

4

ISSN 0233-7673

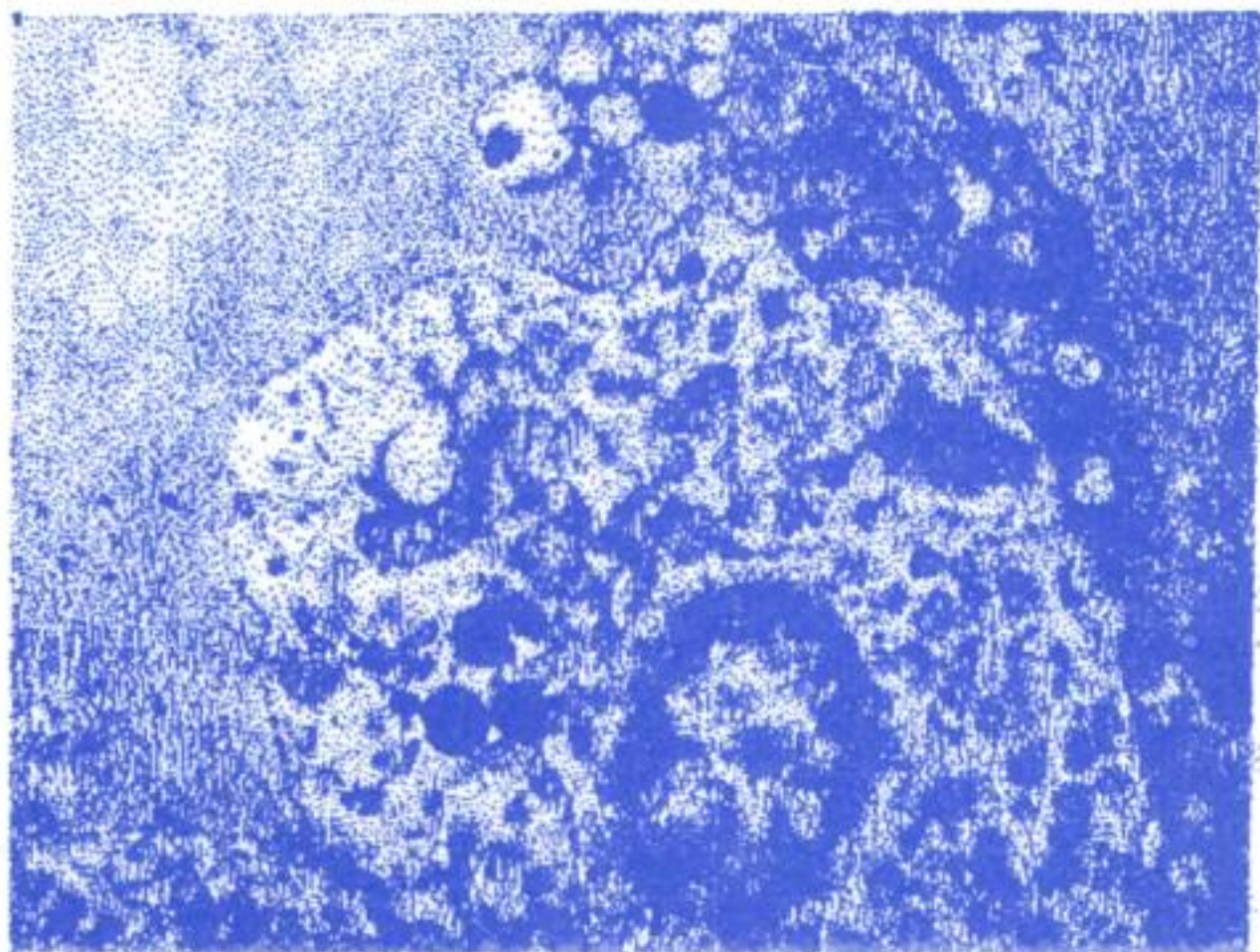
НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ,  
ОТДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ,  
БИОХИМИИ, ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ  
И КЛИНИЧЕСКОЙ ФИЗИОЛОГИИ

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ  
И КРИОМЕДИЦИНЫ



1996

# ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ



ПОИСК АЛЬТЕРНАТИВНЫХ  
ПУТЕЙ МОДИФИКАЦИИ  
АЛЛОМИЕЛОТРАНСПЛАНТАТА.

Т.Г.Дубрава, Е.Д.Луценко, О.В.Грищенко,  
Н.Н.Кушниренко, Е.В.Опанасенко, Т.А.Калиниченко

КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЮ  
ИММУНОРЕАКТИВНОСТИ

ЧАСТЬ I. А.Н.Гольцев,

Л.В.Останкова,

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СВЕРХСПИРАЛЬНОЙ ДНК  
ЭУКАРИОТ В.И.Ващенко

БИОФИЗИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ЯВЛЕНИЯ ГИПЕРТОНИЧЕСКОГО  
КРИОГЕМОЛИЗА Е.А.Гордиенко, С.Е.Коваленко

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), Ю.Ф.Пастухов (Санкт-Петербург), Е.Н.Попов (ответственный секретарь, Харьков), А.Роу (США), Б.П.Сандомирский (Харьков), А.С.Снурников (Харьков), С.Сумида (Япония), А.А.Цуцаева (Харьков), С.А.Шалимов (Киев), Э.З.Эмирбеков (Махачкала), Т.Н.Юрченко (Харьков)

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

Editor-in-Chief V.I.Grishchenko

## EDITORIAL BOARD

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

## EDITORIAL COUNCIL

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

4

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

1996

# ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

## СОДЕРЖАНИЕ

### ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

- Гольцев А.Н., Дубрава Т.Г., Луценко Е.Д., Грищенко О.В., Останкова Л.В., Кушниренко Н.Н., Опанасенко Е.В., Калиниченко Т.А. Поиск альтернативных криоконсервированию путей модификации иммунореактивности алломиелотрансплантата. Часть I. . . . . 3
- Ващенко В.И. Методы исследования сверхспиральной ДНК эукариот . . . . . 16
- Гордиенко Е.А., Коваленко С.Е. Биофизическая модель явления гипертонического криогемолиза . . . . . 24
- Бабийчук Л.А., Землянских Н.Г. Влияние полиэтиленоксида-1500 и температуры на особенности модификации мембран эритроцитов . . . . . 32
- Шейхова Р.Г., Пашаева Д.Э., Эмирбекова А.А., Эмирбеков Э.З. N-ацетилированные дикарбоновые аминокислоты в мозге при гипотермии . . . . . 38
- Кубарко А.И., Застенская И.А., Юсипова Н.А., Гуревич Г.Л. Использование направленной коррекции обмена липидов при гипотермии с целью повышения устойчивости животных к холоду . . . . . 41

### КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

- Ром-Бугославская Е.С., Комарова И.В., Караченцев Ю.И., Капрельянц А.С., Гонкалова И.В. Влияние локального криовоздействия на функциональные возможности эутиреоидной и тиреотоксической щитовидной железы человека в условиях *in vitro* . . . . 45

### КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- Межидов С.Х. Повреждение эритроцитов при ресуспендировании в гипертонических растворах . . . . . 51
- Опанасенко Е.В. Возможность использования криоконсервирования и ткани эмбриональной печени для снижения иммунного конфликта при трансплантации гистонесовместимого костного мозга . . . . . 52
- Ахмад М.М. Влияние условий выделения подвижной фракции спермиев из эякулята человека и хранения ее при 8 °С на морфофункциональные свойства гамет . . . . . 54
- Зинченко А.В. О некоторых механизмах электрической поляризации растворов при замерзании . . . . . 55

### ХРОНИКА

© Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной Академии наук Украины, "Проблемы криобиологии", 1996

This One



SLKU-C92-RQLL

Матеріал, захищений авторським правом

## CONTENTS

### THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Goltsev A.N., Dubrava T.G., Lutsenko E.D., Grischenko O.V., Ostankova L.V., Kushnarenko N.N., Opanasenko E.V., Kalinichenko T.A.</i> A search for the methods of modification of the immune reactivity of the allomyelotransplant, which are alternative to cryopreservation. Part I. . . . . | 3  |
| <i>Vaschenko V.I.</i> Methods of studying suprahelical eucaryotic DNA . . . . .                                                                                                                                                                                                                  | 16 |
| <i>Gordienko E.A., Kovalenko S.E.</i> A biophysical model of the phenomenon of hypertonic cryohemolysis . . . . .                                                                                                                                                                                | 24 |
| <i>Babiychuk L.A., Zemlyanskikh N.G.</i> The effect of polyethylene oxide-1500 and temperature on the peculiarities of the RBC membrane modification . . . . .                                                                                                                                   | 32 |
| <i>Sheikhova R.G., Pashayeva D.E., Emirbekov A.A., Emirbekov E.E.</i> N-acetylated dicarboxylic amino acids in the brain during hypothermia . . . . .                                                                                                                                            | 38 |
| <i>Kubarko A.I., Zastenskaya I.A., Yusipova N.A., Gurevich G.L.</i> Application of a directed correction of lipid exchange during hypothermia with the aim of increasing the resistance of animals to cold . . . . .                                                                             | 41 |

### CRYOPRESERVATION OF BIOSYSTEMS

|                                                                                                                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Rom-Bugoslavskaya E.S., Komarova I.V., Karachentsev I.V., Kaprelaynts A.S., Gopkalova I.V.</i> The action of local cryotreatment on the functional abilities of euthyroid and thyrotoxic human thyroid gland <i>in vitro</i> . . . . . | 45 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

### BRIEF COMMUNICATIONS

|                                                                                                                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Mezhidov S.Kh.</i> RBC damage at resuspending in hypertonic solutions . . . . .                                                                                                                  | 51 |
| <i>Opanasenko E.V.</i> Possible application of cryopreservation and hepatic embryonic tissue for reducing the immune conflict during transplantation of the histoincompatible bone marrow . . . . . | 52 |
| <i>Akhmad M.M.</i> The effect of conditions of isolation of the motile fraction of spermia from human ejaculate and its storage at 8 °C on the morphofunctional properties of gametes . . . . .     | 54 |
| <i>Zinchenko A.V.</i> On some mechanisms of electrical polarization of solutions at freezing . . . . .                                                                                              | 55 |

### CHRONICLE

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

Адрес редакции:

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

Научный редактор *В.И.Луговой*

Редактор *Л.А.Рябинина*

Компьютерный набор и верстка: *Л.А.Рябинина, А.М.Шаталов*

Подп. в печ. 03.03.97. Формат 70x108/16. Бум. тип. № 1. Печать офсетная. Усл. печ. л. 4,9.  
Тираж 350 экз. Цена договорная. Оригинал-макет подготовлен в Институте проблем  
криобиологии и криомедицины НАН Украины. Отпечатано в Харьковской городской  
типографии № 16, 310003, Харьков, ул. Университетская, 16. Зак. **Р-105**

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

**ПОИСК АЛЬТЕРНАТИВНЫХ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЮ  
ПУТЕЙ МОДИФИКАЦИИ ИММУНОРЕАКТИВНОСТИ  
АЛЛОМИЕЛОТРАНСПЛАНТАТА. ЧАСТЬ I**

Проведена оценка иммуномодулирующей активности продуктов фетоплацентарного комплекса (ПФПК) в отношении лимфогемопоезического комплекса интактных и облученных реципиентов с трансплантатом аллогенного костного мозга. Исследованы характер и особенности влияния ПФПК на способность алломиелотрансплантата инициировать реакцию "трансплантат против хозяина" (РТПХ).

Трансплантация костного мозга занимает должное место в арсенале комплексных мероприятий лечения различных гемато- и иммунопатологических состояний организма. При этом основная роль в общем объеме составляющих миелотрансплантации принадлежит аллогенному материалу [39], применение которого связано с одной из серьезных проблем, ограничивающих успешную трансплантацию, — развитием РТПХ в острой или хронической формах [4, 44]. Почти 30 лет назад был определен основной субстрат донорского миелотрансплантата — Т-лимфоциты, инициирующие РТПХ [31]. Таким образом, основные попытки контроля развития РТПХ в эксперименте и клинике были предприняты в отношении донорских Т-клеток, а именно их элиминации или инактивации [9]. До настоящего времени придерживаются мнения, что всякая процедура, приводящая к снижению соотношения Т-лимфоцит/стволовая клетка, ведет к снижению риска развития РТПХ [27]. В то же время получены данные, доказывающие участие в инициации РТПХ не только антиген-реактивных Т-клеток, но и ряда акцессорно-регуляторных элементов кроветворного микроокружения реципиента и миелотрансплантата [4], определяющих функциональный статус самих лимфоцитов [9, 14], т. е. изменяя качественные и количественные параметры обоих типов микроокружения, можно изменить иммунореактивность Т-клеток и в целом миелотрансплантата.

Основные методические подходы на пути снижения активности иммунореактивности миелотрансплантата сводятся к следующему: обработка костного мозга *in vivo* (донора костного мозга); обработка реципиента костного мозга (после миелотрансплантации); и, наконец, обработка костного мозга *in vitro* (серологическая, фракционирование, воздействие физико-химическими факторами). В плане рассматриваемой в работе проблемы принципиально важен именно последний тезис, так как криоконсервирование является не чем иным, как обработкой костного мозга *in vitro*. Выполненный нами ранее цикл исследований [7, 18] убедительно продемонстрировал способность криоконсервирования выступать в роли селективного фактора, элиминирующего из костного мозга различные клеточные субпопуляции. Другими словами, функциональное состояние миелотрансплантата по разному изменяется при различных режимах криоконсервирования. Эти результаты совпали с данными, полученными нашими коллегами на других биологических объектах [11, 45], что явилось предпосылкой для выполнения нами работы по изучению влияния различных режимов криоконсервирования на иммунореактивность алломиелотрансплантата [9]. Оказалось, что при определенных режимах криоконсервирования удастся добиться снижения выраженности течения РТПХ-синдро-

ма. Однако при таких режимах криоконсервирования снижается гемопозитическая активность костного мозга, т. е. возникает необходимость поиска методических подходов с использованием соответствующих экзогенных факторов, позволяющих при минимизации РТПХ-активности костного мозга обеспечить сохранность его защитного потенциала.

Как известно, РТПХ была изучена впервые у мышей [6, 21, 27]. Даже при отличии пар донор-реципиент по H-2 локусу, реакция протекала как поздняя (вторичная болезнь) и не всегда определялась у 100% реципиентов [4]. Trierfelder и Rodt [43] назвали эту обманчиво спокойную систему “относительно супрессированной РТПХ”, указывая на нестабильность состояния реципиента и неясность определяющих это состояние факторов. По-видимому, эта формулировка является подсказкой к выбору тактики управления развитием и течением РТПХ. Действительно, возможность подавления интенсивности течения синдрома (как его острой так, и хронической формы) была продемонстрирована многими авторами при использовании широкого спектра цитостатиков, выступающих в роли иммунодепрессантов [13, 30, 41, 42]. Положительным моментом их действия является способность ингибировать начальную ступень Т-клеточной активации, ведущей к репрессии раннего включения генов, ответственных за продукцию ИЛ-2 и рецепторов к ним [3]. Однако применение этих препаратов влечет за собой развитие ряда осложнений. Прежде всего, это: неспецифическая ингибиция гемопозеза, повышение частоты встречаемости в лимфомиелоидных органах реципиентов вируса Эпштейн-Бара [33], возможность отторжения миелотрансплантата, снижение скорости его приживления [9], — что заставляет искать альтернативные пути модуляции иммунореактивности алломиелотрансплантата.

Анализ состояния иммунных взаимодействий при беременности показывает, что в роли таких модификаторов могут выступать продукты фетоплацентарного комплекса (ПФПК). Широкий спектр так называемых “белков зоны беременности” проявляет активность неспецифических иммуномодуляторов [28, 29]. Источником этих субстанций является не только иммунокомпетентная система материнского организма, но и плодная ткань, несущая лимфогемопозитическую функцию. Так, эмбриональная печень на протяжении почти всего срока беременности является основным местом синтеза одного из важнейших триггерных факторов активации неспецифической иммуносупрессии — альфа-фетопротейна (АФП) [16]. Одновременно с 6-й по 12–16-ю недели гестации печень проявляет максимальную гемопозитическую активность [11]. В этом плане весьма обнадеживающим представляется применение клеток эмбриональной печени (КЭП) с аллогенным, криоконсервированным в соответствующих режимах, костным мозгом с целью минимизации РТПХ и восполнения его сниженной гемопозитической функции. Высказывается предположение, что отсутствие РТПХ-активности аллогенных КЭП обусловлено именно продукцией ею АФП [12]. Аналогичная точка зрения, т. е. о Т-супрессор-индуцирующей способности, существует и относительно других эмбриональных субстанций, что подтверждают результаты многих работ, выполненных с использованием этих субстанций *in vitro* и *in vivo* [10]. Вместе с тем для разработки клинических программ совместного применения алломиелотрансплантата и эмбриональных тканей необходимо создание плацдарма экспериментальных моделей, позволяющих проанализировать патофизиологические основы иммуномодулирующей активности ПФПК.

На основании сказанного выше в задачи данного исследования входило изучение иммуномодулирующей активности ПФПК (клетки эмбриональной печени и экстракт плаценты — КЭП и ЭП) в отношении иммунокомпетентной сферы “интактных” реципиентов, а также иммунореактивности миелотрансплантата в организме аллогенного реципиента.

В работе использованы мыши Balb/c, CBA, (CBAxС57Bl) F<sub>1</sub> 12–14-недельного возраста, массой 18 г. Эмбриональный материал: а) КЭП 12–13-суточных сроков гестации; б) ЭП. ЭП был получен в соответствии с методическими рекомендациями “Приготовление, хранение и клиническое применение криоконсервированной взвеси плаценты для ректального способа применения” и предоставлен нам его разработчиками (В.И.Грищенко, Т.Ф.Морозова, А.М.Воротилин, А.М.Моисеев, О.В.Липина, А.Т.Ходько, О.В.Грищенко, О.С.Прокопюк). КЭП вводили в аллогенной системе; реципиентами были мыши Balb/c, донорами КЭП — мыши CBA. Подсчет ядерных клеток в исследуемых органах, оценку их сохранности после соответствующей обработки проводили по общепринятой методике [17]. В комплимент-зависимой цитотоксической реакции с моноклональными антителами (МАТ) определяли содержание в лимфогемопозитических органах клеток с фенотипом L3T4<sup>+</sup> (Т-хелперы (Тх)) и LyT-2<sup>+</sup> (Т-супрессоры (Тс)). МАТ к данному типу антигена были получены из лаборатории иммунохимии Института канцерогенеза РАМН. Степень изменения функциональной активности иммунокомпетентных клеток (ИКК) мышей-реципиентов ПФПК оценивали по активности их бластной трансформации с фитогемагглютинином (ФГА), а также способности инициировать острую РТПХ в организме сублетально облученного аллогенного реципиента. В первом случае оценивали пролиферацию клеток селезенки по включению <sup>3</sup>H-тимидина [27], во втором — по показателям, характеризующим развитие острой РТПХ (оценка клеточности тимуса, селезенки, костного мозга, масса животных и выживаемость). Инициировали острую РТПХ в модели пересадки сублетально облученным (500 р) мышам линии Balb/c клеток только лимфоузлов мышей линии CBA в дозе 5x10<sup>7</sup>/мышь или совместно с КЭП или ЭП этой же линии мышей.

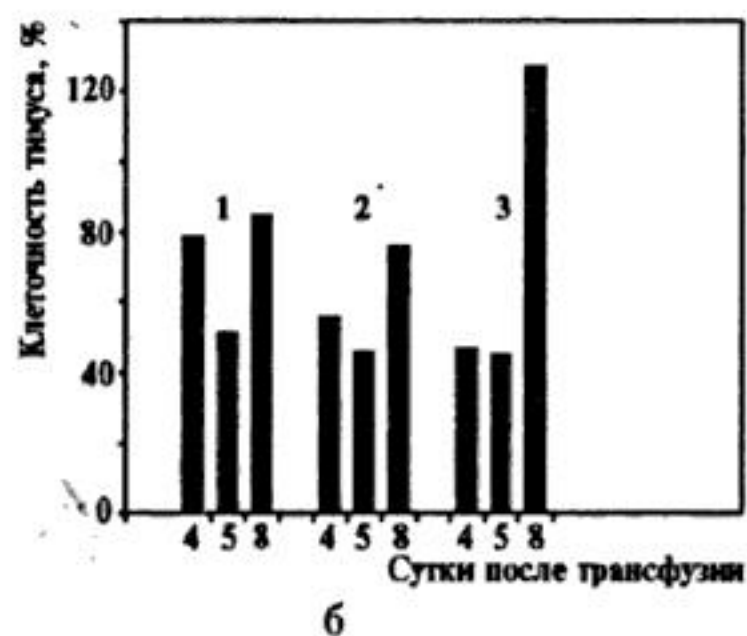
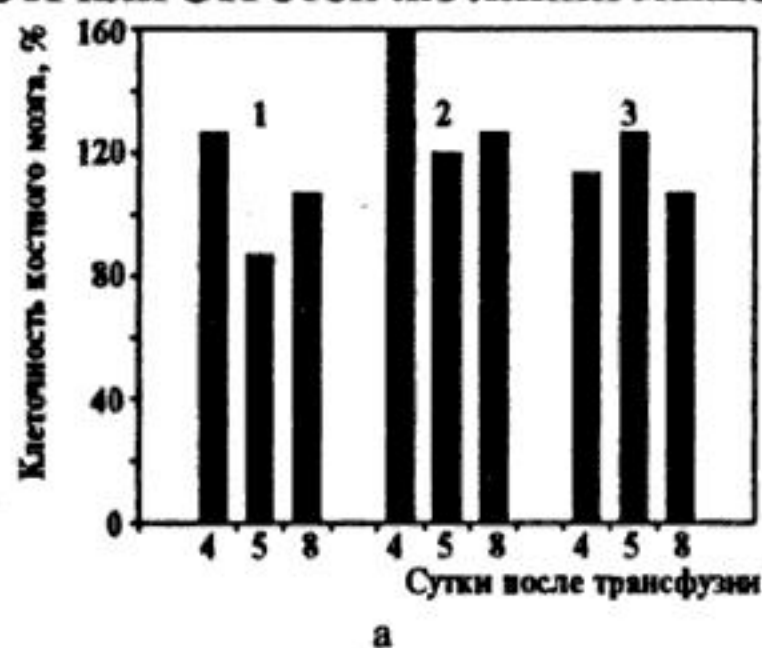
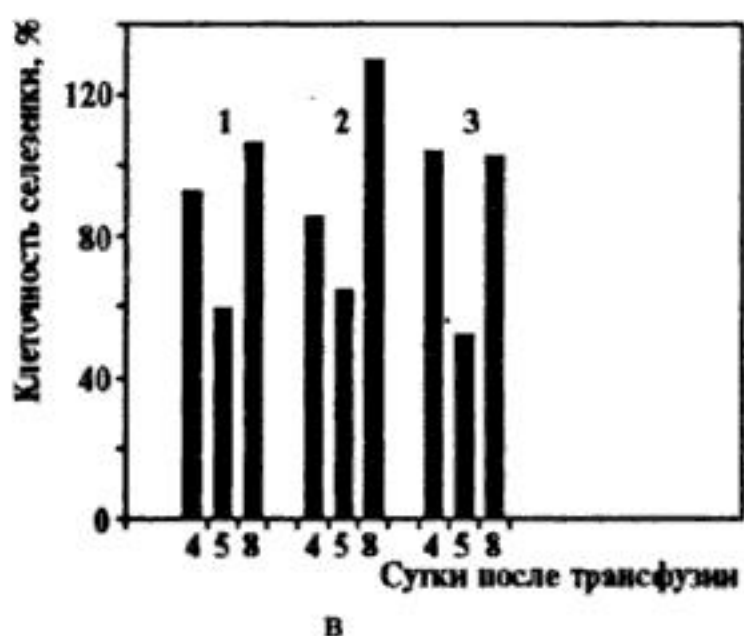


Рис. 1. Клеточность органов после трансфузии КЭП в различных концентрациях: 1 — 1x10<sup>6</sup>/мышь, 2 — 5x10<sup>6</sup>/мышь, 3 — 1x10<sup>7</sup>/мышь

При сравнительном изучении степени влияния ПФПК на иммунореактивность аллогенного костного мозга летально облученным мышам (CBAxС57Bl)F<sub>1</sub> внутривенно вводили нативные или криоконсервированные миелокариоциты мышей линии CBA в дозе 5x10<sup>6</sup>/мышь совместно с КЭП и ЭП или самостоятельно. Выраженность интенсивности развития “вторичной болезни” оценивали по общепринятым показателям, детально изложенным в нашей предыдущей статье [9]. В указанной работе подробно изложены и другие условия выполнения экспериментальных исследований, касающихся замораживания костного мозга, облучения животных и т.д. ПФПК вводили на 14–15-е сут трансплантационного периода. Полученные данные обработаны статистически [2].



Полученные нами результаты (неопубликованные данные) свидетельствуют о том, что ПФПК (как КЭП, так и ЭП) обладают регуляторной активностью в отношении кроветворных предшественников донорского костного мозга в облученном организме. Вместе с тем фундаментальное и прикладное значение имеет оценка характера модулирующей активности этих субстанций в условиях различного исходного состояния лимфогемопозитического комплекса. Такой метод применения ПФПК является одним из вариантов так называемой “тканевой терапии”, и закономерен интерес оценки состояния гемопозитической и иммунокомпетентной сферы реципиентов при такой терапии.

Первая часть работы в основном посвящена оценке иммуномодулирующей активности ПФПК в организме “интактного” реципиента или на фоне воздействия сублетальных доз ионизирующего излучения. Представленные в табл. 1 и на рис. 1 данные свидетельствуют о том, что введение в интактный организм ПФПК, в отличие от введения облученным реципиентам миелотрансплантата, существенно не влияло на медуллярное кроветворение. Это соответствует представлениям о том, что пересаженная гемопозитическая ткань (КЭП) в условиях конкуренции за места функционирования в кроветворном микроокружении интактного реципиента не приживляется и не пролиферирует [24]. Кроме того, даже при наличии в КЭП и ЭП определенных регуляторных активностей (клеток, цитокинов), они не способны в медуллярном кроветворном микроокружении интактного организма конкурировать с местными регуляторами.

Т а б л и ц а 1

Показатели, характеризующие острую РТПХ

| Группы животных                                | Выживаемость<br>10 сут, % | Масса животных    |                   |                   | Масса селезенки<br>на 10-е<br>сут, мг | Клеточность на<br>орган $\times 10^6$ 10 сут |                  |                  | ИС   |
|------------------------------------------------|---------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------------------------|----------------------------------------------|------------------|------------------|------|
|                                                |                           | 3 сут             | 7 сут             | 10 сут            |                                       | С                                            | Т                | КМ               |      |
| Облучение+лимф. клетки, I-я                    | 25                        | 33,7<br>$\pm 1,3$ | 29,3<br>$\pm 1,6$ | 23,8<br>$\pm 1,5$ | 47,0 $\pm 3,6$                        | 5,5<br>$\pm 0,3$                             | 1,0<br>$\pm 0,1$ | 3,4<br>$\pm 0,2$ | 1,97 |
| Облучение+лимф. клетки+КЭП, II-я               | 50                        | 34,9<br>$\pm 2,0$ | 29,3<br>$\pm 1,7$ | 25,3<br>$\pm 1,4$ | 40,0 $\pm 3,6$                        | 7,6<br>$\pm 0,4$                             | 1,4<br>$\pm 0,1$ | 2,6<br>$\pm 0,1$ | 1,58 |
| Облучение+лимф. клетки+ЭП (0,1 мл/мышь), III-я | 68                        | 31,8<br>$\pm 1,9$ | 29,6<br>$\pm 1,7$ | 26,6<br>$\pm 1,8$ | 35,1 $\pm 2,8$                        | 7,1<br>$\pm 0,2$                             | 2,1<br>$\pm 0,1$ | 2,0<br>$\pm 0,1$ | 1,32 |
| Облучение+лимф. клетки+ЭП (0,5 мл/мышь), IV-я  | 60                        | 34,2<br>$\pm 1,7$ | 30,7<br>$\pm 1,7$ | 27,6<br>$\pm 1,4$ | 38,4 $\pm 1,5$                        | 7,4<br>$\pm 0,3$                             | 2,0<br>$\pm 0,1$ | 2,3<br>$\pm 0,1$ | 1,39 |
| Контроль, облучение, V-я                       | 80                        | 28,2<br>$\pm 1,3$ | 27,7<br>$\pm 1,4$ | 29,5<br>$\pm 1,7$ | 37,0 $\pm 2,8$                        | 7,5<br>$\pm 0,5$                             | 2,8<br>$\pm 0,1$ | 2,1<br>$\pm 0,1$ | 1,25 |
| Контроль, интактные мыши, VI-я                 | 100                       | 33,5<br>$\pm 1,8$ | —                 | —                 | 40,1 $\pm 2,0$                        | 150<br>$\pm 3,2$                             | 40<br>$\pm 2,8$  | 15<br>$\pm 2,1$  | 1,19 |

Примечание. ИС – индекс селезенки, КЭП – клетки эмбриональной печени, ЭП – экстракт плаценты, С – селезенка, Т – тимус, КМ – костный мозг

Принципиально важной является ответная реакция других органов лимфогемопозитической системы на введение ПФПК. В тимусе уже с 4-х сут отмечалось развитие гипоплазии органа, растущей с увеличением дозы вводимых КЭП. Наиболее выраженная гипоплазия тимуса отмечалась на 6-е сут посттрансплантационного периода. Динамика снижения и восстановления клеточности тимуса, достигающая уже к 8-м сут близких контролю показателей, сходна с признаками постстрессорного состояния этого органа [10, 19]. Известно, что внутривенное введение в интактный организм клеточных суспензий в высоких дозах является стрессорным фактором, обуславливающим снижение клеточности тимуса за счет гибели кортизончувствительных тимоцитов корковой зоны органа. Пути реализации данного процесса могут быть различными, включая эмоционально-болевой фактор и участие иммунной системы, отвечающей продукцией цитокинов [20], активирующих состояние ЦНС. Общеизвестно наличие на клетках ЦНС рецепторов к ИЛ-1 [15], и установлена зависимость степени активации этих клеток от продукции данного медиатора клетками макрофагальной системы. Для последних, являющихся фактором

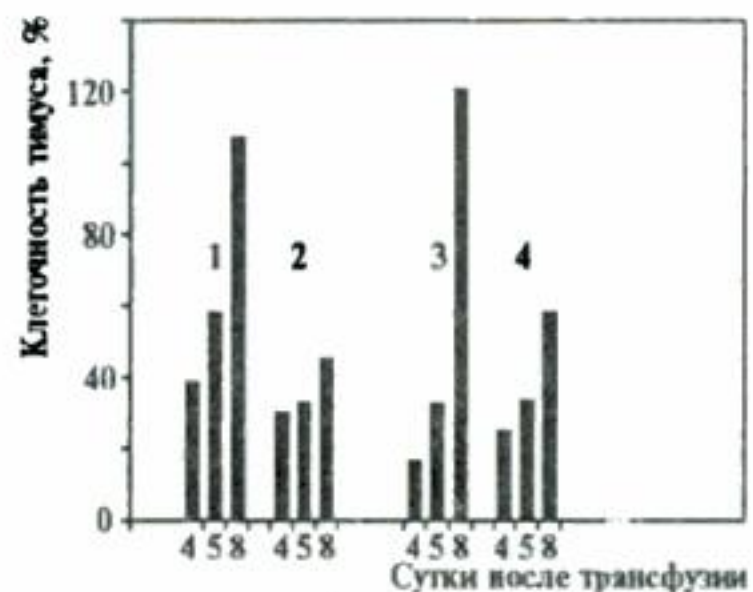
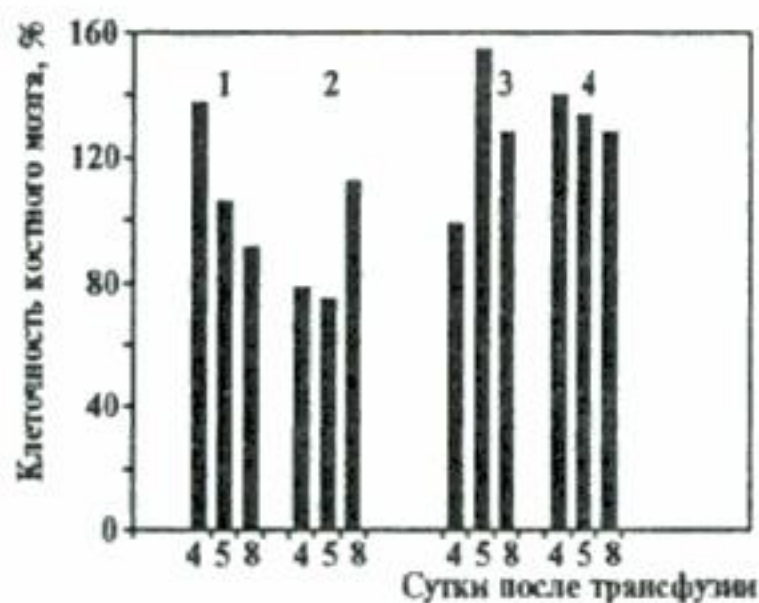
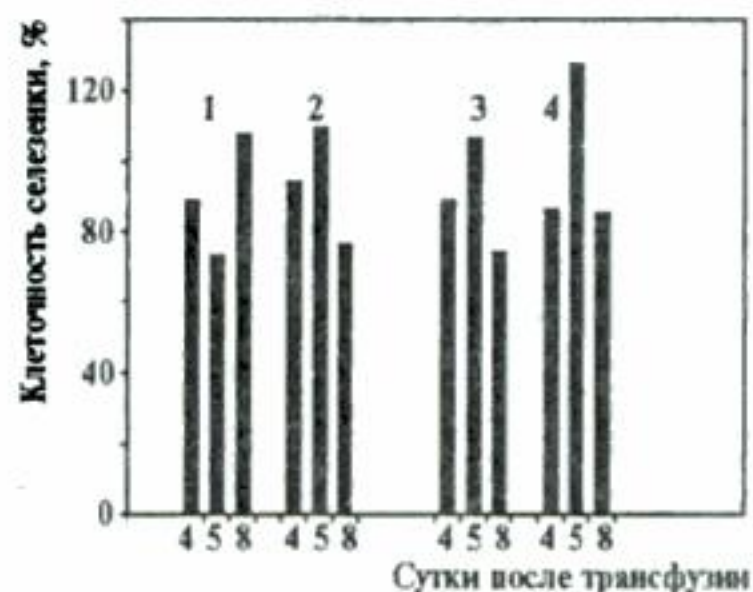


Рис. 2. Клеточность органов после трансфузии клеток взрослой печени и костного мозга: 1 – клетки взрослой печени ( $1 \times 10^6$ /мышь), 2 – то же –  $5 \times 10^6$ /мышь, 3 – клетки костного мозга ( $1 \times 10^6$ /мышь), 4 – то же –  $5 \times 10^6$ /мышь



неспецифической защиты организма [18], введение как аллогенных, так и сингенных (аутологичных) клеток является триггерным фактором повышения функциональной активности [24]. Следовательно, активность развития посттрансфузионного стрессиндуцированного опустошения тимуса будет, очевидно, определяться рядом причин:

дозой вводимых клеток, степенью гетерогенности суспензии, особенностями поверхностных антигенных структур мембран вводимых клеток. Клетки печени по степени экспрессии этих Н-антигенов лишь незначительно уступают наиболее “нагруженным” ими лимфоцитам периферической крови и селезенки [11, 15]. Подтверждением точки зрения о стрессиндуцированной природе опустошения тимуса являются результаты, полученные при введении животным клеток взрослой аллогенной печени и костного мозга, а также ЭП (рис. 2, 3). Трансфузия обеих клеточных суспензий вызывает еще более выраженную гипоплазию тимуса, особенно при введении гетерогенной популяции миелокариоцитов, тогда как введение ЭП (в большей степени бесклеточной фракции) такого эффекта не вызывало. Более того, при определенных дозах и в определенные сроки введения ЭП оказывали стимулирующее действие в отношении клеточности тимуса. В последнее время появились данные о том, что клетки плаценты активно продуцируют ИЛ-1, являющийся одним из ключевых медиаторов иммунной системы [40], выступающий в зависимости от концентрации в роли стимулятора нормальной родовой деятельности или же обуславливающий развитие патологической ситуации. Вместе с тем ИЛ-1 является стимулятором пролиферации тимоцитов у мышей [22]. Следовательно, наблю-

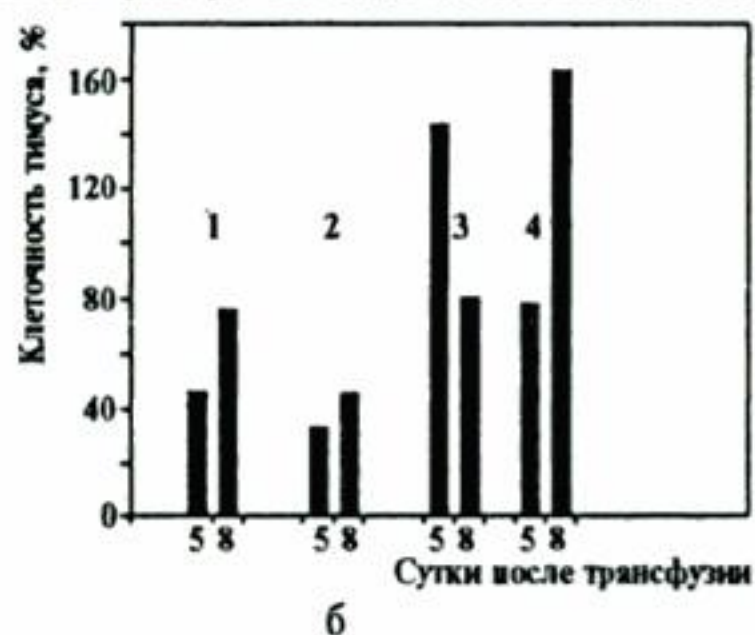


Рис. 3. Клеточность органов после трансфузии продуктов ПФПК: 1 – клетки эмбриональной печени ( $5 \times 10^6$ /мышь), 2 – клетки взрослой печени ( $5 \times 10^6$ /мышь), 3 – экстракт плаценты (0,1 мл/мышь), 4 – экстракт плаценты (0,5 мл/мышь)

даемый нами эффект может быть результатом действия ИЛ-1, присутствующего в ЭП.

