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

Институт проблем криобиологии и криомедицины

2
2001

ISSN 0233-7673

National Academy of Sciences of the Ukraine
Department of Molecular Biology, Biochemistry, Experimental and Clinical Physiology

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY

Материал защищен авторским правом

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ
PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY

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

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

Главный редактор В. И. ГРИЩЕНКО

Редакционная коллегия

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

Редакционный совет

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

Editor-in-Chief V. I. GRISHCHENKO

Editorial Board

S. I. Aksenov (Moscow)
G. A. Babiychuk (Kharkov)
M. E. Beker (Riga)
Yu. P. Blagoj (Kharkov)
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. Mezrichka (Czechia)
H. T. Meryman (USA)
Yu. F. Pastukhov (Sankt-Petersburg)
E. N. Popov (Exec. Secretary, Kharkov)
A. W. Rowe (USA)
B. P. Sandomirsky (Kharkov)
S. A. Shalimov (Kiev)
A. S. Snurnikov (Kharkov)
S. Sumida (Japan)
A. A. Tsutsayeva (Kharkov)
T. N. Yurchenko (Kharkov)
L. Wang (Canada)
G. F. Zhegunov (Kharkov)

Editorial Council

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

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

State Registration Certificate:
KB Series № 98 of 23.09.93

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

e-mail: cryo@online.kharkov.ua

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

e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Матеріал, захищений авторським правом

2
2001

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

СОДЕРЖАНИЕ

К 10-ЛЕТИЮ НЕЗАВИСИМОСТИ УКРАИНЫ

Петренко А. Ю., Грищенко В. И. Трансплантация стволовых клеток — терапия XXI века. 1. Характеристика и свойства стволовых клеток 3

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

Рамазанов В. В., Лупилова Н. А., Тодрин А. Ф., Бондаренко Т. П. Влияние гемина на транспорт протонов в эритроцитах, внесенных в сульфатную среду 13
Юрченко Т. Н., Белоножко А. П., Шарлай Т. М. Относительные показатели активности окислительно-восстановительных ферментов в эпителиальных клетках роговицы в условиях длительной гипотермии . . . 17
Горбунов Л. В. Изучение вероятности кристаллообразования раствора глицерина при высоких скоростях замораживания 21
Попивненко Л. И., Тодрин А. Ф. Теоретическое определение размеров микрокапилляров, используемых для исследования деформируемости эритроцитов 26
Юрченко Г. Г., Дунаевская А. В., Крамар М. И. Влияние метода выделения подвижной фракции гамет из эякулята человека на их морфофункциональную сохранность после криоконсервирования 30
Зовский В. Н. Особенности метаболизма биогенных аминов и циклических нуклеотидов под влиянием полиолов 36
Попова Л. Д. Влияние полиэтиленгликолей на систему вторичных посредников 41
Кричковская Л. В. Применение антиоксидантных препаратов при холодовой адаптации 45
Смольянинова Е. И., Хроменкова О. Б., Жерноклев Г. В. Влияние различных этапов криоконсервирования методом сверхбыстрого замораживания на осмотическую устойчивость и морфофункциональную сохранность эмбрионов мыши 49
Кравченко Л. П., Семенченко О. А., Фуллер Б. Д. Уровень АТФ в изолированных гепатоцитах на этапах холодового хранения в средах различного состава 56
Бабийчук Л. А., Землянских Н. Г., Сумида С., Таура Йа., Иидзима Т. Аутотрансфузия эритроцитов кроликов после криоконсервирования безотмывочным методом 61
Петренко А. Ю., Оченашко О. В. Влияние препаратов эмбриональных тканей человека на интенсивность перекисного окисления липидов при остром токсическом гепатите у крыс 66

КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЕ БИООБЪЕКТОВ

Линник Т. П., Бизикина О. В. Криоконсервирование спермы петухов. I. Цитотоксичность диолов и амидов 72
Семенченко О. А., Петренко А. Ю., Сукач А. Н., Кравченко Л. П., Демин Ю. А. Гипотермическое хранение клеток и тканей эмбрионов человека 80

КРИОМЕДИЦИНА

Журавлев А. С. Сверхнизкие температуры в комплексном лечении больных с воспалительными заболеваниями околоносовых пазух 85
Грищенко В. И., Гришина О. А., Снурников А. С., Муринец-Маркевич Б. Н. Методы локального низкотемпературного воздействия 92
Питько В. А. Изменение функциональной активности лимфоцитов у больных подострым сальпингоофоритом после трансплантации криоконсервированной хориальной ткани 101

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Грищенко В. И., Петренко А. Ю., Жигун А. И., Сукач А. Н., Ревенко Е. Д. Влияние трансплантанции криоконсервированных мезенхимальных клеток эмбрионов человека на процессы регенерации при травматическом повреждении суставного хряща крыс 106
Бондаренко Т. П., Геращенко А. В. Функциональные характеристики органной культуры надпочечников новорожденных поросят после криоконсервирования 108
Lidiya Kravchenko Memorial Prize 110

This One
8WLX-T88-PW8G

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

Матеріал, захищений авторським правом

2 2001

PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY

CONTENTS

TO THE 10th ANNIVERSARY OF UKRAINE INDEPENDENCY

Petrenko A. Yu., Grischenko V. I. Stem Cell Transplantation is the Therapy of the XXI Century. 1. Characteristics and properties of stem cells 3

THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

Ramazanov V. V., Lupilova N. A., TODRIN A. F., BONDARENKO T. P. Hemin Effect on Proton Transport in Red Blood Cells, Introduced With Sulphate Medium 13
Yurchenko T. N., Belonozhko A. P., Sharlay T. M. Relative Indices of the Activity of Oxidative and Recovering Enzymes in Cornea Epithelial Cells under the Conditions of Long-Term Hypothermia 17
Gorbunov L. V. Investigation of the Probability of Crystal Formation in Glycerol Solution under High Freezing Rates 21
Popivnenko L. I., Todrin A. F. Theoretical Determination of Microcapillary Sizes Used for Investigating Erythrocyte Deformability 26
Yurchenko G. G., Dunaevskaya A. V., Kramar M. I. Effect of isolation method for motile fraction of gametes from human ejaculate on their morphofunctional integrity after cryopreservation 30
Zovsky V. N. Metabolism Peculiarities of Biogenic Amines and Cyclic Nucleotides under the Effect of Polyols 36
Popova L. D. A Polyethylene Glycol Effect on the System of Secondary Mediators 41
Krichkovskaya L. V. Application of Antioxidant Preparations During Cold Adaptation 45
Smolyaninova E. I., Khromenkova O. B., Zhernoklev G. V. Influence of various steps of cryopreservation by a method of ultra-rapid freezing on osmotic resistance and morphofunctional integrity of mouse embryos . . . 49
Kravchenko L. P., Semenchenko O. A., Fuller B. J. ATP Level in Isolated Hepatocytes at Various Stages of Cold Storage in the Media with Different Composition 56
Babijchuk L. A., Zemlyanskikh N. G., Sumida S., Taura J., Iijima T. Autotransfusion of Rabbit Erythrocytes after Cryopreservation Washing-out Method 61
Petrenko A. Yu., Ochenashko O. V. Influence of human embryonic tissue preparations on lipids peroxidation intensity in rats acute toxic hepatitis 66

CRYOPRESERVATION OF BIOSYSTEMS

Linnik T. P., Bizikina O. V. Fowl Sperm Cryopreservation. I. Cytotoxicity of Diols and Amides 72
Semenchenko O. A., Petrenko A. Yu., Sukach A. N., Kravchenko L. P., Demin Yu. A. Hypothermic Storage of Cells and Tissues from Human Embryos 80

CRYOMEDICINE

Zhuravlev A. S. Ultra-low Temperatures in Combined Treatment of Patients with Inflammatory Diseases of Accessory Nasal Sinuses 85
Grischenko V. I., Grishina O. A., Snurnikov A. S., Murinets-Markevich B. N. Methods for Local Low-Temperature Effect in Cryomedicine 92
Pitko V. A. Changes in Functional Activity of Lymphocytes of Patients with Subacute Salpingooophoritis after Transplantation of Cryopreserved Chorial Tissue 101

BRIEF COMMUNICATIONS

Grischenko V. I., Petrenko A. Yu., Zhigun A. I., Sukach A. N., Revenko E. B. Transplantation Effect of Human Embryo Cryopreserved Mesenhymal Cells on the Regeneration Processes at a Traumatic Damage of Rat's Articular Cartilage 106
Geraschenko A. V., Bondarenko T. P. Functional Characteristics of Cryopreserved Organ Culture of Newborn Piglet's Adrenal Glands 108

Lidiya Kravchenko Memorial Prize 110

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

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

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 616-089.843: 612.119

UDC 616-089.843: 612.119

Трансплантация стволовых клеток — терапия XXI века.
1. Характеристика и свойства стволовых клеток

А. Ю. ПЕТРЕНКО, В. И. ГРИЩЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Stem Cell Transplantation is the Therapy of the XXI Century.
1. Characteristics and properties of stem cells

A. Yu. PETRENKO, V. I. GRISCHENKO

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

Широкое клиническое применение стволовых клеток (СК) предусматривает создание достаточного запаса трансплантационного материала, т.е. разработку методов их криоконсервирования и низкотемпературного хранения. Существующее мнение о высокой устойчивости СК к действию низких температур привлекает к ним внимание исследователей в области фундаментальной криобиологии, которые рассматривают СК как привлекательную модель для выяснения механизмов криочувствительности биологических объектов. В связи с этим в настоящем обзоре предпринята попытка обобщить современные взгляды на свойства СК и их место в клеточной иерархии.

Широке клінічне застосування стовбурових клітин (СК) передбачає створення достатнього запасу трансплантаційного матеріалу, тобто розробку методів їх кріоконсервування і низькотемпературного зберігання. Існуюча думка про високу стійкість СК до дії низьких температур привертає увагу дослідників у галузі фундаментальної кріобіології, які розглядають СК як привабливу модель для з'ясування механізмів кріочутливості біологічних об'єктів. У зв'язку з цим у даному огляді зроблена спроба узагальнити сучасні погляди на властивості СК і їх місце в клітинній ієрархії.

A wide application of stem cells (SC) foresees the creation of a sufficient stock of transplantational material, i.e. elaboration of the methods for their cryopreservation and low-temperature storage. The notion about a high stability of stem cells to the effect of low temperatures attracts the researchers' attention in the field of fundamental cryobiology, considering the stem cell as an attractive model for elucidation of the mechanisms of cryosusceptibility of biological objects. In this connection in the given review we have attempted to summarize current notions on the SC characteristics and their place in a cellular hierarchy.

Стволовые клетки являются объектом пристального внимания исследователей в области клеточной биологии, экспериментальной и клинической медицины. С их терапевтическим применением связывают надежды на прорыв в лечении онкологических, гематологических, неврологических заболеваний. Использование СК открывает неограниченные перспективы трансплантологии вплоть до создания новых органов.

Термин "стволовая клетка" был введен в 1908 г. нашим соотечественником А. А. Максимовым, который предположил существование единого предшественника всех клеток крови. Хотя эта гипотеза получила экспериментальное подтверждение в 1982 году открытием стволовой кроветворной клетки (СКК) мыши, сенсационный интерес к этим клеткам проявился после 1998 года, когда два независимых исследователя John Gearhart из Университета Джона Гопкинса [21] и James Thomson из университета Висконсин [23] впервые выделили эмбриональную СК человека и показали ее способность к дифференциации в клетки всех трех зародышевых листков. В 1999 году журнал "Science" назвал открытие СК человека третьим по значимости событием XX века в

Stem cells are the object for the detailed attention of the researchers in the field of cell biology, experimental and clinical medicine. Their therapeutic application is connected to hopes for breaking-up when treating oncological, hematological, neurological diseases. SC usage opens unlimited perspectives in transplantology up to the creation of new organs.

The "stem cell" term was introduced in 1908 by Maksimov A. A., our compatriot, who supposed the existence of common precursor of all blood cells. Though this hypothesis was experimentally confirmed in 1982 by the discovery of murine hemopoietic stem cell (HSC), a sensational interest to these cells was manifested after 1998, when John Gearhart from John Hopkins' University [21] and James Thompson from the University of Wiskonsin [23], two independent researchers for the first time isolated human embryonic stem cell and showed its capability for differentiation into the cells of all three germinal lineages. In 1999 "Science" journal named the discovery of human stem cell the third on its significance event of the XX century in the field of medicine after a double spiral and the "human genome" program.

Матеріал, захищений авторським правом

области медицины после двойной спирали и программы "геном человека".

В настоящее время под термином СК подразумевают клетку, способную к нелимитированному самообновлению и образованию одного или нескольких типов дифференцированных потомков.

Морфология стволовых клеток. Часто в формулировку СК включают такую характеристику, как "морфологически неотличимая". Обычно СК представляет собой небольшую клетку, напоминающую малый лимфоцит и не обладающую морфологическими особенностями, позволяющими провести ее идентификацию. Однако существует, по крайней мере, одно исключение — СК нервной периферической системы дрозофилы, где СК иначе ориентированы по отношению к окружающим клеткам [13]. Асимметрическая ориентация СК дрозофилы контролируется внутриклеточными органеллами — спектросомами, которые содержат цитоскелетные и регуляторные белки (спектрин и циклин А).

В связи с отсутствием морфологических особенностей единственной возможностью идентификации СК является разработка панели молекулярных маркеров. В целом СК характеризуется чрезвычайно бедным фенотипом, что обусловлено отсутствием на мембране большинства рецепторов. Очевидно, на СК экспрессированы только рецепторы, ответственные за адгезию к экстраклеточному матриксу, что подавляет запуск реакций терминальной дифференциации. Например, эпидермальные СК экспрессируют высокий уровень β1 интегринов [22]. Наиболее разработаны молекулярные маркеры для СКК и ее коммитированных и окончательно дифференцированных потомков.

Дифференцировочный потенциал. По дифференцировочному потенциалу СК можно разделить на 4 типа: тотипотентные, полипотентные, мультипотентные и унипотентные. Унипотентные СК — предшественники одного типа клеток, способные к нелимитированному самообновлению. Очевидно, наличие унипотентных СК характерно для более древних систем и в настоящее время они обнаружены только в периферической нервной системе и половых железах дрозофилы.

Тотипотентные СК обладают неограниченным, полным или тотальным многообразием, т.е. способны давать начало всем типам клеток организма и плаценты. При помещении тотипотентной клетки в матку развивается полноценный плод. Свойство тотипотентности характерно для оплодотворенной яйцеклетки и сохраняется до стадии зиготы (до 4-клеточной стадии у человека и мыши, 8-клеточной стадии у кроля и овцы, 32-клеточной — у коров) [2]. Таким образом, свойство тотипотентности сохраняется до 2–5 делений. У человека время существования тотипотентных СК составляет около 4 дней после оплодотворения. В результате нескольких последующих циклов деления эти

Now the SC term is implicated as a cell, capable of unlimited self-renewal and forming of one or several types of differentiated progenitors.

Stem cells morphology. Often such a characteristics as "morphologically the same" is included into the SC term. Usually this is a small cell, similar to a small lymphocyte and without morphological peculiarities, allowing to carry-out its identification. However there is, at least, one exception, CS in the drosophila neural peripheric system, where these cells are orientated in different ways in respect of the surrounding cells [13]. Asymmetric orientation of the drosophila SC is controlled with intracellular organellas, spectrosomes, comprising cytoskeletal and regulatory proteins (spectrin and cycline A).

Because of with the absence of morphological peculiarities the elaboration of the panel of molecular markers is a single opportunity of the SC indentification. In the whole, stem cells are characterized by extremely poor phenotype that is stipulated by the absence of the majority of receptors on a membrane. Obviously, just the receptors, responsible for adhesion to an extracellular matrix, are expressed on stem cells, that suppresses the beginning of the reactions of terminal differentiation. For example, epidermal stem cells express a high level of β1 integrins [22]. Molecular markers for hemopoietic stem cell and its committed and finally differentiated progenitors are elaborated in a greater extent.

Differentiatial potential. By differentiatial potential the stem cells can be divided into 4 types: totipotent, polypotent, multipotent and unipotent ones. Unipotent SC are the precursors of one cellular type, capable of unlimited self-renewal. Obviously, the presence of unipotent SC is the characteristic for more ancient systems and now they are found just in the drosophila peripheric nerve system and sex glands.

Totipotent SC possess unlimited, complete or total variety, i.e. capable to initiate all cell types both in an organism and placenta. When introducing a totipotent cell into a uterine, an integral fetus is developed. Totipotent property is the characteristic for fertilized oocyte and it is kept up to zygote stage (up to 4-cellular stage in human and mice, up to 8-cellular stage in rabbit and sheep, 32-cellular stage in cows) [2]. Thus, totipotence is kept up to 2–5 cleavage stages. In human being the time of totipotent cell existence makes about 4 days after fertilization. In the result of some following cleavage cycles these totipotent SC begin specialization and form blastocyste, consist of an outer cell layer and hollow inner mass of blastocyste, where the cell claster of internal mass of blastocyste is present. From the cells of an outer blastocyste layer placenta and other tissues, necessary for embryo development in a uterine, were formed. The cells of an inner blastocyste mass are the precursors of all cell types in an organism and called as polypotent or embryonic stem cells (ESC). Polypotent SC when implanting into a uterine are not capable to develop into

Матеріал, захищений авторським правом

тотипотентные СК начинают специализироваться и образуют бластоцисту, состоящую из наружного слоя клеток и полой внутренней сферы, в которой присутствует кластер клеток внутренней массы бластоцисты. Из клеток наружного слоя бластоцисты образуется плацента и другие ткани, необходимые для развития плода в матке. Клетки внутренней массы бластоцисты являются предшественниками всех типов клеток организма и называются полипотентными или эмбриональными стволовыми клетками (ЭСК). При подсадке в матку полипотентные СК не способны развиваться в организм, поскольку не дают рост плаценты.

В ходе гаструляции большинство эмбриональных клеток теряет свою способность образовывать все типы клеток. Свойство полипотентности сохраняется только в клетках первичного зародышевого листка у эмбрионов человека до 5–8 недель внутриутробного развития [21].

Полипотентные СК, полученные как из первичного зародышевого листка, так и из бластоцисты, характеризуются стабильным кариотипом и минимальным фенотипом [24]. В связи с тем, что на их поверхности еще не экспрессированы рецепторы, при трансплантации они не могут взаимодействовать с окружающими клетками, а просто выполняют свою программу — делятся во всех направлениях, образуя аномальные опухолеподобные структуры — тератомы. Так, трансплантация полипотентных СК иммуннодефицитным мышам приводит к образованию тератом, которые содержат клетки всех трех зародышевых листков: кишечного эпителия (эндодерма), хряща, кости, гладких и поперечнополосатых мышц (мезодерма), нейронального эпителия, эмбриональных желез (эктодерма) [23].

Мультипотентные СК — предшественники нескольких, но не всех типов клеток. Они сохраняют основное свойство СК — способность к нелимитированному самообновлению, т.е. являются условно бессмертными. Мультипотентные СК также называются региональными (РСК) или соматическими.

Примеры региональных СК:

1) стволовые кроветворные клетки — предшественники клеток всех типов крови миелоидного и лимфоидного ростков кроветворения;

2) нервные СК (НСК) — предшественники всех клеток мозга (нейронов, глии) [14]. Недавно обнаруженные в биопсии мозга больного эпилепсией взрослого человека СНК изменили устоявшееся представление о необратимости повреждения нейронов [12];

3) эпителиальные СК — в настоящее время установлен единый предшественник для 4 типов клеток слизистой желудка [22];

4) стволовые клетки периферической нервной системы — предшественники периферических нервов, нейроэндокринных клеток, клеток Шванна, пигментных клеток [13];

an organism, because did not initiate the placenta growth.

During gastrulation the majority of stem cells loss their capability to form all cell types. Polypotence is kept just in the cells of initial germ lineage in human embryos to 5-8 weeks of intrauterine development [21].

Polypotent SC, obtained both from initial germinal lineage and blastocyste, are characterized by a stable karyotype and minimum phenotype [24]. In connection with the fact, that the receptors on their surface have not been yet expressed, during transplantation they could not interact with the surrounding cells, their cleavage occurs in all directions, forming tumor-like structures, teratomes. Thus, transplantation of polypotent SC to immune-deficient mice resulted in the formation of teratomes, comprising the cells in all three germinal leaves: intestinal epithelium (endoderm), cartilage, bone, smooth and cross-striated muscles (mesoderm), neuronal epithelium, embryonic glands (ectoderm) [23].

Multipotent SC are the precursors of some, but not all cell types. They keep the main property of stem cells, capability to unlimited self-renewal, i.e. are conditionally immortalized. Multipotent SC are named also as regional (RSC) or somatic stem cells.

The examples of RSC:

1) hemopoietic stem cells, precursors of all cell types in blood of myeloid and lymphoid hemopoiesis lineages;

2) neuronal stem cells (NSC), precursors of all brain cells (neurons, glia) [14]. Recently revealed neuronal stem cells in the brain biopsy of an adult epileptic patient changed the steady notions about irreversible character of neuron injuries [12];

3) epithelial stem cells. To this time a common precursor for 4 cell types in a stomach mucous membrane has been established [22];

4) stem cells of peripheric nerve system, which are the precursors of peripheric nerves, neuroendocrinic cells, Shwann cells and pigment cells [13];

5) liver stem cells, hepatoblasts, which are the precursors of hepatocytes and biliary cells [4, 5];

6) mesenchymal stem cells, which are the cell precursors of cartilage, bones, smooth and cross-striated muscles, adipocytes [8].

Stem cell sources. As it has been mentioned above, a fertilized oocyte and zygote are the sources of totipotent SC, and blastocyste and primary germ lineage of embryos and fetuses are the sources of polypotent ones. Regional SC can be obtained both from embryos, fetuses and tissues of an adult organism. It should be noted, that fetuses are the sources of both polypotent and multipotent SC. In the tissues of adult organism SC are present under low concentrations. An absolute number of circulating hemopoietic stem cells in peripheric blood makes 3.8 ± 0.8 cells/ml if the expression of CD34 antigen and the absence of CD38 one on the surface of hemopoietic stem cell is the criterion of HSC [19]. Regional stem cells are usually investigated

Матеріал, захищений авторським правом

5) стволовые клетки печени — гепатобласты — предшественники гепатоцитов и билиарных клеток [4, 5];

6) мезенхимальные СК — предшественники клеток хряща, костей, гладких и поперечнополосатых мышц, адипоцитов [8].

Источники СК. Как указывалось выше, источниками тотипотентных СК являются оплодотворенная яйцеклетка и зигота, а полипотентных — бластоциста и первичный зародышевый листок эмбрионов и плодов. РСК могут быть получены как из эмбрионов и плодов, так и из тканей взрослого организма. Следует отметить, что плоды являются источником как полипотентных, так и мультипотентных СК. В тканях взрослого организма СК присутствуют в небольших концентрациях. Так, если за критерий СКК взять экспрессию на ее поверхности CD34 антигена и отсутствие CD38 антигена, то абсолютное количество циркулирующих в периферической крови СКК составляет 3,8 ± 0,8 клеток/мл [19]. Обычно РСК исследуются в таких тканях, как кровь и эпидермис, в них дифференцированные клетки имеют короткое время жизни и могут быть сравнительно легко взяты для анализа.

Стратегии дифференцировки СК. Существует две основные стратегии образования дифференцированных потомков при делении СК [13]:

1) инвариантная — дает начало одной стволовой дочерней клетке и одной дочерней клетке, которая дифференцируется в один тип клеток (рис. 1, *а*). Такая стратегия характерна только для СК дрозофилы;

2) популяционная — дает рост дочерним клеткам, которые могут быть или СК, или коммитированными предшественниками (рис. 1, *б*). Коммитированные клетки имеют ограниченный пролиферативный и дифференцировочный потенциал и по мере деления приобретают структурно-функциональные признаки терминальной стадии дифференцировки. Большинство СК относится к данному типу. В стационарном состоянии каждая СК при делении образует одну СК и одну коммитированную, дающую несколько типов окончательно дифференцированных клеток (рис. 1, *б*, стрелка *1*). Однако в зависимости от ряда факторов могут быть и другие варианты последующей судьбы СК: образование двух дочерних СК (рис. 1, *б*, стрелка *2*) или двух дочерних клеток, каждая из которых начинает дифференцировку (рис. 1, *б*, стрелка *3*). Последний вариант реализуется, в частности, при действии ионизирующего облучения и высоких концентраций стероидных гормонов [3].

При делении одна дочерняя СК обычно остается в ассоциированном состоянии со стромальными клетками своего микроокружения, а другая выходит из ниши, что и является сигналом к дифференцировке.

in such tissues as blood and epidermis, where differentiated cells live during a short time and quite easily can be taken off for analysis.

Strategy of SC differentiation. There are two main strategies of the formation of differentiated progenitors during the SC cleavage [13]:

1) invariant strategy, initiating one daughter cell and one, differentiating into one cell type (Fig. 1, *a*). Such a strategy is characteristic just for SC of drosophila;

2) populational strategy. It initiates the growth of daughter cells, which can be both SC or committed by precursors (Fig. 1, *б*). Committed cells have a limited proliferative and differentiative potential and gradually by cleavage gain structural and functional characteristics of a terminal differentiation stage. The majority of SC is related to the given type. In a stationary state each SC during cleavage forms one SC and one committed cell, that gives some types of finally differentiated cells (Fig. 1, б, arrow *1*). However, depending on the series of factors some other variants of the SC further fate can be available, such as the formation of two daughter SC (Fig. 1, *б*, arrow *2*) or two daughter cells, each of those starts differentiation (Fig. 1, *б*, arrow *3*). The recent variant is realized, in particular, during the effect of ionizing irradiation and high concentrations of steroid hormones [3]. During the cleavage one daughter stem cell usually remains in an associated state with stromal cells of its microenvironment, another one leaves its niche, that is a signal to differentiation.

Immortality of SC. As it is known, SC is capable of unlimited self-renewal, i.e. is an immortalized one. However, the quantity of cleavages is not determined. It depends both on the level and the ratio of proteins-promoters and proteins-inhibitors of a cellular cycle and wavelength of telomere. Cul-1 protein, involved into the destruction of such proteins as Gl cycline is an example of protein-promoter. CDK protein-inhibitor limited proliferation and accelerated differentiation of oligodendritic cell-precursors. Telomerase it is rybonucleoproteinpolymerase, synthesizing telomeric sequences to 3'-ends of chromosomes, plays an important role in the determination of the number of cell cleavages [29]. Telomere expression correlates with the immortality of cell lineages. In the majority of tissues in adult human telomerase activity is quite low or is not determined. Due to this fact with the age telomeres become shorter and cells stop their proliferation. Thus, progressive shortening of telomeres can act as mitotic clocks, counting out the number of cleavages. Telomerase introduction into some somatic human cells prolongs their replicative time of life. In contrast to the cells of an adult organism, ESC and RSC demonstrated a high level of telomerase activity [23]. That can be the explanation of their "immortality". However this "immortality" is a conditional one, because it is quite difficult to calculate a real number of cell divisions. This is connected to the fact, that in

Матеріал, захищений авторським правом

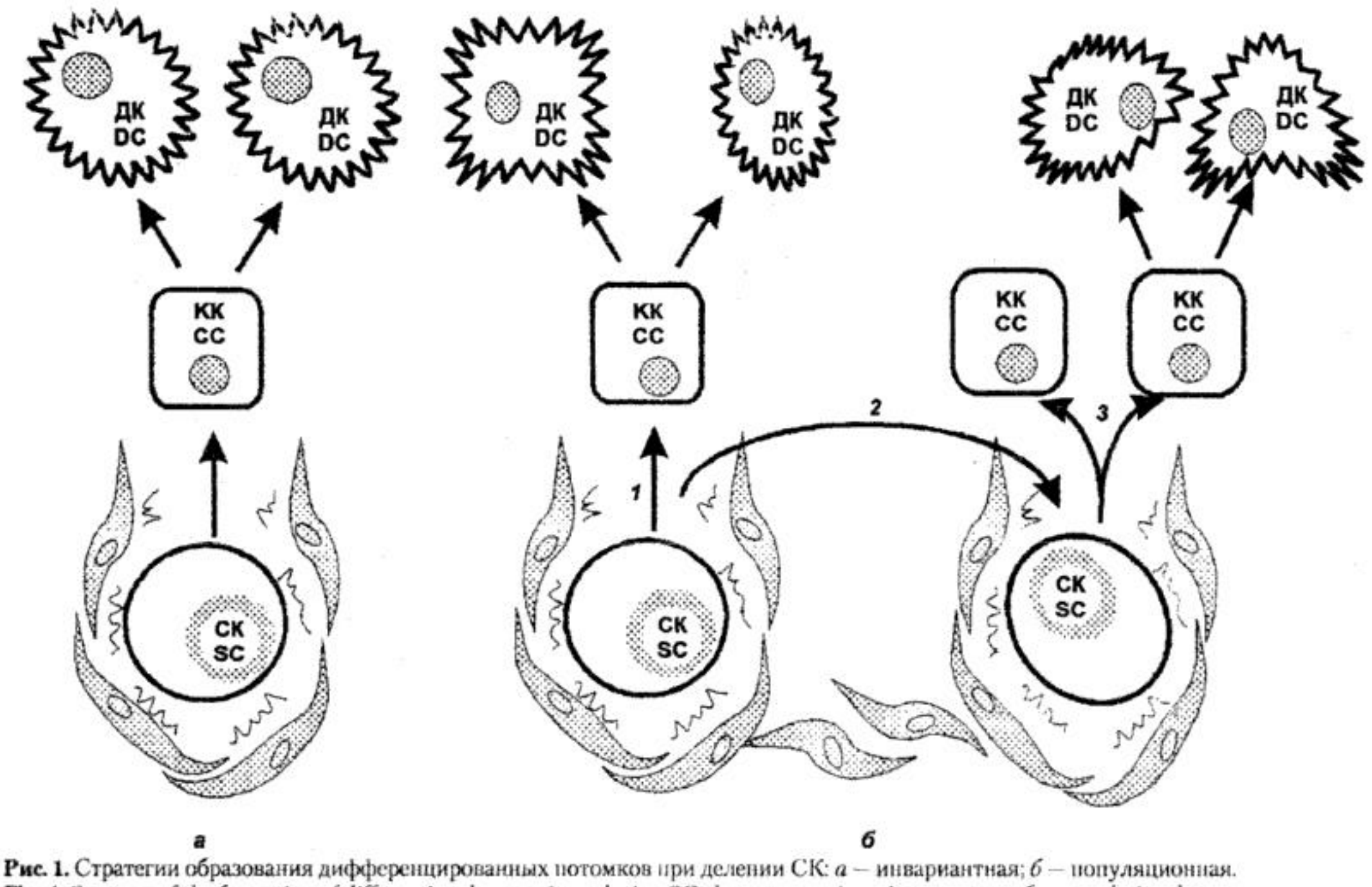


Рис. 1. Стратегии образования дифференцированных потомков при делении СК: *а* — инвариантная; *б* — популяционная.
Fig. 1. Strategy of the formation of differentiated progenitors during SC cleavage: *а* — invariant strategy; *б* — populational strategy.

Бессмертность СК. По определению СК способна к неограниченному самообновлению, т.е. является бессмертной. Однако, строго говоря, количество делений не определено. Оно зависит от уровня и соотношения белков-промоторов и белков-ингибиторов клеточного цикла, а также от длины теломера. Примером белка-промотора является cul-1 белок, который вовлекается в деструкцию таких белков клеточного цикла, как G1 циклины. Белок-ингибитор CDK ограничивает пролиферацию и ускоряет дифференциацию олигодендрических клеток-предшественников. Теломераза — рибонуклеопротеинполимераза, синтезирующая теломерные последовательности к 3' концам хромосом, играет важную роль в определении числа делений клеток [29]. Экспрессия теломеразы коррелирует с "бессмертностью" клеточных линий. В большинстве тканей взрослого человека теломеразная активность очень низкая или не определяется. В результате этого с возрастом теломеры укорачиваются и клетки прекращают пролиферацию. Таким образом, прогрессивное укорочение теломеров может действовать как митотические часы, отсчитывающие число делений. Введение теломеразы в некоторые соматические клетки человека продлевает их репликативное время жизни. В отличие от клеток взрослого организма, ЭСК и РСК проявляют высокий уровень теломеразной активности [23], что и может явиться объяснением их "бессмертности". Однако эта "бессмертность" является условной, поскольку реальное число клеточных делений подсчитать довольно сложно. Это связа stationary state SC are located in G_0 phase of a cellular cycle and do not cleave. Nevertheless, capability of SCC self-renewal is estimated in 50 cellular cleavages [28] and this number is sufficient for maintenance of human hemopoietic system during the whole life. This is explained by a big number of progenitors, appearing during SC differentiation up to a specialized one. Committed cells, which from one side, increase the number of differentiated cells, and from another one, keep proliferative ability of SC, play the main role. Thus, due to committed cells, the stem cells under real conditions cleave rarely, keeping "immortality" characteristics.

Directed migration (Homming). Investigation of the factors, regulating stem cells homming during an organism development, when, for example, hemopoiesis migrates from yolk sack into the aorta-gonade-mesonephrosis region (AGM), then into liver and bone marrow is an important question of current cellular biology. Really, at intravenous injection of hemopoietic stem cells into an adult organism about 20% of injected cells are revealed in 18 hrs in bone marrow, during transplantation to fetus they are accumulated in such hemopoietic organs as liver, spleen, thymus [27].

It has been established [18], that chemokines, new family of signal molecules, involved into homming, as well as inflammatory and immune responses play the main role in the process of SC homming. α-chemokine stromal cell-derived factor-1 (SDF-1), forming in stromal cells and capable to attract chemotoxically

Матеріал, захищений авторським правом

зано с тем, что в стационарном состоянии СК находятся в G_0 фазе клеточного цикла и не делятся. Тем не менее способность к самообновлению СКК оценивается в 50 клеточных делений [28] и такого количества оказывается достаточно для сохранения гемопоэтической системы человека в течение всей жизни. Это объясняется огромным количеством потомков, возникающих в ходе дифференциации СК до специализированной. И главную роль выполняют коммитированные клетки, которые, с одной стороны, увеличивают количество дифференцированных клеток, а с другой — сохраняют пролиферативную способность СК. Таким образом, благодаря коммитированным клеткам, СК в реальных условиях делятся редко, сохраняя свойство "бессмертности".

Направленная миграция (Homming). Важным вопросом современной клеточной биологии является изучение факторов, регулирующих переселение СК в ходе развития организма, когда, например, кроветворение мигрирует из желточного мешка в район АГМ (аорта–гонада–мезонефрос), затем в печень и наконец в костный мозг. Действительно при внутривенном введении СКК во взрослый организм через 18 ч в костном мозге обнаруживается около 20% введенных клеток, а при трансплантации в плод они накапливаются в кроветворных органах — печени, селезенке, тимусе [26].

Удалось установить [18], что ключевую роль в процессе хомминга СК играют хемокины — новое семейство сигнальных молекул, вовлекаемых в хомминг, воспалительный и иммунный (узнавание) ответ. Особую роль играет α-хемокин stromal cell-derived factor-1 (SDF-1), который образуется в стромальных клетках и способен хемотаксически привлекать СК, а также моноциты и лимфоциты [7]. На мембранах СК экспрессирован специфический рецептор для SDF-1, названный фусином или CXCR4 (рис. 2). Роль хемокина и его рецептора в хомминге подтверждается экспериментами, в которых отключение генов, контролирующих экспрессию или SDF-1, или CXCR4, приводило к тому, что гемопоэтические предшественники не меняли место кроветворения в процессе всего развития зародыша [30]. Величина хемотаксического эффекта зависит от градиента хемоатрактанта, и в системе *in vitro* добавка SDF-1 способна увеличить скорость миграции СКК в 4–6 раз [26]. Понимание механизмов, регулирующих миграцию СК в ходе развития организма, и реконструкция схемы миграции позволят разработать методы направленной доставки к поврежденным органам не только трансплантированных клеток, но и лекарственных соединений.

Роль микроокружения (ниши). Стволовой клетке свойственно находиться в специфическом сложноорганизованном микроокружении, которое до настоящего времени остается малоизученным. Наибольшие успехи достигнуты в исследовании гемопоэтической ниши [1, 3, 28], которая образована

both stem cells, monocytes and macrophages, plays a special role [7]. A specific receptor for SDF-1 named as fuchsin or CXCR4, is expressed on the stem cell membranes (Fig. 2). The role of chemokine and its receptor in homming is confirmed by the experiments, in which switching-off of the genes, controlling the expression of SDF-1 or CXCR4, resulted in the fact, that hemopoietic precursors did not change the place of hemopoiesis during the process of the whole embryo development [30]. The value of chemotoxic effect depends on the gradient of chemoattractant and in in vitro system SDF-1 addition is capable to increase the rate of hemopoietic stem cells migration by 4–6 times [26]. Understanding of the mechanisms, regulating the SC migration during an organism development and reconstruction of the migration scheme allowed to elaborate the methods of directed supplying to the damaged organs of both transplanted cells and therapeutic compounds.

The role of microenvironment (niche). Stem cell characteristics is to be in the specific сложно-organized microenvironment, which to this time has remained insufficiently studied. Investigation of hemopoietic niche [1, 3, 28], formed by several types of stromal cells, i.e. fibroblasts, adipocytes, macrophages (Fig. 2) is the most successful. Stromal cells and excreted by them proteins (fibronectin, collagen, laminin, vitronectin and tenasqine) formed stroma. The cells of microenvironment secreted a wide spectrum of the factors, among which the factors of TGFβ (transforming growth factor) families, accelerating SC cleavage, keeping their "immortality" and Wnt, activating transcription by the chain of reactions, including β-catenin [28] should be noted. It is known, that SC factor (SCF), receptor of which (c-Kit ligand) is expressed on its surface and is one of the main markers of its identification, plays a significant role in the SC development. SCF exists in a free and membrane-bounded forms, and the recent, accelerating SC adhesion to stroma, is more important for keeping of "stem characteristics", than a soluble one. The fate of SC considerably depends on the secretion of the series of cytokines, granulocyte-macrophagal colony-stimulating factor (GM-CSF), fibroblast growth factor (FGF), IL-3, which are located in the niche in insoluble form, but specifically bounded with such molecules of extracellular matrix as heparan-sulphate, that allows to make a high local concentration of growth factors. Stem cells, from their side, express various adhesive molecules, binding with extracellular matrix. Thus, SC expresses heparin-binding protein, L-selectin, mycin-like molecules, as well as 4 types of β1-integrins: VLA-2 interacts with collagenic receptor, VLA-4 and VLA-5 interact with fibronectin one, and VLA-6 — with laminin receptor. Structure of these transmembrane proteins is like as a rigid rod, outgoing from the SC surface with multiple glycolized sites, which may interact with the receptors of stromal corresponding proteins. On epidermal and hemopoie-

Матеріал, захищений авторським правом

несколькими типами стромальных клеток – фибробластов, адипоцитов, макрофагов (рис. 2). Стромальные клетки и экскретированные ими белки (фибронектин, коллаген, ламинин, витронектин и тенасцин) образуют строму. Клетки микроокружения секретируют широкий спектр факторов, среди которых в первую очередь следует отметить факторы из семейств TGFβ (трансформирующий фактор роста), ускоряющие деление СК, сохраняя свойства их "бессмертности", и Wnt, активирующие транскрипцию цепью реакций, включающих β-катенин [28].

Известно, что в развитии СК значительную роль играет фактор СК (stem cell factor, SCF), рецептор которого (c-Kit лиганд) экспрессирован на ее поверхности и является одним из основных маркеров ее идентификации. SCF существует в свободной и мембранно-связанной формах, причем последняя, усиливая адгезию СК к строме, более важна для сохранения "стволовых свойств", чем растворимая. Судьба СК во многом зависит от секреции ряда цитокинов – колониестимулирующего фактора гранулоцитов и макрофагов (GM-CSF), ростового фактора фибробластов (FGF), IL-3, которые находятся в нише не в растворимой форме, а специфически связаны с такими молекулами внеклеточного матрикса, как гепаран-сульфат, что позволяет создать высокую локальную концентрацию ростовых факторов. Стволовые клетки со своей стороны экспрессируют различные молекулы адгезии, которые связываются с внеклеточным матриксом. Так, СКК экспрессируют гепарин-связывающий белок, L-селектин, мицин-подобные молекулы, а также 4 типа β1-интегринов: VLA-2 взаимодействует с коллагеновым рецептором, VLA-4 и VLA-5 – с фибронектиновым, а VLA-6 – с ламининовым. Структура этих трансмембранных белков напоминает жесткий стержень, исходящий из поверхности СК, с множественными гликозилированными сайтами, которые могут взаимодействовать с рецепторами соответствующих белков стромы. На эпидермальной и гемопоэтической нишах установлено, что VLA-интегрины требуются для сохранения свойств СК и регулируют дифференциацию кератиноцитов и гемопоэтических клеток через MAP-киназную сигнальную систему. Интегрины удерживают СК в правильном месте в нише, а нарушение их экспрессии вызывает выход СК из ниши и их дифференцировку или гибель путем апоптоза. Интерлейкины и ростовые факторы способны временно активировать интегрины VLA-4, VLA-5 и таким образом усиливать адгезивность СК.

Экспрессия β1-интегринов может регулироваться белками внеклеточного матрикса и передавать сигнал от ниши СК. Роль ниши в определении судьбы потомков СК остается мало изученной. Возможно, образование отдельных коммитированных клеток происходит стохастически, а их последующая пролиферация и направление дифферен-

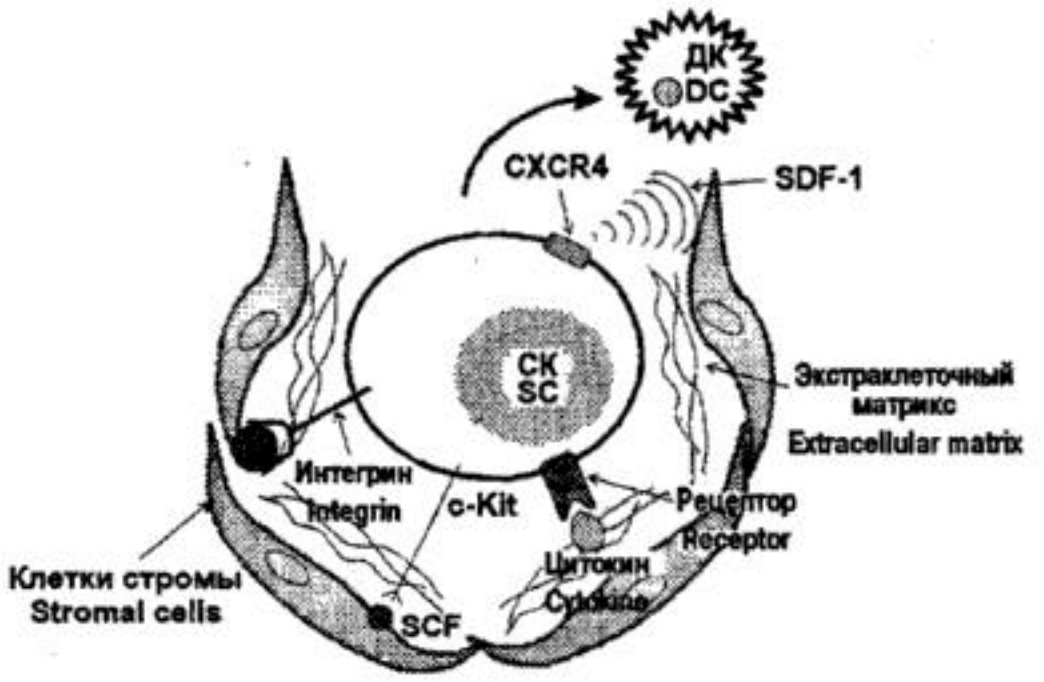


Рис. 2. Схема микроокружения СК.

Fig. 2. Scheme of the SC microenvironment.

tic niches it was established, that VLA-integrins are necessary for keeping of SC properties and regulate differentiation of keratinocytes and hemopoietic cells through the MAP-kinase signal system. Integrins retain SC in a correct place in niche, impairment of their expression causes the leaving of SC from a niche and their differentiation or death caused by apoptosis. Interleukins and growth factors are capable to activate temporarily VLA-4 and VLA-5 integrins and by this way amplify SC adhesion.

β1-integrin expression can be regulated by the proteins of extracellular matrix and a signal transfer from the SC niche. The role of niche in the determination of fate of SC progenitors has remained insufficiently studied. Obviously, formation of the separate committed cells occurs stochastically, and their further proliferation and direction of differentiation are determined by the factors, secreting by various cell types of niche. Thereat the main function of the niche factors is to select the differentiation direction, keeping necessary precursors and causing apoptosis of the unclaimed to this time ones. Existence of the mechanisms, with the help of which the factors, secreted by niche, transfer the information about the direction of differentiation to SC, may be an alternative.

Plasticity of stem cells. It is considered, that differentiating potential of regional stem cells is limited by one tissue or organ. However, to this moment there are experimental data, that RSC, isolated from one tissue, can initiate the growth of cells from other tissues. It was demonstrated, that neuronal SC, isolated both from fetal and adult brain and grown in vitro in the medium, comprising epidermal growth factor and fibroblast growth factor, were capable to initiate the growth of blood cells after intravenous injection into irradiated organism [6]. It is remarkable, that in the given case NSC of ectodermal origin initiated the growth of hemopoietic cells of mesodermal origin. The results of the work [9], where NSC from the brain of adult mouse, injected into blastocyste, formed chimerical embryos and gave progeny of all three germ lineage, are much more impressive.

Матеріал, захищений авторським правом

цировки определяются факторами, которые секретируются различными типами клеток ниши. При этом основная функция факторов ниши – выбирать направление дифференцировки, сохраняя нужные и вызывая апоптоз тех предшественников, которые в данный момент не востребованы. Альтернативно можно предположить существование механизмов, с помощью которых факторы, секретированные нишей, передают информацию СК о направлении дифференцировки.

Пластичность СК. Принято считать, что дифференцировочный потенциал региональных СК ограничивается одной тканью или органом. Однако в настоящее время накапливаются экспериментальные данные о том, что РСК, выделенные из одной ткани, могут давать рост клеткам других тканей. Так, показано, что нервные СК, выделенные как из плодового, так и взрослого мозга и наращенные *in vitro* в среде, содержащей эпидермальный фактор роста и фактор роста фибробластов, способны давать рост клеткам крови после внутривенного введения в облученный организм [6]. Примечательно, что в этом случае НСК эктодермального происхождения давали рост гемопоэтическим клеткам мезодермального происхождения. Еще более впечатляют результаты работы [9], в которой НСК из мозга взрослой мыши, введенные в бластоцисту, образовывали химерные эмбрионы и давали потомство всех трех зародышевых листков.

Подобная пластичность была продемонстрирована и для других СК. Так, культивированные клетки скелетной мышцы после трансплантации облученным реципиентам дифференцировались в гемопоэтическом направлении [15]. Показано, что миобласты при трансплантации в один организм способны образовывать дифференцированные потомки клеток как крови, так и мышц [16, 17]. Предшественники эпителиальных клеток поджелудочной железы, трансплантированные в печень, дифференцировались в гепатоциты, полностью интегрировались с печеночной паренхимой и вырабатывали альбумин и другие специфические белки печени [10].

Очевидно, наибольшей пластичностью обладают СКК. Так, СКК из костного мозга образовывали миофибриллы при трансплантации мышам с экспериментальной мышечной дистрофией Дюшена и гепатоциты при введении в печень [4, 20]. При трансплантации в мозг СКК могут дифференцироваться как в нейрональные, так и глиальные клетки [11]. Вероятность перепрограммирования может быть увеличена, например, одновременным интенсивным делением соседних клеток. В настоящее время мы можем только предполагать о механизмах, вовлеченных в столь драматические изменения судьбы клетки. Рассмотрим несколько гипотез, объясняющих пластичность СК (рис. 3).

1. Региональные СК одной ткани неэквивалентны и отличаются между собой, например, состоянием клеточного цикла или экспрессией генов. Клетки одних субпопуляций способны к перепрограммированию, а других — нет (рис. 3, *1*). В пользу такой гипотезы свидетельствуют данные об установленной гетерогенности СКК [25].

2. Все региональные СК являются рудиментарными ЭСК и способны давать клетки всех трех зародышевых листков (рис. 3, *2*). Конкретное на-

The same plasticity was also demonstrated for other SC. Cultured sceletal muscle cells, after the transplantation to irradiated patients differentiated to hemopoietic direction [15]. It was shown, that myoblasts when transplanting into one organism are capable to form such differentiated progenitors as blood as muscular cells [16, 17]. Precursors of pancreas epithelial cells, transplanted into liver, differentiated into hepatocytes, completely integrated with liver parenchyma and produced albumin and other liver specific proteins [10].

Obviously, hemopoietic stem cells possess the highest plasticity. Hemopoietic stem cells from bone marrow formed myofibrillas when transplanting to mice with experimental muscular dystrophy and hepatocytes when injecting into liver [4, 20]. When transplanting into brain, hemopoietic stem cells may differentiate both in neuronal and glial cells [11]. Probability of re-programming may be increased, for example, by simultaneous intensive cleavage of neighbor cells. Till now we can just suppose the existence of the mechanisms, involved into such dramatic changes of the cell fate. We propose for your consideration some hypothesis, explaining the SC plasticity (Fig. 3):

1. Regional SC in one tissue are not the same and differ, for example, by the state of cellular cycle and gene expression. The cells from one subpopulations are capable of reprogramming, and ones from another are not capable (Fig. 3, *1*). The data on fixed heterogenity of hemopoietic stem cells testify to the favor of such a hypothesis [25].

2. All regional SC are rudimentary embryonic stem cells and capable to initiate the cells of all three germ lineage (Fig. 3, *2*). A certain direction of differentiation into a certain cell type is determined by microenvironment.

3. Regional stem cell, getting into a new niche, recapitulates to the stage of embryonic stem cell and gains the characteristics, close to totipotence, then they differentiate in a necessary direction (Fig. 3, *3*).

4. Stem cell from one region can immediately transform into the cell of another one, receiving signal factors, inherent to new microenvironment (Fig. 3, *4*)

A high plasticity of regional stem cells can be very important in clinical application, because it allows to consider the possibility of regeneration of heterological organ and tissues.

Thus, an organism can be considered as a complex of cellular stem systems (Fig. 3). Thereat each stem cell comprises 3 various cell types: stem, committed and finally differentiated ones. Stem cells, capable of self-renewal and to form all differentiated progenitors of the given stem cellular system play a central role. An initial stem system is a fertilized totipotent oocyte, giving progeny of all specialized cells. This characteristics in human being is kept during 2 divisions, and during the following development SC loss the degree of differentiating variety. In an organism of

Матеріал, захищений авторським правом

правление дифференцировки в определенный тип клеток определяется микроокружением.

3. Попадая в новую нишу, РСК сначала рекапитулирует до стадии ЭСК и приобретает свойства, близкие к тотипотентности, а затем дифференцируется в нужном направлении (рис. 3, *3*).

4. Стволовая клетка одного региона может непосредственно трансформироваться в клетку другого, воспринимая сигнальные факторы, присущие новому микроокружению (рис. 3, *4*).

Высокая пластичность региональных СК может иметь большое клиническое значение, поскольку позволяет рассчитывать на возможность регенерации гетерологических органов и тканей.

Таким образом, организм можно рассматривать как совокупность клеточных стволовых систем (рис. 3). При этом каждая стволовая система включает 3 различных типа клеток: стволовые, коммитированные и окончательно дифференцированные. Центральную роль играют СК, которые способны самообновляться и образовывать все дифференцированные потомки данной стволовой клеточной системы. Первичная стволовая система представляет собой оплодотворенную яйцеклетку, которая является тотипотентной и дает потомство всех специализированных клеток. Это свойство у человека сохраняется в течение 2-х делений, а в ходе последующего развития СК постепенно теряют степень дифференцировочного многообразия. В организме взрослого человека существует около 350 типов специализированных клеток, обеспечивающих все функции органов и тканей. Поврежденные или погибшие клетки замещаются новыми, которые, как правило, являются потомками СК той стволовой системы, к которой они (поврежденные клетки) принадлежали. Однако в экстремальных условиях СК одной стволовой системы могут давать ростки клеткам другой, что обеспечивает сохранение клеточного гомеостаза и регенерацию или замещение поврежденных или мертвых клеток не только данного органа, но и организма в целом.

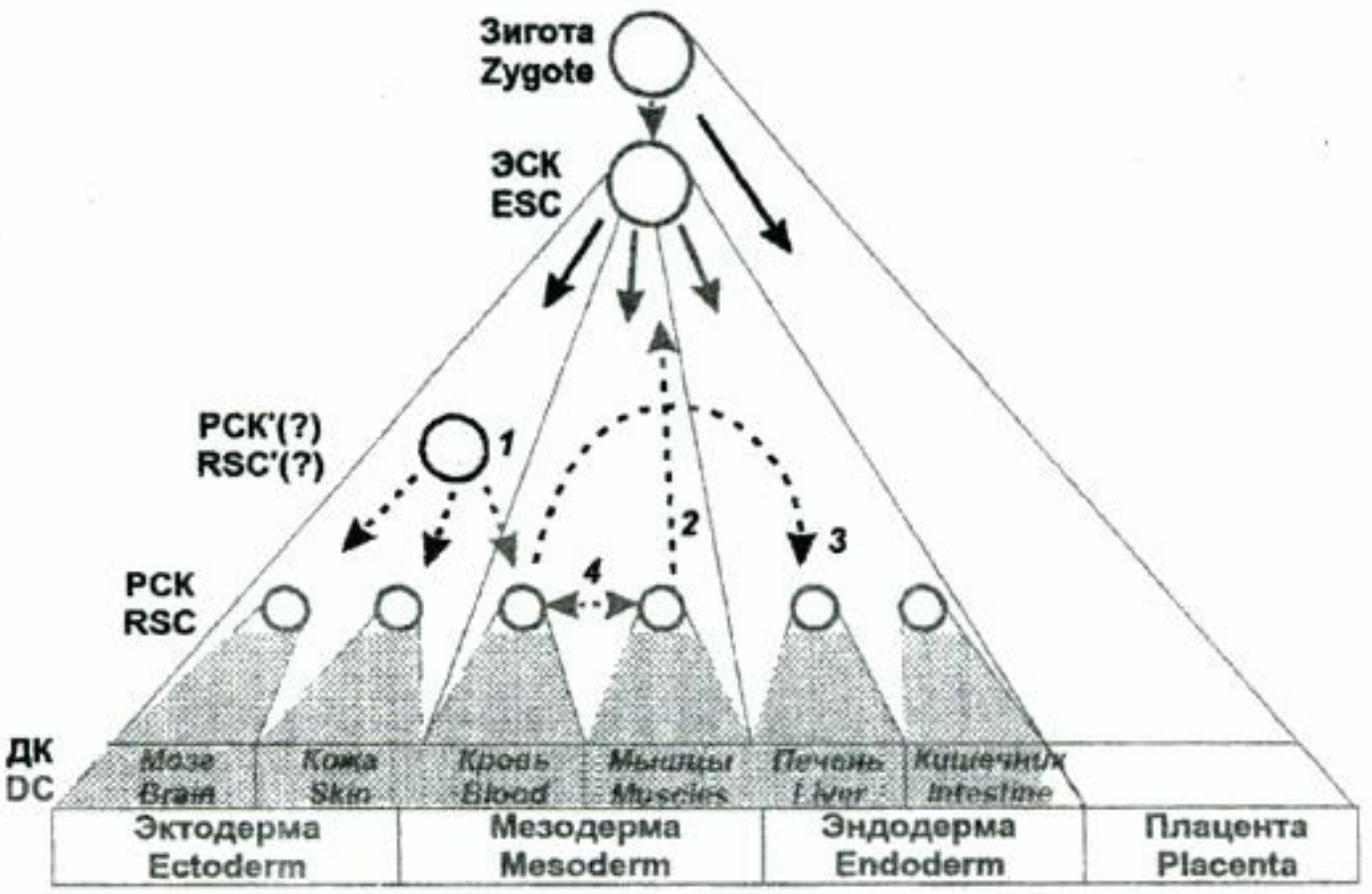


Рис. 3. Стволовые системы и гипотезы пластичности СК.

Fig. 3. Stem systems and hypotheses of the SC plasticity.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Пальцев М. А., Иванов А. А.* Межклеточные взаимодействия.– М.: Медицина, 1995.– 224 с.
2. *Репин В. С., Сухих Г. Т.* Медицинская клеточная биология.– М.: БЭБиМ, 1998.– 199 с.
3. *Ярилин А. А.* Основы иммунологии.– М.: Медицина, 1999.– 607 с.
4. *Alison M.* Liver stem cells: a two compartment system // Curr. Opin. Cell. Biol.– 1998.– 10, № 6.– P. 710–715.
5. *Alison M. R., Poulsom R., Jefery R. et al.* Hepatocyte from non-hepatic adult stem cells // Nature.– 2000.– 406, № 2.– P. 257.
6. *Bjornson C. R., Rietze R. L., Reynolds B. A. et al.* Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells *in vivo* // Science.– 1999.– 283.– P. 534–537.
7. *Bleul C. C., Fuhlbrigge R. C., Casasnovas J. M. et al.* A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) // J. Exp. Med. 1996.– 184.– P. 1101–1109.
8. *Caplan A. I.* Mesenchymal stem cells and gene therapy // Clin. Orthop.– 2000.– 379.– P. S67–70.

adult human being there are 350 types of specialized cells, providing all functions of organs and tissues. Damaged or died cells were substituted by new ones, which, as a rule, were SC progenitors of that stem system, to which they (damaged cells) belonged. However under extreme conditions SC of one stem system can give to another one, that provides the keeping of cell homeostasis and regeneration or substitution of damaged or died cells both from given organ and organism in the whole.

REFERENCES

1. *Paltsev M. A., Ivanov A. A.* Intercellular interactions.– M.: Meditsina, 1995.– 224 p.
2. *Repin V. S., Sukhikh G. T.* Therapeutic cell biology.– M., 1998.– 199 p.
3. *Yarylin A. A.* Grounds of immunology.– M.: Meditsina, 1999.– 607 p.
4. *Alison M.* Liver stem cells: a two compartment system // Curr. Opin. Cell. Biol.– 1998.– 10, № 6.– P. 710–715.
5. *Alison M. R., Poulsom R., Jefery R. et al.* Hepatocyte from non-hepatic adult stem cells // Nature.– 2000.– 406, № 2.– P. 257.
6. *Bjornson C. R., Rietze R. L., Reynolds B. A. et al.* Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells *in vivo* // Science.– 1999.– 283.– P. 534–537.
7. *Bleul C. C., Fuhlbrigge R. C., Casasnovas J. M. et al.* A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) // J. Exp. Med. 1996.– 184.– P. 1101–1109.
8. *Caplan A. I.* Mesenchymal stem cells and gene therapy // Clin. Orthop.– 2000.– 379.– P. S67–70.
9. *Clarke D. L., Johansson C. B., Wilbertz J. et al.* Generalized potential of adult neural stem cells // Science.– 2000.– 288.– P. 1660–1663.
10. *Dabeva M. D., Seong-Gyu H., Vasa S. R. G. et al.* Differentiation of pancreatic epithelial progenitor cells into hepatocytes following transplantation into rat liver // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.– 1997.– 94.– P. 7356–7361.
11. *Eglitis M. A., Mezey E.* Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.– 1997.– 94.– P. 4080–4085.
12. *Eriksson P. S., Perfilieva E., Bjork-Eriksson T. et al.* Neurogenesis in the adult human hippocampus // Nature Medicine.– 1988.– 4, № 11.– P. 1313–1317.

Матеріал, захищений авторським правом

9. *Clarke D. L., Johansson C. B., Wilbertz J. et al.* Generalized potential of adult neural stem cells // Science.– 2000.– 288.– P. 1660–1663.
10. *Dabeva M. D., Seong-Gyu H., Vasa S. R. G. et al.* Differentiation of pancreatic epithelial progenitor cells into hepatocytes following transplantation into rat liver // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.– 1997.– 94.– P. 7356–7361.
11. *Eglitis M. A., Mezey E.* Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.– 1997.– 94.– P. 4080–4085.
12. *Eriksson P. S., Perfilieva E., Bjork-Eriksson T. et al.* Neurogenesis in the adult human hippocampus // Nature Medicine.– 1988.– 4, № 11.– P. 1313–1317.
13. *Fiona M., Watt I., Brigid L. M. Hogan.* Out of Eden: Stem Cells and Their Niches // Science.– 2000.– 287, № 5457.– P. 1427–1430.
14. *Gage F. H.* Mammalian neural stem cells // Science.– 2000.– 287, № 5457.– P. 1433–1438.
15. *Goodell M. A., Rosenzweig M., Kim H. et al.* Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species // Nature Med.– 1997.– 3.– P. 1337–1345.
16. *Gussoni E., Soneoka Y., Strickland C. D. et al.* Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation // Nature.– 1999.– 401.– P. 390–394.
17. *Jackson K. A., Mi T., Goodell M. A.* Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.– 1999.– 96, № 25.– P. 14482–14486.
18. *Kim C. H., Broxmeyer H. E.* In vitro behavior of hematopoietic progenitor cells under the influence of chemoattractants: stromal cell-derived factor-1, steel factor and the bone marrow enviroment // Blood.– 1998.– 91.– P. 100–110.
19. *Korbling M., Huh Y. O., Durett A. et al.* Allogenic blood stem cell transplantation: peripheral and yield of donor-derived primitive hematopoietic progenitor cells ($CD34^+$ $Thy\text{-}1^{dim}$) and lymphoid subsets, and possible predictors of engraftment and GVHD // Blood.– 1995.– 86.– P. 2842–2848.
20. *Petersen B. E., Bowen W. C., Patrene K. D. et al.* Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells // Science.– 1999.– 284.– P. 1168–1170.
21. *Shamblott M. J., Axelman J., Gearhart J. D.* Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.– 1998.– 95.– P. 13726–13731.
22. *Slack J. M. W.* Stem cells in epithelial tissues // Science.– 2000.– 287, № 5457.– P. 1431–1433.
23. *Thomson J. A, Itskovich-Eldor J., Shapiro S. S. et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts // Science.– 1998.– 282, № 6.– P. 1145–1147.
24. *Thomson J. A., Odorico J. S.* Human embryonic stem cell and embryonic germ cell lines // Trends Biotechnol.– 2000.– 18, № 2.– P. 53–57.
25. *Uchida N., Jerabek L., Weissman I. L.* Searching for hematopoietic stem cells. II. The heterogeneity of Thy-$1.1^{(lo)}Lin^{(-/lo)}Sca\text{-}1^+$ mouse hematopoietic stem cells separated by counterflow centrifugal elutriation // Exp. Hematol.– 1996.– 24.– P. 649–659.
26. *Voermans C., Kooi M. L. K., Rodenhuis S. et al.* In vitro migratory capacity of $CD34^+$ cells is related to hematopoietic recovery after autologous stem cell transplantation //Blood.– 2001.– 97, № 3.– P. 799–804.
27. *Westgren M., Ek S., Bui T. et al.* Tissue distribution of transplanted fetal liver cells in the human fetal recipient // Am. J. Obstet. Gynecol.– 1977.– 176, № 1.– P. 49–53.
28. *Whetton A. D., Graham G. J.* Homming and mobilization in the stem cell niche // Trends in Cell. Biol.– 1999.– 9.– P. 233–238.
29. *Yui J., Chiu C. P., Lansdorp P. M.* Telomerase activity in candidate stem cells from fetal liver and adult bone marrow // Blood.– 1998.– 91, № 9.– P. 3255–3262.
30. *Zou Y. R., Koffmann A. H., Kudora M. et al.* Function of chemokine receptor CXCR-4 in haematopoiesis and in cerebellar development // Nature.– 1998.– 393.– P. 595–599.

Поступила 06.03.2001

13. *Fiona M., Watt I., Brigid L. M. Hogan.* Out of Eden: Stem Cells and Their Niches // Science.– 2000.– 287, № 5457.– P. 1427–1430.
14. *Gage F. H.* Mammalian neural stem cells // Science.– 2000.– 287, № 5457.– P. 1433–1438.
15. *Goodell M. A., Rosenzweig M., Kim H. et al.* Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species // Nature Med.– 1997.– 3.– P. 1337–1345.
16. *Gussoni E., Soneoka Y., Strickland C. D. et al.* Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation // Nature.– 1999.– 401.– P. 390–394.
17. *Jackson K. A., Mi T., Goodell M. A.* Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.– 1999.– 96, № 25.– P. 14482–14486.
18. *Kim C. H., Broxmeyer H. E.* In vitro behavior of hematopoietic progenitor cells under the influence of chemoattractants: stromal cell-derived factor-1, steel factor and the bone marrow enviroment // Blood.– 1998.– 91.– P. 100–110.
19. *Korbling M., Huh Y. O., Durett A. et al.* Allogenic blood stem cell transplantation: peripheral and yield of donor-derived primitive hematopoietic progenitor cells ($CD34^+$ $Thy\text{-}1^{dim}$) and lymphoid subsets, and possible predictors of engraftment and GVHD // Blood.– 1995.– 86.– P. 2842–2848.
20. *Petersen B. E., Bowen W. C., Patrene K. D. et al.* Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells // Science.– 1999.– 284.– P. 1168–1170.
21. *Shamblott M. J., Axelman J., Gearhart J. D.* Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.– 1998.– 95.– P. 13726–13731.
22. *Slack J. M. W.* Stem cells in epithelial tissues // Science.– 2000.– 287, № 5457.– P. 1431–1433.
23. *Thomson J. A, Itskovich-Eldor J., Shapiro S. S. et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts // Science.– 1998.– 282, № 6.– P. 1145–1147.
24. *Thomson J. A., Odorico J. S.* Human embryonic stem cell and embryonic germ cell lines // Trends Biotechnol.– 2000.– 18, № 2.– P. 53–57.
25. *Uchida N., Jerabek L., Weissman I. L.* Searching for hematopoietic stem cells. II. The heterogeneity of Thy-$1.1^{(lo)}Lin^{(-/lo)}Sca\text{-}1^+$ mouse hematopoietic stem cells separated by counterflow centrifugal elutriation // Exp. Hematol.– 1996.– 24.– P. 649–659.
26. *Voermans C., Kooi M. L. K., Rodenhuis S. et al.* In vitro migratory capacity of $CD34^+$ cells is related to hematopoietic recovery after autologous stem cell transplantation //Blood.– 2001.– 97, № 3.– P. 799–804.
27. *Westgren M., Ek S., Bui T. et al.* Tissue distribution of transplanted fetal liver cells in the human fetal recipient // Am. J. Obstet. Gynecol.– 1977.– 176, № 1.– P. 49–53.
28. *Whetton A. D., Graham G. J.* Homming and mobilization in the stem cell niche // Trends in Cell. Biol.– 1999.– 9.– P. 233–238.
29. *Yui J., Chiu C. P., Lansdorp P. M.* Telomerase activity in candidate stem cells from fetal liver and adult bone marrow // Blood.– 1998.– 91, № 9.– P. 3255–3262.
30. *Zou Y. R., Koffmann A. H., Kudora M. et al.* Function of chemokine receptor CXCR-4 in haematopoiesis and in cerebellar development // Nature.– 1998.– 393.– P. 595–599.

Accepted in 06.03.2001

Матеріал, захищений авторським правом

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

УДК 612.111: 517.352.4

THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

UDC 612.111: 517.352.4

Влияние гемина на транспорт протонов в эритроцитах, внесенных в сульфатную среду

В. В. РАМАЗАНОВ, Н. А. ЛУПИЛОВА, А. Ф. ТОДРИН, Т. П. БОНДАРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Hemin Effect on Proton Transport in Red Blood Cells, Introduced to Sulphate Medium

V. V. RAMAZANOV, N. A. LUPILOVA, A. F. TODRIN, T. P. BONDARENKO

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

Исследована температурная зависимость транспорта хлорида и сульфата в эритроцитах человека с модифицированным цитоскелетом. Полученные термодинамические параметры указывают на существенное значение цитоскелета в регуляции функционирования системы транспорта анионов.

Досліджено температурну залежність транспорту хлориду і сульфату в еритроцитах людини з модифікованим цитоскелетом. Отримані термодинамічні параметри вказують на істотне значення цитоскелета в регуляції функціонування системи транспорту аніонів.

Temperature dependence of chloride and sulphate transport in human red blood cells with a modified cytoskeleton was investigated. Obtained thermodynamic parameters point to a considerable value of cytoskeleton in the functioning regulation of anion transport.

В суспензии эритроцитов, внесенных в сульфатную среду, происходит двухфазное изменение *pH*. В фазе закисления выход хлорида сопровождается выходом протонов, тогда как фаза защелачивания представляет собой транспорт в клетку сульфата и протона [5]. Результаты исследования позволили предположить, что при гипертоническом воздействии транспорт протонов определяется взаимодействием цитоскелета с мембраной [2]. Для проверки этого предположения в данной работе эритроциты обрабатывали гемином, который вызывает модификацию взаимодействий белка полосы 4.1 с белками цитоскелета, вследствие этого снижается механическая устойчивость клеток [6], а эритроциты теряют способность изменять свою форму при гипертонических воздействиях [1].

Осадок эритроцитов (50 мкл) комбинировали с 2 мл экспериментальной среды, содержащей 120 ммоль/л Na_2SO_4, в термостатируемой ячейке с *pH* электродом. Изменение *pH* суспензии эритроцитов контролировали самописцем. Эритроциты обрабатывали гемином (10 мин) в концентрации 150 мкмоль/л при 37 °С с 20%-м гемотакритом в растворе, содержащем 90 ммоль/л KCl, 45 ммоль/л NaCl, 44 ммоль/л сахарозы, 10 ммоль/л трис (*pH* 7,4).

Параметры транспорта вычисляли, как было описано в [2].

Исследование температурной зависимости транспорта протонов из эритроцитов, обработан-

In red blood cell suspension, introduced to sulphate medium, a two-phase change in *pH* occurs. In acidation phase a chloride release is accompanied with proton release, meanwhile the alkalization phase represents sulphate and proton transport into a cell [5]. The results of investigation allowed to suppose, that under hypertonic effect the proton transport was determined by the interaction of cytoskeleton with membrane [2]. In order to verify this supposition, in the given work the red blood cells were hemin treated, that caused the modification of band 4.1 protein with cytoskeletal proteins, as a result a mechanical resistance of cells decreased [6], as well as red blood cells lost the capability to change their shape under hypertonic effects [1].

Red blood cell sedimentation (50 μl) was combined with 2 ml of an experimental medium, containing 120 mM/l of Na_2SO_4, in a thermostated cell with *pH* electrode. The change in *pH* of red blood cell suspension was controlled using a recorder. Red blood cells were hemin treated in 150 μM/l concentration at 37~symbol P roman C within 10 min with a 20%-hematocrit in the solution, contained 90 mM/l of KCL, 45 mM/l of NaCL, 44 mM/l of sucrose, 10 mM/l of tris (*pH* 7.4).

The transport parameters were calculated as it was described in the paper [2].

The investigation of temperature dependence of proton transport from hemin-treated red blood cells has revealed two linear sites in the temperature range

Матеріал, захищений авторським правом

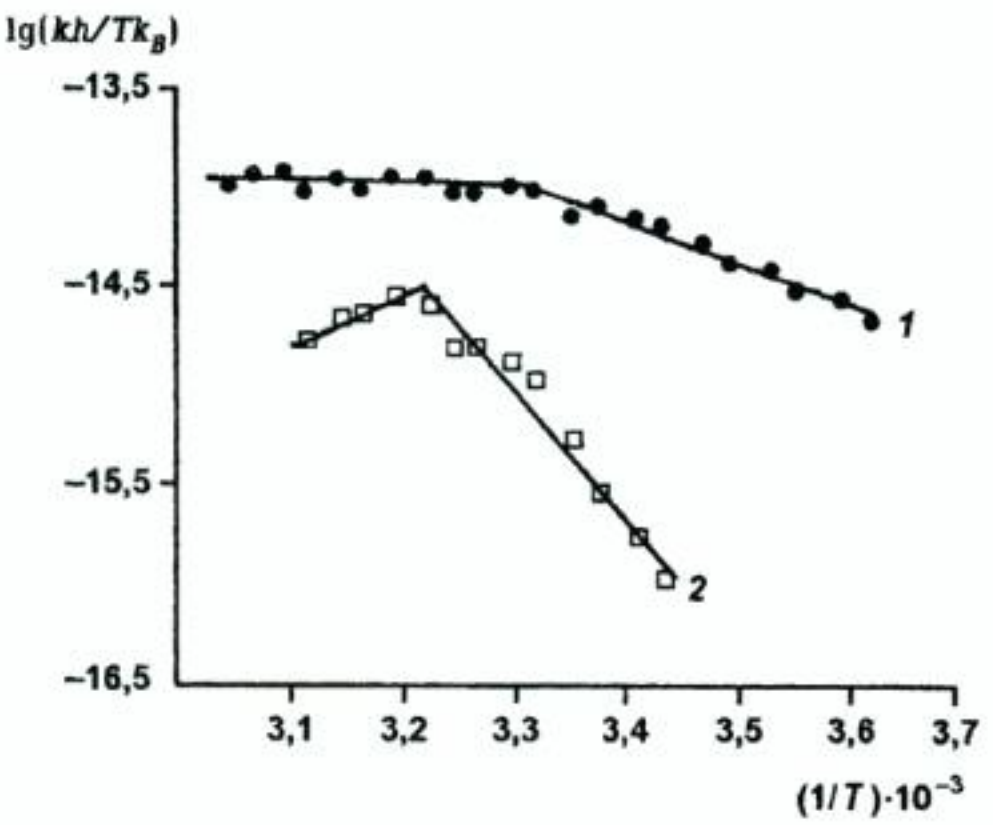
ных гемином, выявило два прямолинейных участка в интервале температур 1–30 и 30–57 °С (рисунок). В интактных эритроцитах было отмечено также наличие двух участков, но в интервалах температур 1–6,5 и 6,5–57 °С. При этом в низкотемпературном участке энтальпия и энтропия активации составляли 34 ккал/моль и 54 кал/моль/град, в высокотемпературном – 4,8 ккал/моль и –50 кал/моль/град соответственно [2]. В модифицированных гемином клетках излом при 6,5 °С исчезает и выявляется при 30 °С (рисунок), при этом в интервале температур 1–30 °С энтальпия активации значительно уменьшается, а энтропия меняет свой знак на отрицательный (таблица). На участке с температурой 30–57 °С чувствительность транспорта к температуре незначительна (рисунок, таблица).