Подобно происходящему в тимусе, выраженное снижение клеточности отмечалось и в селезенке, но лишь на 6-е посттрансфузионные сутки и только при введении эмбрионального материала, т. е. гипоплазия селезенки на 6-е сут после введения КЭП имеет, по-видимому, не стрессиндуцированную природу. Селезенка в организме млекопитающих играет важную роль фильтрующего аппарата: она элиминирует циркулирующие в крови различные частицы, клетки и их обломки. Кроме того, лимфоидный аппарат селезенки реализует иммунные реакции, выраженность которых зависит от характера антигена и пути его поступления в организм. Она больше вовлекается в иммунный ответ именно при внутривенном введении антигена. Иммунные реакции приводят к значительным морфологическим и функциональным изменениям клеточных элементов в селезенке. Показано, например, [15], что после внутривенного введения антигена в селезенке происходит трансформация антителообразующих клеток и клеток-супрессоров. Однако тот факт, что снижение клеточности селезенки имело место только при введении эмбрионального аллогенного материала, говорит о причастности к этому процессу других, неантигениндуцированных механизмов развития патофизиологического процесса. С этим согласуются и данные о клеточности селезенки после введения ЭП (рис. 3). При этом опять же прослеживается влияние дозозависимого и временного факторов в проявлении эффекта.

Не исключено, что данная феноменология связана со способностью эмбриональных субстанций проявлять активность в отношении определенных субпопуляций Т-клеток, в частности Тс [29]. Основным плацдармом формирования зрелых элементов этого ряда является именно селезенка.

Т а б л и ц а 2

Содержание клеток фенотипа L3T4<sup>+</sup> и Ly-T-2<sup>+</sup> в лимфогемопозитических органах мышей Bald/c после введения ПФПК

| Вводимый материал, группа животных | Сутки после введения | Тимус                |            |      | Лимфоузлы            |            |     | Селезенка            |            |     |
|------------------------------------|----------------------|----------------------|------------|------|----------------------|------------|-----|----------------------|------------|-----|
|                                    |                      | Содержание клеток, % |            | ИРИ* | Содержание клеток, % |            | ИРИ | Содержание клеток, % |            | ИРИ |
|                                    |                      | L3T4 (Tx)            | LyT-2 (Tc) |      | L3T4 (Tx)            | LyT-2 (Tc) |     | L3T4 (Tx)            | LyT-2 (Tc) |     |
| КЭП                                | 5                    | 50,0                 | 58,0       | 0,9  | 52,5                 | 27,0       | 1,8 | 30,5                 | 5,5        | 5,5 |
| 5x10 <sup>6</sup> , I-я            | 8                    | 51,0                 | 42,0       | 1,2  | 40,8                 | 21,6       | 1,9 | 17,2                 | 22,1       | 0,8 |
| КВП**                              | 5                    | 34,5                 | 25,5       | 1,35 | 46,3                 | 18,5       | 2,5 | 26,1                 | 8,5        | 3,2 |
| 5x10 <sup>6</sup> , II-я           | 8                    | 58,0                 | 29,0       | 2,0  | 17,0                 | 21,0       | 0,8 | 18,5                 | 8,5        | 2,2 |
| ЭП                                 | 5                    | 76,0                 | 57,0       | 1,3  | 50,0                 | 21,0       | 2,4 | 28,4                 | 8,7        | 3,3 |
| 0,1 мл/мышь, III-я                 | 8                    | 81,0                 | 24,0       | 3,4  | 35,0                 | 25,0       | 1,4 | 32,1                 | 36,0       | 0,9 |
| ЭП                                 | 5                    | 73,0                 | 68,0       | 1,1  | 52,0                 | 28,0       | 1,8 | 30,5                 | 9,0        | 3,4 |
| 0,5 мл/мышь, IV-я                  | 8                    | 84,0                 | 42,0       | 2,0  | 22,0                 | 28,0       | 0,8 | 14,1                 | 41,0       | 0,3 |
| Контроль, V-я                      | —                    | 54,5                 | 19,5       | 2,8  | 31,5                 | 16,5       | 1,9 | 20                   | 6,5        | 3,2 |

Примечание. \* – ИРИ – иммунологический индекс (соотношение Тх:Тс), \*\* – КВП (клетки взрослой печени) использованы как дополнительный контроль, ЭП – экстракт плаценты, контроль – интактные мыши. Представленный числовой материал содержания клеток в органах отражает результаты цитотоксического теста взаимодействия клеток соответствующего органа с указанными моноклональными антителами. Доверительный интервал в группах не превышал 2,5–3%.

С помощью МАТ к LyT-2 и L3T4 антигенам нами была проведена оценка фенотипических характеристик Т-лимфоцитов центральных и периферических лимфоидных органов реципиентов ПФПК. Как видно из табл. 2, распределение клеток в тимусе, лимфоузлах и селезенке с фенотипами L3T4<sup>+</sup> и LyT-2<sup>+</sup>, соответственно принадлежащими к субпопуляциям Тх и Тс, в контрольной группе используемых в эксперименте животных соответствует данным литературы. При введении животным ПФПК динамика изменения их концентрации зависела от характера вводимого ПФПК и времени определения клеточных субпопуляций. В тимусе, на фоне стрессиндуцированной введением клеточных суспензий инволюции органа, на 5–8-е сут отмечалась четкая тенден-

ция к увеличению количества клеток, экспрессирующих двойной фенотипический маркер.

Такая же закономерность прослеживалась и после введения интактным животным другой эмбриональной субстанции — ЭП, когда изменение клеточности органа наблюдалось в несколько ином плане. За некоторым исключением, суммарный показатель  $LyT-2^+$  и  $L3T4^+$  существенно превышал контрольные показатели. В этой связи необходимо подчеркнуть два существенных момента. Во-первых, значительное повышение в органе  $LyT-2^+$  клеток, и, во-вторых, почти полуторакратное увеличение содержания  $L3T4^+$  клеток при введении ЭП. При этом содержание клеток обоих фенотипов в этих группах (III, IV) находилось в обратной зависимости от времени введения ЭП. Складывается впечатление, что вводимые ПФПК (как КЭП, так ЭП) могут серьезно конкурировать с гормонами тимуса в способности модифицировать структурно-функциональное состояние тимоцитов. Не исключено, что механизм такой трансформации реализуется через имеющиеся на тимоцитах рецепторы к ПФПК, подобные тем, которые идентифицированы на Т-клетках периферической крови [28]. Возможно, что изменение фенотипии тимоцитов является подготовительным этапом к изменению содержания определенных клеточных субпопуляций Т-ряда на периферии. По крайней мере, для  $LyT-2^+$  клеток такой характер изменений четко прослеживался в селезенке. На 5-е сут концентрация клеток с таким фенотипом, являющимся характерным маркером Тс [36], существенно не отличалась от контроля. Однако в этот срок достоверно повышался процент  $L3T4^+$  клеток, в результате чего соотношение Тх:Тс увеличивалось до 5,5:1 по сравнению 3,2:1 в контроле. Такая ситуация может отражать начало процесса формирования в селезенке под действием регуляторных факторов ЭП предшественников клеток-супрессоров. Например, идентифицируемые методом розеткообразования Т $\mu$ -клетки включают не только клетки-хелперы, но и индуцируемые супрессорные клетки [15]. Субпопуляция Т $\gamma$ -клеток представлена в основном активированными клетками-супрессорами. Многими авторами указывается на возможность модификации экспрессии данных рецепторов, а также других мембранных характеристик Тх и Тс в зависимости от особых функциональных состояний клеток.

Сказанное находит подтверждение при оценке фенотипических характеристик в более поздние сроки. К 8-м сут количество  $LyT-2^+$ -клеток среди всех спленоцитов резко возрастало, причем при введении ЭП — в значительно большей степени. Другими словами, селезенка как бы накапливала ранее появившиеся в тимусе  $LyT-2^+$ -клетки. Не исключено непосредственное влияние обладающих иммуномодулирующей активностью ПФПК на резистентные селезеночные клетки Т-ряда, трансформирующиеся в  $LyT-2^+$  лимфоциты. Интересно, что повышение концентрации этих клеток, независимо от механизма его обуславливающего, существенным образом отражалось на показателях “иммунорегуляторного индекса” (ИРИ), который во всех случаях становился ниже 1, что еще раз подтверждает экспансию клона Т-супрессорных клеток в селезенке.

Таким образом, введение ПФПК сопровождается повышением в определенные сроки посттрансфузионного периода концентрации клеток с фенотипом  $LyT-2^+$ , относящихся к субпопуляции Тс. Однако известно, что между показателем содержания клеток, несущих определенные иммунологические маркеры, и супрессорными или хелперными функциональными активностями четкой зависимости не обнаружено. Иммунорегуляторное действие оказывает только часть клеток, несущих соответствующие маркеры. Такие состояния, когда клетки, не обладая функциональной активностью иммунорегуляторных единиц, все же являются позитивными по исследуемым маркерам, описаны как часто встречающаяся ситуация при иммунопатологии различного генеза. Например, высокий уровень Т-клеток обнаруживается при системной крас-

ной волчанке, ревматоидном артрите и других аутоиммунных заболеваниях [26, 35], при которых наблюдается утрата активности супрессорного звена иммунитета [23, 38]. Этот феномен приобретает особое значение при отмене иммунологической толерантности к антигенам собственных тканей прежде всего при аутоиммунных растройствах.

Т а б л и ц а 3

Бласттрансформирующая активность клеток селезенки мышей Balb/c после введения ПФПК

| Вводимый реципиентам материал | Доза материала/мышь | Сутки после введения | Активность реакции в сравнении с контролем, % | Ингибирующая активность вводимого материала, % |
|-------------------------------|---------------------|----------------------|-----------------------------------------------|------------------------------------------------|
| КЭП                           | $1 \times 10^6$     | 5                    | 72,8                                          | 27,2                                           |
|                               |                     | 8                    | 77,6                                          | 22,4                                           |
|                               | $5 \times 10^6$     | 5                    | 44,0                                          | 56,0                                           |
|                               |                     | 8                    | 45,0                                          | 55,0                                           |
|                               | $1 \times 10^7$     | 5                    | 36,6                                          | 63,4                                           |
|                               |                     | 8                    | 39,8                                          | 60,2                                           |
|                               | $5 \times 10^7$     | 5                    | 41,4                                          | 58,6                                           |
|                               |                     | 8                    | 47,9                                          | 52,1                                           |
| ЭП                            | 0,1 мл              | 5                    | 20,5                                          | 79,5                                           |
|                               |                     | 8                    | 32,6                                          | 67,4                                           |
|                               | 0,5 мл              | 5                    | 31,0                                          | 69,0                                           |
|                               |                     | —                    | 35,3                                          | 64,7                                           |
| КВП                           | $5 \times 10^6$     | 5                    | 89,6                                          | 10,4                                           |
|                               |                     | 8                    | 94,1                                          | 5,9                                            |
| Контроль                      | —                   | —                    | 100                                           | —                                              |

Примечание. Контролем служили результаты, полученные в реакции спленоцитов интактных мышей той же линии; КЭП – клетки эмбриональной печени, ЭП – экстракт плаценты, КВП – клетки взрослой печени; в РБТ был использован лектин ФГА в концентрации 250 мкг/мл, время культивирования 72 ч.

Исходя из сказанного выше, в следующей серии экспериментов нами был изучен ответ ИКК организма реципиентов ПФПК на неспецифические лектины. Как видно из представленных в табл. 3 данных, бласттрансформирующая активность клеток селезенки реципиентов ПФПК существенным образом изменялась в сравнении с контролем. Введение любой из выбранных концентраций КЭП сопровождалось ингибцией уровня ответа спленоцитов. При этом отмечается выраженный дозозависимый эффект супрессии ответа. Степень ингибиции реакции достигала максимума после введения КЭП в дозе  $1 \times 10^7$ /мышь. Еще более выраженной ингибирующей активностью обладал ЭП с максимальным эффектом в меньшей дозе. При сравнении бласттрансформирующей активности спленоцитов в разные сроки после трансфузии обращает на себя внимание практически идентичная степень ингибиции реакции в 5- и 8-суточных клеточных суспензиях, независимо от дозы вводимых ПФПК. Это достаточно интересный факт, особенно в сопоставлении с результатами оценки динамики изменения субпопуляционного состава Т-клеток в селезенке. Высокая степень ингибиции реакции на 5-е сут на фоне низкой концентрации  $LyT-2^+$ , аналогичной контролю ( $5,5 \pm 0,4\%$  и  $6,5 \pm 0,7\%$  соответственно), дает основание считать возможным проявление супрессорной активности клеток еще не экспрессирующих эти мембранные структуры. Возможно повышение в этот срок в селезенке содержания  $L3T4^+$  клеток, что свидетельствует о развитии в органе первого этапа накопления индуцируемых клеток-супрессоров [5], на начальных стадиях своего формирования экспрессирующих данный маркер.

Как известно, активация супрессорного звена иммунитета отмечается после нагрузки организма большими дозами антигена. Для выяснения, не является ли феноменология поведения иммунокомпетентной сферы реципиентов ПФПК неспецифическим ответом на вводимый антиген, в качестве контроля мышам были введены клетки аллогенной взрослой печени. Оказалось, что в данном случае выраженной ингибиции ответа спленоцитов не наблюдалось. Следовательно, именно эмбриональная ткань способна проявлять моду-

лирующую активность *in vivo* в отношении клеток-супрессоров "интактного" реципиента. Это в полной мере соответствует представлениям о способности эмбриональных тканей проявлять (опосредованно или непосредственно) супрессорную активность в различных модельных системах иммунных реакций [28].

Из полученных данных следует, что персистирующие после введения в организм ПФПК проявляют тропность в отношении и иммунокомпетентной сферы реципиента, активируя Т-супрессорное звено. Данный факт дает основание предполагать возможность проявления аналогичной активности ПФПК и в отношении экзогенных ИКК, а именно, способности ими реализовать РТПХ-активность. С этой целью были выполнены эксперименты, в которых сублетально облученным реципиентам совместно с аллогенными лимфоидными клетками вводили ПФПК. Такие модели являются этапными в общем цикле исследований возможности модуляции иммунореактивности аллогенного костного мозга. В общем, этиопатогенетические основы развития РТПХ при пересадке аллогенного костного мозга у человека и грызунов подобны. Это реакция ИКК миелотрансплантата против чужеродных антигенов хозяина [32]. Принципиальные различия состоят в характере "стартовых потенциалов" того или иного вида миелотрансплантата инициировать синдром. Развитие, в большинстве случаев, острой формы РТПХ при пересадке костного мозга в клинике обусловлено именно присутствием в человеческом миелотрансплантате большого количества иммунореактивных клеток [30]. В этой связи модельным экспериментом оценки иммуномоделирующей активности ПФПК в отношении ИКК как раз и является инициация острой формы РТПХ.

Наиболее общими частыми и характерными клиническими проявлениями острой РТПХ являются снижение массы тела животных, изменение состояния органов лимфоиелоидного комплекса и как интегральный показатель — их гибель. Как видно из результатов, представленных в табл. 1, масса тела у реципиентов лимфоидных клеток (I-я группа) к 10-м сут составляла около 80% от контроля облучения (V-я группа). Примерно такая же динамика изменения данного показателя наблюдалась и в группах мышей, которым аллогенные лимфоидные клетки вводили совместно с КЭП. Более высокие показатели были у реципиентов, которым вводили ЭП. Определение масс селезенки и тела животных на 10-е сут позволило определить индекс селезенки (ИС). Как известно, ИС более 1,3 считается признаком развития спленомегалии, обусловленной РТПХ [6]. У реципиентов I-й группы он составил 1,97, что свидетельствует о развитии у них РТПХ. Совместное введение с иммунокомпетентными клетками КЭП сопровождалось снижением ИС, остающегося, однако, более высоким, чем в контрольной группе (VI-я гр.). Если принять за 100% увеличение ИС в I-й группе в сравнении с VI-й, то совместное введение КЭП снижало этот показатель ровно вдвое. Еще более выраженное снижение ИС отмечалось после введения ЭП. Максимальный эффект проявлялся при введении меньшей из выбранных доз. В данном случае ИС не отличался достоверно от обоих контрольных параметров.

Показатели клеточности лимфоиелоидных органов исследуемых животных также дают определенную информацию о характере развития иммунного конфликта в организме реципиента. Клеточность селезенки на 10-е сут после введения лимфоцитов (I-я гр.), несмотря на значительное увеличение массы органа, была достоверно ниже, чем в V-й группе. Это вполне соответствует представлению о том, что спленомегалия при РТПХ обусловлена не увеличением количества клеток в органе, а увеличением их размеров в результате трансформации малых лимфоцитов в бласты, а также отеком селезенки [37]. У мышей подопытных групп количество спленоцитов было практически аналогично контрольным показателям, что в сопоставлении с массой селезенки еще раз подтверждает ингибицию и течение РТПХ после введения ПФПК. Об

этом свидетельствует и состояние тимуса. Отмечено [6], что тимус наиболее тонко реагирует на развитие РТПХ, отвечая снижением клеточности органа преимущественно за счет корковой зоны. К 10-м сут количество тимоцитов у мышей I-й группы составляло не более 35-37% контрольного уровня (V-я гр.). Атрофия тимуса может быть ответной реакцией органа на стресс, развивающийся как следствие иммуноконфликтной ситуации. Установлено значительное снижение уровня гормонов коры надпочечников в сыворотке животных на фоне развивающейся РТПХ [36]. Ситуация с разрушением тимоцитов непрямым путем при РТПХ дает основание рассматривать синдром как своеобразную иммунологическую тимэктомию. Инволюция тимуса была менее выраженной у мышей с ПФПК. При этом прослеживалась четкая корреляция между показателями ИС и степенью гипоплазии органа в зависимости от вводимого эмбрионального материала. Максимальной ингибирующей активностью в отношении РТПХ обладал ЭП наименьшей концентрации. Большая его доза также оказывала выраженное влияние на интенсивность развития синдрома, но в меньшей степени. Однако в любой концентрации ЭП проявлял более высокую активность, чем КЭП. Это нашло свое отражение и при определении интегрального показателя, характеризующего развитие острой РТПХ, выживаемости реципиентов к 10-м сут. Само по себе облучение обуславливало гибель 20% мышей. Развивающаяся РТПХ при введении лимфоцитов резко сокращала выживаемость реципиентов до 25%. Дополнительное введение ПФПК повышало выживаемость животных, степень которой четко коррелировала с изменениями показателей ИС, массы животных, клеточности исследованных органов. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что КЭП и ЭП обладают выраженной модулирующей активностью в отношении иммунокомпетентной сферы "интактных" реципиентов, а также вводимых им экзогенных ИКК. Результаты показали, что в широком спектре активностей КЭП и ЭП ведущей, безусловно, является активация супрессорного звена иммунитета. Данный факт, в общем, не является исключительным. Ранее сообщалось о способности репродуктивных субстанций белково-пептидной природы регулировать иммунные реакции, в том числе, активировать супрессорное звено иммунитета [10]. Однако во многих работах такой эффект оценивался по результатам модельных экспериментов *in vitro* (РБТ, СКЛ и др.). В наших экспериментах четко установлено повышенное накопление в организме реципиентов ПФПК субпопуляций клеток, фенотипически относящихся к Тс (LyT-2<sup>+</sup>), и, как свидетельствуют функциональные тесты, проявляющих супрессорную активность. Важным является факт однонаправленной модулирующей активности ЭП и КЭП. В задачу работы не входила идентификация активных начал этих тканей, проявляющих иммуномодулирующую активность. По-видимому, это широкий спектр описанных ранее "белков беременности". Все они разделены на трофобластические, ассоциированные с беременностью и фетальные [28].

Способность КЭП проявлять иммуносупрессорную активность, по-видимому, определяется присутствием в этой ткани одного из важнейших триггерных факторов активации Т-супрессорного звена АФП [1]. Мы использовали КЭП 12-13 дней гестации эмбриона, что соответствует примерно середине 2-го триместра беременности у человека [11]. По данным литературы, активный синтез АФП в эмбриональной печени начинается после 12-й недели гестации с максимумом на 14-15-й неделе [11, 16]. Т. е. выбранный нами срок получения КЭП соответствует пику продукции АФП. Показано, что плотный монослой КЭП не способен *in vitro* синтезировать АФП, и лишь клетки на периферии, будучи разобщенными, синтезируют АФП [29]. В наших экспериментах мышам вводили суспензию КЭП, что дает основания предполагать возможную продукцию вводимыми КЭП этого фетального белка. В системе *in vitro* АФП начинает нарабатываться уже спустя 48-50 ч после начала культивиро-

вания гепатоцитов и его объем зависит от количества культивируемых клеток. Об этом свидетельствует и установленный факт зависимости иммуномоделирующей активности от дозы вводимых КЭП (табл. 3). Данные по идентификации субпопуляции Т-клеток в “интактном” организме и с инициацией РТПХ находятся в соответствии с данными о способности АФП генерировать Тс, подавляющие *in vitro* однонаправленную СКЛ [10]. При этом эффект проявляется только при внесении пептида в первые 36 ч культивирования клеток. С учетом приведенной выше информации о временных параметрах начала действия АФП вполне вероятно его участие в минимизации выраженности течения РТПХ. Говоря о проявлении супрессорной активности КЭП, необходимо учитывать возможность участия в реализации эффекта, особенно на ранних этапах посттрансфузионного периода, присутствующих среди КЭП “естественных супрессоров” (ЕС), реализующих широкий спектр иммуносупрессивных реакций [25]. С другой стороны, КЭП обладают выраженной гемопозитической активностью, максимум которой приходится на период 6–12 недель гестации [11]. Отсюда можно сделать важный вывод о возможности использования КЭП разного “возраста” либо как гемопозитической ткани, либо как источника “иммуносупрессивной активности”. В некоторых случаях можно преследовать и ту, и другую цель.

Достаточная информация накоплена в отношении иммуномодулирующей активности ЭП. Способность ЭП модифицировать те или иные типы иммунных реакций связывают со способностью этой ткани синтезировать *in situ* пептиды, относящиеся в основном к бета1-, альфа1- и альфа2-глобулинам, а также субстанции, обладающие гормональной и ферментативной активностью [29].

В общем контексте рассматриваемой в работе проблемы, наиболее интересными являются ТБГ — трофобластический бета1-гликопротеин, альфа2-гликопротеин (альфа2-РАГ), альфа2-макроглобулин (альфа2-РАМ), плацентарный протеин 2 (РР2) и 5 (РР5), плацентарный альфа1-микроглобулин (ПАМГ-1) и альфа2-микроглобулин (ПАМГ-2). Безусловно, нельзя не упомянуть продуцируемые плацентой гормоны белково-пептидной природы, обладающие иммунорегуляторной активностью. Наиболее важными из них являются хорионический гонадотропин (ХГ), плацентарный лактоген (ПЛ), пролактин, хорионический тиреотропный (ХТТГ) и хорионический адренокортикальный (ХАКТГ) гормоны. Среди плацентарных иммунорегуляторных пептидов важное место занимают и опиаты, аналоги нейропептидов головного мозга, главным образом эндорфины и энкефалины. Нет необходимости в представленной работе более подробно анализировать, систематизировать и оценивать их иммуномодулирующую активность. Этой проблеме посвящена соответствующая литература [28]. Хотелось бы отметить, что все указанные выше плацентарные пептиды контролируют практически весь обмен иммунных реакций, включая индукцию генерации клеток-супрессоров, супрессорных факторов, ограничивающих реактивность иммунной системы матери [28]. ЭП является совокупным субстратом, в котором присутствуют перечисленные факторы с оппозитными активностями. Тем не менее наши результаты показывают, что превалирующей в ЭП является иммуносупрессивная активность. Введение ЭП в “интактный” организм вызывает в ИС перераспределение субпопуляций Т-клеток с экспансией Тс. Очевидно, что их активация *in vivo* обуславливает снижение ответа ИКК реципиентов на неспецифические антигены *in vitro*. Наконец, плацентарные пептиды подобно АФП проявляют способность супрессировать активность экзогенных ИКК в модели острой РТПХ. В данном случае не исключена активация Тс как среди ИКК трансплантата, так, хотя и с меньшей вероятностью, среди ИКК реципиента. В любом случае это подтверждает факт наличия на Т-супрессорах и их предшест-

венниках высокоаффинных рецепторов к их “активаторам”, плацентарным пептидам [10].

Неоднократно отмечалось [29], что плацентарные регуляторы иммунных реакций избирательно взаимодействуют с ИКК и влияют на их функцию в зависимости от дозы и, что весьма важно, от срока беременности. Что касается дозозависимых эффектов, то не всегда наши данные четко подтверждали этот тезис. Так, в экспериментах с определением фенотипических признаков Т-клеток показано увеличение концентрации в селезенке  $LyT-2^+$  клеток с увеличением вводимой дозы ЭП. Вместе с тем при оценке функциональной активности ИКК прослеживалась, хотя и в меньшей степени, обратная зависимость. Меньшая доза ЭП оказывала более выраженное супрессивное действие на ИКК в РБТ и проявление РТПХ-активности. Объяснением этому может быть различная “заинтересованность” ИКК в дозе модулятора при структурной и функциональной их трансформации, которые, к тому же, в зависимости от степени зрелости, могут экспрессировать различное количество рецепторов и с различной степенью аффинности к пептидам.

Вопрос оценки степени Т-супрессорной активности плацентарных иммунорегуляторов в зависимости от сроков беременности, подобно фетальному АФП, достаточно интересен и в такой же степени сложен. Безусловно, для клинической практики возможность расширения временного диапазона получения материала ограничена вполне объективными причинами. Однако абсолютно реальна разработка экспериментальных подходов для таких исследований. Началом их могут послужить результаты представленной работы. Мы установили, что продукты ПФПК, полученные даже в определенный срок беременности, проявляют иммуносупрессивное действие в отношении ИКК *in vivo*, в том числе подавляют активность течения острой РТПХ. Данный факт является предпосылкой изучения активности этих субстратов, полученных и в другие сроки беременности, когда их регуляторный потенциал в отношении ИКК будет иным.

Кроме того, ранее нами получены данные о иммуномодулирующей активности криоконсервирования в отношении миелоидной ткани [8, 34]. В связи с этим очевидна необходимость изучения патофизиологических основ совместного применения аллогенных, криоконсервированных в соответствующих режимах миелокариоцитов совместно с ПФПК с целью минимизации иммунного конфликта. Результаты решения данной проблемы будут представлены во II-й части нашей работы.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абелев Г.И. Альфафетопротеин: биология, биохимия, молекулярная генетика // Иммунология. – 1994, N 3. – С. 4–10.
2. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы микробиологических исследований. – Л.: Медицина, 1972. – 180 с.
3. Болотников И.А., Анисимов А.Г. Участие интерлейкина-2 в дифференцировке Т-клеток и развитии неспецифической иммунотоксичности // Иммунология. – 1994, N 2. – С. 17–23.
4. Бутомо Н.В. Трансплантация костного мозга при лучевых поражениях. – М.: Медицина. – 1970, 176 с.
5. Головизин М.В. “Периферилизация” процессов тимической селекции Т-лимфоцитов как причина развития аутоиммунных заболеваний // Иммунология. – 1993, N 5. – С. 4–8.
6. Гольцев А.Н. Сравнительное изучение функциональных свойств деконсервированных и нативных миелокариоцитов в организме облученных реципиентов: Автореф. дис....канд. мед. наук. – Киев, 1978. – 21 с.
7. Гольцев А.Н. Влияние факторов криоконсервирования на иммунобиологические свойства кроветворных клеток костного мозга: Автореф. дис....д-ра мед. наук. ИПКиК АН Украины. – Харьков, 1988. – 35 с.
8. Гольцев А.Н., Останкова Л.В., Дубрава Т.Г. и др. Функциональная активность криоконсервированных кроветворных клеток (КОЕ<sub>с</sub>) в зависимости от компонентного состава миелотрансплантата // Пробл. криобиологии. – 1993, N 4. – С. 34–40.

9. Гольцев А.Н., Луценко Е.Д., Останкова Л.В. и др. Возможности криобиологии в решении иммуноконфликтных проблем при пересадке гистонесовместимого костного мозга // Пробл. криобиологии. – 1996, N 2. – С. 3–10.
10. Говалло В.И. Иммунология репродукции. – М.: Медицина. – 1987. – 303 с.
11. Грищенко В.И., Лобынцева Г.С., Вотякова И.А. и др. Гемопозитические клетки эмбриональной печени (эмбриогенез, трансплантация и криоконсервирование). – Киев: Наук. думка, 1988. – 192 с.
12. Грищенко В.И., Парацук Ю.С., Дахно Ф.В. и др. Криобиология и проблема бесплодия. – Киев: Наук. думка, 1990. – 135 с.
13. Гусева С.А. Изменения Т-клеточного звена иммунитета у больных сублейкемическим миелозом на различных стадиях патологического процесса // Гематол. и трансфузиол. – 1995, N 3. – С. 3–6.
14. Иванова В.П. Иммуномодулирующие пептиды: роль пептидных фрагментов эндогенных и экзогенных белков в модуляции иммунных процессов // Усп. совр. биологии. – 1994, 114. – N 3. – С. 353–371.
15. Клиническая иммунология и аллергология в 3 т. / Под ред. Йегера Л. – М.: Медицина, 1990.
16. Кобозева Н.В., Гуркин Ю.А. Перинатальная эндокринология. Рук-во для врачей. – Л.: Медицина, 1986. – 15 с.
17. Криоконсервирование клеточных суспензий / Под общ. ред. Цуцаевой А.А. – Киев: Наук. думка, 1983. – 240 с.
18. Луценко Е.Д., Гольцев А.Н., Дубрава Т.Г. Криоконсервированный костный мозг: потенциал и ограничения использования в условиях измененного компонентного состава // Пробл. криобиологии. – 1995. – N 2. – С. 29–35.
19. Молекулярные и клеточные аспекты клинической иммунологии / М.: Медицина. – 1989, 256 с.
20. Нагорнев В.А., Зота Е.Г. Цитокины, иммунное воспаление и атерогенез // Усп. совр. биол. – 1996. – 116, N 3. – С. 320–332.
21. Петров Р.В., Зарецкая Ю.М. Радиационная иммунология и трансплантация / М: Атомиздат, 1970. – 543 с.
22. Тапильская Н.Г., Симбирцев А.С., Калинина Н.М. и др. Увеличение продукции интерлейкина-1, экспрессии рецепторов интерлейкина-2 и показателей бластной трансформации лимфоцитов периферической крови у женщин с угрозой срыва беременности // Иммунология. – 1993, N 5. С. 31–34.
23. Утешев Б.С. Механизмы активации В-лимфоцитов // Усп. совр. биол. – 1991. – 11, N 4. – С. 591–603.
24. Фриденштейн А.Я., Лурия Е.А. Клеточные основы кроветворного микроокружения. – М.: Медицина, 1980. – 215 с.
25. Фролов В.М., Германов В.Т., Пересадин Н.А. Некоторые механизмы иммунных нарушений в патогенезе невынашивания беременности // Иммунология. – 1992. – N 5. – С. 54–56.
26. Чекнев С.Б. Патогенез рассеянного склероза: иммуностимуляция или иммунодефицит? // Иммунология. – 1994. – N 2. – С. 9–17.
27. Шевелев А.С. Реакция “трансплантат против хозяина” и трансплантационная болезнь. – М.: Медицина, 1976, 215 с.
28. Ширшев С.В. Интерлейкины и другие медиаторы в клинической иммунологии. – М.: Медицина, 1989. – 116 с.
29. Ширшев С.В. Белки фетоплацентарного комплекса в регуляции иммунных реакций // Усп. совр. биол. – 1993. – 113, N 2. – 230–247.
30. Antin J.H., Ferrara L.M. Cytokine dysregulation and acute graft-versus-host disease // Blood. – 1992. – 80, N 12. – P. 2964–2968.
31. Billingham R.E., Brent L. Quantitative studies on tissue transplantation immunity. IV. Induction of tolerance in newborn mice and studies on the phenomenon of runt disease // Phil. Tr. Roy. Soc. – 1959, 242. – P. 439–475.
32. Ferrara J., Deeg H. Graft-versus-host disease // N. Engl. J. Med. – 1991. – 324, N 3. – P. 667–673.
33. Gilart A., Champlin R.E. Leukemia relapse after allogeneic bone marrow transplantation: A review // Blood. – 1994. – 84, N 11 – P. 3603–3610.
34. Goltsev A.N., Lutsenko E.D., Dubrava T.G. et al. The importance of myelotransplant component content in the manifestation of cryopreserved hemopoietic precursors functional activity. Adequate methods for assessing the role of adhesive cells // Cryoletters. – 1996. – N 3. – P. 187–203.
35. Gregorian J.K., Clark L., Heber-Katz E. et al. Induction of peripheral tolerance with peptide-specific anergy in experimental autoimmune neuritis // Cell. Immunology. – 1993. – 150, N 2. – P. 298–310.
36. Kornbluth M., You-Ten E., Desbarats J. T cell subsets in the thymus of graft-versus-host immunosuppressed mice // Transplantation. – 1991. – 51, N 1. – P. 262–267.
37. Mann R.A., Singh A.B., Singh M. The host response in graft versus host disease. II. The emergence of host protective cells in part determined by background genomic compatibility // Cell. Immunol. – 1993. – 151, N 1. – P. 39–51.

38. *Martin P.J., Schoch G.* A retrospective analysis of therapy for acute graft-versus-host disease: Initial treatment. *Blood.* – 1990. – 76, N 3. – P. 1464–1471.
39. *Storb R., Witherspoon R.* Marrow transplantation: what determines success or failure of hematopoietic reconstitution // *Oncologie.* – 1987. – 10, N 3. – P. 166–171.
40. *Sullivan K.M., Kopecky K.J.* Immunomodulatory and antimicrobial efficacy of intravenous immunoglobulin in bone marrow transplantation // *N. Engl. J. Med.* – 1990. – 323. – P. 705–710.
41. *Sung-Yun Pai, Fruman D.A., Leong T. et al.* Inhibition of calcineurin phosphatase activity in adult bone marrow transplant patients treated with CsA // *Blood.* – 1994. – 84, N 11. – P. 3974–3979.
42. *afurl A., Andreeff M.* Kinetic rationale for cytokine-induced recruitment of myeloblastic leukemia followed by cycle-specific chemotherapy in vitro // *Leukemia.* – 1990. – 4, N 2. – P. 826–831.
43. *Trierfelder S., Rodt H., Hetzel B.* Studies of chimeric tolerance induced with anti-T-cell globulin // *Exp. Hematol.* – 1974. – 2, N 5. – P. 299–304.
44. *Troutt A.B., Kelso A.* Enumeration of lymphokine mRNA-containing cells in vivo in a murine graft-versus-host reaction using the PCR // *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* – 1992. – 89, N 2. – P. 5276–5280.
45. *Venkataraman M.* Cryopreservation-induced enhancement of interleukin-2 production in human peripheral blood mononuclear cells // *Cryobiology.* – 1992. – 29, N 2. – P. 165–174.

Ин-т проблем криобиологии

Поступила 27.12.96

и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Харьковский ин-т усовершенствования врачей

А.Н.ГОЛЬЦЕВ, Т.Г.ДУБРАВА, О.Д.ЛУЦЕНКО, О.В.ГРИЩЕНКО, Л.В.ОСТАНКОВА,  
Н.А.КУШНИРЕНКО, О.В.ОПАНАСЕНКО, Т.О.КАЛІНІЧЕНКО

## ПОШУК АЛЬТЕРНАТИВНИХ КРІОКОНСЕРВУВАННЮ ШЛЯХІВ МОДИФІКАЦІЇ ІМУНОРЕАКТИВНОСТІ АЛОМІЄЛОТРАНСПЛАНТАТА. ЧАСТИНА I

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків  
Харківський ін-т удосконалення лікарів

Проведена оцінка імуномодулюючої активності продуктів фетоплацентарного комплексу (ПФПК) у відношенні лімфогемопоектичного комплексу інтактних і спромінених: реципієнтів з трансплантатом алогенного кісткового мозку. Досліджено характер і особливості впливу ПФПК на здатність аломієлотрансплантату ініціювати реакцію "трансплантат проти хазяїна" (РТПХ).

A.N.GOLTSEV, T.G.DUBRAVA, E.D.LUTSENKO, O.V.GRISCHENKO, L.V.OSTANKOVA,  
N.N.KUSHNIRENKO, E.V.OPANASENKO, T.A.KALINICHENKO

## A SEARCH FOR THE METHODS OF MODIFICATION OF THE IMMUNE REACTIVITY OF THE ALLOMYELOTRANSPLANT, WHICH ARE ALTERNATIVE TO CRYOPRESERVATION. PART I

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

There has been studied the immune-modulating activity of the products of a fetoplacental complex (PFPC) and its action on the state of the immune-competent sphere of intact recipients, and on the irradiated animals with the transplant of the allogenic native and cryopreserved bone marrow. There is submitted the analysis of the extent of the modulating activity of the chosen substances towards cell substrata of a lymphohemopoietic complex of the recipients. The nature and peculiarities of their influence on the ability of the allomyelotransplant to initiate a "transplant versus host" (TVHR) reaction have been also investigated.

УДК 57.043:576.315.42

**В.И.Ващенко**

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СВЕРХСПИРАЛЬНОЙ ДНК ЭУКАРИОТ

На основании результатов исследований, полученных авторами в течение 20 лет, а также литературных данных проведен анализ методов изучения сверхспиральной ДНК эукариот: седиментационного, вискозиметрического, флуоресцентной спектроскопии, флуоресцентной микро-

скопии, электронно-микроскопического, проточно-цитометрического. Показана перспективность этих методов в решении задач криобиологии и криомедицины.

Прошло около 20 лет с тех пор, когда впервые группа исследователей [24] обнаружила особую форму ДНК. Они же совместно с талантливым математиком Фуллером [33] предложили основные параметры и термин “сверхспиральная ДНК” для описания этого сложного феномена. В последующем сверхспиральная ДНК (ссДНК) была изучена на очень большом количестве объектов как про-, так и эукариот. Более того, была открыта отдельная ферментная система (топоизомераза), которая ответственна за топологические перестройки ссДНК [49]. В многочисленных экспериментах подтверждена важная роль сверхспирализации почти во всех процессах функционирования клетки: при репликации ДНК, при репарации и рекомбинации, при транскрипции, в большинстве этапов мейоза и митоза [20, 30]. В настоящее время пристальное внимание исследователей привлекают процессы, протекающие в клетках кровяных и опухолевых клетках при криоконсервировании, так как показано, что обратимость изменений в этих клетках зависит от степени ингибирования биосинтеза нуклеиновых кислот, белка, биоэнергетики клетки и свойств мембран [14]. Понятно, что выяснение роли сверхспирализации ДНК во всех этих процессах требует значительных методических усилий и создания совершенно новых методик и методических подходов. Таким образом, цель настоящего обзора состоит в том, чтобы систематизировать и охарактеризовать то многообразие методов изучения ссДНК эукариот и ее параметров, которое сложилось на сегодняшний день, а также дать анализ возможностей и недостатков отдельных методик в качестве полезных рекомендаций экспериментаторам, работающим в данной области.

По нашему мнению, существующие методы и методики оценки свойств ссДНК можно классифицировать по лежащим в их основе физико-химическим явлениям. Во-первых, — это состав лизирующего раствора и условия получения “нуклеоидов” и, во-вторых, — физический принцип работы измерительного прибора. В соответствии с этим методы подразделяются: на гидродинамические (ультрацентрифугирование, вискозиметрия), оптические (флуоресцентная спектроскопия, флуоресцентная микроскопия), электронно-микроскопические, проточно-цитометрические.

### ГИДРОДИНАМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

**Ультрацентрифугирование.** Одним из наиболее распространенных аналитических методов является ультрацентрифугирование, теоретические и технические подробности которого изложены в руководстве Остермана [15]. Отметим основные постулаты, которые следуют из теории: 1) более массивная молекула движется быстрее, чем менее массивная, 2) более плотная частица движется быстрее, чем менее плотная, 3) чем больше плотность градиента, тем медленнее движется в нем частица, 4) чем больше коэффициент трения, тем медленнее движется частица. Использование перечисленных возможностей метода ультрацентрифугирования позволило сотрудникам лаборатории Винограда [24] не только открыть ссДНК, но и дать трактовку основных ее параметров. В последующем Кук и Бразел [25] применили этот подход для обнаружения и описания ссДНК эукариот. Они же провели анализ технических особенностей “нуклеоидной техники”. Подробно об этом смотрите в работе [27]. Выделим главные из них. Установлено, что ссДНК высших организмов — это вся ДНК клеточного ядра в составе “нуклеоида”. Поэтому ультрацентрифугирование необходимо проводить в линейных градиентах сахарозы, а лизирующий раствор должен иметь высокую ионную силу. На практике более широко используется вариант Кука и Бразел. Основой является линейный градиент сахарозы (15–30%), содержащий 1,95–2,0 М NaCl, 0,001 М ЭДТА, 0,01–0,02 М трис-HCl, 0,5% Тритона X-100 pH=8,0, а лизирующая смесь

имеет состав: 1,95–2,0 М NaCl, 0,1 М ЭДТА, 0,01–0,02 М *трис*-HCl, 0,5% Тритона X-100  $pH=8,0$ ; соотношение суспензии клеток к лизирующей смеси 1:3. Немецкие исследователи [35, 36] предложили свой вариант: 5–20%-я сахароза готовится на растворе: 1 М NaCl, 0,001 М Na<sub>2</sub>ЭДТА, 0,01–0,02 М *трис*-HCl  $pH=7,0–7,5$ , а в лизирующую смесь по примеру японских экспериментаторов [31] вносится полярный детергент, т.е. она имеет вид: 1% SDS, 1 М NaCl, 0,1 М Na<sub>2</sub>ЭДТА, 0,002 М *трис*-HCl.

Во всех случаях для идентификации ссДНК и вычисления ее топологических параметров проводится процедура “титрование свехвитков” (*superhelix density*). Для этого в состав сахарозных градиентов вводят различные количества интеркаляторов (актиномицина Д или этидий бромид). По полученным величинам коэффициента седиментации Сведберга строится график и определяется точка минимума, которая, собственно, и используется при вычислении параметров ссДНК. Однако еще основатели “нуклеоидной техники” для оценки различных воздействий ввели условную величину  $S_r$  (*sedimentation relativity*), которая численно равна отношению расстояний пройденных “нуклеоидом” в центрифужной пробирке в присутствии и в отсутствие интеркалятора в градиенте. В последующем была изобретена еще одна важная модификация [11, 51]. Было предложено величину  $S_r$  определять при стандартной концентрации 30–40 мкг/мл этидий бромид в градиенте.

В отдельную группу следует выделить методики, в которых вместо интеркалятора в сахарозные градиенты вносятся зонды: 1 мкг/мл бисбензимида (Hoechst 33258, 33342) [44] или ДАФИ [37].

Широкое использование седиментационной “нуклеоидной техники” позволило установить ряд существенных особенностей изменений топологических параметров ссДНК при дифференцировке и злокачественной трансформации клеток, при старении, при воздействии физических (включая температурные) факторов, а также химических веществ на клетки и организм животных и человека [12, 45, 48].

Резюмируя, отметим основные достоинства метода ультрацентрифугирования: 1 – высокоточность и надежность техники, 2 – детальную методическую проработку, 3 – оценку максимального количества параметров ссДНК, 4 – практическую возможность использования в криобиологических исследованиях.

**Вискозиметрия.** Не менее важным, чем ультрацентрифугирование, является метод вискозиметрии макромолекул, технические подробности которого хорошо отражены в монографии Фрайфельдера [21]. Для измерения вязкости разработано много приборов, чаще всего используются капиллярные вискозиметры Оствальда и Убеллоде или ротационные — различных модификаций.

Впервые оценку состояния ссДНК эукариот по изменениям относительной вязкости “нуклеоидов” осуществили японские экспериментаторы [31]. Впоследствии подобный подход был применен нами для анализа ссДНК лимфоцитов и клеток костного мозга в радиобиологических и криобиологических исследованиях [4, 5], где приводятся основные требования, соблюдение которых обязательно при вискозиметрии ссДНК эукариот. Они включают следующие положения: 1) применение лизирующей смеси стандартного состава по Куку и Бразел, 2) фиксированное время лизиса образцов (15–20 мин), 3) продолжительность времени измерения не более 60–90 мин. Следует подчеркнуть, что только некоторые исследователи отмечают, что “нуклеоид” при ультрацентрифугировании и при вискозиметрии это не одно и то же. Неправильно также считать, что при вискозиметрии определяется вязкость лизатов клеток. В специальных исследованиях [26, 44, 46] доказано наличие в лизатах сфер “нуклеоидов” в виде дисков с характерным ореолом “гало”. Подробнее — в подразделе “оптические методы”.

При практическом осуществлении вискозиметрии “нуклеонидов” для регистрации параметров ссДНК применяются два методических приема. В одном из них [25] интеркалятор в нужном количестве прибавляется в измеряемый образец после завершения лизиса, во-втором — предварительно вносится в лизирующую смесь [6]. Мы полагаем, что адекватнее наш методический прием и вот почему. Как уже указывалось, для экранирования зарядов макромолекул и для предотвращения гидролиза фосфодиэфирных связей в лизирующей смеси присутствуют высокие концентрации ЭДТА. Следовательно, в момент перемешивания лизирующей смеси с суспензией клеток основания ДНК доступны интеркалятору во всех участках практически одновременно, что соответствует процессу, происходящему при ультрацентрифугировании “нуклеонидов”. Исходя из этого соображения, а также учитывая проточнотометрические данные [38, 40, 41], мы использовали вискозиметрические кривые “титрования” для вычисления параметров ссДНК аналогично тому, как это принято при седиментационном анализе.

Особого внимания заслуживают работы [2, 13], в которых упоминается термин “эластовискозиметрия”. Наиболее разработана теория этого понятия для ротационных вискозиметров Зимма-Крозерса [3]. По существу, эластовязкость — это характеристическая вязкость  $[\eta]$ , которая отражает связь между вязкостью и молекулярной массой ДНК при очень низких градиентах сдвига. Использование вискозиметра Зимма-Крозерса позволило впервые оценить молекулярную массу гигантской молекулы ссДНК эукариот. В отдельных экспериментах [16, 23] анализируются данные, полученные на ротационном вискозиметре, но в расчет берется относительная вязкость образцов в зависимости от наличия интеркалятора в лизируемом и измеряемом образце. При таком подходе мы рискуем получить ряд погрешностей при оценке параметров ссДНК в составе “нуклеонидов”. Отметим главные из них. Во-первых, лизирующая смесь при изучении ссДНК на ротационном вискозиметре Зимма-Крозерса имеет состав: 1% SDS, 0,35 М NaCl, 0,01 М Na<sub>2</sub>ЭДТА, 0,01 М трис-HCl, 0,01% лизоцима, 2 мкг/мл проназы E, pH=9,0. Во-вторых, лизис образцов ведется около 20 ч. Следовательно, структура “нуклеонидов” будет разрушена, и топологические параметры у высвободившейся ссДНК определять некорректно.

Отдельно необходимо отметить работы [2, 13], в которых термин “эластовискозиметрия” привлекается для интерпретации данных по вискозиметрии ссДНК “нуклеонидов” на специально модифицированном вискозиметре Оствальда. При изучении на этом приборе высокополимерной линкерной ДНК не учтены кавитационные эффекты, возникающие при нестационарном турбулентном истечении образцов из измерительной камеры. Поэтому, анализируя эксперименты на таких “эластовискозиметрах”, следует помнить о несоответствии их данным, полученным на вискозиметре Зимма-Крозерса.

Резюмируя, укажем на главные достижения вискозиметрического метода. Во-первых, на усовершенствованном вискозиметре Зимма было установлено, что ссДНК “нуклеонидов” человека — это структура, состоящая из ДНК всего хромосомного набора клетки с молекулярной массой более  $10^{11}$  дальтон. Во-вторых, изучая ссДНК “нуклеонидов” клеток костного мозга при криоконсервировании установили сохранность ее структуры и основных топологических параметров [5].

## ОПТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

**Флуоресцентная спектроскопия.** Теория флуоресцентной спектроскопии подробно описана в ряде руководств [10, 21]. При этом рассматриваются два методических подхода: 1 — оценка собственной флуоресценции изучаемых молекул и 2 — изучение структуры макромолекулы ДНК при внесении флуоресцентных меток и зондов. Для регистрации топологических параметров

ссДНК чаще всего применяют этидий бромид, акридиновый оранжевый и в отдельных исследованиях пропидий йодид [18, 28]. К настоящему времени известны две модификации флуоресцентной спектроскопии ссДНК эукариот. В первом варианте лизирующая смесь имеет состав: 2 М NaCl, 0,1 М ЭДТА, 0,02 М *трис*-HCl, 0,5–1,0% Тритона X-100 при  $pH=8,0$ . При этом регистрируется суммарное изменение интенсивности флуоресценции от всех клеток, внесенных в измерительную камеру. Для предотвращения искажений результатов, за счет разбавления образцов, нами предложено осуществлять лизис непосредственно в кювете флуориметра [6, 18]. Применив несколько методов: седиментационный, вискозиметрический и флуоресцентный для изучения параметров ссДНК макрофагов и тимоцитов, мы произвели расчет условий для этих объектов, при которых возможно определять корректно топологические параметры ссДНК “нуклеоидов” флуориметрическим методом, без построения кривых Скэтчарда по связыванию зонда.

В качестве второго варианта флуоресцентного метода следует рассматривать методику двойной метки. При этом в лизируемый образец вносится интеркалятор для релаксации ссДНК “нуклеоидов”, а затем 0,1 мкг/мл ДАФИ. По абсолютной и относительной разности интенсивности их флуоресценций рассчитывается коэффициент относительной флуоресценции (КОФ) [9]. Любое воздействие, вызывающее дополнительную релаксацию ссДНК, приводит к изменению величины КОФ. Метод очень чувствителен, однако его нельзя использовать для оценки топологических параметров ссДНК “нуклеоидов” при криоконсервировании в присутствии криофилактиков вследствие значительных эффектов тушения флуоресценции.

В заключение приведем основные плюсы и минусы методик флуоресцентной спектроскопии. К достоинствам следует отнести то, что для анализа требуется небольшое количество клеток, время измерений минимальное, и в отдельных случаях возможна оценка плотности сверхспирализации (ПСС) ссДНК “нуклеоидов”. Основным недостатком является измерение флуоресценции “бульона”, т. е. от всей совокупности клеток.

**Флуоресцентная микроскопия.** Флуоресцентные микроскопы по устройству значительно отличаются от световых. Для регистрации флуоресценции производится разделение спектров возбуждения и флуоресценции. При этом применяются фильтры с узкой полосой пропускания, чаще всего интерференционные. Наиболее удачные технические решения этой задачи имеются в приборах фирмы “Leitz” (Германия) и “ЛОМО” (Россия). Отметим также, что для анализа слабой флуоресценции необходимо использовать не только покровные и предметные стекла, но и линзы из нефлуоресцирующего стекла.

Флуоресцентная микроскопия нашла самое широкое применение в биомедицинских исследованиях, в том числе в криобиологии — в основном в самых разнообразных цитохимических методиках. Однако для регистрации нативной ссДНК эукариот необходимо было подобрать иные условия. Такой подход реализован в методике “гало” [7, 26, 47]. Получение ссДНК из клеток производится прямо на предметном стекле при добавлении к образцам лизирующей смеси состава: 2 М NaCl, 0,1 М ЭДТА, 0,01 М *трис*-HCl, 1% Тритона X-100 при  $pH=8,0$  в соотношении 1:3 или 1:4. Затем образец накрывается покровным стеклом и обводится парафиновым карандашом для предотвращения изменений осмолярности за счет испарения воды. При микроскопировании на темном фоне видны диски с красноватой центральной частью и оранжевым ореолом “гало” по периферии. Диаметр “гало” “нуклеоидов” изменяется в зависимости от концентрации интеркалятора (этидий бромида или пропидий йодида) в лизирующем растворе, а также при воздействии разных физических факторов на клетки [7, 47, 48]. Следовательно, используя определенные стандартные условия, можно регистрировать ссДНК “нуклеоидов” и оценивать ее топологические параметры. Это было впервые продемонстрировано в наших

экспериментах [7]. Тем не менее большинство исследователей обычно оценивают лишь один параметр — ИКН, как отношение диаметров “гало” в контроле и опыте при максимальнорелаксирующей концентрации интеркалятора. Только в настоящее время, получив надежные данные на проточном лазерном цитофлуориметре, мы пришли к выводу о принципиальной возможности, используя математический аппарат статистических анализов, вычислять оба параметра ссДНК, а именно: ПСС и ИКН.

Оценивая в целом методику “гало”, можно подчеркнуть несколько важных моментов. Во-первых, указанный метод легко внедрить в любой цитологической лаборатории, оснащенной флуоресцентным микроскопом. Во-вторых, для анализа требуется очень мало материала, так как размеры “гало” измеряются у каждого “нуклеоида”. Наконец, в-третьих, лизирующий раствор можно использовать достаточно долго и таким образом обеспечить единство измерений и надежность получаемых данных.

### МЕТОД ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

Уже на ранних этапах изучения свойств ссДНК эукариот была решена методическая задача по электронной микроскопии этого объекта [39, 42]. Показано, что основным этапом при изучении ДНК является подготовка препарата, которая выполняется по модифицированному варианту Кляйншмидта. При этом исследователи отмечают важность толщины подложки, наносимой на измерительную сеточку, и строгого соблюдения всех условий проводки препарата. На полученных по этой методике электронных фотографиях ссДНК “нуклеоидов” хорошо видны розеточные структуры, в которых имеется центральный участок (кор) с отходящими от него замкнутыми петлями ДНК [42]. Эти данные явились основой для расчетов репликанов ДНК, а также построения целого ряда моделей компактизации ДНК в хроматиновые фибриллы с последующим образованием хромосомы [34, 43, 47].

Таким образом, несомненна важность метода электронной микроскопии ссДНК “нуклеоидов” для выяснения структурных особенностей хромосом, особенно при воздействии физических и химических факторов на различающиеся в функциональном отношении клетки эукариот. Следовательно, весьма перспективными в теоретическом и практическом смысле представляются такие исследования ссДНК в криобиологии и криомедицине.

### МЕТОД ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

Появление совершенных и надежных лазерных цитофлуориметров [17] привело к разработке многочисленных методик, нашедших успешное применение в биологии и медицине [29, 32]. Первая работа в этой области по изучению ссДНК эукариот появилась в 1985 г. [41]. В настоящее время используются две модификации этого метода, различающиеся по составу лизирующей смеси и по способу оценки параметров ссДНК. В первом варианте используется лизирующая смесь состава: 2 М NaCl, 0,01 М ЭДТА, 0,01 М *трис*-HCl, 0,5% Тритона X-100  $pH=8,0$ . Измерение производится на проточном флуориметре “FACS-400” (“Becton-Dickinson”, США) через 30 мин после начала лизиса со скоростью 400 “нуклеоидов” в секунду. Были получены гистограммы интенсивности флуоресценции, на которых отражена зависимость медианы от содержания этидий бромидов в составе ссДНК “нуклеоидов” [40]. Позже, в клинических исследованиях [38], в качестве показателя конформационных нарушений ссДНК использована медиана гистограмм интенсивности при постоянной концентрации этидий бромидов в лизирующей смеси 50 мкг/мл.

Во втором варианте, предложенном в нашей работе [8], лизирующий раствор имеет состав: 1,95 М NaCl, 0,1 М ЭДТА, 0,01 М *трис*-HCl, 0,5% Тритона X-100,  $pH=8,0$ . Через 10 мин после лизиса образцов измерения производятся на проточном лазерном флуориметре “EPICS-C” (“Coultronics”, США—

Франция) со скоростью 400 “нуклеоидов” в секунду при суммации сигналов от 10000 “нуклеоидов”. Используя полученные гистограммы, мы предложили оценивать изменения свойств ссДНК “нуклеоидов” лимфоцитов человека по двум параметрам: ПСС (плотность сверхспирализации, которая вычисляется по смещению коэффициента асимметрии) и ИКН (индекс конформационной напряженности — вычисляется по величине эксцесса на кривой). Такой подход позволяет избежать погрешностей, возникающих при использовании в качестве ИКН медианы, в случае появления дополнительных пиков на гистограмме.

До настоящего времени, за исключением упомянутых выше работ [8, 40, 50], метод оценки топологических параметров ссДНК “нуклеоидов” на проточных лазерных цитофлуориметрах не нашел пока широкого применения. Тем не менее этот метод несомненно перспективен для решения задач криобиологии в силу четырех главных достоинств лазерных приборов: способности регистрировать сигнал от отдельного “нуклеоида”, высокой производительности, надежности и высокой точности определения величины флуоресценции ссДНК “нуклеоидов”.

Таким образом, рассмотрев наиболее широко применяемые методы изучения ссДНК эукариот, отметим также оригинальность отдельных появившихся в последние годы методов — электрофореза “нуклеоидов” [19] и метода поляризационной спектроскопии [22]. Однако теоретическая проработка этих методов пока еще недостаточна для корректного определения топологических параметров ссДНК “нуклеоидов”.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бавыкин С.Г. Динамика структуры хроматина // Итоги науки и техники. ВИНТИ. Сер. Молекулярная биология. — 1988. — Т. 26. — С. 5–121.
2. Блохин Д.Ю., Стручков В.А. Капиллярная эластовискозиметрия нуклеоидов эукариот // Биополимеры и клетка. — 1988. — 4, N 4. — С. 203–211.
3. Бреслер С.Е., Носкин Л.А., Суслов А.В. Эластовискозиметрия как новый метод исследования репарации ДНК // Повреждение и репарация ДНК. — Пушкино: Научн. центр биол. иссл. АН СССР, 1980. — С. 27–42.
4. Ващенко В.И., Решиков А.М. Определение радиочувствительности субпопуляций тимоцитов методом вискозиметрии нуклеоида // Радиобиология. — 1982. — 22, N 5. — С. 690–693.
5. Ващенко Т.Н., Ващенко В.И., Петренко Г.И. и др. Влияние криоконсервирования на топологические переходы суперспиральной ДНК “нуклеоидов” клеток костного мозга человека // Криобиология. — 1986. — N 1. — С. 14–18.
6. Ващенко В.И., Комар В.Е. Оценка конформационных изменений суперспиральной ДНК эукариотических клеток методом прямой флуориметрии нуклеоидов. 1. Сравнительная информативность различных методов изучения нарушений структуры суперспиральной ДНК в тимocyтах и макрофагах // Цитология. — 1986. — 28, N 7. — С. 750–754.
7. Ващенко В.И. Соотношение процессов деградации и репарации суперспиральной ядерной ДНК лимфоидных клеток крысы при облучении: Автореф. дис.... канд. биол. наук. — Ленинград, 1983. — 26 с.
8. Ващенко В.И., Смирнов В.С., Морозов В.Г., Касьянов А.Д. Оценка эффектов ионизирующего излучения низкой интенсивности на иммунную систему генетически неоднородной популяции людей // I Всесоюз. радиобиол. съезд: Тез. докл., Москва. 21–27 авг. 1989 г. Пушкино, 1989. — Т. 5. — С. 1067–1068.
9. Иванов С.Д., Ремизова И.В., Кованько Г.Е. и др. Структурные изменения ДНК нуклеоидов крови и развитие отдаленных последствий у облученных крыс // Бюлл. экспер. биол. и медицины. — 1990. — 109, N 8. — С. 296–299.
10. Кантор Ч., Шиммел П. Биофизическая химия. — М.: Мир, 1984. — Т. 2. — 496 с.
11. Климов Н.А., Ващенко В.И., Грищенко Ю.Д., Комар В.Е. Изучение репарации разрывов и восстановление суперспиральной структуры ДНК лимфоцитов периферической крови крыс после однократного равномерного облучения // Всесоюз. симпоз. “Интерфазная гибель облученных клеток”: Сб. докл., Обнинск, 23–24 апр. 1979 г. — Обнинск, 1979. — С. 30–34.
12. Лучник А.Н. Изменение сверхспирализации ДНК при дифференцировке, старении и злокачественной трансформации // Онтогенез. — 1983. — 14, N 3. — С. 227–237.
13. Нечаевский Ю.В., Серажевская Н.Б. Модификация гонадотропином эффекта малых доз у-радиации на суперскрученность ДНК спермы выюна *Misgurnus fossilis* L // Радиобиология. — 1985. — 25, вып. 4. — С. 469–473.

14. Обозная-Печенежская Э.И., Грищенко В.И., Панков Е.Я. Кробиология обновления: факты и перспективы // Пробл. кробиологии. – 1993. – N 4. – С. 11–20.
15. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование (практич. пособие). – М.: Наука, 1981. – 288 с.
16. Папонов В.Д., Радько С.П., Щеглова Е.Г. Топологическая гетерогенность ДНК в нуклеоидах лейкоцитов человека // Бюлл. exper. биол. и медицины. – 1988. – 105, N 2. – С. 194–195.
17. Полетаев А.И. Проточная цитометрия и сортировка в цитологии, молекулярной биологии, биотехнологии и медицине // Итоги науки и техники. ВИНТИ. Сер. Общие проблемы физико-химической биологии. – 1989. – 12. – С. 3–85.
18. Решиков А.М., Ващенко В.И., Комар В.Е. Оценка конформационных изменений суперспиральной ДНК эукариотических клеток методом прямой флуориметрии нуклеоидов. II. Особенности изменения флуоресценции акридинового оранжевого при изучении суперспиральной ДНК тимоцитов крыс // Цитология. – 1991. – 33, N 2. – С. 89–93.
19. Тронов В.А., Гринько Е.В., Бериташвили Д.Р., Филиппович И.В. Микроэлектрофорез ДНК индивидуальных интактных и гаммаоблученных тимоцитов // Цитология. – 1991. – 33, N 2. – С. 94–102.
20. Филиппович И.В., Сорокина Н.И. Суперспиральная ДНК клеточного ядра // Усп. соврем. биол. – 1983. – 95, вып. 2. – С. 163–180.
21. Фрайфельдер Д. Физическая биохимия. – М.: Мир, 1980. – 583 с.
22. Шурдов М.А., Свинарчук Ф.П., Груздев А.Д. Торсионные напряжения в ДНК полигенных хромосом // Мол. биология. – 1989. – 23, вып. 1. – С. 204–214.
23. Шебро И.В., Папонов В.Д., Дубовая Т.К. Влияние бромистого этидия на вязкость хроматина, выделенного из печени крыс в норме и после денервации // Бюлл. exper. биол. и медицины. – 1990. – 110, N 12. – С. 596–598.
24. Bauer W., Vinograd J. The interaction of closed circular DNA with intercalative dyes. I. The superhelix density of SV40 in the presence and absence of dyes // J. Mol. Biol. – 1968. – 33, N 1. – P. 141–171.
25. Cook P.R., Brazell I.A. Supercoils in human DNA // J. Cell Sci. – 1975. – 19. – P. 261–279.
26. Cook P.R., Brasell I.A., Jost E. Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA // J. Cell Sci. – 1976. – 22, N 2. – P. 303–324.
27. Cook P.R., Brasell I.A. The superhelical density of nuclear DNA from human cells // Eur. J. Biochem. – 1977. – 74, N 3. – P. 527–531.
28. Cook P.R., Brasell I.A. Spectrofluorometric measurement of the binding of ethidium to superhelical DNA from cell nuclei // Eur. J. Biochem. – 1978. – 84, N 2. – P. 465–477.
29. Clinical cytometry // Annals N.Y. Acad. Sci. – 1986. – 468. – 408 p.
30. DNA topology and its biological effects. – N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1990. – 283 p.
31. Ide T., Nakane H., Anzai K., Andoh T. Supercoiled DNA folded by non-histone proteins in cultured mammalian cells // Nature. – 1975. – 258, N 5534. – P. 445–447.
32. Flow cytometry in hematology. – San Diego: Acad. Press, 1992. – 272 p.
33. Fuller F.B. The writhing number of a space curve // Proc. Nat. Acad. Sci. – 1971. – 68, N 4. – P. 815–819.
34. Gretzenberg R.H., Pienta K.J., Ward W.S., Coffey D.S. Nuclear structure and three-dimensional organization of DNA // J. Cell Biochem. – 1991. – 47, N 4. – P. 289–299.
35. Hartwig M. Organization of mammalian chromosomal DNA: superhelical and folded circular DNA subunits from the interphase cell nuclei // Acta Biol. Med. Germ. – 1978. – 37, N 3. – P. 421–432.
36. Hartwig M., Matthers E. Molecular mechanisms in cancerogenesis: II. Abnormally high superhelical stress in chromosomal DNA of mouse Ehrlich ascites tumor cells // Studia Biophys. – 1979. – 77, N 2. – P. 141–148.
37. Lipetz P.D., Brash D.E., Joseph L.B. et al. Determination of DNA superhelicity and extremely low levels of DNA strand breaks in low numbers of nonradiolabeled cells by DNA 4;6-diamidino-2-phenylindole fluorescence in nucleoid gradients // Anal. Biochem. – 1982. – 121, N 2. – P. 339–348.
38. Lynch T.H., Anderson P., Wallace D.M.A. et al. A correlation between nuclear cancer to radiotherapy // Br. J. Cancer. – 1991. – 64, N 5. – P. 867–871.
39. McCready S.J., Akrigg A., Gook P.R. Electron-microscopy of intact nuclear DNA from human cells // J. Cell Sci. – 1979. – 39. – P. 53–62.
40. Milner A.E., Vangan A.T.M., Clark I.P. Measurement of DNA damage in mammalian cells using flow cytometry // Rad. Res. – 1987. – 110, N 1. – P. 108–117.
41. Milner A.E., Vangan A.T.M. DNA strand breaks detected by laser scatter from nucleoids // Int. J. Rad. Biology. – 1985. – 48, N 3. – P. 457.
42. Mullinger A.M., Jonson R.T. The organization of supercoiled DNA from human chromosomes // J. Cell Sci. – 1979. – 38. – P. 369–389.
43. Pienta K.J., Coffey D.S. A structural analysis of the role of the nuclear matrix and DNA loops in the organization of the nucleus and chromosome // J. Cell Sci. – 1984. – Suppl 1. – P. 123–135.
44. Pitout M.W., Louw W.K., Izatt H. et al. A modified neutral sucrose centrifugation method for rapid detection of DNA damaged by  $\gamma$ -radiation and repair in human lymphocytes // Int. J. Biochem. – 1982. – 14, N 10. – P. 899–904.