Термодинамические параметры транспорта протонов в эритроцитах, обработанных гемином в среде, содержащей 120 ммоль/л Na_2SO_4

Условия эксперимента	Транспорт протонов			
	из клетки		в клетку	
Интервал температур, °С	1–30	30–57	15–37	37–48
ΔH^*, ккал/моль	9,56	0,94	29,4	–11,2
ΔS^*, кал/моль/град	–32,5	–61,0	28,3	–102,7
ΔG^*, ккал/моль	18,9	20,3	20,7	21,2

Из [3] известно, что термотропное структурное преобразование в мембранах эритроцитов при 6,5–9,5 °С может определяться фазовым разделением липидов, которое опосредуется взаимодействием белка полосы 4.1 с мембраной. Показано, что селективный протеолиз белка полосы 4.1 приводит к исчезновению термотропного перехода в указанном интервале температур. Обработка эритроцитов гемином вызвала потерю излома (рисунок), который имел место при 6,5 °С в интактных эритроцитах [2]. Кроме того, указанные изменения (таблица) сопровождаются снижением энтальпии активации с 32,3 (для интактных клеток [2]) до 9,56 ккал/моль и переменой знака энтропии с положительного (51,4 кал/моль/град) на отрицательный (–32,5 кал/моль/град). Согласно данным [6] модификация эритроцитов гемином приводит к нарушениям взаимодействий белка полосы 4.1 с белками цитоскелета, а также потере способности клеток изменять свою форму при гипертоническом воздействии [1]. Можно предположить, что в низкотемпературном участке (1–6,5 °С) для интактных эритроцитов [2] термодинамика транспорта протонов из клетки в значительной степени определяется взаимодействиями белка полосы 4.1 в цитоскелете.

Температурная зависимость транспорта протонов в эритроциты, обработанные гемином, выявляет участок роста скорости транспорта (15–37 °С) и участок его инактивации (37–48 °С) (рисунок, таблица). Исследование транспорта протонов в



Температурные зависимости транспорта протонов в эритроцитах, обработанных гемином в среде, содержащей 120 ммоль/л Na_2SO_4: *1* – из клетки; *2* – в клетку.

Temperature dependences of proton transport in hemin-treated red blood cells in the medium, contained 120 mM/l of Na_2SO_4: *1* – out of a cell; *2* – into a cell.

of 1–30 and 30–57 °C (Figure). In intact red blood cells the presence of two sites, but in temperature ranges of 1–6.5 and 6.5–57 °C was noted. In this case in a low temperature site the enthalpy and entropy of activation made 34 kcal/M and 54 cal/M/grad, in high temperature one – 4.8 kcal/M and –50 cal/M/grad, correspondingly [2]. In hemin-modified cells the bend at 6.5 °C disappears and is revealed at 30 °C (Figure), thereat in temperature range of 1–30 °C the enthalpy of activation considerably decreases and the entropy changes its sign to a negative one (Table). On the site with the temperature of 30–57 °C the transport sensitivity to the temperature is not significant (Figure, Table).

Thermodynamic parameters of proton transport in hemin-treated red blood cells in the medium, conatained 120 mM/l of Na_2SO_4

Experiment conditions	Proton transport			
	out of a cell		into a cell	
Temperature range, °C	1–30	30–57	15–37	37–48
ΔH^*, kcal/M	9,56	0,94	29,4	–11,2
ΔS^*, cal/M/grad	–32,5	–61,0	28,3	–102,7
ΔG^*, kcal/M	18,9	20,3	20,7	21,2

As it is known from [3], a thermotropic structural rearrangement in red blood cell membranes at 6.5–9.5 °C can be determined by lipid phase division, that is mediated by the interaction of band 4.1 protein with a membrane. It was demonstrated that a selective proteolysis of band 4.1 protein resulted in a disappearance of a thermotropic transition in the mentioned temperature range. Red blood cell treatment by hemin caused the bend loss (Figure), that occurred at 6.5 °C in intact red blood cells [2]. Besides, the mentioned changes (Table) are accompanied by a decrease

Матеріал, захищений авторським правом

интактные эритроциты показало термотропный излом в области 35 °С [2]. При этом энтальпия и энтропия активации для участка до 35 °С составляли 27 ккал/моль и 22,2 кал/моль/град, а для участка выше 35 °С — 10,8 ккал/моль и –30,6 кал/моль/град. Следовательно, в эритроцитах обработанных гемином, в сравнении с контрольными клетками сдвиг точки излома на графике температурной зависимости входа протонов, а также изменения термодинамических параметров на участке до 35 °С являются незначительными. Интерпретация таких результатов относительно функционирования анионного переносчика сводится к тому, что обменный транспорт анионов в интервале температур 15–35 °С не зависит от характера структурных взаимодействий белков цитоскелета с мембраной. В то же время в высокотемпературном интервале модификация клеток привела к температурозависимому снижению активности транспортной системы (рисунок) в сравнении с интактными клетками [2].

Таким образом, полученные результаты показывают, что термодинамика функционирования системы транспорта анионов в эритроцитах изменяется под воздействием модификатора цитоскелета. При этом для анионного канала в интактных эритроцитах на температурном участке до 6,5 °С относительно высокое значение энергии активации и положительная величина энтропии активации могут определяться взаимодействием цитоскелета с мембраной, выше 6,5 °С влияние цитоскелета на термодинамику канального транспорта анионов ограничивается. Это указывает на то, что обработка гемином приводит к значительному снижению энергии активации и к перемене положительного значения энтропии активации на отрицательное. Кроме того, выявление термотропного излома при 30 °С в модифицированных гемином эритроцитах (рисунок), который не выявлялся в интактных клетках [2], свидетельствует о том, что на участке с температурой выше 6,5 °С влияние цитоскелета на функцию анионного канала также имеет место. В то же время модификация цитоскелета не сказывается значительно на термодинамике функционирования анионного переносчика в интервале температур 15–37 °С. Незначительное смещение точки излома с температуры 35 °С для интактных эритроцитов [2] до 37 °С для клеток с модифицированным цитоскелетом (рисунок) говорит о том, что изменения термодинамического статуса анионного переносчика в указанной области температур связаны с изменениями в самой структуре белка полосы 3 [4]. Тем не менее снижение активности транспорта в условиях температуры выше 37 °С

in the activation enthalpy from 32.3 (for intact cells [2]) to 9.56 kcal/M and a variable of entropy sign from a positive (51.4 cal/M/grad) to a negative one (–32.5 cal/M/grad). According to the data [3], red blood cell modification by hemin results in the disorders of band 4.1 protein interactions with cytoskeletal proteins. as well as in the loss of cell capability to change their shape under hypertonic effect [1]. We can suppose that in a low temperature site (1–6.5 °C) for intact red blood cells [2] the thermodynamics of proton transport from a cell is in a considerable extent determined by interactions of band 4.1 protein in the cytoskeleton.

Temperature dependence of proton transport into hemin-treated red blood cells reveals a site of transport rate growth (15–37 °C) and the site of its inactivation (37–40 °C) (Figure, Table). The investigation of proton transport in intact red blood cells demonstrated a thermotropic bend in the range of 35 °C [2]. Thereat the enthalpy and entropy of activation for the site upto 35 °C made 27 kcal/M and 22.2 cal/M/grad, and for the site higher than 35 °C — 10.8 kcal/M and –30.6 cal/M/grad. Consequently in hemin-treated red blood cells in comparison with the control cells the shift of the bend point on the graph of temperature dependence of proton entrance, as well as the changes in thermodynamical parameters on the site upto 35 °C are not significant. The interpretation of these results regarding anion carrier functioning comes to the fact, that anion exchange transport in temperature interval of 15–35 °C does not depend on the character of structural interactions of cytoskeletal proteins with a membrane. At the same time in a high temperature interval the cell modification resulted in a temperature-dependent decrease in the transport system activity (Figure) in comparison with the intact cells [2].

Thus, the results obtained show, that the thermodynamics of functioning of anion transport system in red blood cells changes under the effect of a cytoskeletal modificator. Thereat for an anion channel in the intact red blood cells on the temperature site upto 6.5 °C a relatively high value of activation energy and a positive value of the activation entropy can be determined by cytoskeleton interaction with a membrane, higher than 6.5 °C the cytoskeleton effect of the thermodynamics of a channel anion transport is limited. This points to the fact, that the treatment by hemin results in a significant decrease in the activation energy and in the change of a positive value of ctivation entropy to a negative one. Besides, the revealing of a thermotropic bend at 30 °C in hemin-modifed red blood cells (Figure), which was not detected in the intact cells [2], testifies to the fact, that on the site with the temperature higher than 6.5 °C the effect of cytoskeleton on anion channel

Матеріал, захищений авторським правом

может указывать на участие цитоскелета в термотропном поведении анионного обменника.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Рамазанов В. В., Бондаренко В. А.* Действие гемина и ДИДС на холодовой и гипертонический шок эритроцитов // Пробл. криобиологии.– 1996.– № 2.– С. 13–17.
2. *Рамазанов В. В., Лупилова Н. А., Тодрин А, Ф., Бондаренко Т.П.* Осмотическая модификация транспорта протонов в эритроцитах в сульфатной среде // Пробл. криобиологии.– 1999.– № 4.– С. 34–41.
3. *Forte T., Leto T. L., Minetti M., Marchesi V. T.* Protein 4.1 is involved in structural thermotropic transition of the red blood cell membrane detected by spin-labeled stearic acid // Biochemistry.– 1985.– 24.– P. 7876–7880.
4. *Galanter W. L., Labotka R. J.* The temperature dependens of human erythrocyte transport of phosphate, phosphite and hipophosphite // Biochim. Biophys. Acta.– 1990.– 1027.– P. 65–71.
5. *Red* cell membranes — a methodological approach / Ed. by J. C. Ellory, J. D. Young.– London: Acad. Pres., 1982.– 369 p.
6. *Shaklai N., Avissar N., Rabizaden E., Shaklai M.* Disintegration of red cell membrane cytoskeleton by hemin // Biochem. Internat.– 1986.– 13, № 3.– P. 467–477.

Поступила 14.03.2000

function also occurs. At the same time the cytoskeleton modification does not considerably affect the thermodynamics of anion carrier functioning in the temperature interval of 15–37 °C. A slight shift of the bend point of the temperature from 35 °C for intact red blood cells [2] to 37 °C for cells with modified cytoskelton (Figure) testifies to the fact, that the changes in a thermodynamic status of anion carrier in the mentioned temperature area are related to the changes in band 3 protein structure itself [4]. Nevertheless a decrease in transport activity under temperature conditions higher than 37 °C can testify to the participation of cytoskeleton in a thermotropic behavior of anion exchanger.

REFERENCES

1. *Ramazanov V. V., Bondarenko V. A.* DIDS and hemin effects on cold and hypertonic shock of red blood cells // Problemy kriobiologii.– 1996.– № 2.– P. 13–17.
2. *Ramazanov V. V., Lupilova N. A., Todrin A. F., Bondarenko T. P.* Osmotic modification of proton transport in red blood cells in sulphate medium // Problems of cryobiology.– 1999.– № 4.– P. 34–41.
3. *Forte T., Leto T. L., Minetti M., Marchesi V. T.* Protein 4.1 is involved in structural thermotropic transition of the red blood cell membrane detected by spin-labeled stearic acid // Biochemistry.– 1985.– 24.– P. 7876–7880.
4. *Galanter W. L., Labotka R. J.* The temperature dependens of human erythrocyte transport of phosphate, phosphite and hipophosphite // Biochim. Biophys. Acta.– 1990.– 1027.– P. 65–71.
5. *Red* cell membranes — a methodological approach / Ed. by J. C. Ellory, J. D. Young.– London: Acad. Pres., 1982.– 369 p.
6. *Shaklai N., Avissar N., Rabizaden E., Shaklai M.* Disintegration of red cell membrane cytoskeleton by hemin // Biochem. Internat.– 1986.– 13, № 3.– P. 467–477.

Accepted in 14.03.2000

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 617.713: 615.361.014.41

UDC 617.713: 615.361.014.41

Относительные показатели активности окислительно-восстановительных ферментов в эпителиальных клетках роговицы в условиях длительной гипотермии

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

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Relative Indices of the Activity of Oxidative and Recovering Enzymes in Cornea Epithelial Cells under the Conditions of Long-Term Hypothermia

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

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

Приведены результаты анализа динамики относительных гистохимических показателей активности окислительно-восстановительных ферментов в эпителиальных клетках роговицы в процессе ее длительного гипотермического хранения.

Приведено результати аналізу динаміки відносних гістологічних показників активності окислювально-відновних ферментів в епітеліальних клітинах у процесі її тривалого гіпотермічного зберігання.

Results of the analysis of dynamics in relative histochemical indices of oxidative and recovering enzymes activity in cornea epithelial cells within the process of its long-term hypothermic storage were demonstrated.

Основным условием использования количественной гистоэнзимологии для функционально-морфологического анализа является определение комплекса критериев, с помощью которых можно оценить характер и степень участия морфологических структур в реализации функции. Данные [1] свидетельствуют, что в ряде случаев такой методический подход эффективен и позволяет получить дополнительную информацию о состоянии метаболизма клетки.

Как известно, классические морфологические методы, особенно в криобиологических ситуациях, часто мало информативны и не дают возможность сделать заключение о повреждении той или иной внутриклеточной системы [2]. Тем более это правомерно при исследовании действия гипотермии, так как признаки необратимого повреждения клетки аутолитическими процессами при обычных методах исследования позволяют определить их проявление на конечных этапах в виде фрагментации хроматина, разрушения плазматической мембраны, выходе ядерного содержимого в цитоплазму.

Использованные в данной работе материалы и методы исследования описаны в [3].

Для углубленного анализа функционального состояния объектов исследования были определены относительные показатели активности ферментов, которые могут служить критерием оценки функциональной морфологии клетки, в дискретном промежутке времени еще до развития грубых структурных изменений.

Determination of the criteria complexes due to which one can estimate the character and degree of morphological structures involvement into the function realization, is the main condition of the usage of qualitative histoenzymology for functional and morphological analysis. Literature data [1] testify, that in the series of cases such a methodical approach is efficient and allows the obtaining of additional information about the state of cell metabolism.

As it is known, classical morphological methods, especially in cryobiological situations, are less informative and do not give the possibility to conclude the impairment about that or another intercellular system [2]. This is more obvious when studying the hypothermia effect, because the signs of irreversible cell impairment by autolytic processes under generally used investigation methods allow to detect their manifestation at final stages like as chromatin fragmentation, damage of plasmatic membrane, release of nuclear composition in cytoplasm.

Used in the given work materials and methods for investigation were described [3].

For the detailed analysis of the functional state of the objects for investigation of relative indices of enzyme activity, which may serve as the criterion for the estimation of cell functional morphology with a certain time interval before the development of rough structural changes.

The dynamics of enzyme specific activity in the cells of growing and renewing cornea epithelium du-

Матеріал, захищений авторським правом

Динамика отношений удельной активности ферментов в клетках растущего и обновляющегося эпителия роговицы в процессе ее длительного гипотермического хранения приведена в табл. 1–4 и на рис. 1–4.

Отношение ЛДГ/МДГ указывает на преобладание гликолиза над циклом трикарбоновых кислот в клетках растущего и обновляющегося эпителия роговицы на всем протяжении процесса гипотермического хранения объекта (табл. 1, рис. 1). Динамика этого показателя характеризуется наличием спада на 2-е сутки и увеличения на 4-е сутки по отношению к начальному периоду хранения. Изменения показателя связаны со временем хранения в клетках переднего и заднего эпителия на $65,3 \pm 3,0$ и $68,3 \pm 3,0\%$ соответственно. Изменения отношения ЛДГ/МДГ в эпителиальных клетках в процессе хранения связаны функционально: $r = 0,98 \pm 0,10$, различия заключаются в небольшом превышении показателя для клеток заднего эпителия.

Таблица 1 **Table 1**

Динамика отношения активности ЛДГ/МДГ

Dynamics of ratio of LDA/MDA activity

Срок хранения Duration of storage	Статистические показатели Statistical features	Тип эпителиальных клеток Type of epithelial cells	
		передний anterior	задний posterior
3 ч 3 hrs	$M \pm m$	1,9 ± 0,02	2,1 ± 0,03
	$V \pm v$	38,5 ± 0,70	29,2 ± 0,90
	$V' \pm v'$	6,3 ± 1,40	7,2 ± 1,60
1 сут 1 day	$M \pm m$	2,0 ± 0,02	2,1 ± 0,03
	$V \pm v$	35,3 ± 0,60	31,3 ± 1,0
	$V' \pm v'$	7,6 ± 1,70	8,4 ± 1,90
2 сут 2 days	$M \pm m$	1,6 ± 0,02	1,7 ± 0,03
	$V \pm v$	41,4 ± 0,80	37,4 ± 1,20
	$V' \pm v'$	8,9 ± 2,0	10,5 ± 2,30
4 сут 4 days	$M \pm m$	2,5 ± 0,03	2,7 ± 0,04
	$V \pm v$	45,6 ± 0,80	36,7 ± 1,20
	$V' \pm v'$	11,7 ± 2,60	11,1 ± 2,50
6 сут 6 days	$M \pm m$	2,2 ± 0,03	2,4 ± 0,05
	$V \pm v$	48,8 ± 0,90	43,6 ± 1,40
	$V' \pm v'$	11,6 ± 2,60	12,1 ± 2,70
8 сут 8 days	$M \pm m$	1,9 ± 0,03	1,9 ± 0,04
	$V \pm v$	53,7 ± 1,00	50,4 ± 1,60
	$V' \pm v'$	13,1 ± 2,90	14,1 ± 3,20

Отношения ЛДГ/α-ГФДГ и МДГ/α-ГФДГ указывают на слабую активность глицерофосфатного челночного механизма по сравнению с гликолизом и циклом Кребса. В интервале между 1–4 сут хранения наблюдается значительное увеличение этих показателей, после чего происходит их снижение ниже исходного уровня (табл. 2, 3, рис. 2, 3). Очевидно, увеличение этих показателей связано с нарушением связи между процессами анаэробного и аэробного окисления, а снижение – с усилением активности челночного механизма.

Время гипотермического хранения оказывает влияние на отношение ЛДГ/α-ГФДГ в клетках переднего эпителия на $94,5 \pm 0,5$, заднего – на

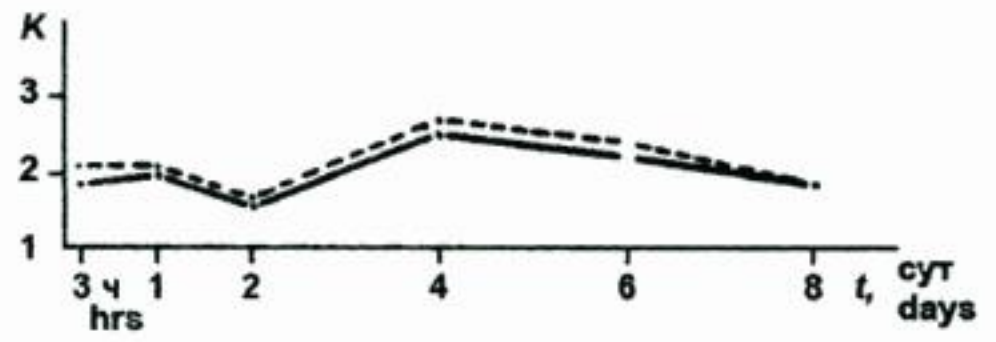


Рис. 1. Динамика отношения удельной активности ЛДГ/МДГ: ——— – клетки переднего эпителия; - - - - – клетки заднего эпителия.

Fig. 1. Dynamics in the specific activity ratio of LDG/MDG specific activity: ——— – cells of the anterior epithelium; - - - - – cells of the posterior epithelium.

ring the process of its long term hypothermic storage is given in the Tables 1–4 and Fig. 1–4.

LDA/MDA ratio testifies to glycolysis prevailing in the cycle of tricarbonic acids in the cells of growing and renewing cornea epithelium within the whole process of histochemical object process (Table 1, Fig. 1). The dynamics of this index is characterized by the reduction to the 2nd day and rising to the 4th day in respect of the initial period of storage. Index changes are related to storage time in cells of anterior and posterior epithelium by 65.3 ± 3.0 and $68.3 \pm 3.0\%$, correspondingly. The changes in LDA/MDA ratio in epithelial cells within the process of storage are functionally connected $r = 0.98 \pm 0.10$, the differences slightly exceed the indices for posterior epithelium cells.

LDG/α-GPhDG and MDG/α-GPhDG testify to a weak activity of glycerophosphate shuttle mechanism in comparison with glycolysis and Krebs' cycle. Within the interval between 1–4 storage days a significant increase of these indices is observed, after which their reduction lower than initial level occurred (Tables 2, 3; Fig. 2, 3). Obviously, an increase of these indices is connected to the impairment of the bond between the processes of anaerobic and acrobic oxidation, and decrease is related to the growth of shuttle mechanism activity.

The time of hypothermic storage affects LDG/α-GPhDG ratio in anterior epithelium cells by $94.5 \pm 0.5\%$, in the posterior one – by $92.7 \pm 0.5\%$, and MDG/α-GPhDG ratio in anterior epithelium by $96.6 \pm 0.5\%$, in posterior – by 95.1 ± 0.5. Functional bond on the change of LDG/α-GPhDG and MDG/α-GPhDG ratio in the cells of anterior and posterior epithelium is following: $r = 0.99 \pm 0.07$ and $r = 1.00 \pm 0.00$, correspondingly. Differences in the dynamics of the indices noted in the cells of anterior and posterior epithelium are related just to the exceeding of their indices in the cells of posterior epithelium.

Also it should be noted the presence of strong correlational bond $r = 0.94 \pm 0.17$, $r = 0.93 \pm 0.18$ between LDG/α-GPhDG and MDG/α-GPhDG during the process of hypothermic storage for the cells of anterior and posterior epithelium.

$NAD \cdot H^2/NADPh \cdot H^2$ ratio testifies, that energy providing of respiration processes prevails in comparison with energy providing of synthesis processes, and therefore, in cornea cells the level of decay (lysis) is by 2–3 times higher, than the synthesis under hypothermic storage. The change of the index is charac-

Матеріал, захищений авторським правом

Таблица 2 **Table 2**

Динамика отношения активности ЛДГ/α-ГФДГ

Dynamics of ratio of LDG/α-GPhDG activity

Срок хранения Duration of storage	Статистические показатели Statistical features	Тип эпителиальных клеток Type of epithelial cells	
		передний anterior	задний posterior
3 ч 3 hrs	$M \pm m$	5,6 ± 0,06	6,3 ± 0,08
	$V \pm v$	43,3 ± 0,80	28,8 ± 0,90
	$V' \pm v'$	6,2 ± 1,40	7,3 ± 1,60
1 сут 1 day	$M \pm m$	5,9 ± 0,06	6,6 ± 0,09
	$V \pm v$	39,2 ± 0,70	31,8 ± 1,00
	$V' \pm v'$	7,7 ± 1,70	8,9 ± 2,00
2 сут 2 days	$M \pm m$	8,4 ± 0,10	9,2 ± 0,15
	$V \pm v$	48,0 ± 0,90	37,4 ± 1,20
	$V' \pm v'$	8,9 ± 2,00	10,3 ± 2,30
4 сут 4 days	$M \pm m$	5,8 ± 0,08	7,1 ± 0,11
	$V \pm v$	53,5 ± 1,00	36,3 ± 1,10
	$V' \pm v'$	12,1 ± 2,70	11,2 ± 2,50
6 сут 6 days	$M \pm m$	3,8 ± 0,06	7,1 ± 0,11
	$V \pm v$	63,3 ± 1,20	42,6 ± 1,30
	$V' \pm v'$	11,4 ± 2,50	13,3 ± 2,80
8 сут 8 days	$M \pm m$	1,8 ± 0,03	2,1 ± 0,05
	$V \pm v$	63,7 ± 1,20	50,6 ± 1,60
	$V' \pm v'$	12,8 ± 2,90	14,0 ± 3,10

Таблица 3 **Table 3**

Динамика отношения активности МДГ/α-ГФДГ

Dynamics of ratio of MDG/α-GPhDG activity

Срок хранения Duration of storage	Статистические показатели Statistical features	Тип эпителиальных клеток Type of epithelial cells	
		передний anterior	задний posterior
3 ч 3 hrs	$M \pm m$	2,9 ± 0,03	3,0 ± 0,04
	$V \pm v$	41,8 ± 0,80	29,1 ± 0,90
	$V' \pm v'$	6,4 ± 1,40	7,3 ± 1,60
1 сут 1 day	$M \pm m$	3,0 ± 0,03	3,2 ± 0,04
	$V \pm v$	39,4 ± 0,70	31,1 ± 1,00
	$V' \pm v'$	7,5 ± 1,70	9,2 ± 2,10
2 сут 2 days	$M \pm m$	5,4 ± 0,07	5,5 ± 0,09
	$V \pm v$	47,1 ± 0,90	38,1 ± 1,20
	$V' \pm v'$	9,1 ± 2,00	10,4 ± 2,30
4 сут 4 days	$M \pm m$	2,3 ± 0,03	2,7 ± 0,04
	$V \pm v$	54,3 ± 1,00	37,4 ± 1,20
	$V' \pm v'$	11,8 ± 2,60	11,0 ± 2,50
6 сут 6 days	$M \pm m$	1,7 ± 0,03	2,0 ± 0,04
	$V \pm v$	63,2 ± 1,20	44,5 ± 1,40
	$V' \pm v'$	11,6 ± 2,60	12,2 ± 2,70
8 сут 8 days	$M \pm m$	1,0 ± 0,02	1,1 ± 0,03
	$V \pm v$	62,6 ± 1,10	51,0 ± 1,60
	$V' \pm v'$	12,9 ± 2,90	14,3 ± 3,20

92,7 ± 0,5%, а на отношение МДГ/α-ГФДГ в переднем эпителии на 96,6 ± 0,5, заднем — на 95,1 ± 0,5%. Существует функциональная связь по изменению отношений ЛДГ/α-ГФДГ и МДГ/α-ГФДГ в клетках переднего и заднего эпителия: $r = 0,99 \pm 0,07$ и $r = 1,00 \pm 0,00$ соответственно. Различия в динамике названных показателей в клетках переднего и заднего эпителия связаны только с превышением их значений в клетках заднего эпителия.

Следует также отметить для клеток переднего и заднего эпителия наличие очень сильной корреляционной связи между ЛДГ/α-ГФДГ и МДГ/α-

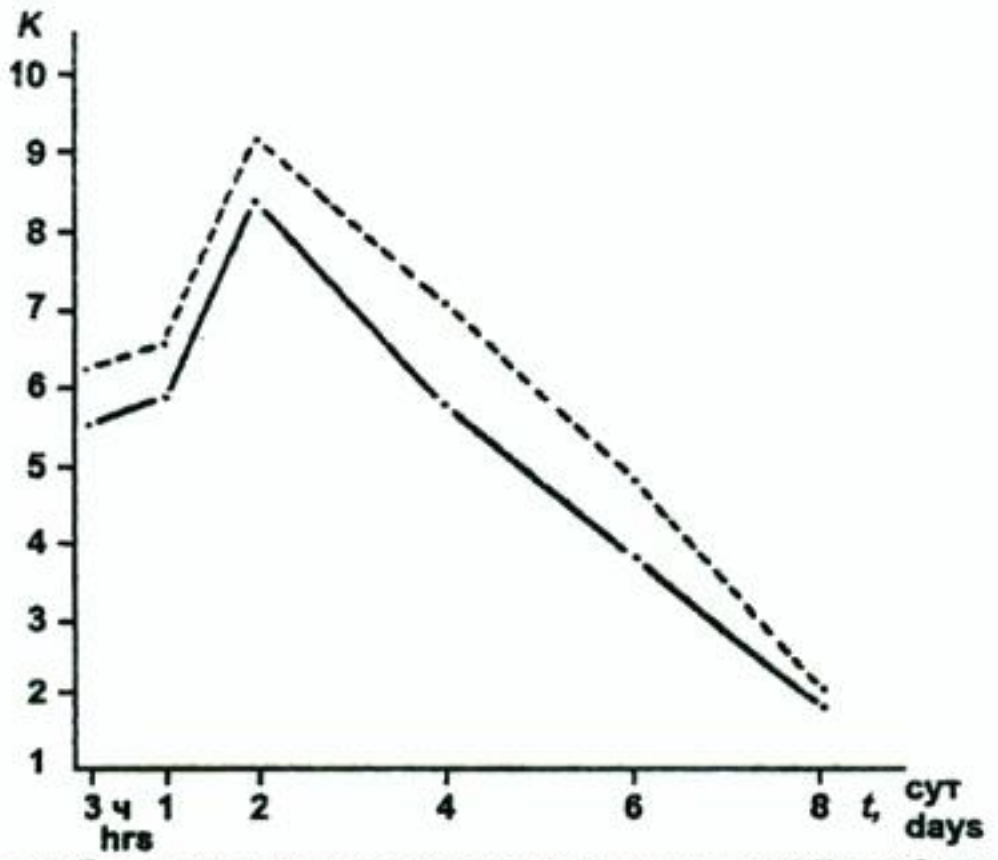


Рис. 2. Динамика отношения удельной активности ЛДГ/α-ГФДГ: ——— — клетки переднего эпителия; - - - - — клетки заднего эпителия.

Fig. 2. Dynamics in the specific activity ratio of LDG/α-GPhDG specific activity: ——— — cells of the anterior epithelium; - - - - — cells of the posterior epithelium.

terized by its gradual increase when storing with some deviations from its general direction (Table 4, Fig. 4).

Storage time affects the ratio change in the anterior epithelium cells by 77.1 ± 2.0, posterior one — by 67.55 ± 0.16%. Index changes in the cells of anterior and posterior epithelium are functionally connected ($r = 0.95 \pm 0.16$). Regression rows practically do not differ for both layers.

In the change of the interaction of energy providing processes for lysis and synthesis the presence of 4 phases is observed: the first one — rising of the indices activity, the second — their reduction, often lower, than an initial value level, the third — an increase of the indices, the fourth — their monotonous decrease [3–5]. This testifies to the presence of two periods of reactive changes, caused by the impairment of generalized system of the "organism–organ" control, and then — by structural and functional damages, appeared due to the factors, caused pathological state

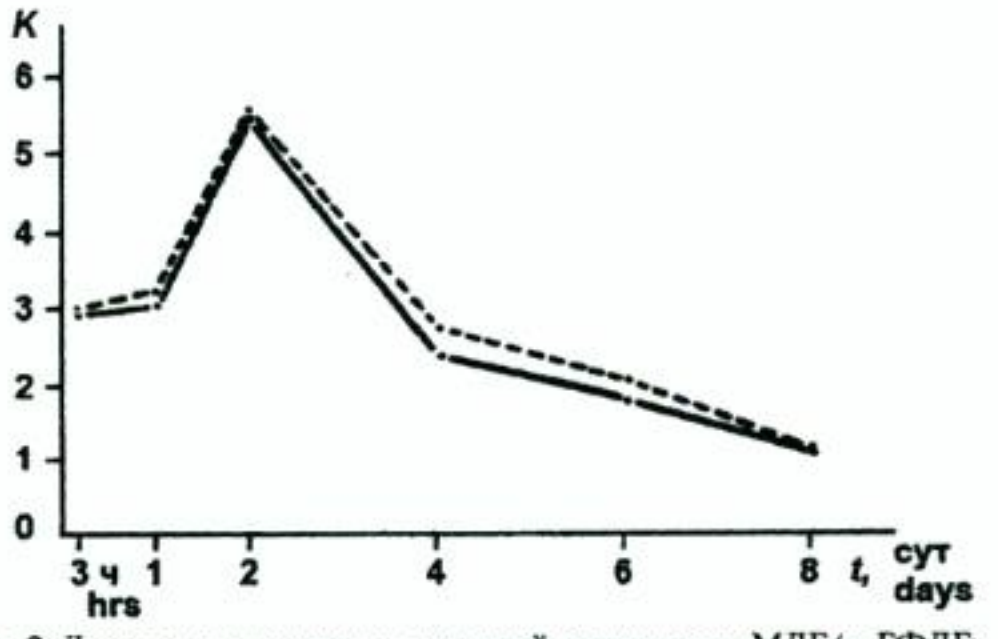


Рис. 3. Динамика отношения удельной активности МДГ/α-ГФДГ: ——— — клетки переднего эпителия; - - - - — клетки заднего эпителия.

Fig. 3. Dynamics in the specific activity ratio of MDG/α-GPhDG specific activity: ——— — cells of the anterior epithelium; - - - - —. cells of the posterior epithelium.

Матеріал, захищений авторським правом

ГФДГ в процессе гипотермического хранения: $r = 0{,}94 \pm 0{,}17$, $r = 0{,}93 \pm 0{,}18$.

Отношение НАД·H^2/НАДФ·H^2 свидетельствует о том, что энергообеспечение процессов дыхания преобладает над энергообеспечением процессов синтеза, а следовательно, в клетках роговицы уровень распада примерно в 2–3 раза выше уровня синтеза при гипотермическом хранении. Изменение показателя характеризуется его постепенным увеличением в процессе хранения с небольшими отклонениями от общей его направленности (табл. 4, рис. 4).

Время хранения влияет на изменение отношения в клетках переднего эпителия на $77{,}1 \pm 2{,}0$, заднего — на $67{,}55 \pm 0{,}16$%. Изменения показателя в клетках переднего и заднего эпителия связаны функционально ($r = 0{,}95 \pm 0{,}16$). Ряды регрессии практически не различимы для обоих слоев.

В изменении взаимодействия процессов энергообеспечения распада и синтеза отмечается наличие 4-х фаз: первая — увеличение активности показателей, вторая — их снижение, чаще всего ниже уровня исходного значения, третья — увеличение показателей, четвертая — их монотонное снижение [3–5]. Это свидетельствует о наличии 2-х периодов реактивных изменений, вызванных нарушением генерализованной системы управления "организм–орган", а далее структурно-функциональными нарушениями, возникающими в силу действия факторов, вызывающих патологическое состояние объекта, что приводит к нарушению локальной системы управления "ткань–клетка".

Таким образом, при длительном гипотермическом хранении объектов действие факторов аутолитического процесса приводит к тому, что на любом этапе гипотермического хранения процессы энергообеспечения распада преобладают над процессами энергообеспечения синтеза.

Таблица 4 **Table 4**

Динамика отношения активности НАД·H^2/НАДФ·H^2

Dynamics of ratio of NAD·H^2/NADPh·H^2 activity

Срок хранения Duration of storage	Статистические показатели Statistical features	Тип эпителиальных клеток Type of epithelial cells	
		передний anterior	задний posterior
3 ч 3 hrs	$M \pm m$	2,0 ± 0,02	2,0 ± 0,02
	$V \pm v$	38,7 ± 0,70	25,1 ± 0,80
	$V' \pm v'$	7,5 ± 1,70	7,4 ± 1,70
1 сут 1 day	$M \pm m$	2,2 ± 0,02	1,9 ± 0,02
	$V \pm v$	40,0 ± 0,70	28,3 ± 0,90
	$V' \pm v'$	8,2 ± 1,80	8,9 ± 2,00
2 сут 2 days	$M \pm m$	1,5 ± 0,02	1,7 ± 0,02
	$V \pm v$	41,4 ± 0,80	31,6 ± 1,00
	$V' \pm v'$	9,7 ± 2,20	9,9 ± 2,20
4 сут 4 days	$M \pm m$	2,9 ± 0,04	2,7 ± 0,04
	$V \pm v$	48,8 ± 0,90	34,7 ± 1,10
	$V' \pm v'$	10,6 ± 2,40	11,6 ± 2,60
6 сут 6 days	$M \pm m$	2,5 ± 0,03	2,3 ± 0,04
	$V \pm v$	50,8 ± 0,90	39,7 ± 1,30
	$V' \pm v'$	12,3 ± 2,80	13,1 ± 2,90
8 сут 8 days	$M \pm m$	2,6 ± 0,04	2,5 ± 0,05
	$V \pm v$	54,8 ± 1,00	46,4 ± 1,50
	$V' \pm v'$	14,4 ± 3,20	14,2 ± 3,20

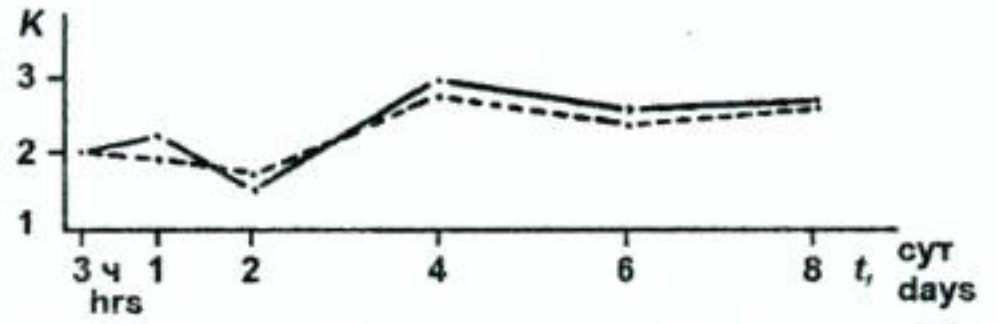


Рис. 4. Динамика отношения удельной активности НАД/НАДФ: ——— — клетки переднего эпителия; - - - - — клетки заднего эпителия.

Fig. 4. Dynamics in the specific activity ratio of NAD/NADPh specific activity: ——— — cells of the anterior epithelium; - - - - — cells of the posterior epithelium.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Гистология* (Введение в патологию) / Под ред. Э. Г. Улумбекова, Ю. А. Чебышева.– М.: ГЭОТАР, 1997.– 960 с.
2. *Обозная Э. И., Пушкарь Н. С., Маркова О. П., Панков Е. Я.* Цитохимия замороженной клетки.– Киев: Наук. думка, 1981.– 176 с.
3. *Юрченко Т. Н., Белоножко А. П., Шарлай Т. М.* Динамика активности α-ГФДГ в клетках растущего и обновляющегося эпителия роговицы в процессе ее гипотермического хранения // Пробл. криобиологии.– 1999.– № 3.– С. 21–26.
4. *Юрченко Т. Н., Белоножко А. П., Шарлай Т. М.* Динамика активности НАД·H^2 и НАДФ·H^2 диафораз в клетках растущего и обновляющегося эпителия роговицы в процессе ее гипотермического хранения // Пробл. криобиологии.– 2000.– № 2.– С. 31–35.
5. *Юрченко Т. Н., Белоножко А. П., Шарлай Т.М* . Динамика активности ЛДГ и МДГ в клетках растущего и обновляющегося эпителия роговицы в процессе ее гипотермического хранения // Пробл. криобиологии.– 2000.– № 3.– С. 38–43.

Поступила 11.04.2000

of the object, that resulted in the injury of the "tissue–cell" local control system.

Thus, during the process of long-term hypothermic storage of objects the effect of the factors of autolytic process results in the fact, that the processes of lysis energy providing predominate ones for synthesis.

REFERENCES

1. *Histology* (Introduction into pathology) / Ed. by E. G. Ulumbekova, Yu. A. Chebysheva.– M.: GEOTAR, 1997.– 960 p.
2. *Oboznaya E. I., Pushkar N. S., Markova O. P., Pankov E. Ya.* Cytochemistrry of a frozen cell.– Kiev: Naukova dumka, 1981.– 176 p.
3. *Yurchenko T. N., Belonozhko A. P., Sharlay T. M.* Dynamics of α-HPDG activity in the cells of growing and renewing cornea epithelium during the process of its hypothermic storage // Problems of Cryobiology.– 1999.– № 3.– P. 21–26.
4. *Yurchenko T. N., Belonozhko A. P., Sharlay T. M.* Dynamics of NAD·H^2 and NADPh·H^2 diaphorases in the cells of growing and renewing cornea epithelium during the process of its hypothermic storage // Problems of Cryobiology.– 2000.– № 2.– P. 31-35.
5. *Yurchenko T. N., Belonozhko A. P., Sharlay T. M.* Dynamics of LDG and MDG in the cells of growing and renewing cornea epithelium during the process of its hypothermic storage // Problems of Cryobiology.– 2000.– № 3.– P. 38–43.

Accepted in 11.04.2000

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 591.15.16

UDC 591.15.16

Изучение вероятности кристаллообразования раствора глицерина при высоких скоростях замораживания

Л. В. ГОРБУНОВ

Харьковский биотехнологический центр, пос. Кулиничи

Investigation of the Probability of Crystal Formation in Glycerol Solution under High Freezing Rates

L. V. GORBUNOV

Center of Biotechnology, Kharkov, Kulinichi

Основой разработки является устройство, предназначенное для количественной регистрации процесса кристаллообразования в широком диапазоне концентраций криопротектора (0–50%) и скоростей охлаждения (0–30 °С/с) с одновременной регистрацией изменения температуры и электропроводности исследуемого раствора с последующей их обработкой. Разработанный термокондуктометрический метод позволил определить вероятность кристаллообразования раствора глицерина с концентрациями 0, 20 и 40% [V/V], приготовленного на фосфатно-солевом буфере (PBS) и охлажденного при скоростях замораживания 0,1; 27 и 30 °С/с. Вероятности кристаллообразования составили 95,8; 84,3; 0% соответственно для каждой вышеуказанной концентрации.

Основою розробки є пристрій, призначений для кількісної реєстрації процесу кристалоутворення в широкому діапазоні концентрацій кріопротектора (0–50%) і швидкостей охолодження (0–30 °С/с) з одночасною реєстрацією зміни температури та електропровідності розчину, що досліджується, з наступною їх обробкою. Розроблений термокондуктометричний метод дозволив визначити можливості кристалоутворення розчину гліцерину з концентраціями 0, 20 і 40% [V/V], приготованого на фосфатно-сольовому буфері (PBS) і охолодженого при швидкостях заморожування 0,1; 27 і 30 °С/с. Вірогідності кристалоутворення становили 95,8; 84,3; 0% відповідно для кожної зазначеної вище концентрації.

The device for quantitative recording of the crystal formation process within a wide range of cryoprotectant concentrations (0–50%) and cooling rates (0–30 °C/s) with simultaneous recording of the change of temperature and electroconductivity of the studied solution with their further processing is the basis for working-out. Elaborated method of thermoconductivity allowed to evaluate the probability of crystal formation in glycerol solution of 0, 20 and 40% concentrations [V/V], prepared with a phosphate-saline buffer (PBS) and cooled under 0,1; 27 and 30 °C/s freezing rates. Probabilities of crystal formation made 95,8; 84,3 and 0%, correspondingly, for each of the mentioned above concentrations.

Кристаллизация воды является одним из факторов, препятствующих получению жизнеспособного деконсервированного биообъекта, охлажденного до температуры жидкого азота. Дальнейшее совершенствование методов витрификации биообъектов связано с разработкой способов количественного определения вероятности образования вне- и внутриклеточного льда. Существующий кондуктометрический метод определения кристаллообразования раствора оказывается неприемлемым при относительно высоких скоростях замораживания ($B > 10$ °С/мин) и концентрациях криопротекторов ($C > 30\%$) [2]. Отсутствие количественных данных не дает полной объективной оценки кристаллообразования в среде и тем самым не позволяет ускорить оптимизацию технологии витрификации, так как при этом отмечается незначительный рост кристаллов, особенно при оттаивании.

Цель работы – разработка термокондуктометрического метода количественного определения вероятности кристаллообразования криопротектора в широком диапазоне концентраций и скоростей замораживания-оттаивания.

Замораживание среды осуществлялось в парах азота в пластиковой соломинке объемом 250 мл или прямым погружением ее в жидкий азот. Ско-

Water crystallization is one of the factors, preventing the obtaining of a viable frozen-thawed bioobject, cooled down to liquid nitrogen temperature. Further improvement of the methods for bioobjects vitrification is connected to elaboration of the ways for quantitative determination of the probability of extra- and intracellular ice formation. Existed conductometric method for determination of the solution crystal formation occurred to be unacceptable under relatively high freezing rates ($B > 10$ °C/min) and cryoprotectants concentrations ($C > 30\%$) [2]. The absence of quantitative data is insufficient in respect of the objective estimation of crystal formation in a medium, due to this fact it is impossible to accelerate optimization of the vitrification technology, because in this case insignificant crystal growth occurs, especially during thawing.

The aim of the given work was to work-out the method of thermoconductivity for quantitative determination of the probability of crystal formation in a cryoprotectant within a wide range of concentrations and freeze-thawing rates.

Freezing of medium was carried-out in nitrogen vapors by means of a plastic straw with 250 ml volume or by its direct immersion into liquid nitrogen. Thawing rate was realized by immersion of containers into

Матеріал, захищений авторським правом

рость оттаивания реализовывалась погружением контейнеров в водяную баню, предварительно нагретую до температуры 40 °С. Температуру образца измеряли при помощи медьконстантановой термопары с диаметром измерительной головки 0,1 мм. Режим снижения температуры регистрировали графопостроителем Н-307. Скорость изменения температуры при замораживании вычисляли в диапазоне зоны эвтектики используемого раствора, а при оттаивании — в температурной зоне рекристаллизации. В качестве модельного раствора использовали растворы глицерина различных концентраций (0, 20, 40, 50% [V/V]), приготовленные на фосфатном солевом буфере (PBS). Полученные результаты статистически обрабатывали общепринятыми методами.

Линейная зависимость электропроводности раствора от изменения температуры является критерием отсутствия роста кристаллов в соответствии с законом электролитической проводимости жидкостей. При вымерзании воды в зоне эвтектики раствора его электропроводность снижается пропорционально степени кристаллообразования. Таким образом, величина объема растущих кристаллов обратно пропорциональна степени изменения электропроводности среды при изменении температуры во времени. Использование медного провода диаметром 0,01 мм как первого электрода и медьконстантановой термопары с диаметром измерительной головки 0,1 мм как второго электрода позволило снизить до минимума их влияние на процесс теплообмена. Это дало возможность регистрировать относительное изменение электропроводности среды в зависимости от температуры при высоких скоростях (рис. 1).

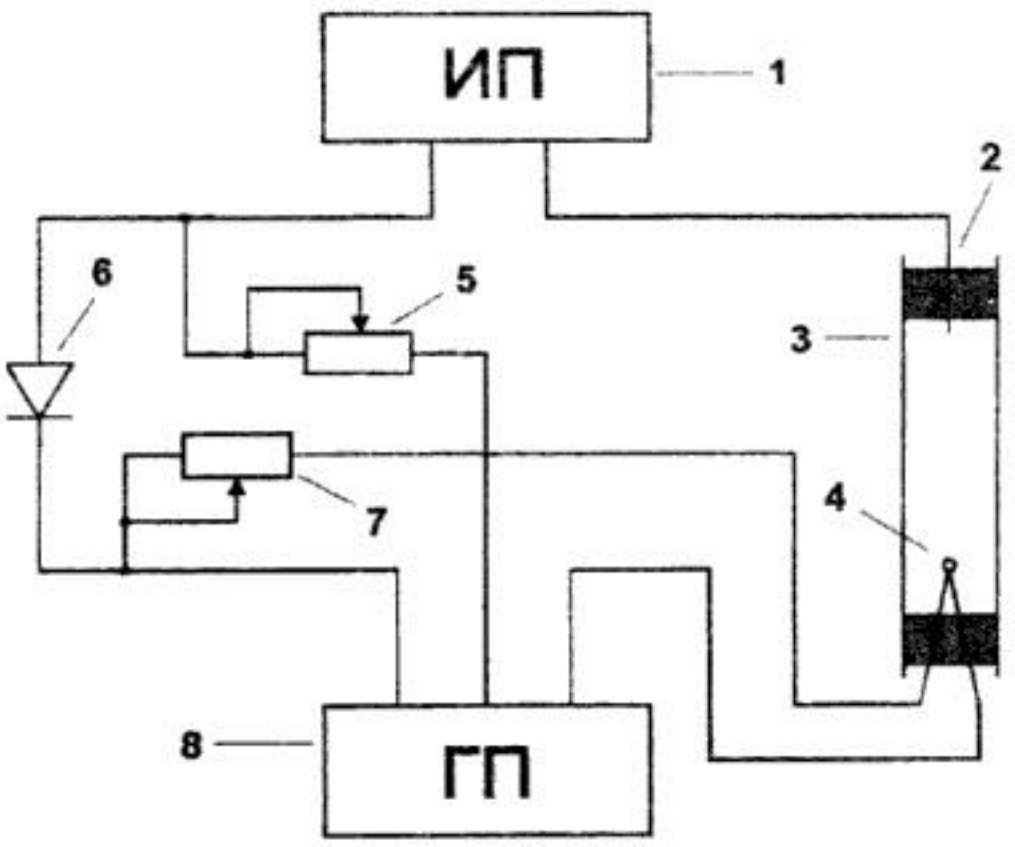


Рис. 1. Электрическая схема регистрации электропроводности исследуемого раствора от изменения температуры: 1 — источник электрического тока; 2 — электрод; 3 — пластиковая соломинка; 4 — термопара; 5, 7 — сопротивления; 6 — диод; 8 — графопостроитель.

Fig. 1. Electric scheme of the recording of electron conductivity in the studied solution on the temperature change: 1 — source of electric current; 2 — electrode; 3 — plastic straw; 4 — thermocouple; 5, 7 — resistance; 6 — diode; 8 — plotting device.

a water bath, preliminarily heated up to the temperature of 40 °C. Temperature of a sample was measured by means of copper-constant thermocouple with 0.1 mm diameter of the measuring head. Regimen of temperature decrease was recorded by means of H-307 plotting device. The rate of temperature decrease under freezing was calculated in the range of eutectics zone of the solution being used, during thawing this value was measured in the temperature zone of crystallization. As a model glycerol solutions of various concentrations (0, 20, 40, 50% [V/V]), prepared with a phosphate salt buffer were used (PSP). Obtained results were statistically processed according to generally accepted methods.

Linear dependence of heat conductivity in a solution on the temperature change is the criterion for the absence of crystal growth according to the law about electrolytic conductivity of fluids. When water freezes-out in the eutectics zone of solution its heat conductivity decreases proportionally to the degree of crystal formation. Thus, the volume of growing crystals is inversely proportional to the level of electroconductivity change in a medium when changing temperature during a time. Usage of copper wire with 0.01 mm diameter as the first electrode and copper-constant thermocouple as the second electrode allowed to reduce to minimum their effect on the heat exchange process. This fact allows the recording of a relative change of electroconductivity depending on the temperature under high rates (Fig. 1).

Proposed device comprises the source of electric current (constant or variable) highly frequency generator of electric signal like as polar symmetric meander 1. Electric signal in the first chain passes through electrode 2, the investigated solution, stored in the plastic straw 3, copper wire of thermocouple 4 and additionally changing resistance 5 ($R = 1$ mOm) by means of which the value of electric current before the freezing beginning. Electroconductivity of the studied medium decreasing during crystal formation was programmed.

During crystal formation electroconductivity of the studied medium decreased and proportionally to this the current power reduced both in the 1st and 2nd chains. Diode 6 programs a constant component of electric current in the second chain, the value of which is fixed to the programmed value by means of shunt 7 ($R_2 = 68$ kOm). Constant components of electric signal, formed in the second chain, as well as of thermocouples in the first one obtained are supplied to plotting device 8, where the changes in electroconductivity are recorded.

To evaluate sensitivity of the device work to a crystal growth depending on electric signal selection glycerol solution was used both during freezing and thawing. Plastic straw was filled with a model solution, electrode was put into its hole and hermetically packed with paste-like corks. By means of the resistances, as well as fixed of coefficients of plotter ampli-

Матеріал, захищений авторським правом

Предлагаемое устройство состоит из источника электрического тока (постоянного или переменного) — высокочастотного генератора электрического сигнала, имеющего вид полярно симметричного меандра 1. Электрический сигнал в первой цепи проходит через электрод 2, исследуемый раствор, который находится в пластиковой соломинке 3, медный провод термопары 4 и дополнительно изменяемое сопротивление 5 ($R = 1$ мОм), при помощи которого задается величина электрического тока до начала замораживания.

При кристаллообразовании электропроводность исследуемой среды понижается и пропорционально этому падает сила тока как в первой, так и во второй цепях. Диод 6 задает постоянную составляющую электрического тока во второй цепи, величина которого устанавливается до заданного значения при помощи шунта 7 ($R_2 = 68$ кОм). Постоянные составляющие электрического сигнала, которые формируются во второй цепи, а также получены с термопары в первой, поступают на графопостроитель Н-307 8, где регистрируются изменения электропроводности от температуры.

Для определения чувствительности работы устройства к росту кристаллов в зависимости от выбора электрического сигнала как при замораживании, так и при оттаивании использовался раствор глицерина. Пластиковая соломинка заполнялась модельным раствором, в ее отверстие помещался электрод и герметически закрывался пастообразными пробками. С помощью сопротивлений, а также установленных коэффициентов усиления графопостроителя выставлялись заданные значения, соответствующие величинам силы тока и температуры. Для выбора источника электрического сигнала апробированы два варианта. В первом использовали постоянный ток. Преимущество данного варианта измерения — возможность выбора напряжения в диапазоне от 2 до 12 В, что позволило увеличить расстояние между рабочими электродами до нескольких сантиметров и тем самым снизить степень инициации роста кристаллов самими электродами. Недостатком оказалась низкая чувствительность проводимости к росту кристаллов в сравнении с ионной (рис. 2).

Второй вариант измерений, основанный на использовании переменного сигнала, отражает соответствие линейной зависимости изменения электропроводности при понижении температуры и отсутствии роста кристаллов в среде, но он применим только при замораживании. Недостатком этого варианта стало сужение рабочего диапазона измерения по току из-за паразитной проводимости переменного сигнала, что явилось причиной сближения электродов до 1 см вследствие низкой электропроводности высоких концентраций криопротектора и малого напряжения генерируемого сигнала (2 В). Таким образом, как источник сигнала использовали переменное напряжение. В этом

fication, the given values, corresponding to the values of current power and temperature were noted. To select the source of electric signal two variants were tested. In the first case a constant current was used. Possibility to chose the voltage within the range from 2 to 12 V is the advantage of the given method for measuring, allowing to increase the distance between working electrodes up to several centimeters and by this way to decrease the initiation degree of crystal growth by electrodes. Low sensitivity of conductivity to crystal growth occurred to be its disadvantage (Fig. 2).

The second variant for measuring, based on the usage of alternating signal, reflects the correspondence of electron conductivity linear dependence under a temperature decrease and the absence of crystal growth in a medium, however it can be applied just

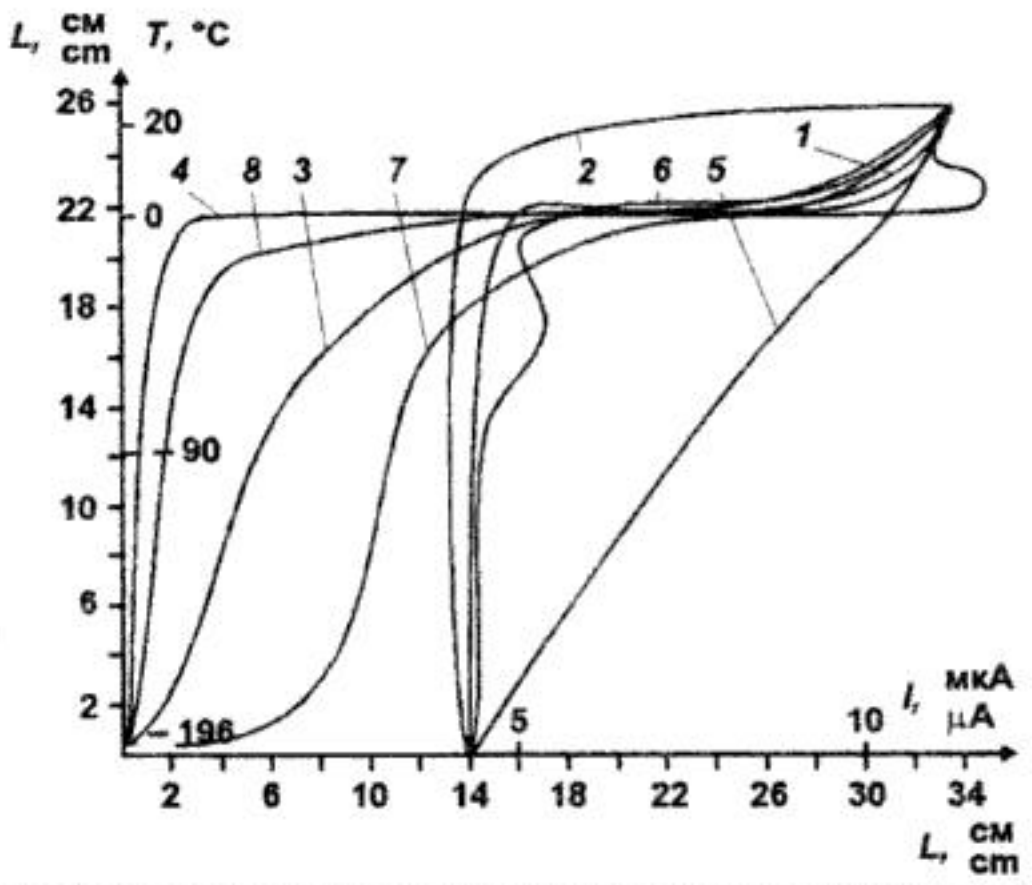


Рис. 2. Изменения электропроводности раствора глицерина с концентрациями $C_0 = 0\%$ и $C_1 = 50\%$ в переменном ($f_1 \neq 0$) и постоянном ($f_0 = 0$) электрическом поле при замораживании ($B_з \approx 30$ °C/с) и оттаивании ($B_0 \approx 25$ °C/с): *1* — замораживание в жидком азоте в переменном электрическом поле f_1 с концентрацией C_0; *2* — оттаивание в водяной бане в переменном электрическом поле f_1 с концентрацией C_0; *3* — замораживание в жидком азоте в постоянном электрическом поле f_0 с концентрацией C_0; *4* — оттаивание в водяной бане в постоянном электрическом поле f_0 с концентрацией C_0; *5* — замораживание в жидком азоте в переменном электрическом поле f_1 с концентрацией C_1; *6* — оттаивание в водяной бане в переменном электрическом поле f_1 с концентрацией C_1; *7* — замораживание в жидком азоте в постоянном электрическом поле f_0 с концентрацией C_1; *8* — оттаивание в водяной бане в переменном электрическом поле f_0 с концентрацией C_1.

Fig. 2. Electron conductivity changes of glycerol solution with $C_0 = 0\%$ and $C_1 = 50\%$ concentrations in an alternating electric field ($f_1 \neq 0$) and a constant one ($f_0 = 0$) under freezing ($B_f \approx 30$ °C/s) and thawing ($B_0 \approx 25$ °C/min): *1* — freezing in liquid nitrogen in an alternating electric field f_1 with C_0 concentration; *2* — thawing in water bath in an alternating electric field f_1 with C_0 concentration; *3* — freezing in liquid nitrogen in an alternating electric field f_0 with C_0 concentration; *4* — thawing in water bath in a constant electric field f_0 with C_0 concentration; *5* — freezing in liquid nitrogen in an alternating electric field f1 with C_1 concentration; *6* — thawing in water bath in an alternating electric field f_1 with C_1 concentration; *7* — freezing in liquid nitrogen in a constant electric field f_0 with C_1 concentration; *8* — thawing in water bath in an alternating electric field f_0 with C_1 concentration.

Матеріал, захищений авторським правом

случае наблюдается более высокая чувствительность ионной проводимости раствора к росту кристаллов. При выборе рабочей частоты в диапазоне от 20 кГц до 2 МГц исключались частотные зоны поглощения электрической энергии молекулами исследуемого раствора (для растворов глицерина таковыми оказались 1,35 и 1,68 МГц). Количественные значения вероятностей кристаллообразования растворов глицерина, замороженных при различных скоростях, определяли при частоте электрического сигнала 200 кГц.

В процессе замораживания графопостроитель регистрировал зависимость изменений силы тока от понижения температуры. Используя эту зависимость, находили скорость изменения электропроводности раствора от температуры V_1 [μA/°C] в положительном диапазоне температуры и скорость падения электропроводности в зоне эвтектики раствора V_2 (рис. 3). Вероятность кристаллообразования вычисляли по формуле

$$P_{кр} = (1 - V_1/V_2)\cdot 100\% .$$

Количественные значения вероятностей кристаллообразований растворов глицерина, полученных при различных скоростях замораживания, приведены в таблице.

Соответствие количественных данных [2], которые были получены при малых скоростях замораживания и низких концентрациях криопротектора, результатам, приведенным выше, позволяет сделать заключение о приемлемости предложенного метода для определения вероятности кристаллообразования в процессе замораживания при низких скоростях. Результаты, полученные при высоких концентрациях криопротектора и скоростях замораживания, дают близкие значения к данным

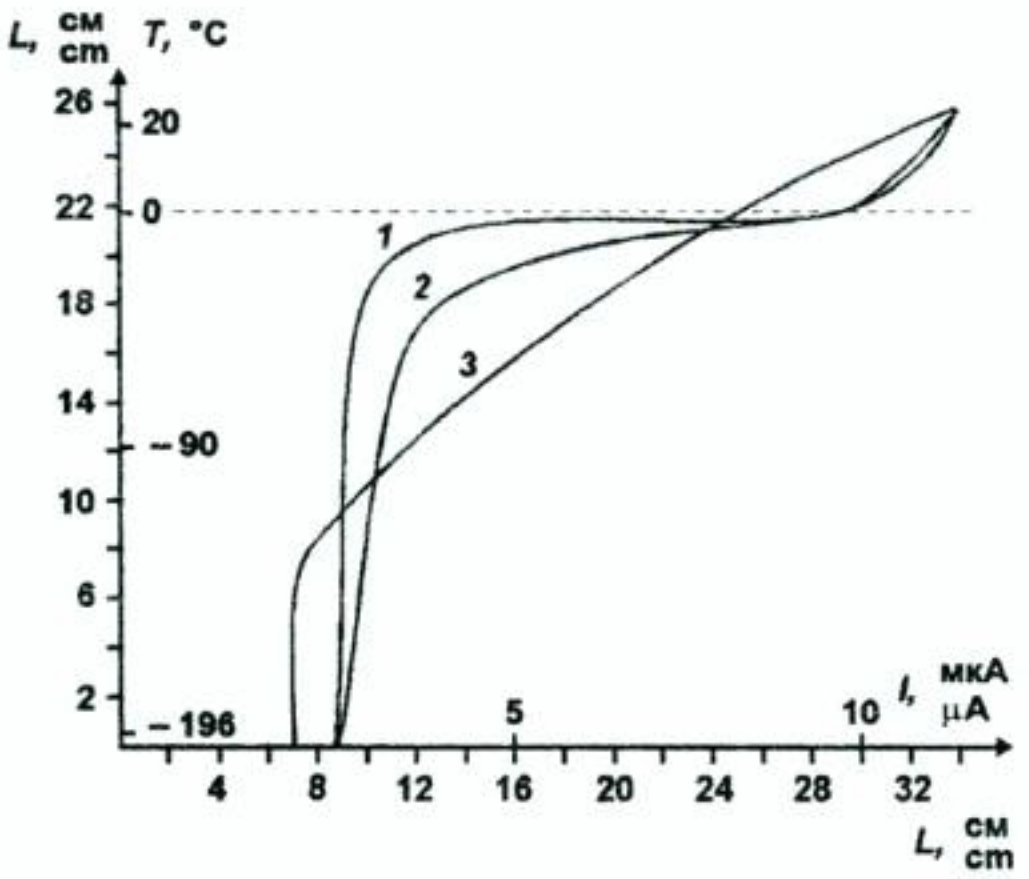


Рис. 3. Изменения электропроводности раствора глицерина с различными концентрациями (C) от температуры в переменном электрическом поле $f = 465$ кГц при замораживании соломинки с разными скоростями ($B_з$): *1* — $B_з \approx 0{,}1$ °C/с, $C = 0\%$; *2* — $B_з = 27$ °C/с, $C = 20\%$; *3* — $B_з = 30$ °C/с, $C = 40\%$.

Fig. 3. Electron conductivity changes in the solution with various concentration (C) depending on the temperature in an alternating electric field $f = 465$ kHz under straw freezing with the following rates (B_f): *1* — $B_f \approx 0.1$ °C/c, $C = 0\%$; *2* — $B_f = 27$ °C/c, $C = 20\%$; *3* — $B_f = 30$ °C/c, $C = 40\%$.

under freezing. Narrowing of an operating measurement range by means of current is the disadvantage of this method due to a parasite conductance of an alternating signal, that is the cause of electrodes approaching up to 1 centimeter due to low electron conductance of high cryoprotectant concentrations and low voltage of the signal being generated (2 V). Thus, alternating voltage was applied as a signal source, in this case a higher sensitivity of the solution ionic conductivity to crystal growth was observed. When selecting an operating frequency within the range from 20 kHz to 2 MHz the frequency absorption zones of electric energy by the molecules of studied solution (for glycerol solutions these values made 1.35 and 1.68 MHz) were excluded. Quantitative values of the crystal formation probabilities in the glycerol solutions, frozen under various rates, were evaluated at 200 kHz frequency of electric signal.

During the freezing process a plotting device recorded the dependence of the change of a current power depending on a temperature decrease. Using this dependence, the rate of the solution electron conductivity change on V_1 temperature [μA/°C] within the range of positive temperatures and the rate of electron conductivity reduction in eutectics zone of the V_2 solution were found (Fig. 3). Crystal formation probability was evaluated according to the formula:

$$P_{cr} = (1 - V_1/V_2)\cdot 100\% .$$

Quantitative values of crystal formation probability of the glycerol solutions, obtained under various freezing rates are given in the Table.

Probability values of crystal formation, obtained under various concentrations of glycerol solution and freezing rates

Cryoprotectant concentration C (V/V), %	Freezing rate ($B \pm m$), °C/s	Probability of crystal formation ($P_{cr} \pm m$), %
0	0.1 ± 0.01	95.8 ± 5.2
20	27 ± 0.89	84.3 ± 3.9
40	30 ± 1.21	0

Accordance of the quantitative data [2], obtained under low freezing rates and low cryoprotectant concentrations with the mentioned above results, allowed to conclude the acceptability of the proposed method for the evaluation of crystal formation probability when freezing under low rates. The results, obtained under high cryoprotectant concentrations and freezing rates, showed the values, similar to the data for probability of crystal formation evaluation basing on qualitative methods [3, 4].

The possibility of quantitative results obtaining within a wide range of freezing rates (from 0.1 to $2 \cdot 10^3$ °C/min) and cryoprotectant concentrations (0–50%) should be added to the advantages of the proposed method. Initiation of crystal growth with measuring electrodes, impossibility of the usage of proposed method at super-high freezing rates

Матеріал, захищений авторським правом

Величины вероятности кристаллообразования, полученные при разных концентрациях раствора глицерина и скоростях замораживания

Концентрация криопротектора C (V/V), %	Скорость замораживания ($B \pm m$), °C/с	Вероятность кристаллообразования ($P_{кр} \pm m$), %
0	0,1 ± 0,01	95,8 ± 5,2
20	27 ± 0,89	84,3 ± 3,9
40	30 ± 1,21	0

определения вероятности кристаллообразования, реализованным на основе использования качественных методов [3, 4].

К достоинствам предлагаемого метода следует отнести возможность получения количественных результатов в широком диапазоне скоростей замораживания (от 0,1 до $2 \cdot 10^3$ °C/мин) и концентраций криопротектора (0–50%). Недостатками в сравнении с качественными методами определения вероятности кристаллообразования [1] являются: инициация роста кристаллов измерительными электродами, невозможность использования предложенного метода при сверхвысоких скоростях замораживания ($B > 2 \cdot 10^3$ °C/мин), низкая чувствительность при оттаивании.

Полагаем, что комплексное использование качественных и количественных методов даст возможность получить количественные данные кристаллообразования среды в широком диапазоне скоростей теплообмена (0,1–$24 \cdot 10^3$ °C/мин). Считаем, что это позволит использовать предложенное устройство с целью оптимизации технологии замораживания в широком диапазоне скоростей охлаждения установлением величин предельно допустимых вероятностей кристаллообразования, обеспечивающих высокий уровень сохранности биообъекта.

Таким образом, предложенный термокондуктометрический метод позволяет определять величину вероятности кристаллообразования среды при замораживании в широком диапазоне скоростей охлаждения (0–30 °C/с) и концентраций криопротектора (0–50%).

Применив разработанный метод, определили вероятности кристаллообразования растворов глицерина с концентрациями 0; 20 и 40% [V/V], приготовленных на PBS и охлажденных при скоростях замораживания 0,1; 27 и 30 °C/с. Вероятности кристаллообразования составили 95,8; 84,3; 0% соответственно для каждой вышеуказанной концентрации.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Безуглый Н. Д., Горбунов Л. В., Морозова И. А.* Определение критической зоны кристаллообразования раствора глицерина в широком диапазоне скоростей замораживания-оттаивания // Пробл. криобиологии.– 2000.– № 3.– С. 32–36.
2. *Осташко Ф. И., Вишневский В. Й., Бугров А. Д.* Удельное сопротивление разбавителей спермы быков при замораживании. // Молочно-мясное скотоводство. Вып. 20.– Киев: Урожай, 1970.– С.
3. *Bronshteyn V. L., Stepontcus P. L.* Low-temperature conductivity measurements of ion mobility in glass-forming aqueous solutions of cryoprotective agents // Cryobiology.– 1990.– 27, № 6.– P. 655.
4. *Massip A., Van der Zwaimen P., Ectors F.* Recent progress in cryopreservation of cattle embryos // Theriogenology.– 1987.– 27.– P. 69–79.

Поступила 23.11.2000

(*B* > $2 \cdot 10^3$ °C/min), low sensitivity under thawing are the disadvantages when comparing to qualitative methods for evaluation of crystal formation probability [1].

We suppose, that a complex usage of qualitative and quantitative methods will give the possibility to obtain quantitative data of the medium crystal formation within a wide spectrum of heat exchange rates (0.1–$24 \cdot 10^3$ °C/min). We consider, that this fact will allow to use the proposed device with the aim of optimization of freezing technology in a wide spectrum of cooling rates by establishing the values of maximally admissible probabilities of crystal formation, providing a high level of the bioobject integrity.

Thus, the proposed thermoconductivity method allowed to determine the probability value of a medium crystal formation when freezing within a wide spectrum of freezing rates (0–30 °C/s) and cryoprotectant concentrations (0–50%).

The probability of crystal formation in glycerol solution with 0, 20 and 40% concentrations [V/V], prepared on the base of PBS and cooled under various freezing rates (0,1; 27 and 30 °C/s) were evaluated during application of the elaborated method. Probabilities of crystal formation made 95,8; 84,3; 0%, correspondingly, for each of the mentioned above concentrations.

REFERENCES

1. *Bezugly N. D., Gorbunov L. V., Morozova I. A.* Determination of a critical zone of glycerol solution crystal formation in a wide range of freeze-thawing rates // Problems of Cryobiology.– 2000.– № 3.– P. 32–36.
2. *Ostashko F. I., Vishnevsky V. J., Bugrov A. D.* Specific resistance of bovine sperm dilute agents under freezing // Meat and Milk Cattle Breeding. Issue 20.– Kiev: Urozhaj, 1970.– P.
3. *Bronshtein V. L., Steponkus P. L.* Low temperature conductivity measurements of ion mobility in glass-forming aqueous solutions of cryoprotective agents // Cryobiology.– 1990.– 27, № 6.– P. 655.
4. *Massip A., Van der Zwaimen P., Ectors F.* Recent progress in cryopreservation of cattle embryos // Theriogenology.– 1987.– 27.– P. 69–79.

Accepted in 23.11.2000

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 577.352.3: 612.111: 57.043

UDC 577.352.3: 612.111: 57.043

Теоретическое определение размеров микрокапилляров, используемых для исследования деформируемости эритроцитов

Л. И. ПОПИВНЕНКО, А. Ф. ТОДРИН

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Theoretical Determination of Microcapillary Sizes Used for Investigating Erythrocyte Deformability

L. I. POPIVNENKO, A. F. TODRIN

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

Теоретически определены размеры микрокапилляров, при продавливании через которые эритроциты деформируются путем сдвига в плоскости мембраны или изотропного натяжения мембраны, с учетом нормального распределения клеток по размерам. При исследовании модуля сдвига необходимо использовать капилляры с радиусами от 2,96 до 1,85 мкм и длиной цилиндрической части $L \geq 8{,}1$ мкм. При радиусах микрокапилляра от 1,85 до 1,658 мкм и $L \geq 9{,}5$ мкм эритроциты будут подвержены изотропному натяжению, однако при этом часть клеток разрушается. Минимальный радиус цилиндрического микрокапилляра, через который проходят все клетки без повреждения, $r_c = 1{,}75$ мкм, а при $r_c = 1{,}56$ мкм погибает 100% клеток.

Теоретично визначено розміри мікрокапілярів, при продавлюванні крізь які еритроцити деформуються шляхом зсуву в площині мембрани або ізотропного натягу мембрани, з урахуванням нормального розподілу клітин за розмірами. При дослідженні модуля зсуву необхідно використовувати капіляри з радіусами від 2,96 до 1,85 мкм і довжиною циліндричної частини $L \geq 8{,}1$ мкм. При радіусах мікрокапілярів від 1,85 до 1,658 мкм і $L \geq 9{,}5$ мкм еритроцити будуть підлягати ізотропному натягу, однак при цьому частина клітин руйнується. Мінімальний радіус циліндричного мікрокапіляра, крізь який проходять усі клітини без пошкодження, $r_c = 1{,}75$ мкм, а при $r_c = 1{,}56$ мкм загине 100% клітин.

The sizes of microcapillaries pushing through which the erythrocytes are deformed by shear stress in membrane plane or by membrane isotopic tension have been theoretically determined taking into account the cell normal distribution in their sizes. When investigating shear modulus it is necessary to use the capillaries with the radius in the range from 2.96 to 1.85 μm and with the length of cylindrical part about $L \geq 8.1$ μm. At a microcapillary radius from 1.85 to 1.658 μm and $L \geq 9.5$ μm erythrocytes will be subjected to an isotropic tension, but under these conditions the part of cells is injured. The minimum radius of cylindrical microcapillary through which all cells pass without injury is $r_c = 1.75$ μm, and at $r_c = 1.56$ μm 100% of cells are injured.

Форма и строение эритроцитов обеспечивают возможность перемещения клеток по микрокапиллярам кровеносной системы, размер которых меньше или порядка диаметра эритроцитов, без повреждения. Снижение способности мембран эритроцитов деформироваться в микрокапиллярах кровеносной системы препятствует выполнению их основной функции — доставке кислорода в периферийные части организма. Поэтому изучение деформируемости мембран эритроцитов важно как для теоретической биофизики, так и для прикладной медицины.

С точки зрения криобиологии важным является вопрос о влиянии длительности хранения и способов консервирования донорской крови на деформируемость эритроцитов. В [6] отмечается снижение деформируемости эритроцитов донорской крови с течением времени хранения. Снижение деформируемости эритроцитов и повышение эффективной вязкости суспензии этих клеток наблюдались также в криоконсервированной крови. Предполагается, что на деформируемость эритроцитов оказывают влияние сахароза и сульфаниламиды, которые входят в состав криозащитной среды [5].

Полное или частичное втягивание клетки в микрокапилляр, диаметр которого меньше размера клетки, является самым распространенным и точным методом определения модулей сдвига и изотропного натяжения клеточных мембран, которые характери-

Erythrocyte shape and structure provide the possibility of cell moving without injury through blood system microcapillaries, which size is less or about erythrocyte diameter. A decrease in erythrocyte membrane capability to be deformed in blood system microcapillaries prevents from the realization of their main function — oxygen delivery into an organism' peripheral parts. Therefore the study of erythrocyte membrane deformability it is important both for theoretical biophysics and applied medicine.

From cryobiological point of view the question about the effect of storage duration and donor blood preservation ways on erythrocyte deformability is very important. A decrease in the deformability of donor's blood erythrocytes with the course of storage time is noted in the paper [6]. The reduction of erythrocyte deformability and the increase in an effective viscosity of these cells suspension were also observed in a cryopreserved blood. One supposes that sucrose and sulphanyl amides, composing a cryoprotective medium [5], affect erythrocyte deformability.

A complete or partial cell drawing into a microcapillary, which diameter is less than a cell size, is the most frequent and accurate method for determining shear modulus and isotopic tension of cellular membranes, which characterize cell deformability [2]. The selection of the capillary size influences on a cellular membrane deformation type to be subjected.

Матеріал, захищений авторським правом

зуют деформируемость клеток [2]. От выбора размеров микрокапилляра зависит, какому типу деформации будет подвержена клеточная мембрана.

При сравнительно больших радиусах микрокапилляров втягиваемые в них эритроциты деформируются путем сдвига в плоскости мембраны или изгибания без увеличения площади ее поверхности. По мере уменьшения радиуса микрокапилляра неизбежно возникает изотропное натяжение, при котором увеличивается площадь поверхности мембраны эритроцита и может наступить разрыв мембраны.

Необходимо отметить, что при определении модулей сдвига и изотропного натяжения мембраны эритроцита большое значение имеют не только радиус микрокапилляра, но и его длина. Это связано с тем, что существующие математические модели учитывают форму, которую принимает клетка при прохождении через капилляр. В достаточно длинном цилиндрическом капилляре клетка примет форму цилиндра, торцы которого будут иметь либо форму выпуклых полусфер при исследовании изотропного натяжения (когда мембрана клетки напряжена), либо выпуклой и вогнутой полусфер при исследовании модуля сдвига [3]. Если же длина капилляра меньше какого-то определенного размера для данного радиуса, то возможна ситуация, при которой часть клетки еще не войдет в микрокапилляр, а часть уже выйдет из него. В этом случае клетка будет иметь гантелеобразную форму, радиусы сферических поверхностей которой изменяются по мере продвижения клетки.

В связи с тем, что эритроциты даже в норме не имеют строго определенных геометрических размеров, при прохождении через микрокапилляр с заданными размерами (диаметр и длина) какая-то часть клеток может испытывать изотропное натяжение или разрушаться, хотя более мелкие клетки при этом не повреждаются, а деформируются.

Поскольку экспериментально сложно разделить клетки по размерам, важно определить размеры капилляра, при которых мембраны эритроцитов деформируются путем сдвига или изотропного натяжения. Учитывая, что площадь поверхности мембраны эритроцита может быть увеличена не более, чем на 4%, после чего наступает разрыв мембраны [2], необходимо определить количество погибших эритроцитов, которое зависит от размеров микрокапилляра, через который они продавливаются, и от распределения клеток по размерам.

В [1] принималось, что при подходе к капилляру эритроцит имеет "парашютообразную" форму, получаемую путем зеркального выпучивания части сферической поверхности относительно плоскости, перпендикулярной оси капилляра. При этом деформация сдвига наступает, если радиус капилляра будет меньше, чем радиус R_0 эритроцита, который определяется из уравнения:

$$R_0 = \frac{1}{2}\sqrt{S_0/\pi}\,, \qquad (1)$$

где S_0 — исходное значение площади поверхности эритроцита.

Изотропное натяжение наступает тогда, когда мембрана клетки становится напряженной. При этом площадь поверхности мембраны начинает увеличиваться. Если мембрана испытывает изотропное натяжение, эритроцит при прохождении

At a quite big microcapillary radiuses the erythrocytes being drawn into them are deformed by the shear stress in membrane plane or bending without increase in its surface plane. With the reduction of microcapillary radius an isotopic tension inevitably occurs, where there is an increase in the plane of erythrocyte membrane surface and the membrane rupture can occur.

It should be noted, that when determining the shear modulus and isotropic tension of erythrocyte membrane both microcapillary radius and its length have a great importance. This is related to the fact, that the existing mathematical models consider the shape, acquired by a cell when passing through a capillary. In a quite long cylindrical capillary cell acquires the shape of cylinder, which faces will have the shape of convex hemisphere at the investigation of isotropic tension (when cell membrane is stressed, or convex and concave hemispheres when investigating shear modulus. [3]. If the capillary length is less than any certain size of the given radius, the situation, when a part of cell will not yet enter into a microcapillary, but a part will already leave it, can occur. In this case the cell will have a fillet-like shape, which spherical surface radiuses will change as a cell moving towards.

Due to the fact, that erythrocytes even in the norm have not a strictly determined geometrical sizes, when passing through a microcapillary with the given sizes (diameter and length) some part of cells can undergo an isotropic tension or be destroyed, although thereat the smaller cells are not injured, but deformed.

Since it is difficult to experimentally divide the cells by sizes, it s important to determine the capillary sizes, under which erythrocyte membranes are deformed by shear or isotropic tension. Taking into consideration the fact, that the surface plane of erythrocyte membrane can be augmented not more, than by 4%, after that the membrane break occurs [2], we should determine the number of died erythrocytes, which depends on microcapillary sizes, through which they are pushed, and on cell distribution by the sizes. It was acquired [1], that when approaching to a capillary the erythrocyte has a "parachute-like" shape, obtained by a glass bulging of a part of a spherical surface in respect of the plane, perpendicular to a capillary axis. Thereat the shear deformation occurs if capillary radius is less than those, determined from the equation:

$$R_0 = \frac{1}{2}\sqrt{S_0/\pi}\,, \qquad (1)$$

where S_0 — an initial value of surface plane.

An isotropic tension occurs when cell membrane becomes stressed. Thereat the plane of membrane surface begins to increase. If a membrane is subjected to an isotropic tension, an erythrocyte when passing through a capillary will gain the shape, which is described by the equation system, used for determining the surface plane and cell volume:

$$\begin{cases} BS_0 = 4\pi r_c^2 + 2\pi r_c L \\ V_0 = \dfrac{4\pi}{3} r_c^3 + \pi r_c^2 L\,, \end{cases} \qquad (2)$$

where r_c — capillary radius; L — length of cell cylindrical part, drawn into a capillary (one considers, that the length L is simultaneously a minimum capillary

Матеріал, захищений авторським правом

через капилляр примет форму, которая описывается системой уравнений, используемой для определения площади поверхности и объема клетки:

$$\begin{cases} BS_0 = 4\pi r_c^2 + 2\pi r_c L \\ V_0 = \dfrac{4\pi}{3} r_c^3 + \pi r_c^2 L\,, \end{cases} \qquad (2)$$

где r_c – радиус капилляра; L – длина цилиндрической части клетки, втянутой в капилляр (считается, что длина L одновременно является минимальной длиной капилляра); коэффициент B равен 1 до начала изотропного растяжения мембраны и 1,04 в момент ее разрыва.

Необходимо учесть, что размеры нормальных эритроцитов не одинаковы. Объемы клеток и площади поверхности их мембран в крови человека удовлетворяют нормальному распределению. Средние значения величин объема $V_0 = 97{,}91 \pm 16{,}16$ мкм^3, площади поверхности эритроцитов и их среднеквадратичные отклонения $S_0 = 129{,}95 \pm 15{,}86$ мкм^2 [7]. Для проведения расчетов принималось, что большему значению объема эритроцита из данного распределения соответствует большее значение площади поверхности его мембраны. При таком распределении эритроцитов по размерам стандартная функция нормальной плотности вероятностей имеет вид [4]:

$$f(Z) = \frac{e^{-Z^2/2}}{\sqrt{2\pi}}\,, \qquad (3)$$

где $Z = (X - \mu)/\sigma$; X – конкретное значение измеренной величины, μ – среднеарифметическое значение измеренной величины по всей генеральной совокупности, σ – среднеквадратичное отклонение.

Площадь под графиком этой функции показывает общее относительное количество измеренных величин (например, объемов эритроцитов) и в пределах от $-\infty$ до $+\infty$ равна 1. В интервале $\mu \pm 3\sigma$, т.е. $Z = \pm 3$, большая часть площади находится под нормальной кривой ($A = 0{,}997$) [4]. Для определения площади под кривой нормального распределения интегрируем уравнение (3) в пределах от $-Z$ до $+Z$ и получаем

$$A = \mathrm{erf}\,(Z/\sqrt{2}\,)\,. \qquad (4)$$

На рис. 1 приведены результаты расчетов радиуса микрокапилляра в зависимости от объема эритроцита. Если эритроциты проходят через капилляр, радиус которого находится в зоне между кривыми *1* и *2* (при соответствующей длине микрокапилляра), то их мембрана подвергается только сдвиговым напряжениям. Кривая *2* служит границей перехода от сдвигового напряжения к изотропному, а кривая *3* – границей максимального растяжения мембраны, при переходе через которую клетка гибнет.

На рис. 2 представлена зависимость минимальной длины микрокапилляра от его радиуса для двух предельных размеров эритроцитов. Излом в верхней части обеих кривых указывает на переход к растяжению мембраны эритроцита.

Таким образом, для исследования усредненного модуля сдвига мембран эритроцитов, находящихся в конкретном объеме суспензии, необходимо использовать капилляры с радиусами r_c от 1,85 до 2,96 мкм при длине цилиндрической части капил-

length), coefficient B is equal to 1 before the beginning of a membrane isotropic tension and 1.04 in the moment of its break.

It should be taken into account, that the sizes of normal erythrocytes are not equal. Cell volumes and the surface planes of their membranes in human blood satisfy the normal distribution. The average means of the values of erythrocyte volume, surface plane and their root-mean-square deviations are equal to $V_0 = 97.91 \pm 16.16$ μm^3, $S_0 = 129.95 \pm 15.86$ μm^2 [7]. In order to perform the calculation one assumed, that to the greater value of erythrocyte volume from the given distribution corresponded the greater value of surface plane of its membrane. At such erythrocyte distribution by sizes a standard function of normal probabilities density is as follows [4]:

$$f(Z) = \frac{e^{-Z^2/2}}{\sqrt{2\pi}}\,, \qquad (3)$$

where $Z = (X - \mu)/\sigma$; X – a certain mean of measured parameter; μ – an average mean (arithmetic mean) of measured parameter according to all general population; σ – a root-mean-square deviation.

The plane under this function graph demonstrates the total relative quantity of measured values (for example, erythrocyte volumes) and within the limits from $-\infty$ to $+\infty$ is equal to 1. Within the range of $\mu \pm 3\sigma$, i.e. $Z = \pm 3$, the major part of the plane is under normal curve ($A = 0.997$) [4]. In order to determine the plane under the normal distribution curve we integrate the equation (3) within the limits from $-Z$ to $+Z$ and we obtained

$$A = \mathrm{erf}\,(Z/\sqrt{2}\,)\,. \qquad (4)$$

In the Fig. 1 there are the results of calculations of a microcapillary radius depending on erythrocyte volume. If erythrocytes pass through a capillary, which radius is located in the zone between the curves *1* and *2* (at a corresponding microcapillary length), their membrane is subjected only to shear tensions. The curve *2* serves as a transition boundary from a shear tension to an isotropic one, but the curve *3* is a boundary of a maximum membrane tension, when passing through it the cell death occurs.

The Fig. 2 demonstrates the dependency of a minimum microcapillary length on its radius for two limit erythrocyte sizes. The break in an upper part of both

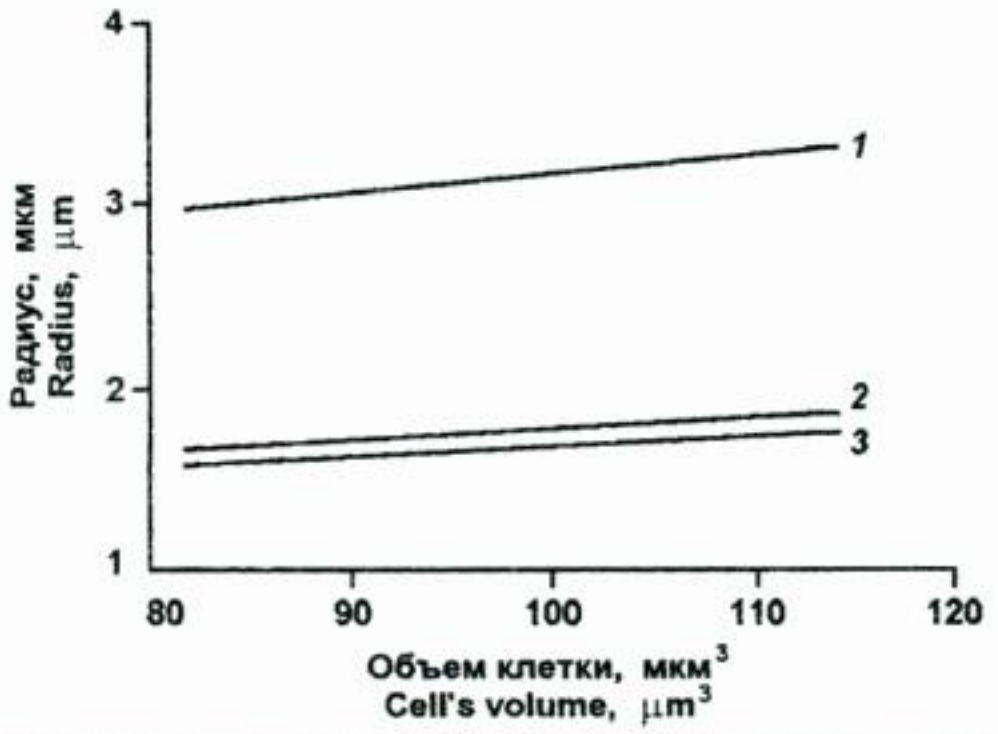


Рис. 1. Зависимость радиуса микрокапилляра от объема эритроцита.

Fig. 1. Dependence of microcapillary's radius on erythrocyte's volume.

Матеріал, захищений авторським правом

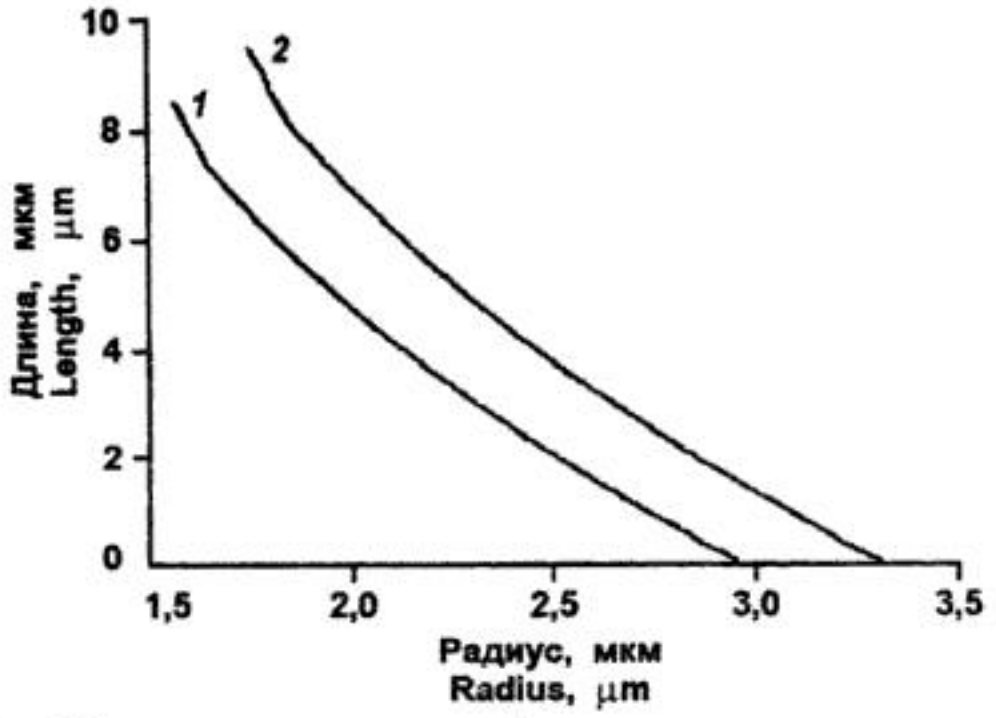


Рис. 2. Зависимость минимальной длины микрокапилляра от его радиуса для двух предельных размеров эритроцита: *1* — $V_0 = 82{,}75$ мкм^3; $S_0 = 114{,}09$ мкм^2; *2* — $V_0 = 114{,}07$ мкм^3; $S_0 = 145{,}81$ мкм^2.

Fig. 2. Dependence of minimum length of microcapillary on its radius for two limit sizes of erythrocyte: *1* — $V_0 = 82.75$ μm^3; $S_0 = 114.09$ μm^2; *2* — $V_0 = 114.07$ μm^3; $S_0 = 145.81$ μm^2.

ляра не меньше 8,1 мкм. В этом случае все клетки независимо от размеров будут испытывать только сдвиговое напряжение.

При радиусах микрокапилляра от 1,75 до 1,85 мкм и длине не менее 9,5 мкм наиболее крупные эритроциты подвергаются изотропному натяжению, в то время как более мелкие клетки (≈ 40%) еще будут деформироваться путем сдвига. Наиболее мелкие эритроциты будут подвергаться изотропному натяжению при радиусе микрокапилляра 1,658 мкм и длине не менее 7,6 мкм. Однако в этом случае более крупные клетки уже будут разрушены.

Исходя из нормального распределения эритроцитов по размерам, определено относительное количество клеток, которые разрушаются при продавливании через микрокапилляр в зависимости от его радиуса (рис. 3). Расчет показывает, что минимальный радиус микрокапилляра, через который проходят все клетки без повреждения, $r_c = 1{,}75$ мкм, а при $r_c = 1{,}56$ мкм могут погибнуть 100% клеток.

Полученные результаты позволяют подобрать длину и диаметр микрокапилляров, используемых для исследования модулей упругости мембран эритроцитов, учитывая размеры клеток.

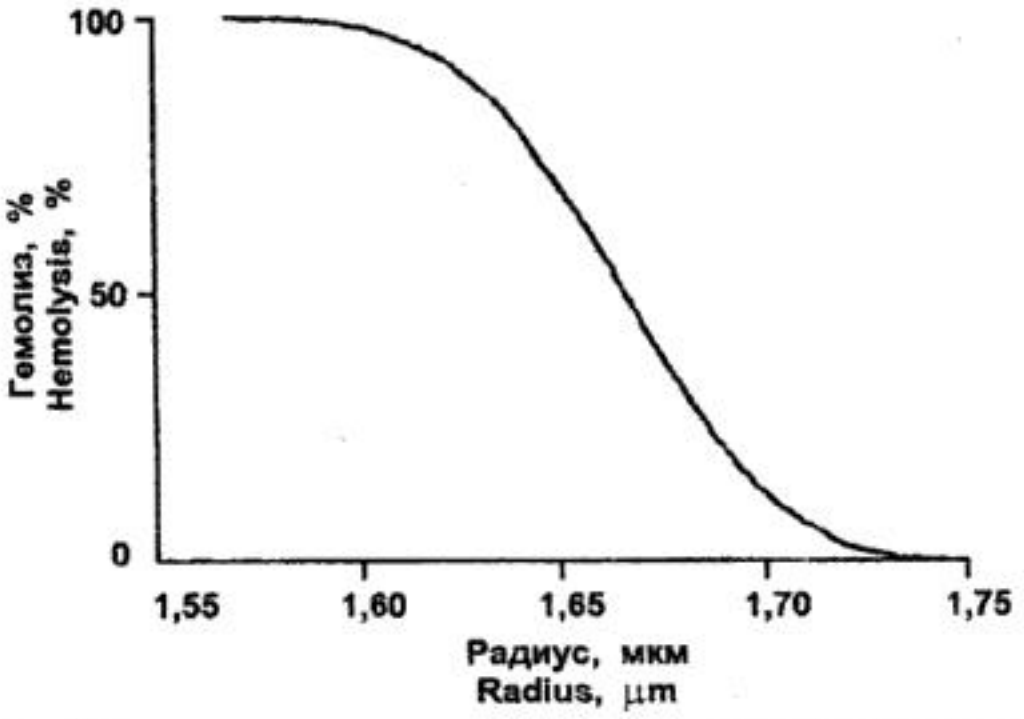


Рис. 3. Зависимость относительного гемолиза эритроцитов от радиуса микроканилляра.

Fig. 3. Dependence of erythrocytes' relative hemolysis on microcapillary's radius.

curves points to the transition to the tension of erythrocyte membrane.

Thus in order to investigate an averaged shear modulus of erythrocyte membranes, being in a certain suspension volume, we should use the capillaries with the radius r_c from 1.85 to 2.96 μm at the length of a capillary cylindrical part not less than 8.1 μm. In this case all cells irrespective of the sizes will suffer the shear tension only.

At a microcapillary radiuses from 1.75 to 1.85 μm and the length not less than 9.5 μm the largest erythrocytes are subjected to an isotropic tension, meanwhile the smaller cells (≈ 40%) will be still deformed by the shear. The smallest erythrocytes will subjected to an isotropic tension at a microcapillary radius 1.658 μm and the length not less than 7.6 μm. However, in this case the largest cells will be already destroyed.

Proceeding from a normal erythrocyte distribution by sizes a relative cell number, which is destroyed when pushing through a microcapillary depending on its radius (Fig. 3), was determined. The calculation demonstrates that a minimum microcapillary radius, through which all cell pass without injury, is $r_c = 1.75$ μm, but at $r_c = 1.56$ μ 100% of cells can die.

The results obtained allow selecting the microcapillary length and diameter, used for the study of erythrocyte membrane elasticity modulus, taking into account cell sizes.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Гардаш Л. И., Гордиенко Е. А.* Изменение формы эритроцитов человека при продавливании через цилиндрический микрокапилляр // Біофіз. вісник.– 1999.– Вип. 3 (1).– С. 88–91.
2. *Ивенс И., Скейлак Р.* Механика и термодинамика биологических мембран.– М.: Мир, 1983.– 304 с.
3. *Каро К., Педли Т., Шротер Р.* Механика кровообращения.– М.: Мир, 1981.– 624 с.
4. *Мельник М.* Основы прикладной статистики.– М.: Энергоатомиздат, 1983.– 416 с.
5. *Фирсов Н. Н., Синицын А. А., Лаврентьев В. В.* Реологические особенности крови и эритроцитарных суспензий // Пробл. гематологии и переливания крови.– 1975.– № 9.– С. 32–34.
6. *Card R. T., Mahandas N., Perkins H. A., Shohet S. B.* Deformability of stored red blood cell. Relationship to degree of packing // Transfusion.– 1982.– 22, № 2.– P. 96–101.
7. *Fung Y. C., Winston C. O., Tsang W. C. O., Patitucci P.* Highresolution data on the geometry of red blood cells // Biorheology.– 1981.– 18.– P. 369–385.

Поступила 06.02.2001

REFERENCES

1. *Gardash L. I., Gordienko E. A.* Change in human erythrocyte shape when pushing through a cylindrical microcapillary // Biofiz. Visnyk.– 1999.– Issue 3 (1).– P. 88–91.
2. *Ivens I., Skeulak R.* Mechanics and thermodynamics of biological membranes.– M.: Mir, 1983.– 304 p.
3. *Karo K., Pedli T., Shroter R.* Mechanics of blood circulation.– M.: Mir, 1981.– 624 p.
4. *Mel'nik M.* Bases of applied statistics.– M.: Energoatomizdat, 1983.– 416 p.
5. *Firsov N. N., Sinitsin A. A., Lavrent'ev V. V.* Rheological peculiarities of blood and erythrocyte suspensions // Problemy gematologii i perelivaniya krovi.– 1975.– № 9.– P. 32–34.
6. *Card R. T., Mahandas N., Perkins H. A., Shohet S. B.* Deformability of stored red blood cell. Relationship to degree of packing // Transfusion.– 1982.– 22, № 2.– P. 96–101.
7. *Fung Y. C., Winston C. O., Tsang W. C. O., Patitucci P.* High-resolution data on the geometry of red blood cells // Biorheology.– 1981.– 18.– P. 369–385.

Accepted in 06.02.2001

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 615.361.014.41: 611.013.11

UDC 615.361.014.41: 611.013.11

Влияние метода выделения подвижной фракции гамет из эякулята человека на их морфофункциональную сохранность после криоконсервирования

Г. Г. ЮРЧЕНКО, А. В. ДУНАЕВСКАЯ, М. И. КРАМАР

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of isolation method for motile fraction of gametes from human ejaculate on their morphofunctional integrity after cryopreservation

G. G. YURCHENKO, A. V. DUNAEVSKAYA, M. I. KRAMAR

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

Изучена эффективность выделения из эякулята подвижной фракции спермиев методами swim-up и фильтрации через стекловолокно для криоконсервирования при нормо- и олигоастеноспермии. Показано, что двухэтапная фильтрация через стекловолокно увеличивает концентрацию подвижных спермиев, количество гамет с конденсированным хроматином и нормальными морфологическими показателями.

Вивчена ефективність виділення з еякуляту рухливої фракції сперміїв методами swim-up і фільтрації крізь скловолокно для кріоконсервування при нормо- і олігоастеноспермії. Показано, що двоетапна фільтрація крізь скловолокно збільшує концентрацію рухливих сперміїв, кількість гамет з конденсованим хроматином і нормальними морфологічними показниками.

The efficiency of isolation of motile fraction spermatozoa from ejaculate by swim-up methods and filtration through glass fibre for cryopreservation at normo- and asthenospermia was studied. It was demonstrated that two-stage filtration through glass fibre increased the concentration of motile spermatozoa, number of gametes with condensed chromatin and normal morphology.

Бесплодие в браке — проблема, занимающая особое место в медицине, что объясняется зависимостью ее от состояния здоровья обоих супругов, а также от социальных факторов. Олигоспермия, астеноспермия и олигоастеноспермия — наиболее частые проявления относительного бесплодия у мужчин. В этих случаях для решения вопроса репродукции супружеской пары применяют внутриматочную инсеминацию жены и оплодотворение *in vitro*. При этом необходимо выделить поступательно подвижные спермии с нормальными морфологическими показателями из плазмы, в которой также содержатся неподвижные гаметы, спермии с морфологическими нарушениями, лейкоциты и бактерии.

Ряд преимуществ дает применение во вспомогательных репродуктивных технологиях криоконсервированных спермиев. В то же время криоконсервирование и отмывание гамет от криозащитной среды приводят к снижению подвижности спермиев [4]. Было показано [7], что удаление лейкоцитов из эякулята перед криоконсервированием положительно влияет на восстановление жизнеспособности и функциональную активность спермиев после отогрева.

Особый интерес представляют исследования в области криоконсервирования спермы при олигоастеноспермии. Патологическая сперма, как правило, плохо переносит этот процесс. Результаты криокон-

Infertility in marriages is the problem taking a leading place in medicine, that is explained by its dependence on the health state of both spouses as well as social factors. Oligospermia, asthenospermia and oligoasthenospermia are the most frequent manifestations of relative infertility in males. Intrauterine insemination of wife and in vitro fertilisation are applied in these cases to solve this question of married couple reproduction. In this situation it is necessary to isolate progressively moving spermatozoa with normal morphology from plasm, which also comprises immotile gametes, spermatozoa with morphological impairments, leukocytes and bacteria.

Some advantages are given by the application of auxiliary reproductive technologies of cryopreserved spermatozoa. At the same time cryopreservation and washing-out of gametes from cryoprotective medium result in a decrease in spermatozoa motility [4]. It has been shown [7], that removal of leukocytes out of ejaculate before cryopreservation positively affects the recovery of viability and functional activity of spermatozoa after thawing.

The investigations in the field of sperm cryopreservation at oligoasthenospermia are of special interest. Pathological sperm as a rule badly survive this process. The cryopreservation results for human sperm significantly depend on initial concentration of cells in the sample being frozen. It has been demonstrated [3], that the concentrating of spermatozoa before

Матеріал, захищений авторським правом

сервирования спермы человека существенно зависят от исходной концентрации клеток в замораживаемой пробе. Показано [3], что концентрирование спермиев перед замораживанием может увеличивать вероятность наступления беременности. Так как криоконсервирование, особенно при выделении подвижной фракции методом swim-up, приводит к существенной потере подвижных спермиев, необходимо искать более эффективный метод получения подвижной фракции из криоконсервированной суспензии спермиев при нормо- и патоспермии.

Цель наших исследований — определение эффективности выделения подвижной фракции спермиев из эякулятов с нормо- и олигоастеноспермией методами swim-up и фильтрации через стекловолокно для использования в технологии криоконсервирования.

Материалом исследования были эякуляты доноров и мужчин из бесплодных супружеских пар. Сперму получали на 3–5-й день сексуальной абстиненции. После разжижения эякулята проводили его оценку в соответствии с рекомендациями ВОЗ (1992 г.) [8]. Определяли объем эякулята, концентрацию спермиев, количество подвижных спермиев в эякуляте и клеток с поступательной подвижностью, количество спермиев с нормальной морфологией, содержание жизнеспособных клеток и гамет с конденсированным хроматином (табл. 1).

Концентрацию и подвижность гамет изучали в камере Makler (Израиль). За общую подвижность принимали сумму быстрых, медленно подвижных и местнокачающихся спермиев, за активную — содержание быстрых и медленных спермиев. Жизнеспособность гамет изучали с помощью суправитальной окраски эозин-нигрозином. Состояние нуклеарного хроматина спермиев определяли методом, описанным Tejada и др. [6], в нашей модификации. Все параметры спермиев изучали в нативных образцах, после криоконсервирования и выделения их подвижной фракции.

Подвижную фракцию выделяли методами swim-up [2] и фильтрации через стекловолокно [5].

freezing can increase the probability of pregnancy onset. Since cryopreservation leads to a considerable loss of motile spermatozoa especially when isolating motile fraction by means of swim-up method, it is necessary to search for more effective method of obtaining motile fraction from cryopreserved suspension of spermatozoa at normo- and pathospermia.

The aim of our studies was to determine the efficiency of isolation of motile fraction of spermatozoa from ejaculates with normo- and oligoasthenospermia by means of swim-up methods and filtration through glass fibre for usage in cryopreservation technology.

Ejaculates of donors and men from infertile married couples were the material for investigation. Sperm was obtained to the 3rd-5th day of sexual abstinence. After ejaculate dilution it was assessed according to the WHO recommendations (1992) [8]. The ejaculate volume, spermatozoa concentration, amount of motile spermatozoa in ejaculate and cells with progressive motility, number of spermatozoa with normal morphology, content of viable cells and gametes with condensed chromatin were determined (Table 1).

Concentration and motility of gametes were studied in Makler chamber (Israel). Total motility was regarded as the sum of rapid, slowly motile and locally swinging spermatozoa, active motility was considered as the content of rapid and slow spermatozoa. Viability of gametes was studied using supravital staining by eosin-nigrosin. The state of nuclear chromatin was determined by the method described by Tejada et al. [6] in our modification. All the parameters of spermatozoa were studied in native samples after cryopreservation and after their motile fraction isolation.

Motile fraction was isolated by the "swim-up" methods [2] and filtration through glass fibre [5]. Each sample was divided into 6 parts and placed into vials. In the first part the characteristics of native ejaculate were investigated. The second part was cryopreserved without isolation of progressively motile fraction and used as the control. In the third the motile fraction was isolated by means of swim-up method before cryopreservation. In the fourth the mo-

Таблица 1

Характеристики нативных эякулятов с нормо- и олигоастеноспермией

Table 1

Characteristics of native ejaculates with normo- and oligoasthenospermia

Характеристика эякулятов Characteristics of ejaculates	Объем эякулята, мл Ejaculate volume, ml	Концентрация, млн/мл Concentration, mln/ml	Подвижность, % Motility, %	Жизнеспособность, % Viability, %	Спермии с нормальной морфологией, % Spermatozoa with normal morphology, %	Спермии с конденсированным хроматином, % Spermatozoa with condensed chromatin, %
Нормоспермия Normospermia	3,3 ± 0,6	83,4 ± 12,6	67,9 ± 11,9	85,6 ± 8,1	54,6 ± 6,7	71,7 ± 7,7
Олигоастеноспермия Oligoasthenospermia	2,6 ± 1,2	14,2 ± 6,4*	25,7 ± 14,4**	72,8 ± 9,4	42,8 ± 9,3	45,1 ± 10,6**

Примечания. * — различие достоверно по сравнению с нормоспермией, $p < 0,01$; ** — различие достоверно по сравнению с нормоспермией, $p < 0,05$.

Notes: * — statistically true difference in comparison with normospermia, $p < 0.01$; ** — statistically true difference in comparison with normospermia, $p < 0.05$.

Матеріал, захищений авторським правом

Каждый образец делили на 6 частей и помещали в пробирки. В одной части изучали характеристики нативного эякулята. Вторую часть криоконсервировали без выделения поступательно подвижной фракции и использовали в качестве контроля. В третьей – подвижную фракцию спермиев выделяли методом swim-up перед криоконсервированием. В четвертой – подвижную фракцию гамет выделяли после криоконсервирования методом swim-up. В пятой – до замораживания спермии центрифугировали при 2 000 об/мин в течение 10 мин. Для увеличения концентрации клеток надосадочную жидкость аспирировали пипеткой и осадок ресуспендировали в среде, объем которой зависел от начальной концентрации спермиев. Фильтрацию через стекловолокно выполняли после криоконсервирования. Этот метод был назван нами двухэтапной фильтрацией. В шестой – центрифугирование и фильтрацию спермиев через стекловолокно проводили после криоконсервирования.

Для криоконсервирования к образцам добавляли криозащитную среду, в состав которой входили глюкоза, натрий лимоннокислый, яичный желток и глицерин в конечной концентрации 4%. Соотношение криоконсерванта и суспензии спермиев было 1:3. Образцы замораживали прямым погружением упаковок в жидкий азот, что обеспечило скорость охлаждения около 2 500 °С/мин. Скорость охлаждения определяли с помощью термопары в идентичной упаковке, содержащей среду замораживания. Для размораживания контейнеры с образцами помещали в водяную баню при 40 °С.

В одной группе эякулятов ($n = 20$) параметры спермиев соответствовали нормоспермии. В другой группе ($n = 32$) концентрация спермиев, подвижность, количество спермиев с конденсированным хроматином были достоверно ниже ($p < 0{,}05$), чем в первой группе и соответствовали олигоастеноспермии [8].

Показатели сохранности спермиев после криоконсервирования образцов с нормоспермией приведены в табл. 2. В контрольных образцах все рассмотренные характеристики гамет снизились по сравнению с исходными, но они находились в пределах нормоспермии. После отогрева образцов, в которых подвижную фракцию выделяли методом swim-up перед криоконсервированием, по сравнению с контролем достоверно увеличилось только количество спермиев с нормальной морфологией ($p < 0{,}05$). По показателям подвижности, жизнеспособности, содержания поступательно подвижных гамет и спермиев с конденсированным хроматином не было обнаружено статистически достоверных различий по сравнению с контролем ($p > 0{,}05$). Эти результаты согласуются с данными Esteves и др. [1], которые показали, что обработка спермиев методом swim-up перед криоконсервированием существенно не улучшает жизнеспособность гамет после отогрева. Как видно из данных

tile fraction of gametes was isolated after cryopreservation by means of swim-up method. In the fifth before freezing the spermatozoa were centrifuged at 2 000 rot/min within 10 min. To increase the concentration of cells the supernatant liquid was aspirated by pipette and the precipitate was re-suspended in the medium, the volume of which depended on initial concentration of spermatozoa. This method was called by us as two-stage filtration. In the sixth the centrifugation and filtration of spermatozoa through glass fibre were conducted after cryopreservation.

For cryopreservation cryoprotective medium, containing glucose, sodium citrate, egg yolk and glycerol in a final concentration of 4%, was added to the samples. The ratio of cryopreservative and spermatozoa suspension made 1:3. The samples were frozen by a direct plunging of packages into liquid nitrogen, that provided a cooling rate about 2500 °C/min. Cooling rate was determined by means of thermocouple in identical package, containing freezing medium. For thawing the containers with samples were placed in water bath at 40 °C.

In one group of ejaculates ($n = 20$) the parameters of spermatozoa corresponded to normospermia. In another group ($n = 32$) spermatozoa concentration, mobility, number of spermatozoa with condensed chromatin were statistically lower ($p < 0.05$) than in the first group and corresponded to oligoasthenospermia [8].

The indices of spermatozoa integrity after cryopreservation of samples with normospermia are presented in Table 2. In the control samples all considered characteristics of gametes reduced in comparison with initial ones but they were within the limits of normospermia. After thawing of samples, in which a motile fraction was isolated by swim-up method before cryopreservation in comparison with the control only the number of spermatozoa with normal morphology increased ($p < 0.05$). On the indices of motility, viability, content of progressively motile gametes and spermatozoa with condensed chromatin there were no statistically true differences in comparison with the control ($p > 0.05$). These results are in the accordance with the data by Esteves et al [1], who showed that the treatment of spermatozoa by swim-up method before cryopreservation significantly improved the viability of gametes after thawing. As the tables show the isolation of motile fraction of spermatozoa by swim-up method before cryopreservation does not affect considerably the integrity of spermatozoa in the process of freeze-thawing.

Application of swim-up and filtration methods through glass fibre after cryopreservation (Table 2) as well as two-stage method the motility and viability of spermatozoa, number of gametes with condensed chromatin and spermatozoa without morphological impairments were statistically higher in comparison with corresponding indices of the control ($p < 0.05$). Concentration of progressively moving spermatozoa statis-

Матеріал, захищений авторським правом

Таблица 2 **Table 2**

Эффективность выделения подвижной фракции спермиев из образцов с нормоспермией в процессе криоконсервирования

Efficiency of isolation of motile fraction from the samples with normospermia in the process of cryopreservation

Параметры спермиев Spermatozoa parameters	Контроль Control	Swim-up до криоконсервирования Swim-up before cryopreservation	Swim-up после криоконсервирования Swim-up after cryopreservation	Двухэтапный метод Two-stage method	Фильтрация после криоконсервирования Filtration after cryopreservation
Подвижность, % Motility, %	51,9 ± 5,4	62,4 ± 5,8**	83,7 ± 4,8*	87,1 ± 4,5*	84,7 ± 8,1*
Концентрация поступательно подвижных спермиев, млн/мл Concentration of progressively moving spermatozoa, mln/ml	16,8 ± 7,1	27,4 ± 5,2**	18,7 ± 4,7**	42,5 ± 4,6*	28,2 ± 5,1**
Жизнеспособность, % Viability, %	68,5 ± 5,2	70,4 ± 8,1**	93,4 ± 4,1*	91,6 ± 5,8*	89,5 ± 6,2*
Спермии с конденсированным хроматином, % Spermatozoa with condensed chromatin, %	62,4 ± 6,2	60,3 ± 7,4**	81,6 ± 7,1*	84,7 ± 6,9*	82,4 ± 5,1*
Спермии с нормальной морфологией, % Spermatozoa with normal morphology, %	31,7 ± 4,9	54,7 ± 8,3*,**	63,2 ± 4,7*,**	78,3 ± 5,1*	65,4 ± 4,2*

Примечания. * — различие достоверно по сравнению с контролем, $p < 0,05$; ** — различие достоверно по сравнению с аналогичным показателем при двухэтапном методе, $p < 0,05$.

Notes: * — statistically true difference in comparison with the control, $p < 0.05$; ** — statistically true difference in comparison with analogous index when using two-stage method, $p < 0.05$.

таблиц, выделение подвижной фракции спермиев методом swim-up перед криоконсервированием не оказывает существенного влияния на сохранность спермиев в процессе замораживания-отогрева.

При применении методов swim-up и фильтрации через стекловолокно после криоконсервирования (табл. 2), а также двухэтапного метода подвижность и жизнеспособность спермиев, количество гамет с конденсированным хроматином и спермиев без морфологических нарушений были выше по сравнению с соответствующими показателями контроля ($p < 0,05$). Концентрация поступательно подвижных спермиев достоверно увеличилась по сравнению с контролем только при двухэтапной фильтрации через стекловолокно.

При применении методов swim-up и фильтрации через стекловолокно после криоконсервирования низкая концентрация поступательно подвижных спермиев, вероятно, обусловлена негативным влиянием центрифугирования на спермии, перенесшим воздействие факторов криоконсервирования.

При двухэтапном методе (табл. 2) морфологическая сохранность спермиев была выше, чем при применении swim-up как до, так и после криоконсервирования.

Увеличение процентного содержания спермиев с конденсированным хроматином в результате отбора клеток двухэтапной фильтрацией контрастирует с показателем, наблюдаемым в образцах, отобранных методом swim-up с последующим криоконсервированием. Это, возможно, обусловлено рядом стрессов, которые испытывают спермии в процессе криоконсервирования, что также лежит в основе снижения подвижности и увеличения количества атипичных форм спермиев.

tically increased in comparison with the control only at two-stage filtration through glass fibre.

When applying the swim-up and filtration methods through glass fibre after cryopreservation low concentration of progressively moving spermatozoa is probably stipulated by negative effect of centrifugation on spermatozoa survived the effect of cryopreservation factors.

At two-stage method (Table 2) morphological integrity of spermatozoa were higher than when swim-up method is applied both before and after cryopreservation.

An increase of percentage of the spermatozoa with condensed chromatin in the result of selection of cells by two-stage filtration is in contrast with the index observed in the samples selected with swim-up method with following cryopreservation. This, probably, is stipulated by some stresses which affect the spermatozoa in the process of cryopreservation, that also is i the base of the reduction of motility and increase in the number of atypical forms of spermatozoa.

Results of investigations (Table 3) show that after thawing of the control samples with oligoasthenospermia a significant decrease of indices of the integrity of spermatozoa in comparison with existing indices of the control under normospermia was found.

When cryopreserving the samples of spermatozoa isolated from ejaculates at pathospermia the integrity of gametes significantly depends on the concentration and motility of spermatozoa before freezing. In the samples with low concentration of spermatozoa the effect of low temperatures resulted in inhibition of

Матеріал, захищений авторським правом

Таблица 3 **Table 3**

Эффективность выделения подвижной фракции спермиев из образцов с олигоспермией в процессе криоконсервирования

Efficiency of isolation of motile fraction from the samples with oligospermia in the process of cryopreservation

Параметры спермиев Spermatozoa parameters	Контроль Control	Swim-up до криоконсервирования Swim-up before cryopreservation	Swim-up после криоконсервирования Swim-up after cryopreservation	Двухэтапный метод Two-stage method	Фильтрация после криоконсервирования Filtration after cryopreservation
Подвижность, % Motility, %	12,3 ± 8,1	56,2 ± 11,3*,**	84,8 ± 4,7*	81,7 ± 5,8*	74,9 ± 6,4*
Концентрация поступательно подвижных спермиев, млн/мл Concentration of progressively moving spermatozoa, mln/ml	3,6 ± 1,5	20,4 ± 6,1*	8,3 ± 4,5**	26,7 ± 5,4*	5,4 ± 3,5**
Жизнеспособность, % Viability, %	35,1 ± 11,7	53,1 ± 7,3**	87,4 ± 5,3*	79,2 ± 6,3*	78,4 ± 6,7*
Спермии с конденсированным хроматином, % Spermatozoa with condensed chromatin, %	23,7 ± 9,4	51,6 ± 6,8*,**	47,3 ± 5,9*,**	68,3 ± 5,1*	54,1 ± 5,8*
Спермии с нормальной морфологией, % Spermatozoa with normal morphology, %	23,3 ± 5,2	24,5 ± 4,6**	27,8 ± 4,1**	51,6 ± 5,3*	46,7 ± 5,9*

Примечания. * — различие достоверно по сравнению с контролем, $p < 0,05$; ** — различие достоверно по сравнению с аналогичным показателем при двухэтапном методе, $p < 0,05$.

Notes: * — statistically true difference in comparison with the control, $p < 0.05$; ** — statistically true difference in comparison with analogous index when using two-stage method, $p < 0.05$.

Результаты исследований (табл. 3) показывают, что после отогрева контрольных образцов с олигоастеноспермией было обнаружено существенное снижение показателей сохранности спермиев по сравнению с соответствующими показателями контроля при нормоспермии.

При криоконсервировании образцов спермиев, выделенных из эякулятов при патоспермии, сохранность гамет существенно зависит от концентрации и подвижности спермиев до замораживания. В образцах с низкой концентрацией спермиев действие низких температур привело к ингибированию кинетической функции гамет, увеличению количества спермиев с деконденсированным хроматином и с нарушенной морфологией. Очевидно, наличие при олигоастеноспермии патологических изменений спермиев на молекулярном и субклеточном уровнях обусловливает высокую чувствительность половых клеток к замораживанию.

После отогрева образцов с высокими исходными показателями жизнеспособности, морфологической целостности и кинетики спермиев эти показатели были выше, чем в образцах с более низкими исходными морфофункциональными характеристиками, хотя потеря подвижности в индивидуальных образцах была довольно высокая.

В группе образцов клеток подвижной фракции, предварительно концентрированных и отобранных методом swim-up, после криоконсервирования концентрация поступательно подвижных спермиев была выше, чем в аналогичных контрольных образцах. Однако не было обнаружено существенных различий в количестве спермиев с нормальной морфологией.

При двухэтапном методе по сравнению с контролем отмечались значительное увеличение количества спермиев с нормальной морфологией и

kinetic function of gametes, increase in the amount of spermatozoa with decondensed chromatin and with impaired morphology. Obviously the presence of pathological changes of spermatozoa at molecular and subcellular levels at oligoasthenospermia stipulates a high sensitivity of sexual cells to freezing.

After thawing of samples with high initial indices of viability, morphological integrity and kinetics of spermatozoa these parameters were higher than in samples with lower initial and morphofunctional characteristics, although the loss of motility in individual samples was quite a high.

In the group of samples of motile fraction preliminarily concentrated and selected by means of swim-up method after cryopreservation the concentration of progressively motile spermatozoa was higher than in analogous control samples. However no significant differences in the amount of spermatozoa with normal morphology were found.

At two-stage method in comparison with the control a considerable increase was noted in the number of spermatozoa with normal morphology and condensed chromatin, as well as concentration of progressively motile cells.

Obtained data testify that to increase the efficiency of cryopreservation of human male sexual cells both at pathospermia and normospermia it is expedient to isolate a motile fraction from sperm after freezing by filtration method through glass fibre.

We have developed the method of two-stage filtration through glass fibre, at which centrifugation of ejaculate is carried out before cryopreservation and

Матеріал, захищений авторським правом

конденсированным хроматином, а также концентрации поступательно подвижных клеток.

Полученные данные свидетельствуют о том, что для повышения эффективности криоконсервирования мужских половых клеток человека как при патоспермии, так и нормоспермии целесообразно выделять из спермы подвижную фракцию гамет после замораживания методом фильтрации через стекловолокно.

Нами был разработан метод двухэтапной фильтрации через стекловолокно, при котором центрифугирование эякулята проводится до криоконсервирования, а фильтрование — после отогрева. Это позволяет исключить негативное влияние центрифугирования на гаметы, перенесшие воздействие факторов криоконсервирования. При двухэтапной фильтрации через стекловолокно концентрация поступательно подвижных спермиев в выделенной популяции гамет, количество среди них клеток с конденсированным хроматином и нормальной морфологией выше, чем при использовании методов swim-up (как до, так и после криоконсервирования) и фильтрации после криоконсервирования.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в процессе криоконсервирования репродуктивных клеток мужчин с олиго-, астено- и олигоастеноспермией происходит значительное снижение морфофункциональных показателей гамет. Вероятно, криоконсервирование потенцирует проявление дефектов, имеющихся у спермиев. Как показали исследования, двухэтапная фильтрация через стекловолокно, являясь щадящим методом селекции клеток не только при нормо-, но и при патоспермии, позволяет выделить из спермы суспензию гамет с высокими показателями биологической сохранности и применять их для лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Esteves S. C., Sharma R. K., Thomas A. J. Jr, Agarwal A.* Suitability of the hypo-osmotic swelling test for assessing the viability of cryopreserved sperm // Fertil. Steril.– 1996.– 66.– P. 798–804.
2. *Lopata A., Patullo M. J., Chang A.* A method for collecting motile spermatozoa from human semen // Fertil. Steril.– 1976.– 27.– P. 677–684.
3. *Maier D. B., Kuslis S. S., Luciano A. A.* Pregnancy rates in a donor sperm program using cryopreservation: effects of total number of motile sperm inseminated and of a procedure to concentrate sperm // Int. J. Fertil. Menopausal. Stud.– 1994.– 39.– P. 145–149.
4. *Sharma R. K., Vemulapalli S., Kohn S., Agarwal A.* Effect of centrifuge speed, refrigeration medium, and sperm washing medium on cryopreserved sperm quality after thawing // Arch. Androl.– 1997.– 39.– P. 33–38.
5. *Sterzik R., Santo M. D., Uhlich S.* Glass wool filtration leads to a higher percentage of spermatozoa with intact acrosomes: an ultrastructural analysis // Hum. Reprod.– 1998.– 13.– P. 2506–2511.
6. *Tejada R. I., Mitchell J. C., Norman A., Marik J. J.* A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence // Fertil. Steril.– 1984.– 42.– P. 87–91.
7. *Wang A. W., Zhang H., Ikemoto I. et al.* Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation // Urology.– 1997.– 49.– P. 921–925.
8. *World* Health Organization. Laboratory manual for examination of human semen and semen-cervical mucus interaction.– Cambridge: Cambridge University press, 1992.– 81 p.

Поступила 03.10.2000

filtration is done after thawing. This allows to exclude negative effect of centrifugation on gametes survived the effect of cryopreservation factors. At two-stage filtration through glass fibre the concentration of progressively motile spermatozoa in isolated population of gametes, number among them of cells with condensed chromatin and normal morphology is higher than when using swim-up method (both before and after cryopreservation) and filtration after cryopreservation.

Obtained data testify to the fact that in cryopreservation process of reproductive cells of men with oligo-, astheno- and oligoasthenospermia there are significant reduction of morphofunctional indices of gametes. Probably, cryopreservation reveals the manifestation of defects, spermatozoa have. As our investigations showed two-stage filtration through glass fibre being a mild method of cell selection not only at normo-, but also at pathospermia permits to isolate from sperm the suspension of gametes with high indices of biological integrity and apply them for treatment of infertility by means of auxiliary reproductive technologies.

REFERENCES

1. *Esteves S. C., Sharma R. K., Thomas A. J. Jr, Agarwal A.* Suitability of the hypo-osmotic swelling test for assessing the viability of cryopreserved sperm // Fertil. Steril.– 1996.– 66.– P. 798–804.
2. *Lopata A., Patullo M. J., Chang A.* A method for collecting motile spermatozoa from human semen // Fertil. Steril.– 1976.– 27.– P. 677–684.
3. *Maier D. B., Kuslis S. S., Luciano A. A.* Pregnancy rates in a donor sperm program using cryopreservation: effects of total number of motile sperm inseminated and of a procedure to concentrate sperm // Int. J. Fertil. Menopausal. Stud.– 1994.– 39.– P. 145–149.
4. *Sharma R. K., Vemulapalli S., Kohn S., Agarwal A.* Effect of centrifuge speed, refrigeration medium, and sperm washing medium on cryopreserved sperm quality after thawing // Arch. Androl.– 1997.– 39.– P. 33–38.
5. *Sterzik R., Santo M. D., Uhlich S.* Glass wool filtration leads to a higher percentage of spermatozoa with intact acrosomes: an ultrastructural analysis // Hum. Reprod.– 1998.– 13.– P. 2506–2511.
6. *Tejada R. I., Mitchell J. C., Norman A., Marik J. J.* A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence // Fertil. Steril.– 1984.– 42.– P. 87–91.
7. *Wang A. W., Zhang H., Ikemoto I. et al.* Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation // Urology.– 1997.– 49.– P. 921–925.
8. *World* Health Organization. Laboratory manual for examination of human semen and semen-cervical mucus interaction.– Cambridge: Cambridge University press, 1992.– 81 p.

Accepted in 03.10.2000.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 616.557.15.04+612.354

UDC 616.557.15.04+612.354

Особенности метаболизма биогенных аминов и циклических нуклеотидов под влиянием полиолов

В. Н. ЗОВСКИЙ

Харьковский государственный медицинский университет

Metabolism Peculiarities of Biogenic Amines and Cyclic Nucleotides under the Effect of Polyols

V. N. ZOVSKY

Kharkov State Medical University

Проведены исследования влияния полиолов на уровень дофамина, адреналина, норадреналина, диоксифенилаланина (ДОФА), триптофана, серотонина, цАМФ и цГМФ. Исследования показали разную направленность действия соединений на адренергическую, дофаминергическую и серотонинергическую системы. Испытуемые соединения изменяли содержание цАМФ и цГМФ в органах и тканях. Снижение концентрации цАМФ в органах сопровождалось повышением ее содержания в плазме. Результаты экспериментов позволяют сделать вывод о структурно-метаболическом нарушении медиаторной регуляции клеточных единиц под влиянием простых полиолов и их блок-сополимеров. Обнаруженные сдвиги в нейромедиаторном механизме клеточной регуляции метаболизма способны привести к развитию дистрофических и деструктивных изменений внутриклеточных структур под влиянием исследуемых веществ.

Проведено дослідження впливу поліолів на рівень дофаміну, адреналіну, норадреналіну, діоксифенілаланіну(ДОФА), триптофану, серотоніну, цАМФ і цГМФ. Дослідження показали різну спрямованість дії речовин на адренергічну, дофамінергічну і серотонінергічну системи. Випробувані сполуки змінювали вміст цАМФ і цГМФ в органах і тканинах. Зниження концентрації цАМФ в органах супроводжувалося підвищенням її вмісту в плазмі. Результати експериментів дозволяють зробити висновок про структурно-метаболічне порушення медіаторної регуляції клітинних одиниць під впливом простих поліолів та їхніх блок-сополімерів. Виявлені порушення в нейромедіаторному механізмі клітинної регуляції метаболізму здатні привести до розвитку дистрофічних і деструктивних змін внутрішньоклітинних структур під впливом досліджуваних речовин.

The investigations of polyols influence on dopamine, epinephrine, norepinephrine, dioxiphenylalanine (DOPA), tryptophan, serotonin, cAMP and cGMP levels were performed. The investigations showed different tendency of compounds on adren-ergic, dophaminergic and serotoninergic system. The investigated compounds changed cAMP and cGMP contents in organs and tissues. The decrease in cAMP concentration in organs was accompanied by the increase in cAMP plasma content. The experiment results allow to conclude the presence of structurally metabolic disturbance of transmitter regulation of cellular units affected by aliphatic polyols and their polymers. The discovered alterations of neurotransmitter mechanism of cellular regulation of metabolism are capable of resulting in dystrophic and destructural changes of intracellular structures under the effect of the studied substances.

Одной из актуальных проблем современной криобиологии и криомедицины является изучение действия различных криоконсервантов на течение физиологических и биохимических процессов в органах, тканях и организме в целом, в частности, веществ органического синтеза полиолы. Эти вещества широко используются в различных отраслях фармацевтической промышленности, медицине, биологии, агрохимии. Представители данного класса соединений ПЭГ-4003, ПЭГ-5003 и ПЭГ-6003 применяются как криоконсерванты крови, эритроцитов, роговицы, хрусталика, стекловидного тела, костного мозга.

В научной литературе практически отсутствуют сведения о влиянии данных веществ на структурно-метаболические процессы, на гомеостаз организма в целом. Известно, что важнейшее свойство живого организма — способность поддерживать гомеостаз. Ряд физико-химических свойств внутренней среды организма должны сохраняться в пределах очень небольших колебаний, так как выход за эти пределы приводит к нарушениям структуры молекул, надмолекулярных образований мембран,

Investigation of the effect of various cryopreservatives, in particular of polyols, which are the substances of organic synthesis, during physiological and biochemical processes in organs, tissues and whole organism, is one of actual problems of current cryobiology and cryomedicine. These substances are widely applied in different branches of pharmaceutical industry, medicine, biology, agrarian chemistry. Representatives of the given class of compounds, such as PEG-4003, PEG-5003 and PEG-6003 are applied as cryopreservatives for blood, red blood cells, cornea, crystalline lens, hyaloid membrane, bone marrow.

The data about the effect of given substances on structural and metabolic processes, homeostasis of a whole organism are absent in scientific literature. It is known, that capability to maintain homeostasis is the most important characteristic of alive organism. The series of physical and chemical properties of internal medium in an organism should to be preserved within the limits of quite insignificant deviations, because breaking coming-out of these limits causes disorders of the molecule structure, overmolecular formations in

Матеріал, захищений авторським правом

к изменению метаболизма и в конечном итоге к нарушению гомеостаза.

Большое значение в поддержании гомеостаза имеют нейротрансмиттеры (цАМФ и цГМФ). Известна тесная взаимосвязь обмена цАМФ с биогенными аминами (норадреналином, адреналином, дофамином, серотонином, ГАМК), глутаминовой кислотой, а также с фосфорилированием [2]. Большой интерес представляет изучение активности нейромедиаторов и вторичных мессенджеров при действии на организм простых полиолов для обоснования механизма их биологического влияния, выяснения изменений энергетического обеспечения приспособительных процессов. Оценка показателей системы биогенных аминов позволяет понять патогенез развивающихся клинических проявлений интоксикации.

Нами изучены некоторые стороны метаболизма биогенных аминов и их предшественников в условиях подострого эксперимента на белых крысах в дозе 1/100 $ДЛ_{50}$ при воздействии простых полиэфиров, а также активность внутриклеточного нейромедиатора цАМФ. Исследовалось содержание адреналина, норадреналина, ДОФА, дофамина, триптофана, серотонина в печени и головном мозге. Реакция организма на изменение моноаминов под влиянием испытуемых соединений была неоднозначной. Так, Л-202, Л-2102 снижали в головном мозге содержание дофамина, адреналина и норадреналина, но не влияли на ДОФА. В печени эти соединения снижали содержание всех аминов (табл. 1). Л-503 и Л-1601-Р повышали уровень соответственно ДОФА и норадреналина в головном мозге. В печени Л-1601-Р снижал содержание ДОФА, дофамина и адреналина, Л-503 — только уровень адреналина. Простые полиэфиры не оказывали влияния на уровень на-

membranes, metabolism changes and as a result homeostasis impairment.

Neurotransmitters (cAMP and cGMP) are very important for homeostasis maintenance. A tight relationship of the cAMP exchange with biogenic amines (noreadrenaline, adrenaline, dophamine, serotonin, aminobuturic acid), glutamine acid, as well as phosphorylation [2] is known. Activity investigation of neuromediators and secondary messengers during the effect of common polyols on an organism is of a great interest for substantiation of the mechanism of their biological effect, elucidation of the changes of the energy providing for adaptation processes. Estimation of the indices of the system of biogenic amines allowed to understand pathogenesis of developing clinical manifestations of intoxication.

We investigated some metabolism aspects of biogenic amines and their precursors under the conditions of subacute experiment in white rats in 1/100 DL_{50} dose under the effect of common polyethers, as well as activity of cAMP intracellular neuromediator. Adrenalin, noradrenalin, DOPA, dophamin, tryptophan, serotonin contents in liver and brain were investigated. Organism response to the change of monoamines under the effect of the compounds under study was not uniform. So, L-202, L-2102 decreased dophamine, adrenaline and noradrenaline content in brain, however did not affect DOPA. In liver these compounds reduced the content of all amines (Table 1). L-503 and L-1601-P increased, correspondingly, the level of DOPA and noradrenaline in brain. In liver L-1601-P reduced the content of DOPA, dophamine and adrenaline; L-503 decreased just adrenaline level. Common polyethers did not affect the level of thyrosin accumulation in liver, which is the precursor of DOPA, dophamine, noradrenaline and

Таблица 1

Влияние простых полиэфиров на биогенные моноамины в подостром опыте

Показатели	Контроль	Л-503 (1/100 $ДЛ_{50}$)	Л-1601-Р (1/10 $ДЛ_{50}$)	Л-202 (1/1000 $ДЛ_{50}$)	Л-2102 (1/1000 $ДЛ_{50}$)
Мозг					
ДОФА	2,02 ± 0,12	2,72 ± 0,12*	1,84 ± 0,28	1,83 ± 0,16	1,70 ± 0,20
Дофамин	3,45 ± 0,54	2,91 ± 0,93	4,06 ± 0,53	1,41 ± 0,25*	1,56 ± 0,31*
Норадреналин	0,77 ± 0,22	1,13 ± 0,45	2,61 ± 0,67*	0,28 ± 0,04*	0,32 ± 0,05*
Адреналин	0,110 ± 0,002	0,120 ± 0,009	0,12 ± 0,07	0,068 ± 0,001*	0,050 ± 0,001*
Печень					
ДОФА	4,01 ± 0,31	3,56 ± 0,47	3,40 ± 0,11*	2,42 ± 0,12*	2,36 ± 0,15*
Дофамин	1,76 ± 0,19	2,09 ± 0,14	1,08 ± 0,26*	1,58 ± 0,14*	1,26 ± 0,23*
Норадреналин	0,81 ± 0,10	0,81 ± 0,22	0,76 ± 0,25	0,55 ± 0,11*	0,48 ± 0,12*
Адреналин	0,15 ± 0,02	0,090 ± 0,015*	0,08 ± 0,02*	0,08 ± 0,02*	0,081 ± 0,015*

Примечание: * — различия с контролем статистически достоверны ($P < 0,05$).

Table 1

The effect of common polyethers on biogenic monoamines in subacute experiment

Indices	Control	L-503 (1/100 DL_{50})	L-1601-P (1/10 DL_{50})	L-202 (1/1000 DL_{50})	L-2102 (1/1000 DL_{50})
Brain					
DOPA	2.02 ± 0.12	2.72 ± 0.12*	1.84 ± 0.28	1.83 ± 0.16	1.70 ± 0.20
Dophamine	3.45 ± 0.54	2.91 ± 0.93	4.06 ± 0.53	1.41 ± 0.25*	1.56 ± 0.31*
Noradrenaline	0.77 ± 0.22	1.13 ± 0.45	2.61 ± 0.67*	0.28 ± 0.04*	0.32 ± 0.05*
Adrenaline	0.110 ± 0.002	0.120 ± 0.009	0.12 ± 0.07	0.068 ± 0.001*	0.050 ± 0.001*
Liver					
DOPA	4.01 ± 0.31	3.56 ± 0.47	3.40 ± 0.11*	2.42 ± 0.12*	2.36 ± 0.15*
Dophamine	1.76 ± 0.19	2.09 ± 0.14	1.08 ± 0.26*	1.58 ± 0.14*	1.26 ± 0.23*
Noradrenaline	0.81 ± 0.10	0.81 ± 0.22	0.76 ± 0.25	0.55 ± 0.11*	0.48 ± 0.12*
Adrenaline	0.15 ± 0.02	0.090 ± 0.015*	0.08 ± 0.02*	0.08 ± 0.02*	0.081 ± 0.015*

Notes: * — statistically significant differences in comparison with the control ($P < 0.05$).

Матеріал, захищений авторським правом

копления в печени и головном мозге тирозина, который является предшественником ДОФА, дофамина, норадреналина и адреналина. Не изменялось его содержание и в плазме крови. Л-1601-Р и Л-503 не влияли на накопление триптофана в головном мозге, но снижали его содержание в печени (табл. 2). Серотонин они повышали как в печени, так и в головном мозге. Л-202, Л-2102 увеличивали уровень триптофана и снижали серотонина в печени и головном мозге. Результаты исследований показывают разную направленность действия соединений на адренергическую, дофаминергическую и серотонинергическую системы.

В предыдущих исследованиях [3] нами отмечены большие изменения со стороны включения $^{45}Ca^{2+}$ в синаптосомы мембран, активности аденилатциклазы и состояния α_1^-, α_2^-, β-, C_1^-, C_2^-, $Д_2$ и глюкокортикоидных рецепторов. Установлено, что уровень этих показателей находится в тесной связи не только с биогенными моноаминами, но и с цАМФ, который участвует в процессах синаптической передачи [6]. Выделившийся в результате секреции нейромедиатор взаимодействует с соответствующим рецептором, активируя связанную с ним аденилатциклазу, что приводит к возрастанию цАМФ в постсинаптической области [1]. При этом активируются фосфорилирование и дефосфорилирование различных белков. Баланс активности аденилатциклазы, ионов Ca^{2+}, нейромедиаторов служит механизмом регуляции уровня цАМФ. Начальным этапом формирования физиологической реакции на клеточном, тканевом и организменном уровнях является возбуждение рецепторной молекулы при взаимодействии с нейромедиатором или гормоном [4]. Под действием нейромедиаторов происходит конформационная перестройка рецепторов [10]. Наиболее распространенными путями нейромедиаторного контроля над внутриклеточными процессами следует считать сопряжение работы соответствующих

adrenaline. Its content in blood plasm also did not change.

L-1601 and L-503 did not affect tryptophane accumulation in brain, but decreased its content in liver (Table 2). These substances increased serotonin level both in liver and brain. L-202 and L-2101 increased tryptophane level and decreased serotonin content in liver and brain. Results of the investigation demonstrated various trends of the of compounds effect on adrenergic, dophaminergic and serotoninergic systems.

Table 2

Serotonin and tryptophane content in white rats under the effect of common polyethers (μg/g of tissue)

Indices	Control	L-503 (1/100 DL_{50})	L-1601 (1/100 DL_{50})	L-202 (1/1000 DL_{50})	L-2102 (1/1000 DL_{50})
Brain					
Tryptophane	5.95 ± 0.89	5.68 ± 0.91	5.44 ± 0.72	15.26 ± 3.06*	14.20 ± 2.41*
Serotonin	2.68 ± 0.70	5.85 ± 0.55*	5.28 ± 0.65*	1.09 ± 0.23*	1.20 ± 0.14*
Liver					
Tryptophane	14.00 ± 2.53	8.98 ± 2.22*	7.46 ± 2.65*	23.46 ± 2.81*	26.50 ± 3.17*
Serotonin	3.03 ± 0.76	8.99 ± 1.46*	7.24 ± 1.53*	1.20 ± 0.45*	1.13 ± 0.27*

Notes: * — statistically significant differences in comparison with the control ($P < 0.05$).

Таблица 2

Содержание серотонина и триптофана у белых крыс под влиянием простых полиэфиров (мкг/г ткани)

Показатели	Контроль	Л-503 (1/100 $ДЛ_{50}$)	Л-1601 (1/100 $ДЛ_{50}$)	Л-202 (1/1000 $ДЛ_{50}$)	Л-2102 (1/1000 $ДЛ_{50}$)
Мозг					
Триптофан	5,95 ± 0,89	5,68 ± 0,91	5,44 ± 0,72	15,26 ± 3,06*	14,20 ± 2,41*
Серотонин	2,68 ± 0,70	5,85 ± 0,55*	5,28 ± 0,65*	1,09 ± 0,23*	1,20 ± 0,14*
Печень					
Триптофан	14,00 ± 2,53	8,98 ± 2,22*	7,46 ± 2,65*	23,46 ± 2,81*	26,50 ± 3,17*
Серотонин	3,03 ± 0,76	8,99 ± 1,46*	7,24 ± 1,53*	1,20 ± 0,45*	1,13 ± 0,27*

Примечание: * — различия с контролем статистически достоверны ($P < 0,05$).

In the previous investigations [3] we noted significant changes from the side of $^{45}Ca^{2+}$ inclusion into synaptosomes of membranes, adenylate cyclase activity and the state of α_1^-, α_2^-, β-, C_1^-, C_2^-, D_2 and glucocorticoid receptors. It was established, that the level of these synthesis is in a tight bond not only with biogenic monoamines, but also with cAMP, participating in the processes of synaptic transfer [6]. Neuromediator, isolated in the result of secretion, interacted with the corresponding receptor, activating bounded with it adenylate cyclase, that resulted in the cAMP increase in postsynaptic region [1]. Thereat phosphorylation and dephosphorylation of various proteins activated. The balance in the activity of adenylate cyclase, Ca^{2+} ions, neuromediators is the mechanism for the regulation of cAMP level. Excitation of the receptor molecule during interaction with neuromediator or hormone [4] is an initial stage of the formation of physiological response on a cellular, tissue and organism levels. Under the effect of neuromediators a conformational rearrangement of receptors occurred [10]. Conjunction of the work of corresponding receptors with the mechanisms of calcium permeability and adenylate cyclase regulation should be considered as the most spread way for neuromediator control over intracellular processes [10].

Practically all cells of the organism in plasmatic membranes comprise adenylate cyclase, catalyzing the synthesis of one of cyclic nucleotides and which ac-

Матеріал, захищений авторським правом

рецепторов с механизмами кальциевой проницаемости и регуляции аденилатциклазы [10].

Практически все клетки организма содержат в составе плазматических мембран аденилатциклазу, катализирующую синтез одного из циклических нуклеотидов и активность которой контролируется рецепторным аппаратом клеточных структур [8]. Возбуждение мембранных рецепторов приводит к изменению содержания в клетке так называемых "вторичных передатчиков". Ведущими клеточными медиаторами являются циклические нуклеотиды (цАМФ и цГМФ). Любой гормон или нейротрансмиттер воздействует на клетку через систему циклических нуклеотидов — универсальных регуляторов метаболизма, пролиферации и дифференцировки клеток. Внутриклеточные концентрации цАМФ и цГМФ претерпевают противоположно направленное изменение в ответ на один и тот же стимул. Внеклеточный сигнал может быть переведен на язык внутриклеточных процессов изменением внутриклеточного цАМФ и модуляцией цАМФ-зависимых протеинкиназ. Подобный механизм может регулировать содержание внутриклеточного цГМФ и активность цГМФ-зависимых протеинкиназ. Внутриклеточные медиаторы оперативно реагируют в ответ на повышение требований, заключающихся в необходимости более интенсивного функционирования органов, систем или всего организма. Когда функция организма стремится к своему пределу, циклические нуклеотиды выступают как звено мобилизации внутренних ресурсов — звено перестройки на новый более высокий уровень функционирования [5].

Повышение уровня цАМФ — наиболее ранний признак стрессовой ситуации в клетке, поэтому чрезмерная активация системы циклических нуклеотидов нередко ведет к развитию патологических реакций.

Постулирована роль цАМФ как медиатора действия адреналина и норадреналина [7, 9]. Речь идет о том, что амины, как и белковые гормоны, оказывают свой эффект через изменение содержания цАМФ в чувствительной клетке. При снижении синтеза цАМФ роль внутриклеточного сигнала может выполнять эквивалентное увеличение образования цГМФ.

Учитывая обнаруженное нами влияние простых полиэфиров на фосфолипидный слой мембран, цепь микросомального окисления, аденилатциклазу, рецепторный аппарат клеточных мембран, биоэнергетику, фосфорилирование, окислительно-восстановительные процессы, биогенные нейромедиаторы (адреналин, норадреналин, серотонин, ДОФА, дофамин, триптофан, глутамат, ГАМК), есть основания ожидать изменений в состоянии внутриклеточных медиаторов (цАМФ и цГМФ). Изучалось влияние веществ на систему циклических нуклеотидов внутренних органов при пероральном воздействии Л-503, Л-1601-Р, Л-202, Л-2102 в дозе

tivity is controlled by the receptor apparatus of cellular structures [8]. Excitation of the membrane receptors results in the change of the content in a cell of so-called "secondary transmitters". Cyclic nucleotides (cAMP and cGMP) are leading cellular mediators. Any hormone or neurotransmitter affects a cell through the system of cyclic nucleotides, which are universal regulators of metabolism, proliferation and cell differentiation. Intracellular cAMP and cGMP concentrations suffered from contrary directed change in response to the same stimulus. Extracellular signal can be translated to the language of intracellular processes by changing intracellular cAMP and modulating cAMP-dependent protein-kinases. Such a mechanism can regulate the content of intracellular cGMP and activity of cGMP-dependent protein-kinases. Intracellular mediators properly response to an increase of demands, consisting in the necessity of more intensive functioning of organs, systems or the whole organism. Cyclic nucleotides play a role of the link for internal resources mobilization, link of rearrangement on a new, higher level of functioning [5].

Increase of the cAMP level is the earliest sign of stress situation in a cell. Therefore excessive activation of the system of cyclic nucleotides often results in the development of pathological reactions.

The role of cAMP as the mediator of adrenaline and noradrenaline effect has been postulated [7, 9]. It means, that both amines and protein hormones manifested their effect through the change of cAMP content in a susceptible cell. When decreasing the cAMP synthesis, the role of intracellular signal may carry-out the same increase of the cGMP formation.

Taking into consideration the revealed by us effect of common polyethers on a phospholipid layer of membranes, the chain of microsomal oxidation, adenylate cyclase, receptor apparatus of cellular membranes, bioenergetics, phosphorylation, oxidative and recovering processes, biogenic neuromediators (adrenaline, noradrenaline, serotonin, DOPA, dophamine, tryptophane, glutamate, GAMK) the changes in the state of intracellular mediators (cAMP and cGMP) can occur. The effect of substances on the system of cyclic nucleotides of internal organs at peroral effect of L-503, L-1601-P, L-2102 in the dose of 1/100 DL_{50} was investigated. Common polyethers in the mentioned dose decreased cAMP level in liver, kidneys, spleen, these substances increased given level in the cAMP plasm and decreased cGMP. The investigations demonstrated, that the substances under study changed cAMP and cGMP contents in organs and tissues (Table 3). The decrease of cAMP concentration in organs accompanied with the increase of its content in plasm. Investigation results allowed to conclude the structural and metabolic impairment of the mediator regulation of cellular units under the effect of diols, triols and their block-co-polymers. L-202, L-2102 showed more significant effect on these processes.

Матеріал, захищений авторським правом

1/100 $ДЛ_{50}$. Простые полиэфиры в указанной дозе снижали уровень цАМФ в печени, почках, селезенке; повышали в плазме цАМФ и снижали цГМФ. Как показали исследования, испытуемые соединения изменяли содержание цАМФ и цГМФ в органах и тканях (табл. 3). Снижение концентрации цАМФ в органах сопровождалось повышением его содержания в плазме. Результаты опытов позволяют сделать вывод о структурно-метаболическом нарушении медиаторной регуляции клеточных единиц под влиянием диолов, триолов и их блок-сополимеров. Более сильное воздействие на эти процессы оказывают Л-202, Л-2102.

Таким образом, действие простых полиолов вызывает структурно-метаболические нарушения медиаторной регуляции клеточных единиц. Обнаруженные сдвиги в нейромедиаторном механизме клеточной регуляции метаболизма способны привести к развитию дистрофических и деструктивных изменений внутриклеточных структур под влиянием исследуемых веществ.