45. Roti-Roti J.L., Painter R.B. Effects of hyperthermia on the sedimentation of nucleoids from Hela cells // *Rad. Res.* – 1982. – 89, N 1. – P. 166–175.
46. Thomas E.A., Thomas C.A. Nucleoid halo expansion indirectly measures DNA damage in single cells // *Exp. Cell Res.* – 1989. – 183, N 1. – P. 149–158.
47. Vogelstein B., Pardoll D.M., Coffey D.S. Supercoiled loops and eukaryotic DNA replication // *Cell.* – 1990. – 22, N 1. – P. 79–85.
48. Vashchenko V.I., Chukhlov A.B., Vashchenko T.N., Rozhdestvenskaya E.N. Inhibitors of topoisomerases as inducers of apoptosis; a strategy for the search and selection of antitumor drugs // 4-th Intern.conference "AIDS, Cancer and related". – St. Petersburg, 21-25 may 1996. – St. Petersburg, 1996. – P. 73.
49. Wang J.C. DNA topoisomerases // *Ann. Rev. Biochem.* – 1985. – 54. – P. 665–697.
50. Wang J.C., Basu H.S., Feuerstein B.G. et. al. Radiation-induced changes in nucleoid halo diameters of aerobic and hypoxic SF-126 human brain tumor cells // *Cytometry.* – 1995. – 19, N 2. – P. 107–111.
51. Weniger P. An improved method to detect small amounts of radiation damage in DNA of eukaryotic cells // *Int. J. Radiat. Biol.* – 1979. – 36, N 2. – P. 197–199.

Военно-медицинская академия, г. Санкт-Петербург

Поступила 18.06.96

В.І.ВАЩЕНКО

## МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ НАДСПІРАЛЬНОЇ ДНК ЕУКАРІОТ

Військово-медична академія, м. С.-Петербург

На основі результатів досліджень, отриманих авторами на протязі 20 років, а також літературних даних проведено аналіз методів вивчення надспіральної ДНК еукаріот: седиментаційного, віскозіметричного, флуоресцентної спектроскопії, флуоресцентної мікроскопії, електронно-мікроскопічного, проточно-цитометричного. Показана перспективність цих методів для розв'язання задач кріобіології і кріомедицини.

V.I.VASCHENKO

## METHODS OF STUDYING SUPRAHELICAL EUCARYOTIC DNA

Military Medical Academy, St.Petersburg

Using the data, obtained throughout the last 20 years, the authors conducted the analysis of the methods of studying suprahelical eucaryotic DNA: sedimentation, viscosimetric, fluorescent spectroscopy, fluorescent microscopy, as well as of electron microscopic and flow-cytometric analysis. These methods have been found promising for solving the tasks of cryobiology and cryomedicine.

УДК 577.37

**Е.А.Гордиенко, С.Е.Коваленко**

## БИОФИЗИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ЯВЛЕНИЯ ГИПЕРТОНИЧЕСКОГО КРИОГЕМОЛИЗА

В работе построена количественная модель явления гипертонического криогемолиза, которая, исходя из некоторых положений теории упругости, теории вероятности образования макроскопической поры в изотропно растянутой мембране и уравнений массопереноса через избирательно проницаемые мембраны клеток, отражает его основные черты.

Гипертоническим холодовым шоком или гипертоническим криогемолизом называется явление повреждения эритроцитов человека, которое возникает в результате их экспозиции в гипертоническом растворе не проникающего в клетки вещества при постоянной температуре (в диапазоне от 45 до 20 °С) и последующего охлаждения до температуры ниже 13 °С, но выше температуры, при которой в клеточной суспензии образуются кристаллы льда. Это явление принципиально отличается от явления так называемого холодового шока, при котором клетки, взвешенные даже в изотонической среде, повреждаются при быстром охлаждении до температуры близкой к 0 °С тем, что при гипертоническом криогемолизе повреждение клеток наступает только после их предварительной экспозиции в гипертонической среде до начала охлаждения.

Эту предварительную экспозицию будем называть в дальнейшем первой стадией гипертонического криогемолиза, а последующее охлаждение — второй стадией. Гипертонический криогемолиз для краткости будем обозначать как ГК, а эритроциты человека будем называть просто эритроцитами, так как ГК по определению относится только к эритроцитам человека. Поскольку при охлаждении в физиологической среде до 0 °С, а также при экспозиции в гипертоническом растворе при постоянной температуре эритроциты повреждаются значительно меньше, чем после ГК, возникло предположение о том, что предварительная (до начала охлаждения) экспозиция эритроцитов в гипертоническом растворе каким-то образом повышает их чувствительность к последующему охлаждению. Целью данной работы является построение количественной биофизической модели указанного явления.

Как известно из теории упругости, свободная энергия деформации тонкой упругой замкнутой оболочки, каковой является и клеточная мембрана, при действии на нее произвольных внешних сил принимает наименьшее из всех возможных значений. Свободная энергия изгиба тонкой оболочки в  $(hH)^2$  раз меньше свободной энергии растяжения-сжатия, где  $h$  — толщина оболочки, а  $H$  — средняя кривизна поверхности оболочки в рассматриваемой точке [3]. Именно поэтому клеточная мембрана в процессе обезвоживания не сжимается, сохраняя исходную форму, а изгибается таким образом, чтобы при заданном объеме клетки площадь поверхности клеточной мембраны оставалась неизменной, точнее, чтобы сохранялась метрика так называемой нейтральной поверхности клеточной мембраны [3]. Так происходит, если этому не препятствуют какие-либо внешние, например, геометрические ограничения. Роль последних в случае обезвоживания эритроцитов могут играть упаковывающиеся в сгусток неправильной формы молекулы гемоглобина. О том, что при концентрациях хлорида натрия во внеклеточной среде, превышающих 0,8 М, может происходить расслоение цитозоля эритроцитов на две фазы, одна из которых содержит мало белка и много растворителя, а другая — мало растворителя и много белка, свидетельствуют данные об уменьшении времени вращательной диффузии спинового зонда ТЕМПОН по сравнению с его значением при более низких концентрациях [4]. По мере роста обезвоживания эритроцитов и вызванного этим концентрирования внутриклеточного гемоглобина цитозоль, очевидно, приобретает свойство сопротивляться изменению формы вследствие уменьшения его текучести.

Объемная доля осмотически неактивных внутриклеточных веществ  $\alpha$  для эритроцита человека по многочисленным литературным данным [6] имеет значение 0,3–0,4, а минимальный объем, до которого они обезвоживаются в гипертонических растворах, составляет 50–60% от объема клетки в изотоническом растворе. Следовательно, можно представить себе упомянутый выше сгусток гемоглобина внутри обезвоженной на 40–50% клетки как состоящий на 30–40% из плотно упакованных молекул гемоглобина и осмотически неактивного растворителя, связанного ими, и на 20% — из осмотически активного раствора, расположенного во внутренних впадинах (“карманах”) плотно упакованного гемоглобинового сгустка. Если площадь поверхности последнего превышает исходное значение площади поверхности клеточной мембраны, то в процессе обезвоживания клеток под действием осмотических сил мембрана в конце концов начинает частично втягиваться в упомянутые выше впадины. Если исключить возможность проскальзывания мембраны вдоль поверхности гемоглобинового сгустка, при достаточно сильном обезвоживании клетки участок мембраны, ограничивающий впадину от внеклеточного раствора, начинает растягиваться. Если предположить, что перекрывание впадины мембраной происходит при относительном объеме клетки 0,5, то, во-первых, легко оценить, какой осмолярности обезвоживающего клетки внеклеточного раствора соответствует это событие, а также значение осмолярности раствора в

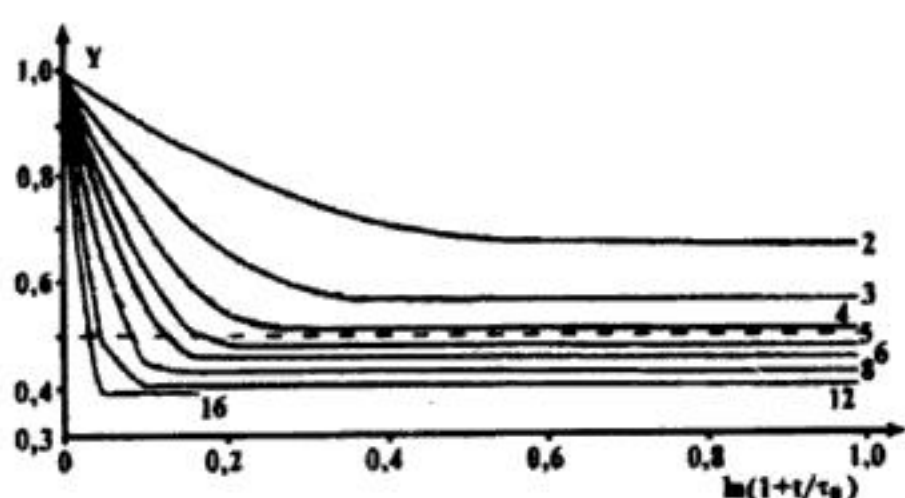


Рис. 1. Зависимость относительного объема эритроцита от времени при различных значениях приведенного осмотического давления гипертонического внеклеточного раствора  $\pi^{\text{out}}$

перекрываемой мембраной впадине. На рис. 1 представлена зависимость относительного объема эритроцита  $y$  от безразмерного параметра  $x = \ln(1+t/\tau_0)$  при различных значениях приведенного осмотического давления внеклеточного раствора  $\pi^{\text{out}}$ , здесь  $t$  – время,  $\tau_0 = (\gamma_0 L_p \pi^{\text{in}}(0))^{-1}$ ,  $\gamma_0$  – поверхностно-объемное отношение эритроцита в физиологическом растворе,  $\pi^{\text{in}}(0)$  – осмотическое давление физиологического раствора,  $L_p$  – коэффициент фильтрации клеточной мембраны,  $\pi^{\text{out}}$  – осмотическое давление

внеклеточного раствора,  $\pi^{\text{out}} = \pi^{\text{out}}/\pi^{\text{in}}(0) = z$ . Представленные на рис. 1 зависимости рассчитаны по уравнению [2]:

$$\frac{dy}{dt} = \frac{1}{\tau_0} \left[ \frac{1-\alpha}{y-\alpha} - \pi^{\text{out}} \right] \quad (1)$$

при  $\tau_0 = 10^{-3}$  с,  $\alpha = 0,35$ , то есть при типичных для эритроцита человека значениях, фигурирующих в (1) параметров. Здесь и в дальнейшем предполагается, что суммарный объем клеток пренебрежимо мал по сравнению с полным объемом клеточной суспензии, так что изменением концентрации внеклеточного раствора в процессе массообмена между клетками и окружающей их средой можно пренебречь.

Как видно из рис. 1 при обезвоживании клеток внеклеточным раствором с приведенным осмотическим давлением от 1 до 4,3 (что соответствует концентрациям внеклеточного раствора от 0,15 М до 0,7 М) уменьшение объема эритроцита не достигает 50%, по-видимому, эффект растяжения клеточной мембраны на впадинах гемоглобиновых сгустков в среднем возникает только при  $\pi^{\text{out}} \geq 4,333$  (1,3 осмоль/кг), при этом начальное значение осмотического давления раствора в “гемоглобиновом кармане”, очевидно, составляет  $4,333\pi^{\text{in}}(0)$ .

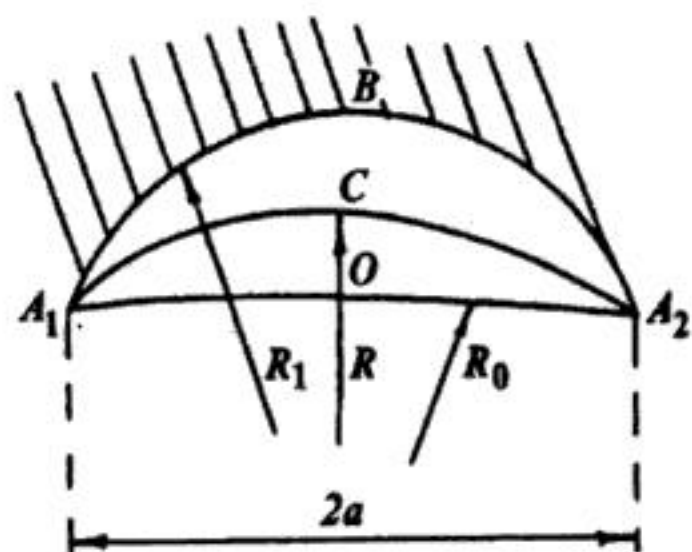


Рис. 2. Модель “гемоглобинового кармана” ( $A_1BA_2$ ), перекрытого сферическим сегментом мембраны

Рассмотрим упрощенную модель процесса деформации клеточной мембраны с момента перекрытия впадины какой-либо ее частью. Будем считать, что “гемоглобиновый карман” представляет собой сферический сегмент радиуса  $R_1$  с радиусом основания  $a$ , и перекрывающая карман часть мембраны в начальный момент времени моделируемого процесса представляет собой участок сферы с радиусом  $R_0$  (рис. 2).

Под действием осмотических сил часть мембраны втягивается в “гемоглобиновый карман” и, в отсутствие проскальзывания мембраны вдоль гемоглобинового сгустка (в точках  $A_1, A_2$ , рис. 2), подвергается растяжению. Изменение радиуса  $R$  участка мембраны, втягиваемого в “карман”, концентрации растворенного в объеме “кармана”, ограниченном мембраной ( $A_1BA_2$ , рис. 2), вещества  $\pi^{\text{in}}$  и натяжение мембраны  $\sigma$  со временем описывается следующей системой дифференциальных уравнений:

$$\frac{d\hat{R}}{dx} = -2\exp(x) \frac{\sqrt{\hat{R}^2-1} (\hat{R} - \sqrt{\hat{R}^2-1}) \cdot F}{2\hat{R} \sqrt{\hat{R}^2-1-2\hat{R}^2+1}}; \quad (2)$$

$$F = \sigma_1 (\pi^{\text{in}} - \pi^{\text{out}}) + \frac{C\hat{R}_0}{\hat{R}} \left[ \frac{\hat{R} (\hat{R} - \sqrt{\hat{R}^2-1})}{\hat{R}_0 (\hat{R}_0 - \sqrt{\hat{R}_0^2-1})} \right];$$

$$\frac{d\pi^{\text{in}}}{dx} = -6\exp(x) \frac{\hat{R} (\hat{R} - \sqrt{\hat{R}^2-1})}{2\hat{R}_1^3 - (2\hat{R}_1^2+1) \sqrt{\hat{R}_1^2-1} - 2\hat{R}^3 - (2\hat{R}^2+1) \sqrt{\hat{R}^2-1}} \cdot \frac{\tau_0^*}{\tau_1} (\pi^{\text{in}} - \pi^{\text{out}}) +$$

$$+ \frac{3\sigma_1 \pi^{\text{in}} \hat{R} [2\hat{R} \sqrt{\hat{R}^2-1} - 2\hat{R}^2+1]}{[2\hat{R}_1^3 - (2\hat{R}_1^2+1) \sqrt{\hat{R}_1^2-1} - 2\hat{R}^3 - (2\hat{R}^2+1) \sqrt{\hat{R}^2-1}] \sqrt{\hat{R}^2-1}} \cdot \frac{d\hat{R}}{dx},$$

где  $\tau_1 = (K/a)^{-1}$ ,  $K$  – коэффициент проницаемости мембраны для растворенного вещества,  $\sigma_1$  – коэффициент отражения клеточной мембраны для раство-

ренного вещества,  $\hat{R}=R/a$ ,  $\hat{R}_1=R_1/a$ ,  $\hat{R}_0 = R_0/a$ ,  $\tau_0^* = \left[ \frac{L_p \pi^{\text{in}}(0)}{a} \right]^{-1}$ ,  $C = 2\Gamma/R_0 \pi^{\text{in}}(0)$ ,  $\Gamma$  – коэффициент растяжения мембраны клетки.

Система уравнений (2) вытекает из хорошо известных уравнений массопереноса в прерывных системах с учетом простых геометрических соображений, которые являются следствием принятых модельных представлений. Если растворенные в клеточной суспензии вещества не проникают через мембраны клеток, то  $K=0$  и  $\sigma_1=1$ . В этом случае через клеточные мембраны переносятся только молекулы растворителя – воды, а концентрация молекул электролита во вне- и внутриклеточной среде изменяется только за счет обезвоживания клеток гипертоническим внеклеточным раствором. Однако в сильно гипертонических растворах хлорида натрия мембрана эритроцитов, как известно [5], теряет свойство полупроницаемости: происходит утечка ионов калия из клеток и вход ионов калия в них. Ради простоты допустим, что коэффициент проницаемости эритроцитов для катионов линейно зависит от приведенного осмотического давления внеклеточной среды, то есть

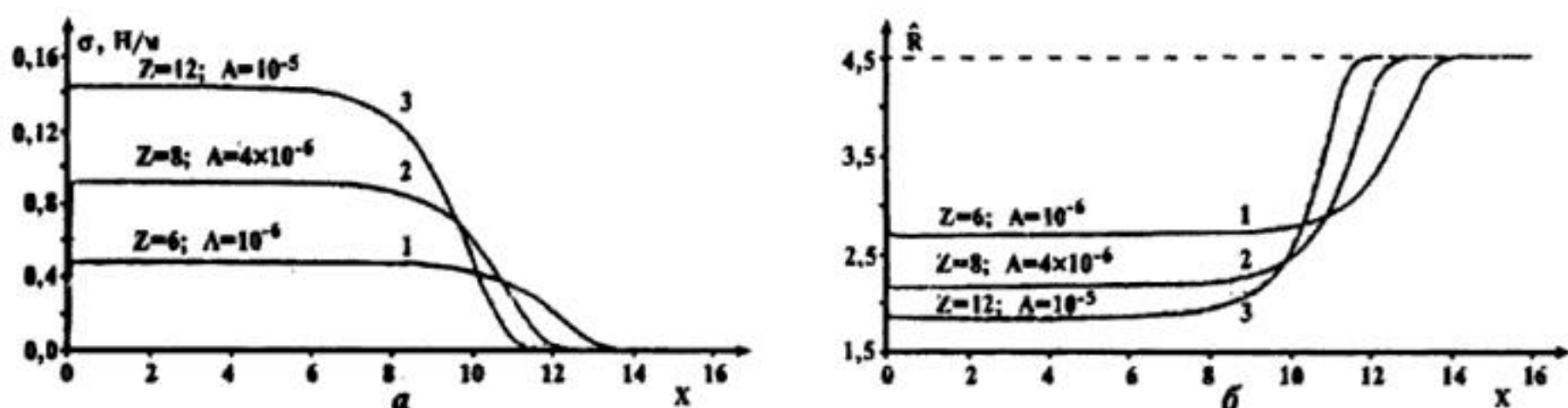


Рис. 3. Зависимость приведенного радиуса  $\hat{R}$  втягиваемой в "гемоглибиновый карман" части мембраны (а) и ее натяжения (б) от безразмерного параметра  $x = \ln(1+t/\tau_0)$ . Расчет проведен при следующих значениях параметров:  $R_0 = 4,5$ ;  $R_1 = 1,5$ ;  $\pi^{\text{in}}(0) = 4,3(3)$ ;  $\sigma_1 = 0,95$ ;  $\tau_0^*/\tau_1 = 0,001$ ;  $C=5$ ;  $A=K$

$$K = a + b\pi^{\text{out}}. \quad (3)$$

Поскольку утечка ионов калия из эритроцитов человека в гипертонических растворах хлорида натрия начинается, когда концентрация внеклеточного раствора превышает значение 0,8 М ( $\pi^{\text{out}} = 5,3(3)$ ), то  $a = -5,3(3)b$ . С другой стороны, при температуре 37 °С примерно половина ионов калия теряется клеткой за 15 мин. Поэтому можно представить зависимость (3) при этой температуре в виде

$$K = (1,5\pi^{\text{out}} - 8) \cdot 10^{-6} \text{ м/с}. \quad (4)$$

На рис. 3 представлены зависимости приведенного радиуса втягиваемой в "гемоглобиновые карманы" части мембраны  $\hat{R}$  и ее натяжения  $\sigma$  от безразмерного параметра  $x = \ln(1+t/\tau_0)$  при различных значениях приведенного осмотического давления внеклеточной среды с учетом (4). Как видно,  $\hat{R}$  вначале быстро (за несколько миллисекунд) уменьшается, а затем по мере входа ионов натрия в клетку и выхода ионов калия из нее радиус втянутой в «карман» части мембраны увеличивается до исходного значения. Натяжение же мембраны растет в течение быстрой фазы обезвоживания «кармана», а затем медленно падает, в конце концов обращаясь в нуль.

Как известно [1], в стационарном случае среднее время образования макроскопической поры в изотропно растянутой мембране определяется выражением

$$\langle t \rangle = \frac{(kT)^{3/2} \sigma}{\pi \gamma D(0) \sqrt{4\sigma^3 - 3\Gamma(\gamma/R_0)^2}} \exp\left(\frac{\pi \gamma^2}{kT\sigma}\right), \quad (5)$$

где  $k$  – постоянная Больцмана,  $T$  – абсолютная температура,  $\gamma$  – линейное натяжение мембранной поры,  $\Gamma$  – коэффициент растяжения мембраны клетки,  $D(0)$  – так называемый коэффициент диффузии в пространстве размеров поры. Аппроксимируя зависимость (5) экспериментальные данные Рэнда [1] о времени гемолиза эритроцита от изотропного натяжения его мембраны  $\sigma$ , находим при  $4\sigma^3 \gg 3\Gamma(\gamma/R_0)^2$

$$\langle t \rangle = (0,02013\sqrt{\sigma}) \exp(0,0689/\sigma). \quad (6)$$

С учетом зависимости (6) можно утверждать, что самого по себе натяжения мембраны эритроцитов, которое возникает в ней при экспозиции клеток в гипертонических растворах, в большинстве исследованных случаев недостаточно для разрыва мембраны и гемолиза клеток на этом этапе ГК. Тем не менее мембрана может быть разрушена за счет дополнительного натяжения, которое возникает при фазовом превращении мембранных компонентов из жидкокристаллического в твердое гелеобразное состояние на втором этапе ГК.

Рассмотрим, как будет меняться натяжение мембраны, если клетки, часть мембраны которых втянута в "гемоглобиновый карман", охладить ниже температуры фазового перехода мембраны из жидкого в твердое состояние, при котором средняя площадь поверхности, приходящаяся на одну молекулу в мембране, уменьшается. Пусть  $T_1$  – температура начала упомянутого фазового перехода, а  $T_2$  – температура, при которой он завершается,  $N$  – полное число молекул в натянутой на "гемоглобиновый карман" части мембраны, а  $N_s(N_f)$  – число молекул, находящихся в твердой (жидкой) фазе. Зависимость числа молекул, перешедших в твердую фазу, от температуры  $T$  ( $T_1 \geq T \geq T_2$ ) представим в простейшем виде

$$\frac{N_s}{N} = \frac{T - T_1}{T_2 - T_1}.$$

Очевидно, при температурах  $T > T_1$  твердая фаза отсутствует и  $\frac{N_s}{N} = 0$ , а при температурах  $T < T_2$  присутствует только твердая фаза и  $\frac{N_s}{N} = 1$ . Обозна-

чим через  $a_f$  и  $a_s$  среднюю площадь, которая приходится на одну молекулу в рассматриваемой части мембраны в отсутствие деформации соответственно в жидкой и твердой фазах, а через  $S_0 = N \cdot a_f$  — площадь рассматриваемой части мембраны в отсутствие деформации до начала фазового перехода. Очевидно,  $\tilde{S}_0 = 2 \hat{R}_0(\hat{R}_0^2 - \sqrt{\hat{R}_0^2 - 1})$ , и в области фазового перехода площадь рассматриваемой части мембраны в отсутствие деформации равна

$$\tilde{S} = N_f a_f + N_s a_s = \tilde{S}_0 - N_s(a_f - a_s).$$

Площадь, занятая жидкой фазой в рассматриваемой части мембраны в отсутствие деформации, есть

$$\tilde{S}_f = (N - N_s) a_f = \tilde{S}_0 \frac{T_2 - T}{T_2 - T_1},$$

а площадь, занятая твердой фазой при тех же условиях, —

$$\tilde{S}_s = \tilde{S}_0 \frac{a_s}{a_f} \frac{T_2 - T}{T_2 - T_1}.$$

Полная площадь втянутой в “гемоглобиновый карман” части мембраны в отсутствие деформации в области фазового перехода равна

$$\tilde{S} = \tilde{S}_f + \tilde{S}_s = \tilde{S}_0 \left[ \frac{T_2 - T}{T_2 - T_1} + \frac{a_s}{a_f} \frac{T - T_1}{T_2 - T_1} \right].$$

Охлаждение клеток ниже точки фазового перехода  $T_1$  приводит к дополнительному изотропному натяжению мембраны, которое в соответствии с законом Гука равно

$$\sigma_f = \Gamma_f \frac{(S_f - \tilde{S}_f)}{\tilde{S}_f} \quad \text{и} \quad \sigma_s = \Gamma_s \frac{(S_s - \tilde{S}_s)}{\tilde{S}_s}$$

для жидкой и твердой фазы соответственно. Здесь  $\Gamma_f$  и  $\Gamma_s$  — коэффициенты растяжения мембраны в жидком и твердом состоянии, а  $S_f$  и  $S_s$  — площадь поверхности деформированной путем втягивания в “гемоглобиновый карман” части мембраны, занятая жидкой и твердой фазой соответственно. Поскольку натяжение мембраны изотропно  $\sigma_f = \sigma_s = \sigma$  и  $S = S_f + S_s$ , то

$$\sigma = \frac{\Gamma_f \left[ T_2 - T + \frac{a_s}{a_f} (T - T_1) \right]}{\frac{\Gamma_f}{\Gamma_s} \frac{a_s}{a_f} (T - T_1) + T_2 - T_1} \left\{ \frac{\hat{R} (\hat{R} - \sqrt{\hat{R}^2 - 1}) (T_2 - T_1)}{\hat{R}_0 (\hat{R}_0 - \sqrt{\hat{R}_0^2 - 1}) \left[ T_2 - T + \frac{a_s}{a_f} (T - T_1) \right]} - 1 \right\}$$

и

$$\frac{\Delta p}{\pi^{\text{in}}(0)} = \frac{2\sigma}{a \hat{R} \pi^{\text{in}}(0)} = C \frac{T_2 - T + \frac{a_s}{a_f} (T - T_1)}{\frac{\Gamma_f}{\Gamma_s} \frac{a_s}{a_f} (T - T_1) + T_2 - T_1} \quad (7)$$

$$\cdot \left\{ \frac{\hat{R} (\hat{R} - \sqrt{\hat{R}^2 - 1}) (T_2 - T_1)}{\hat{R}_0 (\hat{R}_0 - \sqrt{\hat{R}_0^2 - 1}) \left[ T_2 - T + \frac{a_s}{a_f} (T - T_1) \right]} - 1 \right\},$$

где  $C = \frac{2\Gamma_f}{a \pi^{\text{in}}(0)}$ . С учетом соотношения (7) и  $\frac{d}{dt} = \frac{\dot{T}}{T_1} \frac{d}{d\hat{T}}$ , где  $\hat{T} = T/T_1$ , а  $\dot{T}$  —

скорость охлаждения клеточной суспензии, легко преобразовать уравнение (2) к виду, удобному для анализа исследуемого процесса. Получаем

$$\frac{d\hat{R}}{d\hat{T}} = -\frac{T_1}{\hat{T}\tau_0^*} \frac{2\sqrt{\hat{R}^2-1}(\hat{R}-\sqrt{\hat{R}^2-1})}{2\hat{R}\sqrt{\hat{R}^2-1}-2\hat{R}^2+1} \left[ \sigma_1(\hat{\pi}^{\text{in}}-\hat{\pi}^{\text{out}}) + \frac{\Delta p}{\pi^{\text{in}}(0)} \right];$$

$$\frac{d\hat{\pi}^{\text{in}}}{d\hat{T}} = -\frac{T_1}{\hat{T}\tau_0^*} \frac{\hat{R}(\hat{R}-\sqrt{\hat{R}^2-1})}{2\hat{R}^3-(2\hat{R}^2+1)\sqrt{\hat{R}^2-1}-2\hat{R}^3-(2\hat{R}^2+1)\sqrt{\hat{R}^2-1}} \cdot \left\{ \frac{\tau_0^*}{\tau_1} (\hat{\pi}^{\text{in}} - \hat{\pi}^{\text{out}}) + \sigma_1 \hat{\pi}^{\text{in}} \left[ \sigma_1(\hat{\pi}^{\text{in}} - \hat{\pi}^{\text{out}}) + \frac{\Delta p}{\pi^{\text{in}}(0)} \right] \right\},$$

где  $\frac{\Delta p}{\pi^{\text{in}}(0)}$  определяется выражением (7).

Если, начиная с какой-либо точки экспозиции клеток в гипертонической среде, охладить клетки ниже точки фазового превращения в их мембранах ( $\hat{T} < T_1$ ), то во втянутой в "гемоглобиновый карман" части мембраны возникает дополнительное натяжение. На рис. 4-6 показано, как изменяются при этом  $\hat{R}$ ,  $\hat{\pi}^{\text{in}}$  и среднее время образования разрыва в мембране с изменением температуры при различных значениях параметра  $\beta = T/\hat{T}\tau_0^*$ , продолжительности экспозиции клеток в гипертоническом растворе до начала охлаждения и приведенного осмотического давления внеклеточного гипертонического раствора.