Таблица 3

Динамика содержания цАМФ и цГМФ в органах белых крыс под воздействием простых полиэфиров (доза — 1/100 $ДЛ_{50}$), нмоль/г

Органы	Контроль	Л-503	Л-1601-Р	Л-202	Л-2102
Печень	170,12 ± 12,01	78,25 ± 5,76*	106,32 ± 13,75*	84,96 ± 11,72*	110,43 ± 9,86*
Почки	210,35 ± 17,04	117,83 ± 20,14*	150,96 ± 14,23*	107,28 ± 33,54*	115,31 ± 19,73*
Селезенка	188,24 ± 14,85	153,74 ± 18,89*	161,53 ± 29,84	103,75 ± 22,96*	130,77 ± 15,92*

Примечание: * — различия с контролем статистически достоверны ($P < 0,05$).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бабийчук Г. А., Шифман М. И.* Нейрохимические процессы в центральной нервной системе.– Киев: Наук. думка, 1989.– 136 с.
2. *Бышевский А. Ш., Терсенов О. А.* Биохимия для врача.– Екатеринбург, 1994.– 383 с.
3. *Жуков В. И.* Структурно-метаболические механизмы формирования нарушений при действии на организм детергентов: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук.– Ростов н/Д, 2000.– 36 с.
4. *Кац М. М., Лаврецкая Э. Ф.* Рецепторы биогенных аминов мозга: структура, механизмы функционирования и взаимодействие с физиологически активными веществами // Итоги науки и техники. ВИНИТИ. Биоорганическая химия.– 1986.– № 8.– 226 с.
5. *Меерсон Ф. З.* Патогенез и предупреждение стрессовых и ишемических повреждений сердца.– М.: Медицина, 1984.– 52 с.
6. *Пирузян Л. А., Коваль В. И., Лаврецкая Э. Ф.* Действие физиологически активных соединений на биологические мембраны.– М.: Наука, 1974.– 375 с.
7. *Робу А. И.* Стресс и гипоталамические гормоны.– Кишинев: Штиинца, 1989.– 220 с.
8. *Сергеев П. В., Шимановский Н. Л.* Рецепторы физиологически активных веществ.– М.: Медицина, 1987.– 400 с.
9. *Юдаев Н. А., Покровский В. В., Протасов Т. Н.* Механизмы действия гормонов // Биохимия гормонов и гормональной регуляции.– М., 1976.– С. 336–373.
10. *Somlyo A. P., Somlyo A. V.* Calcium and monovalent ione in smooth muscle // Fed. Proc.– 1982.– 41.– P. 2883–2890.

Поступила 04.04.2001

Table 3

Dynamics in cAMP and cGMP content in organs of white rats under the effect of common polyethers (1/100 DL_{50} dose), nmol/g

Organs	Control	L-503	L-1601-P	L-202	L-2102
Liver	170.12 ± 12.01	78.25 ± 5.76*	106.32 ± 13.75*	84.96 ± 11.72*	110.43 ± 9.86*
Kidneys	210.35 ± 17.04	117.83 ± 20.14*	150.96 ± 14.23*	107.28 ± 33.54*	115.31 ± 19.73*
Spleen	188.24 ± 14.85	153.74 ± 18.89*	161.53 ± 29.84	103.75 ± 22.96*	130.77 ± 15.92*

Notes: * — statistically significant differences in comparison with the control ($P < 0.05$).

Thus, the effect of common polyols caused structural and metabolic violations in the mediator regulation of cellular units. The shifts, revealed in a neuromediator mechanism of the metabolism cellular regulation, are capable to cause the development of dystrophic and destructive changes of intracellular structures under the effect of studied substances.

REFERENCES

1. *Babijchuk G. A., Shifman M. I.* Neurochemical processes in central nerve system.– Kiev: Naukova dumka, 1989.– 136 p.
2. *Byshevsky A. S., Tersenov O. A.* Biochemistry for physician.– Ekaterinburg, 1994.– 383 p.
3. *Zhukov V. I.* Structural and metabolic mechanisms of the formation of impairments under the effect of detergents on an organism: Abstract of thesis obtaining for doctor of medical sciences degree.– Rostov, 2000.– 36 p.
4. *Kats M. M., Lavretskaya E. F.* Receptors of biogenic amines in brain: structure, mechanisms of functioning and interaction with physiologically active substances // VINITI. Bioorganic medicine.– 1986.– № 8.– 226 p.
5. *Meerson F. Z.* Pathogenesis and prevention of stress and ischemic damages in heart.– M.: Medicine, 1984.– 52 p.
6. *Piruzyan L. A., Koval V. I., Lavretskaya E. F.* The effect of physiologically active substances on biological membranes.– M.: Nauka, 1974.– 375 p.
7. *Robu A. I.* Stress and hypothalamus hormones.– Kishinev: Shtiintsa, 1989.– 220 p.
8. *Sergeev P. V., Shimanovsky N. L.* Receptors of physiologically active substances.– M.: Medicine, 1987.– 400 p.
9. *Yudayev N. A., Pokrovsky V. V., Protasov T. N.* The mechanisms of hormone effect // Biochemistry off hormones and hormone regulation.– M., 1976.– P. 336–373.
10. *Somlyo A. P., Somplyo A. V.* Calcium and monovalent ione in smooth muscle // Fed. Proc.– 1982.– 41.– P. 2883–2890.

Accepted in 04.04.2001

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 577.1: 615.9: 614.7: 661.185

UDC 577.1: 615.9: 614.7: 661.185

Влияние полиэтиленгликолей на систему вторичных посредников

Л. Д. ПОПОВА

Харьковский государственный медицинский университет

A Polyethylene Glycol Effect on the System of Secondary Mediators

L. D. POPOVA

Kharkov State Medical University

Изучалось влияние полиэтиленгликолей (ПЭГ) на содержание циклических нуклеотидов и ферментов их синтеза в головном мозге крыс. Обнаружены активация гуанилатциклазной и ингибирование аденилатциклазной мессенджерных систем, что свидетельствует о преобладании процессов возбуждения над процессами торможения в головном мозге затравленных животных. Снижение эффективности аденилатциклазной мессенджерной системы у крыс, подвергнутых воздействию ПЭГ, возможно, связано как с нарушениями в системе β-адренорецепторного аппарата синаптосом, так и со снижением абсолютного количества аденилатциклазы.

Вивчався вплив поліетиленгліколей (ПЕГ) на вміст циклічних нуклеотидів та ферментів їх синтезу у головному мозку щурів. Виявлено активацію гуанілатциклазної та гальмування аденілатциклазної месенджерних систем, що свідчить про перевагу процесів збудження над процесами гальмування у головному мозку токсикованих тварин. Зниження ефективності аденілатциклазної месенджерної системи у щурів, на яких впливають ПЕГ, можливо, пов'язане як з порушеннями в системі β-адренорецепторного апарату синаптосом, так і зі зниженням абсолютної кількості аденілатциклази.

The effect of polyethylene glycols on the content of cyclic nucleotides and enzymes of their synthesis in rat brain was investigated. Activation of the guanylate cyclase messenger system and inhibition of adenylate cyclase were found. This fact testifies to the prevalence of the excitation processes in the brain of poisoned with PEG rats. A decrease of the efficiency of adenylate cyclase messenger system in the poisoned with PEG rats, obviously, may be connected both to the impairments in the system of β-adrenoreceptor apparatus in synaptosomes and reduction of an absolute amount of adenylate cyclase.

Полиэтиленгликоли нашли широкое применение в биологии и медицине как криоконсерванты разных биологических объектов (костного мозга, крови, стекловидного тела, хрусталика и др.). Так, ПЭГ-400 используют для получения искусственных эритроцитов, лечебных мазей и основ лекарственных препаратов. Многие представители ПЭГ являются основными компонентами эластичных, жестких и полужестких полиуретанов, синтетической кожи, пластмасс, эпоксидных смол, эмалей, лаков и т.д.

При изучении биохимических механизмов влияния ПЭГ на организм теплокровных животных нами было обнаружено, что они усиливают процессы свободнорадикального окисления и перекисного окисления липидов (ПОЛ) [4].

Структурные перестройки биологических мембран, происходящие при переокислении эндогенных мембранных липидов, изменение микровязкости мембран способствуют изменению активности мембраносвязанных ферментов [3, 5], белков-рецепторов, что приводит к нарушению нейрогуморальной регуляции [6] и прежде всего в системе вторичных посредников.

Участие циклических нуклеотидов в функционировании систем регуляции практически всех сторон метаболизма, функций органов и тканей определяет особую роль исследований их содержания

Polyethylene glycol gained a wide application in biology and medicine as cryopreservative of biological objects (bone marrow, blood, hyaloid membrane, crystalline lens etc.). Polyethylene glycol is used for the obtaining of artificial red blood cells, therapeutic ointments and as the base for medical preparations. Many PEG representatives are the main components of elastic, hard and semi-hard polyurethanes, synthetic skin, plastic, epoxy resins, enamels, varnishes etc.

When studying biochemical mechanisms of the PEG effect on an organism of homoiothermed animals we revealed, that they accelerated the processes of free-radical oxidation and lipid peroxidation (LPO) [4].

Structural rearrangements of biological membranes, occurring during peroxidation of endogenous membrane lipids, as well as during the change in the membranes microviscosity, promote to the change of membrane-bounded enzymes activity [3, 5], proteins-receptors, that results in the impairment of neurohumoral regulation [6] and, first of all, in the system of secondary mediators.

Participation of cyclic nucleotides in the functioning of the regulation systems of practically all metabolism sides, organ and tissue functions, defines a special role of their composition and metabolism investigation at various pathological states in animals and under the effect of toxic substances [1].

Матеріал, захищений авторським правом

и метаболизма при различных патологических состояниях животных и воздействии токсических веществ [1].

Учитывая универсальность действия циклических нуклеотидов и ключевую роль центральной нервной системы в поддержании гомеостаза, целью работы было изучение влияния ПЭГ на содержание циклических нуклеотидов и ферментов их синтеза в головном мозге крыс.

Работа выполнена на белых крысах линии Вистар, которым ежедневно с помощью зонда вводили ПЭГ с молекулярной массой: 300 (Лд-303); 400 (Л-402); 500 (Л-503); 1500 (Л-1502); 1600 (Л-1601); 2400 (Л-2402) в дозе 1/100 $ДЛ_{50}$. Длительность введения – 30 сут.

Активность аденилатциклазы определяли в грубой синаптосомальной фракции головного мозга по методу, описанному в [7], с незначительными модификациями, активность гуанилатциклазы – по методу [8].

Среда инкубации для определения активности аденилатциклазы включала 50 мкМ трис-HCl (pH 7,5), 6 мкМ $MgCl_2$, 10 мкМ креатинфосфата, 0,5 мг/мл креатинфосфокиназы, 10 мкМ теофиллина, 3 мкМ АТФ. Концентрация эффекторов: NaF – 10 мкМ, изопротеренола – 10^{-3} М.

При определении активности гуанилатциклазы использовали среду инкубации, содержащую 50 мкМ трис-HCl (pH 7,5), 4 мкМ $MgCl_2$, 4 мкМ креатинфосфата, 0,7 мг/мл креатинфосфокиназы, 10 мкМ теофиллина, 1 мкМ ГТФ.

Реакцию инициировали добавлением биоматериала. Инкубацию проводили в течение 10 мин при 37 °С на водяной бане. Реакцию останавливали кипячением на водяной бане в течение 3 мин. В контрольные пробирки субстрат (соответственно АТФ или ГТФ) добавляли после кипячения. Об активности аденил- и гуанилатциклаз судили по накоплению продуктов ферментативной реакции (цАМФ и цГМФ).

Содержание циклических нуклеотидов определяли радиоиммунологическим методом с использованием наборов реактивов фирмы Amersham (Великобритания) по прилагаемой методике. Установлено, что все изученные ПЭГ достоверно снижали содержание цАМФ и активность аденилатциклазы, при этом активность гуанилатциклазы и содержание цГМФ повышались (табл. 1).

Следует отметить, что процент снижения активности аденилатциклазы был менее выражен, чем процент снижения содержания цАМФ, а повышение активности гуанилатциклазы было более существенным, чем повышение концентрации цГМФ. Например, под влиянием Л-2402 активность аденилатциклазы снижалась на 16%, а концентрация цАМФ – на 42%, активность гуанилатциклазы возрастала на 126%, а содержание цГМФ – всего лишь на 62%. Эти результаты свидетельствуют об усилении распада циклических нуклеотидов под влиянием ис-

Considering the universality of the cyclic nucleotides effect and a key role of central nerve system in the homeostasis maintenance, the investigation of PEG effect on the composition of cyclic nucleotides and enzymes of their synthesis in rats' brain was the aim of given work.

The work was carried-out in white Wistar rats, to which PEG with the molecular masses of: 300 (Ld-303); 400 (L-402); 500 (L-503); 1500 (L-1502); 1600 (L-1601); 2400 (L-2402) in the dose of 1/100 DL_{50} was injected every day by means of a probe. Duration of the injection made 30 days.

Adenylate cyclase activity was determined in a rough synaptosomal fraction of brain by described method [7] with slight modifications, guanylate cyclase activity was evaluated by the method [8].

Incubation medium for the determination of adenylate cyclase activity comprised 50 μM tris-HCl (pH 7.5), 6 μM $MgCl_2$, 10 μM creatine phosphate, 0.5 mg/ml of creatine phosphokinase, 10 μM of theophyllin, 3 μM of ATP. Effectors concentration was 10 μM in NaF, 10^{-3} M in isoproterenol.

When determining guanylate cyclase activity the incubation medium, comprising 50 μM tris-HCl (pH 7.5), 4 μM $MgCl_2$, 4 μM creatine phosphate, 0.7 mg/ml of creatine phosphokinase, 10 μM thiophilin, 1 μM GTP, was used.

Reaction was initiated by adding the biomaterial. Incubation was conducted within 10 min under 37 °C in a water bath. Reaction was stopped by boiling in a water bath within 3 min. Substrate was added after boiling (ATP and GTP, correspondingly) into the control vials. Activity of adenylate cyclase and guanylate cyclase was measured on the accumulation of the enzymic reaction products (cAMP and cGMP).

Content of cyclic nucleotides was estimated by means of radioimmunological method using reagent kits of Amersham company (UK) according to the attached method. It was established, that all studied PEGs statistically and significantly decreased the cAMP content and adenylate cyclase activity, thereat guanylate cyclase activity and cGMP content increased (Table 1).

It should be noted, that percentage of the decrease in the adenylate cyclase activity was manifested less in comparison with the percentage of cAMP content, and guanylate cyclase activity increase was more sig-

Table 1

The effect of glycols (1/100 DL_{50}) on the content of cAMP/cGMP, the levels of basal activity of adenylate- and guanylate cyclase in the brain cortex of rats.

Substance	Adenylate cyclase pMol/mg of protein/min	cAMP, fMol/mg of tissue	Guanylate cyclase, pMol/mg of protein/min	cGMP, fMol/mg of tissue
Control	106.8 ± 10.2	480.3 ± 17.5	70.0 ± 4.1	45.4 ± 1.2
L-402	67.1 ± 2.4**	220.8 ± 2.4***	160.1 ± 12.8***	99.3 ± 3.6***
L-503	69.0 ± 1.3**	315.6 ± 21.7***	149.3 ± 22.1**	87.6 ± 2.5***
L-2402	89.8 ± 1.7*	34.06 ± 32.5***	158.2 ± 20.1**	73.4 ± 3.1***
L-1502	72.4 ± 2.6**	280.4 ± 27.2***	184.3 ± 27.2**	85.2 ± 2.9***

Матеріал, захищений авторським правом

Таблица 1

Влияние гликолей (1/100 $ДЛ_{50}$) на содержание цАМФ и цГМФ, уровни базальной активности аденилат- и гуанилатциклаз в коре головного мозга крыс ($n = 6$)

Вещество	Аденилат-циклаза, пмоль/мг белка/мин	цАМФ, фмоль/мг ткани	Гуанилат-циклаза, пмоль/мг белка/мин	цГМФ, фмоль/мг ткани
Контроль	106,8 ± 10,2	480,3 ± 17,5	70,0 ± 4,1	45,4 ± 1,2
Л-402	67,1 ± 2,4**	220,8 ± 2,4***	160,1 ± 12,8***	99,3 ± 3,6***
Л-503	69,0 ± 1,3**	315,6 ± 21,7***	149,3 ± 22,1**	87,6 ± 2,5***
Л-2402	89,8 ± 1,7*	34,06 ± 32,5***	158,2 ± 20,1**	73,4 ± 3,1***
Л-1502	72,4 ± 2,6**	280,4 ± 27,2***	184,3 ± 27,2**	85,2 ± 2,9***

следованных ксенобиотиков. При этом величина соотношения цАМФ/цГМФ существенно снижалась с 10,6 для контрольных животных до 2,2 после воздействия Л-402 (в среднем до 3,4).

При изучении влияния фармакологических препаратов, изменяющих соотношение цАМФ/цГМФ, на резистентность животных к острой гипоксии [2] было обнаружено, что средства, повышающие величину соотношения цАМФ/цГМФ, снижают выживаемость животных, а средства, снижающие эту величину, повышают выживаемость. Та же закономерность была выявлена и для других экстремальных воздействий. Возможно, изменения в системе циклических нуклеотидов, развивающиеся в результате токсического воздействия ПЭГ, являются механизмами адаптации животных к экстремальным условиям.

Для выяснения причины снижения активности аденилатциклазы у крыс, затравленных ПЭГ, мы определяли не только базальную активность аденилатциклазы, но и активность фермента на фоне стимулирующего влияния изопротеренола и фтористого натрия.

Изопротеренол относится к группе катехоламинов и оказывает стимулирующее действие на β-адренорецепторы, т.е. он имитирует эффекты норадреналина. Помимо гормонов, сильным активирующим действием на аденилатциклазу обладает NaF. В отличие от гормонов NaF действует только в бесклеточных системах, по-видимому, непосредственно влияя на каталитическую субъединицу. Фтористый натрий широко используют для выявления полной активности препаратов аденилатциклазы из различных тканей.

Базальную и модулируемую аденилатциклазную активность изучали на препаратах мембран синаптосом мозга. В ходе эксперимента было обнаружено, что в синаптосомах головного мозга контрольных животных изопротеренол повышал активность фермента всего лишь на 4% (табл. 2).

Таблица 2

Влияние ксенобиотиков на активность аденилатциклазы в препаратах мембран синаптосом мозга крыс, нмоль/мг белка/мин ($n = 6$)

Вещество, 1/100 $ЛД_{50}$	Активность		
	базальная	индуцированная изопротеренолом	индуцированная NaF
Контроль	1,08 ± 0,013	1,117 ± 0,018	1,79 ± 0,08
Лд-303	0,53 ± 0,011*	0,50 ± 0,002*	0,82 ± 0,009*
Л-1601	0,42 ± 0,003*	0,42 ± 0,001*	0,71 ± 0,04*

Примечание. * — $P < 0{,}001$.

nificant, than an increase in cGMP concentration. For example, under the effect of L-2402 adenylate cyclase activity decreased by 16%, cAMP concentration reduced by 42%, guanylate cyclase activity increased by 126%, cGMP content – just by 62%. These results testify to the decay intensification in cyclic nucleotides under the effect of studied xenobiotics. Thereat the value of cAMP/cGMP ratio considerably decreased from 10.6 for the control animals to 2.2 after L-402 effect (in average down to 3.4).

When studying the effect of pharmacological preparations, changing cAMP/cGMP ratio on the animals resistance to an acute hypoxia [2] it was revealed, that the means, increasing value of cAMP/cGMP ratio, decreased the animals viability, and preparations, reducing this value, increased viability. The same regularity also was found for other extreme effects. Obviously, changes in the system of cyclic nucleotides, developed due to the PEG toxic effect, are the mechanisms of animals adaptation to extreme conditions.

To reveal the cause of the decrease in adenylate cyclase activity in rats, poisoned with PEG, we determined both the basal adenylate cyclase activity and enzyme activity on the background of isoproterenol and sodium fluoride stimulating effect.

Isoproterenol is related to the group of catecholamines and shows a stimulating effect on β-adrenoreceptors, i.e. it imitates noradrenalin effect. Besides hormones, NaF possesses a high activating effect on adenylate cyclase. In contrast to hormones, NaF acts just in systems without cells, obviously, immediately affecting a catalytic subunit. Sodium fluoride is widely used to reveal a complete activity of adenylate cyclase preparations from various tissues.

Basal and modulated adenylate cyclase activities were investigated by means of the membrane preparations of brain synaptosomes. During the experiment it was found, that in the brain synaptosomes of the control animals isoproterenol increased enzyme activity just by 4% (Table 2).

Table 2

The effect of xenobiotics on the adenylate cyclase activity in the membrane preparations of rat brain synaptosomes, nMol/mg of protein/min

Substance, 1/100 LD_{50}	Activity		
	Basal	Isoproterenol induced	NaF induced
Control	1.08 ± 0.013	1.117 ± 0.018	1.79 ± 0.08
Ld-303	0.53 ± 0.011*	0.50 ± 0.002*	0.82 ± 0.009*
L-1601	0.42 ± 0.003*	0.42 ± 0.001*	0.71 ± 0.04*

Note. * — $P < 0.001$.

Obtained results coordinate with our own data on the prevailing of α_1-adrenoreceptors in the brain cortex over β-adrenoreceptors [6], the given fact gives the possibility to suppose, that the effects of norad-

Матеріал, захищений авторським правом

Полученные результаты согласуются с нашими данными о преобладании α_1-адренорецепторов в коре головного мозга над β-адренорецепторами [6]. Этот факт дает возможность предположить, что эффекты норадреналина в коре головного мозга осуществляются, в основном, через α_1-адренорецепторы.

У животных, затравленных ПЭГ, изопротеренол вообще не оказывал стимулирующего влияния на аденилатциклазу синаптосом головного мозга, что может быть связано или со снижением количества β-адренорецепторов у этих животных, или с нарушением индукторных связей между рецептором и сопрягающей субъединицей.

Добавление в среду инкубации NaF повысило активность аденилатциклазы в препаратах синаптосом головного мозга как контрольной, так и опытной групп животных (в среднем на 60%). Но по абсолютной величине активность аденилатциклазы в головном мозге крыс, затравленных ПЭГ, была более чем в 2 раза ниже по сравнению с контролем, что свидетельствует о снижении синтеза этого фермента.

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют об активации гуанилатциклазной и ингибировании аденилатциклазной мессенджерных систем, что, с одной стороны, указывает на преобладание процессов возбуждения над процессами торможения в головном мозге, с другой — обеспечивает выживание животных в экстремальных условиях.

Снижение эффективности аденилатциклазной мессенджерной системы у крыс, подвергнутых воздействию гликолей, вызвано как нарушениями в системе β-адренорецепторного аппарата синаптосом, так и уменьшением абсолютного количества аденилатциклазы, что, очевидно, связано со снижением синтеза этого фермента.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Денисов В. М., Рукавишникова С. М., Жуков В. И.* Биохимия миокарда, пораженного адреналином.– Харьков: Оригинал, 1999.– 184 с.
2. *Кожемяка Л. А., Коростовцев Д. С.* Динамика соотношения клеточных медиаторов адрен- и холинэргических систем (цАМФ–цГМФ) в механизмах адаптации к гипоксии // ДАН СССР.– 1977.– 237, № 6.– С. 1519–1521.
3. *Кучеренко Н. Е., Васильев А. Н.* Липиды.– Киев: Вища шк., 1985.– 247 с.
4. *Попова Л. Д.* Влияние диолов на антиоксидантную систему эритроцитов // Гигиена населенных мест: Сб. науч. тр.– Киев, 2000.– Вып. 37.– С. 117–120.
5. *Попова Л. Д.* Влияние полиэтиленгликолей на активность ферментов мембран митохондрий // Материалы научно-практ. конф. "Региональные пробл. охраны здоровья населения Центр. Черноземья".– Белгород, 2000.– С. 580–584.
6. *Попова Л. Д., Стеценко С. А.* Нейрогуморальные механизмы токсического действия ионогенных и неионогенных поверхностно-активных веществ // Научно-техн. конф. "Экология и здоровье человека. Охрана водного и воздушного бассейнов. Утилизация отходов".– Харьков, 2000.– Т. 1.– С. 161–163.
7. *Ткачук В. А., Балденков Г. Н., Щеглова М. В.* Соотношение скоростей синтеза и распада циклического аденозин-3',5'-монофосфата в скелетных мышцах кролика // ДАН СССР.– 1976.– 228, № 2.– С. 490–493.
8. *Чирков Ю. Ю., Тыщук И. А., Белушкина Н. Н., Северина И. С.* Гуанилатциклаза тромбоцитов крови человека // Биохимия.– 1987.– 52, Вып. 6.– С. 956–963.

Поступила 20.03.2001

renalin in the brain cortex are mainly realized through α_1-adrenoreceptors.

In the poisoned with PEG animals isoproterenol did not affect a stimulated action on the adenylate cyclase of brain synaptosomes, that might connected both to the decrease of β-adrenoreceptors number in these animals or to the disorder of the inductor bonds between a receptor and conjugated subunit.

NaF addition into the incubation medium increased adenylate cyclase activity in the preparations of brain synaptosomes both in the control and experimental groups of animals (in average by 60%). However, on its absolute value the adenylate cyclase activity in the brain of poisoned with PEG rats was more than twice lower in comparison with the control, that testified to the reduction of this enzyme synthesis.

Thus, the obtained results testify to the activation of guanylate cyclase messenger system and inhibition of the adenylate cyclase one, that, from one hand, testify to prevailing of the excitation processes over the inhibition ones in brain, from another hand, provides animals viability under extreme conditions.

Reduction of the efficiency of the adenylate cyclase messenger system in rats, affected by glycols effect, caused both by the impairments in the system of β-adrenoreceptor apparatus in synaptosomes and reduction of the adenylate cyclase absolute quantity, that, obviously, related to the decrease of this enzyme synthesis.

REFERENCES

1. *Denisov V. M., Rukavishnikova S. M., Zhukov V. I.* Biochemistry of miocardium, damaged by adrenalin.– Kharkov: Original, 1999.– 184 p.
2. *Kozhemyaka L. A., Korostentsev D. S.* Dynamics of the ratio of cellular mediators of adrenal- and cholyergic systems (cAMP-cGMP) in the adaptation mechanisms to hypoxia // Reports of Academy of Sciences of the USSR.– 1997.– 237, № 6.– P. 1519–1521.
3. *Kucherenko N. E., Vasilyev A. N.* Lipids.– Kiev: Vyscha shkola, 1985.– 247 p.
4. *Popova L. D.* Effect of diols on antioxidative system of red blood cells // Hygiene of populated area: Collection of Scientific works.– Kiev, 2000.– Issue 37.– P. 117–120.
5. *Popova L. D.* Effect of polyethylene glycols on the enzyme activity of mitochondria membranes // Materials of Scientific-Practical Conference "Regional Problems for Health Care of the Population of the Central Chernozem Zone".– Belgorod, 2000.– P. 580–584.
6. *Popova L. D., Stetsenko S. A.* Neurohumoral mechanisms of toxic effects of ionogenic and non-ionogenic surficially-active substances // Scientific technical Conference "Ecology and Human Health. Consercvation of aqueous and air basins. Scrap utilization".– Kharkov, 2000.– V. 1.– P. 161–163.
7. *Tkachuk V. A., Baldenkov G. N., Scheglova M. V.* Ratio of the rates of synthesis and disintegration of cyclic adenosine-3',5'-monophosphate in skeletal muscles of rabbit // Reports of Academy of Sciences of the USSR.– 1976.– 228, № 2.– P. 490–493.
8. *Chirkov Yu. Yu., Tyschuk I. A., Belushkina N. N., Severina I. S.* Guanylate cyclase of human trombocytes // Biokhimia.– 1987.– 52, Issue 6.– P. 956–963.

Accepted in 20.03.2001

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 777.352: 577.121.7

UDC 777.352: 577.121.7

Применение антиоксидантных препаратов при холодовой адаптации

Л. В. КРИЧКОВСКАЯ

Национальный технический университет "Харьковский политехнический институт"

Application of Antioxidant Preparations During Cold Adaptation

L. V. KRICHKOVSKAYA

"Kharkov Polytechnical Institute" National Technical University

Изучалось влияние поливитаминного препарата "Аекол" на основе микробиологического каротина на возможность регулирования адаптационных механизмов при воздействии на организм холода. Показано регулирующее влияние "Аекола" на ферментативную и неферментативную реакции перекисного окисления липидов (ПОЛ) на тканях мозга, печени и крови при действии на организм низких температур.

Вивчався вплив полівітамінного препарату "Аекол" на основі мікробіологічного каротину на можливість регулювання адаптаційних механізмів при дії на організм холоду. Показано регулюючу дію "Аеколу" на ферментативну та неферментативну реакції перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) на тканинах мозку, печінки та крові при дії на організм низьких температур.

The effect of "Aecol" polyvitamin preparation on the base of microbiological carotene on the regulative possibility of adaptive mechanisms under a cold effect on an organism, has been investigated. "Aecol" regulating effect on enzymic and non-enzymic reactions of lipid peroxidation (LPO) in brain, liver tissues and blood under the effect of low temperatures on an organism was demonstrated.

Одной из основных проблем современной науки является изучение взаимодействия организма с внешней средой. На различных физиологических уровнях исследователи формулировали общие принципы формирования компенсаторно-приспособительных реакций организма [8].

Исследования биохимических (молекулярных) адаптивных механизмов пока не имеют точного всеобъемлющего объяснения, хотя стратегия определенных частных направлений биохимической адаптации сформулирована [7]. В наименьшей степени на этом уровне изучены адаптивные изменения в мозге.

Важнейшим естественным механизмом модификации мембранных липидов является свободнорадикальное ПОЛ [1]. Этот механизм реализуется в норме, при патологиях и экстремальных внешних воздействиях. Установлено, что в развитии стрессорной реакции ведущим патогенетическим звеном является активация свободнорадикального окисления в мембранах клетки [1]. В инициации процесса ПОЛ прямо или косвенно участвуют активные формы кислорода: синглетный кислород, гидроксильный и супероксидный радикалы, перекись водорода [12].

Реакции ПОЛ играют особую роль в мозге. Мозг потенциально подвержен ПОЛ в связи: 1) с высокой потребностью в кислороде (потребление мозгом кислорода в покое достигает 15–20% от общего потребления организмом); 2) значительным содержанием липидов с полиненасыщенными жирными кислотами; 3) изобилием мембранных струк-

Investigation of an organism interaction with environment is one of the main problems in a modern science. At various physiological levels researchers formulated general principles of the formation of compensatory and adaptive responses in an organism [8].

Investigations of biochemical (molecular) adaptive mechanisms have not been completely explained yet, however the strategy of certain separate directions of biochemical adaptation has been formulated [7]. Adaptive changes in brain at this level have been studied in the least extent.

Free-radical lipid peroxidation is the most important natural mechanism for the membrane lipids modification [1]. This mechanism is realized in the norm, at pathological states and extreme effects of environment. It has been established that in the development of stress response the activation of free-radical oxidation in cell membranes is the leading pathogenetic link [1]. In the initiation of LPO process the active oxygen forms, such as singlete oxygen, hydroxile and superoxide radicals, hydrogen peroxide participate directly or indirectly.

LPO reactions play a special role in brain. Brain is potentially subjected to LPO due to: 1) a high demand of oxygen (oxygen consumption by brain in a rest achieves 15–20% of general its consumption by organism); 2) a significant content of lipids with polyunsaturated fatty acids; 3) plenty of membrane structures, in a hydrofobic phase of those an oxygen solubility is considerably higher, than in water-soluble cell components, 4) the presence of compounds (for example, biogenic amines), metabolism of those is attended

Матеріал, захищений авторським правом

тур, в гидрофобной фазе которых растворимость кислорода значительно выше, чем в водорастворимых компонентах клетки; 4) наличием соединений (например биогенных аминов), метаболизм которых сопряжен с образованием свободных радикалов, и большого количества компонентов электронпереносящей цепи (например убихинона) — потенциальных источников супероксидных радикалов; 5) относительно низкой активностью систем ферментативной и неферментативной антирадикальной защиты [13].

Применение биологически активных веществ является неотъемлемой частью современного практического здравоохранения в решении адаптационных процессов.

В умеренном климате Украины организм часто подвергается не только воздействию холодового фактора, но и переохлаждениям, поэтому для выяснения возможных путей адаптации к холодовому стрессу нами исследовалось влияние препарата "Аекол", в состав которого входят вещества с антиоксидантными свойствами, на состояние антиоксидантной системы в тканях мозга, сыворотке крови и печени при длительном переохлаждении организма.

Опыты проводили на 5-месячных беспородных белых крысах весом 180–200 г. В течение 3-х недель животных содержали по 2 ч при температуре –5 °С. В гомогенатах мозговой ткани определяли активность супероксиддисмутазы (СОД) [2], каталазы и глутатионпероксидазы [3].

Гомогенизацию ткани мозга проводили в среде *pH* 7,4, используя в дальнейшем супернатант, полученный при центрифугировании гомогената на холоде при 5 000 об/мин.

Об интенсивности ПОЛ в печени, мозге и сыворотке крови судили по количеству образования первичных молекулярных продуктов ПОЛ — диеновых коньюгатов (ДК) [9] — и вторичных — малонового диальдегида (МДА) [4].

Определение первичных продуктов ПОЛ проводили, исходя из их способности поглощаться в УФ области спектра (233 нм). В основе метода определения вторичных продуктов ПОЛ лежит реакция между МДА и тиобарбитуровой кислотой, которая при высокой температуре и в кислой среде протекает с образованием окрашенного комплекса, имеющего максимум поглощения при длине волны 532 нм.

Воздействие холода как стрессового фактора отражается на реакциях перекисного окисления, что отмечено в [5, 6, 10], однако мы не встретили работ, касающихся коррекции адаптационных систем организма при холодовом воздействии с помощью биологически активных препаратов. В состав препарата "Аекол" входят витамины А, Е, К, β-каротин и ионол. Влияние препарата на реакции ПОЛ в гомогенатах тканей организма при переохлаждении отражено в табл. 1.

Биологически активные вещества β-каротин, α-токоферол, витамин K_3, ионол, входящие в со-

with free radical formation, as well as big number of components of electro-transferring chain (for example ubiquinone), which are the potential sources of superoxide radicals; 5) relatively low activity of the systems of enzymic and non-enzymic antiradical protection [12].

Application of biologically active substances is an integral part of current practical health care in the solution of adaptive processes.

In moderate climate of Ukraine an organism is often subjected both to the effect of cold factor and overcooling, therefore for the elucidation of possible ways for the adaptation to a cold stress we investigated the effect of "Aecol" preparation, comprising substances with antioxidant properties, on the state of antioxidant system in brain tissues, blood serum and liver during long-term overcooling of an organism.

Experiments were carried-out in the 5-months' 180–200 g white rats. Within two weeks animals were kept during 2 hrs under the temperature of –5 °C. In brain tissue homogenates the activity of superoxide-dismutase (SOD) [2], catalase and glutationperoxidase was determined [3].

Brain tissue homogenization was carried-out in *pH* 7.4 medium, using in future supernatant, obtained during homogenate centrifuging in a cold at 5 000 rot/min.

LPO intensity in liver, brain and blood serum was evaluated on the number of formation of the LPO initial molecular products, diene conjugates (DC) [2] and secondary ones, malone dialdehyde (MDA) [4].

Determination of LPO initial products was carried-out proceeding from their capability to be adsorped in UV region of spectrum (233 nm). In the base of this method there is the reaction between MDA and thiobarbituric acid, occurring at a high temperature and acidic medium with the formation of stained complex, which has the maximum of adsorption at the wave length of 532 nm.

It was noted, that the effect of cold as a stress factor was reflected to LPO reactions [5, 6, 10], however we had not met the works on the correction of adaptive systems in an organism under a cold effect by means of biologically active preparations. "Aecol" preparation comprises A,E, K, β-carotene and ionol. The effect of given preparation on LPO processes in homogenates of organism tissues during overcooling is reflected in the Table 1.

Biologically active substances such as β-carotene, α-tocopherol, vitamin K_3, ionol, which the "Aecol" preparation comprised, are related to compounds, possessing antiradical and antioxidant effects [5].

Injection to animals during the whole experiment of "Aecol" preparation, which can be related to total antioxidant, resulted in the correction of indices of non-enzymic antioxidant system, approximating them to the values in intact animals. The rats after "Aecol" injection differed from the animals of the 2nd group (cold control), they were more active, have clean hair and normal skin. The rats, did not subjected to the

Матеріал, захищений авторським правом

Таблица 1 **Table 1**

Влияние "Аекола" на реакции ПОЛ в гомогенатах тканей при холодовом стрессе (% к интактному контролю), $n = 13$

The effect of "Aecol" preparation on LPO reactions in the organism tissues homogenates under a cold stress (% to intact control), $n = 13$

Условия опыта Experimental conditions	Печень Liver		Гомогенат мозга Brain homogenate		Сыворотка крови Blood serum	
	ДК / DC	МДА / MDA	ДК / DC	МДА / MDA	ДК / DC	МДА / MDA
Интактный контроль Intact control	100	100	100	100	100	100
Холодовой контроль Cold control	$72 \pm 5^{*}$	$48 \pm 3^{*}$	$79 \pm 6^{*}$	$75 \pm 5^{*}$	76 ± 6	88 ± 9
Опыт Experiment	83 ± 6	91 ± 9	94 ± 8	$94 \pm 7^{**}$	$95 \pm 7^{**}$	98 ± 9

Примечания. * — $p < 0{,}05$ к интактному контролю; ** — $p < 0{,}05$ к холодовому контролю.

Notes. * — $p < 0.05$ to intact control; ** — $p < 0.05$ to cold

став препарата "Аекол", относят к соединениям, обладающим антирадикальными и антиоксидантными эффектами [5]. Введение в течение всего эксперимента животным препарата "Аекол", который по существу можно отнести к суммарному антиоксиданту [11], приводит к коррекции показателей неферментативной антиоксидантной системы, приближая их к значениям у интактных животных. Крысы, которым вводили "Аекол", отличались от животных 2-й группы (холодовой контроль) даже внешне, они были более подвижны, имели чистую шерсть и нормальный кожный покров. Крысы, не получавшие препарат после холодового воздействия, были взъерошены, волосяной покров с 9-го дня имел неопрятный вид.

Исследование влияния "Аекола" на супероксиддисмутазную и каталазную активности в гомогенатах головного мозга крыс, подвергавшихся переохлаждению, свидетельствует об изменениях изучаемых параметров антиоксидантной системы (табл. 2).

Представленные в табл. 1 и 2 данные свидетельствуют о том, что при введении крысам "Аекола", в состав которого входят антиоксиданты, ведущая роль антиоксидантной защиты может принадлежать компонентам неферментативной системы. Витамин Е в составе "Аекола", наряду с β-каротином, отвечает в определенной мере за стабилизацию структурной организации мембранных липидов [5].

Данные, полученные при определении влияния каротинсодержащего поливитаминного препарата "Аекол" на уровень свободнорадикальных процессов у крыс после холодового воздействия, подтверждают наличие у испытуемого препарата антиоксидантных свойств. Введение "Аекола" на фоне длительного переохлаждения способствует сохранности свободнорадикального окисления на уровне интактных животных, что помогает им (судя по их физиологическому состоянию) легче переносить действие холода.

Таблица 2 **Table 2**

Влияние "Аекола" на антиоксидантную ферментативную активность мозга крыс при холодовом воздействии (% к интактному контролю)

The effect of "Aecol" preparation on antioxidant enzymic activity in rat brain under a cold effect (% to intact control)

Условия опыта Experiment conditions	СОД SOD	Каталаза Catalase	Глутатионпероксидаза Glutationperoxidase
Интактный контроль Intact control ($n = 11$)	100	100	100
Холодовой контроль Cold control ($n = 12$)	$86 \pm 5{,}4$	$136 \pm 10{,}3^{*}$	$108 \pm 10{,}2$
Опыт Experiment ($n = 10$)	$97 \pm 6{,}5$	$120 \pm 7{,}9^{**}$	$106 \pm 9{,}6$

Примечания. * — $p < 0{,}05$ к интактному контролю; ** — $p < 0{,}05$ к холодовому контролю.

Notes: * — $p < 0.05$ to intact control; ** — $p < 0.05$ to a cold control.

preparation injection after a cold effect, were disheveled, their hair, beginning from the 9th day, became untidy.

Investigation of the effect of "Aecol" preparation on superoxidedismutase and catalase activity in brain homogenates of rats, subjected to overcooling, testified to the changes of studied parameters of antioxidant system (Table 2).

The data presented in the Tables 1 and 2 testified, that when injecting to rats "Aecol" preparation, comprising antioxidants, the leading role of antioxidant protection may belong to the components of non-enzymic system. Both vitamin E and β-carotene, which "Aecol" comprises, in a certain extent respond to the stabilization of structural organization in membrane lipids [5].

The data, obtained when determining the effect of "Aecol", carotene-containing polyvitamin preparation on the level of free radical processes in rats after a cold effect, confirm the presence of antioxidant properties in this preparation. "Aecol" injection on the background of long-term overcooling promotes to the integrity of free radical oxidation at the level of intact

Матеріал, захищений авторським правом

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бурлакова Е. Б., Храпова Н. Г.* Перекисное окисление липидов и природные АО // Успехи химии.– 1985.– 54.– С. 1540–1549.
2. *Гуревич В. С., Шатилина Л. В.* Сравнительный анализ двух методов определения активности супероксиддисмутазы // Лаб. дело.– 1990.– № 4.– С. 44–47.
3. *Королюк М. А., Иванова Л. Н.* Метод определения активности каталазы // Лаб. дело.– 1988.– № 1.– С. 16–19.
4. *Косухин А. Б., Ахметова Б. С.* Экстракция липидов смесью гептан-изопропанол для определения диеновых конъюгатов // Лаб. дело.– 1987.– № 5.– С. 335–337.
5. *Кричковская Л. В.* Химия, биохимия и технология биологически активных каротинсодержащих средств на основе растительных масел и жиров.– Харьков, 1997.– 211 с.
6. *Куликов В. Ю., Семенюк А. В., Колесникова Л. И.* Перекисное окисление липидов и холодовый фактор.– Новосибирск, 1988.– 213 с.
7. *Панин Л. Е.* Влияние длительной гипоксии на содержание биогенных аминов в синапсах мозга крыс // Бюл. экс. биол. и мед.– 1983.– 96, № 1.– С. 12–14.
8. *Саркисов Д. С.* О сущности так называемых бессимптомных периодов болезни // Архив патологии.– 1984.– № 1.– С. 3–11.
9. *Федорова Т. Н., Коршунова Т. С.* Реакция с тиобарбитуровой кислотой для определения малонового диальдегида крови методом флюорометрии // Лаб. дело.– 1983.– № 3.– С. 25–28.
10. *Эмирбеков Э. З., Львов С. П., Гасангаджиева А. Г.* Влияние многократного холодового стресса на интенсивность перекисного окисления липидов и антиоксидантную систему тканей // Бюл. экс. биол. и мед.– 1998.– 125, № 1.– С. 385–387.
11. *Пат. 2384* (Україна) МПК[5] А61К31/05. Засіб для заживлення ран / Л. В. Кричковська, Г. К. Зябченкова, Л. А. Чорненька, А. К. Северцев. Заявлено 30.03.89. Публ. 26.12.94 // Бюл. № 5–1.– С. 38.
12. *O'Brien P. J.* Oxidation of lipids in bioloqical membranes and intraceluler consequences // Autoxidantion of Unsaturated Lipids.– London: Academic Press, 1987.– P. 233–280.
13. *Sastry P. S.* Lipids of nervous tissue composition and metabolism // Pros. Lipid Res.– 1995.– 24, № 2.– P. 69–176.

Поступила 15.02.2001

animals, that help them (according to their physiological state) to easier endure a cold effect.

REFERENCES

1. *Burlakova E. B., Khrapova N. G.* Lipid peroxidation and natural antioxidants // Uspekhi himii.– 1985.– 54.– P. 1540–1549.
2. *Gurevich V. S. Shatilina L. V.* Comparative analysis of two methods for determination of superoxidedesmutase activity // Laboratornoe delo.– 1990.– № 4.– P. 44–47.
3. *Korolyuk M. A., Ivanova L. N.* The method for determination of catalase activity // Laboratornoe delo.– 1988.– № 1.– P. 16–19.
4. *Kosukhin A. B., Akhmetova B. S.* Lipid extraction with heptan-isopropanol mixture for determination of diene conjugates // Laboratornoe delo.– 1987.– № 5.– P. 335–337.
5. *Krichkovskaya L. V.* Chemistry, biochemistry and technology of biologically active carotene-containing preparations on the base of plant oils and fats.– Kharkov, 1997.– 211 p.
6. *Kulikov V. Yu. Semenyuk A. V., Kolesnikova L. I.* Lipid peroxidation and a cold factor.– Novosibirsk, 1998.– 213 p.
7. *Panin L. E.* Effect of long-term hypoxy on the composition of biogenic amines in rat brain synapses // Bull. Exp. Biol. i med.– 1983.– 96, № 1.– P. 12–14.
8. *Sarkisov D. S.* About the nature of so-called symptomless periods of disease // Pathology archive.– 1984.– № 1.– P. 3–11.
9. *Fedorova T. N., Korshunova T. S.* Reaction with thiobarbituric acid for malone dialdehyde determination in blood by fluorometry method // Laboratornoe delo.– 1983.– № 3.– P. 335–337.
10. *Emirbekov E. Z., Lvov S. P., Gasangadzhieva A. G.* Effect of multiple cold stress on the intensity of lipid peroxidation and antioxidative system in tissues // Bull. exp. biol. and med.– 1998.– 125, № 1.– P. 385–387.
11. *Patent № 2384* (Ukraine). MPK[5] A61K31/05. L. V. Krichkovs'ka, G. K. Zyabchenkova, L. A. Chornen'ka, A. K. Severtsev. Manif. 30.03.89. Publ. 26.12.94 // Bull. № 5-1.– P. 38.
12. *O'Brien P. J.* Oxidation of lipids in biological membranes and intracellular consequences // Autoxidation of Unsaturated Lipids.– London: Academic Press, 1987.– P. 233–280.
13. *Sastry P. S.* Lipids of nervous tissue composition and metabolism // Pros. Lipid. Res.– 1995.– 24, № 2.– P. 69–176.

Accepted in 15.02.2001

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043: 615.361.014.41: 577.352.43: 57.085.43

UDC 57.043: 615.361.014.41: 577.352.43: 57.085.43

Влияние различных этапов криоконсервирования методом сверхбыстрого замораживания на осмотическую устойчивость и морфофункциональную сохранность эмбрионов мыши

Е. И. СМОЛЬЯНИНОВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

О. Б. ХРОМЕНКОВА

Харьковский государственный медицинский университет

Г. В. ЖЕРНОКЛЕВ

Харьковский биотехнологический центр

Influence of various steps of cryopreservation by a method of ultra-rapid freezing on osmotic resistance and morphofunctional integrity of mouse embryos

E. I. SMOLYANINOVA

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

O. B. KHROMENKOVA

Kharkov State Medical University

G. V. ZHERNOKLEV

Kharkov Biotechology Center

Изучено влияние различных этапов сверхбыстрого замораживания на осмотическую устойчивость, морфофункциональную и генетическую сохранность доимплантационных эмбрионов мыши. Показано, что эмбрионы ранних стадий развития обладают различной устойчивостью к добавлению и удалению криозащитного раствора. Основным этапом, ответственным за морфологическую целостность эмбрионов, является этап удаления криопротектора из среды эквилибрации. Выживаемость мышиных эмбрионов после сверхбыстрого замораживания в среде на основе глицерина и сахарозы составила 83,33%, а их жизнеспособность в условиях *in vitro* — 55,56%. Обнаружено увеличение доли патологических митозов в деконсервированных эмбрионах.

Вивчено вплив різних етапів надшвидкого заморожування на осмотичну стійкість, морфофункціональне і генетичне збереження доімплантаційних ембріонів миші. Показано, що ембріони ранніх стадій розвитку мають різну стійкість до додавання і виведення кріозахисного розчину. Основним етапом, відповідним за морфофункціональну цілісність ембріонів, є етап виведення кріопротектора з середовища еквілібрації. Виживання мишачих ембріонів після надшвидкого заморожування у середовищі з гліцерину та сахарози становила 83,33%, а їхня життєздатність в умовах *in vitro* — 55,56%. Виявлено збільшення частки патологічних мітозів у деконсервованих ембріонах.

The effect of various steps of ultra-rapid freezing on osmotic resistance, morphofunctional and genetic integrity of pre-implantational mouse embryos has been investigated. It has been shown that early mouse embryos have different resistance to the procedure of adding and removal of the cryoprotective solutions. The step of removal of equilibrium medium is the basic step responsible for morphofunctional integrity of embryos. The survival rate of mouse embryos was 83.33% after ultra-rapid freezing in the medium on the basis of glycerol and sucrose, and their ability to develop *in vitro* made 55.56%. The increase of portion of the mitotic pathologies in cryopreserved embryos is revealed.

Сверхбыстрое замораживание погружением в жидкий азот как наиболее быстрый и эффективный способ криоконсервирования эмбрионов млекопитающих, в том числе и человека, активно разрабатывается в мировой практике [2–4, 7, 9, 10, 14, 16].

Основным методическим подходом, лежащим в основе данного способа, является предварительная (перед непосредственным погружением в жидкий

Ultra-rapid freezing by plunging into liquid nitrogen as the fastest and most effective way of mammals embryos cryopreservation, including human embryos in the world practice has been actively developed [2–4, 7, 9, 10, 14, 16].

This method is based on a preliminary (prior to immediate plunging into liquid nitrogen) cells equilibration in the permeable and non-permeable cryopro-

Матеріал, захищений авторським правом .

азот) эквилибрация клеток в смеси проникающего и непроникающего криопротекторов, которая обеспечивает необходимое обезвоживание и насыщение клеток криозащитным веществом. Такой подход выгодно отличает способ сверхбыстрого замораживания от способа витрификации [11], так как позволяет использовать менее высокие концентрации проникающих криопротекторов, снижая тем самым вероятность их токсического воздействия на клеточные структуры. В качестве проникающих компонентов сред замораживания используются диметилсульфоксид, 1,2-пропандиол, этиленгликоль и глицерин; в качестве непроникающей добавки — сахароза в различных концентрациях [5, 6, 10, 16].

Анализ литературных данных показывает, что, несмотря на обширный экспериментальный опыт и количество сообщений об успешном применении различных методов сверхбыстрого замораживания для криоконсервирования эмбрионов мыши, сельскохозяйственных животных и человека, до сих пор не существует каких-либо общепринятых схем, а каждый из предлагаемых способов имеет ограничения или по видовой принадлежности эмбрионов, или по стадиям их развития. Дискуссионным остается вопрос соотношения концентраций проникающих и непроникающих ингредиентов в среде замораживания и времени эквилибрации клеток на этапах предобработки. Как правило, эти параметры подбираются эмпирически и могут варьировать в широких пределах. В то же время известно, что продолжительность обработки эмбрионов и манипуляции с ними до замораживания могут сказаться на морфофункциональной сохранности клеток. Так, даже успешное развитие эмбрионов в условиях *in vitro* после криоконсервирования может привести к неудачам по приживляемости эмбрионов *in vivo*. Авторы [14, 15] ссылаются либо на малое количество трансплантированных реципиенту деконсервированных эмбрионов, либо на вероятные повреждения цитоскелета и хромосомного аппарата клеток под непосредственным воздействием проникающих криопротекторов, либо на несогласованность стадий развития деконсервированных эмбрионов и естественного репродуктивного цикла реципиента. Следовательно, экстраполяция конкретных методов замораживания, эффективных для эмбрионов одного вида млекопитающих, на эмбрионы других видов или других стадий развития того же вида остается проблематичной. Особенно это относится к криоконсервированию эмбрионов человека как необходимой части программ экстракорпорального оплодотворения с целью сохранения "лишних" эмбрионов, получаемых в таких программах [4, 14].

Таким образом, остаются актуальными исследования, направленные на детальный анализ уже существующих методов и их модификаций с целью оценки эффективности и преимуществ конкретных методических подходов. Это позволит, с одной стотectants mixture, which provides necessary dehydration and saturation of cells with cryoprotectant substance. Such an approach favourably distinguishes the ultra-rapid freezing from the vitrification [11], as it allows using more lower concentrations of cryoprotectants, that decreases the probability of their toxic influence on cell structures. As freezing medium permeable components the dimethyl sulfoxide, 1,2-propanediol, ethylene glycol and glycerol are used, as the impermeable additive the sucrose with various concentrations is applied [5, 6, 10, 16].

The analysis of literature data shows that despite a wide experimental experience and number of reports about successful application of various ultra-rapid freezing methods for cryopreservation of embryos of mouse, agricultural animals and human, there are no any standard protocols, and each of the offered ways has restrictions or in embryo's species origin, or in their development stage. The ratio of permeable and impermeable components in freezing medium and the time of cell equilibration on stage of their pre-processing remains under disscussion. As a rule these parameters are empirically selected and may vary within wide limits. At the same time it is known that the duration of embryos processing and the manipulations on them may affect the cell morphofunctional integrity. So even embryos have successfully developed *in vitro* after cryopreservation they can be failed in retention *in vivo*. The authors [14, 15] refers to both little amount of frozen-thawed embryos transplanted into a recipient, and to probable cytoskeleton and cell chromosome apparatus damage under direct effect of permeable cryoprotectants, and to inconsistency of developmental stages of frozen-thawed embryos and recipient natural reproductive cycles. Hence the extrapolation of concrete freezing methods, being effective for one mammal species, on embryos of another species or of the same species but of another development stage remains problematically. Especially it concerns human embryos cryopreservation as a essential part of the IVF programs aiming the preservation of "surplus" embryos, obtained in such programs [4, 14].

Thus it still remains actual to carry out the investigations directed to the detailed analysis of existing methods and its modifications with the purpose to estimate the efficiency and advantages of distinct method approaches. It will allow from one side the extending of application area of ultra-rapid freezing both with the species factor and with various developmental stages. From another side it will allow to obtain the information of cryostability and cryosensitivity mechanisms of pre-implantation embryos to cryopreservation factors, that makes a basis of science forecasting in searching the long-term storage methods.

The aim of the investigation is to study the influence of various ultra-rapid freezing stages in glycerol and sucrose based medium on osmotic resistance, morphofunctional and cytological characteristics of mouse embryos of pre-implantation developmental stages.

Матеріал, захищений авторським правом

роны, расширить рамки использования сверхбыстрого замораживания как по видовому фактору, так и по различным стадиям развития, а с другой — получить информацию о механизмах криоустойчивости и криочувствительности доимплантационных эмбрионов к факторам криоконсервирования, что составляет основу научного прогнозирования в поисках оптимизации методов долгосрочного хранения.

Цель работы — изучение влияния различных этапов сверхбыстрого замораживания в среде на основе глицерина и сахарозы на осмотическую устойчивость, морфофункциональные и цитологические характеристики эмбрионов мыши доимплантационных стадий развития.

Анализируемый метод сверхбыстрого замораживания был разработан вначале для криоконсервирования эмбрионов крыс и коров [2], а затем успешно применен для криоконсервирования эмбрионов мыши [3]. Следовательно, метод обладает определенной долей универсальности, однако положительные результаты были получены только для эмбрионов на стадии 6–8 бластомеров.

Наряду с оценкой морфофункциональной сохранности эмбрионов, мы уделили внимание осмотическому поведению эмбрионов мыши на этапах добавления криопротектора к клеткам, эквилибрации эмбрионов в среде замораживания, а также при последующей отмывке эмбрионов от криопротектора.

В работе использовали 1-, 2- и 8-клеточные ранние и 8-клеточные компактизированные эмбрионы мыши, полученные от суперовулированных самок F_1(CBA×C57Bl) промыванием физиологической средой Дюльбекко отпрепарированных яйцеводов забитых самок [1].

Цикл сверхбыстрого замораживания, описанный в [2, 3], включал следующие этапы:

эквилибрация эмбрионов в 10%-м растворе глицерина в течение 10 мин при комнатной температуре;

перенос эмбрионов в пластиковые пайеты, содержащие 5 мкл среды замораживания, состоящей из смеси 30% глицерина и 70% 1 М сахарозы (этап занимал не более 1,5 мин);

непосредственное погружение в жидкий азот и хранение;

быстрый отогрев пайет с эмбрионами в водяной бане при 38 °С и перенос в 0,5 М раствор сахарозы на 10 мин для удаления криопротектора;

4-кратная отмывка эмбрионов от сахарозы в физиологической среде Дюльбекко.

Осмотическое поведение эмбрионов изучали на этапах: добавления криопротектора к клеткам, эквилибрации в среде замораживания и последующей отмывки эмбрионов от среды криоконсервирования без непосредственного замораживания. Эмбрионы в небольшой (10 мкл) капле физиологической среды Дюльбекко помещали на предметное стекло и фиксировали под микроскопом МБИ-

The analysed ultra-rapid freezing method was developed firstly for cryopreservation of rat and cow embryos [2], and then was successfully applied for mouse embryos cryopreservation [3]. Hence, this method is to some extend universal, however the positive results were obtained only for embryos at 6–8 blastomeres stages.

Together with an evaluation of embryos' morphofunctional integrity, we have paid attention to the mouse embryos osmotic behaviour at the stages of adding cryoprotectant to cells, embryos' equilibration in freezing medium and also when removing cryoprotectant out of them.

1-, 2- and 8-cellular early and 8-cellular compactized mouse embryos derived from superovulated females F_1(CBA×C57Bl) were used in the work by means of washing-out already prepared oviducts of perished females by Dulbecco physiological medium [1].

The cycle of ultra-rapid freezing, described in the papers [2, 3] comprised the following stages:

equilibration of embryos in 10% glycerol for 10 min at room temperature;

transfer of embryos into plastic paillettes, containing 5 µl of freezing medium, comprising the mixture of 30% glycerol and 70% of 1 M sucrose (the stage took not more than 1.5 min);

direct plunging into liquid nitrogen and storage;

rapid thawing of paiettes with embryos in water bath and transfer into 0.5 M sucrose solution for 10 min to remove cryoprotectant;

4-fold washing-out of embryos with Dulbecco physiological medium.

Osmotic behaviour of embryos was studied at the stages: cryoprotectant adding to cells, equilibration in freezing medium and subsequent washing-out of embryos out-of cryopreservation medium without direct freezing. Embryos in small (10 µl) drop of Dulbecco physiological medium were placed on subject glass and fixed in MBI-13 microscope with glass micropipette, attached to micromanipulator MK-2. In micropipette a slight negative pressure was created, that prevented the loss of a cell in a process of solutions change. Recording of kinetics of cell osmotic response was carried-out using a camera. The time of adding the solutions was fixed by timing device. Experimental dependencies of the change in relative volume of cells on equilibration time in studied solutions were found. Morphofunctional integrity of embryos after the equilibration in the solutions of cryoprotectants and after the cycle of low-temperature preservation were assessed on their ability to proceed under *in vitro* conditions not less than three grades of cleavage. Cytological analysis of air-dry preparations of embryos, prepared according to the method of Tarkowsky A. K. [13], was conducted to estimate the state of genetic apparatus after low-temperature preservation.

Fig. 1 shows the characteristic dependencies of relative volume of 1-, 2- and early 8-cellular mouse

Матеріал, захищений авторським правом

13 с помощью стеклянной микропипетки, закрепленной в микроманипуляторе $МК_2$. В микропипетке создавалось небольшое отрицательное давление, что предотвращало потерю клетки в процессе смены растворов. Регистрацию кинетики осмотической реакции клеток осуществляли с помощью кинокамеры. Время добавления растворов фиксировали секундомером. Были получены экспериментальные зависимости изменения относительного объема клеток от времени эквилибрации в исследуемых растворах. Морфофункциональную сохранность эмбрионов после их эквилибрации в растворах криопротекторов и после цикла низкотемпературного консервирования оценивали по их способности проходить в условиях *in vitro* не менее трех делений дробления. Цитологический анализ суховоздушных препаратов эмбрионов, приготовленных по методу Тарковского А. К. [13], проводился для оценки состояния генетического аппарата после низкотемпературного консервирования.

На рис. 1 представлены характерные зависимости относительного объема 1-, 2- и ранних 8-клеточных эмбрионов мыши от времени экспозиции в процессе последовательной смены растворов (конкретные условия экспериментов указаны в подписи к рисунку). Анализ полученных результатов показал, что эмбрионы мыши на разных стадиях дробления обладают различной устойчивостью к данной процедуре. Устойчивость клеток возрастала в ряду "зигота–2-клеточный эмбрион–8-клеточный эмбрион", а основным этапом, ответственным за морфологическую целостность клеток, является этап удаления криопротекторов из среды эквилибрации. Анализируя экспериментальные зависимос-

embryos on exposure time in the process of consecutive change of the solutions (distinct conditions of experiments are given in legends and figures). Analysis of obtained results demonstrated that mouse embryos at different stages of cleavage possessed different resistance to given procedure. Cell resistance increased in the row: "zygote–2-cellular embryo–8-cellular embryo" and main stage, responsible for morphological integrity of cells, is the stage of cryoprotectant removal out-of equilibration medium. When analysing the experimental dependencies of changes in relative volume of cells on equilibration time in the studied solutions, one can qualitatively estimate the processes of mass transfer between cell and environment at each stage of treatment. The adding of 10% glycerol to 1-cellular mouse embryo (the first stage) causes a decrease in cellular volume in dehydration process down to the values of $0.48V_0 \pm 0.02V_0$ ($n = 5$), 10-min's equilibration of cells results in an increase of cell volume from minimum value to the values of $0.51V_0 \pm 0.01V_0$ ($n = 5$), that testifies to a partial penetration of glycerol into the cells. Following change of the first solution to the freezing medium, consisting of the mixture of 30% glycerol and 70% of 1 M sucrose (the second stage), results to a sharp decrease of cellular volume value due to additional dehydration in average down to $0.25V_0 \pm 0.01V_0$ ($n = 5$). Within 1.5 min of maintaining the 1-cellular embryos in this medium no more changes in the volume are observed and the change of the freezing medium to 0.5 M sucrose solution results in an increase of relative cellular volume up to the values of $0.44V_0 \pm 0.01V_0$ ($n = 5$), that testifies to water entering into a cell. Hypertonic concentration of sucrose prevented an extra swelling

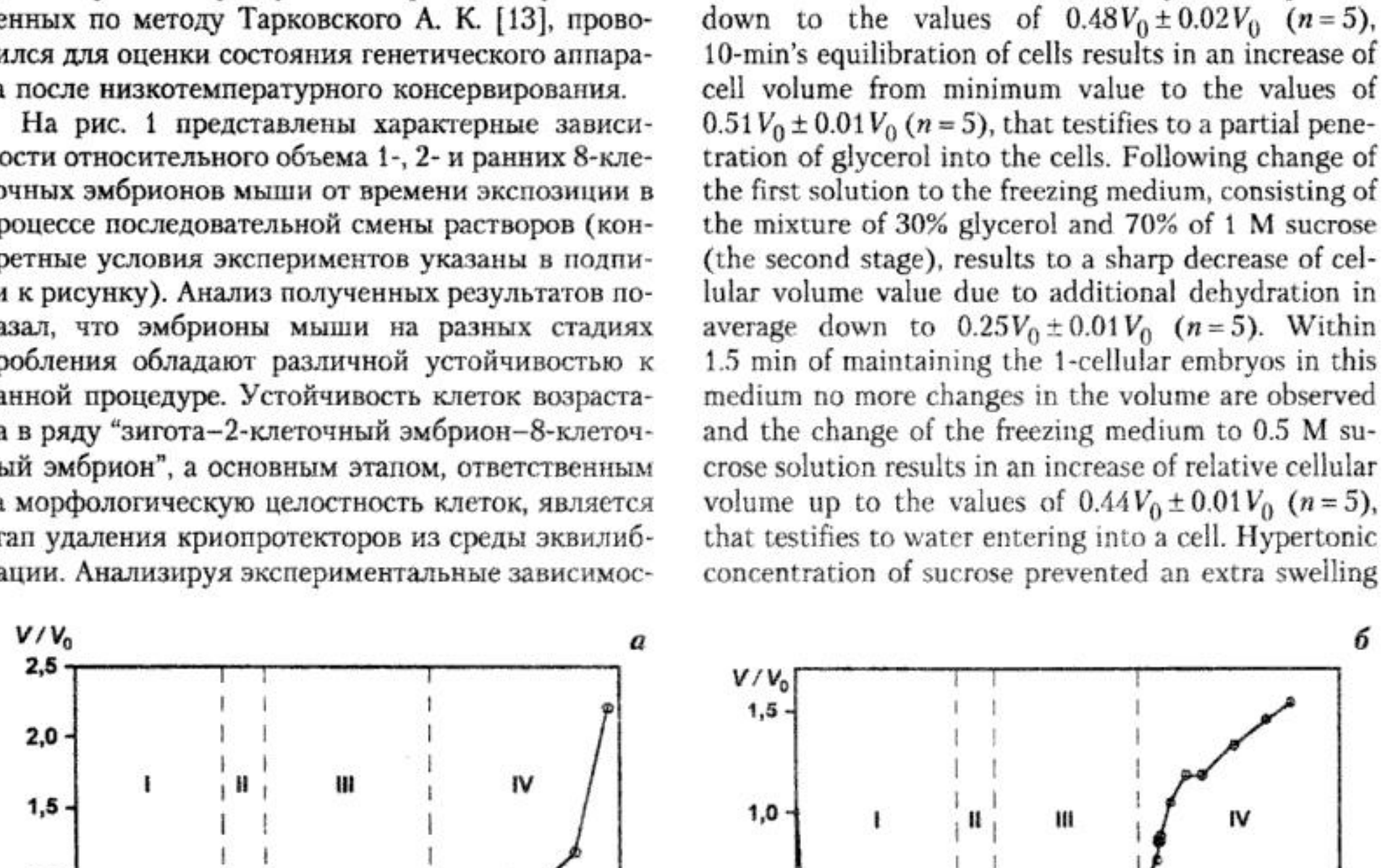


Рис. 1. Характерная зависимость относительного объема: *а* – 1-клеточного; *б* – 2-клеточного; *в* – 8-клеточного эмбриона мыши от времени эквилибрации в процессе последовательной смены растворов: I – 10%-го раствора глицерина на среде Дюльбекко; II – среды замораживания (30%-й раствор глицерина на 1 М растворе сахарозы); III – 0,5 М раствора сахарозы; IV – среды Дюльбекко.

Fig. 1. Characteristic dependencies of relative volume of *а* – 1-cell, *б* – 2-cell, *в* – 8-cell mouse embryo on the equilibration time in process of consecutive solution change: I – 10% glycerol solution based on Dulbecco medium; II – freezing medium (30% glycerol solution based on 1 M sucrose); III – 0.5 M sucrose solution; IV – Dulbecco medium.

Матеріал, захищений авторським правом

ти изменения относительного объема клеток от времени эквилибрации в исследуемых растворах, можно качественно оценить процессы массопереноса между клеткой и окружающей средой на каждом этапе обработки. Так, добавление 10%-го раствора глицерина к одноклеточному эмбриону мыши (этап I) вызывает уменьшение клеточного объема в процессе обезвоживания до значений $0{,}48V_0 \pm 0{,}02V_0$ ($n = 5$), 10-минутная эквилибрация клеток приводит к увеличению объема клетки от минимального значения до значений $0{,}51V_0 \pm 0{,}01V_0$ ($n = 5$), что свидетельствует о частичном проникновении глицерина в клетки. Последующая замена первого раствора на среду замораживания, состоящую из смеси 30% глицерина и 70% 1 М сахарозы (этап II), приводит к резкому уменьшению величины клеточного объема за счет дополнительной дегидратации в среднем до $0{,}25V_0 \pm 0{,}01V_0$ ($n = 5$). В течение 1,5 мин выдерживания 1-клеточных эмбрионов в этой среде изменений объема больше не наблюдается, а замена среды замораживания на 0,5 М раствор сахарозы приводит к увеличению относительного клеточного объема до значений $0{,}44V_0 \pm 0{,}01V_0$ ($n = 5$), что свидетельствует о поступлении воды в клетку. Гипертоническая концентрация сахарозы предотвращала чрезмерное набухание клетки, однако последующая отмывка зиготы в среде Дюльбекко приводила к резкому и чрезмерному увеличению относительного объема зигот до значений, превышающих исходные в 1,6, а иногда и в 2 раза.

В случае с 2-клеточным эмбрионом наблюдалось аналогичное поведение клеток на всех этапах обработки. Однако следует отметить, что насыщение клеток криопротектором на этапе I происходит в большей степени. Относительный клеточный объем менялся от $0{,}51V_0 \pm 0{,}01V_0$ до $0{,}64V_0 \pm 0{,}02V_0$, а значение минимального объема на этапе II составляло $0{,}35V_0 \pm 0{,}02V_0$ ($n = 5$). Можно предположить, что 10-минутная экспозиция 2-клеточных эмбрионов приводит к большему насыщению клеток криопротектором, что уменьшает опасность чрезмерной дегидратации клеток на этапе II по сравнению с зиготой. Однако 10-минутная экспозиция в 0,5 М растворе сахарозы недостаточна для удаления глицерина из клетки, и конечный этап (помещение клеток в физиологическую среду Дюльбекко) приводит к набуханию эмбрионов – относительный объем превышает исходное значение в 1,3–1,4 раза. В некоторых случаях наблюдалось образование мембранных волдырей на поверхности бластомеров.

Осмотическое поведение 8-клеточных эмбрионов на всех этапах значительно отличалось от поведения эмбрионов предыдущих стадий. Эквилибрация в 10%-м растворе глицерина приводила сначала к уменьшению относительного клеточного объема до значений $0{,}52V_0 \pm 0{,}09V_0$ в процессе дегидратации, а к 9–10-й минуте экспозиции наблюдалось увеличение количественных значений объема

of cell, but following washing-out of zygote in Dulbecco medium resulted in a sharp and extreme increase in relative volume of zygotes up to the values exceeding initial in 1.6, and sometimes twice.

In the case with 2-cellular embryo we observed analogous behaviour of cells at all stages of treatment. However it should be noted that cell saturation by cryoprotectant at the first stage occurs in a greater extent. Relative cellular volume changed from $0.51V_0 \pm 0.01V_0$ up to $0.64V_0 \pm 0.02V_0$, and the value of minimum volume at the second stage made $0.35V_0 \pm 0.02V_0$ ($n = 5$). One can suppose that 10 min exposure of 2-cellular embryos results in a greater saturation of cells by cryoprotectant, that decreases the danger of extra dehydration of cells at the second stage in comparison with zygote. However 10 min exposure in 0.5 M sucrose solution is insufficient for the removal of glycerol out of cell and a final stage (cells placing into Dulbecco physiological medium) results in embryos swelling: relative volume exceeds initial value in 1.3–1.4 times. In some cases we the formation of membrane blebs on blastomere surface.

Osmotic behaviour of 8-cellular embryos at all stages considerably differed from the behaviour of embryos of previous stages. Equilibration in 10% glycerol solution firstly resulted in a reduction of relative cellular volume down to values of $0.52V_0 \pm 0.09V_0$ in the process of the dehydration and to the 9–10th minutes of exposure the increase of quantitative volume values up to $0.85V_0 \pm 0.04V_0$ ($n = 5$) was observed, that testifies to the entering of big amount of glycerol into the cells in comparison with 1- and 2-cellular embryos. The value of minimum volume after freezing medium adding made $0.45V_0 \pm 0.04V_0$ ($n = 5$). Substitution of freezing medium to washing-out sucrose solution caused an initial increase in cellular volume up to $0.72V_0 \pm 0.04V_0$ and then as glycerol releases out of a cell its reduction took place down to the values of $0.56V_0 \pm 0.08V_0$ to the 10th min of equilibration. Following transfer of cells to Dulbecco physiological medium resulted in a gradual returning of blastomeres volume to their initial values. No morphological impairments were observed during this and deviations of the values of relative cellular volume from native ones did not have a sharp character as it was in the case with 1- and 2-cellular embryos, although in some cases non-isotropic shrinking of blastomeres was observed.

Obtained data can be explained by different extent of permeability of plasmatic membranes of 1-, 2- and 8-cellualr embryos for glycerol molecules. It is know that permeability for this cryoprotectant increases almost twice after oocyte fertilization as well as with the development of embryo [8]. From this point of view an optimal stage of the development for cryopreservation by the mentioned way remains the stage of 8 blastomeres. However the possibility of adaptation of this method for 2-cellular stage could not be excluded. In this case the further investigations of the process of saturation with glycerol of cells to find

Матеріал, захищений авторським правом

до $0{,}85\,V_0 \pm 0{,}04\,V_0$ ($n = 5$), что свидетельствует о поступлении большего количества глицерина в клетки по сравнению с 1- и 2-клеточными эмбрионами. Значение минимального объема после добавления среды замораживания составляло $0{,}45V_0 \pm 0{,}04V_0$ ($n = 5$). Замена среды замораживания на отмывочный раствор сахарозы вызывала первоначальное увеличение клеточного объема до $0{,}72V_0 \pm 0{,}04V_0$, а затем, по мере выхода глицерина из клетки, происходило его уменьшение до значений порядка $0{,}56V_0 \pm 0{,}08V_0$ к 10-й минуте эквилибрации. Последующий перенос клеток в физиологическую среду Дюльбекко приводил к плавному возвращению объемов бластомеров к их исходным значениям. Морфологических нарушений при этом не наблюдалось, а отклонения величин относительного клеточного объема от нативных значений не носили такого резкого характера, как в случае 1- и 2-клеточных эмбрионов, хотя в некоторых случаях происходило неизотропное сжатие бластомеров.

Полученные данные можно объяснить различной степенью проницаемости плазматических мембран 1-, 2- и 8-клеточных эмбрионов для молекул глицерина. Известно, что проницаемость к этому криопротектору возрастает почти в 2 раза после оплодотворения яйцеклетки, а также по мере развития эмбриона [8]. С этой точки зрения оптимальной стадией развития для консервирования указанным способом остается стадия восьми бластомеров. Однако нельзя исключить возможность адаптации данного метода для 2-клеточной стадии. В этом случае необходимы дальнейшие исследования процесса насыщения клеток глицерином с целью оптимизации условий добавления криопротектора и отмывания клеток от среды замораживания.

Данные о морфофункциональной сохранности 2- и 8-клеточных эмбрионов, подвергавшихся 20-минутной эквилибрации в 1 М растворе глицерина, соответствующему 10%-й объемной концентрации, представлены на рис. 2. В контрольной группе жизнеспособность эмбрионов мыши различных стадий развития достоверно не отличалась друг от друга. После эквилибрации с криопротектором доля эмбрионов всех стадий развития, прошедших в условиях *in vitro* как минимум три деления дробления, была достоверно меньше, чем в контроле. Так, для 2-клеточных эмбрионов эта величина составила 78,95%, по сравнению с 82,98% для контрольной группы ($p < 0{,}05$). Полученные данные еще раз подтверждают, что глицерин в 10%-й концентрации не является губительным для эмбрионов 2-клеточной стадии и легко удаляется 0,5 М раствором сахарозы.

Доля 8-клеточных эмбрионов мыши, сохранивших свою морфологию после полного цикла криоконсервирования, составила 83,33% (30 из 36), однако в условиях *in vitro* только 55,56% (20 из 36) достигли стадии бластоцисты через 36 ч культивирования. При этом 24,91% из них имели нарушения, обнаруженные при цитологическом анализе. Уровень патологических митозов в эмбрионах, подвергнутых замораживанию-оттаиванию, был достоверно выше (13,7%), чем в нативных эмбрионах (3,9%). Среди наблюдаемых патологий митоза 30% были связаны с повреждением митотического

optimal conditions for cryoprotectant adding and washing-out of the cells out of freezing medium are essential.

The data on morphofunctional integrity of 2- and 8-cellular embryos subjected to 20-min equilibration in 1 M glycerol solution, corresponding to 10% volumetric concentration are given in Fig. 2. In the control group the viability of mouse embryos of different developmental stages statistically did not differ from each other. After equilibration with cryoprotectant the part of embryos of all development stages, having under *in vitro* at least three cleavage grades, was statistically less than the control. Thus for 2-cellular embryos this value made 78.95% in comparison with 82.98% for the control group ($p < 0.05$). Obtained data once more confirm that glycerol under 10% concentration is not ruinous for embryos of 2-cellular stage and easily removed by 0.5 M of sucrose.

The part of 8-cellualr mouse embryos, kept their morphology after a complete cryopreservation cycle made 83.33% (30 of 36), but under *in vitro* conditions only 55.56% (20 of 36) achieved the stage of blastocyst in 36 hrs of culturing. In this case 24.91% of them had the impairments, found during cytological analysis. The level of pathological mitoses in embryos, subjected to freeze-thawing was significantly higher (13.7%) than in native embryos (3.9%). Among the observed mitosis pathologies 30% were connected to mitotic apparatus damage: three-pole and monocentric mitosis, hollow and three-group metaphase; 70% of pathologies were found with damage of chromosome: chromosome delay in metaphase, chromatide bridges, appearance of micronuclei and chromosome adhesion. Impairment of normal course of mitosis results in the appearance of cells with changed karyotype, also such cells can be viable. Thus the conducted analysis showed that all stages of freezing significantly affected the embryos integrity. In this case for estimation of efficiency of this or other cryopreservation method along with the evaluation of viability it is necessary to attract both theoretical approaches and cytological

Рис. 2. Жизнеспособность эмбрионов мыши после 20-минутной эквилибрации в 1 М растворе глицерина: □ — контроль; ■ — опыт.

Fig. 2. Mouse embryo viability after 20 min equilibration in 1 M glycerol solution: □ — control, ■ — experiment.

Матеріал, захищений авторським правом

аппарата: трехполюсный и моноцентрический митозы, полая и трехгрупповая метафазы; 70% патологий – с повреждением хромосом: отставание хромосом в метафазе, хроматидные мосты, появление микроядер и слипание хромосом. Нарушение нормального течения митоза приводит к появлению клеток с измененным кариотипом, хотя такие клетки и могут быть жизнеспособными. Таким образом, проведенный анализ показал, что все этапы замораживания существенно влияют на сохранность эмбрионов. При этом для оценки эффективности того или иного метода криоконсервирования наряду с оценкой жизнеспособности необходимо привлекать как теоретические подходы, так и цитологический анализ для выяснения причин криочувствительности клеток к действию различных факторов криоконсервирования с целью их оптимизации.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Биология* развития млекопитающих. Методы: Пер. с англ. / Под ред. М. Манк.– М.: Мир, 1990.– 406 с.
2. *Исаченко В. В., Грищенко В. И., Осташко Ф. И. и др.* Сверхбыстрое замораживание эмбрионов крыс и коров без "классической" эквилибрации // Пробл. криобиологии.– 1994.– № 3.– С. 3–7.
3. *Кривохарченко А. С., Вильянович Л. И., Серобян Г. А. и др.* Выживаемость эмбрионов мыши после сверхбыстрого замораживания разными способами с использованием различных криопротекторов // Пробл. репродукции.– 1995.– № 4.– С. 13–17.
4. *Петрушко М. П.* Использование криоконсервированных эмбрионов человека во вспомогательных репродуктивных технологиях // Пробл. криобиологии.– 2000.– № 1.– С. 71–75.
5. *Bongso A., Chye N. S., Sathananthan H. et al.* Chromosome analysis of two-cell mouse embryos frozen by slow and ultrarapid methods using two different cryoprotectants // Fertil. Steril.– 1988.– 49, № 5.– P. 908–912.
6. *Emiliani S., Van den Bergh M., Vannin A. S. et al.* Comparison of ethylene glycol, 1,2-propanediol and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocysts // Hum. Reprod.– 2000.– 15, № 4.– P. 905–910.
7. *Friedler S., Guidice L. C., Lamb E. J.* Cryopreservation of embryos and ova // Fertil. Steril.– 1988.– 49, № 5.– P. 743–764.
8. *Jascowsky S. C., Leibo S. P., Mazur P.* Glycerol permeability of fertilized and unfertilized mouse ova // J. Exp. Zool.– 1980.– 212.– P. 329–341.
9. *Krag K. T., Koehler I. M., Wright R. W.* A method for freezing early murine embryos by plunging directly into liquid nitrogen // Theriogenology.– 1985.– 22, № 6.– P. 119.
10. *Maznio A., Takahashi Y., Valdes C. A. et al.* Effect of various cryoprotectants on survival of mouse embryos cryopreserved by the quick freezing method // J. Vet. Res.– 1989.– 37, № 2.– P. 29–39.
11. *Rall W. F.* Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification // Cryobiology.– 1987.– 24, № 5.– P. 387–402.
12. *Takeda T., Elsen R., Seidel G. E.* Cryopreservation of mouse embryos by direct plunging into liquid nitrogen // Theriogenology.– 1984.– 21, № 1.– P. 266.
13. *Tarkowsky A.K.* An air-drying method for chromosome preparation from mouse eggs // Cytogenetics.– 1966.– № 5.– P. 394–400.
14. *Trounson A.O., Peura A., Kirby C.* Ultrarapid freezing: A new low-cost and effective method of embryo cryopreservation // Fertil. Steril.– 1987.– 48, № 5.– P. 843–850.
15. *Vincent C., Johnson M.H.* Cooling, cryoprotectants and the cytoskeleton of mammalian oocytes // Oxford Rev. Reprod. Biol.– 1992.– 14.– P. 73–100.
16. *Wilson L., Quinn P.* Development of mouse embryos cryopreserved by an ultra-rapid method of freezing // Hum. Reprod.– 1989.– 4, № 1.– P. 86–90.

Поступила 13.02.2001

analysis to reveal the causes of cryosensitivity of cells to the effect the different factors of cryopreservation with the aim of optimization.

REFERENCES

1. *Biology* of mammals development. Methods // Ed. by M. Mank.– M.: Mir, 1990.– 406 p.
2. *Isachenko V. V., Gryschenko V. I., Ostashko F. I. et al.* Ultra-rapid freezing of rat and cow embryos without "classic" equilibration // Problems of Cryobiology.– 1994.– № 3.– P. 3–7.
3. *Krivokharchenko A. S., Vilyanovich L. I., Serobyan G. A. et al.* Mouse embryos survival after ultra-rapid freezing with various ways and using various cryoprotectants // Probl. reproduktsii.– 1995.– № 4.– P. 13–14.
4. *Petrushko M. P.* Usage of human cryopreserved embryos in auxiliary reproductive technologies // Problems of Cryobiology.– 2000.– № 1.– P. 71–75.
5. *Bongso A., Chye N. S., Sathananthan H. et al.* Chromosome analysis of two-cell mouse embryos frozen by slow and ultrarapid methods using two different cryoprotectants // Fertil. Steril.– 1988.– 49, № 5.– P. 908–912.
6. *Emiliani S., Van den Bergh M., Vannin A. S. et al.* Comparison of ethylene glycol, 1,2-propanediol and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocysts // Hum. Reprod.– 2000.– 15, № 4.– P. 905–910.
7. *Friedler S., Guidice L. C., Lamb E. J.* Cryopreservation of embryos and ova // Fertil. Steril.– 1988.– 49, № 5.– P. 743–764.
8. *Jascowsky S. C., Leibo S. P., Mazur P.* Glycerol permeability of fertilized and unfertilized mouse ova // J. Exp. Zool.– 1980.– 212.– P. 329–341.
9. *Krag K. T., Koehler I. M., Wright R. W.* A method for freezing early murine embryos by plunging directly into liquid nitrogen // Theriogenology.– 1985.– 22, № 6.– P. 119.
10. *Maznio A., Takahashi Y., Valdes C. A. et al.* Effect of various cryoprotectants on survival of mouse embryos cryopreserved by the quick freezing method // J. Vet. Res.– 1989.– 37, № 2.– P. 29–39.
11. *Rall W. F.* Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification // Cryobiology.– 1987.– 24, № 5.– P. 387–402.
12. *Takeda T., Elsen R., Seidel G. E.* Cryopreservation of mouse embryos by direct plunging into liquid nitrogen // Theriogenology.– 1984.– 21, № 1.– P. 266.
13. *Tarkowsky A.K.* An air-drying method for chromosome preparation from mouse eggs // Cytogenetics.– 1966.– № 5.– P. 394–400.
14. *Trounson A.O., Peura A., Kirby C.* Ultrarapid freezing: A new low-cost and effective method of embryo cryopreservation // Fertil. Steril.– 1987.– 48, № 5.– P. 843–850.
15. *Vincent C., Johnson M.H.* Cooling, cryoprotectants and the cytoskeleton of mammalian oocytes // Oxford Rev. Reprod. Biol.– 1992.– 14.– P. 73–100.
16. *Wilson L., Quinn P.* Development of mouse embryos cryopreserved by an ultra-rapid method of freezing // Hum. Reprod.– 1989.– 4, № 1.– P. 86–90.

Accepted in 13.02.2001

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 611.36.018.1: 612.592

UDC 611.36.018.1: 612.592

Уровень АТФ в изолированных гепатоцитах на этапах холодового хранения в средах различного состава

Л. П. КРАВЧЕНКО, О. А. СЕМЕНЧЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Б. Д. ФУЛЛЕР

Королевский госпиталь, отделение хирургии, Лондон

ATP Level in Isolated Hepatocytes at Stages of Cold Storage in the Media with Different Composition

L. P. KRAVCHENKO, O. A. SEMENCHENKO

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

B. J. FULLER

University Department of Surgery, Royal Free & University College Medical School, London, United Kingdom

Изучали изменение жизнеспособности изолированных гепатоцитов и их энергетического статуса на различных этапах гипотермического хранения и последующей нормотермической инкубации. Установлена эффективность сахарозосодержащего раствора (ССР) для длительного хранения изолированных клеток печени при 4 °С.

Вивчали зміни життєздатності ізольованих гепатоцитів та їх енергетичного статусу на різних етапах гіпотермічного зберігання та послідуючої нормотермічної інкубації. Встановлено ефективність сахарозовмісного середовища (СВС) для тривалого зберігання ізольованих клітин печінки при 4 °С.

The change in the viability of isolated hepatocytes and their energetic status at different stages of hypothermic storage and following normothermic incubation was studied. The efficiency of a sucrose-based medium for a long-term storage of liver's isolated cells at 4 °C was established.

При разработке новых и улучшении существующих методов холодового хранения целой печени используют четыре основные модели: перфузированный целый орган, срезы печени, изолированные гепатоциты в культуре и в суспензии [8, 12]. Последние две модели — предмет самостоятельных исследований в криобиологии и криомедицине, поскольку изолированные паренхиматозные клетки печени животных и человека применяются в клинической практике для лечения больных с острой печеночной недостаточностью, а также при создании искусственной печени [8].

Цель исследования — изучение изменения жизнеспособности изолированных гепатоцитов и их энергетического статуса на этапах гипотермического хранения клеток при 4 °С в средах различного состава и после нормотермической инкубации.

Гепатоциты выделяли из печени лабораторных крыс (вес 200–250 г) с применением перфузии печени сахарозным раствором, содержащим 4 мМ ЭДТА [4]. Данный метод обеспечивает получение из 8–10 г печени 300–400 млн изолированных ге-

When elaborating new methods and improving the existed ones for a cold storage of the whole liver 4 main models are used, they are: a perfused whole organ, liver slices, isolated hepatocytes in culture and suspension [8, 12]. Two latter models are the subject for independent investigations in cryobiology and cryomedicine, because isolated parenchymatous cells of animals and human liver are applied in a clinical practice both to treat patients with acute liver insufficiency and when creating an artificial liver [8].

Investigation of the change in the viability of isolated hepatocytes and their energetic status at stages of hypothermia the cell storage under 4 °C in the media with different composition and after normothermic incubation, was the aim of the given work.

Hepatocytes were isolated from the liver of laboratory rats (weight 200–250 g) using liver perfusion with the sucrose solution containing 4 mM EDTA [4]. The given method provides the obtaining from 300–400 mln. of isolated hepatocytes from 8–10 g of liver, viability of those makes 90 ± 5% (according to the data of vital dye excluding). After isolation hepa-

Матеріал, захищений авторським правом

патоцитов, жизнеспособность которых составляет 90 ± 5% (по данным исключения витального красителя). После выделения изолированные гепатоциты ресуспендировали в средах различного состава, выбор которых определялся задачами эксперимента. Исследовали следующие консервирующие среды: ССР, разработанный ИПКиК НАН Украины [5], модифицированный раствор UW [9] и ССР, приготовленный на гистидиновом буфере (90 мМ), который используется в комбинации с раствором UW для стабилизации *pH* [7].

Гипотермическое хранение изолированных гепатоцитов при 4 °С проводили в бакпечатках (объем суспензии 5 мл, концентрация клеток $2–4 \cdot 10^6$/мл) в течение 1, 24 и 48 ч. После каждого периода холодового хранения консервирующие среды удаляли, а осадок гепатоцитов ресуспендировали в Кребс-Рингер-бикарбонатном буфере и проводили нормотермическую инкубацию клеток при 37 °С. Предварительно буфер насыщали карбогеном (3 мин), после чего в его состав добавляли 5 ммоль глюкозы и 1% БСА. Инкубацию суспензии клеток печени проводили в стеклянных плоскодонных колбах в водяном термостате, постоянно перемешивая в течение 90 мин. Концентрация клеток при инкубации не превышала 1–2 млн/мл. После холодового хранения и последующей нормотермической инкубации сохранность изолированных гепатоцитов оценивали по исключению клетками витального красителя (0,6%-го трипанового синего), приготовленного на физиологическом растворе, *pH* 7,4, и по содержанию внутриклеточного АТФ, уровень которого определяли с помощью готового набора фирмы SIGMA, согласно методике [6] на спектрофотометре CARY-50 (производство Австралия). Метод основан на переходе 1,3-дифосфоглицерата в глицеральдегид-3-фосфат, который в конце реакции сопровождается окислением НАДН в НАД и полученный продукт эквивалентен молярному содержанию АТФ в образце.

Все используемые в работе реактивы импортного и отечественного производства имели квалификацию "х.ч." и "ч.д.а.". При обработке полученных данных использовалась статистическая программа Original. Достоверность изменений определялась с привлечением one-way ANOVA-test.

В исследованиях морфометрических показателей изолированных гепатоцитов на различных этапах холодового хранения [11] была показана высокая эффективность консервирующего раствора, содержащего изотоническую сахарозу, сывороточный альбумин и ионы кальция, по сохранению клеточного объема, жизнеспособности и морфологии клеточной поверхности. Эффект ССР был продемонстрирован в сравнении с консервирующими средами, которые применяются в клинической трансплантологии: раствор гипертонического цитрата и модифицированный раствор UW. В данной серии экспериментов мы продолжили сравнительное

tocytes were re-suspended in the media with different composition, selection of those was determined by the aims of experiment. The following preserving media were investigated: sucrose-based solution (SBS), elaborated at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine [5], modified UW solution [9] and sucrose-based solution (SBS), prepared with a histidine buffer (90 mM), used in the combination with UW solution for *pH* stabilization [7].

Hypothermia storage of isolated hepatocytes under 4 °C was carried-out in the containers (volume of the suspension was 5 ml, cell concentration made $2–4 \cdot 10^6$/ml) during 1, 24 and 48 hrs. After each period of cold storage the preserving media were removed, supernatant of hepatocytes was re-suspended in Krebs–Ringer's bicarbonate buffer and normothermic incubation of cells was done under 37 °C. Buffer was preliminarily saturated with carbogen (3 min), then 5 mM glucose and 1% BSA were added into its composition. Incubation of liver cell suspension was carried-out in the glass flat-bottomed flasks in a water thermostat, with constantly mixturing during 90 min. Cell concentration during incubation did not exceed 1–2 mln/ml. After cold storage and further normothermic incubation the integrity of isolated hepatocytes was estimated on the vital dye excluding by cells (0.6% trypane blue), prepared with physiological solution, *pH* 7.4, and on the content of intracellular ATP, the level of which was determined by means of the prepared set (SIGMA), according to the method [6] by means of CARY-50 spectrophotometer (Australia). The method is based on the transition of 1,3-diphosphoglycerate into glyceraldehyde-3-phosphate, accompanied by NADH and NAD oxidation at the finishing of reaction and the obtained product became an equivalent to a molar ATP content in the sample.

All used in the work reagents of home and foreign production is qualified as chemically pure and pure for analysis. When processing the data, a statistical "Original" software was used. Significance of the changes was determined with the attraction of one-way ANOVA-test.

In the experiments of morphological indices of isolated hepatocytes at different stages of cold storage [11] a high efficiency of the preserving solution, comprising isotonic sucrose, bovine albumin and calcium ions in respect of cellular volume keeping, as well as viability and morphology of the cellular surface, was demonstrated. SBS effect was demonstrated in comparison with the preserving media, applied in clinical transplantology, such as solution of hypertonic citrate and modified UW solution. In the given series of experiments we continued a comparative study of hypothermic storage of hepatocytes in SBS and modified variant of UW solution basing on the change of the ATP intracellular composition.

The level of ATP recovery after various terms of hepatocytes hypothermic storage and further nor-

Матеріал, захищений авторським правом

изучение гипотермического хранения гепатоцитов в ССР и модифицированном варианте раствора UW на основании изменения внутриклеточного содержания АТФ.

Исследовался также уровень восстановления АТФ после различных сроков гипотермического хранения гепатоцитов и последующей нормотермической инкубации. Способность клеток к ресинтезу АТФ и отсутствие деградации адениннуклеотидов в физиологических условиях после холодовой ишемии является надежным прогностическим показателем сохранности клеток в целом [1].

Как показали результаты исследований, ресуспендирование изолированных гепатоцитов в различных средах практически не изменяло их жизнеспособность после часового холодового хранения при 4 °С (рис. 1). Уровень АТФ в образцах ССР-1, ССРг-2, UW-3 составлял 34, 32 и 34 нмоль/млн клеток соответственно (рис. 2). По данным [2] содержание АТФ в свежевыделенных гепатоцитах с жизнеспособностью не менее 90% составляет 25–50 нмоль/млн клеток. Следует отметить, что уровень АТФ в изолированных гепатоцитах коррелирует в целом с качеством выделенных клеток и состоянием их плазматических мембран. Полученные результаты свидетельствуют о высокой степени интактности клеток печени и их адекватной реакции на условия краткосрочного холодового хранения в средах различного состава.

Объективным показателем оценки метаболической активности изолированных клеток и органов является поддержание сбалансированного метаболизма в физиологических условиях Для проверки сохранности изолированных гепатоцитов после холодового хранения в средах различного состава клетки дополнительно инкубировали в мимothermic incubation was also investigated. Cell capability to the ATP re-synthesis and the absence of adenine-nucleotides under physiological conditions after a cold ischemia is a reliable prognostic index of the cell stability in the whole.

The results of investigation demonstrated, that resuspending of isolated hepatocytes in different media practically did not change their viability after 1 hrs' cold storage at 4 °C (Fig. 1). ATP level in the samples (SBS-1, SBSh-2, UW-3) made 34, 32 and 34 nM/mln of cells, correspondingly (Fig. 2). According to the data [2], ATP composition in freshly isolated hepatocytes with the viability of not less, than 90% is 25–50 nM/mln of cells. It should be noted, that ATP level in isolated hepatocytes in the whole correlates with the quality of isolated cells and the state of their plasmatic membranes. The obtained results testify to a high extent of intactness in liver cells and their adequate response a short-term cold storage in the media with different composition.

Maintenance of the balanced metabolism under physiological conditions is an objective index of the estimation of metabolic activity in isolated cells and organs. To check the integrity of isolated hepatocytes after a cold storage in the media of various composition cells were additionally incubated in a minimum saline medium under 37 °C. A high capability of freshly isolated hepatocytes to increase the ATP level after normothermic incubation has been established, that confirmed the balanced stabilizing of energetic metabolism. The rate of ATP level rising after 1 hrs' cold storage was practically the same and did not depend on the composition of preserving solution (0.26, 0.25 and 0.23 nM/min, correspondingly for 1, 2, 3 solutions). Isolated liver cells, obtained by means of non-enzymic method have a complete balance of the

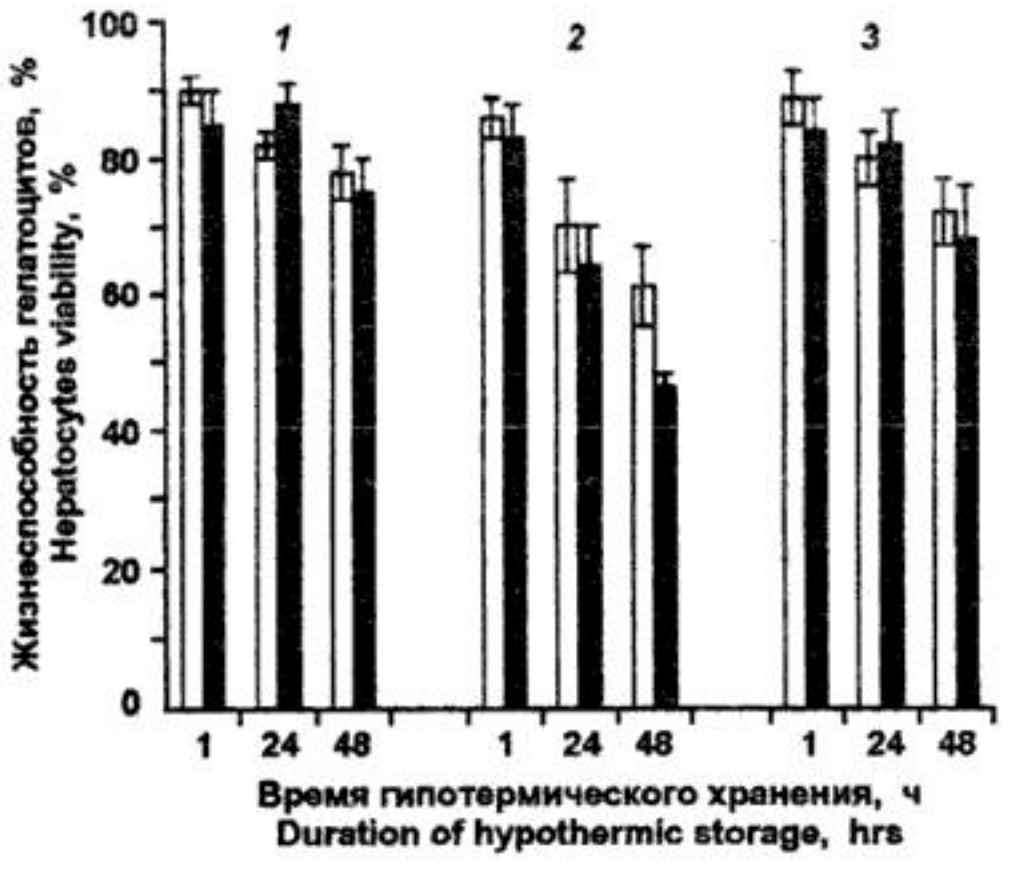


Рис. 1. Жизнеспособность изолированных гепатоцитов: □ – после гипотермического хранения; ■ – нормотермической инкубации; *1* – ССР; *2* – ССР на гистидиновом буфере; *3* – раствор UW.

Fig. 1. Viability of isolated hepatocytes after: □ – hypothermic storage; ■ – normothermic incubation; *1* – SBS; *2* – SBS with a histidine buffer; *3* – UW solution.

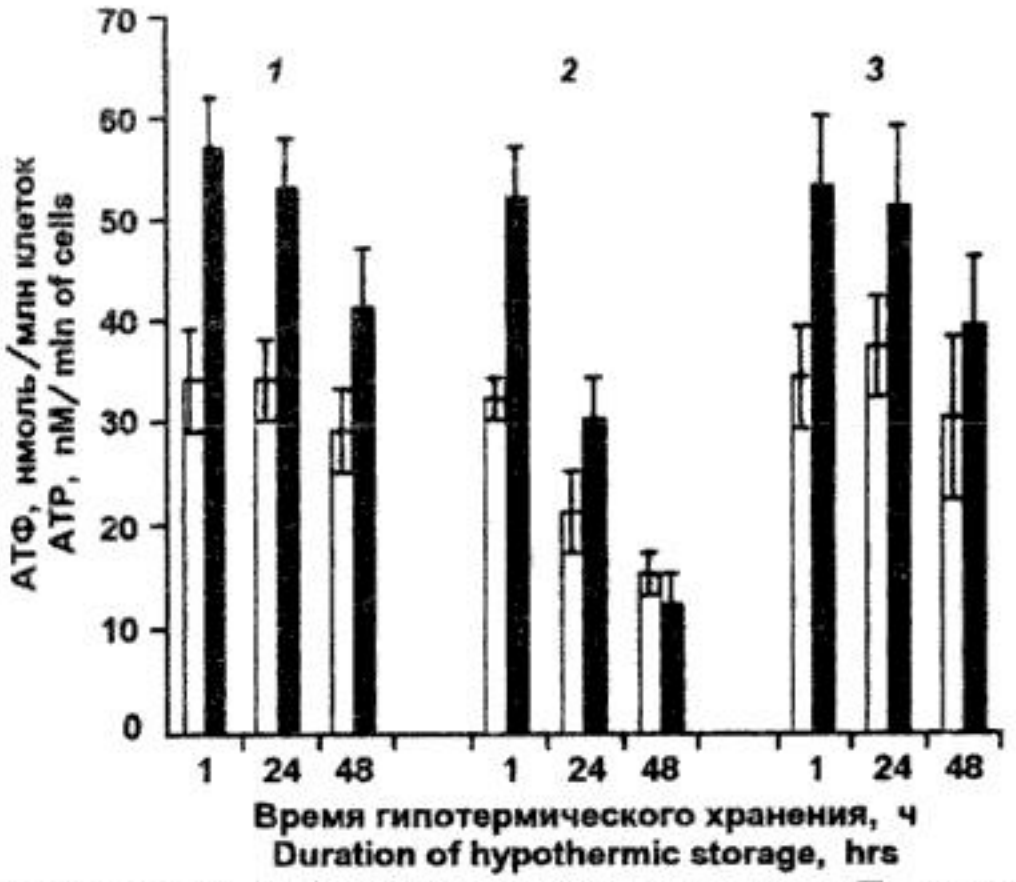


Рис. 2. Уровень АТФ в изолированных гепатоцитах: □ – после гипотермического хранения; ■ – нормотермической инкубации; *1* – ССР; *2* – ССР на гистидиновом буфере; *3* – раствор UW.

Fig. 2. ATP level in isolated hepatocyets after: □ – hypothermic storage; ■ – normothermic incubation; *1* – SBS; *2* – SBS on a histidine buffer; *3* – UW solution.

Матеріал, захищений авторським правом

нимальной солевой среде при 37 °С. Установлена высокая способность свежевыделенных гепатоцитов повышать уровень АТФ после нормотермической инкубации, что подтверждает сбалансированность энергетического метаболизма. Скорость повышения уровня АТФ после часового холодового хранения была практически одинакова и не зависела от состава консервирующего раствора (0,26, 0,25 и 0,23 нмоль/мин соответственно для растворов 1, 2 и 3). Изолированные клетки печени, полученные неферментативным методом, имеют полную сбалансированность энергообразующих и энергопотребляющих процессов, и краткосрочная холодовая ишемия не является лимитирующим моментом для дальнейшего повышения энергетического пула в условиях, приближенных к физиологическим.

Суточное хранение суспензии изолированных гепатоцитов в условиях холодовой ишемии в средах различного состава приводит к следующим изменениям изучаемых показателей. Жизнеспособность образцов в растворах 1 и 3 снижается незначительно и составляет 82 и 80% соответственно (рис. 1), а в растворе 2 достоверно снижается до 70%. Уровень АТФ в клетках печени после холодового хранения в средах 1 и 3 остается без изменения, а в среде 2 отмечается снижение этого показателя (< 0,05). Последующая нормотермическая инкубация образцов в минимальной солевой среде приводит к достоверному увеличению уровня АТФ во всех исследуемых группах (рис. 2), однако степень достоверности отличается. Регенерация содержания АТФ в клетках печени в физиологических условиях после суточного хранения проходила со скоростью 0,21, 0,09 и 0,24 нмоль/мин для растворов 1, 2 и 3 соответственно. Полученные данные свидетельствуют о том, что ССР и среда UW практически одинаково сохраняют структурные и метаболические свойства изолированных гепатоцитов в условиях холодовой гипоксии. Клетки, суспендированные в этих растворах, способны в физиологических условиях восстанавливать уровень АТФ почти до контрольного уровня. Дальнейшее хранение образцов в условиях холодовой ишемии (48 ч) привело к снижению жизнеспособности изолированных гепатоцитов (рис. 1). Содержание АТФ в клетках, хранившихся в средах 1 и 3, практически не изменилось, а в среде 2 наблюдалось дальнейшее снижение этого показателя (рис. 2). Последующая инкубация гепатоцитов (группы 1 и 3) в физиологических условиях не способствовала повышению уровня АТФ, однако он и не снижался, что также является положительным моментом для характеристики растворов. Исследования по изучению исключения клетками трипанового синего, профиля плазматической мембраны и объема жизнеспособных изолированных гепатоцитов [3] показали, что перечисленные параметры полностью сохраняются при использовании растворов 1 и 3 после 48-часового холодового хранения. Далее наблюдалось снижение жизнеспособности клеток, изменение профиля плазматических мембран и объема жизнеспособных гепатоцитов, что согласуется с данными [10]).

energy-forming and energy-consuming processes, and a short-term cold ischemia is not a limiting moment for further increase of energetic pool under the conditions, close to physiological ones.

One-day storage of the suspension of isolated hepatocytes under the conditions of cold ischemia in the media of various composition resulted in the following changes of the studied indices. Viability of the samples in 1 and 3 solutions decreased slightly and made 82 and 80%, correspondingly (Fig. 1), and in the 2 solution this index decreased down to 70%. ATP level in liver cells after a cold storage in 1 and 3 solutions remained without changes, and in the 2 medium the reduction of the given index was observed (< 0.05). Following normothermic incubation of the samples in the minimum saline medium resulted in a significant increase of ATP level in all studied groups (Fig. 2), however the significance degree differed. Regeneration of ATP composition in liver cells under physiological conditions after one-day storage occurred with the rate of 0.21, 0.09 and 0.24 nM/min for the 1, 2, 3 solutions, correspondingly. The obtained data testify, that SBS and UW media keep structural and metabolic properties of isolated hepatocytes under the conditions of a cold hypoxia at practically the same level. The cells, suspended in these solutions, are capable to renew the ATP level under physiological conditions almost up to the control level. Further storage of the samples under the conditions of cold ischemia (48 hrs) resulted in the viability decrease of isolated hepatocytes (Fig. 1). ATP content in the cells, stored in the 1 and 3 media, did not practically change, however in the 2 medium the further reduction of this index (Fig. 2) was observed. Further incubation of hepatocytes (1 and 3 groups) under physiological conditions did not promote to an increase in the ATP level, however no decrease in it was noted, that is a positive moment when characterizing the solutions. Investigations on studying of the trypane blue exclusion by cells, profile of plasmatic membrane and volume of viable isolated hepatocytes demonstrated, that the mentioned parameters are preserved completely when using 1 and 3 solutions after 48 hrs' cold storage. Then a decrease of cell viability, the change of plasmatic membranes profile and the volume of viable hepatocytes, confirmed with the data [10], were observed.

The applied preserving solutions, containing non-penetrating into a cell components (SBS, UW) in an equal extent prevented osmotic damages of hepatocytes, characteristic for a cold ischemia at early storage stages. Suppression of osmotic changes in cells promoted to the keeping of a high metabolic activity also at later stages of cold storage, however this state was limited with the time factor (48 hrs). Obviously, long-term storage of isolated liver cells under the conditions of cold ischemia resulted in a weakening of endogenous substrates of oxidation and impossibility to keep energetic status under normothermal incuba-

Матеріал, захищений авторським правом

Применяемые консервирующие растворы, содержащие непроникающие в клетку компоненты (CCP, UW), в равной степени предотвращали осмотические повреждения гепатоцитов, характерные для холодовой ишемии на ранних этапах хранения. Подавление осмотического набухания клеток способствовало сохранению высокой метаболической активности и на более поздних этапах холодового хранения, однако это состояние лимитируется временным фактором (48 ч). Очевидно, длительное пребывание изолированных клеток печени в условиях холодовой ишемии приводит к истощению эндогенных субстратов окисления и невозможности поддерживать энергетический статус при нормотермической инкубации в минимальной солевой среде. Можно предположить, что применение в этих экспериментальных условиях питательных сред будет способствовать регенерации уровня внутриклеточного АТФ.

Таким образом, результаты изучения внутриклеточного содержания АТФ в гепатоцитах после длительного холодового хранения в средах различного состава свидетельствуют о высокой эффективности разработанного нами CCP, не уступающего широко применяемому в клинической трансплантологии консервирующему раствору UW. Эффект CCP, приготовленного на гистидиновом буфере, пока нам не понятен и требует дальнейшего изучения.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Биленко М. В.* Ишемические и реперфузионные повреждения органов.– М.: Медицина, 1989.– 368 с.
2. *Лукьянова Л. Д.* Гепатоцит. Фукционально-метаболические свойства.– М.: Наука, 1985.– 270 с.
3. *Шаніна І. В., Кравченко Л. П., Фуллер Б. Д., Сукач О. М.* Вплив консервувальних розчинів на морфометричні параметри ізольованих гепатоцитів щурів при гіпотермічному зберіганні // Трансплантологія.– 2000.– 1, № 1.– С. 283–285.
4. *Пат. 14080* України, МПК[5] С 12 № 5/00. Спосіб здобуття ізольованих гепатоцитів / Л. П. Кравченко, А. М. Андрієнко, О. А. Семенченко (Україна).– № 4721762/SU; Заявлено 20.07.89; Публ. 25.04.97.– Бюл. № 2.
5. *Пат. 16946* України, МПК[5] С 12 № 5/00. Розчин для гіпотермічного зберігання ізольованих гепатоцитів / Л. П. Кравченко, А. М. Андрієнко, О. А. Семенченко, А. М. Білоус (Україна).– № 4684421/SU; Заявлено 20.02.89; Публ. 29.08.97.– Бюл. № 4.
6. *Adams H.* Adenosin 5'-Triphosphate Determination with Phosphoglycerate Kinase // Methods of enzymatic analysis.– N.Y.: Academic Press, 1963.– P. 539–543.
7. *Churchill T., Mitchell S. J., Fuller B. J.* Metabolic considerations of histidine-based solutions for liver storage // Transplant. Proceed.– 1995.– 27.– P. 2859–2860.
8. *Fuller B.* The effects of cooling on mammalian cells // Clinical applications of cryobiology / Ed. by B. Fuller, B. Grout.– London, Boston: CRC Press, Boca Raton Ann, 1997.– P. 2–21.
9. *Jamieson N. V., Sundberg R., Lindell S. et al.* Preservation of the canine liver for 24–48 hours using simple storage with UW solution // Transplantation.– 1988.– 46.– P. 517–522.
10. *Marsh D. C., Lindell S. L., Fox L. E. et al.* Hypothermic preservation of hepatocytes. I. Role of cell swelling // Cryobiology.– 1989.– 26, № 6.– P. 524–534.
11. *Shanina I. V., Kravchenko L. P., Fuller B. J., Grischenko V. I.* A comparison of a sucrose-based solution with other preservation media for cold storage of isolated hepatocytes // Cryodiology.– 2000.– 41.– P. 315–318.
12. *Southard J. H., Belzer F. O.* Organ preservation // Ann. R. Med.– 1995.– 46.– P. 235–247.

Поступила 17.04.2001

tion in the minimum saline medium. It should be supposed, that application of nutritive media under these experimental conditions will contribute to regeneration of the level of intracellular ATP.

Thus, the results of investigation of the ATP intracellular content in hepatocytes after long-term cold storage in the media of various content testified to a high efficiency of the elaborated by us SBS, not inferior to those widely applied in clinical transplantology the UW preserving solution. The effect of SBS, prepared on a histidine buffer, is not yet clear for us and require further investigation.

REFERENCES

1. *Bilenko M. V.* Ischemic and re-perfusive damages of organs.– M.: Meditsina, 1989.– 368 p.
2. *Lukyanova L. D.* Hepatocyte. Functional and metabolic properties.– M.: Nauka, 1985.– 270 p.
3. *Shanina I. V., Kravchenko L. P., Fuller B. D., Sukach O. M.* The effect of preserving solutions on morphometric parameters of rat isolated hepatocytes under hypothermic storage // Transplantology.– 2000.– 1, № 1.– P. 283–285.
4. *Patent* of the Ukraine, N 14080. The way for obtaining of isolated hepatocytes / L. P. Kravchenko, A. M. Andrienko, O. A. Semenchenko (Ukraine).– № 4721762/SU; Accepted in 20.07.89; Publ. 25.04.97.– Bul. № 2.
5. *Patent* of the Ukraine, N16946. Solution for hypothermic storage of isolated hepatocytes / L. P. Kravchenko, A. M. Andrienko, O. A. Semenchenko, A. M. Belous (Ukraine).– № 468421/SU; Accepted in 20.02.89; Publ. 29.08.97.– Bul. № 4.
6. *Adams H.* Adenosin 5'-Triphosphate Determination with Phosphoglycerate Kinase // Methods of enzymatic analysis.– N.Y.: Academic Press, 1963.– P. 539–543.
7. *Churchill T., Mitchell S. J., Fuller B. J.* Metabolic considerations of histidine-based solutions for liver storage // Transplant. Proceed.– 1995.– 27.– P. 2859–2860.
8. *Fuller B.* The effects of cooling on mammalian cells // Clinical applications of cryobiology / Ed. by B. Fuller, B. Grout.– London, Boston: CRC Press, Boca Raton Ann, 1997.– P. 2–21.
9. *Jamieson N. V., Sundberg R., Lindell S. et al.* Preservation of the canine liver for 24–48 hours using simple storage with UW solution // Transplantation.– 1988.– 46.– P. 517–522.
10. *Marsh D. C., Lindell S. L., Fox L. E. et al.* Hypothermic preservation of hepatocytes. I. Role of cell swelling // Cryobiology.– 1989.– 26, № 6.– P. 524–534.
11. *Shanina I. V., Kravchenko L. P., Fuller B. J., Grischenko V. I.* A comparison of a sucrose-based solution with other preservation media for cold storage of isolated hepatocytes // Cryodiology.– 2000.– 41.– P. 315–318.
12. *Southard J. H., Belzer F. O.* Organ preservation // Ann. R. Med.– 1995.– 46.– P. 235–247.

Accepted in 17.04.2001

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 612.111.615.361-014.413

UDC 612.111.615.361-014.413

Аутотрансфузия эритроцитов кроликов после криоконсервирования безотмывочным методом

Л. А. БАБИЙЧУК, Н. Г. ЗЕМЛЯНСКИХ, С. СУМИДА*, Йа. ТАУРА**, Т. ИИДЖИМА***

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков
**Лаборатория криомедицины и трансфузии крови, Токио*
***Национальный университет Ямагучи, Ямагучи*
****Международный университет Хейсей, Сайтама*

Autotransfusion of Rabbit Erythrocytes after Cryopreservation Washing-out Method

L. A. BABIJCHUK, N. G. ZEMLYANSKIKH, S. SUMIDA*, J. TAURA**, T. IIJIMA***

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov
**Laboratory for cryomedicine and blood transfusion*
***National University of Yamaguchi, Yamaguchi*
****International University Heisei, Saitama*

Проведены эксперименты по аутотрансфузии эритроцитов кролика после их криоконсервирования по разработанному безотмывочному методу. Показана высокая выживаемость эритроцитов как после криоконсервирования, так и после аутотрансфузии. Полученные данные свидетельствуют о том, что этот метод криоконсервирования эритроцитов с ПЭО-1500 позволяет значительно повысить выживаемость клеток после размораживания и сохранять их высокую жизнеспособность после трансфузии в русло крови. Данный метод является более перспективным по сравнению с существующими, так как упрощает и удешевляет процедуру получения качественных деконсервированных клеток и может найти широкое применение в практической медицине.

Проведено експерименти з аутотрансфузії еритроцитів кролика після їх кріоконсервування за розробленим методом. Показано високе виживання як після кріоконсервування, так і після аутотрансфузії. Отримані дані свідчать про те, що цей метод кріоконсервування з ПЕО-1500 дозволяє значно підвищити виживання клітин після розморожування і зберігати їх високу життєздатність після трансфузії в русло крові. Даний метод більш перспективний у порівнянні з існуючими, бо спрощує і здешевлює процедуру одержання якісних деконсервованих клітин і може знайти широке застосування в практичній медицині.

Experiments on the rabbit erythrocytes' autotransfusion after their cryopreservation according to the washing-out method were carried-out. A high erythrocytes' viability both after cryopreservation and autotransfusion was demonstrated. The obtained data testified, that this method for erythrocytes cryopreservation with PEO-1500 allowed to increase the cell viability after freeze-thawing and keep their viability after the transfusion into blood channel. The given method is more perspective in comparison with the existed ones, because it simplifies and makes more cheaper the procedure for obtaining of qualitative frozen-thawed cells and can be widely applied in practical medicine.

Снижение температуры и осмотическое воздействие на клетку сопровождаются возникновением и развитием различных процессов, ведущих к изменению состояния мембранных белков [4, 6]. Поэтому можно предположить, что в определенных оптимальных условиях температурно-осмотического воздействия на клетки реакция их мембранных структур может быть переориентирована, и клетка приобретет определенную устойчивость к экзогенному воздействию. В работах [1–3] было показано, что снижение температуры инкубации эритроцитов с ПЭО-1500 до 0 °С и его дозированное введение в суспензию приводят к уменьшению количества связывающегося с клетками криопротектора, что коррелирует с увеличением устойчивости эритроцитов к действию факторов замораживания-отогрева. Такой режим ограничивает повреждения различных форм клеток и способствует сохранению барьерных свойств плазматической мембраны в процессе криоконсервирования. Установлено, что

Temperature reduction and osmotic effect on a cell are accompanied by the appearance and development of different processes, resulting in the change of the membrane proteins state [4, 6]. Therefore it can be supposed, that under certain optimal conditions of temperature and osmotic effect on a cell the response of their membrane structures can be re-oriented and a cell gains certain stability to exogenous effect. It was demonstrated [1–3], that the temperature decrease of erythrocytes incubation with PEO-1500 down to 0 °C and its dosed injection into suspension resulted in the reduction of the quantity of bounded with cells cryoprotectants, correlating with an increase of erythrocytes stability to the effect of freeze-thawing factors. Such a regimen limited the damage of various forms of cells and promoted to the keeping of barrier characteristics in a plasmatic membrane during cryopreservation process. It has been established, that an increase of erythrocytes stability after treatment with a cryoprotectant under 0 °C in comparison with the

Матеріал, захищений авторським правом

повышение устойчивости эритроцитов после обработки криопротектором при 0 °С по сравнению с инкубацией при комнатной температуре во многом определяется модификацией белков цитоскелета, которые удерживают форму и объем клеток в данных экспериментальных условиях.

Нами был разработан безотмывочный метод криоконсервирования эритроцитов в больших объемах и обоснованы его преимущества перед существующими.

Поскольку важным показателем структурно-функциональной полноценности эритроцитов после криоконсервирования является их выживаемость в русле крови, целью работы было провести эксперименты по аутотрансфузии эритроцитов после криоконсервирования их по разработанному безотмывочному методу и определить выживаемость клеток после трансфузии.

Для проведения исследований были взяты беспородные кролики-самцы весом 2–2,87 кг. Допустимый объем забираемой крови определялся по общепринятым нормам, согласно которым учитываются:

1) объем циркулирующей в организме крови, который составляет около 8% от массы тела;

2) объем крови, допустимый для забора у донора (не превышает 8% от объема циркулирующей в организме крови).

Исходя из этого нами был рассчитан объем забираемой крови для аутотрансфузии у каждого кролика в зависимости от массы тела (табл. 1). В качестве антикоагулянта был использован раствор CPD (Япония). Все животные были разделены на три группы (по 3 животных в каждой группе) в зависимости от условий эксперимента: группа I — контроль; группа II — криоконсервирование эритроцитов глицериновым методом; группа III — криоконсервирование эритроцитов по разработанному безотмывочному методу.

У животных группы I кровь забирали и хранили с плазмой при комнатной температуре до момента трансфузии (до 2-х суток), у групп II и III кровь забирали, центрифугировали при 1 500 об/мин в течение 10 мин, затем отбирали плазму, которую хранили при комнатной температуре. Кровь забирали из ушной вены. После забора крови наблюдали образование небольших сгустков, что связано с повышенным содержанием фибриногена в крови кроликов по сравнению с кровью человека. Затем после удаления плазмы к эритромассе добавляли:

группа II — 30%-й раствор глицерина (SF-30%, Япония) 1:1 по объему;

группа III — 30%-й раствор ПЭО-1500 на физиологическом растворе NaCl и 0,01М Трис-буфере 1:1 по объему. Обработку эритроцитов проводили при 0 °С, дозированно в течение 40 мин. Данные представлены в табл. 1.

После добавления криопротектора суспензию эритроцитов переносили в пластиковые одноразо-

incubation under a room temperature mainly is determined by the modification of cytoskeleton proteins, keeping cellular shape and volume under given experimental conditions.

We elaborated the washing-out method for erythrocytes cryopreservation in large volumes and substantiated its advantages in comparison with the existed ones.

Carrying-out of the experiments on the erythrocytes autotransfusion after their cryopreservation according to the elaborated method, as well as determining of the cell viability after transfusion, were the aims of the given work, because the erythrocytes' viability in a blood channel is an important index of structural and functional integrity of erythrocytes.

We used 2–2.87 kg mongrel rabbits-males for the investigation conducting. Acceptable volume of blood procurement was determined according to generally accepted norms, considering the following parameters:

1. The volume of circulating in an organism blood makes about 8% of the body mass.

2. Blood volume, acceptable for the procurement from a donor does not exceed 8% of the volume of the blood, circulating in an organism.

Proceeding from this fact, we calculated the volume of the procured for autotransfusion blood in each rabbit depending on the body mass (Table 1). CPD solution (Japan) was used as anticoagulant. All animals were divided into three groups (3 animals in each group) depending on the experiment conditions: the 1st group made control; the 2nd group did erythrocytes cryopreservation by means of glycerol method, the 3rd group consisted of the erythrocytes cryopreserved according to the washing-out method.

In animals of the 1st group blood was procured and stored with plasm under room temperature up to the moment of transfusion (up to 2 days), in the 2nd and 3rd groups blood was procured, centrifuged at 1 500 rot/min within 10 min, then the plasm, stored under room temperature, was removed. Blood was procured from an ear vein. After the blood procurement the small clots formation was observed, that was connected to an increased fibrinogen content in rabbits' blood in comparison with human blood. Then after plasm removal to erythromass the following solutions were added:

the 2nd group — 30% glycerol solution (SF-30%, Japan), in 1:1 ratio;

the 3rd group — 30% PEO-1500 solution on NaCl physiological solution and 0.01 M Tris-buffer in the 1:1 ratio. Erythrocytes treatment was carried-out under 0 °C, by dose, during 40 min. The data are presented in the Table 1.

After the cryoprotectant adding erythrocytes suspension was transferred into plastic disposable containers (CP4 99 Plastic, USA production) and frozen down to –196 °C by immerging into liquid nitrogen. Storage was done in liquid nitrogen during two days.

Матеріал, захищений авторським правом

Таблица 1 **Table 1**

Криоконсервирование эритроцитов кролика для аутотрансфузии

Cryopreservation of rabbit erythrocytes for autotransfusion

Условия эксперимента Experiment conditions	Контроль Control			Криоконсервирование с 30%-м глицерином Cryopreservation with 30% glycerol			Криоконсервирование с 30%-м ПЭО-1500 Cryopreservation with 30% PEO-1500		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Масса кролика, кг Weight of rabbit, kg	2,65	2,53	2,0	2,36	2,87	2,27	2,83	2,48	2,33
Объем крови, забранной у животных, мл Volume of blood, procured in animals, ml	17,0	16,0	12,8	16,6	18,4	14,5	18,0	15,9	14,9
Объем крови с учетом использованного антикоагулянта, мл Volume of blood, considering anticoagulant usage, ml	19,4	18,3	14,6	19,0	21,0	16,5	20,5	18,1	17,0
Объем эритромассы после удаления плазмы, мл Erythromass volume after plasm removal, ml	Кровь не центрифугировали и хранили с плазмой при комнатной температуре Blood was not centrifuged and stored with plasm under room temperature			9,0	11,5	8,0	10,0	7,5	7,0
Объем добавленного криопротектора, мл Volume of added cryoprotectant, ml				9,0	11,5	8,0	10,0	7,5	7,0
Замораживание, °С Freezing, °С	–			–196			–196		
Размораживание, °С Thawing, °С	–			42–44			42–44		
Объем суспензии после размораживания, мл Volume of suspension after thawing, ml	–			18,0	20,0	15,0	15,0	12,0	10,0
Обработка клеток после размораживания Cell treatment after thawing	–			3-х кратная отмывка по схеме Thresh-fold washing-out according to thescheme			1-кратное осаждение эритроцитов Single sedimentation of erythrocytes		
Гемолиз эритроцитов после размораживания, % Erythrocytes hemolysis after thawing, %	–			17,9	12,04	31,6	6,82	16,32	16,87

вые контейнеры (СР4 99 Plastic пр-ва США) и замораживали до –196 °С погружением в жидкий азот. Хранение осуществляли в жидком азоте в течение 2-х суток.

Размораживание проводили на водяной бане при температуре 42–44 °С при постоянном покачивании контейнера. Объем суспензии после размораживания уменьшался в связи с тем, что в контейнер для замораживания не переносили сгустки, образовавшиеся при заборе крови.

Поскольку при использовании глицерина клетки необходимо отмывать после размораживания [5], мы проводили трехкратную отмывку эритроцитов согласно стандартной процедуре для глицеринового метода:

суспензию эритроцитов с глицерином центрифугировали, надосадок удаляли и к осадку добавляли равный объем 3,5%-го NaCl, затем центрифугировали 5 мин при 3 000 об/мин, после чего еще дважды отмывали 0,9%-м NaCl. Все надосадки собирали для определения гемолиза клеток после размораживания.

Эритроциты, замороженные с ПЭО-1500, осаждали и в надосадке определяли гемолиз после размораживания.

Видно (табл. 1), что гемолиз клеток после размораживания эритроцитов с ПЭО-1500 практически в два раза меньше, чем клеток, криоконсервиро-

Thawing was carried-out in water bath at the temperature of 42–44 °C at constant shaking of the container. The volume of suspension after thawing decreased due to the fact, that blood clots, formed at procurement, were not transferred into the container for freezing.

We have carried-out the erythrocytes' three-stage washing-out according to the standard procedure for glycerol method, i.e. erythrocytes suspension with glycerol was centrifuged, supernatant was removed and an equal volume of 3.5% NaCl was added to sediment, then 5 min centrifugation at 3 000 rot/min and twice washing out with 0.9% NaCl were done. All supernatants were taken for the cell hemolysis determination after thawing; erythrocytes, frozen with PEO-1500, were sedimented and hemolysis after thawing was determined in supernatant.

Table 1 showed, that cell hemolysis after erythrocytes thawing with PEO-1500 was practically twice lower, than in the cells, cryopreserved with glycerol. These data testify, that washing-out method for erythrocytes cryopreservation with PEO-1500, elaborated by us, allows to significantly increase the cell viability after thawing and to simplify the procedure for the obtaining of qualitative frozen-thawed cells. However, it should be noted, that the data, obtained for erythrocytes of human donors' blood after their cryopreser-

Матеріал, захищений авторським правом

ванных с глицерином. Эти данные свидетельствуют о том, что разработанный безотмывочный метод криоконсервирования эритроцитов с ПЭО-1500 позволяет в значительной степени повысить выживаемость клеток после размораживания и упростить процедуру получения качественных деконсервированных клеток. Однако следует отметить, что данные, полученные для эритроцитов донорской крови человека после их криоконсервирования как с ПЭО-1500, так и с глицерином (табл. 2), значительно лучше, чем полученные на эритроцитах кролика. Это связано с особенностями состава крови кролика, в которой гораздо выше содержание фибриногена, что приводит к образованию сгустков, и большое содержание нейтрофилов, разрушение которых способствует образованию гелевой структуры. Поэтому кровь кролика является не лучшим объектом для исследования выживаемости эритроцитов, однако довольно удобным объектом для проведения аутотрансфузии.

Таблица 2

Гемолиз эритроцитов донорской крови человека, криоконсервированных различными методами

Номер эксперимента	Гемолиз, %		
	с 30%-м ПЭО-1500	с 30%-м глицерином	
		Гемолиз после размораживания	Суммарный гемолиз после 3-кратной отмывки
1	2,0	8,8	15,6
2	1,2	8,0	14,4
3	1,1	5,8	12,4
4	4,2	10,2	23,9

Для проведения аутотрансфузии был измерен объем оставшейся после центрифугирования (для метода с ПЭО) или отмывания эритромассы (для глицеринового метода), к которой добавляли равный объем плазмы, соответствующий данной эритромассе. Однако в плазме после хранения ее 2-е суток было обнаружено большое количество сгустков (фибрин), которые перед смешиванием с эритромассой были удалены. Объем крови для аутотрансфузии каждому кролику представлен в табл. 3. Кровь вводили в ушную вену медленно шприцами производства Японии. В течение 2-х часов после трансфузии у кроликов не было никаких побочных эффектов. Забор крови для определения гемолиза осуществляли из ушной артерии в количестве 3 мл через 2 ч после трансфузии. Из табл. 3 видно, что гемолиз эритроцитов после криоконсервирования глицериновым методом даже ниже контрольных величин. Это связано с тем, что при 3-кратном отмывании эритроцитов, криоконсервированных с 30%-м глицерином, практически все повреждения клетки удаляются, о чем свидетельствует довольно высокий гемолиз после размораживания (табл. 1).

Гемолиз эритроцитов, криоконсервированных с 30%-м ПЭО-1500 после аутотрансфузии невысок

vation both with PEO-1500 and glycerol (Table 2), is considerably more efficient, than ones, obtained with the rabbit erythrocytes. This is connected both to the peculiarities of blood composition in rabbit, in which fibrinogen content is quite higher, that results in the clots formation, and a high neutrophiles content, damage of which promotes to the formation of gel structure. Therefore the rabbits' blood is not the best object for investigation of erythrocytes viability, however it is quite convenient for the autotransfusion conducting.

Table 2

Erythrocytes hemolysis of human donor's blood, cryopreserved by different methods

Experiment number	Hemolysis, %		
	With 30% PEO-1500	With 30% glycerol	
		Hemolysis after thawing	Total hemolysis after thresh-fold washing-out
1	2.0	8.8	15.6
2	1.2	8.0	14.4
3	1.1	5.8	12.4
4	4.2	10.2	23.9

To carry-out autotransfusion the volume of erythromass, remained after centrifuging (for the method with PEO) and washing-out (for glycerol method) was measured, to which an equal volume of plasm, corresponding to given erythromass, was added. However after the plasm storage during 2 days a big number of clots (fibrin), which were removed before the mixing with erythromass was revealed. Blood volume for autotransfusion to each rabbit is presented in the Table 3. Blood was slowly injected into an ear vein by means of syringes of Japanese production. During 2 hrs after transfusion no side effects were revealed in rats. Blood procurement for the hemolysis determination was carried-out from ear vein in 2 hrs after transfusion in the volume of 3 ml. We see, that the erythrocytes hemolysis after cryopreservation by means of glycerol method is lower than the control values. This was connected to the fact, that during thresh-fold washing-out of the erythrocytes, cryopreserved with 30% glycerol, practically all cell damages were disappeared, quite high hemolysis after thawing testified to this fact (Table 1).

Hemolysis of the erythrocytes, cryopreserved with 30% PEO-1500 after autotransfusion is quite low in comparison with the control. This testifies to a high cell viability both after thawing and autotransfusion. The data obtained confirmed, that elaborated by us washing-out method for erythrocytes cryopreservation with PEO-1500 allowed to significantly increase the cell viability after freeze-thawing and to keep their high viability after transfusion into blood channel. The given method is more perspective in comparison with existed ones, because it significantly simplifies

Матеріал, захищений авторським правом

Таблица 3 **Table 3**

Аутотрансфузия крови кроликов и уровень гемолиза эритроцитов после аутотрансфузии

Autotransfusion of the rabbits' blood and hemolysis level of erythrocytes after autotransfusion

Условия эксперимента Experiment conditions	Контроль Control			Криоконсервирование с 30%-м глицерином Cryopreservation with 30% glycerol			Криоконсервирование с 30%-м ПЭО-1500 Cryopreservation with 30% PEO-1500		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Объем эритромассы для трансфузии, мл Erythromass volume for transfusion, ml	–	–	–	7,5	7,5	6,75	6,0	6,0	5,0
Объем крови для трансфузии (фибрин-сгустки), мл Blood volume for transfusion (fibrin-clots), ml	18,0	18,0	13,0	15,0	15,0	13,5	12,0	12,0	10,0
2 часа после трансфузии 2 hrs after transfusion	Отсутствуют реакции и побочные эффекты No response and side effects are noted								
Гемолиз в крови после трансфузии, % Hemolysis in blood after transfusion, %	1,82	1,15	1,18	1,51	0,87	1,05	3,42	3,09	4,97

по сравнению с контролем. Это свидетельствует о высокой выживаемости клеток как после размораживания, так и после аутотрансфузии. Полученные данные подтверждают, что разработанный безотмывочный метод криоконсервирования эритроцитов с ПЭО-1500 позволяет в значительной степени повысить выживаемость клеток после размораживания и сохранять их высокую жизнеспособность после трансфузии в русло крови. Данный метод более перспективен по сравнению с существующими, так как значительно упрощает и удешевляет процедуру получения качественных деконсервированных клеток и может найти широкое применение в практической медицине.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бабийчук Л. А., Землянских Н. Г.* Влияние температуры и криопротектора ПЭО-1500 на характер модификации белков цитоскелета и устойчивость эритроцитов в процессе криоконсервирования // Пробл. криобиологии.– 1994.– № 2.– С. 7–11.
2. *Бабийчук Л. А., Землянских Н. Г., Белоус А. М.* Влияние полиэтиленоксида и сахарозы на содержание Ca^{2+} и фосфорилирование белков спектрин активного комплекса эритроцитов при охлаждении и замораживании-отогреве // Пробл. криобиологии.– 1995.– № 2.– С. 9–13.
3. *Землянских Н. Г.* Роль температуры во взаимодействии полиэтиленоксида м.м. 1500 с эритроцитами // Физико-химические свойства и биологическое действие криопротекторов: Сб. науч. трудов.– Харьков, 1990.– С. 46–49.
4. *Конев С. В.* Структурная лабильность мембран и регуляторные процессы.– Минск: Наука и техника, 1987.– 240 с.
5. *Семенова Н. В., Федорова Л. И., Виноградов В. Л. и др.* Сравнительное изучение криоконсервированных эритроконцентратов при различных способах их отмывания // Гематология и трансфузиология.– 1986.– № 10.– С. 42–52.
6. *Morrow J. S., Marchesi V. T.* Self-assembly of spectrin oligomers in vitro: a basis for a dynamic cytoskeleton // J. Cell Biol.– 1981.– № 88.– P. 463–468.

Поступила 06.03.2001

and makes cheaper the procedure for obtaining of qualitative frozen-thawed cells and can be widely applied in practical medicine.

REFERENCES

1. *Babijchuk L. A., Zemlyanskikh N. G.* The effect of temperature and PEO-1500 cryoprotectant on the character of cytoskeletal proteins modification and erythrocytes stability during the process of cryopreservation // Problems of cryobiology.– 1994.– № 2.– P. 7–11.
2. *Babijchuk L. A., Zemlyanskikh N. G., Belous A. M.* Polyethylene oxide and sucrose effect on the Ca^{2+} content and phosphorylation of the proteins of spectrin-active erythrocytes complex under cooling and freeze-thawing // Problems of cryobiology.– 1995.– № 2.– P. 9–13.
3. *Zemlyanskikh N. G.* Temperature role in the interaction of PEO-1500 with erythrocytes // Physical and chemical characteristics and biological effect of cryoprotectants: Coll. of Scientific works.– Kharkov, 1990.– P. 46–49.
4. *Konev S. V.* Structural lability of membranes and regulatory processes.– Minsk: Nauka i tekhnika, 1987.– 240 p.
5. *Semenova N. V., Fedorova L. I., Vinogradov V. L. et al.* Comparative investigation of cryopreserved erythroconcentrates at different ways of their washing-out. // Hematology and transfusiology.– 1986.– № 10.– P. 42–52.
6. *Morrow J. S., Marchesi V. T.* Self-assembly of spectrin oligomers in vitro: a basis for a dynamic cytoskeleton // J. Cell Biol.– 1981.– № 88.– P. 463–468.

Accepted in 06.03.2001

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 616-089.843: 615.361.36.013.014.413: 577.125.33.08

UDC 616-089.843: 615.361.36.013.014.413: 577.125.33.08

Влияние препаратов эмбриональных тканей человека на интенсивность перекисного окисления липидов при остром токсическом гепатите у крыс

А. Ю. ПЕТРЕНКО, О. В. ОЧЕНАШКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Influence of human embryonic tissue preparations on lipids peroxidation intensity in rats acute toxic hepatitis

A. Yu. PETRENKO, O. V. OCHENASHKO

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

Исследованы интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ), активность аланинаминотрансферазы (АлАТ) и аспартатаминотрансферазы (АсАТ) в сыворотке крови крыс при остром токсическом повреждении печени четыреххлористым углеродом (CCl_4) на фоне трансплантации криоконсервированных клеток эмбриональной печени человека (КЭП) и цитозоля мягких тканей эмбриона человека. Установлено, что трансплантация исследуемых препаратов не оказывает существенного влияния на активность ферментов в сыворотке крови экспериментальных животных. В то же время трансплантация КЭП достоверно снижает интенсивность перекисных процессов на 3-и сутки после инъекции CCl_4 в сыворотке крови крыс, а цитозоль эмбриональных тканей человека оказывает кратковременное действие и эффективен только в первые сутки после токсического воздействия. Таким образом, вводимые препараты ингибируют перекисные процессы, но не устраняют повреждение гепатоцитов, вызванное CCl_4. Авторы полагают, что способность исследуемых препаратов оказывать ингибирующее действие на свободнорадикальные процессы требует дальнейшего изучения.

Досліджено інтенсивність перекисного окислення ліпідів (ПОЛ), активність аланінамінотрансферази (АлАТ) та аспартатамінотрансферази (АсАТ) у сироватці крові щурів при гострому токсичному пошкодженні печінки чотирьоххлористим вуглецем (CCl_4) на фоні трансплантації кріоконсервованих клітин ембріональної печінки людини (КЕП) та цитозолю м'яких тканин ембріона людини. Встановлено, що трансплантація препаратів, які досліджуються, не має суттєвого впливу на активність ферментів у сироватці крові експериментальних тварин. У той же час трансплантація КЕП достовірно знижує інтенсивність перекисних процесів на 3-ю добу після ін'єкції CCl_4 у сироватці крові щурів, а цитозоль ембріональної тканини людини має короткочасну дію та ефективний тільки у першу добу після токсичного впливу. Таким чином, препарати, що вводяться, інгібують перекисні процеси, але не усувають пошкодження гепатоцитів, яке породжене CCl_4. Автори вважають, що здатність досліджених препаратів інгібувати вільно радикальні процеси потребує подальшого вивчення.

We studied lipids peroxidation (LPO) intensity, alaninaminotransferrase (AlAT) and aspartateaminotransferrase (AsAT) activity in rats blood serum under liver acute toxic injury by carbon tetrachloride (CCl_4) on a background of transplantation of human embryonic liver cells (ELC) and human embryo soft tissues cytosole. It is established that the transplantation of studied preparations made no sufficient effect on enzyme activity in blood serum of experimental animals. At the same time the ELC transplantation statistically true decreases the peroxidative processes intensity to the 3rd day after CCl_4 injection in rats blood serum and the human embryonic tissue cytosole makes a short-term effect and is effective during the first day after toxic influence. Thus the injected preparations inhibit the peroxidative processes, but did not eliminate the hepatocytes injury caused by CCl_4. Authors suggest that ability of studied preparations to make an inhibitory action on free-radical processes requires a further investigation.

Тяжелые формы токсического гепатита могут привести к развитию острой гепатоцеребральной недостаточности вплоть до печеночной комы с летальным исходом в первую неделю болезни [4]. По мнению многих исследователей [1, 6], альтернативным методом лечения острой печеночной недостаточности (ОПН) является использование клеточной терапии, включающей трансплантацию криоконсервированных аллогенных или ксеногенных гепатоцитов. Наиболее перспективно использование препаратов из эмбриональной печени человека, поскольку клеткам из эмбриональных и фетальных тканей присущи высокая пролиферативная активность и низкая иммунногенность [5]. Эмбриональная печень, кроме предшественников гемопоэтических клеток, содержит также гепатобласты — общие предшественники гепатоцитов и

Severe forms of toxic hepatitis may result in development of acute hepatocerebral insufficiency up to liver coma with lethal result in the first week of disease [4]. Many investigators consider [1, 6], that the alternative method of acute hepatic insufficiency (AHI) treatment is the usage of cellular therapy, including transplantation of cryopreserved allogeneic or xenogenic hepatocytes. Application of human embryonic liver preparations is the most perspective, while cells from embryonic and fetal tissues have a high proliferative activity and low immunogenity [5]. Embryonic liver along with hemopoietic cells progenitors contains also the hepatoblasts, which are the general progenitors of hepatocytes and biliary cells. It allows their successful using in transplantology for treatment of AHI. For estimation of an efficiency of preparation action it is necessary to choose an adequate model

Матеріал, захищений авторським правом

билиарных клеток. Это позволяет предположить их успешное использование в трансплантологии для лечения ОПН. Для оценки эффективности действия препарата необходимо выбрать адекватную модель, которая должна воспроизводить патологию, соответствующую заболеванию печени у человека. Одна из скрининговых моделей поражения печени — острая жировая дистрофия органа, возникающая при введении CCl_4.

Цель работы — изучение ПОЛ и течения патологических процессов в печени при остром токсическом гепатите, индуцированном введением CCl_4 после трансплантации суспензии криоконсервированных КЭП и цитозоля мягких тканей эмбриона человека.

Клетки печени выделяли из эмбрионов человека 7–12 недель гестации неферментативным способом [7], модифицированным для малых объемов: криоконсервировали их в сахарозно-солевой среде с использованием 5%-го ДМСО по 3-этапной программе замораживания. Суспензию клеток отогревали на водяной бане при 37 °С непосредственно перед трансплантацией. Цитозоль получали гомогенизацией мягких тканей эмбриона человека с последующим центрифугированием при 20 000*g* в течение 40 мин. Супернатант хранили при –30 °С.

В эксперименте использовали самцов крыс массой 160–180 г. Операцию проводили под эфирным наркозом. Животным вскрывали брюшную полость и трансплантировали в пульпу селезенки суспензию КЭП человека (10^6/0,3 мл) или цитозоль мягких тканей эмбриона человека (0,3 мл), содержащего 0,6–0,8 мг белка. Для контроля брали крыс, которым в пульпу селезенки вводили равный объем среды консервирования.

На 3-и сутки после операции животным внутрибрюшинно вводили 40%-й CCl_4 на вазелиновом масле из расчета 0,4 мл/100 г их веса.

Активность аминотрансфераз и интенсивность процессов ПОЛ в сыворотке крови крыс исследовали через 24, 48 и 72 ч после инъекции им CCl_4. Степень повреждения печени после токсического воздействия CCl_4 оценивали по изменению активности АлАТ и АсАТ, используя стандартный набор LaChema. Уровень ПОЛ в сыворотке крови крыс определяли по концентрации малонового альдегида (МДА) [2].

CCl_4 — яд, который может вызывать острое или хроническое поражение печени в зависимости от дозы и длительности воздействия, что обусловливает его широкое использование в эксперименте при создании различных моделей печеночной недостаточности. В литературе описаны различные способы и дозы введения CCl_4 для воспроизведения картины острого токсического повреждения печени. Поздняков В. С., Иванов Н. Г. [8] предлагают вводить крысам CCl_4 в виде 50%-го масляного раствора по 1 мл/100 г внутрижелудочно, или 0,8 мл/100 г массы животного подкожно в течение двух дней. Long R., Moore L. [13] вводили живот-

which must reproduce a pathology, corresponding to liver disease in human. One of the liver damage screening model is the organ's acute lipid distrophy, caused by CCl_4 injection.

The aim of the work is an investigation of LPO and pathologic processes under acute toxic hepatitis, caused by CCl_4 injection after transplantation of cryopreserved ELC suspension and human embryo soft tissue cytosole.

Liver cells were isolated from human embryos of 7–12 gestation weeks by non-enzymic method [7], modified for small volumes. Cryopreservation was performed in sucrose-saline solution with 5% DMSO by 3 step freezing program. Cell suspension was thawed on water bath at 37 °C immediately before transplantation. Cytosole was received by homogenisation of human embryo soft tissues with following centrifugation at 20 000*g* during 40 min. Supernatant was stored at –30 °C.

Male 160–180 g rats were used in experiment. The operation was carried-out under ether narcosis. Animals peritoneal cavity was opened and human ELC suspension (10^6/0.3 ml) were intrasplenically transplanted or human embryo soft tissues cytosole, containing 0.6–0.8 mg of protein. As a control we used the rats, which were intrasplenically injected with the equal volume of preservation medium.

To the third day after operation animals were intraperitoneally injected with 40% CCl_4 on vaselinum oil in respect of 0.4 ml/100 g of their weight.

The aminotransferrase activity and LPO processes intensivity were studied in 24, 48 and 72 hrs after CCl_4 injection. Liver damaging extent after CCl_4 toxic effect was estimated by AlAT and AsAT activity change using standard LaChema kit. The LPO level in rats blood serum was determined on malone dialdehyde (MDA) concentration [2].

CCl_4 is a poison, which may cause an acute or chronic liver damage depending on the effect dose or duration, that stipulated its wide usage in experiment by creating the various models of liver insufficiency. Different ways and doses of CCl_4 injection for reproduction of acute toxic liver damage are described in the literature. Pozdnyakov V. S., Ivanov N. G. [8] offer 1 ml/100 g CCl_4 intragastric injection to rats as a 50% oil solution or 0.8 ml/100 g of animal weight subcutaneously during 2 days. Long R., Moore L. [13] have injected CCl_4 to animals intraperitoneally under concentration of 1.5 ml/1 kg of their weight. Itoh S., Gohara S. [12] have studied the influence of damaging agent injection site on toxic effect development in liver. Rats were injected intragastrally or intraperitoneally with 50% CCl_4 solution under concentration of 0.5 ml/100 mg of their weight. We have chosen the intraperitoneal way of injection, since the histological investigations [12] showed, that such a way of CCl_4 injection affected the liver much stronger.

For determining the optimal dose of substance injected we have divided the animals into three groups,

Матеріал, захищений авторським правом

ным CCl_4 внутрибрюшинно в концентрации 1,5 мл/1 кг их массы. Itoh S., Gohara S. [12] исследовали влияние места введения повреждающего агента на проявление токсического воздействия на печень. Крысам вводили интрагастрально или внутрибрюшинно 50%-й раствор CCl_4 в концентрации 0,5 мл/100 г их массы. Нами был выбран внутрибрюшинный вид инъекции, поскольку гистологические исследования [12] показали, что такой способ введения CCl_4 оказывает более сильное повреждающее действие на печень.

Для определения оптимальной дозы вводимого вещества животных разделили на три группы (в каждой группе по пять крыс). Подопытным животным вводили 40%-й CCl_4 из расчета 0,3, 0,4 или 0,5 мл/100 г массы. Степень токсического повреждения определяли по их выживаемости в каждой экспериментальной группе.

Введение 0,5 мл CCl_4 на 100 г массы вызывало гибель 3-х крыс через сутки после воздействия. К 48 ч погибали все животные данной группы. При инъекции 0,4 мл/100 г гибель животных наблюдалась через 2-е суток (2 крысы). Оставшиеся выживали до конца эксперимента. Выживаемость составила 60%. Введение CCl_4 в концентрации 0,3 мл/100 г вызывало угнетение двигательной активности у животных в течение первых суток после токсического воздействия, но не оказывало летального действия на них. Таким образом, в данной постановке эксперимента мы остановились на дозе, равной 0,4 мл/100 г массы животного.

В эксперименте использовали 64 крысы. Все животные хорошо переносили операцию по введению препаратов в селезенку. Послеоперационная активность наблюдалась через 20–30 мин. Потребность в еде и питье возникала уже через час после введения препаратов. Через сутки после трансплантации экспериментальные животные по активности и поведению ничем не отличались от интактных. Через 72 ч после начала эксперимента крысам внутрибрюшинно вводили CCl_4, вызывая острое токсическое повреждение печени. Клинические признаки поражения наблюдались уже через 4–5 ч. Животные становились вялыми, малоподвижными с выраженным цианозом конечностей, а также у них наблюдалась лихорадка. Такие симптомы сохранялись в течение 2-х суток после введения CCl_4. Улучшение наступало через 48 ч. К этому времени крысы становились более активными, уменьшался цианоз конечностей, прекращалась лихорадка, возникала потребность в еде и питье. Различий в группах животных по этим критериям выявлено не было. Процент выживаемости (61–65) зависел от природы введенного препарата.

В норме активность АлАТ у интактных животных составляла $0{,}73 \pm 0{,}075$ мккат/л, через сутки после введения животным CCl_4 наблюдалось ее 20-кратное увеличение (рис. 1). Высокая активность фермента сохранялась в течение 48 ч, затем досто-

(5 rats per each group). Experimental animals were injected with 40% CCl_4 in respeect of 0.3, 0.4 or 0.5 ml/100 ml of weight. The toxic effect extent was determined on their survival in each experimental group.