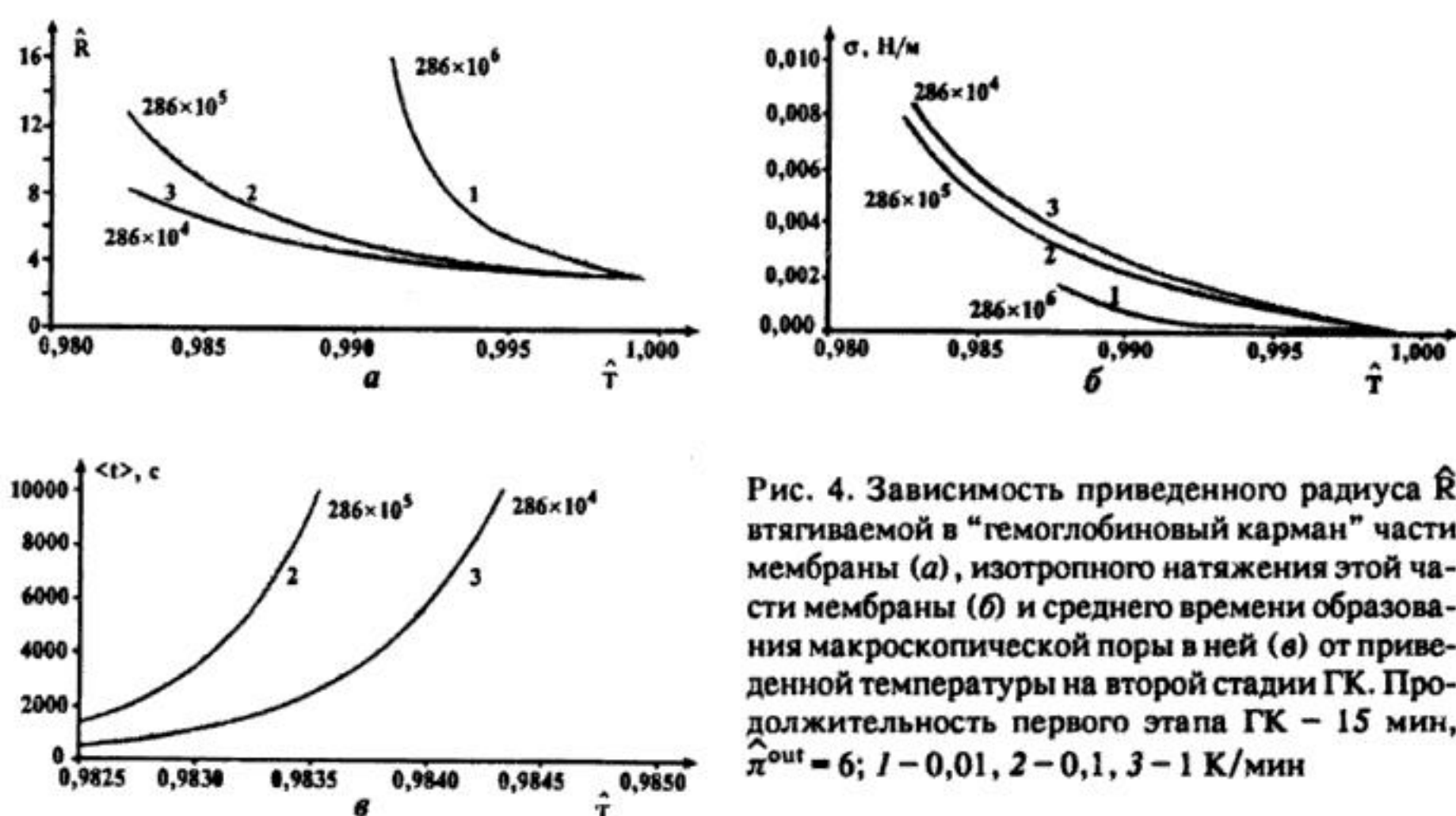


Рис. 4. Зависимость приведенного радиуса  $\hat{R}$  втягиваемой в "гемоглобиновый карман" части мембраны (а), изотропного натяжения этой части мембраны (б) и среднего времени образования макроскопической поры в ней (в) от приведенной температуры на второй стадии ГК. Продолжительность первого этапа ГК – 15 мин,  $\hat{\pi}^{\text{out}} = 6$ ; 1 – 0,01, 2 – 0,1, 3 – 1 К/мин

Как следует из результатов численных экспериментов, натяжение мембраны на втором этапе гипертонического криогемолиза существенно падает с понижением скорости охлаждения клеточной суспензии в области фазового перехода мембраны из жидкокристаллического в твердое состояние до значения примерно 0,6 К/мин. При такой и меньших скоростях охлаждения натяжение мембраны настолько мало, что образование разрыва в ней маловероятно. С увеличением скорости охлаждения натяжение увеличивается, и образование разрыва в мембране становится более вероятным. Таким образом, с увеличением скорости охлаждения на второй стадии гипертонического криогемолиза вероятность повреждения мембраны эритроцитов и, следовательно, гемолиза возрастают. Однако при достаточно большой скорости охлаждения,

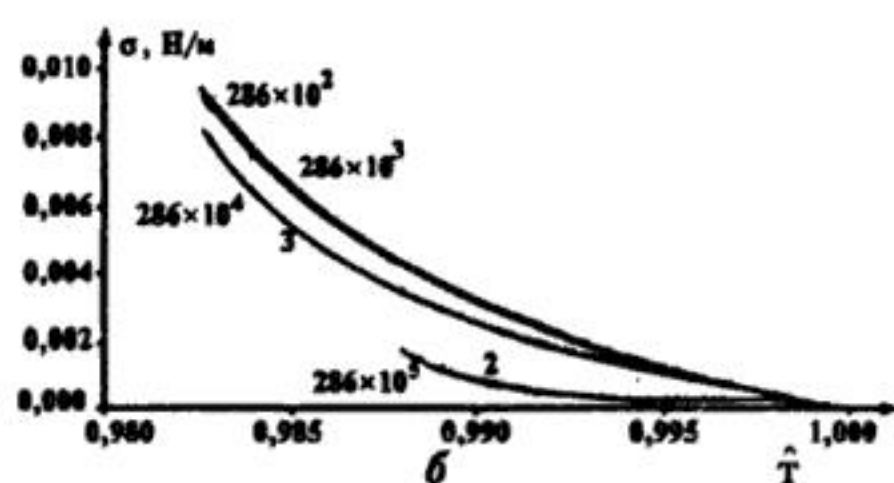
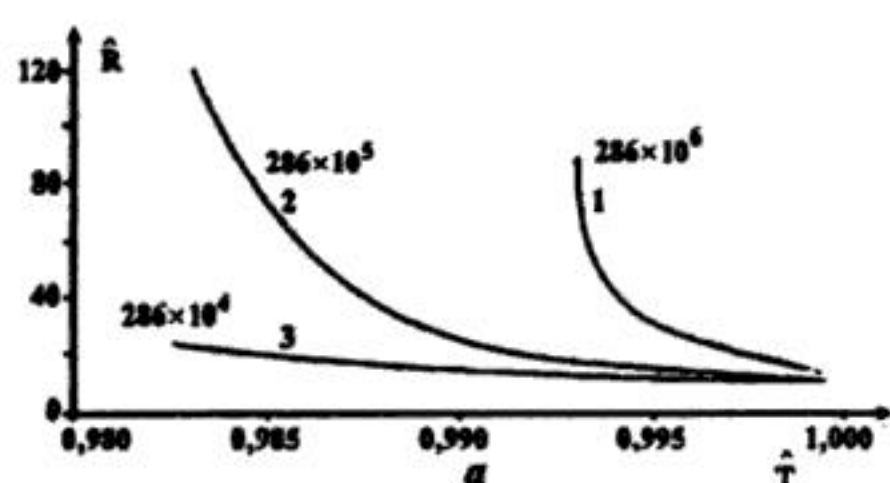
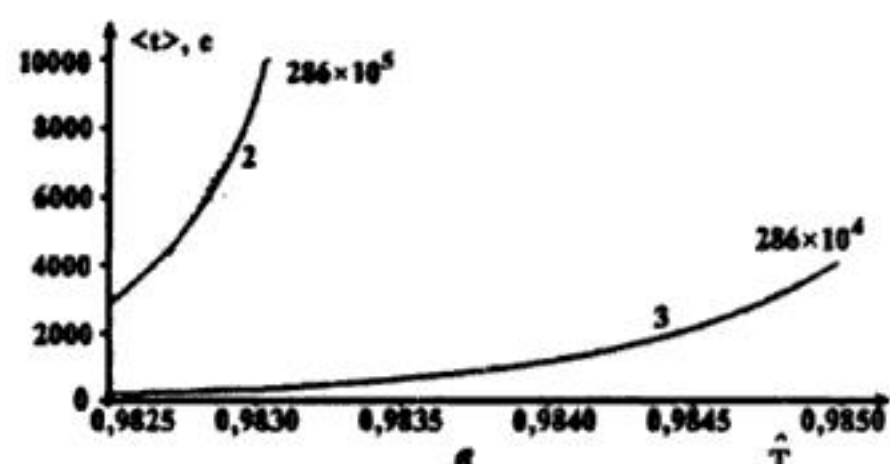


Рис. 5. Зависимость приведенного радиуса  $\bar{R}$  вытягиваемой в "гемоглибиновый карман" части мембраны (а), изотропного натяжения этой части мембраны (б) и среднего времени образования макроскопической поры в ней (в) от приведенной температуры на второй стадии ГК. Продолжительность первого этапа ГК – 15 мин,  $\pi^{\text{out}} = 8$ ; 1 – 0,01, 2 – 0,1, 3 – 1 К/мин



несмотря на возникновение сравнительно большого натяжения в мембране, время пребывания клеточных мембран в напряженном состоянии становится настолько малым, что процесс образования макроскопических пор в них не успевает осуществиться вплоть до момента релаксации натяжения до сравнительно небольших значений.

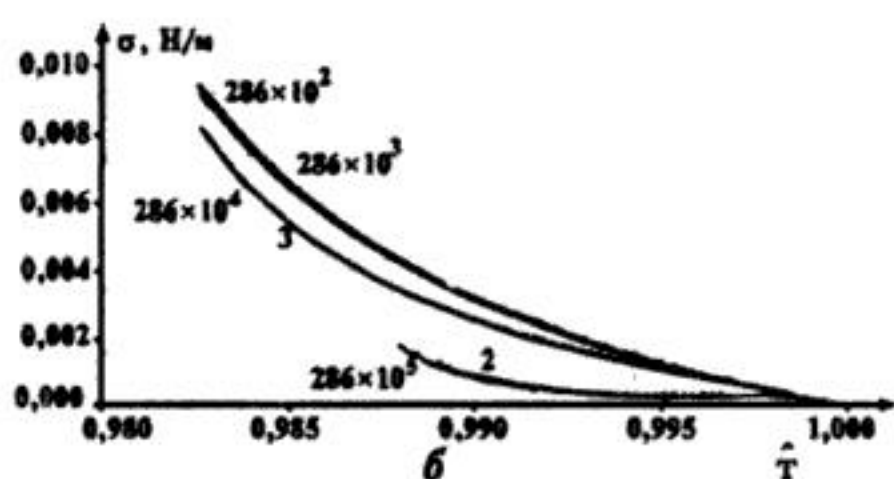
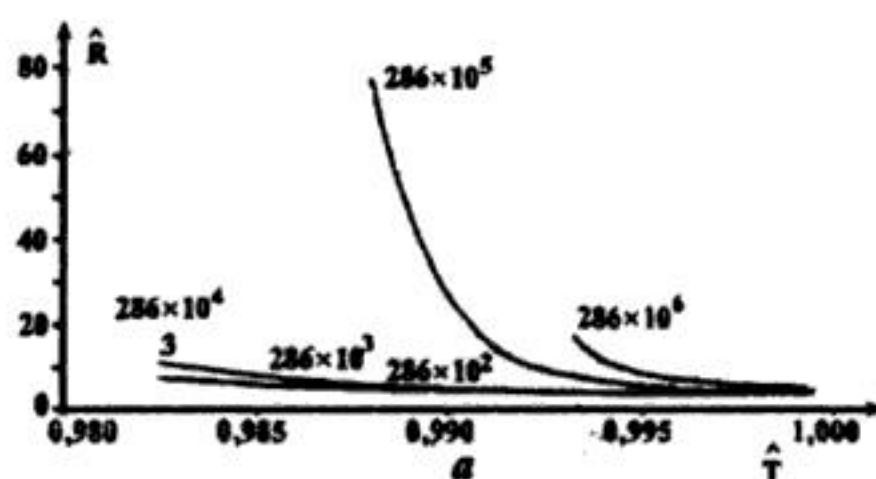
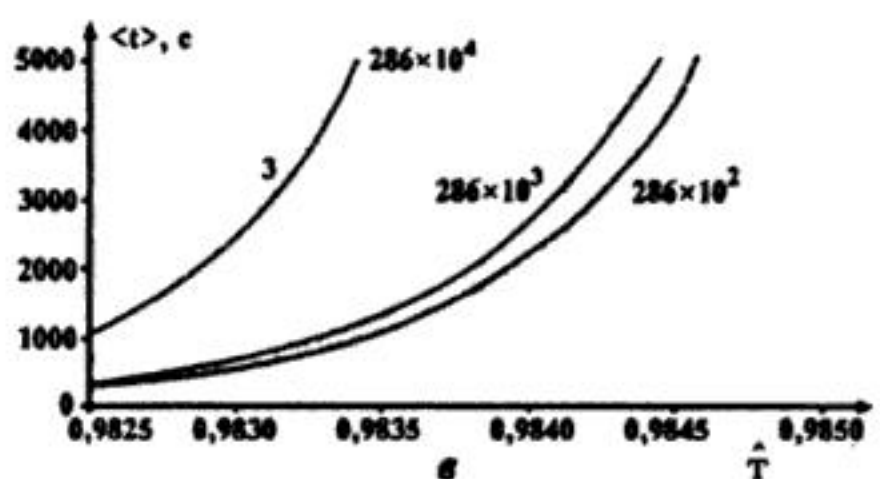


Рис. 6. Зависимость приведенного радиуса  $\bar{R}$  вытягиваемой в "гемоглибиновый карман" части мембраны (а), изотропного натяжения этой части мембраны (б) и среднего времени образования макроскопической поры в ней (в) от приведенной температуры на второй стадии ГК. Продолжительность первого этапа ГК – 15 мин,  $\pi^{\text{out}} = 12$ ; 1 – 0,01, 2 – 0,1, 3 – 1 К/мин



Таким образом, построенная модель гипертонического криогемолиза объясняет, почему сама по себе экспозиция клеток в гипертоническом растворе не приводит к значительному гемолизу, а повреждение клеток наступает при последующем охлаждении суспензии до температуры, более низкой, чем область фазового превращения в мембране, причем более быстрое охлаждение приводит к большему гемолизу, чем медленное.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гордиенко Е.А., Гордиенко О.И. О механизме осмотического лизиса эритроцитов // Криобиология. – 1986. – № 2. – С. 23–25.
2. Гордиенко Е.А., Некоз И.А. Осмотическая реакция эритроцитов на контакт с гипертоническими растворами непроникающего криопротектора // Криобиология. – 1989. – № 1. – С. 11–13
3. Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М. Теория упругости. – М.: Наука, 1987. – 246 с.

4. Межидов С.Х., Мусеев В.А., Нардид О.А. Влияние повышенных концентраций хлорида натрия и температуры на состояние цитозоля эритроцитов // Биофизика. – 1987. – 32, № 3. – С. 528–530.
5. Soderstrom N. Hemolysis by hypertonic solutions of neutral salts // Acta Physiol. Scand. – 1944. – 7. – P. 56–68.
6. Savitz D., Sidel V.W., Solomon A.K. Osmotic properties of human red cells // J. Gen. Physiol. – 1964. – 48, № 1. – P. 79–94.

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

Поступила 16.07.96

Є.О.ГОРДІЄНКО, С.Є.КОВАЛЕНКО

## БІОФІЗИЧНА МОДЕЛЬ ЯВИЩА ГІПЕРТОНІЧНОГО КРІОГЕМОЛІЗУ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Побудована кількісна модель явища гіпертонічного криогемолізу, яка, виходячи з деяких положень теорії пружності, теорії імовірності утворення макроскопічної пори в ізотропно розтягнутій мембрані та рівнянь масопереносу крізь вибірково проникні мембрани клітин, відбиває його головні риси.

E.A.GORDIENKO, S.E.KOVALENKO

## A BIOPHYSICAL MODEL OF THE PHENOMENON OF HYPERTONIC CRYOHEMOLYSIS

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

The report deals with the development of a qualitative model of a hypertonic cryohemolysis, which, as judged by some principles of the theory of elasticity, theory of probability of formation of the macroscopic pore in the isotropically stretched membrane, and the equations of mass transfer via selectively permeable cell membranes, reflects its basic features.

УДК 57.043

**Л.А.Бабийчук, Н.Г.Землянских**

## ВЛИЯНИЕ ПОЛИЭТИЛЕНОКСИДА–1500 И ТЕМПЕРАТУРЫ НА ОСОБЕННОСТИ МОДИФИКАЦИИ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ

Проведены исследования изменений формы эритроцитов и состояния белков их плазматической мембраны при различных температурных режимах обработки клеток криопротектором ПЭО-1500 и после замораживания-отогрева. Установлено, что обработка эритроцитов при 0 °С ПЭО-1500 в значительной степени стабилизирует форму клеток, и приобретенная стабильность формы сохраняется в процессе замораживания-отогрева. Показано, что постепенное добавление ПЭО-1500 при 0 °С позволяет сохранить в процессе криоконсервирования структуру белков мембранного каркаса эритроцитов в близком к нативному состоянию.

Полиэтиленоксиды широко используются в экспериментальной биологии как вещества, способные модифицировать структурное состояние клеточных систем. Эти вещества в последнее время также находят применение в криобиологии как соединения, способные защищать клетки от альтерирующего воздействия низких температур и других факторов криоконсервирования [5, 7]. Достаточно эффективным непроникающим криопротектором, позволяющим сохранить структурно-функциональные свойства эритроцитов после их замораживания до –196 °С, является полиэтиленоксид с молекулярной массой 1500 (ПЭО-1500). Устойчивость клеток к действию низких температур в присутствии ПЭО-1500 зависит от его концентрации, длительности воздействия и температуры инкубации [1]. В нашей предыдущей работе [2] было показано, что обработка эритроцитов криопротектором ПЭО-1500 при температуре близкой к 0 °С повышает устойчивость клеток к последующему замораживанию-отогреву в большей степени, чем обработка клеток при комнатной температуре.

Фузогенное и криопротекторное действие полиэтиленоксидов, по-видимому, в первую очередь связано с их способностью модифицировать плазматическую мембрану клеток [11, 13]. Однако механизм защитного действия непроникающих криопротекторов остается во многом неясным. Предполагают, что при использовании этих соединений защита клетки обусловлена ее умеренной дегидратацией и формированием вокруг нее дополнительной защитной оболочки [4]. Вместе с тем неясно, оказывают ли экзогенные криопротекторы лишь коллигативное и дегидратирующее действие или каким-то образом изменяют состояние белков цитоскелета клетки. В связи с этим целью данной работы было изучение изменений формы эритроцитов и состояния белков их плазматической мембраны при различных температурных режимах обработки криопротектором и после замораживания-отогрева.

Объектом исследования служили эритроциты донорской крови человека, консервированной на среде "Глюгидир" со сроком хранения при температуре 4 °С до 5 сут. Эритроциты осаждали центрифугированием при 3000 об/мин. Осадки дважды промывали 3–4-кратным объемом раствора, содержащего 150 мМ NaCl и 10 мМ *трис*-HCl, pH 7,4 (среда А). Эритроциты обрабатывали 30%-м раствором ПЭО-1500, приготовленным на основе среды А либо при 0–4 °С, либо при комнатной температуре. Раствор ПЭО-1500 вводили в клеточную суспензию либо сразу путем добавления равного объема раствора криопротектора, либо путем добавления через каждые 4 мин равными порциями в течение 40 мин. При этом окончательное соотношение объемов эритроцитарной массы и раствора криопротектора при любом из способов составляло 1:1. Суспензию эритроцитов замораживали в жидком азоте до температуры –196 °С. Размораживание проводили в водяной бане при температуре 22 °С с постоянным покачиванием.

Для оценки связывания криопротектора с эритроцитами и их белками использовали  $^{14}\text{C}$ -ПЭО-1500 (синтезированный в ИПКиК НАНУ). Клетки обрабатывали меченым криопротектором как описано выше, после чего несвязавшийся ПЭО-1500 удаляли из клеточной суспензии путем 3-кратной отмывки 20-кратным объемом среды А. Количество связавшегося с клетками или их белками  $^{14}\text{C}$ -ПЭО-1500 определяли путем измерения радиоактивности осадков в сцинтилляторе СЖ-8 на счетчике "Backman LS 7800". Морфологические изменения эритроцитов исследовали методом электронной растровой микроскопии [3, 6] с помощью электронного микроскопа РЭМ-100У. При оценке морфологических изменений нами использованы классификация форм эритроцитов, предложенная в работе [3], а также некоторые элементы других классификаций морфологических форм эритроцитов. Состояние белков мембран эритроцитов оценивали с помощью метода электрофореза в ПААГ. С этой целью клетки обрабатывали диамидом как описано в [10], после чего получали их белые тени по методу [9] и проводили электрофорез белков в градиентных гелях ПААГ [30] ("Pharmacia", Швеция). Гели сканировали на денситометре "Backman CDS 200".

Полиэтиленоксиды могут оказывать не только криопротекторное, но и токсическое действие на клетки, дестабилизируя их плазматическую мембрану и снижая устойчивость к экстремальным воздействиям. В определенных условиях токсическое влияние криопротектора, очевидно, можно свести к минимуму, учитывая, что токсичность связана именно с влиянием криопротектора на свойства мембраны. При изучении связывания  $^{14}\text{C}$ -ПЭО-1500 с эритроцитами было обнаружено, что количество криопротектора, связавшегося с клетками, сильно зависит от температуры, при которой клетки инкубируются с криопротектором. Так, при 0 °С с клетками связывается в 5 раз меньше  $^{14}\text{C}$ -ПЭО-1500, чем при комнатной температуре (рис. 1). Варьируя скорость введения криопротектора в клеточную суспензию, мы обнаружили, что постепенное добавление ПЭО-1500 при комнатной температуре приводит к увели-

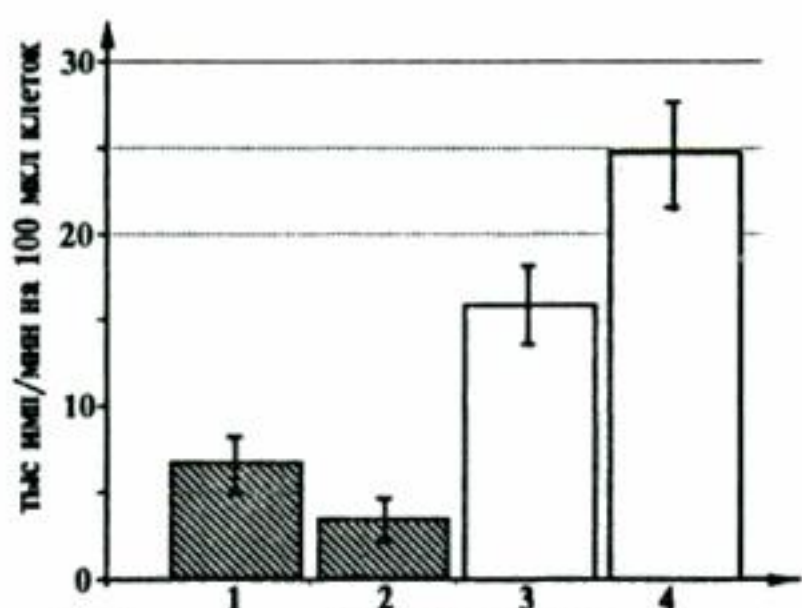


Рис. 1. Связывание  $^{14}\text{C}$ -ПЭО-1500 с эритроцитами при различных режимах инкубации их с криопротектором: 1 – одновременное добавление ПЭО-1500 при 0 °С, 2 – постепенное добавление ПЭО-1500 при 0 °С, 3 – одновременное добавление ПЭО-1500 при 20 °С, 4 – постепенное добавление ПЭО-1500 при 20 °С

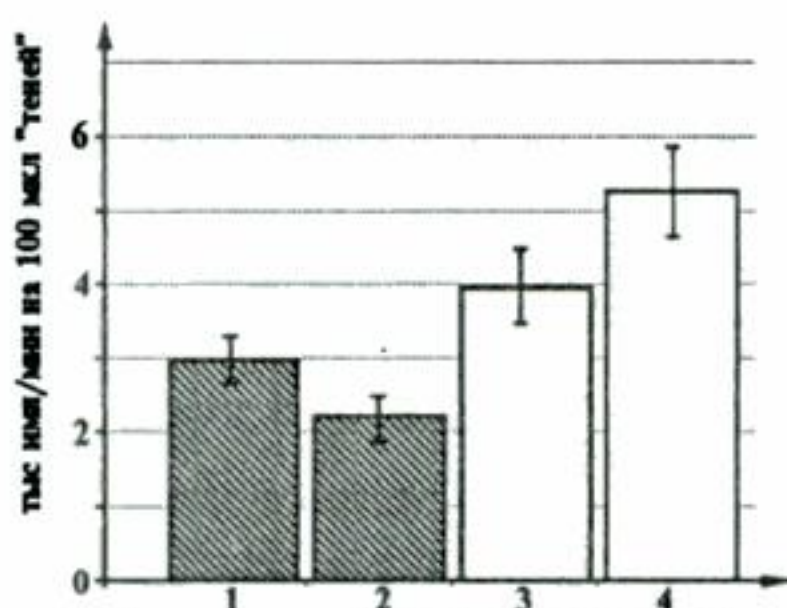


Рис. 2. Связывание  $^{14}\text{C}$ -ПЭО-1500 с белыми тенями эритроцитов при различных режимах инкубации: 1 – одновременное добавление ПЭО-1500 при 0 °С, 2 – постепенное добавление ПЭО-1500 при 0 °С, 3 – одновременное добавление ПЭО-1500 при 20 °С, 4 – постепенное добавление ПЭО-1500 при 20 °С

чению его взаимодействия с эритроцитами. При нулевой температуре не обнаруживается достоверных отличий в уровне связывания  $^{14}\text{C}$ -ПЭО-1500 с клетками в зависимости от темпов введения криопротектора в клеточную суспензию. Механизм взаимодействия ПЭО-1500 с клетками достаточно сложен. Возможно, ПЭО-1500 с эритроцитами просто адсорбируется на поверхности клетки, в результате чего изменяется состояние их плазматической мембраны. Кроме того, ПЭО-1500 может встраиваться в гидрофильные и гидрофобные участки плазматической мембраны [4]. Температура, как известно [8], оказывает влияние на характер так называемых “слабых” связей. Повышение температуры стабилизирует гидрофобные взаимодействия, что может объяснить обнаруженные нами количественные различия в уровне связывания  $^{14}\text{C}$ -ПЭО-1500 с эритроцитами при различных температурах. По мнению [4], наиболее вероятным представляется гидрофобный характер взаимодействия ПЭО-1500 с мембраной, что приводит к увеличению связывания ПЭО-1500 с клетками при комнатной температуре по сравнению с 0 °С.

Поскольку в использованном нами препарате ПЭО-1500 могли содержаться примеси низкомолекулярных фракций полимера, способных проникать в клетку, различия во взаимодействии этого криопротектора с клетками при 0–4 °С и комнатной температуре могут быть также обусловлены различным уровнем диффузии их молекул в клетку. Для проверки этого предположения были проведены эксперименты с незамкнутыми белыми тенями в тех же экспериментальных условиях. Эти эксперименты позволяют исключить роль проникновения молекул внутрь клетки при оценке связывания ПЭО-1500 с мембранами эритроцитов. Как видно из рис. 2, закономерности, установленные при взаимодействии с нативными эритроцитами, характерны и для незамкнутых белых теней. Это свидетельствует о том, что различия в уровне связывания криопротектора при различных температурах определяются особенностями его взаимодействия с плазматической мембраной эритроцитов, а не диффузией его в клетки.

В предыдущих наших работах [1, 2] было обнаружено повышение устойчивости эритроцитов к замораживанию после их обработки криопротектором при нулевых температурах по сравнению с клетками, обработанными при комнатной температуре. Это позволяет предположить, что существует корреляция между количеством ПЭО-1500, связавшегося с клетками, и их устойчивостью к замораживанию-отогреву. Увеличение связывания криопротектора с клетками перед замораживанием приводит к снижению устойчивости эритроцитов к низкотемпературному воздействию. По-видимому, при увеличении количества ПЭО-1500, связывающегося с плазматической мембраной эритро-

цитов, начинает проявляться его цитотоксический эффект, что может обусловить снижение устойчивости эритроцитов в цикле криоконсервирования.

При добавлении к клеткам ПЭО-1500 прежде всего изменяется их объем и форма. Поскольку количество ПЭО-1500, связавшегося с клетками, зависит от температуры, можно предположить, что степень изменения объема и формы эритроцитов также зависит от температуры. В связи с этим мы исследовали изменение формы эритроцитов при обработке их ПЭО-1500 в различных температурных условиях.

При постепенном введении криопротектора в суспензию эритроцитов при низкой положительной температуре поверхностная архитектура эритроцитов мало изменялась (рис. 3, б). Доля нормоцитов была намного выше, чем в контроле, доля гемолитических форм достигала 8% (табл. 1). Обработка эритроцитов ПЭО-1500 при комнатной температуре приводила к значительной деформации клеток как по сравнению с контролем (рис. 3, а), так и по сравнению с клетками, обработанными при 0 °С (рис. 3, в). Гораздо чаще встречались гемолитические формы эритроцитов (общее количество – 20%), среди которых преобладали сильно деформированные и куполообразные клетки. По-видимому, обработка при комнатной температуре способствует ускорению эффекта “диск-сфера” трансформации переходных форм дискоцитов в гемолитические.

Т а б л и ц а 1

Морфологическая характеристика эритроцитов крови человека в условиях действия криопротектора ПЭО-1500 и замораживания-отогрева

| Условия опыта                                                   | Типы эритроцитов          |                   |                          |                        |                         |                 |                        | Прочие<br>формы кле-<br>ток (куполо-<br>образные,<br>“спущенный<br>мяч” и др.) |
|-----------------------------------------------------------------|---------------------------|-------------------|--------------------------|------------------------|-------------------------|-----------------|------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                 | Нор-<br>моци-<br>ты,<br>% | Дискоциты, %      |                          |                        |                         | Сфероциты,<br>% |                        |                                                                                |
|                                                                 |                           | с<br>греб-<br>нем | с зуб-<br>чатым<br>краем | с от-<br>рост-<br>ками | “туто-<br>вая<br>ягода” | глад-<br>кие    | с от-<br>рост-<br>ками |                                                                                |
| Контроль                                                        | 33,2<br>±6,8              | 1,6<br>±0,9       | 24,0<br>±3,8             | 32,6<br>±8,0           | 3,1<br>±0,1             | 1,5<br>±0,05    | 2,0<br>±0,6            | 2,0<br>±0,04                                                                   |
| ПЭО-1500 при 0 °С                                               | 61,7<br>±5,8*             | 1,8<br>±0,7       | 20,3<br>±2,7             | 6,8<br>±1,6*           | 0,2<br>±0,08*           | 2,4<br>±1,2*    | 0,2<br>±0,07*          | 6,6<br>±0,5*                                                                   |
| ПЭО-1500 при 22 °С                                              | 39,3<br>±8,1              | 3,3<br>±0,5*      | 21,3<br>±3,7             | 15,5<br>±3,6*          | 0,9<br>±0,03*           | 3,1<br>±0,6*    | 1,0<br>±0,05           | 15,6<br>±1,6*                                                                  |
| Замораживание-отогрев после<br>инкубации с ПЭО-1500 при 0°С     | 51,7<br>±3,9**            | 1,7<br>±0,8       | 14,9<br>±1,7             | 7,6<br>±0,6**          | 1,5<br>±0,4**           | 11,5<br>±2,9    | 1,3<br>±0,3**          | 9,8<br>±1,7**                                                                  |
| Замораживание-отогрев после<br>инкубации с ПЭО-1500 при<br>22°С | 28,8<br>±1,4**            | 2,9<br>±1,2       | 24,9<br>±6,4             | 13,1<br>±2,4**         | 0,4<br>±0,01**          | 14,7<br>±4,2    | 0,5<br>±0,01**         | 14,7<br>±1,9**                                                                 |

Примечание. \* – различие достоверно (P<0,05) по сравнению с контролем; \*\* – различие достоверно (P<0,05) при сравнении морфологических характеристик после замораживания-отогрева эритроцитов, инкубированных с ПЭО-1500 при 0 и 22 °С.

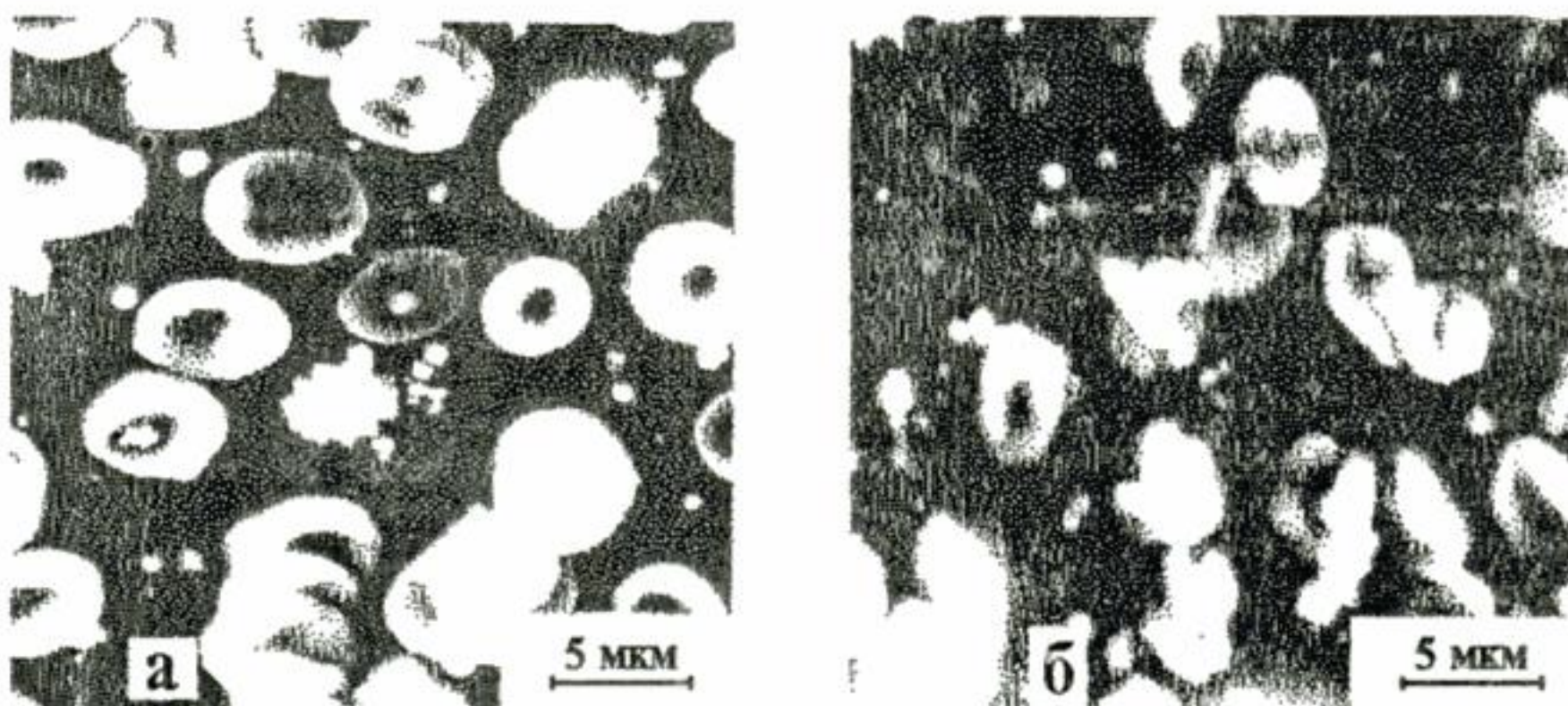


Рис. 4. Форма деконсервированных эритроцитов, преинкубированных с ПЭО-1500 при различных температурах: а – добавление криопротектора при 0 °С, б – добавление при 20 °С. Уменьшение при репродукции 3/5

После замораживания-отогрева эритроцитов, обработанных ПЭО-1500 при комнатной температуре, большая часть клеток была по-прежнему сильно деформирована; была высока доля гемолитических форм (рис. 4, б), среди которых преобладали гладкие сфероциты и сильно деформированные формы (табл. 1), а также встречались фрагменты эритроцитов. После размораживания эритроцитов, обработанных ПЭО-1500 при 0 °С, большая часть клеток была представлена нормоцитами. Число гемолитических форм было значительно ниже, чем у клеток, обработанных при комнатной температуре. Полученные данные свидетельствуют о том, что обработка эритроцитов при 0 °С ПЭО-1500 в значительной степени стабилизирует форму клеток, уменьшая вероятность трансформации диск-сфера. При этом приобретенная стабильность формы после обработки при 0 °С сохраняется и в процессе замораживания-отогрева. Известно, что важная роль в поддержании формы принадлежит белкам цитоскелета [12], поэтому обнаруженные нами изменения формы отражают в определенной степени реакцию белков цитоскелета на температурное и осмотическое воздействие.

Характер модификации мембранных белков эритроцитов при действии на клетки криопротектора и в результате замораживания можно оценить, используя белок-сшивающие реагенты, в частности, диамид, который окисляя SH-группы, сшивает белки, находящиеся на определенном расстоянии друг от друга [10]. В результате чего между белками образуются дисульфидные мостики и возникают высокомолекулярные агрегаты белков, которые обнаруживаются на электрофореграммах на старте геля.