0.5 ml/100 g of weight injection causes the death of 3 rats in a day after effect. In 48 hrs all animal from this group died. At the 0.4 ml/100 g injection the animal death was observed in 2 days (2 animals). The rest of animals have survived up to the end of experiment. The survival makes 60%. The CCl_4 injection in concentration 0.3 ml/100 g caused an suppression of animals motional activity during the first day after toxic effect, but have not caused the lethal effect on them. Thus in this protocol of experiment we have chosen the dose equal to 0.4 ml/100 g of animal's weight.

In the experiment we used 64 rats. All animals survived well the operation on the preparations introduction into spleen. Post-operational activity was observed in 20–30 min. The need in food and drinking appeared in 1 hr after preparations introduction. In 24 hrs after transplantation experimental animals on the activity and behaviour did not differ intact ones. In 72 hrs after the beginning of experiments CCl_4 was intraperitoneally introduced to rats, causing by this an acute toxic damage of liver. Clinical signs of the damage were observed even in 4–5 hrs. Animals became flaccid, not mobile with manifested cyanosis of extremeties as well as the fever was found in them. Such symptoms kept within 48 hrs after the introduction of CCl_4. An improvement started in 48 hrs. To this time the rats became more active, cyanosis of extremeties reduced, fever stopped, the need in food and drinking appeared. Differences in the group of animals on these criteria were not revealed. The percentage of survival (61–65) did not depend on the origin of introduced preparation. In the norm the activity of AlAT in intact animals made 0.73 ± 0.075 μcat/l in 24 hrs after introduction of CCl_4 to animals there was its 20th-fold increase (Fig. 1). A high activity of enzyme preserved within 48 hrs then it statistically true decreased and in 3 days made 3.1 ± 0.61 μcat/l.

During the development of AHI the dynamics of the activity of AsAT had a similar character with the change in AlAT (Fig. 2). In 24 hrs aftre CCl_4 introduction the damage of rats' liver was accompanied by the increase of the activity of AsAT in 10 times in comparison with the norm (1.03 ± 0.1 μcat/l). To 72 hrs of enzyme activity reduced and made 2.42 ± 0.56 μcat/l.

Transplantation of the preparations under study did not considerably affect the level of activity of investigated enzymes in blood serum of animals with damaged liver. In experimental groups multiple activation of enzymes in 24 hrs after CCl_4 introduction and reduction of their activity to 72 hrs after toxic damage were observed. No statistically significant dif-

Матеріал, захищений авторським правом

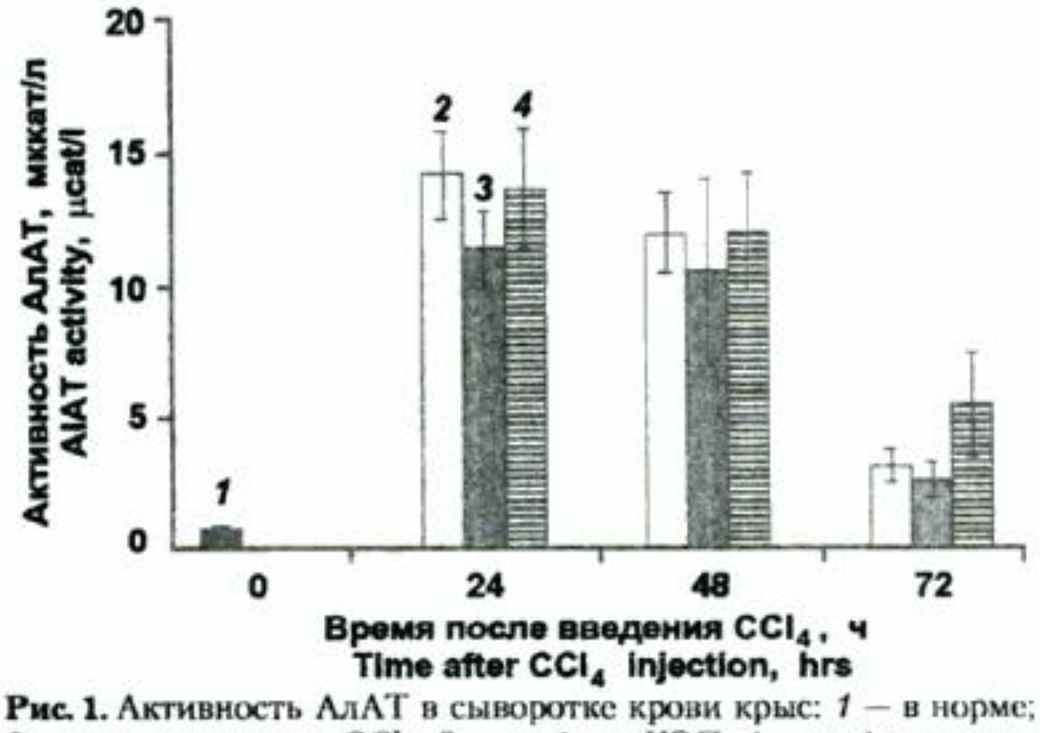


Рис. 1. Активность АлАТ в сыворотке крови крыс: *1* — в норме; *2* — после инъекции CCl_4; *3* — на фоне КЭП; *4* — на фоне цитозоля мягких тканей эмбриона человека.

Fig. 1. AlAT activity in rats blood serum: *1* — in norm; *2* — after CCl_4 injection; *3* — with human ELC; *4* — with human embryo soft tissues cytosolc.

Рис. 2. Активность АсАТ в сыворотке крови крыс: *1* — в норме; *2* — после инъекции CCl_4; *3* — на фоне КЭП; *4* — на фоне цитозоля мягких тканей эмбриона человека.

Fig. 2. AsAT activity in rats blood serum: *1* — in norm; *2* — after CCl_4 injection; *3* — with human ELC; *4* — with human embryo soft tissues cytosole.

верно снижалась и через 3-е суток составляла 3,1 ± 0,61 мккат/л.

При развитии ОПН динамика активности АсАТ носила сходный характер с изменением АлАТ (рис. 2). Через сутки после введения CCl_4 повреждение печени крыс сопровождалось увеличением активности АсАТ в 10 раз по сравнению с нормой (1,03 ± 0,1 мккат/л). К 72-м часам активность фермента снижалась и составляла 2,42 ± 0,56 мккат/л.

Трансплантация изучаемых препаратов не оказывала существенного влияния на уровень активности исследуемых ферментов в сыворотке крови животных с пораженной печенью. В опытных группах наблюдались многократная активация ферментов через сутки после введения CCl_4 и снижение их активности к 72-м часам после токсического повреждения. Достоверных отличий между опытными и контрольными животными в изменении активности сывороточных трансаминаз выявлено не было. Полученные результаты показали, что введение CCl_4 в выбранной концентрации вызывало сильное повреждение печени, которое сопровождалось многократным повышением уровня сывороточных трансаминаз. Репаративные процессы в печени активируются через 72 ч после токсического воздействия на организм животных [9]. В наших экспериментах в это время активность ферментов достоверно снижалась, но все же не достигала значений контрольных животных. Введение препаратов не оказывало существенного влияния на процессы репарации в печени в данной экспериментальной модели.

В процессе метаболизма CCl_4 в печени образуются свободные радикалы, повреждающие плазматическую мембрану, эндоплазматический ретикулум, митохондрии, лизосомы и ядро. При любом поражении гепатоцитов неизбежным является повышение уровня ПОЛ [9]. В связи с этим определяли концентрацию МДА в сыворотке крови крыс.

Содержание МДА в сыворотке крови интактных животных составляло 6,16 ± 0,59 нмоль/мл

ferences between experimental and control animals in the activity change of serum transaminases were noted. The obtained results showed, that CCl_4 injection in the chosen concentration caused a manifested liver injury, accompanied by multiple increase in the level of serum transaminases. Reparative processes in liver were activated in 72 hrs after a toxic effect on the animals' organism [9]. At the same time in our experiments the enzymes activity statistically and significantly decreased, however it did not reach the values of the control animals. Injection of the preparations did not significantly affect the reparation process in liver in the given experimental model.

Free radicals, damaging plasmatic membrane, endoplasmatic reticulum, mytochondria, lysosomes and nucleus are formed during metabolic process of CCl_4 in liver. During each damage of hepatocytes an increase of LPO level is inevitable [9]. In this connection MDA concentration in the rat blood serum was determined.

MDA content in the blood serum of intact animals made 6.1 ± 0.59 nmol/ml (Fig. 3). CCl_4 injection statistically increased in 24 hrs the MDA concentration by 1.7 times, and this ratio remained up to 72 hrs after the effect. In animals, to which the transplantation of liver embryonic cells suspension was done, the MDA concentration in 24 hrs after CCl injection increased lesser in comparison with the control, remaining at such a level up to 48 hrs, then it decreased to 72 hrs, reaching the norm (7.16 ± 0.66 nmol/ml). Thereat statistically significant difference in the MDA concentration at the absence and presence of transplanted cells was noted.

Cytosol injection of embryonic soft tissues was manifested in the tendency to the MDA concentration reduction in a day after CCl_4 injection in comparison with the control values ($p = 0.08$), however this effect was a short-term and in 48 hrs was not revealed. In 3 days after CCl_4 injection the MDA concentration in this animals' group made 9.87 ± 2.175 nmol/ml,

Матеріал, захищений авторським правом

(рис. 3). Введение CCl_4 достоверно увеличивало концентрацию МДА в 1,7 раза через сутки у контрольных животных и это соотношение сохранялось до 72-х часов после воздействия. У животных, которым производили трансплантацию суспензии КЭП, концентрация МДА через 24 ч после введения CCl_4 увеличивалась в меньшей степени по сравнению с контролем, оставаясь на таком уровне до 48 ч, а затем к 72-м часам снижалась, достигая нормы ($7{,}16 \pm 0{,}66$ нмоль/мл). При этом было отмечено достоверное различие в концентрациях МДА при отсутствии и наличии трансплантированных клеток.

Введение цитозоля мягких тканей эмбрионов проявлялось в тенденции к снижению концентрации МДА через сутки после инъекции CCl_4 по сравнению с контрольными значениями ($p = 0{,}08$), но это действие было кратковременным и не обнаруживалось уже через 48 ч. Через 3-е суток после введения CCl_4 концентрация МДА в этой группе животных составляла $9{,}87 \pm 2{,}175$ нмоль/мл, что соответствовало значениям в контрольной группе. Таким образом, однократное введение CCl_4 активировало процессы ПОЛ в сыворотке контрольных животных в течение всего исследуемого периода. Трансплантация препаратов из эмбриональной печени оказывала антиоксидантный эффект на 3-и сутки, а действие цитозоля мягких тканей снижало уровень перекисных процессов в течение первых суток после токсического воздействия.

Приведенные результаты свидетельствуют о том, что однократное введение высоких доз CCl_4 вызывало развитие ОПН, которая проявлялась в повреждении паренхиматозных клеток печени (гепатоцитов) и повышении маркерных ферментов (АлАТ, АсАТ) в крови. Морфологически ОПН характеризуется развитием центролобулярных некрозов печеночных клеток и жировой дистрофией [4]. Одним из механизмов этого повреждения следует считать индукцию ПОЛ, уровень которого повышался в 1,7 раза через 24 ч после токсического воздействия и сохранялся в течение 3-х суток. При этом необходимо отметить, что, в отличие от препаратов из эмбриональной печени, которые проявляли тенденцию к ингибированию ПОЛ уже в первые сутки и достоверно снижали концентрацию МДА на 3-и сутки, цитозоль эмбриональных тканей оказывал кратковременное действие и был эффективным только в первые сутки после токсического воздействия. Однако этот механизм, очевидно, не является единственным и определяющим для развития ОПН, индуцированной CCl_4. Об этом свидетельствует факт, что введение эмбриональных клеток и их экстрактов подавляет ПОЛ, но не предотвращает гибель клеток печени. Это согласуется с данными [11, 15], в которых отмечается, что повреждение печени токсическими веществами и процессы ПОЛ могут быть независимыми процессами. Подобные явления наблюдали и при воздей-

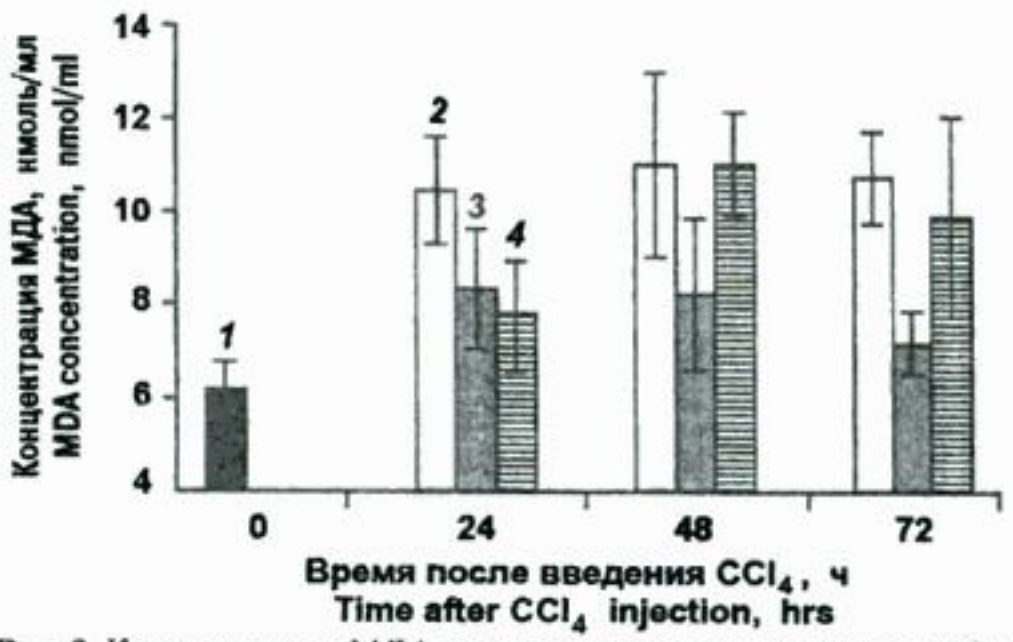


Рис. 3. Концентрация МДА в сыворотке крови: интактных (*1*) и опытных (*2–4*) крыс после инъекции CCl_4; на фоне КЭП (*3*) и цитозоля мягких тканей эмбриона человека (*4*).

Fig. 3. MDA concentration in blood serum of intact (*1*) and experimental animals (*2–4*) after CCl_4 injection; with human ELC (*3*); with human embryo soft tissues cytosole (*4*).

that corresponded to the values in the control group. Thus, a single CCl_4 injection activated the LPO processes in the serum of control animals within the whole period of investigation. Transplantation of the preparations from embryonic liver showed antioxidative effect to the third day, and cytosol effect of soft tissues decreased the level of peroxidative processes within the first day just after a toxic effect.

Presented results testified, that a single injection of high CCl_4 doses caused the development of acute liver insufficiency, manifested in the damage of parenchymatous liver cells (hepatocytes) and increase of marker enzymes (AlAT, AsAT) in blood. Morphologically acute liver insufficiency was characterised by the development of central lobular necroses of liver cells and fatty dystrophy [4]. LPO induction is one of the mechanisms of this damage, level of which increased by 1.7 times in 24 hrs after a toxic effect and remained within three days. Thereat it is necessary to note, that in contrast to embryonic liver preparations, which already to the first day manifested the tendency to LPO inhibition and to the 3rd day statistically reduced the MDA concentration, cytosol of embryonic tissues showed a short-term effect and was efficient just during the 1st day after a toxic effect. However this mechanism, obviously, is not a single and determining one for the development of an acute hepatic insufficiency, induced by CCl_4. The fact testifies to the following: the injection of embryonic cells and their extracts, suppresses LPO, however, it does not prevent the damage of liver cells testifies to this. This was confirmed with the data [11, 15], noted, that the liver damage by toxic substances and the LPO processes can be independent processes. Such phenomena were also observed under CCl_4 effect [14]. CCl_4 is membranetropic poison, capable of the damage of biological membranes as the solvent of lipids [3]. Increase of hepatocytes membrane permeability stipulates the release of cytoplasmatic enzymes (AlAT and AsAT) from cells, and as a result, an increase of their level in serum. Thereat

Матеріал, захищений авторським правом

ствии CCl_4 [14]. CCl_4 – мембранотропный яд, может повреждать биологические мембраны как растворитель липидов [3]. Увеличение проницаемости мембран гепатоцитов обусловливает выход цитоплазматических ферментов АлАТ и АсАТ из клеток и, как следствие, повышение их уровня в сыворотке. При этом степень ферментемии пропорциональна выраженности острого повреждения печени [10].

Очевидно, индукция ПОЛ не первичный механизм в развитии ОПН в данной конкретной постановке эксперимента, а вторичный, т.е. развивается вследствие некроза поврежденных клеток. Установленное в работе ингибирующее действие эмбриональных препаратов на интенсивность ПОЛ требует дальнейшего изучения на других моделях и может явиться основанием для их применения в лечении патологий печени, в патогенез которых вовлекаются перекисные процессы.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Абдуллаев Н. И., Корухов Н. Ю.* Опыт применения консервированных ксеногепатоцитов в комплексном лечении больных желтухами // Вестник хирургии.– 1991.– 146, № 4.– С. 101–103.
2. *Андреева Л. Н.* Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой // Лаб. дело.– 1988.– № 11.– С. 41–43.
3. *Владимиров Ю. А., Арчаков А. И.* Перекисное окисление липидов в биолопических мембранах.– М.: Наука, 1972.– 252 с.
4. *Гальперин Э. И., Семендяева М. И., Неклюдова Е. А.* Недостаточность печени.– М.: Медицина, 1978.– 328 с.
5. *Кулаков В. И., Сухих Г. Т., Молнар Е. М.* Трансплантация фетальных тканей человека: анализ состояния проблемы и перспективы развития // Трансплантация фетальных тканей и клеток человека.– М., 1996.– С. 5–10.
6. *Маргулис М. С., Ерухимов Е. А.* Использование изолированных живых гепатоцитов для лечения печеночной недостаточности // Хирургия.– 1985.– № 3.– С. 150–153.
7. *Петренко А. Ю., Сукач А. Н., Росляков А. Д., Мазур С. П.* Выделение гепатоцитов крыс неферментативным методом: Детоксикационная и дыхательная активности // Биохимия.– 1991.– 56, № 9.– С. 1647–1651.
8. *Поздняков В. С., Иванов М. Г.* Изменение функционального состояния у крыс при воздействии CCl_4 // Токсикология новых промышленных химических веществ.– М., 1979.– С. 87–90.
9. *Скакун Н. П., Писько Г. Т., Мосейчук И. П.* Поражение печени четыреххлористым углеродом.– М.: НИИТЭХИМ, 1989.– 94 с.
10. *Хендерсон Д.* Патофизиология органов пищеварения.– М.: Бином, 1997.– 284 с.
11. *Holme J. A, Wirth P. J., Dybing E. et al.* Cytotoxic effects of N-hydroxyparacetamol in suspensions of isolated rat hepatocytes // Acta pharmacol. et toxicol.– 1982.– 51, № 2.– P. 87–95.
12. *Itoh I., Gohara S., Inomata R. et al.* Calcium staining by the glyoxal-bis-(2-hydroxianil)-method in the livers of rats treated with CCl_4, diltiasem, and with both agents together // Liver.– 1990.– 10.– P. 365–371.
13. *Long R., Moore L. Biochemical evaluation of rat hepatocyte primary cultures as a model for carbon tetrachloride hepatotoxicity: comparative studies in vivo and vitro // Toxicol. and Appl. Pharmacol.– 1988.– 92.– P. 295–305.*
14. *Stasey N. H., Priestly B. G.* Dose-dependent toxicity of CCl_4 in isolated rat hepatocytes and the effect of hepatoprotective treatment // Toxicol. and Appl. Pharmacol.– 1978.– 45.– P. 29–39.
15. *Stasey N. H., Klaasen C. D.* Cadmium uptake by isolated rat hepatocytes // Toxicol. and Appl. Pharmacol.– 1980.– 55.– P. 448–455.

Поступила 13.03.2001

the degree of enzymia is proportional to the manifestation of an acute liver injury [10].

Obviously, the LPO induction is not a determining mechanism in the development of acute liver insufficiency in the given experiment, but it is secondary one, because it is developed due to the necrosis of damaged cells. Inhibiting effect of embryonic preparations on the LPO intensity, established by us, requires the following investigation in other models and can be the base for their application in the treatment of liver pathologies, into pathogenesis of which peroxidative processes are involved.

REFERENCES

1. *Abdullayev N. I., Korukhov N. Yu.* Experience in conservated xenohepatocytes application in complex treatment of icterus patients // Vestnik khirurgii.– 1991.– 146, № 4.– P. 101–103.
2. *Andreyeva L. N.* Modification of lipid peroxides determination method in thiobarbituric acid test // Lab. Delo.– 1988.– № 11.– P. 41–43.
3. *Vladimirov Yu. A., Archakov A. I.* Lipid peroxidation in biological membranes.– M.: Nauka, 1972.– 252 p.
4. *Galperin E. I., Semendyayeva M. I., Neklyudova E.A.* Liver insufficiency.– M.: Meditsina, 1978.– 328 p.
5. *Kulakov V. I., Sukhikh G. T., Molnar E. M.* Human fetal tissue transplantation: analysis of problem state and development perspectives // Human fetal tissue and cells transplantation.– M., 1996.– P. 5–10.
6. *Margulis M. S., Yerukhimov E. A.* Using of isolated living hepatocytes for liver insufficiency treatment // Khirurgiya.– 1985.– № 3.– P. 150–153.
7. *Petrenko A. Yu., Sukach A. N., Roslyakov A. D., Mazur S. P.* Hepatocytes isolation with non-enzymatic method: detoxicational and breathing activities // Biokhimia.– 1991.– 56, № 9.– P. 1647–1651.
8. *Pozdnyakov V. S., Ivanov M. G.* Functional state changes in rats at CCl_4 influence // Toxicology of new industrial chemicals.– M., 1979.– P. 87–90.
9. *Skakun N.P., Pisko G.T., Moseychuk I.P.* Liver affection by carbone tetrachlorid.– M., 1989.– 94 p.
10. *Henderson D.* Patophysiology of digestion organs.– M.: Binom, 1997.– 284 p.
11. *Holme J. A, Wirth P. J., Dybing E. et al.* Cytotoxic effects of N-hydroxyparacetamol in suspensions of isolated rat hepatocytes // Acta pharmacol. et toxicol.– 1982.– 51, № 2.– P. 87–95.
12. *Itoh I., Gohara S., Inomata R. et al.* Calcium staining by the glyoxal-bis-(2-hydroxianil)-method in the livers of rats treated with CCl_4, diltiasem, and with both agents together // Liver.– 1990.– 10.– P. 365–371.
13. *Long R., Moore L.* Biochemical evaluation of rat hepatocyte primary cultures as a model for carbon tetrachloride hepatotoxicity: comparative studies in vivo and vitro // Toxicol. and Appl. Pharmacol.– 1988.– 92.– P. 295–305.
14. *Stasey N. H., Priestly B. G.* Dose-dependent toxicity of CCl_4 in isolated rat hepatocytes and the effect of hepatoprotective treatment // Toxicol. and Appl. Pharmacol.– 1978.– 45.– P. 29–39.
15. *Stasey N. H., Klaasen C. D.* Cadmium uptake by isolated rat hepatocytes // Toxicol. and Appl. Pharmacol.– 1980.– 55.– P. 448–455.

Accepted in 13.03.2001

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043: 636.5.082.453

UDC 57.043: 636.5.082.453

Криоконсервирование спермы петухов
I. Цитотоксичность диолов и амидов

Т. П. ЛИННИК

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

О. В. БИЗИКИНА

НИИ птицеводства УААН, Борки, Харьковская обл.

Fowl Sperm Cryopreservation
I. Cytotoxicity of Diols and Amides

T. P. LINNIK

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

O. V. BIZIKINA

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

Изучено цитотоксическое действие на сперму петухов 16 соединений двух гомологических рядов диолов и амидов в диапазоне концентраций от 2,5–12,5% и температуры от 4 до 40 °С. Показано, что амиды меньше, чем диолы, повреждают клетки до замораживания, если вещества прибавляют к суспензии сперматозоидов при температуре от 4 до 20 °С. Обнаружено, что диолы и амиды по-разному влияют на сохранность мембран головок и целостность акросом, что позволяет сделать заключение о дифференцированном действии этих двух классов веществ на различные органеллы сперматозоидов до замораживания. На основании полученной зависимости цитотоксичности диолов и амидов от температуры высказано предположение, что повреждающее действие амидов на сперму петухов имеет химическую природу, а диолов — не только химическую, но и осмотическую (с преимуществом последней).

Вивчена цитотоксична дія на сперму півнів 16 сполук двох гомологічних рядів діолів і амідів у діапазоні концентрацій 2,5–12,5% та температури від 4 до 40 °С. Показано, що аміди менше, ніж діоли, пошкоджують клітини до заморожування, якщо речовини додають до суспензії сперматозоїдів при температурі від 4 до 20 °С. Виявлено, що діоли та аміди по-різному впливають на цілість мембран голівок та цілісність акросом, що дозволяє зробити висновок про диференційну дію цих двох класів речовин на різні органели сперматодоїдів до заморожування. На підставі одержаної залежності цитотоксичності діолів та амідів від температури зроблено припущення, що пошкоджуюча дія амідів на сперму півнів має хімічну природу, а діолів — не тільки хімічну, але й осмотичну (з перевагою останньої).

A cytotoxical effect on fowl sperm of 16 compounds of diol and amide two homologous series within the concentration range of 2.5–12.5% and temperature from 4 to 40 °C was studied. It was demonstrated, that amides less than diols damage cells before freezing if substances are added to spermatozoa at the temperature from 4 to 20 °C. It was found, that diols and amides affect in a different way the safety of head membranes and acrosomes integrity, that allows to make the conclusion on a differentiated effect of these two classes of substances on different organelles of spermatozoa prior freezing. Basing on the obtained dependence of diol and amide cytotoxicity on the temperature we supposed, that a damaging amide effect to fowl sperm had a chemical nature, and those of diol not only chemical but osmotic one with the advantage of the last one.

Применяемые методы низкотемпературного хранения спермы птиц, в частности петухов, позволяют получать оплодотворенность яиц на уровне 60–85% [8, 11, 12], что достигается либо увеличением спермодозы и кратности осеменения, либо значительным усложнением технологии применения криоконсервированной спермы (глубокое осеменение, удаление криопротектора перед использованием спермы и т.д.). Следует признать, что реальные успехи в области криоконсервирования спермы птиц, полученные в основном эмпирически, достигли определенного уровня. Так как самые эффективные среды, самые оптимальные режимы

The applied methods of low temperature storage of poultry sperm, fowl in particular, allow to obtain the fertilization rate at the level of 60–85% [8, 11, 12], that is achieved either by augmenting a sperm dose and the insemination muptiplicity or by considerably complicating the technology of cryopreserved sperm application (deep insemination, cryoprotectant removal before sperm usage etc.). It should be admitted that real successes in the field of poultry sperm cryopreservation, obtained mainly by an empirical way, achieved the certain level. Since the most efficient media, the most optimal cooling regimens and a qualitative initial material do not permit to preserve more

Матеріал, захищений авторським правом

охлаждения и качественный исходный материал не позволяют сохранить более 40–50% абсолютно полноценных клеток после замораживания-оттаивания [8, 13], совершенствование методов криоконсервирования спермы птиц остается объектом пристального внимания многих исследователей. Ключевым вопросом данной проблемы является скрининг новых, эффективных криопротекторов, выяснение природы их цитотоксичности, поиск путей снижения их повреждающего действия на клетки на всех этапах низкотемпературного консервирования.

Цель данной работы – сравнительное изучение цитотоксического действия на сперму петухов соединений двух гомологических рядов с постепенно усложняющейся структурой (диолов и амидов), представители которых этиленгликоль, N,N-диметилацетамид, N,N-диметилформамид используются как криопротекторы при криоконсервировании спермы петухов [11, 12].

В опытах использовали сперму петухов породы миноров, австролорпов и белый леггорн. Сперму получали методом массажа абдоминальной области. Применяли смесь эякулятов нескольких петухов. Для оценки жизнеспособности спермы определяли: подвижность, переживаемость, количество сперматозоидов с целыми и поврежденными мембранами головок, состояние акросом [4] с использованием прижизненного окрашивания флуоресцентными красителями этидиум бромидом и тиазиновым красным. Абсолютный показатель переживаемости рассчитывали как площадь фигуры, ограниченной координатами подвижности спермы, временем жизни и кривой падения ее подвижности, по формуле $S = a_1t_1 + ... + a_nt_n$, где a_n – последовательные оценки подвижности спермы; t_n – последовательные отрезки времени, на которые интерполировалась соответствующая подвижность спермы.

Исследованы 8 соединений ряда диолов и 8 соединений ряда алифатических амидов (табл. 1). Все соединения марки "ч.д.а." или "х.ч." дополнительно очищали и идентифицировали общепринятыми методами [1]. Для описания структуры исследуемых веществ применяли собственные и литературные данные их физико-химических характеристик (табл. 1) [1–3].

Полученную сперму разбавляли средой в соотношении 1:1, в течение 20–30 мин выдерживали при определенной температуре. Затем добавляли раствор исследуемого вещества в той же среде до требуемой конечной концентрации в суспензии клеток в соотношении 1:1 и инкубировали в течение определенного времени при исследуемой температуре. Для разбавления спермы использовали среду следующего состава (г/100 мл воды): глутамат натрия – 1,57; фруктоза – 0,5; лактоза – 3,0; ацетат калия – 0,25; ацетат магния – 0,07; осмотичность 340 мОсмоль/кг; *pH* 6,9.

than 40–50% of absolutely integral cells after freeze-thawing [8, 13], the mastering of methods of poultry sperm cryopreservation remains the object of a great attention of many investigators. The main item of this problem is the screening of new, efficient cryoprotectants, the revealing of the nature of their cytotoxicity, the search for the ways of reduction of their damaging effect on cells at all stages of low temperature preservation.

The aim of this work is a comparative study of a cytotoxical effect on fowl sperm of two homologous series compounds with a gradually complicating structure (diols and amides), which derivatives ethylene glycol, N,N-dimethyl acetamide, N,N-dimethyl formamide are used as cryoprotectants during fowl sperm cryopreservation [11, 12].

In the experiments we used the fowl sperm of the Minor, Australorp and White Leghorn breeds. The sperm was obtained using the method of the abdominal area massage. The ejaculate mixture of several fowls was applied. In order to evaluate the sperm viability we determined such parameters as motility, survival, number of spermatozoa with intact and damaged membranes of heads, acrosome state [4] using an in lifetime staining by fluorescent dyes of ethidium bromide and thiasine red. An absolute survival index was calculated as a plane of the figure, limited by the coordinates of sperm motility, life time and the curve of its motility fall, using the formula $S = a_1t_1 + ... + a_nt_n$, where a_n – consecutive evaluations of sperm motility; t_n – consecutive time periods to which a corresponding sperm motility was interpolated.

We investigated 8 compounds of diol series and those of aliphatic amide series (Table 1). All compounds labeled as "pure for analysis" and "chemical pure" were additionally purified and identified by the commonly used methods [1]. To describe the structure of the studied substances we applied the own and literature data of their physical and chemical characteristics (Table 1) [1–3].

The obtained sperm was diluted by the medium in 1:1 ratio, held under certain temperature within 20–30 min. Then the solution of the studied substance was added to the same medium up to the required final concentration in cell suspension in 1:1 ratio and incubated during the certain time at the studied temperature. For sperm dilution we used the medium of the following composition (g/100 ml of water): sodium glutamate – 1.57; fructose – 0.5; lactose – 3.0; potassium acetate – 0.25; magnesium acetate – 0.07; osmotic characteristics – 340 mOsM/kg; *pH* 6.9.

We varied the temperature of adding and exposure of substances within the limits of 4–40 °C, substances concentration in spermatozoa suspension within the range of 2.5–12.5%, time of sperm exposure with substances from 15 min to 2 hours. Statistical proceeding of the data obtained was accomplished according to the Fisher–Student's method.

Матеріал, захищений авторським правом

Варьировали температуру прибавления и экспозиции веществ в пределах 4–40 °С, концентрацию веществ в суспензии сперматозоидов в диапазоне 2,5–12,5%, время экспозиции спермы с веществами от 15 мин до 2 ч. Статистическую обработку полученных результатов выполняли по методу Фишера–Стьюдента.

В табл. 1 представлены физико-химические свойства исследуемых веществ ряда амидов и диолов. Молекулярная масса изученных веществ изменяется в пределах 62–147, т.е. по принятой классификации все они относятся к эндоцеллюлярным криопротекторам. Как видно из приведенных данных, амиды более гидрофобны, имеют более высокую диэлектрическую проницаемость и дипольный

Physical and chemical properties of studied substances of amid and diol series are presented in the Table 1. Molecular mass of studied substances changes within the limits of 62–147, i.e. according to the established classification all of them are related to the endocellular cryoprotectants. As it is shown from the data presented amides are more hydrophobic, have a higher dielectric permeability and dipole moment in comparison with diols and, consequently, are capable to affect in a greater extent the main cell properties and functions.

The Table 2 shows the investigation results of diol and amide effect of fowl sperm integrity at 20 °C. The data were obtained at the concentration of substances in sperm suspension of 75%. In order to determine an

Таблица 1 **Table 1**

Физико-химические свойства веществ ряда диолов и амидов

Physical and chemical properties of substances of diol and amide series

Вещество Substance	Молекулярная масса Molecular mass	Коэффициент распределения Distribution coefficient	Поверхностная активность, моль/м^2·10^{-9} Surfacial activity, М/м^2·10^{-9}	Диэлектрическая проницаемость при 25 °С [1] Dielectric permeability at 25 °С [1]	Дипольный момент [1] Dipol moment [1]
Диолы / Diols:					
Этиленгликоль (ЭГ) Ethylene glycol (EG)	62,07	0,040	2,6	38,5	2,3
1,3- пропандиол (1,3-ПД) 1,3-propanediol (1,3-PD)	76,10	0,064	16,6	34,3	–
1,2-пропандиол (1,2-ПД) 1,2-propanediol (1,2-PD)	76,10	0,076	7,40	32,0	2,25
2-метоксиэтанол (2-МЭ) 2-metoxyethanol (2-ME)	76,10	0,121	11,8	16,0	2,12
1,4-бутандиол (1,4-БД) 1,4-butanediol (1,4-BD)	90,12	0,137	16,9	30,8	–
1,3-бутандиол (1,3-БД) 1,3-butanediol (1,3-BD)	90,12	0,182	17,3	28,8	–
2,3 -бутандиол (2,3-БД) 2,3-butanediol (2,3-BD)	90,12	0,227	16,9	21,0	–
1,2-бутандиол (1,2-БД) 1,2-butanediol (1,2-BD)	90,12	0,308	22,3	22,4	–
Амиды / Amides:					
Формамид (ФА) Formamide (FA)	45,04	0,049	4,2	109,5	3,37
Ацетамид (АЦ) Acetamide (AC)	59,07	0,062	10,7	60,0	3,72
N-метилацетамид (МАЦ) N-methylacetamide (MAC)	73,10	0,113	12,6	179,0*	3,71
N,N-диметилформамид (ДМФА) N,N-dimethylformamide (DMFA)	73,10	0,233	19,4	36,71	3,86
N,N-диметилацетамид (ДМАЦ) N,N-dimethylacetamide (DMAC)	87,12	0,291	21,2	37,78	3,81
Ацетилморфолин (АЦМОР) Acethylmorpholine (ACMOR)	129,06	0,388	28,5	–	–
N-(β-оксиэтил)ацетамид (ОЭА) N-(β-oxyethyl) acetamide (OEA)	103,12	0,280	28,0	–	–
N,N-(β-диоксиэтил)-ацетамид (ДОЭА) N,N-(β-dioxyethyl)-acetamide (DOEA)	147,0	0,394	39,8	–	–

Примечания. Коэффициент распределения веществ определяли в системе вода–октанол, поверхностную активность на границе фаз вода–гептан [2, 3]; * — диэлектрическая проницаемость при 30 °С.

Notes. The substance distribution coefficient was determined in the water–octanol system, surfacial activity — at the limit of water–heptan phases [2, 3]; * — dielectric permeability at 30 °C.

Матеріал, захищений авторським правом

момент по сравнению с диолами и, следовательно, способны в большей степени влиять на основные свойства и функции клетки.

В табл. 2 приведены результаты исследования влияния диолов и амидов на сохранность спермы петухов при 20 °С. Данные получены при концентрации веществ в суспензии спермы 7,5%, для определения абсолютной переживаемости сперматозоидов время экспозиции с криопротектором продлевали до конечной гибели клеток. Контролем во всех экспериментах служила сперма петухов, разведенная только средой и инкубированная в тех же условиях, что и с веществами.

Учитывая структуру и физико-химические свойства исследуемых веществ, следовало ожидать, что соединения ряда амидов по отношению к сперматозоидам петуха будут более цитотоксичными. Но, как видно из приведенных данных, это не подтверждается. Через 2 ч инкубации спермы с амидами остается до 65–70% морфологически целых клеток, в то время как с диолами — всего 43–62% целых сперматозоидов. Определение абсолютной переживаемости также подтвердило, что амиды меньше повреждают сперматозоиды петухов при одинаковых условиях эксперимента. Не наблюдается четкой зависимости цитотоксичности веществ от их гидрофобности, просматривается лишь ее тенденция. Например, более гидрофобный ДМФА меньше повреждает сперматозоиды, чем формамид. Но у формамида в три раза выше диэлектрическая проницаемость и, вероятно, этим объясняется его высокое повреждающее действие по отношению к сперматозоидам петухов.

Полученные результаты показывают, что в ряду амидов менее цитотоксичными являются МАЦ, ДМФА, ДМАЦ, в ряду диолов — ЭГ, 1,2-ПД и 2,3-БД. Для выяснения разницы характера их действия на сперматозоиды исследована сохранность мембран головок и целостность акросом в зависимости от концентрации веществ в суспензии клеток в диапазоне 2,5–12,5% и температуры экспозиции 4–40 °С. В табл. 3 и 4 представлены полученные результаты, приведено количество сперматозоидов

Таблица 2

Влияние амидов и диолов на сохранность спермы петухов до замораживания

Table 2

Amide and diol effect on fowl sperm integrity before freezing

Вещество Substance	Подвижность спермиев*, % Spermatozoa motility*, %	Количество спермиев с морфологическими повреждениями, %, через (мин) Spermatozoa number with morphological damages, %, in (min)			Абсолютная переживаемость *S*, усл. ед. Absolute survival *S*, rel. units
		15	60	120	
Контроль Control	90 ± 4	6,3 ± 1,6	6,7 ± 1,4	9,2 ± 1,3	1 480
Амиды / Amides:					
ФА / FA	45 ± 5	16,4 ± 2,3	29,9 ± 3,6	43,2 ± 3,7	100
АЦ / AC	75 ± 5	17,2 ± 3,2	29,3 ± 4,7	38,3 ± 2,4	32
МАЦ / MAC	85 ± 7	8,4 ± 0,6	13,9 ± 2,3	26,4 ± 2,3	402
ДМФА / DMFA	85 ± 3	9,2 ± 0,7	14,5 ± 1,8	23,6 ± 2,4	428
ДМАЦ / DMAC	80 ± 5	10,1 ± 0,9	15,6 ± 2,1	27,8 ± 2,7	375
АЦМОР / ACMOR	60 ± 5	14,3 ± 2,4	22,6 ± 5,2	42,1 ± 4,3	253
ОЭА / OEA	70 ± 5	21,3 ± 2,7	28,4 ± 3,7	39,3 ± 3,1	222
ДОЭА / DOEA	50 ± 5	24,5 ± 3,2	37,6 ± 2,4	54,6 ± 4,7	125
Диолы / Diols:					
ЭГ / EG	70 ± 4	9,9 ± 0,7	19,7 ± 1,7	37,3 ± 2.4	367
1,3-ПД / 1,3-PD	52 ± 8	24,3 ± 2,7	30,9 ± 1,3	46,9 ± 3,7	54
1,2-ПД / 1,2-PD	75 ± 5	10,7 ± 0,8	21,8 ± 6,2	39,4 ± 2,3	384
2-МЭ / 2-ME	50 ± 6	26,4 ± 3,7	34,8 ± 5,1	57,3 ± 4,2	245
1,4-БД / 1,4-BD	60 ± 8	17,1 ± 2,4	25,3 ± 2,8	44,5 ± 3,5	226
1,3-БД / 1,3-BD	65 ± 5	18,3 ± 3,1	25,9 ± 3,4	48,4 ± 3,2	164
1,2-БД / 1,2-BD	50 ± 4	27,1 ± 4,2	38,1 ± 4,3	53,2 ± 4,1	58
2,3-БД / 2,3-BD	55 ± 7	12,1 ± 1,2	25,4 ± 4,1	41,2 ± 3,7	348

Примечания. * — подвижность определена через 60 мин инкубации; контроль — сперма петухов, разбавленная средой 1:1.

Notes. * — motility is determined in 60 min of incubation; control — fowl sperm, diluted with the medium 1:1.

absolute survival of spermatozoa the exposure time with cryoprotectant was augmented up to a final cell death. The fowl sperm, being diluted only by the medium and incubated under the same conditions that with the substances, was the control for all experiments.

Taking into consideration physical and chemical properties of studied substances it should be expected, that the compounds of amide series in respect to fowl spermatozoa would be more cytotoxical. However, as it is seen from the data presented, this fact is not confirmed. After two hours of sperm incubation with amides up to 65–70% of cells remain morphologically integral, meanwhile with diols — totally 43–62% of integral spermatozoa. The determination of an absolute survival also confirmed that amides in a lesser extent damage fowl spermatozoa under similar experiment conditions. We did not observe a distinct dependence of substance cytotoxicity on their water-repellent-property, only its tendency was seen. For example, more hydrophobic DMFA damages spermatozoa in a lesser extent than formamide. But formamide's dielectric permeability in thrice higher, and this explains its high damaging effect in respect to fowl spermatozoa.

The data obtained demonstrate, that MAC, DMFA, DMAC are less toxical in amide series, EG, 1,2-PD and 2,3-BD — in those of diols. For revealing the difference of the character of their effect on sper-

Матеріал, захищений авторським правом

с поврежденными мембранами головок и аномальными акросомами (в % от контроля). Количество сперматозоидов в контроле с целой мембраной головок равнялось 98,0 ± 0,6%, с целой акросомой — 89,0 ± 0,4%. Сохранность мембран головок спермиев и целостность акросом определены после 15–20 мин инкубации с криопротектором. Увеличение концентрации веществ в суспензии вызывает повышение их повреждающего действия на сперматозоиды, что очевидно. Установлено, что оптимальная конечная концентрация в среде для амидов — не более 10%, для диолов — не более 7,5% при температуре прибавления 4 °С. При других условиях инкубации повреждения сперматозоидов возрастают.

Обнаружено, что вещества ряда диолов и амидов по-разному влияют на сохранность мембран головок и целостность акросом. В табл. 3 показан уровень повреждений мембран головок сперматозоидов. Как видно, в присутствии диолов количество клеток с поврежденными мембранами достигает 15–20%, в то время как в присутствии амидов — не превышает уровня 10% даже при концентрации 12,5% и температуре прибавления 40 °С. В табл. 4 приведены данные влияния амидов

matozoa we investigated the safety of membranes of heads and acrosome integrity depending on substance concentration in cell suspension within the range of 2.5–12.5% and the exposure temperature 4–40 °C. In the Table 3 and 4 the results obtained, the number of spermatozoa with damaged membranes of heads and abnormal acrosomes in percentage of the control are presented. The quantity of spermatozoa in the control with an integral membrane of heads made 98.0 ± 0.6%, with an intact acrosome – 89 ± 0.4%. The integrity of membranes of spermatozoa heads and acrosome safety were determined after 15–20 min of incubation with a cryoprotectant. An increase in substances concentration in suspension causes the augmentation of their damaging effect on spermatozoa, that is obvious. It was established, that an optimal final concentration in the medium for amides in not more, than 10%, for diols — not more than 7.5% at 4 °C temperature of adding. Under other incubation conditions there is an increase in spermatozoa damage.

It was found, that the substances of diol and amide series affect in a different way the integrity of membranes of heads and acrosome safety. In the Table 3 the level of damages of membranes of spermatozoa heads is demonstrated. As it is seen, in diol presence the number of cells with damaged membranes achieves 15–20%, meanwhile in the presence of amides it does not exceed 10% level even under the 12.5% concentration and 40 °C temperature of adding. The data on amide and diol effect on acrosome integrity are shown in the Table 4. Under the temperature of adding from 4 to 20 °C the level of damages is practically equal. The revealed differences are not statistically significant, except of the results obtained with 2,3-BD, in which presence the number of cells with damaged acrosomes achieves 14–17%. But when increasing the incubation temperature of substances with sperm from 25 to 40 °C amides more considerably damage the acrosomes than diols. Under the substances concentration of 12.5% in the suspension, up to 27% of cells have abnormal acrosomes. The data obtained allow to conclude about a differentiated effect of diols and amides on different organelles of fowl spermatozoa [10].

The dependence of diol and amide damaging effect on fowl spermatozoa on the temperature occurred to be much more com-

Таблица 3

Влияние амидов и диолов на сохранность мембран головок спермиев петуха

Table 3

Amide and diol effect on the membrane integrity of fowl spermatozoa heads

Вещество Substance	Концентрация, % Concentration, %	Количество сперматозоидов с поврежденными мембранами головок, %, при температуре, °С Spermatozoa number with damaged membranes of heads, %, at temperature, °С			
		4	15	25	40
МАЦ MAC	2,5	1,3 ± 0,1	1,5 ± 0,1	2,2 ± 0,1	2,5 ± 0,2
	5,0	1,4 ± 0,1	1,7 ± 0,1	2,6 ± 0,1	4,1 ± 0,3
	7,5	1,4 ± 0,1	2,7 ± 0,2	3,1 ± 0,2	5,8 ± 0,3
	10,0	3,6 ± 0,2	4,4 ± 0,2	5,4 ± 0,2	7,4 ± 0,5
	12,5	4,2 ± 0,2	5,3 ± 0,3	6,0 ± 0,3	8,4 ± 0,5
ДМАЦ DMAC	2,5	1,5 ± 0,1	1,7 ± 0,1	2,4 ± 0,1	3,8 ± 0,2
	5,0	1,5 ± 0,2	2,2 ± 0,1	3,6 ± 0,2	5,1 ± 0,2
	7,5	1,8 ± 0,2	3,1 ± 0,3	4,2 ± 0,3	5,7 ± 0,3
	10,0	4,0 ± 0,3	4,9 ± 0,2	5,2 ± 0,2	7,9 ± 0,3
	12,5	5,2 ± 0,3	7,0 ± 0,5	7,6 ± 0,5	8,9 ± 0,5
ДМФА DMFA	2,5	1,5 ± 0,1	1,7 ± 0,1	2,9 ± 0,2	3,6 ± 0,2
	5,0	1,4 ± 0,2	2,1 ± 0,2	3,1 ± 0,3	4,8 ± 0,3
	7,5	1,4 ± 0,2	2,9 ± 0,1	4,2 ± 0,2	5,6 ± 0,3
	10,0	3,1 ± 0,3	4,9 ± 0,2	4,9 ± 0,3	6,9 ± 0,2
	12,5	4,7 ± 0,3	5,6 ± 0,3	5,9 ± 0,4	7,6 ± 0,4
ЭГ EG	2,5	2,6 ± 0,4	4,1 ± 0,4	2,3 ± 0,1	2,1 ± 0,1
	5,0	3,9 ± 0,3	6,0 ± 0,7	5,4 ± 0,3	4,1 ± 0,2
	7,5	5,2 ± 0,4	9,1 ± 0,7	7,1 ± 0,2	5,5 ± 0,1
	10,0	8,0 ± 0,2	14,2 ± 0,9	11,3 ± 0,4	8,2 ± 0,4
	12,5	12,1 ± 0,6	16,1 ± 1,2	12,5 ± 0,4	10,6 ± 0,5
1,2-ПД 1,2-PD	2,5	2,4 ± 0,3	4,6 ± 0,1	2,4 ± 0,2	2,2 ± 0,1
	5,0	3,8 ± 0,6	6,2 ± 0,3	3,9 ± 0,4	4,1 ± 0,4
	7,5	5,4 ± 0,4	10,1 ± 0,5	4,7 ± 0,3	5,2 ± 0,3
	10,0	8,6 ± 0,6	14,7 ± 0,4	8,4 ± 0,6	8,4 ± 0,4
	12,5	12,8 ± 0,7	16,9 ± 0,6	13,2 ± 0,6	10,1 ± 0,5
2,3-БД 2,3-BD	2,5	4,1 ± 0,2	5,4 ± 0,3	4,4 ± 0,3	4,0 ± 0,4
	5,0	5,6 ± 0,4	7,8 ± 0,7	5,2 ± 0,2	5,8 ± 0,6
	7,5	8,4 ± 0,7	12,6 ± 0,5	10,2 ± 0,5	9,8 ± 0,3
	10,0	9,6 ± 0,6	14,8 ± 0,4	14,6 ± 0,7	12,2 ± 0,2
	12,5	16,4 ± 0,7	19,4 ± 0,9	16,2 ± 1,1	15,1 ± 0,9

Матеріал, захищений авторським правом

и диолов на целостность акросом. При температуре прибавления от 4 до 20 °С уровень повреждений практически одинаков. Выявленные различия не достоверны, исключая результаты, полученные с 2,3-БД, в присутствии которого количество клеток с поврежденными акросомами достигает 14–17%. Но при повышении температуры инкубации веществ со спермой от 25 до 40 °С амиды более значительно повреждают акросомы, чем диолы. При концентрации веществ 12,5% в суспензии до 27% клеток имеют аномальные акросомы, что позволяет сделать заключение о дифференцированном действии диолов и амидов на различные органеллы сперматозоидов петухов и согласуется с ранее полученными данными [10].

Еще более сложной оказалась зависимость повреждающего действия диолов и амидов на сперматозоиды петухов от температуры. На рис. 1 приведены данные морфологической сохранности клеток, полученные при концентрации веществ в суспензии 10%.

Как видно из рис. 1, *а*, количество сперматозоидов с морфологическими повреждениями в присутствии амидов с повышением температуры монотонно увеличивается, в то время как в присутствии диолов зависимость их повреждающего действия на клетки от температуры носит более сложный характер (рис. 1, *б*). Кривая зависимости проходит через максимум при 15 °С и уменьшается с ростом температуры до уровня, наблюдаемого при 4 °С. Обнаруженное различие зависимости цитотоксичности диолов и амидов от температуры, возможно, объясняется следующим. Повреждающее действие амидов на сперматозоиды петухов имеет преимущественно химическую природу, обусловленную высокой проницаемостью амидов через мембраны, а диолов — не только химический, но и осмотический характер, вероятно, с преимуществом последнего. К сожалению, в литературе не удалось обнаружить конкретных значений коэффициентов проницаемости амидов через мембраны сперматозоидов, имеются только косвенные данные [6, 12]. Однако уникально высокая проницаемость амидов через мембраны других видов клеток подтверждалась неоднократно [6, 7]. Максимум на кривой зависимости повреждающего действия диолов от температуры (рис. 1, *б*) в области 15 °С, видимо, обусловлен наличием фазовых переходов липидов мембран из жидкокристаллического в состояние геля, а также внутренней перестройкой бислоя, что приводит к более высокой чувствительности мембраны сперматозоидов в этом интервале температур к внешним воздействиям.

На рис. 2 приведены литературные данные [5] чувствительности сперматозоидов петуха к охлаждению от положительных температур до 0 °С и термической динамики фазовых переходов липидов

Таблица 4

Влияние амидов и диолов на сохранность акросом спермиев петуха

Table 4

Amide and diol effect on the acrosome integrity of fowl spermatozoa

Вещество Substance	Концентрация, % Concentration, %	Количество сперматозоидов с поврежденными мембранами головок, %, при температуре, °С Spermatozoa number with damaged membranes of heads, %, at temperature, °С			
		4	15	25	40
МАЦ MAC	2,5	5,1 ± 0,5	5,6 ± 0,4	10,4 ± 0,7	10,8 ± 0,9
	5,0	6,2 ± 0,7	6,2 ± 0,6	10,8 ± 0,9	11,5 ± 0,8
	7,5	6,4 ± 0,6	7,4 ± 0,6	11,6 ± 0,8	12,6 ± 0,9
	10,0	8,2 ± 0,6	10,1 ± 0,5	12,3 ± 0,7	14,1 ± 0,7
	12,5	8,8 ± 0,5	11,3 ± 0,7	16,1 ± 0,8	17,4 ± 0,9
ДМАЦ DMAC	2,5	5,3 ± 0,4	5,7 ± 0,6	10,6 ± 0,7	12,3 ± 0,6
	5,0	6,5 ± 0,5	7,1 ± 0,4	11,4 ± 0,6	14,8 ± 0,9
	7,5	6,9 ± 0,3	7,9 ± 0,6	14,2 ± 0,8	15,6 ± 0,8
	10,0	8,7 ± 0,7	11,3 ± 0,8	15,6 ± 0,7	17,7 ± 1,1
	12,5	10,7 ± 0,9	12,2 ± 1,0	23,0 ± 1,3	27,1 ± 1,4
ДМФА DMFA	2,5	5,1 ± 0,3	5,6 ± 0,4	10,9 ± 0,5	12,1 ± 0,5
	5,0	6,4 ± 0,3	6,9 ± 0,4	11,1 ± 0,5	14,6 ± 0,4
	7,5	8,2 ± 0,4	7,4 ± 0,5	12,3 ± 0,6	15,2 ± 0,6
	10,0	8,8 ± 0,4	9,6 ± 0,4	13,6 ± 0,5	16,6 ± 0,5
	12,5	9,1 ± 0,5	10,4 ± 0,6	19,3 ± 0,7	23,0 ± 0,9
ЭГ EG	2,5	4,8 ± 0,7	5,6 ± 0,6	4,6 ± 0,6	4,2 ± 0,6
	5,0	5,2 ± 0,6	7,4 ± 0,7	6,0 ± 0,4	5,6 ± 0,4
	7,5	6,9 ± 0,4	8,5 ± 0,6	6,8 ± 0,6	6,3 ± 0,7
	10,0	6,9 ± 0,7	9,1 ± 0,7	7,2 ± 0,5	6,6 ± 0,7
	12,5	8,4 ± 0,8	10,1 ± 0,8	8,4 ± 0,7	7,9 ± 0,7
1,2-ПД 1,2-PD	2,5	5,1 ± 0,4	6,7 ± 0,4	5,0 ± 0,3	4,6 ± 0,2
	5,0	5,7 ± 0,3	7,0 ± 0,6	5,6 ± 0,3	4,9 ± 0,3
	7,5	7,2 ± 0,4	9,1 ± 0,5	7,3 ± 0,7	6,7 ± 0,5
	10,0	7,7 ± 0,7	10,2 ± 0,8	8,6 ± 0,5	7,4 ± 0,4
	12,5	9,6 ± 0,7	12,6 ± 0,9	10,7 ± 0,7	10,2 ± 0,7
2,3-БД 2,3-BD	2,5	5,6 ± 0,2	8,9 ± 0,3	5,7 ± 0,4	5,4 ± 0,2
	5,0	6,4 ± 0,4	7,2 ± 0,6	5,9 ± 0,3	5,7 ± 0,2
	7,5	8,7 ± 0,3	10,3 ± 0,6	7,4 ± 0,5	6,9 ± 0,4
	10,0	9,3 ± 0,7	12,7 ± 0,8	9,3 ± 0,7	8,7 ± 0,7
	12,5	12,6 ± 0,9	16,9 ± 0,9	13,9 ± 0,7	13,0 ± 0,6

plicated. The Figure 1 comprises the data of cell morphological integrity, obtained under the 10% substance concentration in the suspension.

As it is seen from the Fig. 1, *a* the spermatozoa number with morphological damages in the amide presence with an increase in the temperature augments monotonously, meanwhile in the diol presence the dependence of their damaging effect on cells on the temperature has more complicated character (Fig. 1, *б*). The curve of dependence passes through the maximum at 15 °C and reduces with the temperature growth down to the level, observed at 4 °C. The revealed difference of dependence of diol and amide cytotoxicity on the temperature, probably, is explained by the follows. A damaging effect of amides on fowl spermatozoa has mainly chemical nature, stipulated by a high amide permeability through membranes, but those of diol has not only chemical, but osmotical character to, probably with the advantage of the last one. Unfortunately in the literature we did not manage to reveal the distinct values of amide permeability coefficients through the spermatozoa membranes, there are only indirect data [6, 12]. However an uniquely high amide permeability through the membranes of other kinds of cells was more than once confirmed [6, 7]. The maximum at the curve of diol damaging effect dependence on the temperature (Fig. 1, *б*) in the area of 15 °C is apparently stipulated by the presence of phase transitions of lipid membranes

Матеріал, захищений авторським правом

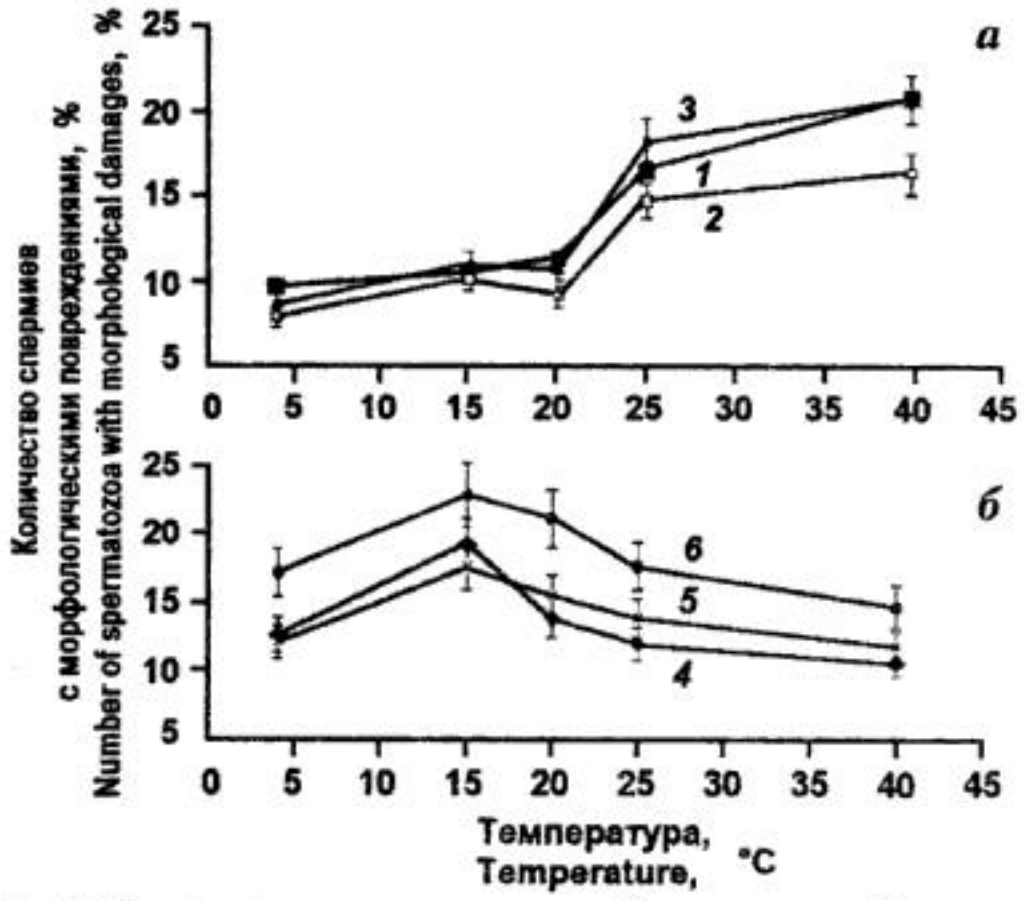
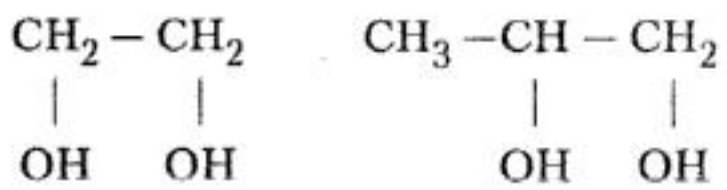


Рис. 1. Зависимость повреждающего действия амидов (*а*) и диолов (*б*) на сперматозоиды петуха от температуры: *1* – ДМФА; *2* – МАЦ; *3* – ДМАЦ; *4* – ЭГ; *5* – 1,2-ПД; *6* – 2,3-БД.

Fig. 1. Dependence of amides (*a*) and diols (*б*) damaging effect to fowl spermatozoa on temperature: *1* – DMFA; *2* – MAC; *3* – DMAC; *4* – EG; *5* – 1,2-PD; *6* – 2,3-BD.

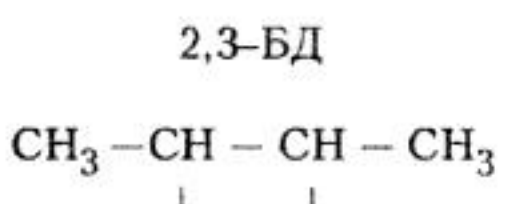
мембран в этом же диапазоне температур. Жизнеспособность сперматозоидов определяли по целостности мембран. Как видно из рис. 2, кривые, описывающие характер изменения сохранности мембран сперматозоидов и температурной зависимости фазовых переходов мембранных липидов, подобны. Фазовые переходы липидов мембран сперматозоидов петуха наблюдаются в диапазоне от 25 до 12 °С. В этом же интервале температур обнаружено максимальное количество морфологически поврежденных клеток при инкубации с диолами. В меньшей степени это наблюдается для ЭГ (рис. 1, *б*), что, вероятно, обусловлено более высокой его проницаемостью через мембрану. Представленные структурные формулы исследованных диолов ЭГ, 1,2-ПД и 2,3-БД наглядно демонстрируют постепенное усложнение их структуры, что естественно вызывает изменение физико-химических свойств диолов:

ЭГ



1,2–ПД

2,3–БД



Одна метильная группа в 1,2-ПД и две метильные группы в 2,3-БД приводят к увеличению размеров молекул по сравнению с ЭГ и повышению их гидрофобности (см. табл. 1). Следовательно, меняется способность этих веществ проникать в клетку или механизм их проницаемости через мембрану. Известно [9], что коэффициент проницаемости через мембрану сперматозоидов человека для ЭГ выше, чем для 1,2-ПД (0,79 и $0{,}23 \cdot 10^{-2}$ см/мин со-

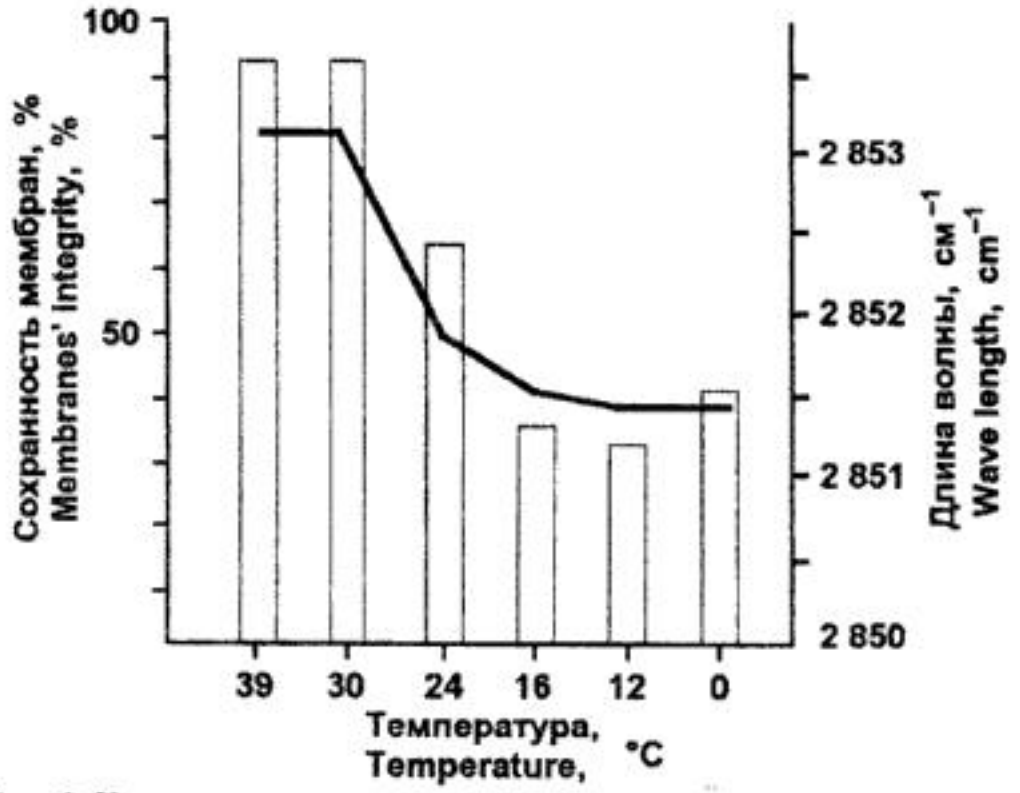


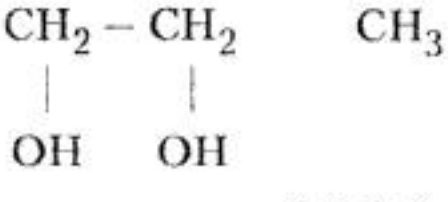
Рис. 2. Чувствительность сперматозоидов петухов к охлаждению от 40 до 0 °С и фазовые переходы липидов мембран [5]: □ – сохранность мембран сперматозоидов; ——— – длина волны.

Fig. 2. Sensibility of fowl spermatozoa to cooling from 40 to 0 °C and phase transition of membrane lipids [5]: □ – spermatozoa membranes' integrity; ——— – wave length.

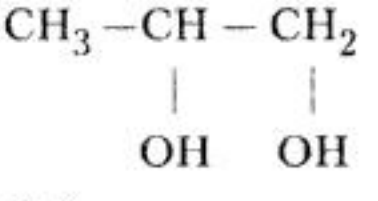
from a liquid-crystal state into the gel one, as well as by an inner rearrangement of biolayer, that results in the higher sensitivity of spermatozoa membrane in this temperature interval to the external effects.

In the Fig. 2 there are the literature data [5] of fowl spermatozoa sensitivity to cooling from positive temperatures to 0 °C and to thermal dynamics of phase transitions of lipid membranes in the same temperature interval. Spermatozoa viability was determined by the membrane integrity. As it is seen in the Fig. 2 the curves, describing the character of change in spermatozoa membrane integrity and temperature dependence of phase transitions of membrane lipids are the similar. Phase transitions of fowl spermatozoa membrane lipids are observed in the range from 25 to 12 °C. In the same temperature interval we revealed a maximum number of morphologically damaged cells during the incubation with diols. In a lesser extent it is observed for EG (Fig. 1, *б*), that, probably, is stipulated by a higher its permeability through a membrane. The presented structural formulae of EG, 1,2-PD and 2,3-BD investigated diols visually demonstrate a gradual complication of their structure, that, naturally causes the change in diol physical and chemical properties:

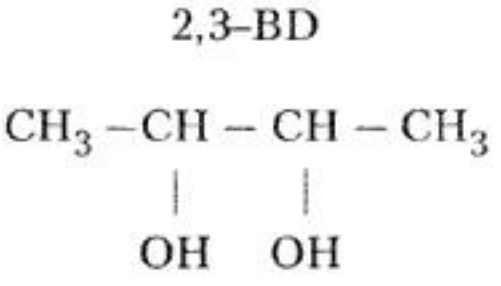
EG



1,2–PD



2,3–BD



One methyl group in 1,2-PD and two methyl groups in 2,3-BD result in an increase in the molecule sizes in comparison with EG and their water-repellent-property augmentation (see Table 1). Consequently the capability of these substances to penetrate

Матеріал, захищений авторським правом

ответственно). Подобную зависимость можно ожидать и для сперматозоидов петуха, так как проницаемость мембран спермы петуха и человека для воды очень близки (спермы петуха – $2{,}1 \cdot 10^4$ см/мин/атм, спермы человека – $2{,}4 \cdot 10^4$ см/мин/атм [13]). Проницаемость 2,3-БД через мембрану сперматозоидов будет еще ниже, что, вероятно, и вызывает его высокую цитотоксичность по отношению к сперме петухов, обусловленную осмотическим фактором.

Таким образом, обнаружено, что диолы и амиды по-разному влияют на сохранность мембран головок и целостность акросом, что позволяет сделать вывод о дифференцированном действии этих двух классов веществ на различные органеллы сперматозоидов до замораживания. Установлено, что характер повреждающего действия амидов и диолов на сперматозоиды петухов также существенно отличается. Полученные результаты дают основание предположить перспективность применения смеси амидов и диолов в качестве криопротекторов при криоконсервировании спермы птиц, что позволит не только снизить их цитотоксичность, но и повысить уровень морфофункциональной сохранности сперматозоидов после замораживания-оттаивания.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Карапетян Ю. А., Эйчис В. Н.* Физико-химические свойства электролитных неводных растворов.– М.: Химия, 1989.– 252 с.
2. *Линник Т. П.* Зависимость криопротекторной активности соединений ряда амидов от их физико-химических свойств: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.– Харьков, 1986.– 19 с.
3. *Пичугин Ю. И., Новиков А. Н.* Зависимость цитотоксичности и криопротекторной активности диолов от их структуры и физико-химических свойств // Криоконсервирование клеток и тканей.– Харьков, 1989.– С. 15–28.
4. *Сахацкий Н. И., Терещенко А. В., Артеменко А. Б.* Экспресс-метод оценки оплодотворяющей способности замороженно -оттаянной спермы сельскохозяйственной птицы // С.-х. биология.– 1987.– № 12.– С. 77–80.
5. *Arav A., Pearl M., Zeron Y.* Does lipid explain chilling sensitivity and membrane lipid phase transition of spermatozoa and oocytes? // Cryo-Lett.– 2000.– 21.– P. 179–186.
6. *Fahy G. M.* Cryoprotectant toxicity reduction: specific or nonspecific? // Cryo-Lett.– 1984.– 5, № 5.– P. 287–294.
7. *Fahy G. M., Lilley T. H., Lindsell H. et al.* Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: In search of molecular mechanisms // Cryobiology.– 1990.– 27, № 3.– P. 247–268.
8. *Hammerstedt R. N., Graham J. K.* Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol // Cryobiology.– 1992.– 29.– P. 26–38.
9. *Gilmore J. A., McGann, L. E., Liu J. et al.* Effect of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa // Biol. of Reprod.– 1995.– 53.– P. 985–995.
10. *Maeda T., Terada T., Tsutsumi Y.* Comparative study of the effects of various cryoprotectants in preserving the morfology of frozen and thawed fowl spermatozoa // Brit. Poultry Sc.– 1984.– 25, № 4.– P. 547–553.
11. *Schramm G.-P., Hubner R.* Konservierung von Gefugelsperma // Arch. Tierz.– 1989.– 32, № 1.– S. 51–61.
12. *Tselutin K., Narubina L, Mavrodina T., Tur B.* Cryopreservation of poultry semen // Brit. Poultry Sc.– 1995.– 36.– P. 805–811.
13. *Watson P. F.* Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing // Reprod. Fertil. Dev.– 1995.– 7.– P. 871–891.

Поступила 27.02.2001

into a cell or the mechanism of their permeability through a membrane will change. It is known [9], that the permeability coefficient through the membrane of human spermatozoa for EG is higher, than for 1,2-PD (0.79 and $0.23 \cdot 10^{-2}$ cm/min, correspondingly). The similar dependence can be expected for fowl spermatozoa too, since the permeability of human and fowl sperm membranes for water are very close (fowl sperm – $2.1 \cdot 10^4$ cm/min/atm, human sperm – $2.4 \cdot 10^4$ cm/min/atm [13]). The permeability of 2,3-BD through spermatozoa membrane will be much lower, that, probably, causes its high cytotoxicity in respect to fowl sperm, stipulated by an osmotic factor.

Thus, it was found that diols and amides affect the safety of membranes of heads and acrosome integrity in a different way, that allows to conclude about a differentiated effect of these two classes of substances on different spermatozoa organelles before freezing. It was established, that the character of amide and diol damaging effect on fowl spermatozoa differed in a considerable way. The data obtained give the reasons to suppose the perspective of amide and diol mixture application as cryoprotectants when cryopreserving poultry fowl sperm, that permits not only to reduce their cytotoxicity, but to increase the level of morpho functional integrity of spermatozoa after freeze-thawing.

REFERENCES

1. *Karapetyan Yu. A., Ejchis V. N.* Physical and chemical properties of electrolit non-aqueous solutions.– M.: Khimiya, 1989.– 252 p.
2. *Linnik T. P.* Dependence of a cryoprotective activity of amide series compounds on their physical and chemical properties: Abstr. Thesis Cand. Biol. Sci.– Kharkov, 1986.– 19 p.
3. *Pichugin Yu. I., Novikov A. N.* Dependence of diol cytotoxicity and cryoprotectant activity on their structure and physical and chemical properties // Kriokonservirovanie kletok i tkanej.– Kharkov, 1989.– P. 15–28.
4. *Sakhatsky N. I., Tereschenko A. V., Artemenko A. B.* Express-method of fertilizing ability estimation of fowl frozen-thawed sperm //S.-kh. Biologiya.– 1987.– № 12.– P. 77–80.
5. *Arav A., Pearl M., Zeron Y.* Does lipid explain chilling sensitivity and membrane lipid phase transition of spermatozoa and oocytes? // Cryo-Lett.– 2000.– 21.– P. 179–186.
6. *Fahy G. M.* Cryoprotectant toxicity reduction: specific or nonspecific? // Cryo-Lett.– 1984.– 5, № 5.– P. 287–294.
7. *Fahy G. M., Lilley T. H., Lindsell H. et al.* Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: In search of molecular mechanisms // Cryobiology.– 1990.– 27, № 3.– P. 247–268.
8. *Hammerstedt R. N., Graham J. K.* Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol // Cryobiology.– 1992.– 29.– P. 26–38.
9. *Gilmore J. A., McGann, L. E., Liu J. et al.* Effect of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa // Biol. of Reprod.– 1995.– 53.– P. 985–995.
10. *Maeda T., Terada T., Tsutsumi Y.* Comparative study of the effects of various cryoprotectants in preserving the morfology of frozen and thawed fowl spermatozoa // Brit. Poultry Sc.– 1984.– 25, № 4.– P. 547–553.
11. *Schramm G.-P., Hubner R.* Konservierung von Gefugelsperma // Arch. Tierz.– 1989.– 32, № 1.– S. 51–61.
12. *Tselutin K., Narubina L, Mavrodina T., Tur B.* Cryopreservation of poultry semen // Brit. Poultry Sc.– 1995.– 36.– P. 805–811.
13. *Watson P. F.* Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing // Reprod. Fertil. Dev.– 1995.– 7.– P. 871–891.

Accepted in 27.02.2001

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 612.014.43.646

UDC 612.014.43.646

Гипотермическое хранение клеток и тканей эмбрионов человека

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

Hypothermic Storage of Cells and Tissues from Human Embryos

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

Изучена жизнеспособность суспензий клеток печени и нервных тканей эмбрионов человека 7–12 недель гестации в процессе длительного гипотермического хранения в средах различного состава. Установлена более высокая устойчивость к низким положительным температурам клеток эмбрионального происхождения по сравнению с клетками взрослых особей, а также эффективность сахарозосодержащего раствора (ССР) для их гипотермического хранения при 4 °С.

Вивчена життєздатність суспензії клітин печінки та нервових тканин ембріонів людини 7–12 тижнів гестації у процесі довгострокового гіпотермічного зберігання в середовищах різного складу. Установлена більш висока стійкість до низьких позитивних температур клітин ембріонального походження в порівнянні з клітинами дорослих, а також ефективність сахарозомісткого розчину (СМР) для їх гіпотермічного зберігання при 4 °С.

Viability of the suspensions of liver cells and neuronal tissues from human embryos of 7–12 gestation weeks during the process of long-term storage in the media with various composition has been investigated. A higher stability to low positive temperatures of the cells of embryonic origin in comparison with the cells of adult organism, as well as the efficiency of sucrose-based solution (SBS) for their hypothermic storage under 4 °C were established.

В последние годы в медицинской практике расширилось применение эмбриональных клеток и тканей человека. Для создания необходимого запаса фетального материала наиболее распространенным способом является криоконсервирование и хранение при сверхнизких температурах. Криоконсервирование позволяет сохранить морфологию и функцию клеток неограниченно долгое время, однако оно предполагает использование криопротекторов, которые обладают определенной токсичностью. Помимо этого сам процесс криоконсервирования, а также дальнейшее низкотемпературное хранение является достаточно дорогостоящей процедурой, требующей как специальных материалов и оборудования, так и подготовленного персонала. Альтернативой криоконсервированию является гипотермическое хранение биологических объектов в условиях бытового холодильника при 4 °С. При этом для успешной трансплантации необходимо использовать такие условия гипотермического хранения, которые позволили бы сохранить функциональную активность клеток в течение срока, необходимого для оценки вирусной и бактериальной чистоты.

Кроме того, гипотермическое хранение является обязательным этапом забора биологического материала и предшествует этапам выделения и криоконсервирования. Эти этапы обычно разнесены в пространстве, и транспортировка материала должна проводиться при таких гипотермических условиях, которые обеспечат сохранение жизнеспособ-

Within the recent years the application of human embryonic cells and tissues extended in a medical practice. To create necessary stock of fetal material cryopreservation and storage under ultra-low temperatures is the most widespread method. Cryopreservation allows to keep morphology and the cell function during unlimited time, however it supposes the usage of cryoprotectants, possessing a certain toxicity. Besides, the process of cryopreservation, as well further low-temperature storage is quite an expensive procedure, requiring both the special material and equipment, as well as prepared staff. Hypothermic storage of biological objects in refrigerator under 4 °C is an alternative to cryopreservation. Thereat for a successful transplantation it is necessary to use such conditions of hypothermic storage, allowing to keep the cell functional activity during the term, necessary for viral and bacterial safety estimation.

Besides, hypothermic storage is an obligatory stage between the biological material taking-off and the stages of isolation and cryopreservation. These stages are usually distant, and the material transporting should be carried out at hypothermic storage, providing the cell viability keeping. The Hanks' medium is used as such a transporting medium. At the same time the sucrose-based solution (SBS), keeping the morphology and function of isolated hepatocytes and liver under hypothermia conditions during longer period of time in comparison with saline solutions, has been elaborated at the Institute for Problems of Cryobio-

Матеріал, захищений авторським правом

ности клеток. В качестве такой транспортной среды используется среда Хенкса. В то же время в ИПКиК НАН Украины разработан ССР [2], который сохраняет морфологию и функции изолированных гепатоцитов и печени в условиях гипотермии значительно дольше, чем солевые растворы [7]. Сравнительный анализ также показал, что ССР не уступает по эффективности наиболее широко используемой в мире среде UW [8]. Однако исследований, направленных на изучение целесообразности использования ССР для гипотермического хранения препаратов фетального происхождения, до настоящего времени проведено не было. Цель работы — изучение сохранности клеток и тканей печени и мозга эмбрионов человека 7–12 недель гестации в ССР и среде Хенкса.

Нервную ткань и печень выделяли из эмбрионов человека 7–12 недель гестации, полученных в результате абортов при согласии донора. Ткани помещали в стерильные флаконы, содержащие исследуемые среды, и хранили в условиях бытового холодильника (4 °С) до и после транспортировки, которую осуществляли на льду. Для приготовления суспензии клеток ткани переносили из флаконов в стерильные чашки Петри, промывали физиологическим раствором с антибиотиком и подвергали дезинтеграции путем вибрации [4]. После очистки и фильтрации суспензии клеток объемом 1 мл хранили в пластиковых пробирках в бытовом холодильнике в течение 9 сут.

Жизнеспособность оценивали по исключению клетками витального красителя трипанового синего [5]. Активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) определяли по методу [3], а общую активность фермента — после разрушения клеток детергентом (0,1%-й тритон Х-100) с последующей 30-минутной инкубацией при 37 °С. Количество клеток в пробах подсчитывали в камере Горяева [1].

К настоящему времени нами накоплен значительный экспериментальный материал по выбору оптимальной среды для холодового хранения изолированных окончательно дифференцированных гепатоцитов и печени. Установлено, что наиболее эффективной для гипотермического хранения клеток является среда, содержащая непроникающую в клетки сахарозу [7]. Использование изотонического раствора сахарозы с микродобавками солей способствует поддержанию барьерной функции мембран и водного баланса в клетке, что сохраняет ее жизнеспособность на высоком уровне. В предыдущих экспериментах [6] показано, что гепатоциты, хранившиеся в разработанной нами среде в условиях холодовой ишемии, могут переживать без существенных структурно-функциональных нарушений до 3-х суток, сохраняя при этом жизнеспособность более 70%.

Существует мнение о достаточно высокой устойчивости эмбриональных клеток к гипотермическому хранению, обусловленной преобладанием

logy and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine [7]. Comparative analysis demonstrated that SBS is not inferior to UW one, the most widely applied solution in the world [8]. However, the investigations, directed to the study of the expediency of SBS usage for hypothermic storage of fetal preparations have not been yet carried-out. The aim of the given work was to study the integrity of liver and brain cells and tissues of 7–12 gestation weeks' human embryos in the SBS and Hanks' medium.

Neuronal tissue and liver were isolated from 7–12 gestation weeks' human embryos, obtained in the result of abortions with the donor's consent. Tissues were put into sterile bottles with the media under study and stored in refrigerator (4 °C) before and after transporting in ice. To prepare the cell suspension, tissues were transferred from bottles into sterile Petri dishes, washed-out by means of physiological solution with antibiotic and subjected to disintegration by vibration [4]. After purification and filtration 1 ml cell suspensions were stored in plastic vials in refrigerator during 9 days.

Viability was estimated on the exclusion of trypane blue vital dye [5]. Lactatdehydrogenase activity (LDG) was evaluated according to the method [3] after the cell damage with detergent (0.1% triton X-100) with the following 30-min incubation at 37 °C. Cell number in the samples was calculated in Goryaev's chamber [1].

Till now we have accumulated a significant experimental material on the selection of optimal medium for a cold storage of isolated, finally differentiated hepatocytes and liver. It was established, that the most efficient for cell hypothermic storage is the medium, containing non-penetrating into a cell sucrose [7]. Usage of sucrose isotonic solution with saline microadditives promotes to maintenance of the membrane barrier function and aqueous balance in a cell, kept its viability at a high level. Previous experiments [6] showed, that hepatocytes, stored in the elaborated by us medium under cold ischemia conditions, can live up to 3 days without considerable structural and functional damages, kept thereat viability more than 70%.

There is the notion about quite a high stability of embryonic cells to hypothermic storage, stipulated by the prevailing of glycolytic way for energy generation. However a comparative study of the susceptibility to hypothermic storage of embryonic and differentiated cells has not been conducted. It was established, that the viability of embryonic liver cells (ELC) made $89 \pm 4\%$ and did not change when transferring the suspension from an isolation medium into SBS. At the same time cell transfer into Hanks' solution resulted in a decrease of cell viability by 10–15%. This effect may be connected to some factors, elucidation of which requires an additional investigation.

The investigation results demonstrated (Fig. 1), that 6-days' hypothermic storage of ELC in SBS prac-

Матеріал, захищений авторським правом

гликолитического пути генерации энергии. Однако сравнительного изучения чувствительности к гипотермическому хранению эмбриональных и дифференцированных клеток проведено не было. Установлено (рис. 1), что жизнеспособность клеток эмбриональной печени (КЭП) составляла 89 ± 4% и не изменялась при переносе суспензии из среды выделения в ССР. В то же время перенос клеток в раствор Хенкса приводил к снижению жизнеспособности клеток на 10–15%. Этот эффект может быть связан с несколькими факторами, для выяснения которых требуется провести дополнительные исследования.

Результаты исследований показали (рис. 1), что 6-суточное гипотермическое хранение КЭП в ССР практически не влияло на их жизнеспособность по исключению трипанового синего. Через 9 сут количество жизнеспособных клеток снижалось на 16% по сравнению с контролем и составляло 72 ± 3%. Жизнеспособность КЭП, хранившихся в растворе Хенкса, была значительно ниже. Уже на 3-и сутки она снижалась более чем на 10%, а через 9 сут хранения почти 60% клеток погибало.

Свежевыделенная суспензия эмбриональных нервных клеток (ЭНК) характеризовалась более низкой жизнеспособностью по сравнению с КЭП (рис. 2) и снижалась она также при переносе в среду Хенкса, но не в ССР. На протяжении всего исследуемого срока хранения наблюдалось постепенное уменьшение количества жизнеспособных клеток, и на 9-е сутки в ССР она составляла 43 ± 3%, а в растворе Хенкса – 21 ± 2% (рис. 2).

Для дополнительной характеристики сохранности изолированных эмбриональных клеток, подвергнутых длительному гипотермическому хранению при 4 °С, был изучен уровень активности ЛДГ – цитоплазматического фермента, широко применяемого для тестирования повреждения клеток.

Результаты исследований, представленные на рис. 3, свидетельствуют о постепенном увеличении в среде уровня ЛДГ на протяжении всего срока гипотермического хранения КЭП в растворе Хенк-

tically did not affect their viability on trypane blue exclusion. In 9 days the number of viable cells decreased by 16% in comparison with the control and made 72 ± 3%. Viability of ELC stored in Hanks' solution, was significantly lower. To the third day it decreased more than by 10%, and in 9 days of storage about 60% of cells died. Freshly-isolated suspension of embryonic neuronal cells (ENC) characterized by lower viability in comparison with ELC (Fig. 2) and also decreased when transferring into Hanks' medium, but not into SBS. Within the whole observation term a gradual reduction of the number of viable cells was observed, and to the 9th day in SBS it made 43 ± 3%, in Hanks' solution was 21 ± 2% (Fig. 2).

For an additional integrity of isolated embryonic cells, subjected to long-term hypothermic storage at 4 °C, the level of LDG activity of cytoplasmatic enzyme, widely applied for the testing of damaged cells, has been investigated.

Investigation results, presented in Fig. 3, testify to a gradual increase of LDG level in a medium during the whole term of hypothermic storage of embryonic liver cells in Hanks' solution. In 9 days the enzyme activity increased by 17 ± 3% in comparison with the control, when using SBS as a preserving medium this index increased just by 12 ± 1%.

LDG level in ENC also decreased during hypothermic storage, in 9 days an increase of LDG activity in a medium made about 20% not depending on the composition of the storage medium (Fig. 4).

Thus, the investigation results of viability on trypane blue exclusion and LDG elimination into extracellular medium allowed to conclude a higher stability of embryonic cells to hypothermic storage in comparison with finally differentiated ones. A comparative analysis of two methods for the stability determination gives the possibility to suppose, that estimation by means of cell staining with vital dyes is more simple, rapid and informative in comparison with the determination of LDG activity, because thereat a significant differences in the samples under study are revealed during the process of hypothermic storage in different media.

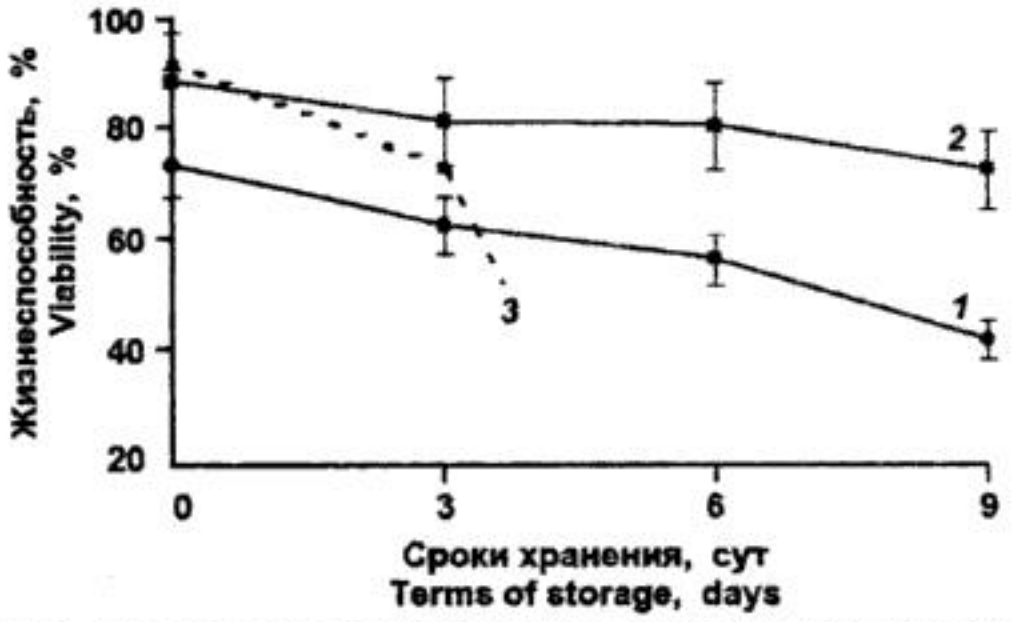


Рис. 1. Влияние гипотермического хранения на жизнеспособность КЭП человека (*1* – среда Хенкса; *2* – ССР) и гепатоцитов взрослых крыс (*3*).

Fig. 1. The effect of hypothermic storage on the viability of human ELC (*1* – Hanks' medium; *2* – SBS) and hepatocytes of adult rats (*3*).

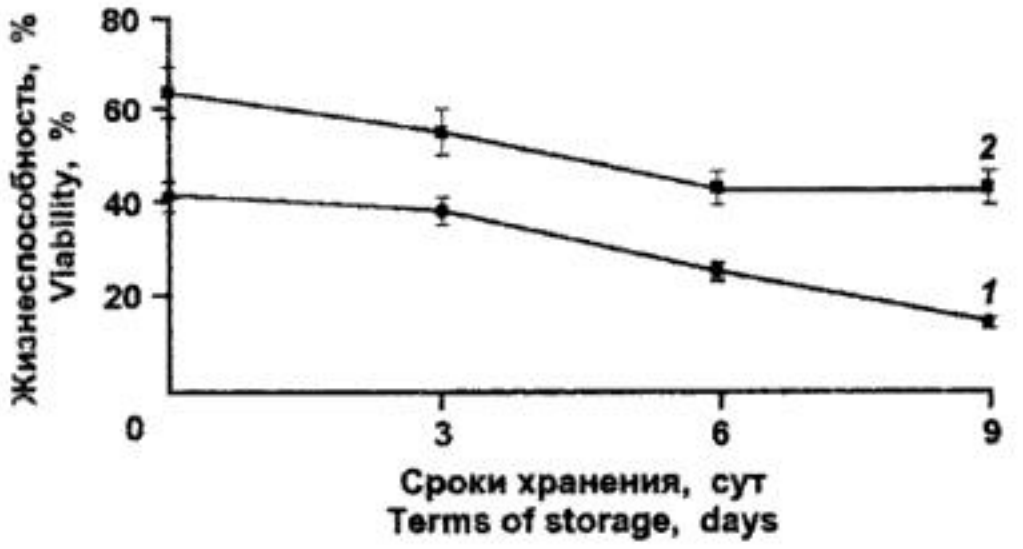


Рис. 2. Влияние гипотермического хранения на жизнеспособность ЭНК человека: *1* – среда Хенкса; *2* – ССР.

Fig. 2. The effect of hypothermic storage on the viability of human ENC: *1* – Hanks' medium; *2* – SBS.

Матеріал, захищений авторським правом

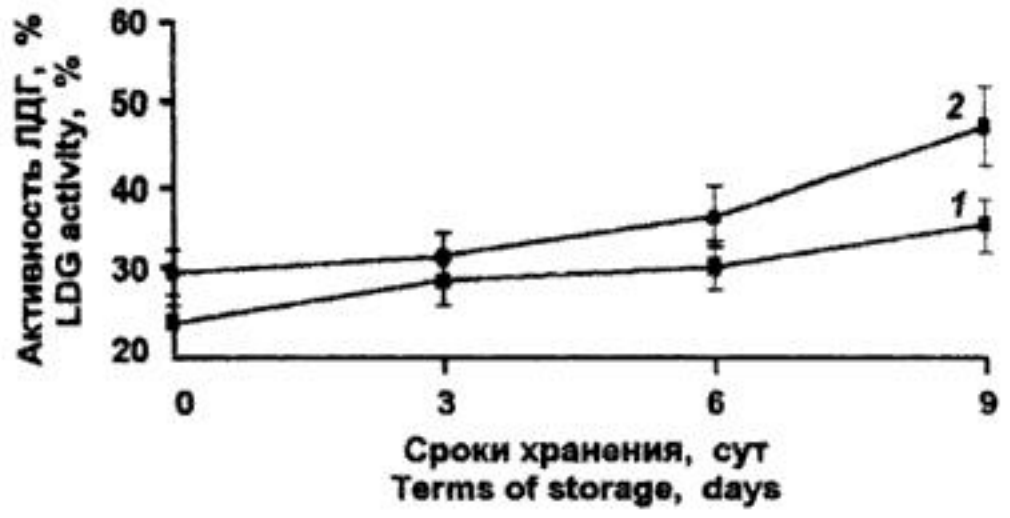


Рис. 3. Активность ЛДГ в процессе гипотермического хранения КЭП человека: *1* – среда Хенкса; *2* – ССР.

Fig. 3. LDG activity in human ELC during the process of hypothermic storage: *1* – Hanks' medium; *2* – SBS.

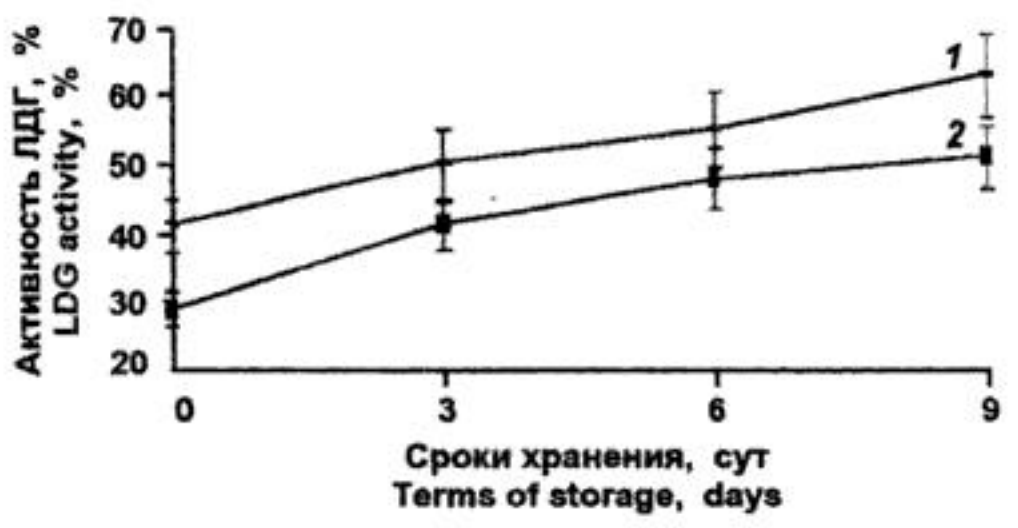


Рис. 4. Активность ЛДГ в процессе гипотермического хранения ЭНК человека: *1* – среда Хенкса; *2* – ССР.

Fig. 4. LDG activity in human ENC during the process of hypothermic storage: *1* – Hanks' medium; *2* – SBS.

са. Через 9 сут активность фермента увеличилась на 17 ± 3% по сравнению с контролем, а при использовании в качестве консервирующей среды ССР лишь на 12 ± 1%.

Уровень ЛДГ в ЭНК также снижался в ходе гипотермического хранения, и через 9 сут увеличение активности ЛДГ в среде составляло около 20% независимо от состава среды хранения (рис. 4).

Таким образом, результаты изучения жизнеспособности по исключению трипанового синего и элиминации во внеклеточную среду ЛДГ позволяют сделать вывод о более высокой устойчивости эмбриональных клеток к гипотермическому хранению по сравнению с окончательно дифференцированными. Сравнительный анализ двух методов определения сохранности дает возможность предположить, что оценка с помощью окрашивания клеток витальным красителем является более простой, быстрой и информативной в сравнении с определением активности ЛДГ, поскольку при этом выявляются большие различия в исследуемых параметрах в процессе гипотермического хранения в различных средах.

Представленные данные (рис. 1) свидетельствуют о том, что устойчивость эмбриональных клеток к действию низких положительных температур гораздо выше, чем у изолированных клеток взрослого организма. Также заслуживают внимания данные о том, что ЭНК менее устойчивы к гипотермическому хранению по сравнению с клетками печени.

Проведенные исследования по гипотермическому хранению эмбриональных клеток мозга и печени эмбрионов человека в средах различного состава позволяют отдать предпочтение ССР, который лучше, чем среда Хенкса, сохраняет морфологическую целостность обоих типов клеток. Применение ССР дает возможность без существенной потери жизнеспособности сохранить КЭП в течение 6 сут, а ЭНК – 3-х суток. Такой срок является достаточным для проведения вирусного контроля, что позволяет рекомендовать ССР для клинического применения.

Далее была проведена серия экспериментов, в которой гипотермическому хранению подвергались не изолированные клетки, а ткани печени и

The presented data (Fig. 1) testified, that embryonic cell stability to the effect of low positive temperatures was considerably higher, than in the isolated cells of adult organism. The data, that ENC are less stable to hypothermic storage in comparison with liver cells, are also important.

The investigations conducted on hypothermic storage of human embryonic brain and liver cells in the media with different composition allowed to give preference to SBS, which keeps morphological integrity of both types of cells better, than Hanks' solution. SBS application gives the possibility to preserve ELC during 6 days, and ENC – within 3 days without a significant viability loss. Such a term is sufficient for the viral control conducting, that allows to recommend SBS for clinical application.

The series of experiments, in which liver and brain tissues of human embryos, but not isolated cells were subjected to hypothermic storage. Duration of hypothermic storage in this case made 1 day, then the tissues were disintegrated by single cells and subjected to cryopreservation. The results, presented in Fig. 5 demonstrated, that liver hypothermic storage both in SBS and Hanks' solution resulted in a slight viability decrease in comparison with ELC, obtained from the liver without storage (Fig. 1). Thereat viability of the cells, isolated from liver, stored in SBS, has a higher

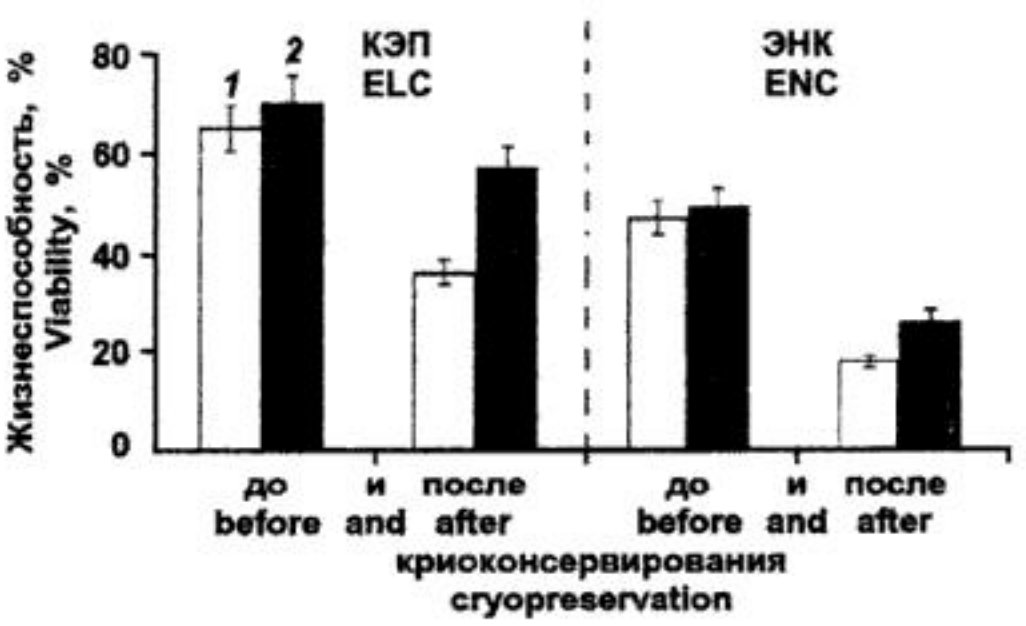


Рис. 5. Жизнеспособность до и после криоконсервирования КЭП и ЭНК, полученных из тканей, подвергнутых суточному гипотермическому хранению в среде Хенкса (*1*) и ССР (*2*).

Fig. 5. Viability before and after cryopreservation of ELC and ENC, obtained from tissues, subjected to 1-day hypothermic storage in Hanks' medium (*1*) and SBS (*2*).

Матеріал, захищений авторським правом

мозга эмбрионов человека. Продолжительность гипотермического хранения в этом случае составляла 1 сутки, после чего ткани были дезагрегированы на одиночные клетки, которые подвергались криоконсервированию. Результаты, приведенные на рис. 5, показывают, что гипотермическое хранение печени как в ССР, так и в среде Хенкса приводит к некоторому снижению жизнеспособности по сравнению с КЭП, полученными из печени, не подвергавшейся хранению (рис. 1). При этом жизнеспособность клеток, изолированных из печени и хранившихся в ССР, была лишь незначительно выше по сравнению с раствором Хенкса. Вместе с тем после криоконсервирования, клетки, полученные из печени, которая хранилась в ССР, имели значительно более высокую жизнеспособность, чем хранившиеся в среде Хенкса. Аналогичные результаты были получены и при исследовании ЭНК.

Приведенные данные показывают, что в процессе гипотермического хранения клетки в составе как эмбриональных, так и окончательно дифференцированных тканей повреждаются в большей степени, чем клетки в изолированном состоянии.

Таким образом, исследования, проведенные как на тканях, так и на изолированных клетках печени и мозга эмбрионов человека, дают основания рекомендовать ССР для гипотермического хранения биологических объектов фетального происхождения.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Неменова Ю. М.* Методы лабораторных клинических исследований.– М.: Медицина, 1972.– 424 с.
2. *Пат. № 16946* України, МПК[5] С 12 № 5/00. Розчин для гіпотермічного зберігання ізольованих гепатоцитів / Л. П. Кравченко, А. М. Андрієнко, О. А. Семенченко, А. М. Білоус (Україна).– № 4684421/SU; Заявлено 20.02.89; Публ. 29.08.97, Бюл. № 4.
3. *Kachmar J. R., Moss D. W.* Enzymes // Fundam. Clin. Chem.– Philadelfia, 1976.– P. 652–660.
4. *Petrenko A. Yu., Sukach A. N.* Isolation of intact mitochondria and hepatocytes using vibration // Anal. Biochemistry.– 1991.– 194, № 2.– P. 326–329.
5. *Seglen P. O.* Preparation of isolated rat liver cells // Meth. Cell Biol.– 1976.– № 13.– P. 29–83.
6. *Shanina I., Kravchenko L.* Metabolic properties of isolated rat hepatocytes after long-term storage at 4 °C // Пробл. криобиологии.–1997.– № 4.– С. 66–68.
7. *Shanina I., Kravchenko L., Sampson V.* Efficiency of the sucrose-containing solution on the cold preservation of whole liver // Cryo-Lett.– 1998.– 19, № 4.– P. 231–236.
8. *Southard J. H., Gulic T., Ametani M.* Important component of the UW-solution // Transplantation.– 1990.– 49, № 2.– P. 251–257.

Поступила 29.05.2001

viability, than ones, stored in Hanks' medium. The same results were also obtained when investigating ENC.

Presented data demonstrated, that during the process of hypothermic storage the cells in the composition of both embryonic and finally differentiated tissues are damaged in a greater extent, than cells in the system of cell suspensions.

Thus, the investigations presented both on tissues and isolated cells of human embryonic liver and brain gave the reason to recommend SBS for hypothermic storage of biological objects of fetal origin.

REFERENCES

1. *Nemeneva Yu. M.* The methods for laboratory clinical investigations.– M.: Meditsina, 1972.– 424 p.
2. *Patent* of the Ukraine № 16946. Solution for hypothermic storage of isolated hepatocytes / L. P. Kravchenko, A. M. Andrienko, O. A. Semenchenko, A. M. Belous (Ukraine).– № 4684421/SU; Accepted in 20.02.89; Published 29.08.97, Bul. № 4.
3. *Kachmar J. R., Moss D. W.* Enzymes // Fundam. Clin. Chem.– Philadelfia, 1976.– P. 652–660.
4. *Petrenko A. Yu., Sukach A. N.* Isolation of intact mitochondria and hepatocytes using vibration // Anal. Biochemistry.– 1991.– 194, № 2.– P. 326–329.
5. *Seglen P. O.* Preparation of isolated rat liver cells // Meth. Cell Biol.– 1976.– № 13.– P. 29–83.
6. *Shanina I., Kravchenko L.* Metabolic properties of isolated rat hepatocytes after long-term storage at 4 °C // Problemy kriobiologii.–1997.– № 4.– C. 66–68.
7. *Shanina I., Kravchenko L., Sampson V.* Efficiency of the sucrose-containing solution on the cold preservation of whole liver // Cryo-Lett.– 1998.– 19, № 4.– P. 231–236.
8. *Southard J. H., Gulic T., Ametani M.* Important component of the UW-solution // Transplantation.– 1990.– 49, № 2.– P. 251–257.

Accepted in 29.05.2001

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 616.216-002-08: 615.832.97

Сверхнизкие температуры в комплексном лечении больных с воспалительными заболеваниями околоносовых пазух

А. С. ЖУРАВЛЕВ

Харьковский государственный медицинский университет

UDC 616.216-002-08: 615.832.97

Ultra-low Temperatures in Combined Treatment of Patients with Inflammatory Diseases of Accessory Nasal Sinuses

A. S. ZHURAVLEV

Kharkov State Medical University

Изучены влияние сверхнизких температур в изолированном варианте, а также в соединении с ультрафиолетовым облучением крови (УФОК) на воспалительный процесс в синусах и соответствующие реакции больного организма. Показано, что локальное внутрипазушное криоорошение в соединении с фотомодификацией крови вызывает наиболее выраженный терапевтический эффект и на более длительное время, чем отдельные физические факторы, что подтверждено положительной динамикой микробиологических, цитологических и иммунологических показателей.

Вивчено вплив наднизьких температур в ізольованому варіанті, а також у сполученні з ультрафіолетовим опромінюванням крові (УФОК) на запальний процес у синусах і відповідні реакції хворого організму. Показано, що локальне внутрішньопазушне кріорозпилювання у сполученні з фотомодифікацією крові викликає найбільш виражений терапевтичний ефект і на більш тривалий час, ніж окремі фізичні фактори, що підтверджено позитивною динамікою мікробіологічних, цитологічних та імунологічних показників.

Ultra-low temperature effect in the isolated version as well as when combining with ultraviolet irradiation of blood (UVIB) on inflammatory process in sinuses and corresponding responses of ill organism were studied. It was shown that a local intrasinusal cryoirrigation combined with blood photomodification caused the most manifested therapeutic effect and for a longer time, than some physical factors, that was confirmed by positive dynamics of microbiological, cytological and immunological indices.

Внедрение сверхнизких температур в здравоохранение позволило повысить эффективность лечения многих ЛОР заболеваний. В повседневной практике оториноларингологов главным образом используется их деструктивное действие при вазомоторном рините, хроническом тонзиллите, новообразованиях верхних дыхательных путей [1, 3, 7]. Применяется этот фактор также как противорецидивное лечение хронических полипозных риносинуитов [2]. Однако при экссудативных синуитах локальные криовоздействия только начинают внедряться. Имеются лишь единичные сообщения о благотворном влиянии холода на воспаленную слизистую оболочку при хроническом гнойном гайморите [4, 8]. Но его использование носит лишь эмпирический характер в связи с отсутствием обоснования метода. Кроме того, не изучены механизмы действия парожидкостной струи жидкого азота на воспаленную слизистую оболочку синуса. В связи с этим нами предложены новые методы холодового лечения хронического гнойного гайморита как в изолированном, так и комбинированном вариантах. Для их проведения разработана соответствующая аппаратура.

Использовали криораспыление жидкого азота на слизистую оболочку пораженной пазухи и изучали его влияние на патологический процесс (1-я

Ultra-low temperature introduction in health care allowed augmenting the treatment efficiency of many otorhinolaryngological diseases. In a daily practice of otorhinolaryngologists one mainly uses their destructive effect at vasomotor rhinitis, chronic tonsillitis, tumors of superior respiratory tracts [1, 3, 7,]. This factor is also applied as a antirelapsing treatment of chronic polypous rhinosinuitis [2]. However at exudative sinuitis local cyoeffects only begin to be introduced. There are single reports about favorable effect of cold on inflammatory mucous membrane at chronic purulent maxillary sinusitis [4, 8]. However its usage has only empirical character relating to the absence of the method substantiaiton. Besides, the effect mechanisms of steam-fluid jet of liquid nitrogen on sinus's inflamed mucous membrane have not been studied. In this connection we proposed new methods of cold treatment of chronic purulent maxillary sinusitis both in isolated and combined versions. For their conducting the corresponding devices were developed.

We used the cryospraying of liquid nitrogen on mucous membrane of affected sinuses and studied its effect on pathological process (1st group, 40 patients). For the first time for cryospraying performance one proposed the set of tubes of metal air conduits of 2 mm diameter from blood transfusion systems (Fig. 1). Tubes were shortened to 12 cm (optimal length, ne-

Матеріал, захищений авторським правом

группа — 40 больных). Впервые для проведения криораспыления предложен набор трубок из металлических воздуховодов диаметром 2 мм от систем для переливания крови (рис. 1). Трубки были укорочены до 12 см (оптимальная длина, необходимая для манипулирования на пораженной пазухе). Трубку 1 на конце затачивали со скосом кнаружи. На дистальном конце трубки 2 наносили точечные отверстия для прохождения парожидкостной струи азота, которая при этом образовывала сферу. Для лечения на трубку 1 помещали фторопластовый дренаж, который является хорошим теплоизолятором, металлическая заточенная часть оставалась открытой. После пункции пазухи трубкой 1 в типичном месте забирали материал с воспаленной слизистой оболочки для цитологического исследования. Через фиксированный дренаж на весь период лечения пазуху промывали стерильным физиологическим раствором, неоднократным продуванием высушивали. Затем в дренаж вводили трубку 2, через которую криоаппаратом КАС-01 орошали слизистую оболочку воспаленного синуса жидким азотом с экспозицией 1–2 с 2–3 раза с интервалом 5–7 с (рис. 2). Подобная процедура осуществлялась 1 раз в день в течение 5–6 дней. Кроме этого, больные получали лишь сосудосуживающие капли в нос, десенсибилизирующую терапию (димедрол, тавегил, супрастин) в адекватных дозах.

Рис. 1. Набор трубок (1, 2) для криолечения верхнечелюстной пазухи при ее воспалении.

Fig. 1. Set of the tubes (1, 2) for the cryotreatment of maxillary sinus during its inflammation.

Вторую группу больных (40 чел) подвергали криоорошению воспаленной слизистой оболочки синуса по описанной выше методике с предварительным УФОК. Методика УФОК, разработанная нами, заключается в следующем: 20 мл крови из локтевой вены облучается ультрафиолетовыми лучами с длиной волны 254 нм в течение 2–3 мин в аппарате собственной конструкции [6]. Затем она возвращается в кровяное русло путем перевода аппарата в вертикальное положение за 2–3 мин. Процедура криораспыления начинается через 15–20 мин. Продолжительность такого комплексного курса лечения зависела от динамики патологического процесса и в среднем составляла 4–6 сеансов.

У больных изучались динамика цитологической картины из очага воспаления, микробный пейзаж в нем, а также изменения иммунологического статуса до и в различные сроки после лечения.

Больные из 1-й клинической группы сразу после 1–2 сеансов внутрисинусового криораспыле-

cessary for manipulation on affected sinus). Tube 1 was sharpened at the end with a bevel to outside. On a distal end of the tube 2 we made the point holes for passing nitrogen steam-fluid jet, which formed a sphere thereat. For the treatment a fluoroplastic drainage, being good heat insulator, was put on the tube 1 by such a way that the metal sharpened part remained opened. After the puncture of sinus using the tube 1 one procured in a typical place the material from an inflamed mucous membrane for cytological study. Through a fixed drainage for all the treatment period the sinuses were washed by a sterile physiological solution and multiple insufflation. Then the tube 2 was introduced into a drainage, through which by means of KAS-1 cryoapparatus the mucous membrane of inflamed sinus was irrigated by liquid nitrogen with the 1–2 s exposure 2–3 times with the interval of 5–7 s (Fig. 2). The similar procedure was realized once in a day within 5–6 days. Besides, the patients received only vasoconstrictive nasal drops, desensibilized therapy (dimedrol, tavegil, suprastin) in adequate doses.

Рис. 2. Парожидкостное криовоздействие на слизистую оболочку верхнечелюстной пазухи при ее хроническом воспалении.

Fig. 2. Paraliquid cryoeffect on the mucous membrane of maxillary sinus during its chronic inflammation.

The second group of patients (40 persons) was subjected to a cryoirrigation of an inflamed sinus mucous membrane according to the described above method with the UVIB. The UVIB method, developed by us, consists in the follows: 20 ml of blood from an ulnar vein was irradiated by the ultraviolet rays with 254 nm wave length within 2–3 min in the apparatus of own construction [6]. Then it cames back into the blood channel by means of the apparatus position change in a vertical one for 2–3 min. The procedure of cryospraying begins in 15–20 min. The duration of such combined treatment course depended on the dynamics of pathological process and made 4–6 performances an average.

The dynamics of cytological picture from the inflammation focus, microbial view in it, as well as the changes in immunological status before and in different terms after treatment.

The patients from the 1st clinical group just after 1–2 performances of intrasinus cryospaying noted certain aggravation of nasal respiration. It was accompanied by keeping edematic state and hyperemia of nasal cavity mucous membrane, presence of pathological discharge, which character did not practically change. However, beginning from the 3rd–4th day there was the improvement in patients' respiratory nasal function, a visible tendency for normalizing other nasal

Матеріал, захищений авторським правом

ния отмечали некоторое ухудшение носового дыхания. Это сопровождалось сохранением отечности и гиперемии слизистой оболочки полости носа, наличием патологического отделяемого, характер которого практически не менялся. Однако, начиная с 3–4 дня, у пациентов улучшалась дыхательная функция носа, появлялась заметная тенденция к нормализации других его функций. При объективном осмотре через 3–4 сеанса заметно регрессировали отек и гиперемия слизистой оболочки полости носа, уменьшалось количество патологического секрета в общем и среднем носовых ходах. Кроме того, менялся и характер экссудата, который сначала был гнойным, а затем слизисто-гнойным, слизистым. К 4–5 сеансу у большинства больных (82%) нормализовалось общее самочувствие: исчезали слабость, разбитость, улучшались сон и аппетит. Также восстанавливались дыхательная, обонятельная, резонаторная функции носа, исчезало отделяемое в носовых ходах. Осложнений в ходе лечения и после него не наблюдалось.

Пациенты из 2-й клинической группы применяемый комбинированный метод лечения также переносили хорошо. Нивелирование субъективных и объективных симптомов заболевания у большинства лиц (58%) наступило после 2–3 сеансов и проявилось в уменьшении головных болей, частичном восстановлении носового дыхания. При передней риноскопии выявлено уменьшение набухания и гиперемии слизистой оболочки полости носа. Гнойный экссудат становился слизистым, количество его заметно уменьшалось. К 4–5 сеансу у 35 из 40 обследованных наступило клиническое выздоровление.

Проведенные лабораторные исследования показали, что до начала лечения в отделяемом из околоносовых пазух у больных преобладали стафилококки (43%) и в основном золотистый. У 24% обследованных высеяна анаэробная микрофлора (Г+кокки, бактероиды, фузобактероиды). Микробные ассоциации обнаружены у 12% пациентов, а стрептококки (гемолитический и негемолитический), кишечная палочка и протей – в 7% случаев каждые. Установлено, что у большинства преобладала патогенная микрофлора (54%), вызывающая неблагоприятное течение патологического процесса.

Микробиологические исследования, проведенные сразу после окончания курса низкотемпературного лечения, показали, что доля высеваемых стрептококков увеличилась в 2–3 раза при одновременном снижении стафилококков в 1,4 раза; существенно сократилось количество патогенных микроорганизмов и увеличилась доля сапрофитов. Однако анаэробные микроорганизмы, протей, кишечная палочка, а также ассоциированные микробы продолжали высеваться с прежней частотой. Через 2 мес после окончания холодового лечения вновь выявлено увеличение процента высеваемости стафилококков (43%), из них золотистого 31%. Его соотношение с полученными результатами до

functions. At an objective observation in 3–4 performances there was a considerable regression of edema and hyperemia of nasal cavity mucous membrane, a decrease in a quantity of pathological discharge in a general and middle nasal passages. Besides, there was the change in the exudate character, which firstly was purulent, then mucopurulent, mucous one. By the 4–5 performance in the majority of patients (82%) there was the normalization of general state such as the absence of weakness, fatigue, sleep and appetite improvement. It was also observed the recovery of respiratory, olfactory, resonator nasal functions, the absence of discharge in nasal passages. There were no complications during the treatment course and after it.

The patients of the 2nd clinical group endured well the applied combined treating method. The leveling of subjective and objective disease symptoms in the majority of patients (58%) occurred after 2–3 performances and was manifested in a reduction in headaches, partial recovery of nasal respiration. At an anterior rhinoscopy we revealed a reduction in swelling and hyperemia of nasal cavity mucous membrane. Purulent exudate became mucous, its amount significantly decreased. To the 4–5th sessions in 35 patients of 40 being under investigation a clinical recovery occurred.

Laboratory investigations, conducted by us, showed, that before the treatment starting the staphylococci (43%), mainly, Staphylococcus aureus prevailed in suppurative discharge from accessory nasal sinuses in patients. In 24% of investigated anaerobic microflora (G+ccocci, bacteroids, fusobacteroids) was inoculated. Microbial associations were revealed in 12% of patients, and streptococci (hemolytic and non-hemolytic), *Escherichia coli* and *Proteus* were found in 7% of cases. It was established, that in the majority of cases pathogenic microflora (54%), causing an unfavorable course of pathological process, prevailed.

Microbiological investigations, carried-out just after the finishing of the course of low-temperature treatment, demonstrated, that the part of inoculated streptococci increased by 2–3 times at simultaneous reduction of staphylococci by 1.4 times; the number of pathogenic microorganisms and saprophytes quantity increased. However, anaerobic microorganisms, *Proteus*, *Escherichia coli*, as well as associated microbes were inoculated with the same rate. In 2 months after the cold treatment finishing an increase in the percentage of staphylococci inoculation (43%) was revealed, among them Staphylococcus aureus made 31%. Its ratio with the obtained results before the treatment and just after it manifested by the following way: 4:3:5. Besides, non-hemolytic streptococcus completely disappeared, and the percentage of the hemolytic strain inoculation increased twice. In the whole the ratio of pathogenic and saprophyte microflora at this stage of investigation can be manifested by 7:1 ratio.

Матеріал, захищений авторським правом

лечения и сразу после него выражалось как 4:3:5. Кроме того, негемолитический стрептококк полностью исчез, а процент высеваемости гемолитического штамма увеличился в 2 раза. В целом соотношение патогенной микрофлоры и сапрофитной на этом этапе обследования можно выразить соотношением 7:1.

После проведения комплексного лечения (внутрисинусовое криоорошение + УФОК) замечено уменьшение высеваемости стафилококка (в частности золотистого) и стрептококка (38% против 43 и 5% против 7 соответственно). Однако обнаружено некоторое увеличение высеваемости Г– и Г+ анаэробных микроорганизмов. Выделение кишечной палочки и протея осталось на прежнем уровне. Исследования, проведенные через 2 мес после курса лечения, показали, что доля золотистого стафилококка еще более уменьшалась, общее количество больных, имеющих в патологическом очаге стафилококки, составило 35%. Число больных со стрептококковой микрофлорой на воспаленной слизистой оболочке синуса осталось прежним, анаэробных микроорганизмов в посевах значительно уменьшилось. В целом обследование больных через 2 мес после лечения показало преобладание в очаге воспаления непатогенной микрофлоры над патогенной, что выражалось соотношением 3:2.

Проведены цитологические исследования материала, взятого со слизистой оболочки воспаленной пазухи. Установлено, что до начала лечения по сравнению с нормой [5] имело место преобладание сегментоядерных нейтрофилов, увеличенное количество дегенеративного эпителия при малом проценте клеток цилиндрического эпителия и лимфоцитов. К концу курса лечения внутрисинусовым криораспылением выявлено достоверное снижение числа сегментоядерных нейтрофилов, однако к нормальному значению этот показатель так и не возвратился. Кроме того, отмечен значительный рост содержания нормальных эпителиоцитов при одновременном уменьшении доли дегенеративных эпителиальных клеток. Также в цитограммах обнаружена нормализация процента эозинофилов, а содержание лимфоцитов возвратилось в пределы физиологических колебаний. Через 2 мес после завершения курса лечения изученные показатели еще больше изменились. Все они достоверно отличались от значений, полученных при исследовании до начала терапии. Кроме того, отмечается, что после лечения практически все показатели за исключением содержания сегментоядерных нейтрофилов и моноцитов находились в пределах физиологических колебаний. После проведения локального внутрисинусового криоорошения и квантовой гемотерапии у больных хроническими гнойными гайморитами установлено, что сразу после окончания лечения произошло достоверное снижение сегментоядерных нейтрофилов, неизмененных эпителиоцитов, а также эозинофилов и мо-

After conducting a complex treatment (intrasinusal cryoirrigation in the combination with UVIB) a decrease in staphylococci and streptococci inoculation (in particular, *Staphylococcus aureus*) (38% versus 43% and 5% versus 7%, correspondingly). However, a slight increase in G+ and G– inoculation from anaerobic microorganisms was revealed. Release of *Staphylococcus aureus* and *Proteus* remained at the previous level. Investigations conducted in 2 months after the treatment course, demonstrated, that the number of *Staphylococcus aureus* decreased much more, and a total number of the patients, which have staphylococci in pathological focus, made 35%. The number of patients with streptococcus microflora on the inflamed mucous membrane of sinus remained as previous one, the quantity of anaerobic microorganisms in inoculations significantly decreased. In the whole, investigation of the patients in 2 months after treatment showed the prevailing of non-pathogenic flora in comparison with pathogenic one, that manifested in the ratio of 3:2.

Cytological investigations of the material, taken from the mucous membrane of an inflamed sinus have been carried-out. It was established, that to the treatment start in comparison with the norm [5] the prevailing of segment-nuclear neutrophiles, an increased number of degenerative epithelium at low percentage of the cells from cylindrical epithelium and lymphocytes occurred. To the treatment course finishing with intrasinusal cryoatomizer, a statistically significant decrease of the number of segment-nuclear neutrophiles was revealed, however to the normal value this index did not return. Besides, a significant growth of the content of normal epitheliocytes at simultaneous decrease of the part of degenerative epithelial cells has been noted. In cytograms normalization of eosinophiles percentage was also revealed, and lymphocytes content returned to the limits of physiological differences. In 2 months after finishing of the treatment course, studying parameters much more changed. They all significantly differed on the values, obtained during investigation before the therapy starting. Besides, it was noted, that after the treatment practically all indices excluding the content of segment-nuclear neutrophiles and monocytes were within the limits of physiological differences. After a local intrasinusal cryoirrigation and quantum chemotherapy in the patients with chronic maxillary sinusitis it was established, that just after the finishing of treatment a statistically significant decrease of segment-nuclear neutrophiles, not changed epitheliocytes, as well as eosinophiles and monocytes at significant simultaneous increase of cylindrical epithelial cells and lymphocytes occurred. However, the normal level just after the treatment finishing was achieved just by the number of eosinophiles and changed epitheliocytes. In 2 months after the treatment finishing all studied tests occurred to be within the limits of physiological differences, and the number of revealed monocytes and

Матеріал, захищений авторським правом

ноцитов при одновременном значительном нарастании цилиндрических эпителиальных клеток и лимфоцитов. Однако нормального уровня сразу после окончания лечения достигло лишь количество эозинофилов и измененных эпителиоцитов. И уже через 2 мес после завершения лечения все изученные параметры оказались в пределах физиологических колебаний, число выявленных моноцитов и лимфоцитов даже значительно превысило контрольные значения показателя.

Состояние клеточного и гуморального иммунитета организма больных, а также его динамика под влиянием проводимых методов лечения представлены в таблице. Из приведенных данных видно, что до начала лечения у всех пациентов имеют место снижение процентного содержания Т- и В-лимфоцитов, а также одновременное повышение О-лимфоцитов. Кроме того, наблюдалось достоверное уменьшение количества Т-хелперов и увеличение Т-супрессоров в крови, что отражает заметное подавление клеточного иммунитета больного организма. Это обусловило существенное снижение

lymphocytes significantly increased the control values of the index.

The state of cellular and humoral immunity in the patients' organism, as well as its dynamics under the effect of conducted methods for treatment are presented in the table. According to presented data we saw, that to the treatment beginning a decrease of T- and B-percentage, as well as simultaneous rising of O-lymphocytes occurred. Besides, a statistically significant decrease of the number of T-helpers and T-suppressors in blood was observed, that reflected a considerable suppression of cellular immunity in a patient's organism. This fact stipulated a significant decrease of the helper-suppressor ratio in comparison with these indices in healthy people. Dysbalance of serum immunoglobulins, statistically significant inhibition of IgA and IgM on the background of the IgG increase was also revealed. After the finishing of the course of cold treatment an increase of T- and B-lymphocytes occurred. Absolute values of these indices were different in comparison with the initial values, however they were within the limits of physiological

Состояние и динамика показателей клеточного и гуморального иммунитета у больных хроническими гнойными гайморитами при лечении физическими факторами

State and dynamics of the indices of cellular and humoral immunity in patients with chronic maxillary sinusitis when treating with physical factors

Показатели Indexes	Контроль (по И. В. Филатовой, 1990) Control (according to I. V. Filatova, 1990)	Внутрисинусовое криоорошение Intrasinusis cryoirrigation			Внутрисинусовое криоорошение + УФОК Intrasinusis cryoirrigation + UVIB		
		до лечения Before treatment	сразу после лечения Just after treatment	через 2 мес после лечения In 2 months after treatment	до лечения Before treatment	сразу после лечения Just after treatment	через 2 мес после лечения In 2 months after treatment
Лимфоциты, 10^9/л Lymphocytes, 10^9/l	1,5–2,5	1,72 ± 0,09	1,61 ± 0,07	2,62 ± 0,10*	1,88 ± 0,13	2,62 ± 0,19*	2,71 ± 0,22*
Т-лимфоциты, 10^9/л T-lymphocytes, 10^9/l	1,0–1,3	0,81 ± 0,02**	1,12 ± 0,1*	1,19 ± 0,02*	1,11 ± 0,02	2,42 ± 0,07*,**	2,75 ± 0,08**
Т-лимфоциты, % T-lymphocytes, %	69,8 ± 0,6	64,5 ± 0,8**	66,6 ± 0,4*,**	66,0 ± 0,3*,**	54,5 ± 1,2**	63,0 ± 1,2*,**	69,6 ± 1,3*
В-лимфоциты, 10^9/л B-lymphocytes, 10^9/l	0,1–0,2	0,10 ± 0,01	0,14 ± 0,06*	0,20 ± 0,01*	0,16 ± 0,02	0,27 ± 0,02*,**	0,30 ± 0,01*,**
В-лимфоциты, % B-lymphocytes, %	21,0 ± 0,5	10,0 ± 0,6**	10,8 ± 0,4**	11,0 ± 0,01**	8,3 ± 0,7**	18,3 ± 1,5*,**	19,8 ± 1,4*
О-лимфоциты, 10^9/л O-lymphocytes, 10^9/l	0,2–0,5	0,30 ± 0,01	0,55 ± 0,02*	0,60 ± 0,02**	0,75 ± 0,03**	0,90 ± 0,30*,**	0,93 ± 0,03*,**
О-лимфоциты, % O-lymphocytes, %	8,4 ± 0,5	25,7 ± 0,8**	22,2 ± 0,9*,**	23,0 ± 0,6**	36,8 ± 1,2**	1,74 ± 0,7*,**	10,6 ± 0,5*,**
Т-хелперы, % T-helpers, %	50–53	43,4 ± 2,7**	47,5 ± 2,3*	50,0 ± 2,8*	45,2 ± 1,1**	39,0 ± 1,0*,**	53,3 ± 1,9*
Т-супрессоры, % T-suppressors, %	17–20	28,4 ± 0,8**	13,6 ± 1,2*,**	12,0 ± 1,0*,**	20,9 ± 1,1	18,5 ± 0,9	18,0 ± 1,2
Хелперы/супрессоры Helpers/suppressors	2,5–3,0	1,5 ± 0,4**	3,4 ± 0,2*	4,1 ± 0,5*,**	2,1 ± 0,1**	2,1 ± 0,1**	2,4 ± 0,1*
Иммуноглобулин А, мкмоль/л Immune globulin A, μmol/l	21,5 ± 1,3	14,9 ± 0,9**	21,9 ± 0,7*	23,1 ± 0,8*	9,4 ± 0,7**	17,2 ± 1,1*,**	24,9 ± 2,3*,**
Иммуноглобулин М, мкмоль/л Immune globulin M, μmol/l	1,24 ± 0,07	1,12 ± 0,05**	0,70 ± 0,04*,**	0,97 ± 0,05*,**	0,94 ± 0,06**	0,70 ± 0,04*,**	1,53 ± 0,11*,**
Иммуноглобулин G, мкмоль/л Immune globulin G, μmol/l	72,5 ± 3,4	91,2 ± 4,8**	101,8 ± 5,8*,**	81,3 ± 5,1**	92,8 ± 4,8**	117,5 ± 6,3*,**	84,4 ± 3,8*,**

Примечания. * — достоверно сравнение результатов до и после лечения; ** — достоверно сравнение результатов до и после лечения с контролем.

Notes. * — statistically true comparison of the results before and after treatment; ** — statistically true comparison of the results before and after treatment with the control.

Матеріал, захищений авторським правом

хелперно-супрессорного соотношения по сравнению с этими показателями у здоровых лиц. Также выявлен дисбаланс сывороточных иммуноглобулинов: достоверная ингибиция IgA и IgM на фоне увеличения содержания IgG. После окончания курса холодового лечения произошло повышение процентного содержания Т- и В-лимфоцитов. Абсолютные величины этих показателей были различны с начальными значениями, но оставались в пределах физиологических колебаний. Следует отметить, что относительное содержание О-лимфоцитов продолжало быть измененным при сравнении с нормальным его значением, которое превышало почти в 3 раза. Такая же тенденция прослеживается и в отношении абсолютного значения этого показателя. При рассмотрении субпопуляционного состава Т-лимфоцитов установлено, что доля хелперов в общем ансамбле клеток значительно повысилась, а супрессоров — уменьшилась. В связи с этим и соотношение этих клеток также отличалось от первичного его значения. Кроме того, выявлено достоверное нарастание содержания IgA до нормальных цифр и дальнейшее снижение IgM. Уровень IgG, повышенный до начала лечения, еще больше повысился. Через 2 мес после окончания лечения процентное содержание в крови Т- и В-лимфоцитов повысилось, хотя так и не достигло нормальных значений, а их абсолютные величины практически не отличались от таковых у здоровых людей. Доля О-фракции лимфоидных клеток несколько уменьшилась по сравнению с первичным исследованием, однако оставалась значительно повышенной почти в 3 раза по сравнению с величинами у здоровых лиц. Исследование отдельных фракций Т-лимфоцитов показало, что удельный вес хелперов достиг физиологической нормы, а количество супрессоров так и осталось ниже его нормальных значений, что следует расценивать как сохранение дисбаланса функционально дифференцированных Т-лимфоидных клеток. Динамика гуморального иммунитета на этом этапе исследования характеризовалась увеличением уровня сывороточного иммуноглобулина А, уменьшением значений IgM и IgG при сравнении с начальными исследованиями. Однако лишь первый показатель стал физиологически нормальным, остальные так и не достигли этого уровня.

Таким образом, исследование клеточного и гуморального иммунного статуса больных с хроническими экссудативными синуитами показало, что положительная динамика прослеживается в ближайшие сроки после использования сверхнизких температур на патологический очаг за счет его санации, а это в свою очередь оказывает опосредованное благотворное влияние на весь организм. При исследовании через 2 мес изменения изученных показателей в большинстве нивелируются, что диктует необходимость дополнить холодовой лечебный фактор воздействием дополнительного УФОК.

differences. It should be noted, that a relative content of O-lymphocytes continued to be changed when comparing with its normal value, exceeded by 3 times.

The same tendency is traced in respect of an absolute value of this index. When considering the subpopulational content of T-lymphocytes it has been established that the portion of helpers in a total cell ensemble considerably increased and as for the suppressors it reduced. In this connection the ratio of these cells also differed from its primary value. Besides a significantly true rising of IgA content up to normal figures and further decrease in IgM were revealed. IgG level increased before the beginning of treatment enhanced much higher. In 2 months after finishing the treatment the percentage of the content in the blood of T- and B-lymphocytes increased, although it did not reach normal values, their absolute values practically did not differ from those in healthy people. The portion of O-fraction of lymphoid cells slightly reduced in comparison with primary investigation, but it remained considerably increased almost in 3 times in comparison with the values in healthy persons. Investigation of some fractions of T-lymphocytes showed that a specific share of helpers reached physiological norm and the number of suppressors remained lower that its normal values, that should be considered as the keeping of the dysbalance of functionally differentiated T-lymphoid cells. Dynamics of humoral immunity at this stage of study was characterised by the increase in the level of serum immune globulin A, decrease in the values of IgM and IgG when comparing with initial investigations. However only the first index became physiologically normal , the rest did not reach this level.

Thus the investigations of cellular and humoral immune status of patients with chronic exudative sinuites has shown that positive dynamics is traced within the closest terms after the application of low temperatures to pathological locus due to its sanation and this in its turn affects favourably as mediator on the whole organism. When studying in 2 months the changes of investigated indices in their majority are levelled, that dictates the necessity to add a cold therapeutic factor by the effect of additional immune modulating UVIB. After conducting of such a combined, pathogenetically stipulated method of sanation of pathological locus in perrhinal sinuses the certain positive changes in lymphogenesis were observed. At the background of an increase in the content of total number of lymphoid cells of peripheric blood considerably enhanced the number of T-lymphocytes, the processes of cell differentiation activated. Reduction of the percentage of the content of non-differentiated O-lymphocytes was accompanied by an increase of antibody forming B-cells. Some reduction of the number of both fractions of T-lymphocytes was noted due to which helper-suppressory coefficient remained at previous level.

Матеріал, захищений авторським правом

После проведения такого комбинированного, патогенетически обоснованного метода санации патологического очага в околоносовых пазухах наблюдались определенные положительные изменения лимфогемопоэза. Так, на фоне повышения содержания общего количества лимфоидных клеток периферической крови существенно возрастало количество Т-лимфоцитов, активизировались процессы дифференцировки клеток. Уменьшение процентного содержания недифференцированных О-лимфоцитов сопровождалось увеличением антителообразующих В-клеток. Отмечено некоторое снижение количества обеих фракций Т-лимфоцитов, за счет чего хелперно-супрессорный коэффициент остался на прежнем уровне. Кроме того, выявлена положительная динамика иммуноглобулинов А. Через 2 мес после завершения курса санации пазух взаимоотношения Т- и В-лимфоцитов становились практически такими же, как и у здоровых лиц. Лишь количество О-клеток было несколько выше нормального уровня. Содержание субпопуляций Т-лимфоцитов пришло в соответствие с нормой, поэтому хелперно-супрессорный индекс возвратился в пределы физиологических колебаний.

Итак, изучением тестов клеточного и гуморального иммунитета установлено, что они в подавляющем большинстве случаев оказываются нормальными, что обусловливается благотворным влиянием холодового фактора на патологический очаг и модифицирующим действием ультрафиолетовых лучей на кровь.

Полученные результаты лечения больных хроническими экссудативными синуитами с использованием холодового фактора и УФОК свидетельствуют о том, что наиболее эффективен метод санации пазух, включающий локальное внутрипазушное криоорошение в сочетании с фотомодификацией крови пациента.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Грищенко В. И., Сандомирский Б. П., Колонтай Ю. Ю. и др.* Практическая криомидицина.– Киев: Здоров'я, 1987.– 248 с.
2. *Загорянская М. Е.* Криопрофилактика рецидива полипозного риносинуита // Тез. докл. IX Всесоюз. съезда оториналар. СССР (15–17 ноября 1988 г.).– Кишинев: Штиинца, 1988.– С. 390–391.
3. *Сквирская А. А., Зайцев Б. С., Ищенко Г. К.* Криотерапия хронических ринитов и риносинуитов и ее влияние на некоторые иммунологические показатели больных // Актуальные вопросы оториноларингологии.– Ташкент, 1980.– С. 83–84.
4. *Филатов В. Ф., Журавлёв А. С., Муринец-Маркевич Б. Н., Степанов Э. П.* Криостимулирующее лечение больных хроническим гайморитом // Журн. ушных, носовых и горловых болезней.– 1991.– № 3.– С. 1–4.
5. *Филатова И. В.* Сравнительная оценка эффективности лечения хронических гнойных верхнечелюстных синуитов лазероксигеновоздействием и ультрафиолетовым облучением крови: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.– Киев, 1990.– 28 с.
6. *А. с. 1806786* СССР МКИ[4]. Способ УФ-облучения крови и устройство для его осуществления / А. С. Журавлев, Б. Н. Муринец-Маркевич, Л. С. Красников, А. М. Бредихин // Бюл. изобр.– 1993.– № 13.– С. 44.
7. *Dowell M., Paher A. L.* Nasal polypectomy: should antral washout be a routine? // J. Laryngol. Otol.– 1992.– 106, № 8.– P. 695–696.
8. *Yamabe K., Hokki A., Masuda M.* Cryosurgery for chronic sinusitis // Pract. Otol. Kyoto.– 1986.– 79, № 3.– P. 409–419.

Поступила 06.06.2001

In addition, a positive dynamics of immune globulin A is revealed. In 2 months after finishing the sanation course of sinuses the interrelations of T- and B-lymphocytes became practically the same as in healthy people. Only the number of O-cells was slightly higher in comparison with the normal level. The content of subpopulation of T-lymphocytes corresponded the norm, so helper-suppressory index came back to the limits of physiological deviations.

Thus by studying the tests of cellular and humoral immunity it has been established but they in the majority of cases occur to be normal, that is stipulated by favourable effect of cold factor on pathological locus and modifying effect of ultraviolet lights on blood.

Obtained treatment results of patients with chronic exudative sinuites using cold factor and ultraviolet irradiation of blood testify to the fact that the method of sinuses sanation is the most efficient, including local intrasinuses cryoirrigation in combination with photomodification of a patient's blood.

REFERENCES

1. *Grischenko V. I., Sandomirsky B. P., Kolontaj Yu. Yu. et al.* Practical cryomedicne.– Kyiv, Zdorov'ya, 1987.– 248 p.
2. *Zagoryanskaya M. E.* Cryoprevention of polypous rhinosinusitis // Abstr. for IX All-Union congress of otorhinolaringologists. USSR (15–17 November 1988).– Kishinev: Shtiintsa, 1988.– P. 390–391.
3. *Skvirskaya A. A., Zajtsev B. S., Ischenko G. K.* Cryotherapy of chronic rhinitis rhinosinusitis and its effect on some immunological indices of patients // Actual questions of otorhinolaringology.– Tashkent, 1980.– P. 83–84.
4. *Filatov V. F., Zhuravlev A. S., Murinets-Markevich B. N., Stepanov E. P.* Cryostimulating effect of patients with chronic maxillary sinusitis // Journal of otic, nasal and jugular diseases.– 1991.– № 3.– P. 1–4.
5. *Filatova I. V.* Comparative evaluation of the treatment efficiency of chronic purulent maxillary sinusitis by means of laseroxygenoeffect and ultraviolet bloodirradiation: Abstr. Thesis Cand. Med. Sci.– Kiev, 1990.– 28 p.
6. *Author* Certificate 1806786 USSR MKU[4]. Method of UV-irradiation of blood and apparatus for its realization / A. S. Zhuravlev, B. N. Murinets-Markevich, L. S. Krasnikov, A. M. Bredikhin // Bul. izobr.– 1993.– № 13.– P. 44.
7. *Dowell M., Paher A. L.* Nasal polypectomy: should antral washout be a routine? // J. Laryngol. Otol.– 1992.– 106, № 8.– P. 695–696.
8. *Yamabe K., Hokki A., Masuda M.* Cryosurgery for chronic sinusitis // Pract. Otol. Kyoto.– 1986.– 79, № 3.– P. 409–419.

Accepted in 06.06.2001

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 615.832.9: 615.47

UDC 615.832.9: 615.47

Методы локального низкотемпературного воздействия в криомедицине

В. И. ГРИЩЕНКО, А. С. СНУРНИКОВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

О. А. ГРИШИНА

Харьковский государственный медицинский университет

Б. Н. МУРИНЕЦ-МАРКЕВИЧ

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

Methods for Local Low-Temperature Effect in Cryomedicine

V. I. GRISCHENKO, A. S. SNURNIKOV

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

O. A. GRISHINA

Kharkov State Medical University

B. N. MURINETS-MARKEVICH

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

Описана криогенная аппаратура, применяемая для локального низкотемпературного воздействия в медицине, показаны ее высокая эффективность в лечении различных заболеваний и необходимость широкого внедрения в клиническую практику.

Описана кріогенна апаратура, яка використовується для локального низькотемпературного впливу в медицині, показані її висока ефективність у лікуванні різних захворювань і необхідність широкого впровадження в клінічну практику.

Cryogenic apparatuses applied for local low-temperature effect in medicine is described and showed its high efficiency when treating various diseases and necessity of more widespread application into clinical practice.

Изучение воздействия холода на разные биологические объекты началось три столетия назад, тем не менее в самостоятельную научную дисциплину – криобиологию – эта отрасль знаний выделилась только в 60-е годы нашего столетия. Криобиология является теоретической основой применения криогенного метода в клинической медицине [5–7, 9, 10], в частности, дерматологии, офтальмологии, гинекологии, стоматологии, нейрохирургии, оториноларингологии и других отраслях медицины.

Криохирургический метод, ставший в настоящее время методом выбора в стереотаксической нейрохирургии, постепенно завоевывает права гражданства в хирургии опухолей головного мозга и, в частности, для деструкции аденом гипофиза.

В офтальмологии накоплен опыт успешной криохирургической деструкции внутриглазных опухолей, криоаппликаций для лечения заболеваний роговицы, отслойки сетчатки, глаукомы, для экстракции хрусталика.

Investigation of the cold effect on different biological objects has started three hundreds years ago, however this field became an independent one of sciences, cryobiology, only in the sixties. Cryobiology is a theoretical ground for cryogenic method application in clinical medicine [5–7, 9, 10], in particular, dermatology, gynecology, ophthalmology, stomatology, neurosurgery, othorhynolarhyngology and other fields of medicine.

Cryobiological method, which till now became the method of selection in stereotaxical neurosurgery, gradually win civic rights in surgery of brain tumors and, in particular, for the destruction of hypophysis adenomas.

In ophthalmology the experience of a successful cryobiological destruction of intraocular tumors, cryoapplications for the treatment of cornea diseases, retina exfoliation, glaucoma, for crystalline lens extraction has been accumulated.

"Sphere of the effect" of cryosurgical method in otorhinolaryngology is rapidly widening. Cryotonsillectomy, which has the series of advantages in com-

Матеріал, захищений авторським правом

Быстро расширяется "сфера действия" криохирургического метода в оториноларингологии. Все более широкое распространение получает криотонзиллэктомия, имеющая ряд неоспоримых преимуществ перед обычным удалением миндалин — легкое течение послеоперационного периода, практически отсутствие кровотечения и других осложнений.

Успешными оказались работы по криодеструкции полипов носовых раковин, узелков на голосовых связках, гланулем гортани. Обнадеживающие результаты получены при лечении доброкачественных и злокачественных опухолей ЛОР органов (ангиофибромы носоглотки, базалиомы полости носа, рака глотки и гортани и др.), а также папилломатоза гортани.

В урологии наиболее существенные результаты получены при криогенной деструкции аденом предстательной железы. Произведено уже несколько тысяч операций, показавших ряд бесспорных ее преимуществ перед классической простатэктомией. Сделаны первые шаги в криодеструкции рака предстательной железы.

С 1970 года криохирургический метод применяется для лечения гинекологических заболеваний: патологических изменений на шейке матки, эрозии (эрозированные эктропионы, лейкоплакии, эндометриозы, полипы), остроконечных кондилом вульвы, дисфункциональных маточных кровотечений, фибромиом матки.

Криовоздействие имеет определенные преимущества перед токами высокой частоты (диатермоэлектрокоагуляцией). Низкие температуры воздействуют на клетки разных тканевых элементов более медленно и дифференцированно. Процесс криовоздействия на организм протекает безболезненно, в дальнейшем не развиваются рубцовые изменения. В то же время регенерация ткани происходит быстрее, чем после применения токов высокой частоты.

Исходя из оптимальных температурных уровней, во ФТИНТе (Харьков) были разработаны аппараты, использующие различные хладагенты и принципы охлаждения. Так, для достижения уровня охлаждения наконечника в контакте с тканью ниже −140 °С применены устройства, в которых криогенный эффект достигается с помощью жидкого азота.

Аппарат [1], изображенный на рис. 1, состоит из сосуда Дьюара *8*, переливного сифона *9*, гибкого шланга *2* для подачи жидкого азота и рабочего органа — криозонда *1* со сменными наконечниками. Переливной сифон имеет запорный вентиль *3*, трубку подачи *10*, манометр *4*, оребренный корпус *5*, соединенный с высокотеплоемким и теплопроводным кожухом *6*, образующим с соосно расположенной трубкой подачи зазор *7*. Отверстия *11* верхней части кожуха соединяют полость зазора между кожухом и трубкой подачи с полостью, расположенной над жидким азотом.

parison with generally accepted tonsils removal, such as a mild severity of postoperational period, practically the absence of hemorrhages and other complications, become more widespread.

The investigations on cryodestruction of polyps in turbinated bones, nodules on vocal ligaments, larynx glanulemas occurred to be successful. Reassuring results were obtained when treating non-malignant and malignant tumors in othorhinolaryngological organs (angiofibromas of nasopharynx, basaliomas in nasal cavity, gullet and larynx cancer etc.), as well as larynx papillomatosis.

In urology the most successful results were obtained at cryogenic destruction of prostate adenomas. Some thousands of the operations, demonstrated the series of unquestionable advantages in comparison with classical prostatectomy have been carried-out. The first steps in the cryodestruction of prostate cancer were done.

Beginning from 1970 the cryosurgical method is applied for the treatment of gynecological diseases of cervix uteri, erosions (erosioned ectropions, leukoplakia, endometriosis, ployposes, red edge of lips, disfunctional uterine hemorrhages, uterine fibromiomas.

Cryoeffect has certain advantages in comparison with high frequency current (diathermoelectrocoagulation). Low temperatures affect the cells of various tissue elements more slowly and differentiately. Cryoeffect process to an organism occurs smoothly and in future the scarry changes do not develop. At the same time tissue regeneration occurs more rapidly, than after applying high frequency current.

Proceeding from the optimum temperature levels, the devices, using various cooling agents and cooling principles were elaborated at B. I. Verkin Institute for Low Temperatures Physics and Engineering of National Academy of Sciences of the Ukraine (Kharkov). To achieve a cooling level in the tip (head) in the contact with tissue lower than −140 °C the devices, in which cryogenic effect is reached by means of liquid nitrogen, were applied.

Apparatus [1], showed in the Fig. 1, consists of Dewar vessel *8*, transferring siphon *9*, flexible hose *2* for liquid nitrogen supplying and a working organ, cryoprobe *1* with accessory tips. Transferring siphon has valve *3*, flux tube *10*, manometer *4*, finned body *5*, connected to high heat capacity and head-conductivity housing *6*, forming clearance *7* with alignedly located feed tube. Holes *11* in the housing top connected the space of clearance between housing and feed tube with the space, located over liquid nitrogen.

Advanced system for nitrogen feeding from Dewar vessel to a working part of instrument does not require a vacuum pump, compressor, cylinder with compressed gas or electric heater. To prepare apparatus to the work it is necessary to feel Dewar vessel with liquid nitrogen, and siphon (with closed valve) to connect hermetically with the neck of Dewar vessel. Under the effect of hydrostatic pressure liquid nitro-

Матеріал, захищений авторським правом

Усовершенствованная система подачи жидкого азота из сосуда Дьюара к рабочей части инструмента не требует вакуумного насоса, компрессора, баллона со сжатым газом или электрического нагревателя. Для подготовки аппарата к работе сосуд Дьюара неоходимо заполнить жидким азотом, а переливной сифон (при закрытом вентиле) герметично соединить с горловиной сосуда Дьюара. Под действием гидростатического давления жидкий азот стремится заполнить зазор между трубкой подачи и кожухом, при этом он частично газифицируется и в виде струи парожидкостной смеси через отверстия попадает на теплую оребренную поверхность корпуса, что приводит к дополнительной газификации.

Газификация жидкого азота в зазоре обеспечивается за счет поглощения им тепла, выделяемого высокотеплоемким кожухом. Снаружи кожух охлаждается медленно из-за малотеплопроводной паровой подушки, образующейся между кожухом и жидким азотом. Значительная газификация жидкого азота происходит лишь в первые 20–30 с и с уменьшением разности температур между кожухом и заполняющим зазор азотом достигает минимальной величины, зависящей от теплопритоков из окружающей среды, но достаточной для поддержания постоянного давления при определенном расходе азота.