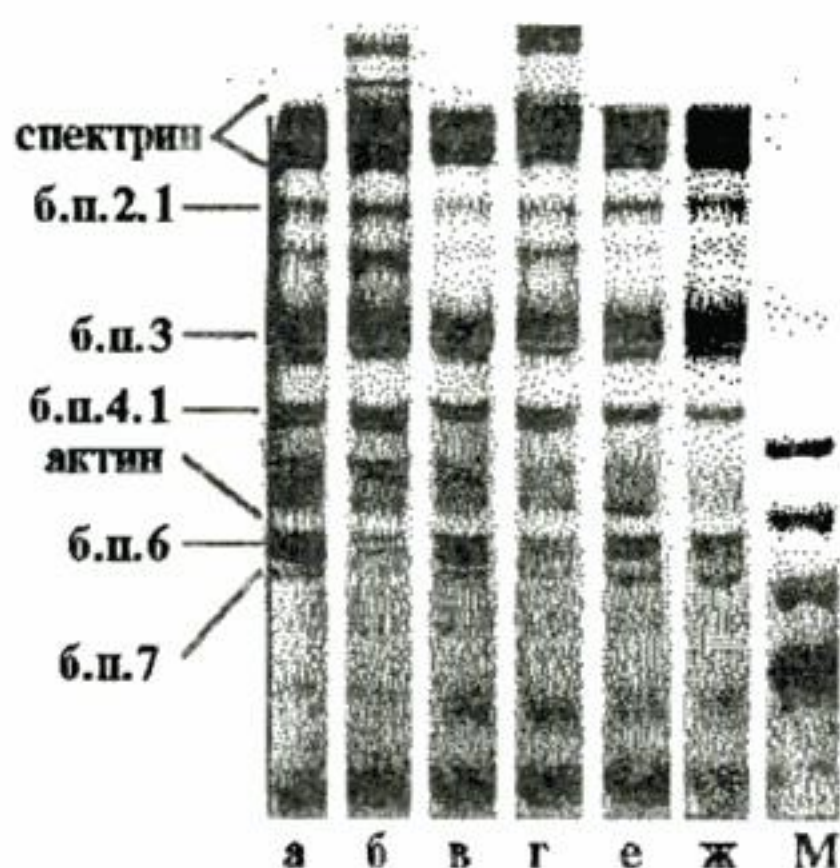


Рис. 5. Электрофорез мембранных белков эритроцитов, обработанных диамидом, после их инкубации с криопротектором при различных температурах и после замораживания-отогрева: а – нативные эритроциты, б – эритроциты, замороженные в отсутствие криопротектора, в – инкубация эритроцитов с ПЭО-1500 при 20 °С, г – замораживание после инкубации клеток с ПЭО-1500 при 20 °С, е – инкубация эритроцитов с ПЭО-1500 при 0 °С, ж – замораживание эритроцитов после их инкубации с криопротектором при 0 °С, М – маркерные белки

Т а б л и ц а 2

Содержание различных фракций белков в мембранах эритроцитов при разных температурных режимах экспонирования с ПЭО и после замораживания

| Условия экспериментов                                         | Мембранные белки |          |            |              |        |            |
|---------------------------------------------------------------|------------------|----------|------------|--------------|--------|------------|
|                                                               | Спек-трин        | Анки-рин | Белок п. 3 | Белок п. 4.1 | Ак-тин | Олиго-меры |
| Нативные эритроциты (контроль)                                | 17,7             | 12,5     | 25,1       | 9,6          | 11,3   | —          |
| Замораживание без криопротектора                              | 14,0             | 13,9     | 17,1       | 7,7          | 7,8    | 14,5       |
| Инкубация эритроцитов с криопротектором при 22 °С             | 16,6             | 10,9     | 26,5       | 6,9          | 9,7    | 2,4        |
| Замораживание после инкубации с криопротектором при 22 °С     | 12,4             | 9,5      | 20,8       | 4,2          | 4,3    | 14,0       |
| Экспонирование клеток с криопротектором при 0 °С              | 17,6             | 10,8     | 28,3       | 7,3          | 10,1   | 0,5        |
| Замораживание после экспонирования с криопротектором при 0 °С | 17,8             | 12,9     | 26,3       | 7,8          | 7,5    | 3,8        |

Примечание. Данные представлены в % по отношению к общему содержанию белка в мембране.

При поэтапном добавлении ПЭО-1500 к клеткам характер распределения белковых фракций в ПААГ практически не отличается от нативных эритроцитов (рис. 5). Инкубация клеток с криопротектором при комнатной температуре приводила к нарушению пространственной упаковки части мембранных белков, поскольку на старте электрофореграмм выявлялось небольшое количество агрегатов (табл. 2). Различия в характере модификации белков цитоскелета эритроцитов при различных режимах инкубации с ПЭО-1500 становились более отчетливыми после замораживания-отогрева клеток. В этом случае обработка диамидом размороженных клеток, которые инкубировали с криопротектором при комнатной температуре, позволяла обнаружить значительное количество белковых агрегатов на старте геля. Денситометрирование электрофореграмм показало, что уровень агрегирования белков в этом случае был сопоставим с таковым для белков эритроцитов, замораживавшихся в среде без криопротектора. При этом отмечено снижение содержания белков отдельных фракций, что свидетельствует о нарушении пространственной структуры части мембранных белков и появлении доступных для диамида SH-групп и вовлечении их в процесс агрегации. Постепенное добавление ПЭО-1500 при 0 °С позволяет сохранить в процессе криоконсервирования структуру белков мембранного каркаса эритроцитов в состоянии, близком к нативному по данному показателю. Агрегация белков под действием диамида составляет всего 3,8% от всех мембранных белков, а распределение их по фракциям незначительно отличается от контроля.

Полученные в работе данные позволяют заключить, что более высокий уровень связывания ПЭО-1500 при комнатной температуре, по сравнению с таковым при 0 °С, сопровождается значительной деформацией клеток и нарушением пространственной структуры мембранных белков. Снижение температуры, при которой эритроциты обрабатываются ПЭО-1500, позволяет сохранить форму эритроцитов и пространственную структуру мембранных белков близкими к нативным, что обуславливает меньшую повреждаемость клеток при замораживании-отогреве.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бабийчук Л.А. Влияние охлаждения на структуру и осмотические свойства эритроцитов человека: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Харьков, 1985. — 22 с.
2. Бабийчук Л.А. "Холодовая адаптация" эритроцитов к действию низких температур // Биохимические аспекты холодовых адаптаций. Сб. науч. тр. — Харьков, 1991. — С. 26–31.
3. Козинец Г., Симоварт Ю. Поверхностная архитектура клеток периферической крови в норме и при заболеваниях системы крови. — Таллинн: Велгус, 1984. — 250 с.
4. Моисеев В.А. Молекулярные механизмы криповреждения и криозащиты белков и биологических мембран: Автореф. дис. ... д-ра. биол. наук. — Харьков, 1984. — 47 с.
5. Пушкарь Н.С., Шраго М.И., Белоус А.М. и др. Криопротекторы. — Киев: Наук. думка, 1978. — 236 с.
6. Ровенский Ю.А. Растровая электронная микроскопия нормальных и опухолевых клеток. — М.: Наука, 1976. — 503 с.

7. Шраго М.И. О криозащитном действии полимеров окиси этилена на эритроциты человека при глубоком охлаждении (к проблеме криоконсервирования крови): Автореф. дис. ... д-ра. биол. наук. – Ленинград, 1971. – 33 с.
8. Хочачка П., Сомеро Дж. Биохимическая адаптация. – М.: Мир, 1988. – 568 с.
9. Fairbanks G., Steek T.L., Wallach D.F.H. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane // Biochemistry. – 1971. – 10. – P. 2606–2617.
10. Haest C.W.H., Kamp D., Plasa G., Deutick B. Intra and intramolecular cross-linking of proteins in intact erythrocytes and ghosts by SH-oxidizing agents // Biochem. and Biophys. Acta. – 1977. – 469, N 2. – P. 226–230.
11. Klaus A., Pratsch L., Gawrisch K. Effect of poly (ethylene glycol) on phospholipid and polarity of the external phase // Biochem. and Biophys. Acta. – 1983. – 728, N1. – P. 121–128.
12. Mohandas N. Regulation of red cell membrane deformability and its ability by proteins network // Phys. Med. and Biol. – 1988. – 33, Suppl. – P. 354.
13. Morgan C.G., Thomas E.W., Yianni Y.P. The use of fluorescence energy transfer to distinguish between poly (ethylene glycol)-induced aggregation of vesicles // Biochem. and Biophys. Acta. – 1983. – 782, N 3. – P. 356–362.

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

Поступила 18.11.96

Л.О.БАБІЙЧУК, Н.Г.ЗЕМЛЯНСЬКИХ

## ВПЛИВ ПОЛІЕТИЛЕНОКСИДУ-1500 І ТЕМПЕРАТУРИ НА ОСОБЛИВОСТІ МОДИФІКАЦІЇ МЕМБРАН ЕРИТРОЦИТІВ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Проведені дослідження змін форми еритроцитів і стану білків їх плазматичної мембрани при різних температурних режимах обробки клітин кріопротектором ПЕО-1500 і після заморожування-відігрівання. Встановлено, що обробка еритроцитів при 0 °С ПЕО-1500 значно стабілізує форму клітин і набула стабільність форми зберігається в процесі заморожування-відігрівання. Показано, що поступове додавання ПЕО-1500 при 0 °С дозволяє зберігати у процесі кріоконсервування структуру білків мембранного каркаса еритроцитів у стані, близькому до нативного.

L.A.BABIYCHUK, N.G.ZEMLYANSKIKH

## THE EFFECT OF POLYETHYLENE OXIDE AND TEMPERATURE ON THE PECULIARITIES OF THE RBC MEMBRANE MODIFICATION

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

There have been studied the changes in the shapes of RBC (red blood cells) and the state of proteins of their plasma membranes during various modes of temperature treatment of cells with a PEO-1500 cryoprotectant and after freeze-thawing. Treatment of RBC with PEO-1500 at 0 °C has been found to considerably stabilize the shapes of cells, and thus acquired stability is maintained in the process of freeze-thawing. A gradual addition of PEO-1500 at 0 °C has been shown to permit to maintain the structure of the proteins of the membrane assembly of RBC in a state, close to the native, during cryopreservation.

УДК 612.822.1:612.57

**Р.Г.Шейхова, Д.Э.Пашаева, А.А.Эмирбекова,  
Э.З.Эмирбеков**

## Н-АЦЕТИЛИРОВАННЫЕ ДИКАРБОНОВЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ В МОЗГЕ ПРИ ГИПОТЕРМИИ

Изучено влияние гипотермии до 30 и 20 °С и последующего самосогревания крыс на содержание N-ацетилированных глутаминовой (НАГК) и аспарагиновой (НААК) кислот в тканях мозга. Обнаруженные значительные изменения в содержании НАГК и НААК в мозге животных в изученных состояниях свидетельствуют о важной роли этих аминокислот в механизмах гипотермии. Предполагается, что в условиях гипотермии в разной степени активируются процессы депонирования ацетильных групп и нейромедиаторных аминокислот в N-ацетилированных глутаминовой и аспарагиновой кислотах.

В патогенезе гипотермии теплокровных организмов решающая роль отводится ЦНС, в связи с чем весьма детально исследуются различные стороны

метаболизма мозга [2, 3]. Для раскрытия нейрохимических механизмов при низкой температуре тела важное значение имеет изучение нейроспецифических компонентов, таких как N-ацетилированные глутаминовая и аспарагиновая кислоты, которые играют в функциональной деятельности мозга большую роль [4].

Опыты проводили на лабораторных белых крысах-самцах массой 150 г. Гипотермию вызывали с помощью холодовых камер, через рубашку которых циркулировала вода с температурой 4–5 °С. Температуру тела, измеряемую ректально (РТ), снижали так, что за 15 мин она составляла 30 °С, за 60 мин — 20–19 °С. В отдельных случаях глубокую гипотермию (20–19 °С) повторяли 3 раза в течение 3 сут. Исследования проводили в процессе самосогревания животных (через 3 ч) и после перенесенной гипотермии (через 3 и 7 сут). Подопытных и контрольных крыс декапитировали, вскрывали черепную коробку, разделяли большие полушария и средний + промежуточный мозг. Для биохимического анализа все последующие процедуры с тканями мозга проводили на холоде. Очищенные от кровеносных сосудов отделы мозга гомогенизировали в 5 объемах раствора Рингера. Гомогенат тканей мозга центрифугировали, в надосадочной жидкости определяли содержание НАГК и НААК, для чего проводили 30-минутный гидролиз с половинным объемом 6N HCl в кипящей водяной бане в пробирке с обратным холодильником. Гидролизат выпаривали, осадок растворяли в 0,5 мл бидистиллированной воды и в нем определяли концентрацию глутаминовой и аспарагиновой кислот методом электрофореза на бумаге по Дозе [1]. Количество НАГК и НААК определяли по разнице глутамата и аспартата до и после гидролиза (таблица).

Содержание N-ацетилированных дикарбоновых аминокислот в отделах мозга крыс при гипотермии и последующем самосогревании (в мкмоль/г свежей ткани)  $M \pm m$ ;  $n=5-6$

| Серии опытов                              | N-ацетилированный глутамат |                            | N-ацетилированный аспартат |                            |
|-------------------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|                                           | Большие полушария мозга    | Средний+промежуточный мозг | Большие полушария мозга    | Средний+промежуточный мозг |
| Контроль (интактные животные)             | 7,22±0,40                  | 3,62±0,32                  | 5,42±0,32                  | 3,29±0,18                  |
| Гипотермия, °С:                           |                            |                            | ...                        |                            |
| 30                                        | 4,00±0,29                  | 8,30±0,50                  | 3,46±0,14                  | 9,10±0,49                  |
| 20                                        | 12,3±1,15                  | 6,33±0,32                  | 7,96±0,13                  | 8,40±0,38                  |
| 3-кратная гипотермия 20–19                | 4,12±0,32                  | 5,09±0,32                  | 3,04±0,08                  | 2,91±0,30                  |
| Самосогревание после гипотермии 30 через: |                            |                            | ...                        |                            |
| 3 ч                                       | 3,33±0,16                  | 9,10±0,55                  | 7,18±0,21                  | 4,29±0,17                  |
| 7 сут                                     | 19,05±0,53                 | 13,11±0,24                 | 14,32±0,47                 | 18,48±0,49                 |
| после гипотермии 20–19 через:             |                            |                            | ...                        |                            |
| 3 ч                                       | 3,43±0,13                  | 3,90±0,14                  | 2,29±0,15                  | 4,60±0,8                   |
| 7 сут                                     | 3,88±0,19                  | 4,56±0,20                  | 9,80±0,65                  | 4,84±0,09                  |
| после 3-кратной гипотермии 20–19 через:   |                            |                            | ...                        |                            |
| 3 ч                                       | 12,80±0,45                 | 6,30±0,20                  | 11,60±0,19                 | 5,40±0,20                  |
| 7 сут                                     | 9,50±0,33                  | 11,6±0,35                  | 0,50±0,04                  | 5,50±0,05                  |

При умеренной гипотермии (30 °С), когда крысы находятся в возбужденном состоянии, содержание НАГК и НААК в больших полушариях головного мозга значительно снижается, а в среднем + промежуточном мозге увеличивается. Углубление гипотермии до состояния “холодового наркоза” (температура тела 20–19 °С) у крыс приводит к резкому увеличению содержания НАГК и НААК в исследуемых отделах головного мозга. Гипотермическое воздействие, включающее в себя 3-кратное снижение температуры тела крыс до 20–19 °С, сопровождается дальнейшим уменьшением содержания N-ацетилированных дикарбоновых аминокислот в тканях мозга. Анализ полученных данных (табл.) свидетельствует о том, что дискоординация метаболизма НАГК и НААК в мозге крыс, вызванная гипотермией, не только не нормализуется, но и углубляется при дальнейшем самосогревании.

Через 7 сут у самосогревшихся крыс после умеренной гипотермии содержание N-ацетилированных форм дикарбоновых аминокислот увеличивается в исследуемых отделах мозга от 2,5 до 6 раз по сравнению с таковым у интактных животных. После самосогревания через 3 ч и 7 сут в динамике содержания НАГК и НААК в мозге крыс, перенесших глубокую гипотермию (20–19 °С), не выявляется различий по сравнению с контрольной группой. Параллельно в мозге определялось содержание свободных глутаминовой и аспарагиновой кислот. Показано, что при гипотермии и последующем самосогревании в больших полушариях мозга и в среднем+промежуточном мозге значительно снижается абсолютное содержание глутаминовой кислоты (варьируя от  $8,15 \pm 0,51$  — в контроле  $3,32 \pm 0,22$ ) и аспарагиновой кислоты (варьируя от  $5,90 \pm 0,11$  в контроле до  $0,04 \pm 0,04$  мкмоль/г свежей ткани). Анализ данных показывает, что изменения содержания дикарбоновых аминокислот не коррелируют с уровнем содержания их N-ацетилированных форм при гипотермии и последующем самосогревании. Объяснением этому может служить тот факт, что в мозге уровень нейроспецифических аминокислот: дикарбоновых и их N-ацетилированных форм, балансируется не только их метаболизмом, но дополнительным их выбросом из мест связывания. Значительные изменения в содержании НАГК и НААК в мозге, обнаруженные в наших опытах, свидетельствуют о важной роли этих нейроспецифических веществ в механизмах гипотермии. Можно думать, что в условиях гипотермии в разной степени активизируются процессы депонирования ацетильных групп и нейромедиаторов в N-ацетилированных формах дикарбоновых аминокислот.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Эмирбеков Э.З. Азотистый метаболизм мозга при гипотермии и зимней спячке. — Махачкала: Дагучпедгиз, 1969. — 136 с.
2. Эмирбеков Э.З. Адаптация биохимической активности мозга к низкой температуре тела // Организованный мозг (материалы научн. конф.). — М.: Б. и., 1993. — С. 62–64.
3. Эмирбеков Э.З., Львова С.П. Механизмы биохимических изменений при низких температурах тела. — Ростов/на Дону: Изд-во РГУ, 1985. — 80 с.
4. Strecker H.I. Biochemistry of selected amino acids // Handbook of neurochemistry (Ed. by Abel Lajtha). 3. Metabolic reactions in the nervous system. — New York–London: Plenum Press, 1970. — P. 173–207.

Дагестанский гос. ун-т,  
НИИ биологии, г. Махачкала

Поступила 01.03.96

Р.Г.ШЕЙХОВА, Д.Е.ПАШАЕВА, А.А.ЕМИРБЕКОВА, Е.З.ЕМИРБЕКОВ

#### N-АЦЕТИЛЬОВАНІ ДИКАРБОНОВІ АМІНОКИСЛОТИ В МОЗКУ ПРИ ГІПОТЕРМІЇ

Дагестанський державний університет  
НДІ біології, м.Махачкала

Вивчено вплив гіпотермії до 30 і 20 °С та подальшого самозігрівання щурів на вміст N-ацетильованих глутамінової (НАГК) і аспаргінової (НААК) кислот в тканинах мозку. Виявлені значні зміни у вмісті НАГК і НААК у мозку тварин у вивченому стані, свідчать про важливу роль цих амінокислот у механізмах гіпотермії. Передбачається, що в умовах гіпотермії в різній мірі активуються процеси депонування ацетильних груп і нейромедіаторних амінокислот в N-ацетильованих глутаміновій і аспаргіновій кислотах.

R.G.SHEIKHOVA, D.E.PASHAYEVA, A.A.EMIRBEKOV, E.E.EMIRBEKOV

#### N-ACETYLATED DICARBONIC AMINO ACIDS IN THE BRAIN DURING HYPOTHERMIA

Dagestan State University  
Scientific & Research Institute of Biology, Makhachkala

There has been studied the action of hypothermic treatment down to 30 °C and 20 °C and subsequent self-warming of rats on the content of N-acetylated glutaminic (NAGA) and aspartic (NAAA)

acids in the brain tissues. The revealed considerable changes in the content of *N*AGA and *N*AAA in the brain of the animals in the studied states are indicative on the important role of these amino acids in the mechanisms of hypothermia. It is supposed that during hypothermic treatments the processes of deposition of acetyl groups and neuromediatory amino acids in *N*-acetylated glutaminic and asparaginic acids are differently activated.

УДК 616-089.583.29:616-008.935.155

**А.И.Кубарко, И.А.Застенская, Н.А.Юсипова,  
Г.Л.Гуревич**

## **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НАПРАВЛЕННОЙ КОРРЕКЦИИ ОБМЕНА ЛИПИДОВ ПРИ ГИПОТЕРМИИ С ЦЕЛЬЮ ПОВЫШЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ ЖИВОТНЫХ К ХОЛОДУ**

Исследованы процессы биосинтеза липидов в печени крыс с разной устойчивостью к охлаждению. Установлено, что у более устойчивых особей синтез фосфатидилхолина (ФХ) и холестерина (Х) протекает активнее, чем у менее устойчивых. На основе этих данных предпринята попытка коррекции липидного обмена введением липосом (ФХ:Х=1М:1М) с целью повышения холодовой резистентности организма. Показано, что введение липосом в комплексе с  $\alpha$ -токоферолом увеличивает выживаемость животных после охлаждения до 14 °С на 35%, введение  $\alpha$ -токоферола — на 8%. Предполагается, что положительное воздействие липосом при гипотермии связано с влиянием экзогенных ФХ и Х на структуру и свойства биологических мембран.

Исследования метаболических систем и их регуляции при гипотермии направлены, как правило, на поиск средств повышения устойчивости организма к охлаждению. Известны такие способы коррекции повреждающих эффектов гипотермии, как применение препаратов антигипоксического действия [10], акклимация [1], использование предшественников ряда внутриклеточных метаболитов [9] и биологически активных веществ [3, 6, 11] и др. Тем не менее проблема эффективного повышения устойчивости к холоду еще не решена. Использование с этой целью некоторых липидов представляется обоснованным, если принять во внимание их выраженную адаптационную функцию в организме в условиях действия низких температур. В настоящей работе представлены результаты изучения процессов биосинтеза липидов в печени крыс с разной устойчивостью к охлаждению, а также применения фосфатидилхолин-холестериновых липосом для повышения устойчивости млекопитающих к холоду.

Опыты выполнены на 106 беспородных белых крысах-самцах массой 190–210 г. Исследование биосинтеза липидов в печени животных проводили в условиях их охлаждения в холодовой камере ( $V=8\text{ м}^3$ ) в течение 2 ч при температуре  $(5\pm 1)^\circ\text{C}$  с периодическим смачиванием (каждые 10 мин) в воде той же температуры. Охлаждали ненаркотизированных животных без применения иммобилизации. Ректальную температуру (РТ) измеряли серийным электротермометром ТПЭМ-1 со стержневым датчиком. В зависимости от скорости снижения РТ все животные были разделены на две группы: условно “термолабильные” (ТЛ; РТ после 2-часового охлаждения  $(24,8\pm 0,38)^\circ\text{C}$  и условно “терморезистентные” (ТР; РТ в идентичных условиях охлаждения  $(31,9\pm 0,60)^\circ\text{C}$ ). “Промежуточная” группа крыс из дальнейших исследований была исключена. За 1 ч до декапитации внутрибрюшинно вводили  $2\text{-}^{[14]}\text{C}$ -ацетат натрия из расчета 300 мкКи/кг. Радиоактивность фосфолипидных фракций холестерина и незэстерифицированных жирных кислот (НЭЖК) после их хроматографического разделения определяли на сцинтилляционном счетчике фирмы “Бекман”. Количество индивидуальных фракций для расчета удельной радиоактивности определяли: фосфолипидных — по фосфору [16], холестерина — по методу Либермана-Бурхарда, НЭЖК — по Данкомбу [14]. Контролем служили интактные животные.

С целью повышения устойчивости к холоду животным вводили за 3,5–4 ч до охлаждения в хвостовую вену липосомы, полученные методом, описанным

в [7], содержащие ФХ и Х в эквимольном соотношении (20 мг ФХ и 10 мг Х на крысу), а также масляный раствор  $\alpha$ -токоферола ацетата внутримышечно в дозе 900 мг/кг. Чистота ФХ и Х проверена методом тонкослойной хроматографии (ТСХ). Индекс ненасыщенности ФХ составлял 0,87. Другой группе животных вводили масляный раствор  $\alpha$ -токоферола ацетата внутримышечно в дозе 900 мг/кг. Контрольной группе вводили физиологический раствор внутривенно и внутримышечно в тех же дозах. Подопытных и контрольных животных охлаждали по принятой методике до 14 °С и определяли выживаемость после указанного экстремального воздействия в первые 20–30 мин самосогревания в термонеutralных условиях.

Т а б л и ц а 1

Удельная радиоактивность липидных фракций печени крыс после 2-часового охлаждения

| Показатели                 | Статпоказатели    | ТЛ (I)                                        | ТР (II)                                      | Контроль (III)          |
|----------------------------|-------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------------|-------------------------|
| (имп/мкг Р/мин)            |                   |                                               |                                              |                         |
| ЛФХ                        | $n$<br>$M \pm m$  | 7<br>15,97 $\pm$ 3,68                         | 9<br>21,25 $\pm$ 4,08                        | 6<br>25,29 $\pm$ 4,43   |
| СМ                         | То же             | 6<br>4,96 $\pm$ 0,44<br>$P_{I, III} < 0,02$   | 9<br>5,34 $\pm$ 0,31<br>$P_{II, III} < 0,05$ | 7<br>6,68 $\pm$ 0,42    |
| ФХ                         | "-                | 7<br>6,33 $\pm$ 0,48<br>$P_{I, III} < 0,001$  | 9<br>8,44 $\pm$ 0,63<br>$P_{I, II} < 0,02$   | 8<br>10,40 $\pm$ 0,82   |
| ФЭА                        | "-                | 7<br>9,20 $\pm$ 0,41<br>$P_{I, III} < 0,01$   | 8<br>8,94 $\pm$ 0,33<br>$P_{II, III} < 0,01$ | 8<br>13,12 $\pm$ 0,96   |
| КЛ (кардиолипид)           | "-                | 6<br>6,74 $\pm$ 0,85                          | 6<br>6,91 $\pm$ 0,70                         | 7<br>6,16 $\pm$ 0,26    |
| ФИ<br>(фосфатидилинозитол) | "-                | 6<br>174,94 $\pm$ 27,93                       | 7<br>278,17 $\pm$ 47,59                      | 7<br>270,0 $\pm$ 42,44  |
| (имп/мг/мин)               |                   |                                               |                                              |                         |
| Свободный холестерин       | $n$<br>$M$<br>$m$ | 6<br>1091,23<br>120,28                        | 8<br>2013,16<br>307,10<br>$P_{I, II} < 0,02$ | 8<br>1276,17<br>285,15  |
| Эфиры холестерина          | То же             | 6<br>1373,91<br>151,42<br>$P_{I, III} < 0,05$ | 9<br>2851,43<br>322,11<br>$P_{I, II} < 0,01$ | 7<br>2380,84<br>341,10  |
| НЭЖК, имп/мкэкв/мин        | $n$<br>$M \pm m$  | 7<br>223,53 $\pm$ 14,66                       | 8<br>190,66 $\pm$ 22,97                      | 8<br>263,13 $\pm$ 30,59 |

Как следует из полученных данных (табл. 1), у ТЛ крыс 2-часовое охлаждение вызывает снижение по отношению к контролю скорости синтеза основных фосфолипидных фракций: сфингомиелина (СМ) — на 26%, фосфатидилэаноламина (ФЭА) — на 30 и ФХ — на 39%. Интенсивность синтеза СМ и ФЭА в печени ТР крыс, как и у ТЛ животных, ниже аналогичных показателей контроля на 20 и 32% соответственно. Скорость же синтеза ФХ при идентичном охлаждении у более устойчивых к холоду крыс, в отличие от ТЛ, не изменяется. Более того, она достоверно ( $P < 0,02$ ) выше скорости синтеза ФХ у менее устойчивых к охлаждению животных. Выявленное снижение скорости биосинтеза СМ у ТЛ и ТР особей и ФХ у ТЛ связано, по-видимому, с истощением сывороточного фонда холина, который в условиях охлаждения при ускорении обмена нейромедиаторов используется, в первую очередь, мозгом для обеспечения потребностей в синтезе ацетилхолина [15]. У более устойчивой к холоду группы крыс потребность в ФХ удовлетворяется, очевидно, за счет интенсивного ацилирования лизофосфатидилхолина (ЛФХ), содержание которого в этих условиях уменьшается [4]. Холестеринсинтетическая активность печени у ТЛ и ТР животных (табл. 1) не отличается от таковой в контроле. Однако активность синтеза холестерина в печени ТР крыс на 84% выше аналогичной у ТЛ группы, что подтверждено статистически ( $P < 0,02$ ). Скорость синтеза эфиров холестерина у ТЛ особей почти вдвое ниже аналогичных по-

казателей в контрольной и ТР группах (составляет 58 и 48 % от уровня контроля и ТР соответственно). Вышеизложенное свидетельствует в пользу относительного накопления в печени ТР животных холестерина в виде его эфиров.

Исходя из результатов исследования процессов биосинтеза липидов в печени крыс с разной устойчивостью к холоду, можно заключить, что наиболее выраженные различия обнаружены в метаболизме ФХ и Х: у более устойчивых к охлаждению особей синтез липидных фракций протекает интенсивнее. На основе этих данных предпринята попытка коррекции липидного обмена с целью повышения устойчивости к холоду. Для этого использовались липосомы, содержащие эквимоллярные количества ФХ и Х.

Известно, что внутривенно введенные липосомы попадают главным образом в гепатоциты, причем уже в первые 20–40 мин после введения печень извлекает из кровотока 50–80% липосом [12], а достаточно высокий уровень липидов, доставленных в печень, сохраняется в ее ткани в течение суток [13]. Таким образом, можно предположить, что в нашем эксперименте к началу охлаждения в печени депонировалась значительная доля экзогенных липидов и уровень их оставался высоким на всем протяжении эксперимента. Механизмы взаимодействия липосом с клетками на данном этапе изучены недостаточно. Однако показано, что лецитиновые липосомы могут извлекать из клеток около половины холестерина плазматических мембран [8]. Во избежание этого явления в нашем эксперименте использовались липосомы, содержащие ФХ и Х в соотношении, близком к соотношению для плазматических мембран печеночных клеток.

Т а б л и ц а 2

Влияние  $\alpha$ -токоферола и фосфатидилхолинхолестериновых липосом на выживаемость крыс после экстремального охлаждения до 14 °С

| Серии опытов                                | Общее кол-во животных | Из них погибло | % выживаемости |
|---------------------------------------------|-----------------------|----------------|----------------|
| Контроль (охлаждение)                       | 24                    | 14             | 41,7           |
| Охлаждение + $\alpha$ -токоферол            | 20                    | 10             | 50,0           |
| Охлаждение + липосомы + $\alpha$ -токоферол | 22                    | 5              | 77,2           |

Результаты исследования выживаемости животных после охлаждения до 14 °С в процессе самосогревания представлены в табл. 2. Выживаемость в контроле составила 41,7%, у животных подопытной группы (введение  $\alpha$ -токоферола) — 50 %, а при использовании липидов в комплексе с  $\alpha$ -токоферолом — 77, 20%. Таким образом, можно констатировать факт значительного увеличения холодовой устойчивости животных под влиянием комплекса ФХ, Х и витамина Е.  $\alpha$ -токоферол использовался в комплексе с липидами с целью переключения обмена НЭЖК на процессы  $\beta$ -окисления, а также для предотвращения перекисной деструкции фосфолипидов мембран и экзогенных липидов липосом. Обнаруженное положительное воздействие использованных липосом при охлаждении связано, вероятно, с влиянием ФХ и Х на структуру и свойства биологических мембран. Известно, что одним из ведущих факторов, оказывающих влияние на интенсивность холодового повреждения мембран, является возникновение и развитие трансмембранных эффектов, меняющих проницаемость клеточной оболочки для ионов и электролитов [2]. Введение ФХ, возможно, предотвращает нарушение структуры и свойств липидного бислоя, поскольку известно, что он способен образовывать наиболее устойчивые бислои [5]. Холестерин же, обладая способностью выполнять роль регулятора текучести биологических мембран [17], при включении в липидный бислой в условиях увеличения его микровязкости при охлаждении приводит, вероятно, к повышению текучести мембраны, что способствует сохранению функции мембраносвязанных ферментов.

Таким образом, предпринятая нами на основе анализа результатов исследования метаболизма липидов в печени крыс, различающихся по устойчивости к холоду, попытка использовать в качестве средства, повышающего ре-

зистентность организма к охлаждению, липосомы, содержащие ФХ и Х, в комплексе с  $\alpha$ -токоферолом оказалась успешной. Использование этих средств позволяет повысить устойчивость животных к глубокому охлаждению на 35%.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аристова В.В., Барашиков В.А., Карпова Э.И. и др. Влияние некоторых эндогенных факторов на чувствительность организма к холоду // IV Всесоюз. конф. "Теоретические и практические проблемы действия низких температур на организм": Тез. докл., – Л.: Б.и., 1975. – С. 15.
2. Белоус А.М., Бондаренко В.А., Гулевский А.К. Молекулярно-клеточная концепция криоповреждений клетки: роль трансмембранных дефектов // Криобиология. – 1987. – № 2. – С. 3–10.
3. Дрозд Ю.И. и др. Увеличение устойчивости к холодовому воздействию у лабораторных животных под влиянием полипептидов из сумки Фабрициуса // Авиакосм. и экол. мед. – 1992. – 26, № 4. – С. 74–75.
4. Застенская И.А., Юсипова Н.А. Липидный спектр печени крыс в зависимости от их устойчивости к холоду // Биохимия. – Минск: Изд-во БГУ, 1989. – С. 25–30.
5. Ивков В.Г., Берестовский Г.Н. Липидный бислой биологических мембран. – М.: Наука, 1982. – 224 с.
6. Кубарко А.И., Балаклиевский А.И., Губкина Н.И. и др. Нейрохимические и мембранные механизмы острой гипотермии и ее коррекция иммобилизованным адреналином // X Всесоюз. конф. по биохимии нервной системы: Тез. докл. – Горький, 1987. – 45–46.
7. Липосомы в биологических системах / Под. ред. Г.Грегориадиса, А.Аллисона. – М.: Медицина, 1983. – 383 с.
8. Марголис Л.Б., Бергельсон Л.Д. Липосомы и их взаимодействие с клетками. – М.: Наука, 1986. – 240 с.
9. Моисеенок А.Г., Омелянчик С.Н., Утню Л.Я. и др. Структура фонда кофермента А (КоА) и содержание ацетил-КоА в печени животных при глубокой гипотермии // Криобиология. – 1988. – № 3. – С. 36–39.
10. Рыжаков Д.И., Баландина М.В., Бояринов Г.А. и др. Некоторые методы коррекции повреждающего действия гипотермии и гипоксии // 2 Всесоюз. симп. "Физиологические и клинические проблемы адаптации организма человека и животных к гипоксии, гипертермии и неспецифические средства восстановления": Материалы симп. – М.: Б.и., 1978. – С. 235.
11. Утню Л.Я. и др. Кардиопротекторные свойства производного 1,4-дигидропиридина глутапирона в условиях глубокой гипотермии // Бюл. экспер. биол. и мед. – 1989. – 108, № 11. – С. 558–561.
12. Чебанов С.М., Бердичевский В.Р., Торчилин В.П. Динамика морфо-функциональных изменений в печени мышей под влиянием липосом. Материалы электронно-химического исследования // Липосомы. Применение в биологии и медицине. М.: Наука, 1985. – С. 35–40.
13. Шерпоф Дж., Роердник Ф., Хекстра Д. и др. Стабильность липосом в присутствии компонентов крови. Последовательность включения липосомальных липидов и их содержимого в клетки печени крыс // Липосомы в биологических системах. – М.: Медицина, 1983. – С. 183–210.
14. Duncombe W.J. The calorimetric determination of long-chain fatty acids in the 0,05–0,5 mol range // Biochem. J. – 1962 – 83, № 1. – P. 6.
15. Leatwood P.D., Schlosser B. Phosphatidylcholine, choline and cholinergic function // Int. J. Vitam. and Nutr. Res. – 1986. – 56, Suppl., № 29. – P. 49–67.
16. Morrison W.R. A fast simple and reliable method for the microdetermination of phosphor in biological materials // Analyt. Biochem. – 1964. – 7, № 2. – P. 218–224.
17. Yeagle P.L. Cholesterol and the cell membrane // Biochem. et Biophys. Acta. – 1985. – 822, № 3/4. – P. 267–287.

Минский гос. мед. ин-т

Поступила 01.08.94

А.І.КУБАРКО, І.А.ЗАСТЕНСЬКА, Н.А.ЮСІПОВА, Г.Л.ГУРЕВИЧ

## ВИКОРИСТАННЯ СПРЯМОВАНОЇ КОРЕКЦІЇ ОБМІНУ ЛІПІДІВ ПРИ ГІПОТЕРМІЇ З МЕТОЮ ПІДВИЩЕННЯ СТІЙКОСТІ ТВАРИН ДО ХОЛОДА

Мінський державний медичний інститут

Досліджені процеси біосинтезу ліпідів в печінці щурів з різною стійкістю до охолодження. Встановлено, що у більш стійких особей синтез фосфатидилхоліну (ФХ) і холестерину (Х) протікає активніше, ніж у менш стійких. На основі цих даних розпочата спроба корекції ліпідного обміну введенням ліпосом (ФХ:Х=1М:1М) з метою підвищення холодової резистентності організму. Показано, що введення ліпосом у комплексі з  $\alpha$ -токоферолом збільшує виживаемість тварин після охолодження до 14 °С на 35%, введення  $\alpha$ -токоферолу — на 8%. Припускається, що

позитивно для ліпосом при гіпотермії пов'язана з впливом екзогенних ФХ і Х на структуру та властивості біологічних мембран.

A.I.KUBARKO, I.A.ZASTENSKAYA, N.A.YUSIPOVA, G.L.GUREVICH

## APPLICATION OF A DIRECTED CORRECTION OF LIPID EXCHANGE DURING HYPOTHERMIA WITH THE AIM OF INCREASING THE RESISTANCE OF ANIMALS TO COLD

Minsk State Medical Institute

The authors investigated the processes of lipid biosynthesis in the livers of rats with different resistance to cooling. It was found that in the more resistant species the synthesis of phosphatidyl choline (PC) and cholesterol (C) occurs more actively as compared with less resistant species. On the basis of these data the authors made an attempt of correcting the lipid exchange by injection of liposomes (PC:C=1 M:1 M) with the aim of increasing cold resistance of the organism. The injection of liposomes together with  $\alpha$ -tocopherol was found to increase survival of animals after cooling down to 14 °C by 35%, and injection of tocopherol alone – by 8%. It is supposed that positive action of liposomes during hypothermia relates to the action of the exogenous PC and C on the structure and properties of biological membranes.

## КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

УДК 612.44:57.043

**Е.С.Ром-Бугославская, И.В.Комарова,  
Ю.И.Караченцев, А.С.Капрельянц, И.В.Гопкалова**

## ВЛИЯНИЕ ЛОКАЛЬНОГО КРИОВОЗДЕЙСТВИЯ НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ЭУТИРЕОИДНОЙ И ТИРЕОТОКСИЧЕСКОЙ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

В условиях *in vitro* на полученной субоперационно ткани эутиреоидной и тиреотоксической щитовидной железы исследовали эффект локального криовоздействия на ее секреторную активность, структуру и чувствительность к действию тиреоидных стимуляторов. Показано, что локальное воздействие холода (–180 °C, время экспозиции 3 мин, диаметр наконечника криодеструктора 1 см) приводит к значительным, в том числе ультраструктурным, морфологическим изменениям в ткани железы; содержание тиреоидных гормонов в инкубате изменяется фазно — вначале резко возрастает (“вымывание” гормонов из поврежденных фолликулов), а затем падает (торможение секреции). Локальное криовоздействие блокирует реакцию фрагментов щитовидной железы на действие тиреоидных активаторов (ТТГ, норадреналин, серотонин) и тормозит захват  $^3\text{H}$ -норадреналина. Эутиреоидная щитовидная железа на ранних стадиях эксперимента оказывается более чувствительной к воздействию холода, чем тиреотоксическая.

Локальному криовоздействию (ЛКВ) подвергалась центральная часть фрагмента полученной субоперационно эутиреоидной (паранодальная неизменная ткань щитовидной железы (ЩЖ) больных узловым зобом) и тиреотоксической ЩЖ. С этой целью использовался криодеструктор “Криоэлектроника-2” (диаметр наконечника 1 см, экспозиция 3 мин, температура –180 °C). Сразу после размораживания фрагменты железы массой 50 мг после 60-минутной преинкубации в среде 199 при температуре 37 °C помещались в свежую среду на 180 мин с почасовым определением в инкубате содержания свободных Т3 и Т4 с помощью наборов для иммуноферментного анализа (“Иммунотех”, Россия). При изучении реактивности ткани ЩЖ к действию тиреоидных стимуляторов в среду инкубации вводились ТТГ 100 мЕд/мл, норадреналин и серотонин  $5 \times 10^{-6}$  М. Содержание в инкубате тиреоидных гормонов определялось после 60 мин инкубации. Для исследования уровня поглощения фрагментами ЩЖ  $^3\text{H}$ -норадреналина меченый гормон (примерно 140 тыс. имп/мин) вводился в среду инкубации; радиоактивность образцов ткани определялась после 60, 120 и 180 мин инкубации с помощью бета-счетчика. Цифровой материал обрабатывали статистически с использованием критерия Стьюдента на ЭВМ. Для анализа структуры ткани ЩЖ, подвергшейся ЛКВ,

были использованы методы световой (окраска гематоксилином-эозином) и трансмиссионной электронной микроскопии. Ткань фиксировалась глутаральдегидом и  $\text{OSO}_4$ . Обезвоживание производилось в ацетоне возрастающей крепости; заливка — в смесь эпоксидных смол эпон-аралдит. Срезы изготавливались на ультрамикротоме УМТП-5. Контрастирование объектов осуществляли по методу Рейнольдса; просмотр и фотографирование в электронном микроскопе ЭМБ-100 БР.

Как видно из табл. 1, после 60-минутной инкубации выброс  $\text{T}_3$  эутиреоидной тканью ЩЖ, подвергшейся предварительному ЛКВ, увеличился в 2 раза, а  $\text{T}_4$  — в 1,5 раза в сравнении с контролем (фрагменты интактной ЩЖ). Секреция тиреоидных гормонов фрагментами тиреотоксической ЩЖ в этих условиях возросла в меньшей степени (на 26–27% соответственно). При исследовании в динамике (табл. 2) картина существенно менялась. В среде, содержащей фрагменты интактной эутиреоидной ЩЖ, содержание  $\text{T}_3$  продолжало увеличиваться: с  $1,29 \pm 0,11$  до  $3,52 \pm 1,54$  пмоль/л (+157%) через 120 мин и до  $4,74 \pm 1,97$  пмоль/л (+260%) через 180 мин. Увеличивалось и накопление  $\text{T}_4$ , хотя и менее интенсивно (+62 и +79% соответственно).

Т а б л и ц а 1

Влияние локального криовоздействия (ЛКВ) на секреторную активность фрагментов эутиреоидной и тиреотоксической щитовидной железы человека (60 мин инкубации)

| Группа | Состояние железы | Статистические показатели             | Содержание в инкубате, пмоль/л        |                                        |                                                  |                                        |
|--------|------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------------------------------|----------------------------------------|
|        |                  |                                       | Эутиреоидная ЩЖ                       |                                        | Тиреотоксическая ЩЖ                              |                                        |
|        |                  |                                       | $\text{T}_3$                          | $\text{T}_4$                           | $\text{T}_3$                                     | $\text{T}_4$                           |
| I      | Интактная        | $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$<br>$n$      | 10<br>$1,29 \pm 0,11$                 | 10<br>$21,50 \pm 0,14$                 | 16<br>$2,25 \pm 0,20$                            | 16<br>$30,36 \pm 0,21$                 |
| II     | После ЛКВ        | $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$<br>$p$<br>% | 10<br>$2,65 \pm 0,12$<br><0,01<br>201 | 10<br>$32,06 \pm 0,17$<br><0,05<br>150 | 13<br>$2,79 \pm 0,19$<br>$0,1 > p > 0,05$<br>127 | 13<br>$38,48 \pm 2,37$<br><0,05<br>126 |

Примечание.  $n$  — число образцов ткани.

В то же время в инкубате, содержащем ткань эутиреоидной ЩЖ после ЛКВ, прирост значений и  $\text{T}_3$ , и  $\text{T}_4$  к 120-й мин инкубации резко тормозился, составляя соответственно +12 и +15%, а к 180-й мин уровень тиреоидных гормонов в инкубате оказывался даже несколько ниже, чем после 1-часовой экспозиции.

Т а б л и ц а 2

Влияние ЛКВ на динамику секреторной активности эутиреоидной и тиреотоксической щитовидной железы человека в условиях *in vitro*. Абсолютные и нормированные значения

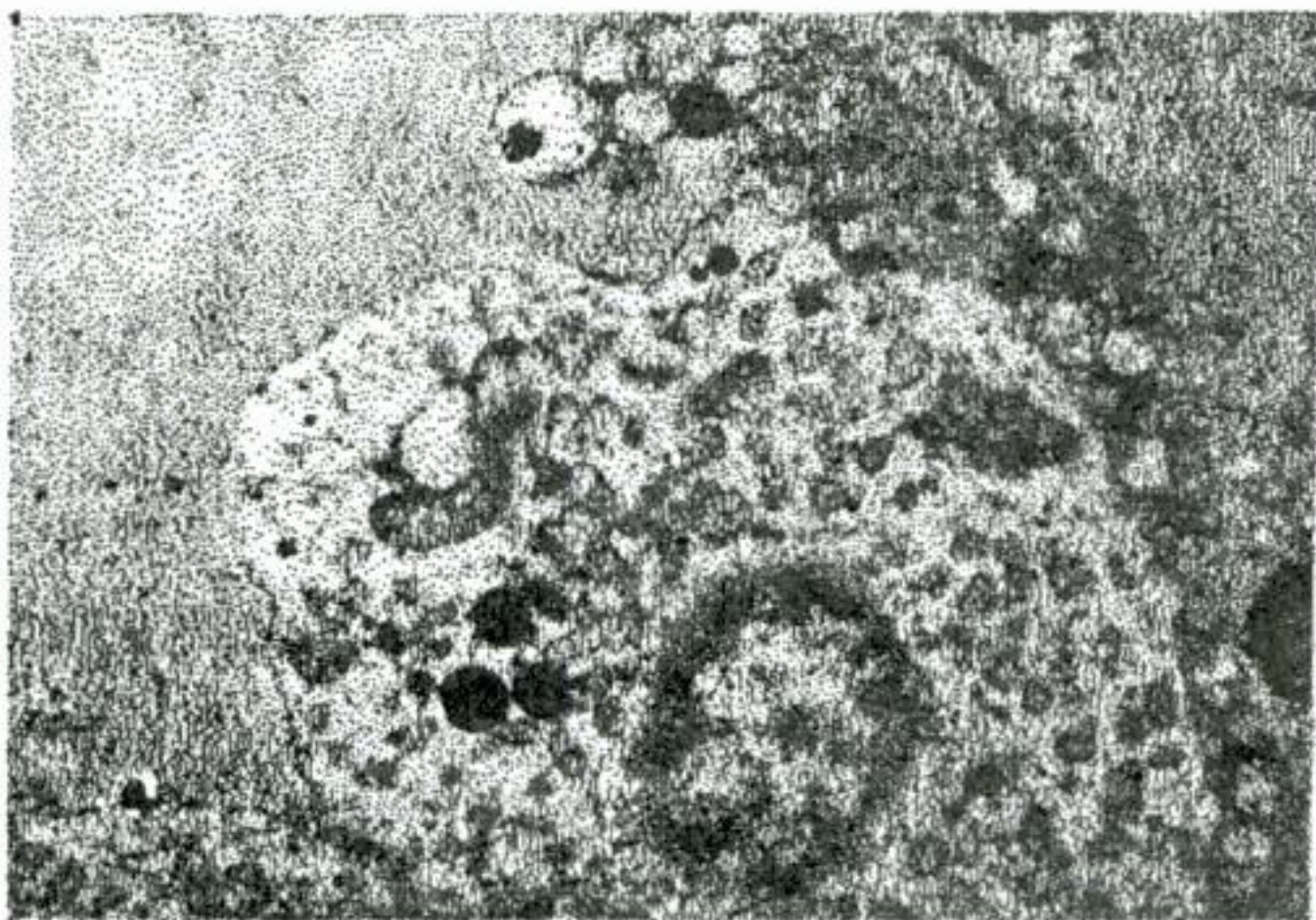
| Группа | Время инкубации, мин | Содержание в инкубате, пмоль/л |                  |                 |                  |                                |                  |                 |                  |
|--------|----------------------|--------------------------------|------------------|-----------------|------------------|--------------------------------|------------------|-----------------|------------------|
|        |                      | Эутиреоидная ЩЖ ( $n=10$ )     |                  |                 |                  | Тиреотоксическая ЩЖ ( $n=15$ ) |                  |                 |                  |
|        |                      | интактная                      |                  | после ЛКВ       |                  | интактная                      |                  | после ЛКВ       |                  |
|        |                      | $\text{T}_3$                   | $\text{T}_4$     | $\text{T}_3$    | $\text{T}_4$     | $\text{T}_3$                   | $\text{T}_4$     | $\text{T}_3$    | $\text{T}_4$     |
| I      | 60                   | $1,29 \pm 0,11$                | $21,50 \pm 0,14$ | $2,65 \pm 0,12$ | $32,06 \pm 2,11$ | $2,25 \pm 0,19$                | $30,36 \pm 2,01$ | $2,79 \pm 0,16$ | $38,48 \pm 3,04$ |
| II     | 120                  | $3,32 \pm 1,54$                | $34,88 \pm 2,20$ | $2,86 \pm 0,09$ | $36,88 \pm 1,39$ | $5,31 \pm 0,31$                | $44,06 \pm 3,21$ | $3,31 \pm 0,17$ | $46,04 \pm 2,93$ |
|        | $P_{I-II}$           | <0,01                          | <0,05            | —               | —                | <0,01                          | <0,05            | —               | —                |
| III    | 180                  | $4,74 \pm 1,97$                | $37,24 \pm 3,03$ | $2,54 \pm 0,09$ | $26,56 \pm 1,91$ | $4,95 \pm 0,21$                | $40,84 \pm 4,16$ | $3,04 \pm 0,13$ | $40,88 \pm 5,01$ |
|        | $P_{I-III}$          | <0,02                          | <0,05            | —               | $0,1 > p > 0,05$ | <0,01                          | <0,05            | —               | —                |
|        | $P_{II-III}$         | <0,05                          | —                | —               | <0,05            | —                              | —                | —               | —                |

Примечание. Нормированные значения показателей вычисляются по отношению к данным, полученным при 60-минутной инкубации.

В среде, содержащей фрагменты интактной тиреотоксической ЩЖ, прирост содержания  $\text{T}_3$  в динамике исследования тормозился раньше, чем в случае использования эутиреоидной ЩЖ — показатели содержания  $\text{T}_3$  и  $\text{T}_4$  на 120-й и 180-й мин исследования были практически одинаковыми (уровень  $\text{T}_3$  составлял  $5,31 \pm 0,31$  и  $4,95 \pm 0,21$  пмоль/л, т. е. соответственно 236 и 220% от значений, полученных на I-м этапе, а уровень  $\text{T}_4$  —  $44,06 \pm 3,21$  и  $40,84 \pm 4,16$

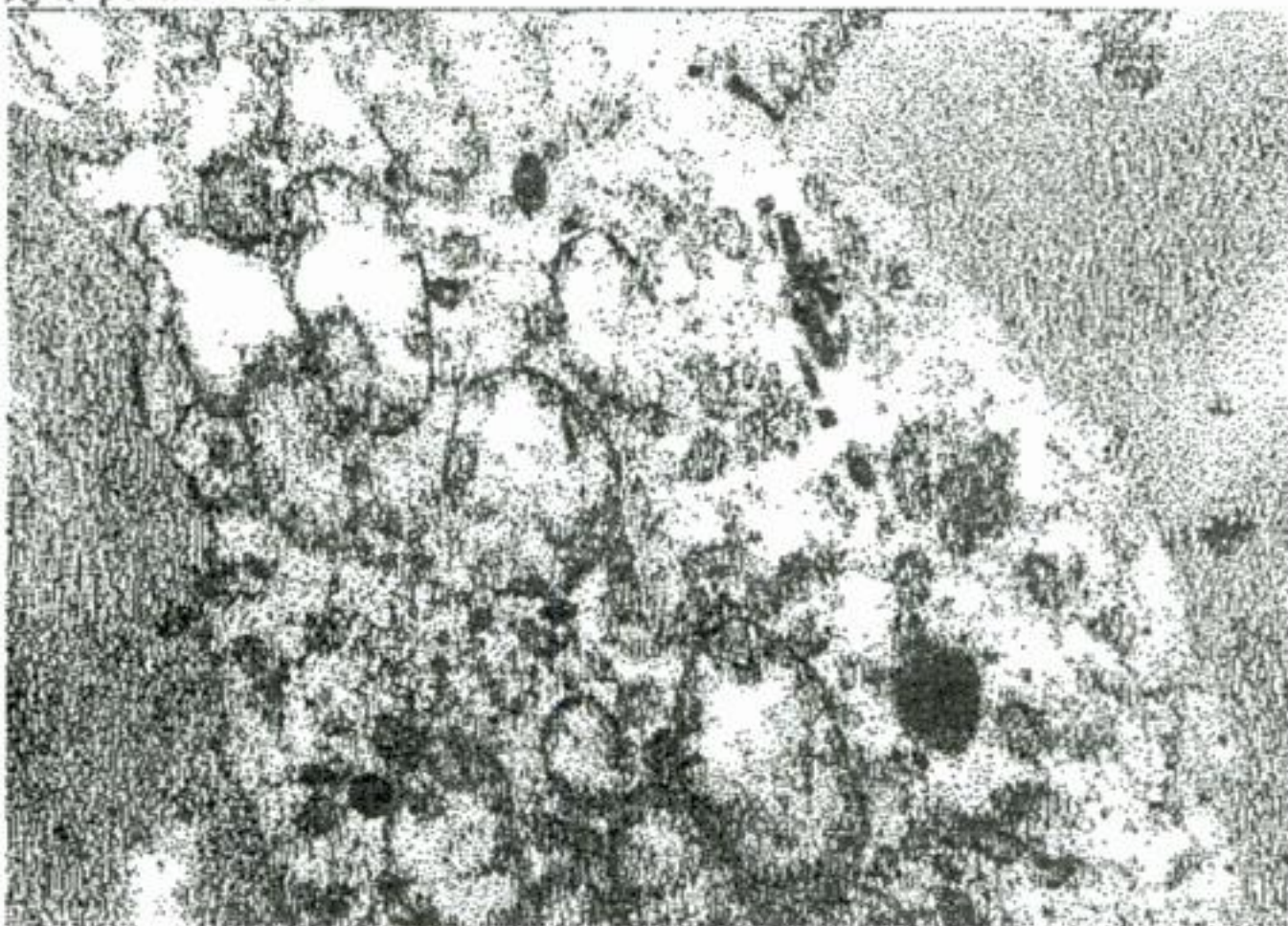
пмоль/л, или 145 и 133% от исходных данных). В среде, содержащей ткань тиреотоксической ЩЖ, подвергшейся ЛКВ, прироста содержания тиреоидных гормонов через 120 и 180 мин инкубации не происходило. Следовательно, и эутиреоидная, и тиреотоксическая железы в ответ на ЛКВ давали однотипную реакцию: после существенно-го увеличения выброса тиреоидных гормонов в среду инкубации фрагменты железы, в отличие от интактной, теряли секреторную активность. Можно в связи с этим полагать, что первоначальное увеличение выброса Т<sub>3</sub> и Т<sub>4</sub> было обусловлено не "возбуждением" железы в связи с холодным воздействием, а разрушением части тироцитов с "вымыванием" гормонов в среду инкубации.

Действительно, анализ структуры ткани и эутиреоидной, и тиреотоксической ЩЖ после замораживания до -180 °С и последующего оттаивания обнаружил вакуолизацию цитоплазмы тиреоидного эпителия; тироциты содержат ядра, имеющие извитой контур, встречаются разрушенные клетки; соединительнотканые прослойки разрыхлены, кровеносные сосуды расширены, заполнены эритроцитами. При электронно-микроскопическом исследовании выявляются изменения ультраструктуры тироцитов (рис. 1 а, б): цитоплазма некоторых клеток тиреоидного эпителия вакуолизирована, происходит частичная потеря внутренней структуры, кристы не везде четко определяются; местами нарушена целостность митохондрий; у части тироцитов ядро приобретает извилистый или прерывистый контур. Таким образом, микроскопическими исследованиями подтверждено предположение о деструктивных изменениях в ткани ЩЖ, подвергшейся ЛКВ. В экспериментах по криодеструкции печени также обнаружены значительные изменения активности ряда ферментных систем [1, 2]. В условиях быстрого замораживания-отогрева выявлялись



а

Рис. 1, а. Тироцит больного тиреотоксикозом после локального замораживания щитовидной железы: пикнотические изменения ядра, повреждение органоидов цитоплазмы. X 10000. Уменьшение при репродуцировании 3/5



б

Рис. 1, б. Участок цитоплазмы тироцита после криовоздействия: повреждение структуры митохондрий и плазматической мембраны. X 16000. Уменьшение при репродуцировании 3/5

и необратимые структурные нарушения мембраносвязанных белков эритроцитов [5].

Однако, как неоднократно отмечалось в исследованиях В.А.Чуйко и др. [7, 8], глубокое охлаждение фрагментов ЩЖ приводит к разнонаправленным изменениям ряда важнейших биохимических процессов в ЩЖ: захват йодидов клетками ЩЖ снижается, как и включение  $^{14}\text{C}$ -аминокислот в белки ЩЖ, но возрастает органификация йодидов, сохраняется активность некоторых ферментов, имеющих отношение к процессам йодирования тиреоглобулина (МАО) и секреции тиреоидных гормонов (катепсин Д); тормозится секреция тиреоидных гормонов, но не прекращается полностью; не изменяется активность аденилатциклазы в ЩЖ и т. д. В целом, вектор отмеченных изменений указывает на определенную криоустойчивость ЩЖ к замораживанию. Применительно к полученным нами данным это не дает оснований исключить принципиальную возможность той или иной степени обратимости отмеченных изменений, тем более что исследования В.А.Чуйко проводились на фрагментах ЩЖ, хранившихся относительно длительное время при сверхнизких температурах, а в наших исследованиях ЛКВ было кратковременным.

Ранее нами было показано существование ТТГ-чувствительной и ТТГ-рефракторных форм тиреотоксической ЩЖ [4]; реакция на действие стимуляторов и ингибиторов тиреоидной функции выявлялась только в первом случае, поэтому для оценки эффекта ЛКВ исследования проводились на ткани ТТГ-чувствительной тиреотоксической ЩЖ.

Т а б л и ц а 3

Реакция интактной и подвергшейся ЛКВ тиреотоксической щитовидной железы человека в условиях *in vitro* на введение в инкубационную среду активаторов тиреоидной функции. Абсолютные и нормированные значения содержания  $\text{T}_3$  и  $\text{T}_4$  в инкубате

| Группа | Вид воздействия                         | Статистические показатели        | Содержание в инкубате, пмоль/л |                         |                       |                        |
|--------|-----------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|-------------------------|-----------------------|------------------------|
|        |                                         |                                  | Интактная железа               |                         | Железа после ЛКВ      |                        |
|        |                                         |                                  | $\text{T}_3$                   | $\text{T}_4$            | $\text{T}_3$          | $\text{T}_4$           |
| I      | Контроль                                | $n$<br>$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ | 8<br>2,76 $\pm$ 0,13           | 8<br>33,44 $\pm$ 2,86   | 8<br>2,35 $\pm$ 0,12  | 8<br>28,86 $\pm$ 3,17  |
| II     | ТТГ<br>100 мЕд/мл                       | $n$<br>$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ | 9<br>5,50 $\pm$ 0,23**         | 9<br>76,44 $\pm$ 5,11** | 9<br>2,59 $\pm$ 0,19  | 9<br>27,68 $\pm$ 2,46  |
| III    | Норадреналин<br>5 $\times$ 10 $^{-6}$ М | $n$<br>$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ | 10<br>4,52 $\pm$ 0,14*         | 10<br>39,24 $\pm$ 3,01  | 10<br>2,44 $\pm$ 0,19 | 10<br>25,88 $\pm$ 2,39 |
| IV     | Серотонин<br>5 $\times$ 10 $^{-6}$ М    | $n$<br>$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ | 9<br>3,44 $\pm$ 0,16*          | 9<br>59,24 $\pm$ 4,29** | 9<br>1,64 $\pm$ 0,11* | 9<br>23,90 $\pm$ 2,04  |

Примечание. Приведены значения, полученные через 60 мин инкубации с активатором тиреоидной функции. Достоверность различий по сравнению с контролем: \* –  $P < 0,05$ , \*\* –  $P < 0,001$ .

Помимо специфического стимулятора тиреоидной активности (ТТГ), были апробированы норадреналин и серотонин, являющиеся, как известно, активными неспецифическими стимуляторами тиреоидной функции [10, 11]. ТТГ вводится в среду инкубации в концентрации 100 мЕд/мл, биогенные амины — 5 $\times$ 10 $^{-6}$  М. Из приведенных в табл. 3 данных видно, что все использованные средства повышают выброс в инкубат тиреоидных гормонов тканью интактной ЩЖ. В наибольшей степени это свойственно ТТГ (содержание  $\text{T}_3$  в инкубате под его влиянием увеличилось на 99%, а  $\text{T}_4$  на 128%); норадреналин повышал преимущественно выброс  $\text{T}_3$  (на 63%), а серотонин преимущественно  $\text{T}_4$  (на 76%), хотя в последнем случае заметно возросла и секреция  $\text{T}_3$  (на 39%). Из табл. 3 отчетливо видно, что предшествующее ЛКВ полностью блокирует стимулирующий эффект использованных средств на железу.

Таким образом, получены доказательства того, что ЛКВ вызывает значительное снижение захвата тиреотоксической ЩЖ  $^3\text{H}$ -норадреналина (табл. 4): это выявлялось уже при 60-минутной экспозиции, когда включение меченого амина в ткань интактной железы составляло (233,0 $\pm$ 13,6) имп/мин/мг ткани, а в случае предварительного ЛКВ (197,0 $\pm$ 14,0) имп/мин/мг ткани.

После 120-минутной экспозиции включение лиганда в интактную ткань повышалось на 33%, а после криодеструкции — оставалось на прежнем уровне. Через 3 ч с начала инкубации уровень захвата  $^3\text{H}$ -норадреналина фрагментами тиреотоксической ЩЖ снижался в обоих случаях (на 18% в интактной и 16% в подвергшейся ЛКВ ткани ЩЖ). Сравнительно низкие общие цифры поглощения  $^3\text{H}$ -норадреналина интактной тиреотоксической железой отмечались и в наших предыдущих исследованиях [5], что скорее всего связано с существенным повышением содержания эндогенного норадреналина в ЩЖ больных диффузным токсическим зобом и образованием гормон-рецепторных комплексов.

Т а б л и ц а 4

Захват  $^3\text{H}$ -норадреналина тканью тиреотоксической щитовидной железы человека (интактной и подвергшейся ЛКВ) в динамике исследования

| Группа | Время инкубации, мин | Статистические показатели                       | Интактная железа                   |                                      | Железа после ЛКВ           |                             |
|--------|----------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------|-----------------------------|
|        |                      |                                                 | имп/мин на образец ткани           | имп/мин на 1 мг ткани                | имп/мин на образец ткани   | имп/мин на 1 мг ткани       |
| I      | 60                   | $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$<br>$n$                | 12<br>11650 $\pm$ 1031             | 12<br>233,0 $\pm$ 13,6               | 14<br>9850 $\pm$ 883       | 14<br>197,0 $\pm$ 14,1      |
| II     | 120                  | $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$<br>$n$<br>$P_{I-II}$  | 12<br>15450 $\pm$ 1200<br><0,05    | 12<br>309,0 $\pm$ 21,2*<br><0,05     | 14<br>10250 $\pm$ 970<br>— | 14<br>205,0 $\pm$ 19,2<br>— |
| III    | 180                  | $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$<br>$n$<br>$P_{I-III}$ | 12<br>9550 $\pm$ 745<br>0,1>P>0,05 | 12<br>191,0 $\pm$ 14,4<br>0,1>P>0,05 | 14<br>8350 $\pm$ 876<br>—  | 14<br>167,0 $\pm$ 14,3<br>— |

В отдельном рассмотрении нуждается вопрос о различиях в динамике показателей содержания Т<sub>3</sub> и Т<sub>4</sub> в инкубате на разных стадиях эксперимента с ЛКВ и ЩЖ. Так, темп накопления Т<sub>3</sub> в инкубате, содержащем фрагменты и интактной, и тиреотоксической ЩЖ (табл. 2), был значительно выше, чем Т<sub>4</sub>. Поскольку в условиях *in vitro* в среде инкубации отсутствуют ферменты, участвующие в дейодировании последнего, обнаруживаемый Т<sub>3</sub> не может образоваться в результате периферической конверсии Т<sub>4</sub>, а является непосредственным результатом секреции Т<sub>3</sub> тканью ЩЖ. В связи с этим “отставание” прироста содержания Т<sub>4</sub> в рассматриваемом случае предположительно можно объяснить относительным снижением способности тироцитов к йодированию фенольного кольца 3',5'-трийодтиронины за счет падения активности йодтирозиновых остатков в условиях отсутствия в среде инкубации ТТГ, катализирующего указанные процессы [6]. Действительно, добавление ТТГ в среду инкубации, в отличие от эффекта норадреналина, сопровождается потенцированием образования именно Т<sub>4</sub> (табл. 3). Эти данные коррелируют с результатами исследований [9], в которых было продемонстрировано влияние норадреналина в основном на органификацию йода в ЩЖ, в то время как ТТГ оказывал влияние преимущественно на секрецию Т<sub>4</sub>. В свете изложенного полученные нами данные о влиянии ЛКВ на состояние секреторной активности ЩЖ могут косвенно указывать на механизмы, через которые осуществляется это воздействие.

Подводя общий итог проведенным исследованиям, можно прийти к заключению, что ЛКВ на ЩЖ человека в условиях *in vitro* вызывает в ней значительные структурно-функциональные изменения: на ранних этапах после кратковременной локальной гипотермии происходит разрушение части тироцитов, сопровождающееся “вымыванием” гормонов в инкубационную среду; в дальнейшем тормозится секреция Т<sub>3</sub> и Т<sub>4</sub>. При этом существенное значение приобретает снижение чувствительности фрагментов железы к эффекту тиреоидных стимуляторов на основе различных механизмов. Сравнивая реакцию эутиреоидной и тиреотоксической ткани железы на ЛКВ, следует отметить, что тиреотоксическая ткань железы вообще является менее активной в условиях *in vitro* (раньше, чем в эутиреоидной железе, происходит относительное торможение секреции тиреоидных гормонов), а ее реакция на кратковремен-

ное холодное воздействие на ранних этапах эксперимента оказывается ослабленной.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Капрельянц А.С. Ультраструктурные основы деструкции и восстановления печени при локальном замораживании: Автореф. дис....д-ра биол. наук. – Харьков, 1989. – 43 с.
2. Капрельянц А.С., Марченко Л.Н., Мигунова Р.К. и др. Клеточный и тканевой аспекты криодеструкции печени // II Междунар. конф. “Успехи современной криобиологии”: Материалы, Харьков, 20–25 апр. 1992 г. – Харьков: Б. и. – 1992. – С. 79–80.
3. Нардид О.А., Дюбо Т.С., Розанова Е.Д. и др. Влияние быстрого замораживания на конформацию мембранвстроенных гемосодержащих белков // I Съезд Украинского общества криобиологии и криомедицины: Материалы, Харьков, 18–20 окт. 1995 г. – Харьков: Б. и. – 1995. – С. 172–173.
4. Ром-Бугославская Е.С., Гальчинская В.Ю. Чувствительность и рефрактерность щитовидной железы к тиреотропному гормону при диффузном токсическом зобе / Респ. межвед. сб. “Эндокринология”. – Киев: Здоров’я, 1991. – Вып. 21. – С. 139–143.
5. Ром-Бугославская Е.С., Гальчинская В.Ю., Горбенко В.Н. Захват  $^3\text{H}$ -норадреналина в нормальной и тиреотоксической ткани щитовидной железы // Пробл. эндокринолог. – 1983. – XX, № 10. – (депонирована, № 1217).
6. Рачев Р.Р., Ещенко Н.Д. Тиреоидные гормоны и субклеточные структуры. – М.: Медицина, 1975. – 294 с.
7. Чуйко В.А. Биохимические процессы в криоконсервированной ( $-196^\circ\text{C}$ ) щитовидной железе и ее функция: Автореф. дис.... д-ра биол. наук. – Харьков, 1985. – 42 с.
8. Чуйко В.А., Утевский А.М. Биохимия криоконсервированной щитовидной железы. – Киев: Наук. думка, 1985. – 213 с.
9. Maajan M.L., Morelly C. TSH and catecholamines independence effects on active transport and iodine organification in isolated thyroid cells // Acta endocrinol. – 1977. – 86, № 4. – P. 763–767.
10. Melander A. Aminergic regulation of thyroid activity // Acta Med. Scand. – 1977. – 27, № 2. – P. 251–262.
11. Morlly Y.E., Roleigh M.Y., Brammer G.L. et al. Serotonirgic and catecholaminergic influence on thyroid function in the vervet monkey // Europ. J. of Pharmacology. – 1980. – 67. – P. 283–288.

Украинский НИИ фармакотерапии  
эндокринных заболеваний, г. Харьков  
Ин-т проблем криобиологии  
и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Поступила 15.07.96

О.С.РОМ-БУГОСЛАВСЬКА, І.В.КОМАРОВА, Ю.І.КАРАЧЕНЦЕВ, О.С.КАПРЕЛ'ЯНЦ,  
І.В.ГОПКАЛОВА

## ВПЛИВ ЛОКАЛЬНОЇ КРІОГЕННОЇ ДІЇ НА ФУНКЦІОНАЛЬНІ МОЖЛИВОСТІ ЕУТИРОЇДНОЇ ТА ТИРОТОКСИЧНОЇ ЩИТОВИДНОЇ ЗАЛОЗИ ЛЮДИНИ В УМОВАХ *IN VITRO*

Український НДІ фармакотерапії ендокринних захворювань, м. Харків  
Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

В умовах *in vitro* на отриманій субопераційно тканині еутироїдної та тиротоксичної щитовидної залози досліджували ефект локальної кріогенної дії на її секреторну активність, структуру та чутливість до ефекту тироїдних стимуляторів. Показано, що локальна дія холоду ( $-180^\circ\text{C}$ , термін експозиції 3 хв, діаметр наконечника кріодеструктора 1 см) призводить до значних (у тому числі ультраструктурних) морфологічних змін в паренхімі залози; вміст тироїдних гормонів в інкубаті змінюється фазно: спочатку різко підвищується (“вимивання” гормонів з пошкоджених фолікулів), а потім знижується (гальмування секреції). Локальний кріогенний ефект блокує реакцію фрагментів щитовидної залози щодо дії тироїдних активаторів (ТТГ, норадреналін, серотонін) та гальмує захоплення  $^3\text{H}$ -норадреналіну. Еутироїдна щитовидна залоза на ранніх стадіях експерименту виявляється більш чутливою до дії холоду, ніж тиротоксична.

E.S.ROM-BUGOSLAVSKAYA, I.V.KOMAROVA, I.V.KARACHENTSEV, A.S.KAPRELYANTS,  
I.V.GOPKALOVA

## THE ACTION OF LOCAL CRYOTREATMENT ON THE FUNCTIONAL ABILITIES OF EUTHYROID AND THYROTOXIC HUMAN THYROID GLAND *IN VITRO*

Ukrainian Scientific-Research Institute of Pharmacotherapy of Endocrine Diseases, Kharkov

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

The authors investigated the *in vitro* effect of local cryotreatment on the secretory activity, structure and susceptibility to the action of thyroid stimulators of the subsurgically harvested euthyroid and thyrotoxic thyroid gland. It was shown that local action of cold ( $-180^{\circ}\text{C}$ , time of exposure 3 min, diameter of the end of cryodestructor 1 cm) resulted in considerable, including ultrastructural, morphological changes in the tissue of the gland; the content of thyroid hormones in the incubate changed in a phase-like manner – sharply increased at first ("washing-out" of hormones out of the injured follicles), followed by a drop (inhibition of secretion). Local cryotreatment blocked the response of the thyroid gland fragments to the action of thyroid activators (TTG, norepinephrine, serotonin) and inhibited capture of  $^3\text{H}$ -norepinephrine. Euthyroid thyroid gland at the early stages of experiments turned out to be more susceptible to the action of cold as compared with thyrotoxic gland.

## КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 612.111:57.043

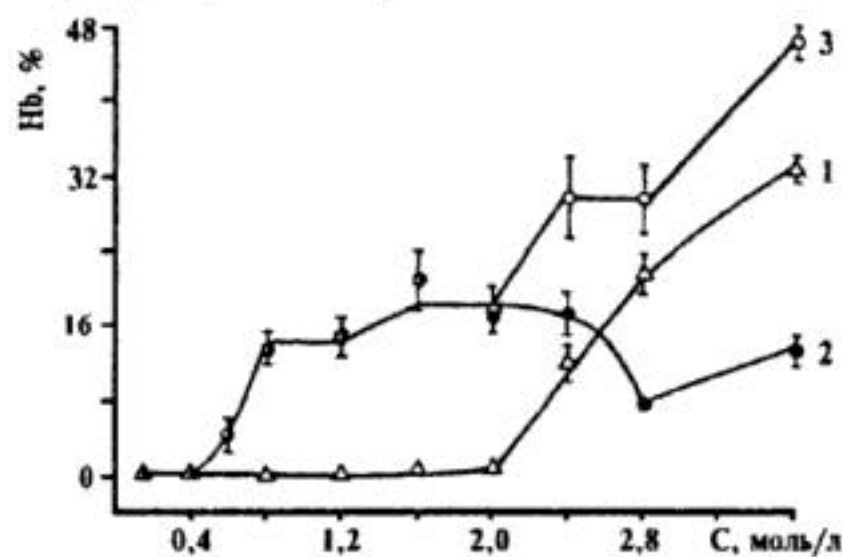
С.Х.Межидов

## ПОВРЕЖДЕНИЕ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ РЕСУСПЕНДИРОВАНИИ В ГИПЕРТОНИЧЕСКИХ РАСТВОРАХ

Известно [1, 2], что после криоконсервирования биологических объектов с использованием высоких концентраций криопротекторов их необходимо отмывать от него, используя гипертонические растворы непроникающих низкомолекулярных веществ, так как биологические объекты повреждаются при переводе в физиологические условия из-за осмотического шока. Однако влияние ресуспендирования биологических объектов в гипертонических растворах на их сохранность изучено недостаточно. В связи с этим мы исследовали влияние различных концентраций натрия хлорида на повреждение эритроцитов после центрифугирования и ресуспендирования в том же растворе, в котором они находились.

Исследования проведены на эритроцитах донорской крови человека 3–5 сут хранения при  $4^{\circ}\text{C}$ . Перед экспериментом эритроциты отмывали 3 раза физиологическим раствором натрия хлорида, который содержал 5 ммоль/л натрий-фосфатный буфер с  $\text{pH}$  7,2. Центрифугирование проводили на лабораторной центрифуге ЦЛС-3н при 3000 об/мин в течение 15 мин. Эритромассу хранили при  $0^{\circ}\text{C}$ . Все растворы готовили из препаратов марки ЧДА или ХЧ. Температура растворов была  $(20 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ . Соотношение эритромасса:раствор составляло 1:25. После смешения суспензию выдерживали в течение 10 мин при  $(20 \pm 1)^{\circ}\text{C}$  и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 мин. Затем отбирали надосадок для определения повреждения клеток на первом этапе, добавляли к эритромассе такой же раствор в соотношении 1:3, встряхивали пробирку для ресуспендирования эритроцитов и после этого доводили объем до первоначального значения. Затем эритроциты центрифугировали сразу при 1500 об/мин и отбирали надосадок. Для удаления эритроцитов, оставшихся в надосадке, центрифугировали его при 3000 об/мин в течение 4–5 мин после чего определяли гемолиз на ФЭК-56М.

Результаты исследований представлены на рисунке. Видно, что на первом этапе эритроциты начинают гемолизироваться при концентрации натрия хлорида 1,6 моль/л. Причем гемолиз эритроцитов увеличивается при концентрациях натрия хлорида выше 2 моль/л и достигает 33% при его концентрации 3,6 моль/л. При повторном переводе в тот же раствор гемолиз эритроцитов отмечает-



Зависимость гемолиза эритроцитов от концентрации натрия хлорида и от ресуспендирования в том же растворе после центрифугирования: 1 – гемолиз эритроцитов при эквilibрации (1-й этап), 2 – гемолиз эритроцитов при ресуспендировании (2-й этап), 3 – суммарный гемолиз на двух этапах

ся уже при концентрации натрия хлорида 0,6 моль/л. При дальнейшем увеличении концентрации натрия хлорида количество поврежденных эритроцитов увеличивается до его концентрации 1,6 моль/л, однако различия в количестве поврежденных клеток в диапазоне концентраций 0,8–2,4 моль/л небольшие. Обращает на себя внимание то, что повреждается меньшее количество эритроцитов на втором этапе при концентрациях натрия хлорида 2,8–3,6 моль/л.

Если просуммировать гемолиз на обоих этапах, то мы увидим, что гемолиз носит ступенчатый характер. По-видимому, причиной такого характера гемолиза эритроцитов является их гетерогенность.

Следует заметить, что эритроциты повреждаются при ресуспендировании в растворах натрия хлорида с концентрацией 0,6 моль/л и выше. Возможно, что причиной такого повреждения является нарушение барьерных свойств мембран эритроцитов при их центрифугировании в гипертонических растворах. Другой причиной, возможно, является взаимодействие мембранных компонентов различных эритроцитов между собой в силу сжатия двойного электрического слоя мембран, что может привести на этапе ресуспендирования к выходу этих компонент из состава мембраны, возникновению дефектов в ней и повреждению клеток (при центрифугировании эритроцитов в гипертонических растворах натрия хлорида отмечается их слипание). В связи с этим следует полагать, что при отмывке эритроцитов от криопротекторов целесообразнее применять диализ или отмывающие растворы с низкой, насколько это возможно, осмотичностью.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоус А.М., Грищенко В.И. Кробиология. – Киев: Наук. думка. – 1994. – 431 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.

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

Поступило 17.01.97

УДК 615.361.018.46.014.41

**Е.В.Опанасенко**

## ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ И ТКАНИ ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ ДЛЯ СНИЖЕНИЯ ИММУННОГО КОНФЛИКТА ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГИСТО-НЕСОВМЕСТИМОГО КОСТНОГО МОЗГА

Трансплантация аллогенного костного мозга является альтернативным методом терапии различных гематологических заболеваний у человека. Однако одним из основных препятствий применения этого метода является развитие иммунного конфликта в виде реакции "трансплантат против хозяина" (РТПХ). Изучение патофизиологических основ инициации и развития РТПХ продемонстрировало необходимость присутствия в миелотрансплантате не только общепризнанных триггеров этой реакции Т-лимфоцитов, но и аксессуарных клеточных популяций, продуцирующих широкий спектр регуляторных цитокинов. Есть основания полагать, что изменение сбалансированного клеточного состава миелотрансплантата может изменять не только гемопоэтическую функцию, но и РТПХ-активность миелотрансплантата.

Очевидно, что качественные и количественные параметры тех или иных регуляторно-аксессуарных элементов и клеток-эффекторов миелотрансплантата могут быть изменены под действием реализуемых в процессе криоконсервирования физико-химических факторов, проявляющих различную активность при различных режимах криоконсервирования. Это убедительно было продемонстрировано нами в предварительной серии экспериментов по оценке интенсивности развития РТПХ при трансплантации криоконсервированного в различных режимах костного мозга. Были использованы димексид и ПЭО-400, обеспечивающие, как известно, различную сохранность при криоконсервировании не только кроветворных предшественников, но и регуляторных стромальных элементов. В качестве основного объекта исследования были выбраны аксессуарно-регуляторные фракции адгезивных клеток (АК) костного мозга, включающие и предшественники стромальных клеток. Показано, что интенсивность и время начала развития синдрома во многом обусловлены компонентным составом костного мозга. В большинстве случаев получены близкие результаты при пересадке нативного с измененным компонентным составом костного мозга (элиминирована фракция АК) и криоконсервированным в том или ином режиме. При криоконсервировании в режиме К-1 (с димексидом), обеспечивающим сохранность КОЕ<sub>ф</sub>, РТПХ-активность миелотрансплантата была близка интактному нативному. Режим К-2 (с ПЭО-400) модифицировал костный мозг в плане его РТПХ-активности подобно нативному костному мозгу без АК. То есть этот режим выступает как фактор селекции АК и снижения иммунореактивности миелотрансплантата. Следовательно, криоконсервирование может выступать в роли модифицирующего фактора в отношении иммунореактивности аллогенного костного мозга. Такая активность может ре-

ализоваться через клетки, входящие во фракции АК костного мозга, принимающих участие в развитии РТПХ и обладающих "трансплантатбельностью".

Альтернативным путем модификации иммунореактивности алломиелотрансплантата может быть сотрансплантация с ним биологически активных веществ, например, входящих в состав эмбриональных тканей и обладающих иммунотропной активностью. Решению этой задачи, а именно, экспериментальному обоснованию возможности использования эмбриональных субстанций (клеток эмбриональной печени) с целью снижения иммунореактивности миелотрансплантатов, была посвящена вторая часть работы.

Острую РТПХ вызывали введением сублетально облученным мышам линии Balb/c аллогенных лимфоцитов (кл. лимфоузлов + кл. селезенки) в дозе  $5 \times 10^7$ /мышь (2-я группа). Другой группе мышей вводили лимфоидные клетки совместно с клетками эмбриональной печени (ЭП) в концентрации  $5 \times 10^6$ /мышь (3-я группа). Контролем служили облученные мыши той же линии, которым клетки не вводили (1-я группа). На 3-и, 7-е и 10-е сут после облучения и введения клеток определяли массу животных. Животных, выживших на 10-е сут, забивали, подсчитывали клеточность селезенки, костного мозга, тимуса, количество лейкоцитов и эритроцитов в периферической крови.

Наиболее общим и частым клиническим проявлением острой РТПХ и ее выраженности является истощение, снижение массы тела животных и их выживаемость. Масса интактных животных в среднем составлял 33,5 г.; масса облученных животных (1-я группа), животных с трансплантатом лимфоидных клеток (2-я группа) и клеток ЭП (3-я группа) снижалась к 10-м сут посттрансплантационного периода и составляла 80, 74 и 72% соответственно (таблица). Выживаемость животных к 10-м сут в этих группах составляла 80, 25 и 50%. Следовательно, дополнительная трансплантация клеток ЭП с лимфоцитами (3-я группа) позволила в 2 раза повысить выживаемость животных по сравнению со 2-й группой.

При острой форме РТПХ, как известно, в ранней фазе развития синдрома происходит увеличение массы селезенки — спленомегалия. Пролиферативный процесс в лимфоидной ткани на ранней стадии трансплантационной болезни развивается в результате реакции трансплантированных иммунокомпетентных клеток против антигенов хозяина. Об этом свидетельствуют и представленные в таблице данные. Само по себе облучение реципиентов в дозе 500р не вызывало развитие спленомегалии, масса селезенки мышей 1-й группы составляла 37 мг. Сплениомегалия развивалась при трансплантации иммунокомпетентных клеток. Известно, что спленомегалия обусловлена не увеличением количества клеток в органе, а увеличением их размера в результате трансформации малых лимфоцитов в бласты, а также отеком селезенки. Подтверждением этому является тот факт, что клеточность селезенки на 10-е сут после трансплантации во 2-й группе была снижена в 1,4 раза по сравнению с контролем. Интересно, что в 3-й группе масса селезенки хотя достоверно и не отличалась от показателей 1-й и 2-й групп, но все же прослеживалась тенденция к снижению выраженности спленомегалии у этих мышей.

#### Показатели, характеризующие острую РТПХ

| Условия эксперимента                        | Выживаемость на 10-е сут, % | Масса животных, г |       |                | Масса селезенки на 10-е сут, мг | Клеточность/орг., 10-е сут, $\times 10^6$ |       |              |
|---------------------------------------------|-----------------------------|-------------------|-------|----------------|---------------------------------|-------------------------------------------|-------|--------------|
|                                             |                             | 3 сут             | 7 сут | 10 сут         |                                 | Селезенка                                 | Тимус | Костный мозг |
| Контроль облучения (1-я гр.)                | 80                          | 28,2              | 27,7  | $26,7 \pm 1,7$ | $37 \pm 2,8$                    | 7,5                                       | 2,8   | 2,1          |
| Облучение + лимфоид. кл. (2-я гр.)          | 25                          | 33,7              | 29,3  | $24,7 \pm 1,5$ | $47 \pm 4,1$                    | 5,5                                       | 1,0   | 3,4          |
| Облучение + лимфоид. кл. + кл. ЭП (3-я гр.) | 50                          | 34,9              | 29,3  | $24,2 \pm 1,4$ | $40 \pm 3,6$                    | 7,6                                       | 1,4   | 2,6          |

Примечание. Средняя масса интактных животных — 33,5 г; средняя масса селезенки этих же животных составляла 40,1 мг.

Уменьшение массы тимуса регистрировалось уже на 10-е сут после трансплантации. Период выраженной атрофии тимуса совпадал со стадией максимальной спленомегалии. Тимус является самым чувствительным индикатором степени тяжести острой РТПХ. Атрофию тимуса можно, по-видимому, рассматривать как реакцию на стресс, вызванный трансплантацией клеток. Поскольку Т-лимфоциты могут быть разрушены при РТПХ непрямым путем в результате повышенной секреции кортикостероидов надпочечников, некоторые авторы рассматривают РТПХ как своеобразную "иммунологическую" тимэктомию.

Клеточность в костном мозге во 2-й группе в 1,6 раза превосходила облученный контроль 1-й группы, а в 3-й группе достоверно не отличалась от него. В периферической крови достоверных изменений в количестве лейкоцитов и эритроцитов на 10-е сут после трансплантации в исследуемых группах не наблюдалось (данные не приведены).

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать заключение о том, что совместная трансплантация клеток ЭП с лимфоидными клетками существенным образом модифицирует иммунореактивность последних, что сопровождается снижением выраженности ведущих симптомов этого заболевания. Данный факт обуславливает необходимость дальнейшего изучения патофизиологических основ совместного применения аллогенных криоконсервированных миелокариотитов в сочетании с эмбриональными тканями и продуктами их деятельности с целью миними-

зации РТПХ-активности, что является одним из главных условий повышения эффективности трансплантации гистонесовместимого костного мозга в клинике.

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

Поступило 27.06.96

УДК 611.013.12:612.592

**М. М. Ахмад**

## **ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ВЫДЕЛЕНИЯ ПОДВИЖНОЙ ФРАКЦИИ СПЕРМИЕВ ИЗ ЭЯКУЛЯТА ЧЕЛОВЕКА И ХРАНЕНИЯ ЕЕ ПРИ 8 °С НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ГАМЕТ**

В наши дни репродуктивная система подвергается мощному воздействию вредных экологических и производственных факторов, в результате чего число бесплодных браков возросло и составляет 10–30%, в половине из них бесплодие связано с мужским фактором. Для лечения бесплодия применяются новые вспомогательные репродуктивные технологии. Их успеху способствует обеспечение как долгосрочного, так и краткосрочного хранения спермиев в биологически активном состоянии.

Целью нашей работы явилось изучение зависимости эффективности краткосрочного гипотермического хранения спермиев человека из подвижной фракции клеток эякулята от степени нарушения сперматогенеза и выяснение возможности использования искусственного дополнительного постоянного магнитного поля для повышения эффективности выделения подвижных спермиев из эякулята и их хранения при гипотермии.

Материалом исследования были эякуляты мужчин из бесплодных супружеских пар. Подвижную фракцию спермиев выделяли методом “всплывания”. При разработке режима гипотермического хранения руководствовались методиками [2] и [3] в собственной модификации. Так, в качестве среды выделения подвижных гамет и хранения их при гипотермии мы на основании результатов предварительных исследований избрали питательную среду Эрла. Охлаждение суспензии подвижных спермиев от комнатной температуры до 8 °С осуществляли в пластмассовых пробирках емкостью 2 мл. Пробирки помещали в эксикатор, в атмосферу которого вводили 5% CO<sub>2</sub>, и герметически закрытым помещали в холодильник с температурой 8 °С. Для получения искусственного дополнительного постоянного магнитного поля (ДПМП) использовали так называемый “магнитный сосуд”, любезно предоставленный нам М. Г. Ковалевым, который использовал его в своих исследованиях на сперме быков [1]. Это магнитное устройство состоит из 12 постоянных полосовых магнитов, соединенных между собой одноименными полюсами таким образом, что образуют собою цилиндр, который впрессован южным полюсом в дерево. В этом сосуде мы выдерживали среду Эрла в полиэтиленовом флаконе емкостью 250 мл не менее 4 ч (экспозиция подобрана в предварительных экспериментах). Каждый эякулят разделяли на два образца. Из одного образца подвижную фракцию спермиев выделяли и хранили при 8 °С в среде, экспонированной в ДПМП, из другого — в среде, не подвергавшейся воздействию ДПМП. Эффективность выделения подвижных гамет из спермы была выше в среде Эрла, предварительно выдержанной в ДПМП как при нормоспермии, так и при патоспермиях.

Жизнеспособность гамет подвижной фракции эякулята в условиях гипотермии достоверно не снижалась в течение 48 ч в среде, не экспонированной в ДПМП, и 72, если применяли среду, выдержанную в ДПМП. Это отмечалось, если суспензию спермиев получали из эякулятов при нормо- и олигоспермии. При астено- и олигоастеноспермии количество живых клеток достоверно снизилось через 48 ч в среде Эрла без воздействия ДПМП и через 72 ч, если применяли ДПМП. Показатели соответственно были:  $(68,5 \pm 4,2)$ ,  $(62,1 \pm 3,7)$  % и  $(70,2 \pm 6,4)$ ,  $(60,7 \pm 5,3)$  %.

Переживаемость клеток подвижной фракции при нормо- и патоспермиях была различной. При нормоспермии она составила  $(10,1 \pm 1,1)$  ч, при олигоспермии  $(8,4 \pm 0,9)$  ч, при олиго- и астеноолигоспермии —  $(5,9 \pm 0,6)$  и  $(4,8 \pm 0,5)$  ч соответственно, что достоверно ниже показателя при нормоспермии. Использование “омагниченной” среды Эрла для выделения подвижной фракции не внесло статистически значимых изменений в показатели переживаемости. Хранение в этой среде суспензии спермиев при 8 °С позволило пролонгировать на сутки уровень исходной переживаемости клеток только при нормоспермии: клетки из свежеполученного эякулята имели переживаемость  $(12,2 \pm 1,3)$  ч, через 72 ч хранения при 8 °С она оставалась достаточно высокой  $(8,5 \pm 0,9)$  ч, т. е. статистически значимых различий не появилось ( $p > 0,05$ ). Скорость эндогенного дыхания при использовании среды без ДПМП оставалась на исходном уровне при гипотермии лишь сутки. Если применяли среду Эрла, экспонированную в ДПМП, снижение скорости эндогенного дыхания регистрировали лишь на 3-и сут гипотермического хранения, причем только при астеноспермии и олигоастеноспермии. При нормо- и олигоспермии она достоверно не снизилась по сравнению с показателем свежевыделенных клеток.

Акрсомальная патология у подвижных гамет более выражена при патоспермиях. Так, содержание клеток с поврежденной акросомой в суспензии подвижных спермиев при нормоспермии составляет  $(7,4 \pm 0,9)$  %, в то время как при олиго-, астено- и олигоастеноспермии соответственно:

(12,5±1,4); (15,5±1,5); (20,2±2,4) %. Достоверное нарастание количества клеток с поврежденной акросомой при гипотермии отмечается при олигоастеноспермии через 48 ч, при менее выраженной патологии сперматогенеза и нормоспермии — через 72 ч. Применение ДПМП позволяет сохранить стабильность акросомального аппарата у подвижных спермиев, полученных из эякулятов при нормо- и олигоспермии и хранившихся в условиях гипотермии, на протяжении 72 ч. С динамикой сохранности акросом при гипотермическом хранении спермиев коррелировала динамика изменения активности акрозина.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ковалев М.Г. Изменчивость некоторых признаков спермы быков-производителей под воздействием постоянного магнитного поля: Автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук. — Ленинград-Пушкин, 1990. — 31 с.
2. Крамар М.И. Влияние гипотермии на морфологические и функциональные свойства спермиев человека: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Харьков, 1990. — 17 с.
3. Чуб Н.Н., Терпячая И.В., Пиняев В.И., Луцкая Л.И. Изучение пенетрационной и оплодотворяющей способности спермиев человека, хранившихся в условиях гипотермии // Бесплодие. Вспомогательные репродуктивные технологии. — Киев: Б.и., 1995. — С. 184–186.

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

Поступило 19.11.96

УДК 57.043

**А.В.Зинченко**

## О НЕКОТОРЫХ МЕХАНИЗМАХ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ ПОЛЯРИЗАЦИИ РАСТВОРОВ ПРИ ЗАМЕРЗАНИИ

Возникновение потенциала замерзания было обнаружено Воркманом и Рейнольдсом еще в 1950 г., однако этому явлению пока дано только умозрительное объяснение. Воркман и Рейнольдс наблюдали электризацию льда, образующегося в результате кристаллизации переохлажденных капель воды при их столкновении с холодной металлической пластинкой [4]. Эффект объяснялся преимущественным внедрением ионов одного знака в растущий кристалл льда, в результате чего кристалл оказывался объемно заряженным. Мы наблюдали кристаллизационную разность потенциалов около 0,7 В при медленном замораживании физиологического раствора. Однако при быстром охлаждении растворов криозащитных веществ регистрировались всплески электрической поляризации, на несколько порядков превышающие кристаллизационную разность потенциалов при температуре вплоть до -196 °С. Это явление имеет место не только в кристаллизующихся, но и в стеклюющихся растворах в твердофазном состоянии. Отсюда следует, что механизм данного явления отличается от механизма возникновения кристаллизационной разности потенциалов в экспериментах Воркмана и Рейнольдса.

Электрические поля в замерзающих растворах могут иметь такое происхождение: 1) пьезо- и пирозлектрические явления в кристаллах; 2) локальные электрические поля за счет несовершенства кристаллической решетки; 3) акустоэлектрический эффект (может иметь место как в кристаллах, так и в стеклах); 4) возникновение разности потенциалов при растрескивании стекол по границам структурной и химической неоднородности (ликваций). Поскольку в криобиологии часто используются стеклющиеся растворы, то остановимся на двух последних механизмах. Акустоэлектрический эффект наблюдается при распространении по твердому телу ультразвуковой волны. Смещение атомов, вызванное ультразвуковой волной, сказывается на распределении и характере движения носителей заряда, что приводит к возникновению ЭДС. Ультразвуковая волна возникает при растрескивании матрицы.

Напряженность акустоэлектрического поля и соответствующий потенциал можно определить из формулы [3]:

$$E_a = \mu \alpha_n I / \gamma v,$$

где  $\mu$  — подвижность носителей;  $\alpha_n$  — коэффициент поглощения звука носителями;  $\gamma$  — электрическая проводимость материала;  $v$  — скорость волн в материале;  $I$  — интенсивность волн. Используя численные значения параметров, характерные для льда, мы нашли, что величина акустоэлектрической ЭДС во льду может достигать нескольких десятков вольт.

Возникновение зарядов при растрескивании может произойти в том случае, когда образующаяся трещина разделяет некоторые неоднородные по своим свойствам участки вещества. В стеклообразном веществе, по нашему мнению, такими неоднородностями могут являться ликвации. Между неоднородными в химическом отношении участками может существовать контактная разность потенциалов. Если по границе такой неоднородности пройдет трещина, то это эквивалентно увеличению расстояния между обкладками некоего конденсатора между данными неоднородностями. При этом уменьшается емкость конденсатора и соответственно увеличивается разность по-

тенциалов между обкладками. Соответствующие оценки показывают, что разность потенциалов между границами такой трещины может достигать от десятков до сотен вольт.

Таким образом, два последних механизма могут вызывать разность потенциалов между локальными участками замороженного вещества, способную привести к развитию свечения (криолюминесценция), что и наблюдалось в экспериментах [1, 2].

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зинченко А.В., Мусатова И.Б. Оптическое излучение водных растворов ПЭГ-300, ПЭГ-400 и ПЭГ-600 при термическом воздействии // Докл. НАН Украины. – 1994. – № 4. – С. 132–136.
2. Зинченко А.В., Мусатова И.Б. Электрические явления в водных растворах низкомолекулярных полиэтиленгликолей при охлаждении-нагреве // Пробл. криобиологии. – 1993. – № 3. – С. 40–43.
3. Weinreich G. Ultrasonic Attenuation Free Carriers in Germanium // Phys. Rev. – 1957. – 107. – P. 317–319.
4. Workman E.J., Reynolds S.E. Electrical phenomena occurring during the freezing of dilute aqueous solution and their possible relationship to thunderstorm electricity // Phys. Rev. – 1950. – 78. – P. 254–250.

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

Поступило 14.01.97

## ХРОНИКА

### УВАЖАЕМЫЕ КОЛЛЕГИ!

В марте 1997 г. исполняется 25 лет Институту проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины.

Приглашаем Вас принять участие в юбилейных мероприятиях, которые будут проходить 17–18 апреля 1997 г. в ИПКиК НАНУ по адресу: Украина, 310015, г. Харьков, ул. Переяславская, 23.

Намечается провести:

– совместное заседание Бюро Отделения молекулярной биологии, биохимии, экспериментальной и клинической физиологии Президиума НАН Украины, Президиума Украинского общества криобиологии и криомедицины, ученого совета института с повесткой дня: “ИПККиК НАН Украины 25 лет. Достижения и перспективы развития”;

– совещание “Перспективы развития современной криобиологии”. Согласие принять участие в юбилейных мероприятиях получено от видных ученых Украины, СНГ и зарубежных стран.

Контактный телефон (0572) 72-00-72

Ученый секретарь ГАРБУЗ Владимир Иванович

## К СВЕДЕНИЮ АВТОРОВ ЖУРНАЛА “ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ”

Статья представляется в 2 экз. с сопроводительным письмом и экспертным заключением (для авторов из Украины). Объем оригинальной статьи – не более 10, обзорной – 12 стр. машинописного текста, включая список литературы, таблицы, иллюстрации и подписи к рисункам. Объем краткого сообщения – 3 стр. Оба экземпляра подписываются авторами с указанием учреждения, фамилии, имени и отчества, домашнего и служебного адресов, номеров телефонов и даты.

Журнал издается методом компьютерного набора. Для ускорения редакционной обработки и выхода в свет авторы могут присылать статьи, кроме напечатанного на бумаге варианта, также в виде файлов на дискетах. Текст статьи необходимо набирать с помощью программ редактирования текста, поддерживающих альтернативную кодировку (например ЛЕКСИКОН, MultiEdit, Microsoft Word) и не использовать программы типа ChiWriter.

В случае машинописного варианта статья печатается на машинке черной лентой через 2 интервала на белой бумаге форматом (210x297 мм). На странице не более 30 строк, в строке не более 60–62 знаков. Абзацный отступ равен 5 знакам. Левое поле страницы – не менее 25, правое – 10, верхнее – 20 мм.

В левом верхнем углу проставляется УДК, затем инициалы и фамилия автора (авторов), название статьи. Название учреждения указывается под списком литературы, слева.

В тексте обязательна расшифровка аббревиатур-терминов; ссылки на номера статей по списку литературы даются в квадратных скобках.

Таблицы печатают на отдельных страницах, помещают в рукописи вслед за страницей, содержащей первую ссылку на эту таблицу. Слово “Таблица” с указанием ее порядкового номера печатается в одну строку с ее названием. Примечания к таблице даются непосредственно под ней. Листы с таблицами включают в общую нумерацию страниц рукописи. На полях проставляют номера таблиц и рисунков против тех мест текста, где они должны быть заверстаны. Формулы и буквенные обозначения должны быть выполнены четко, крупно; индексы и показатели степени печатаются или вписываются ниже или выше строки. Прописные и строчные буквы в формулах, одинаковые по начертанию и отличающиеся только размером, подчеркиваются: прописные буквы – двумя черточками снизу, строчные – двумя черточками сверху. Следует особенно четко вписывать сходные по написанию буквы: *e* и *l*, *I* и *J*, *h* и *n*. Курсивные буквы подчеркиваются волнистой линией, прямые буквы, а также нуль, *sin*, *cos*, *exp* и т.д. размечаются на прямое начертание знаком  $\_$ . Нумерация формул должна быть сквозной в пределах статьи (арабскими цифрами в круглых скобках). Разметка формул производится синей или фиолетовой пастой, греческие буквы подчеркиваются или обводятся красным карандашом, готические – синим. Нестандартные знаки (математические, физические, химические) выписываются на поле (один раз с указанием их значения).

Рисунки в количестве не более 5 выполняются черной тушью на кальке, чертежной бумаге (или в виде фотографий) размером не более 100x200 мм. На них наносятся только необходимые условные обозначения. Расшифровка их дается в подписи к рисунку или в тексте. На обороте рисунка указывается его порядковый номер, фамилия автора, название статьи и журнала. Иллюстрации должны быть четкими, чтобы их можно было внести в память системы с помощью сканера.

Список литературы составляется в алфавитном порядке. В списке необходимо привести следующие сведения: фамилия и инициалы автора в оригинальной транскрипции, название статьи, журнала или книги и далее: для периодических изданий – год издания, том, номер, номера страниц; для монографий – место издания, название издательства, год издания, общее количество страниц.

Названия периодических изданий на иностранных языках сокращаются в соответствии с правилами, принятыми в изданиях ВИНТИ.

Ссылки на неопубликованные работы не допускаются.

Объем списка литературы не должен превышать 5% общего объема рукописи.

Реферат к статье подается на русском и английском языках (авторы из Украины представляют также реферат на украинском языке) объемом до 0,3 стр.

Материалы направлять по адресу: 310015, Харьков-15, ул. Переяславская, 23, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, редакция журнала “Проблемы криобиологии”.

# ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

4<sup>1996</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. 1996. №4. 1-56