Величина теплопритоков в стабилизировавшемся режиме может изменяться путем установки кожуха с большим или меньшим поперечным сечением участка, соединенного с наружным оребренным корпусом.

Давление над жидкостью быстро растет и через 10–15 с достигает 0,15 МПа, что вполне достаточно для эффективной циркуляции азота через наконечник криозонда. После открытия вентиля жидкий азот через шланг поступает к наконечнику, охлаждая который, испаряется и выходит в окружающую среду.

Описанный аппарат эксплуатируется в течение 30 лет на базе родильного дома № 5 г. Харькова.

Возможность лечения эрозии, полипов и остроконечных кондилом при более высоких температурах привела к необходимости создания аппарата АКГ-01, использующего закись азота, которая хранится в баллонах при температуре 20 °С (давление внутри баллона равно 5,2 МПа).

Аппарат АКГ-01 (рис. 2) обеспечивает температуру охлаждения в зоне контакта с тканью от –50 до –60 °С дросселированием закиси азота в охлаждающем наконечнике до атмосферного давления. В состав аппарата входит подвижная тележка *1*, на которой установлен баллон *2* и смонтирован пульт управления *4*, обеспечивающий постоянный режим работы и технику безопасности. С баллоном через гибкий шланг *5* соединен криозонд *3* со сменными наконечниками различных геометрических форм и размеров, применяемых дифференци-

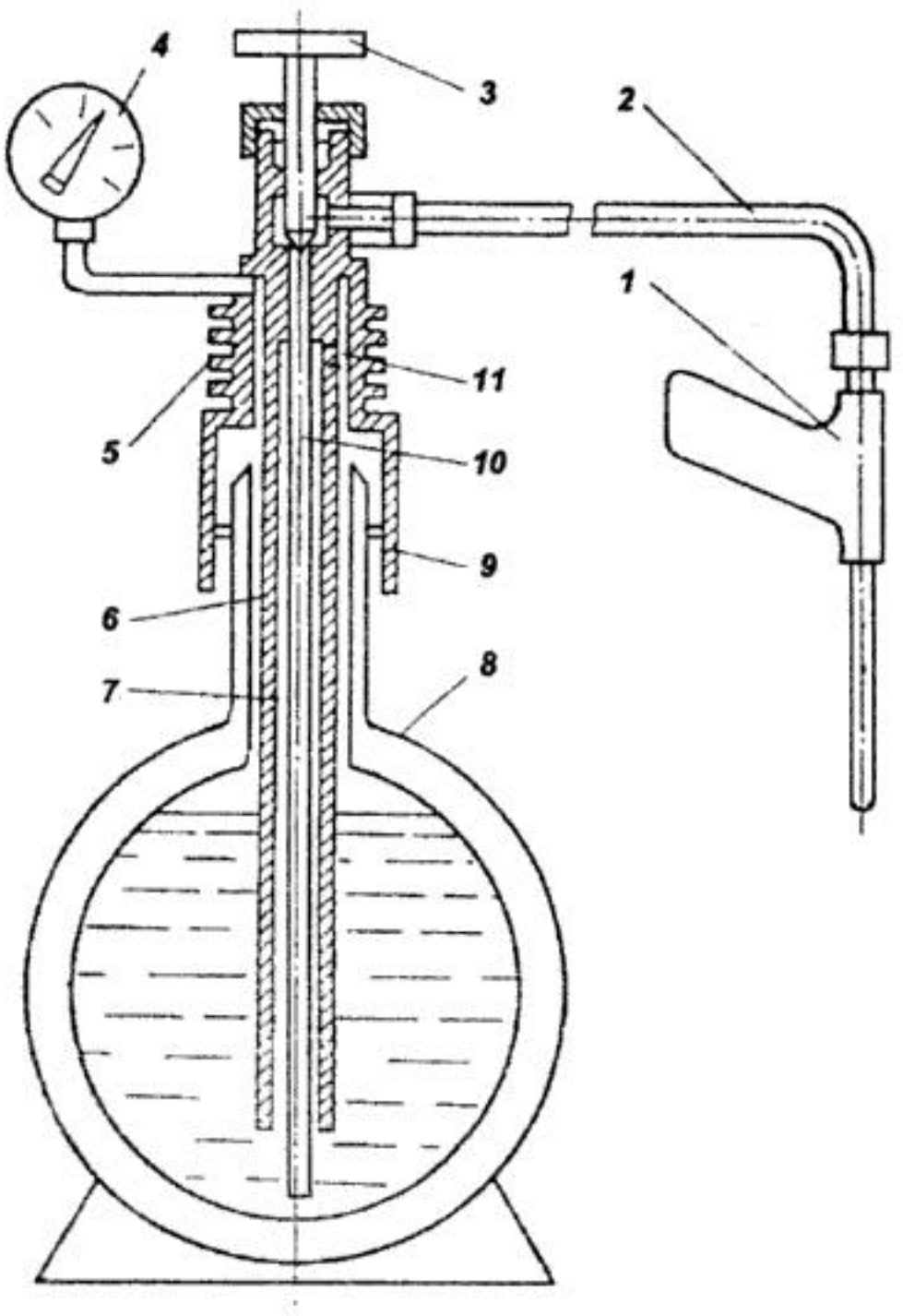


Рис. 1. Гинекологический аппарат на жидком азоте.

Fig. 1. Gynecological apparatus working with liquid nitrogen.

gen tends to feel the clearance between a feeding tube and housing, thereat it partially gasificates and as a jet of paraliquid mixture through the holes hits on a warm finned surface of the body, that results in additional gasification.

Gasification of liquid nitrogen occurred due to the absorption by it of the heat, released by high-heat-capacity housing. Housing from the outside is cooled slowly due to a slight heat-conductivity of the heat bed, formed between housing and liquid nitrogen. Significant gasification of liquid nitrogen occur just on first 20–30 s and by the reduction of temperature differences between a housing and nitrogen, filling clearance it achieves the minimum value, depending on heat input from an outer medium, which is sufficient for maintaining of a constant pressure at a certain nitrogen consumption.

The value of heat input in a stabilized regimen can be changed due to installation of the housing with bigger or lesser cross-section in the region, connected to an exterior finned body. Pressure over a liquid rises rapidly and in 10–15 s achieves 0.15 MPa, which is quite sufficient for an efficient nitrogen circulation through the cryoprobe tip. After the valve opening liquid nitrogen passes through a hose to the tip, and cools it, then it evaporates and releases into an outer medium.

Матеріал, захищений авторським правом

рованно в зависимости от вида заболевания и величины пораженного участка.

Аппарат можно эксплуатировать, используя в качестве хладагента двуокись углерода, обеспечивая температуру в зоне контакта с тканью от –40 до –50 °С.

Методика криогенного лечения ряда гинекологических заболеваний с помощью аппарата АКГ-02 разработана в 70-е годы на кафедре акушерства и гинекологии ХМИ под руководством проф. Грищенко В. И. [5].

Технические характеристики аппаратов	АКГ-01	АКГ-02
Хладагент	закись азота	закись азота
Комплект наконечников, шт.	3	6
Форма наконечников, мм:		
цилиндрическая	8	8
грибообразная	8/20	6/20, 5/15
заостренная	4/8/20	4/15/30
		4/15/20
Минимальная температура наконечника в контакте с живой тканью, °С	–50	–70
Время непрерывной работы, мин	12	60
Габаритные размеры, мм	420×350×1 250	450×450×1 100
Масса аппарата, кг:		
без баллона	8	8,5
с баллоном в заправленном состоянии	30	30

Рабочий орган аппарата — криозонд — компактен, портативен и удобен в работе. Его конструкция обеспечивает мгновенную подачу и прекращение подачи хладагента, а также быструю смену наконечников необходимой формы и размеров.

Аппарат АКГ-02 предназначен для криодеструкции патологически измененных участков ткани наружных половых органов, влагалища, шейки матки и криокоагуляции слизистой (эндометрии) внутренней полости матки, а также может применяться при лечении ряда заболеваний в урологии, проктологии и дерматологии.

Для лечения необратимых форм пульпитов и предраковых заболеваний красной каймы губ и слизистой оболочки полости рта криодеструкцией пораженных тканей парожидкостной струей азота создан криораспылитель азотный стоматологический КАС-01 [2], состоящий из двух легко разборных узлов: клапанно-сифонного устройства и теплоизолированного малогабаритного резервуара для жидкого азота (рис. 3).

Время криовоздействия при лечении предраковых заболеваний от 8 до 13 с в зависимости от площади глубины замораживания патологического участка ткани.

Лечение предраковых заболеваний слизистой оболочки полости рта осуществляется по методикам, разработанным кафедрой терапевтической стоматологии Харьковского института усовершенствования врачей.

The described apparatus is explored within 30 years on the base of Maternity House № 5 (Kharkov).

Possibility of the treatment of such diseases as erosions, polyps and pointed condylomas under higher temperatures resulted in the necessity to create ACG-01 apparatus, using nitrogen oxide, which is stored in the containers under the temperatures of 20 °C (pressure inside of the container made 5.2 MPa).

ACG-01 apparatus (Fig. 2) provides cooling temperature in a contact zone with tissue from –50 to –60 °C by nitrogen oxide decelerating in a cooling tip up to an atmosphere pressure. Apparatus contains a movable truck *1*, where the container *2* is set and a control desk *4*, providing a constant regimen of the work and safety engineering, is assembled. Cryoprobe *3* with accessory tips of different geometrical forms and sizes, applied differentiately depending on disease and size of the impaired organ, is connected to the container through a flexible hose.

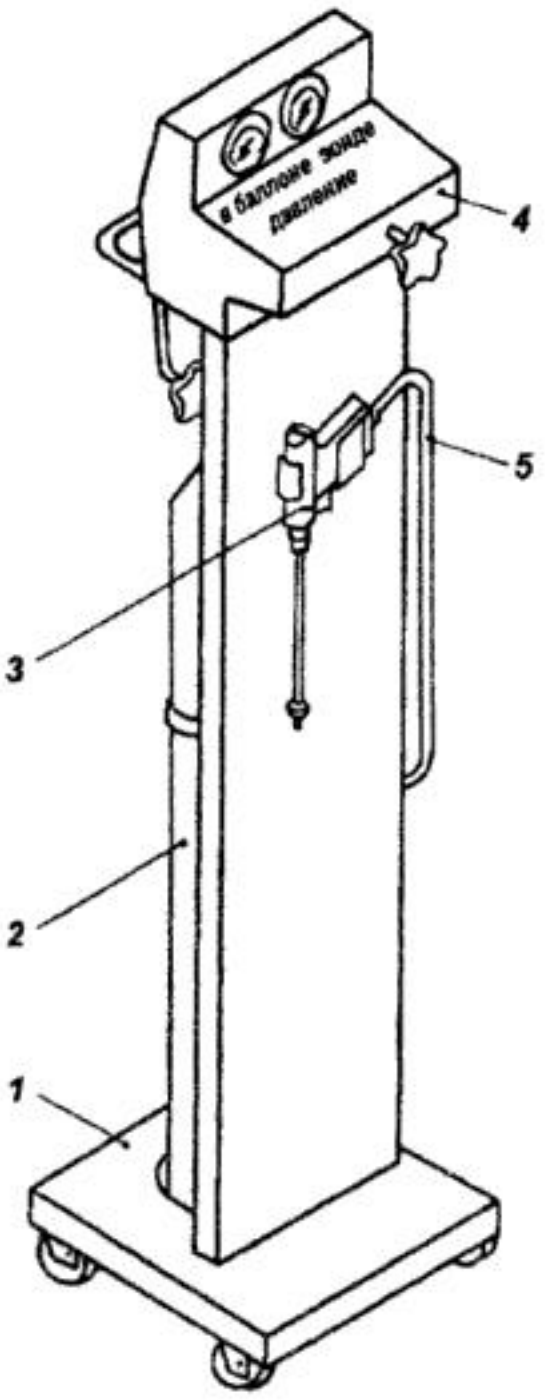


Рис. 2. Гинекологический аппарат АКГ-01.

Fig. 2. ACG-01 gynecological apparatus.

Apparatus can be explored using carbon dioxide as a coolant, providing the temperature from –40 to –50 °C in the zone of contact with tissue.

The method for cryogenic treatment of the series of gynecological diseases by means of ACG-2 apparatus has been elaborate in seventies at the Chair of Obstetrics and Gynecology in Kharkov Medical Institute under the leadership of Professor V. I. Grischenko[5].

Cryoprobe, which is a working organ of the apparatus is compact, portable and comfortable in the work. Its construction provides a momentary feeding and the finishing of coolant feeding, as well as a rapid change of tips of necessary shapes and sizes.

ACG-2, gynecological apparatus is intended for the cryodestruction of pathologically changed tissue sites of external genital organs, vagina, cervix uteri and mucous membrane (endometrium) cryocoagulation of inner uterine cavity, as well as can be used when treating the series of diseases in urology, proctology and dermatology.

Матеріал, захищений авторським правом

Рис. 3. Криораспылитель азотный стоматологический КАС-01.

Fig. 3. CAS-01 dermatological nitrogenic cryoatomizer.

Кафедра терапевтической стоматологии регулярно проводит курс лекций и практических занятий по криогенному методу лечения в стоматологии.

Опытным производством ФТИНТа НАН Украины изготовлено и внедрено в клиническую практику более 200 криораспылителей КАС-01, удобных в работе и простых в эксплуатации.

Технические характеристики криораспылителя КАС-01

Объем азотного резервуара, см^3	100
Время непрерывной работы, мин:	
при истечении азота через иглу № 0840	4
при истечении азота через иглу № 625	8
Масса распылителя, кг	0,5
Габаритные размеры, мм:	
высота	250
диаметр	86

Для лечения очагового нейродермита, хронической экземы с выраженной лихенификацией кожи, круговидного облысения, доброкачественных образований кожи, остроконечных кондилом, бородавочной формы красного плоского лишая и других заболеваний кожи разработан аппликатор криогенный дерматологический КД-3 [3, 6] (рис. 4), снабженный сменными наконечниками с различными размерами контактной поверхности и ключом для их установки.

Technical characteristics of the apparatuses	**ACG-01**	**ACG-02**
Coolant	nitrogen oxide	nitrogen oxide
Set of tips, units	3	6
Shape of tips, mm		
cylindric	8	8
mushroom-shaped	8/20	6/20, 5/15
pointed	4/8/20	4/14/30, 4/15/20
Minimum temperature in the tip, in the contact with alive tissue, °C	−50	−70
Duration of continuos work, min	12	60
Overall dimensions, mm	420×350×1 250	450×450×1 100
Weight of apparatus, kg		8.5
without container	8	30
with filled container	30	

CAS-01 stomatological nitrogen cryo-atomizer has been created for the treatment of irreversible forms of pulpits and pre-tumor diseases of red edge of lips and mucous membrane of mouth cavity by means of cryodestruction of the impaired organs by vapor-liquid nitrogen jet [2], consisting in two easily knock-down units: valve-siphon device and heat-isolated compact reservoir for liquid nitrogen (Fig. 3).

Cryoeffect duration when treating pre-tumor diseases makes from 8 to 13 s depending on the freezing depth area of the frozen tissue region.

Technical characteristics of CAS-01 cryo-atomizer

The volume of nitrogen reservoir, cm^3	100
Duration of continuos work, min	
during nitrogen outflux through a needle № 0840	4
during nitrogen outflux through a needle № 625	8
The mass of atomizer, kg	0.5
Overall dimensions, mm	
height	250
diameter	86

Treatment of pre-tumor diseases of the mucous membrane in a mouth cavity was carried-out according to the methods, elaborated at the Chair of

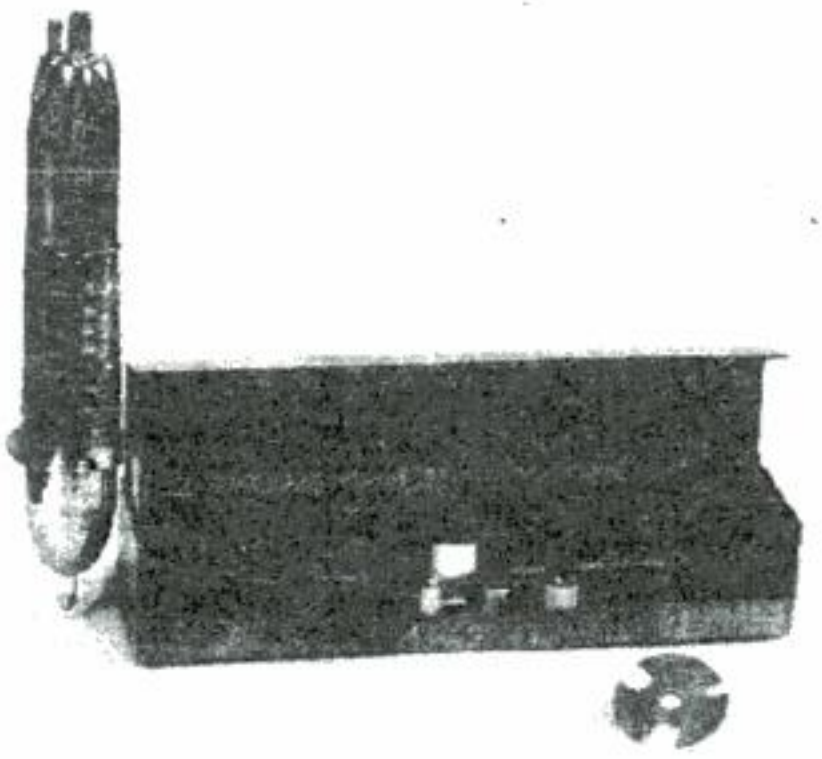


Рис. 4. Аппликатор криогенный дерматологический КД-3.

Fig. 4. CD-3 cryogenic dermatological applicator.

Матеріал, захищений авторським правом

Технические характеристики аппликатора КД-3

Хладагент	жидкий азот
Гидравлический объем резервуара, $см^3$	80
Минимальная температура охлаждающего наконечника, °С	−170
Измеряемое усилие на динамометре рукоятки, кГ	0–2,5
Диаметры контактных поверхностей сменных наконечников, мм	3, 5, 10, 16
Время непрерывной работы, мин	3
Масса аппликатора, кг	0,4
Габаритные размеры, мм:	
длина	290
диаметр	42

Клинические испытания проведены на кафедре дерматологии Харьковского медицинского института при лечении 133 больных (от 4-х до 78 лет) с обычными, плоскими и подошвенными бородавками, остроконечными кондиломами, доброкачественными новообразованиями кожи. У подавляющего большинства больных получены хорошие клинические и косметические результаты.

Клинико-экспериментальные исследования показали, что аппликатор прост и удобен в работе, безопасен для обслуживающего персонала и больных, позволяет осуществлять дозированное криовоздействие на кожу, а криотерапия с его помощью эффективна в лечении ряда дерматозов.

Для лечения заболеваний центральной нервной системы: эпилепсии, внутримозговых опухолей, болевых синдромов, болезни Паркинсона и других патологий разработан криозонд автономный нейрохирургический КМ-16 [4], состоящий из ампулы, которая заполняется жидким азотом, и сменной канюли с охлаждающим наконечником (рис. 5).

Технические характеристики криозонда КМ-16

Хладагент	жидкий азот
Объем азотной ампулы, $см^3$	80
Время непрерывной работы в одном цикле, мин	8
Габаритные размеры, мм:	
длина	415
высота	85
ширина	40

Клинико-экспериментальные исследования и разработка методических рекомендаций выполне-

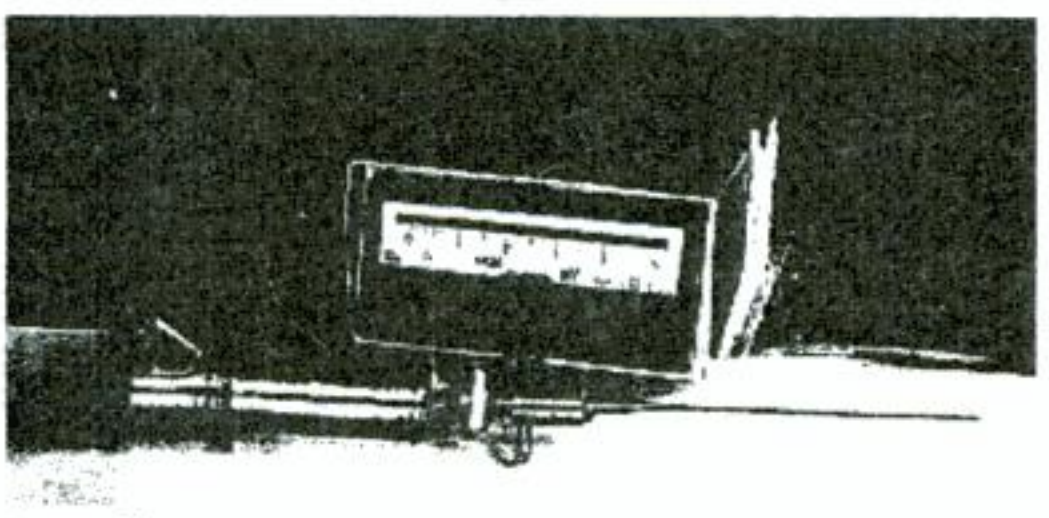


Рис. 5. Криозонд автономный нейрохирургический КМ-16.

Fig. 5. CM-16 autonomous neurosurgical cryoprobe.

therapeutical stomatology of Kharkov Institute for Advanced Training of Physicians.

The Chair of therapeutical stomatology regularly conduct the courses of lectures and practice on the treatment by cryogenic method in stomatology.

Experimental Unit of the B. I. Verkin Institute for Low Temperatures Physics and Engineering of National Academy of Sciences of the Ukraine (Kharkov) produced and introduced into a clinical practice more than 200 CAS-01 cryo-atomizers, suitable for work and easy in application.

CD-3 [3, 6], cryogenic dermatological applicator has been elaborated to treat focal neurodermites, chronic eczema with manifested skin lichenification, alopecia areata, non-malignant skin neoplasms, pointed condylomas, wart form of lichen (ruber) planus and other skin diseases. CD-3 applicator (Fig. 4) is supplied by 4 accessory tips with various sizes of a contact surface and key for their installation.

Technical characteristics of CD-3 applicator

Coolant	liquid nitrogen
Hydraulic volume of reservoir, cm^3	80
Minimum temperature of a cooling tip, °C	−170
The measured force on the handle dinamometer, kG	0–2.5
Diameters of contact surfaces of accessory tips, mm	3, 5, 10, 16
Duration of continuos work, min	3
The mass of applicator, kg	0.4
Overall dimensions, mm	
length	290
diameter	42

Clinical trials have been carried-out at the Chair of Dermatology of Kharkov Medical University when treating 133 patients (4–78 years old) with simple, flat and plantar warts, pointed condylomas, non-malignant skin neoplasms. In the majority of patients good clinical and cosmetic results were obtained.

Clinical and experimental investigations demonstrated, that applicator is simple and suitable in the work, safe for personnel and patients, allows to conduct the cryoeffect by dose on a skin, and cryotherapy due to its help is an efficient when treating the series of dermatoses.

CM-16 [4], autonomous neurosurgical cryoprobe, consisting in the ampoule, filled with liquid nitrogen and accessory cannula with a cooling tip has been elaborated for the treatment of central nerve system diseases: epilepsy, brain tumors, ache syndromes, Parkinson's disease and other pathologies (Fig. 5).

Technical characteristics of CM-16 cryoprobe

Coolant	liquid nitrogen
The volume of nitrogen ampoule, cm^3	80
Duration of continuos work in one cycle, min	8
Overall dimensions, mm	
length	415
height	85
width	40

Матеріал, захищений авторським правом

ны на кафедре нейрохирургии ХМИ под руководством проф. Сипитого В. И.

Криозонд КМ-16 отличается от аналогов повышенной автономностью, удобством обслуживания, простотой конструкции. Практически неограниченная длительность криовоздействия обеспечена сменой ампул с жидким азотом, а относительно малый диаметр криозонда (2 мм) уменьшает травматизацию окружающих структур, обеспечивает замораживание патологической ткани диаметром до 3 см. Конструкция ампул с жидким азотом позволяет отклонять их в процессе операции на 90° от вертикали, что значительно увеличивает возможность манипулировать инструментом, а также регулировать объем разрушаемой ткани и немедленно прекращать криовоздействие при появлении симптомов поражения окружающих структур.

Для криовоздействия на патологически измененные ткани полости носа, рта, глотки. гортани, уха при прямой ларингоскопии в процессе лечения больных, страдающих сосудистыми и кожными новообразованиями наружного слухового прохода и барабанной полости, новообразованиями мягкого неба, сосудистыми новообразованиями полости носа, вазомоторным ринитом, разработан криоаппликатор КМ-22 [8].

Технические характеристики криоаппликатора КМ-22

Хладагент	жидкий азот
Температура охлаждающего наконечника, °С	−160
Время работы криоаппликатора в одном цикле, мин	5
Диаметр канюли, мм	2
Длина канюли, мм	130
Масса криоаппликатора, кг	0,3
Габаритные размеры, мм	415×40×85

Криоаппликатор КМ-22 (рис. 6) содержит теплоизолированную канюлю с охлаждающим нако-

Clinical and experimental trials, as well as elaboration of methodical recommendations have been carried-out at the Chair of neurosurgery in Kharkov Medical University under the leadership of Professor Sipityy V. I.

CM-16 cryoprobe differs on the analogues with an increased autonomous characteristics, suitability in the usage, simple design. Practically non-limited cryoeffect duration is provided by the change of ampoules with liquid nitrogen, and relatively small cryoprobe diameter (2 mm) decreases traumatization of surrounding structures, provides freezing of pathological tissue to 3 cm diameter. Design of ampoules with liquid nitrogen allows to decline them by 90° from vertical during operation, that significantly increases opportunity to manipulate by the instrument, as well as regulate the volume of damaged tissue and immediately stop cryoeffect in the case of the symptoms appearance of the injury in surrounding structures.

CM-22 cryoapplicator [8] has been elaborated for the cryoeffect on pathologically changed tissues of nasal, mouth, gullet, larynx, ear cavities under direct laryngoscopy during the treatment of patients with vascular and skin diseases of external acoustic meatus and tympanic cavity, neoplasms of soft palate, vasomotor rhinitis.

Technical characteristics of CM-22 cryoapplicator

Coolant	liquid nitrogen
Temperature of cooling tip, °C	−160
Duration of the work of cryoapplicator in one cycle, min	5
Diameter of canullla, mm	2
Length of canullla, mm	130
Mass of cryoapplicator, kg	0.3
Overall dimensions, mm	415×40×85

Cryoapplicator (Fig. 6) comprises heat-isolated canulla with cooling tip, accessory ampoules with liquid nitrogen, safety valves, control lever.

Clinical trials of given cryoapplicator have been carried-out at the Department of ear, throat and nose diseases of Moscow medical Stomatological Institute named by N. A. Semashko, Moscow children clinics named by Rusakov, University of people friendship named by Patris Lumumba, Chair of otorhinolaryngology of the Kharkov Institute for Advanced Training of Physicians.

In the result of clinical trials it was established, that cryoapplicator is simple in usage, reliable, provides good vision of operational field and can be ap-

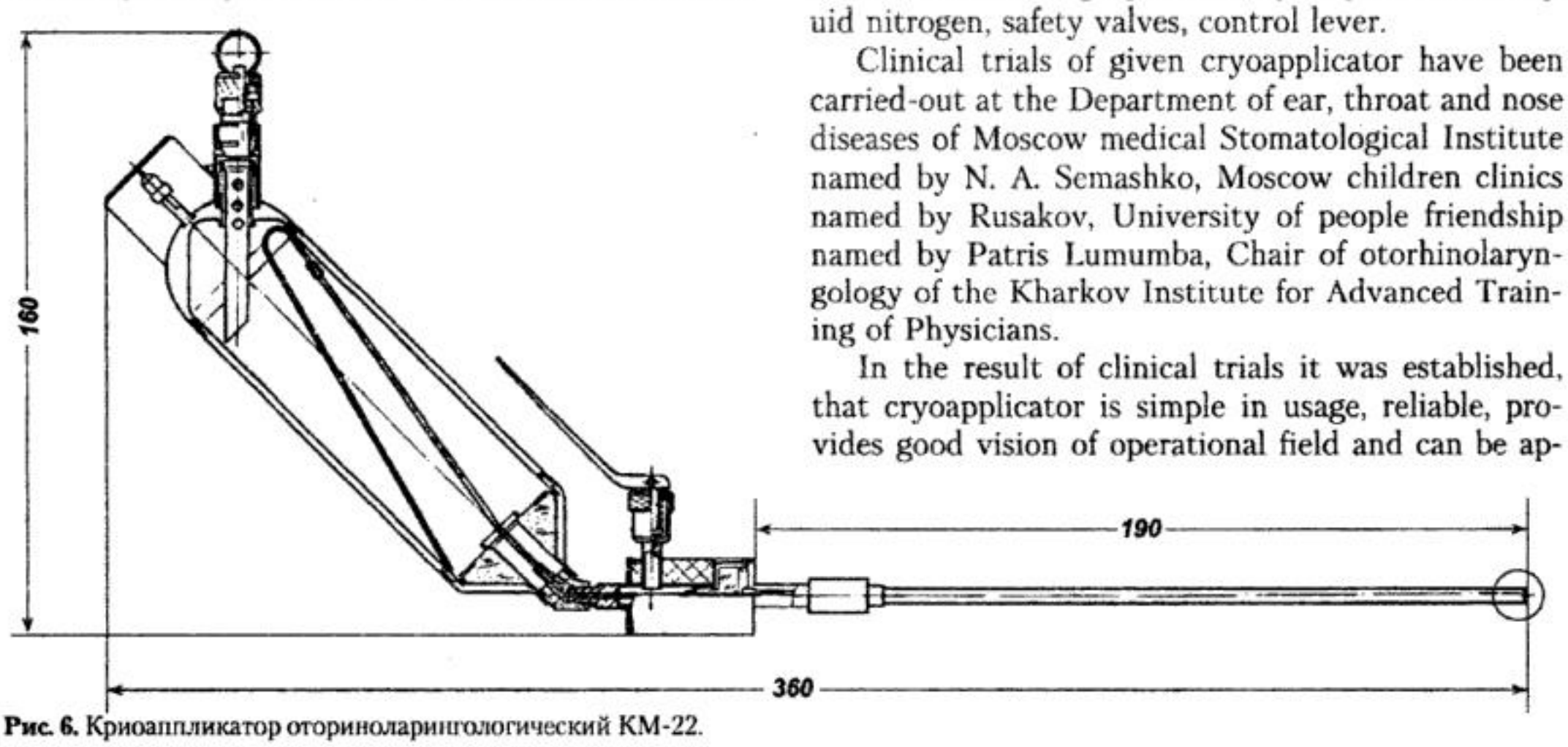


Рис. 6. Криоаппликатор оториноларингологический КМ-22.

Fig. 6. CM-22 otorhinolaryngological cryoapplicator.

Матеріал, захищений авторським правом

нечником, сменные ампулы с жидким азотом, предохранительные клапаны, рычаг управления.

Клинические испытания криоаппликатора проведены в отделении болезней уха, горла, носа Московского медицинского стоматологического института им. Н. А. Семашко, Московской детской клинике им. Русакова, Университете дружбы народов им. Патриса Лумумбы, на кафедре оториноларингологии Харьковского института усовершенствования врачей.

В результате клинических испытаний установлено, что криоаппликатор прост в эксплуатации, надежен, обеспечивает хороший обзор операционного поля и его можно применять как в стационарах, так и в амбулаторных условиях.

Для выполнения криогенным методом таких операций в области глазного яблока, как криоэкстракция катаракты, криопексия при отслойке сетчатки, криоциклотермия при различных формах глаукомы, извлечение инородных тел из глаза, трансвитреальная криохирургия сетчатой и сосудистой оболочек глаза, криоаппликация при заболеваниях роговой оболочки, конъюктивы, была разработана универсальная криоофтальмологическая установка УМ-14 [11].

Установка УМ-14 (рис. 7) содержит блок управления и измерения, пневмосистему и два баллона с криоагентом, которые смонтированы в кожухе на тележке, а также комплект сменных криоинструментов (рис. 8).

В установке УМ-14 предусмотрены: ножное переключение охлаждения и отогрева; возможность расположения наконечника в нужном положении по отношению к биологическим тканям; стабильность, воспроизводимость, возможность измерения и регулирования температур в диапазоне от комнатной до –85 °С.

Технические характеристики установки УМ-14

Криоагент	закись азота
Рабочее давление, МПа	4,3
Диапазон регулируемых температур, °С	0 ÷ –85
Время выхода на режим охлаждения, с	3
Время отогрева наконечника, с	5
Габаритные размеры, мм	505×530×1 240
Масса установки (с баллонами), кг	63

Клинические испытания установки УМ-14 проведены в Московском НИИ глазных болезней им. Гельмгольца, на кафедре глазных болезней Московского медицинского института им. Н. И. Пирогова, на кафедре Харьковского института усовершенствования врачей, в клинике глазных болезней им. Гиршмана (г. Харьков). В результате клинических испытаний установлено, что при проведении операций установка обеспечивает комфортные условия как для хирурга, так и для обслуживающего персонала, проста в обслуживании и безопасна в работе.

plied both in stationary clinics and under ambulatory conditions.

Universal cryoophthalmological device UM-14 [11] was elaborated for carrying-out such operations by means of cryogenic method in the region of eyeball such as cryopexy at retina exfoliation, cryocyclothermia at various glaucoma forms, taking-off the foreign substances from an eye, transvitreal cryosurgery of retinal and vascular eye membranes, cryoapplication at cornea diseases, conjunctive etc.

UM-14 device (Fig. 7) comprises control and measuring desks, pneumosystem and two containers with cryoagent, assembled in housing on a track, as well as the set of accessory cryoinstruments (Fig. 8). In the UM-14 device such pints are foreseen: foot switching of cooling and warming, possibility of the tip location in necessary conditions in respect of biological tissues, stability, capability of reproduction, opportunity of temperatures measuring and regulation in the temperature range from room one to –85 °C.

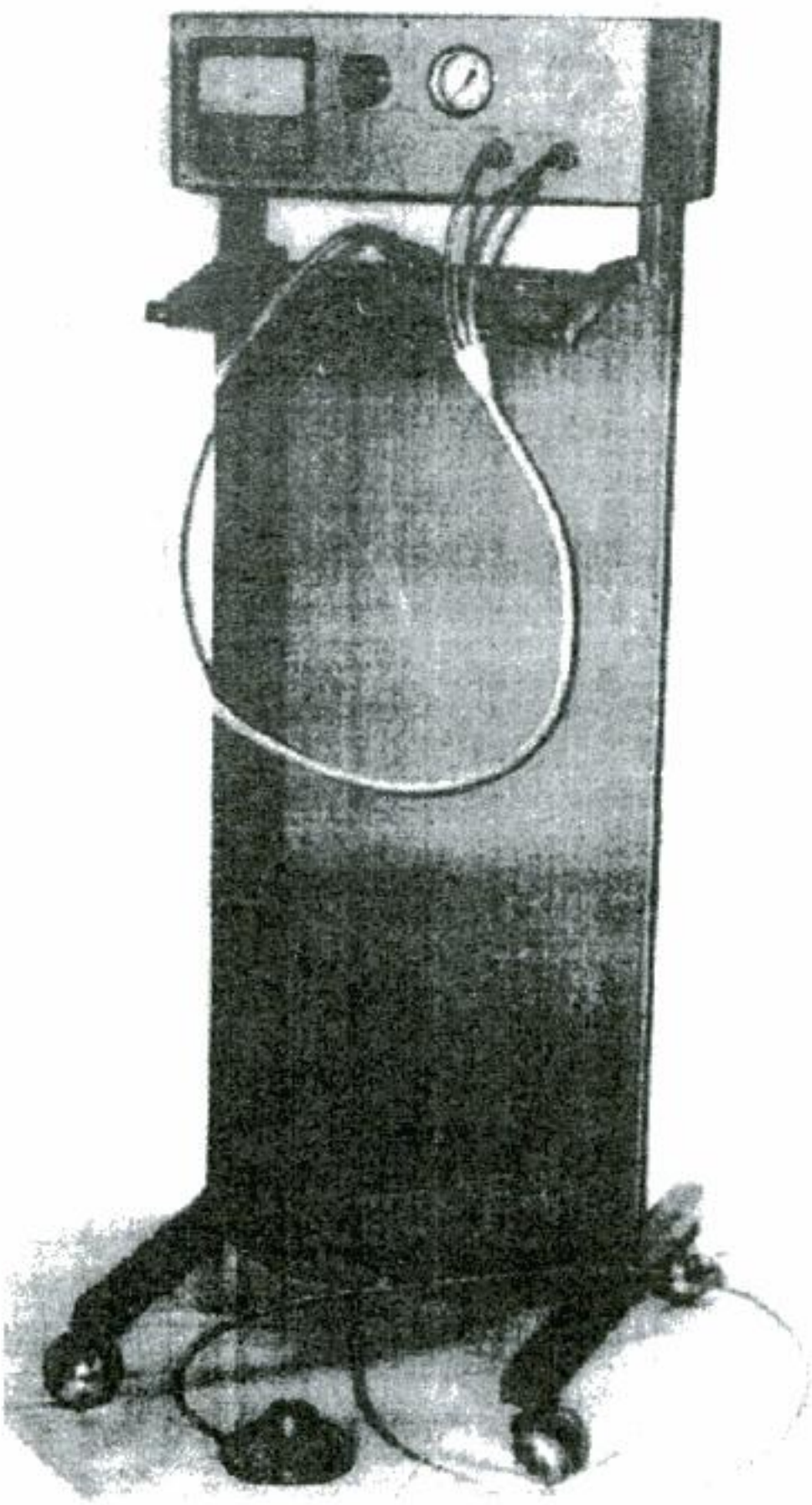


Рис. 7. Криоофтальмологическая установка УМ-14.

Fig. 7. UM-14 Cryoophthalmological device.

Матеріал, захищений авторським правом

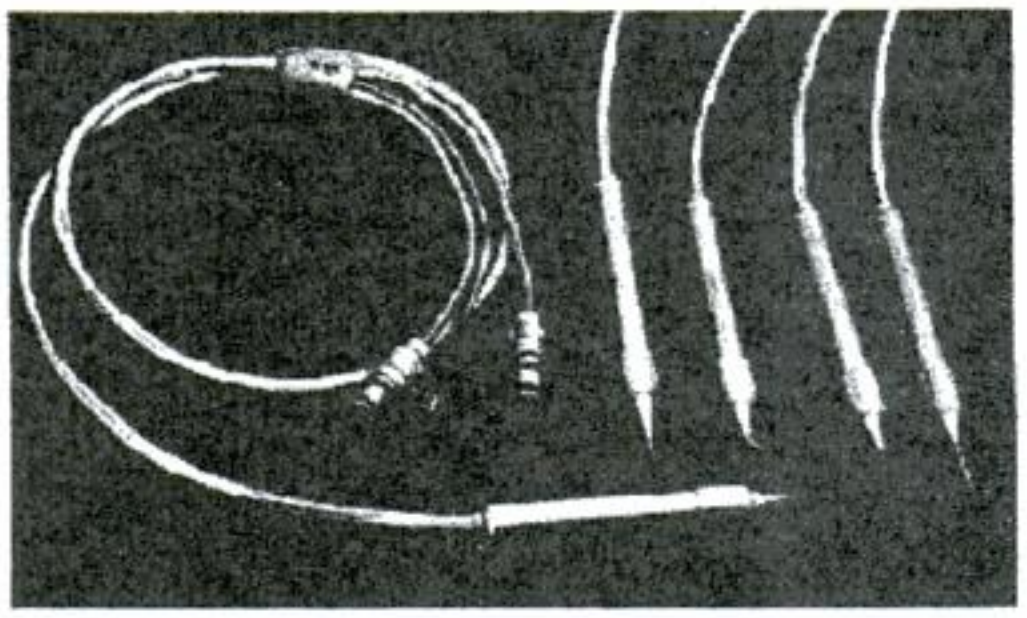


Рис. 8. Комплект криоинструментов для установки УМ-14.

Fig. 8. UM-14 Cryoinstruments set for UM-14 device.

Таким образом, применение описанной аппаратуры для низкотемпературного воздействия в медицине показало ее высокую эффективность в лечении различных заболеваний и необходимость более широкого внедрения в клиническую практику.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Веркин Б. И., Грищенко В. И., Муринец-Маркевич Б. Н. и др.* Криогенная техника в гинекологической практике // Мед. техника.– 1978.– № 2.– С. 29–32.
2. *Веркин Б. И., Никитин В. А., Божко К. В и др.* Низкие температуры в стоматологии.– Киев: Наук. думка, 1990.– 250 с.
3. *Веркин Б. И., Задорожный Б. А., Гень С. П. и др.* Аппликатор для криохирургии в дерматологии // Мед. техника.– 1976.– № 3.– С. 41–42.
4. *Веркин Б. И., Сипитый В. И., Муринец-Маркевич Б. Н. и др.* Автономный нейрохирургический криозонд // Мед. техника.– 1977.– № 1.– С. 28–30.
5. *Грищенко В. И.* Криотерапия и криохирургия в акушерстве и гинекологии.– М.: Медицина, 1974.– 28 с.
6. *Задорожный Б. А.* Криохирургия в дерматологии.– Киев: Здоров'я, 1985.– 68 с.
7. *Кандель Э. И.* Криохирургия.– М.: Медицина, 1974.– 304 с.
8. *Московченко Н. А., Муринец-Маркевич Б. Н., Журавлев А. С. и др.* Криогенный ЛОР аппликатор // Мед. техника.– 1981.– № 5.– С. 58–59.
9. *Практическая криомедицина / Под ред. В. И. Грищенко, Б. П. Сандомирского.– Киев: Здоров'я, 1987.– 248 с.*
10. *Терновой К. С., Гассанов Л. Г.* Низкие температуры в медицине.– Киев: Наук. думка, 1988.– 280 с.
11. *Чередниченко В. М., Муринец-Маркевич Б. Н., Бездетко П. А. и др.* Новый офтальмологический криоаппарат и опыт его применения // Вестник офтальмологии.– 1982.– № 5.– С. 52–54.

Поступила 02.03.2001

Technical characteristics of UM-14 device

Cryoagent	nitrogen oxide
Working pressure, MPa	4.3
The range of regulated temperatures, °C	0 ÷ –85
Time of the beginning of cooling regimen, s	3
Duration of the tip warming, s	5
Overall dimensions, mm	505×530×1 240
Mass of the device (with containers), kg	63

Clinical trials of UM-14 device have been carried-out at the Moscow R&D Institute for Eye Diseases named by Helmholtz, at the Chair of Eye Diseases in the Moscow Medical Institute named by N. I. Pirogov, at the Chair of Ophthalmology in Kharkov Institute for Physicians Advance Training, in the clinics of eye diseases named by Girshman (Kharkov). In the result of clinical trials it has been established, that when conducting operations the device provides convenient conditions both for surgeon and personnel, is simple for the usage and safe when operating.

Thus, application of the described above apparatuses for low-temperature effect in medicine showed its high efficiency when treating various diseases and necessity of more widespread application into clinical practice.

REFERENCES

1. *Verkin B. I., Grischenko V. I., Murinets-Markevich B. N. et al.* Cryogenic techniques in gynecological practice // Medical techniques.– 1978.– № 2.– P. 29–32.
2. *Verkin B. I., Nikitin V. A., Bozhko K. V. et al.* Low temperatures in stomatology.– Kiev: Naukova dumka, 1990.– 250 p.
3. *Verkin B. I., Zadorozhnyy B. A., Gen' S. P.* Applicator for cryosurgery in dermatology // Medical techniques.– 1976.– № 3.– P. 41–42.
4. *Verkin B. I., Sipityy V. I., Murinets-Markevich B. N. et al.* Autonomous neurosurgical cryoprobe // Medical techniques.– 1997.– № 1.– P. 28–30.
5. *Grischenko V. I.* Cryotherapy and cryosurgery in obstetrics and gynecology.– M.: Meditsina, 1974.– 28 p.
6. *Zadorozhnyy B. A.* Cryosurgery in dermatology.– Kiev: Zdorov'ya, 1985.– 68 p.
7. *Kendel E. I.* Cryosurgery.– M.: Meditsina, 1974.– 304 p.
8. *Moskovchenko N. A., Murinets-Markevich B. N., Zhuravlev A.S. et al.* Cryogenic applicator for otorhinolaryngological organs // Medical techniques.– 1981.– № 5.– P. 58–59.
9. *Practical* cryomedicine / Ed. by V. I. Grischenko, B. P. Sandomirsky.– Kiev: Zdorov'ya, 1987.– 248 p.
10. *Ternovoy K. S., Gassanov L. G.* Low temperatures in medicine.– Kiev: Naukova dumka, 1988.– 280 p.
11. *Cherednichenko V. M., Murinets-Markevich B. N., Bezdetko P.A. et al.* New ophthalmological cryoapparatus and experience of its application // Review of ophthalmology.– 1982.– № 5.– P. 52–54.

Accepted in 02.03.2001

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 618.11-002-097: 611.013.84: 57.043

UDC 618.11-002-097: 611.013.84: 57.043

Изменение функциональной активности лимфоцитов у больных подострым сальпингоофоритом после трансплантации криоконсервированной хориальной ткани

В. А. ПИТЬКО

Харьковский государственный медицинский университет

Changes in Functional Activity of Lymphocytes of Patients with Subacute Salpingooophoritis after Transplantation of Cryopreserved Chorial Tissue

V. A. PITKO

Kharkov State Medical University

Проведенные исследования позволили установить, что под влиянием комплексного лечения с использованием криоконсервированной хориальной ткани (КХТ) у больных подострым сальпингоофоритом наблюдается улучшение как клинических, так и лабораторных показателей. Однонаправленность этих изменений связана с нормализацией деятельности основных систем организма, в том числе и функциональной активности лимфоцитов. Использование определения иммунологических показателей в процессе лечения (функциональной активности лимфоцитов периферической крови) способствует объективной оценке эффективности проводимой терапии.

Проведені дослідження дозволили встановити, що під впливом комплексного лікування з використанням кріоконсервованої хоріальної тканини (КХТ) у хворих підгострим сальпінгоофоритом спостерігається покращення як клінічних, так і лабораторних показників. Однонаправленість цих змін пов'язана з нормалізацією діяльності основних систем організму, у тому числі і функціональної активності лімфоцитів. Визначення імунологічних показників у процесі лікування (функціональної активності лімфоцитів периферичної крові) сприяє об'єктивній оцінці ефективності терапії, яка проводиться.

Carried-out investigations allowed to establish that under the effect of complex treatment using cryopreserved chorial tissue (CChT) in patients with subacute salpingooophoritis there was an improvement of both clinical and laboratory indices. Single direction of these changes is related to the normalisation of the activity of main organism systems, in particular functional activity of lymphocytes. Usage of determination of immunological indices in the treatment process (functional activity of lymphocytes of peripheric blood) contributes to an objective estimation of the efficiency of the therapy being conducted.

В структуре гинекологических заболеваний одно из главных мест занимает воспаление придатков матки [2]. Воспалительные заболевания придатков матки часто протекают подостро, без яркой клинической картины, имеют стертые, малосимптомные формы.

Многие авторы считают, что одной из причин подострого течения сальпингоофоритов и недостаточной эффективности противовоспалительной терапии является снижение иммунологической реактивности организма [1].

В последние годы резко возрос интерес к иммунорегулирующей терапии воспалительных процессов [3]. Поэтому не случайно средства, направленные на повышение неспецифической резистентности организма, прежде относившиеся к вспомогательным, в настоящее время могут рассматриваться как важные в системе профилактики и терапии большинства воспалительных процессов в придатках матки. Перспективным в этом отношении может стать биопрепарат КХТ, получаемый из хориона человека 8–10 нед. гестации [6].

Было показано [4], что иммунный статус больных подострым сальпингоофоритом характеризу-

In the structure of gynaecological diseases one of the main places is taken by uterus appendages inflammation [2]. Inflammatory diseases of uterus appendages often have subacute course without vivid clinical picture and have obliterated, slightly symptomatic forms.

Many authors believe that one of the causes of subacute course of salpingooophoritis and slight insufficiency of anti-inflammatory therapy is the reduction of immunological reactivity of an organism [1].

Recently the interest to immune regulating therapy of inflammatory processes has increased [3]. Therefore it is not accidental that the means directed to a rise of non-specific resistance of an organism, earlier referred to auxiliary ones today can be referred as important in the system of preventive measures and therapy of the majority of inflammatory processes in uterus appendages. The biopreparation of CChT, derived from human chorion of 8–10 weeks of gestation can become perspective in this respect [6].

We have shown [4] that immune status of patients with subacute salpingooophoritis is characterised by the decrease in activity of indices of cellular immunity and increase of the activity of humoral factors of pro-

Матеріал, захищений авторським правом

ется снижением активности показателей клеточного иммунитета и повышением активности гуморальных факторов защиты, что может быть связано с изменением иммунологической компетентности лимфоцитов. В связи с этим целесообразно изучить влияние трансплантации КХТ на функциональную активность лимфоцитов.

Проведено клинико-иммунологическое обследование 51 больной подострым сальпингоофоритом с длительностью заболевания от 4-х месяцев до 4-х лет и 30 здоровых женщин (контрольная группа).

Контрольную группу составили соматически здоровые женщины в возрасте 25,2 ± 0,9 лет, в анамнезе которых отсутствовали гинекологические заболевания.

Женщин с подострым сальпингоофоритом разделили на 2 группы (основные), которые были сопоставимы по возрасту (средний возраст больных 25,9 ± 0,7 лет), клиническим проявлениям и длительности заболевания.

Первую группу составили пациенты (31 женщина), получавшие этиотропную антибактериальную терапию с учетом максимальной терапевтической разовой и суточной дозы с обязательным приемом нистатина или леворина в среднетерапевтических дозах. Проводились медикаментозная детоксикация; витаминотерапия B_1, E, C; вводились биостимуляторы — ФиБС, плазмол, стекловидное тело, а также седативные, антигистаминные средства. Пациенты принимали физиотерапевтические процедуры.

Больным 2-й группы (20 женщин) в комплексе с традиционной терапией (ТТ) произведена трансплантация КХТ, ее образцы были получены из Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины. Образец (1×1 см) размораживали в условиях операционной и трансплантировали в верхний наружный квадрант ягодицы.

Иммунологические показатели определяли до и после окончания лечения. Основным критерием оценки состояния иммунного статуса была выбрана реакция бластрансформации лимфоцитов (РБТЛ) периферической крови в ответ на митогены фитогемаглютинин (ФГА), конканавалин (Кон А), митоген лаконоса (PWM).

Функциональную активность лимфоцитов в данной реакции оценивали радиометрическим методом [8] и выражали в импульсах в минуту. Интегральным показателем был индекс стимуляции (ИС), который определяли как отношение активности включенного изотопа в культурах с митогеном к соответствующим величинам в контрольных культурах (со средой).

Статистическую обработку полученных результатов проводили по критерию Стьюдента–Фишера.

Чаще всего больные жаловались на боли в гипогастральной, паховой областях, которые иррадиировали в область крестца. Наблюдались ухудшение общего состояния, нарушение менструальной,

tection, that can be related to immunological competence of lymphocytes. In this connection it was considered as expedient to investigate the effect of transplantation of CChT on functional activity of lymphocytes.

Clinical and immunological monitoring was carried out in 51 patients with subacute sulpingooophoritis with the duration of disease from 4 months to 4 years and in 30 healthy women (control group).

The control group comprised somatically healthy women within the age range of 25.2 ± 0.9 years, in whose anamnesis no gynaecological diseases were found.

Women with subacute salpingooophoritis were divided into 2 groups (main) which were comparable by age (an average age of patients was 25.9 ± 0.7 years), clinical manifestations and duration of the disease.

The first group comprised patients (31 women) with etiotropic antibacterial therapy taking into account maximum therapeutic single and daily dose with obligatory taking of nystatin and levorinum in average therapeutic doses. Medicinal detoxication, vitamin therapy with B_1, E, C was carried out; biostimulators — FiBS, plasmol, vitreous body, as well as sedative, antihistamine means were introduced. Patients took physiotherapeutic procedures.

For the patients of the 2nd group (20 women) in the complex with traditional therapy (TT) the transplantation of CChT was done, its samples were obtained at the Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine. The sample (1×1 cm) was thawed and under operational room conditions transplanted to an upper outer quadrant of the buttocks. Immunological indices were determined before and after finishing of the treatment. As the main criterion of the assessment of immune status state the reaction of blasttransformation of lymphocytes (RBTL) of peripheric blood in response to mitogens of phytohemagglutinin (PhGA), concanavalin (Con A), mitogen of laconosa (PWM) was chosen. Functional activity of lymphocytes in this reaction was estimated by radiometric method [8] and expressed in the impulses per minute. Integral index was the stimulation index (SI), which was defined as the ratio of the activity of included isotope in cultures with mitogen to corresponding values in the control cultures (with the medium).

Statistical processing of the obtained results was performed on the criterion of Student–Fisher.

Main complaints were the pains in hypogastral, inguinal region, which irradiated to sacrum region. We observed the aggravation of general state, impairment of menstrual, reproductive functions, pathological secretions.

Results of the carried out treatment showed that in patients with subacute salpingooophoritis with CChT in complex treatment their general state improved more rapidly and body temperature as well as blood indices normalised, the pains in the abdomen

Матеріал, захищений авторським правом

репродуктивной функций, патологические выделения.

Результаты проведенного лечения показали, что у больных подострым сальпингоофоритом, которые получали в комплексном лечении КХТ, быстрее, чем у больных, получавших традиционное лечение, улучшалось общее состояние, нормализовались температура тела, показатели крови, исчезали боли внизу живота.

Продолжительность пребывания в стационаре больных, которые получали лечение с использованием КХТ, составила $16{,}01 \pm 0{,}71$ койко-день ($P < 0{,}05$), при лечении традиционными методами — $18{,}61 \pm 0{,}89$.

Как следует из приведенных в таблице данных иммунологических исследований, у больных подострым сальпингоофоритом, по сравнению с женщинами контрольной группы, отмечалось достоверное повышение спонтанной РБТЛ, что характеризует постоянное "раздражение" (стимуляцию) лимфоцитов либо каким-то инфекционным началом, либо формируемыми при его экспансии аутоантигенами [7].

Наряду с этим лимфоциты больных снижали ответ на митоген. В частности, ответ на ФГА снижался более чем на 47,6%. Считается, что ответ на ФГА имеет высокую степень корреляции с соотношением субпопуляций СД4:СД8 клеток и абсолютным содержанием СД4 клеток [10]. Т-лимфоциты, отвечающие на ФГА, являются преимущественно

bottom disappeared in comparison with those patients having traditional treatment.

The duration of in-patient staying for the patients with CChT treatment made 16.01 ± 0.71 days ($P < 0.05$) and for those treated by traditional methods it was 18.61 ± 0.89.

The table data of immunological studies show that in patients with subacute salpingooophoritis in comparison with women of the control group there was statistically true increase of spontaneous RBTL, that characterises a constant "irritation" (stimulation) of lymphocytes either by some infectional agent, or formed autoantigens during its expansion [7].

Along with this lymphocytes reduced the response to mitogen. In particular, response to PhGA decreased more than by 47.6%. There is a notion, that the response to PhGA has a high degree of correlation with the ratio of subpopulations of CD4:CD8 cells and absolute content of CD4 cells [10]. T-lymphocytes, responding to PhGA, are mainly $CD4^+$ antigen-recognising helpers-cells [9]. So, the reduction of the response of peripheric blood lymphocytes to PhGA reflects the decrease of functional status, first of all of the helpers-cells. Concavalin A represents the mitogen, to which T-cells of different maturation degree respond [5]. More manifested in comparison with PhGA (49.5% and 47.6%) inhibition of response of patients' lymphocytes to this mitogen is quite explainable, because a total functional state of both mature (the example with PhGA) and less differentiated (in-

Показатели функциональной активности лимфоцитов в РБТЛ больных подострым сальпингоофоритом до и после применения различных методов лечения

Indices of functional activity of lymphocytes in RBTL of patients with subacute salpingooophoritis before and after application of different treatment methods

Показатели Indices		Здоровые женщины Healthy women	Больные до лечения* Patients before treatment*	СОП, % DD, %	Группа 1 (ТТ) Group 1 (TT)		Группа 2 (КХТ) Group 2 (CChT)	
					После лечения After treatment	СОП, % DD, %	После лечения After treatment	СОП, % DD, %
Спонтаннаяя РБТЛ Spontaneous RBTL		305,11 ± 29,09	417,75 ± 35,74[1]	+36,95	390,65 ± 39,71	+28,04	348,81 ± 31,02	+11,4
ФГА PhGA	Абсолютные величины Absolute values	7 500,11 ± 300,43	5 346,56 ± 262,64[1]		4 570,6 ± 310,6[1]		19 239,67 ± 1594,34[1]	
	ИС / SI	24,41 ± 2,39	12,81 ± 1,43[1]	−47,6	11,73 ± 1,62[1]	−51,9	55,15 ± 6,61[1,2,3]	+125,9
Кон А Con A	Абсолютные величины Absolute values	12 085,44 ± 1 400,70	8 233,12 ± 792,76[1]		7 368,89 ± 721,41[1]		16 512,89 ± 1 416,23[2,3]	
	ИС / SI	39,61 ± 2,84	20,02 ± 1,99[1]	−49,5	18,82 ± 1,12[1]	−52,4	47,34 ± 5,23[2,3]	+19,6
PWM	Абсолютные величины Absolute values	5 275,93 ± 583,24	4 808,56 ± 318,11		5 203,48 ± 518,61		9 866,98 ± 789,54[1,2,3]	
	ИС / SI	17,29 ± 1,94	11,51 ± 1,05[1]	−33,5	12,97 ± 1,17	−25	28,28 ± 2,75[1,2,3]	+63,1

Примечания. * — усредненный показатель всех групп; СОП — степень отклонения показателя от нормы (здоровые женщины); ИС — индекс стимуляции (отношение абсолютного показателя к спонтанной РБТЛ); [1]($P < 0{,}05$) — достоверность различия показателей по отношению к здоровым женщинам; [2]($P < 0{,}05$) — достоверность различия показателей в группах до и после лечения; [3]($P < 0{,}05$) — достоверность различия показателей между ТТ и после применения КХТ.

Notes. * — an average index for all groups; DD — deviation degree as for the norm (healthy women); SI — stimulation index; [1]($P < 0.05$) — statistically significant difference of indices in respect of healthy women; [2]($P < 0.05$) — statistically significant difference of indices in the groups before and after treatment; [3]($P < 0.05$) — statistically significant difference of indices between TT and after CChT application

Матеріал, захищений авторським правом

СД4$^+$ антигенраспознающими клетками-хелперами [9]. Следовательно, снижение ответа лимфоцитов периферической крови на ФГА отражает снижение функционального статуса, прежде всего клеток-хелперов. Кон А представляет собой митоген, на который отвечают Т-клетки различной степени зрелости [5]. Вполне объяснима более выраженная, в сравнении с ФГА (49,5% и 47,6%), ингибиция ответа лимфоцитов больных на данный митоген, поскольку снижается суммарное функциональное состояние как зрелых (пример с ФГА), так и менее дифференцированных (повышение концентрации 0-клеток; данные не представлены) элементов. Ответ на митоген PWM также достоверно снижается (ИС снизился в 1,49 раз; $P < 0,05$), свидетельствуя об ингибиции функциональной активности клеток. Такого рода изменения указывают на нарушение функциональной активности лимфоцитов, играющих ведущую роль в реализации реакций клеточного и гуморального иммунитета и на необходимость коррекции их состояния теми или иными методами.

Проведенная нами традиционная терапия больных подострым сальпингоофоритом существенно не снижала спонтанную РБТЛ, что, видимо, можно рассматривать как сохранение дополнительной антигенной нагрузки на лимфоциты в условиях имеющегося в организме воспалительного процесса. После традиционного лечения сохранялась ингибиция ответа Т- и В-клеток на неспецифические лектины, в результате чего иммунная система данной группы больных оставалась на достоверно более низком уровне в сравнении с контролем (здоровые женщины).

Лечение с применением КХТ позволило стабилизировать спонтанную РБТЛ, доводя бластрансформирующую активность лимфоцитов до уровня контроля (348,81 ± 31,02 и 305,11 ± 20,09; $P > 0,05$). На этом фоне прослеживалась значительная стимуляция ответа лимфоцитов на все выбранные митогены. Наиболее выраженной была стимуляция Т-клеток на ФГА, в меньшей степени, но как и на ФГА выше контроля, отвечали клетки на Кон А. Как указывалось в [9], на митогенный стимул отвечают антигенреактивные Т-хелперы: зрелые на ФГА и вместе с ними менее зрелые на Кон А. Следовательно, КХТ в организме больных подострым сальпингоофоритом не только способствует интенсификации процесса восстановления функции фракций со сниженной активностью, но, по-видимому, вовлекает в "сверхответ" клетки с исходным нормальным функциональным статусом. Это свидетельствует о том, что степень стимуляции функциональной активности Т-клеток под влиянием КХТ явно превышает степень стимуляции экспрессии маркеров этих клеток. Этот тезис подтверждается и оценкой ответа В-клеток на PWM, функциональная активность этих клеток в РБТЛ повышалась почти в полтора раза по сравнению с

crease of the concentration of 0-cells, results are not given) elements decreases. The response to PWM mitogen also decreases statistically true (SI reduced in 1.49 times, $P < 0.05$), testifying to the inhibition of functional activity of cells. Such changes point to the impairment of functional activity of lymphocytes, playing the leading role in the realization of cellular and humoral immunity and to the necessity of their state correction by other methods.

Conducted by us traditional therapy of patients with subacute salpingooophoritis considerably did not reduce spontaneous RBTL, that probably can be considered as the keeping of additional antigen loading to lymphocytes under conditions of being in an organism inflammatory process. After traditional treatment the inhibition of the response of T- and B-cells to specific lectines kept, in the result of this immune system of given group of patients remained at statistically true low level in comparison with the control (healthy women).

Treatment using CChT allowed to stabilize the spontaneous RBTL, blasttransforming activity of lymphocytes by approaching to the control level (348.81 ± 31.02 and 305.11 ± 20.09; $P > 0.05$). At this background we traced a significant stimulation of lymphocytes response to all selected mitogens. The most manifested stimulation was the one of T-cells to PhGA in lesser extent but as well as to PhGA was higher than the control, the cells responded to Con A. As it was mentioned earlier [9] antigenreactive T-helpers: mature to PhGA and together with them less mature ones to Con A respond to mitogen stimulus. Therefore, CChT in an organism of patients with subacute salpingooophoritis not only contributes to an intensification of the recovery process of function of the fraction with reduced activity, but also probably involves the cells with initial functional status into "super-response". This testifies to the fact that the stimulation degree of functional activity of T-cells under CChT effect obviously exceeds the stimulation degree of markers expression of these cells, this thought is confirmed by the estimation of B-cells response to PWM, functional activity of these cells in RBTL increased almost 1.5 times in comparison with the control (SI was correspondingly, 28.28 ± 2.75 and 17.29 ± 1.94; $P < 0.05$). So the CChT preparation expresses a high "interest" in stimulation of antigen-recognising function of T- and B-lymphocytes, that is functional activity, identified in RBTL.

Thus the performed investigations permitted to establish that under the effect of complex treatment using CChT in the patients with subacute salpingooophoritis the improvement of both clinical and laboratory indices were observed. The single direction of these changes is related to the normalisation of the activity of main organism systems, in particular immune system and its basic substrate, immune competent cells.

Матеріал, захищений авторським правом

контролем (ИС был соответственно 28,28 ± 2,75 и 17,29 ± 1,94; $P < 0,05$). Следовательно, препарат КХТ проявляет высокую "заинтересованность" в стимуляции антигенраспознающей функции Т- и В-лимфоцитов, то есть функциональной активности, идентифицированной в РБТЛ.

Таким образом, проведенные исследования позволили установить, что под влиянием комплексного лечения с использованием КХТ у больных подострым сальпингоофоритом наблюдается улучшение как клинических, так и лабораторных показателей. Однонаправленность этих изменений связана с нормализацией деятельности основных систем организма, в том числе иммунной системы и ее основного субстрата — иммунокомпетентных клеток.

Использование теста определения иммунологических показателей в процессе лечения (функциональной активности лимфоцитов периферической крови) способствует объективной оценке эффективности проводимой терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Аксененко В. А., Рогов В. М., Рыжов В. В.* Некоторые аспекты патогенеза воспалительных заболеваний матки и придатков // Вестник рос. ассоциации акушерства и гинекологии.– 1995.– 4.– С. 21–23.
2. *Вовк І. Б., Новік Л. М.* Захворювання, що передаються статевим шляхом // Педіатрія, акушерство та гінекологія.– 2000.– № 2.– С. 110–115.
3. *Матвеева Н. К., Лапик Т. Н., Сотникова Е. И. и др.* Применение иммунокорректоров в комплексном лечении хронических воспалительных заболеваний внутренних половых органов // Иммунопатология и клиническая иммунология.– 1995.– № 5.– С. 48–49.
4. *Питько В. А., Грищенко В. И., Суббота Н. П.* Влияние криоэкстракта хориона на состояние иммунитета у женщин с подострым сальпингоофоритом // Пробл. криобиологии.– 2000.– № 1.– С. 81–85.
5. *Ситковский М. В., Шестаков С. В., Брусованик В. И. и др.* Особая роль клеток, рецепторы которых длительно не исчезают с клеточной поверхности в трансмембранной активации лимфоцитов конкавалином А // Докл. АН СССР.– 1981.– 258, № 5.– С. 1261–1264.
6. *Суббота Н. П., Грищенко В. И., Питько В. А. и др.* Получение, хранение и применение фрагментов, суспензий и криоэкстракта хориона: Метод. рекомендации.– Харьков, 1997.– 8 с.
7. *Чеботарев В. Ф.* Современное представление о механизмах аутоимунного процесса. Аутоагрессия и проблемы иммунореабилитации при эндокринной патологии // Імунологія та алергологія.– 1998.– № 1.– С. 59–63.
8. *Шютт Х.* Реакция бласттрансформации лимфоцитов: Иммунологические методы / Под ред. Г. Фримеля.– М.: Медицина, 1987.– С. 294–308.
9. *Rappoport S., Dunn M., Parkutan K.* Immature T-lymphocytes in the perepheral blood of bone marrom transplant recipients // Transplantation.– 1983.– 36, № 6.– P. 674–680.
10. *Ueda M.* Studies on immunological reconstitution after bone marrow transplantation // J. Jusen. med. Soc.– 1984.– 93, № 1.– P. 36–45.

Поступила 12.03.2001

The usage of the test for determination of immunological indices in the treatment process (functional activity of lymphocytes of peripheric blood) contributes to an objective estimation of the efficiency of the therapy being conducted.

REFERENCES

1. *Aksenov V. A., Rogov V. M., Ryzhov V. V.* Some aspects of pathogenesis of inflammatory diseases of uterus and appendages // News of Russian Association of Obstetrics and Gynecology.– 1995.– 4.– P. 21–23.
2. *Vovk I. B., Novik L. M.* Sexually transmitted diseases // Paediatry, obstetrics and gynaecology.– 2000.– № 2.– P. 110–115.
3. *Matveyeva N. K., Lapik T. N., Sotnikova E. I. et al.* Application of immune correctors in the complex treatment of chronic inflammatory diseases of inner genital organs // Immune pathology and clinical immunology.– 1995.– № 5.– P. 48–49.
4. *Pitko V. A., Grischenko V. I., Subbota N. P.* Action of chorion cryoextraction on the immunity state of females with subacute salpingo-oophoritis // Problems of cryobiology.– 2000.–№ 1.– P. 76–80.
5. *Sitkovsly M. V., Shestakov S. V., Brusovanik V. I. et al.* Specific role of cells, the receptors of which do not disappear for a long time from cellular surface in transmembrane activation of lymphocytes by concavaline A // Reports of Academy of Sciences of the USSR.– 1981.– 258, № 5.– P. 1261–1264.
6. *Subbota N. P., Grischenko V. I., Pitko V. A. et al.* Obtaining, storage and application of fragments, suspensions and cryoextract of chorion: Methodical recommendations.– Kharkov, 1997.– 8 p.
7. *Chebotaryov V. F.* Modern notion on the mechanisms of autoimmune process. Autoagression and problems of immune rehabilitation under endocrinic pathology // Immunology and allergology.– 1998.– № 1.– P. 59–63.
8. *Shyutt Kh.* Reaction of blasttransformation of lymphocytes: Immunological methods / Ed. by G. Frimel.– M.: Meditsina, 1987.– P. 294–308.
9. *Rappoport S., Dunn M., Parkutan K.* Immature T-lymphocytes in the perepheral blood of bone marrow transplant recipients // Transplantation.– 1983.– 36, № 6.– P. 674–680.
10. *Ueda M.* Studies on immunological reconstitution after bone marrow transplantation // J. Jusen. Med. Soc.– 1984.– 93, № 1.– P. 36–45.

Accepted in 12.03.2001

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 616-089.843: 615.361.013.014.413: 616-003.93.08

Влияние трансплантации криоконсервированных мезенхимальных клеток эмбрионов человека на процессы регенерации при травматическом повреждении суставного хряща крыс

В. И. ГРИЩЕНКО, А. Ю. ПЕТРЕНКО, А. И. ЖИГУН, А. Н. СУКАЧ, Е. Б. РЕВЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Согласно современным представлениям восстановление хрящевой ткани в значительной степени зависит от наличия и активности стволовых клеток-предшественников, способных к самообновлению и дифференцировке в зрелые клетки. При этом единая стволовая мезодермальная клетка является предшественницей фибробластов, адипоцитов, остеоцитов, хондроцитов и ретикулоцитов [1]. В чрезвычайно малых количествах эти стволовые клетки присутствуют во всех костных структурах. Показано, что при старении, а также при таких "возрастных" заболеваниях, как остеопороз и остеоартрит количество мезодермальных или остеогенных стволовых клеток сохраняется, однако их пролиферативная активность и ростовой потенциал резко снижаются [2]. Трансплантация аллогенных стволовых клеток оказывает кратковременный стимулирующий эффект на регенерацию костной и хрящевой тканей из-за развития иммунного ответа и последующего быстрого отторжения трансплантата.

Перспективным методом репарации хрящевых дефектов может быть трансплантация мезенхимальных клеток из эмбриональных тканей, которые являются наиболее богатым источником стволовых клеток и характеризуются низкой иммуногенностью, а также высокой пластичностью и пролиферативной активностью [3]. Цель настоящей работы – изучение влияния криоконсервированной суспензии мезенхимальных клеток, полученных из эмбрионов человека 5–7 недель гестации, на регенерацию суставного хряща крыс после травматического повреждения.

Эксперимент проведен на 12- и 3-месячных белых крысах линии Вистар, которым под общим тиопенталовым наркозом, не вскрывая коленный сустав, было произведено травматическое повреждение суставного хряща в области латерального мыщелка дистального отдела бедренной кости. Повреждение наносили специальным иглопробойником (диаметр 2 мм) на глубину 2 мм. После этого инъекционной иглой в полость сустава вводили $3–5 \cdot 10^6$ криоконсервированных мезенхимальных клеток эмбрионов человека. Животным контрольной группы вводили равный объем среды, используемой для криоконсервирования.

Мезенхимальные клетки получали путем мягкой дезагрегации эмбрионов человека 5–7 недель гестации на одиночные клетки. Криоконсервирование суспензии выполняли с 5%-м диметилсульфоксидом по 3-этапной программе замораживания до –196 °С. Образцы хранили в жидком азоте криобанка ИПКиК НАНУ, отогревали непосредственно перед экспериментом. Жизнеспособность клеток после деконсервации составляла не менее 50%.

Крысы были выведены из опыта на 7- и 14-е сутки передозировкой эфира. Материалом для анализа служили коленные сус-

UDC 616-089.843: 615.361.013.014.413: 616-003.93.08

Transplantation Effect of Human Embryo Cryopreserved Mesenhymal Cells on the Regeneration Processes at a Traumatic Damage of Rat's Articular Cartilage

V. I. GRISCHENKO, A. Yu. PETRENKO, A. I. ZHIGUN, A. N. SUKACH, E. B. REVENKO

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

According to current notions, the recovery of cartilaginous tissue in a considerable extent depends on the presence and activity of stem cells-progenitors, capable to the self-renewal and differentiation into mature cells. Thereat the general stem mesodermal cell is the progenitor of fibroblasts, adipocytes, osteocytes, chondrocytes and reticulocytes [1]. These stem cells are present in all osteal structures in the extremely small quantities. It was shown, that during ageing as well as at such "age" diseases as osteoporosis and osteoarthritis the number of mesodermal or osteogenic stem cells remained, however their proliferative activity and growth potential sharply decreased [2]. The transplantation of allogenic stem cells causes a short-term stimulating effect on the regeneration of osteal and cartilaginous tissue due to the development of immune response and the following rapid rejection of a transplant.

The perspective method of cartilaginous defect reparation can be the transplantation of mesenchymal cells from embryonic tissues, which are the richest source of stem cells and are characterized by a low immunogeneity, as well as a high plasticity and proliferative activity [3]. The aim of this work was to study the effect of cryopreserved suspension of mesenchymal cells, obtained from human embryos of 5–7 gestation weeks, on the regeneration of rat's articular cartilage after traumatic damage.

The experiment was carried-out in the 12 and 3-month's Wistar line white rats, to which under general anesthesia without opening the knee joint, a traumatic damage of the articular cartilage in the area of a lateral condyle of the femur distal section was done. The injury was performed by a special needle-punch (2 mm diameter) 2 mm deep. After that using an injection needle we injected into the joint cavity $3–5 \cdot 10^6$ of cryopreserved mesenchymal cells of human embryos. We introduced to the control group's animals the equal volume of the medium, used for cryopreservation.

Mesenchymal cells were obtained by means of a soft desaggregation of human embryos of 5–7 gestation weeks for single cells. The suspension cryopreservation was accomplished with a 5% dimethyl sulfoxide by 3-stage program of freezing down to –196 °C. The samples were stored into liquid nitrogen of the cryobank of the Institute for problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, and were directly thawed before the experiment. Cell viability after freeze-thawing made not less than 50%.

Rats were removed from the experiment on the 7th and 14th days by ether overdosage. The knee joints of rats, fixed in a neutral 10% formalin, decalcified in a 5% nitric acid, dehydrated by alcohols of an increasing concentration and placed into a celloidin, served as the material for analysis. The sections of 5–7 μm thickness were

Матеріал, захищений авторським правом

тавы крыс, которые были фиксированы в нейтральном 10%-м формалине, декальцинированы в 5%-й азотной кислоте, обезвожены спиртами возрастающей концентрации и заключены в целлоидин. Срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, а также пикрофуксином по методу Ван-Гизона.

В контрольной серии экспериментов на 7-е сутки в суставном хряще мыщелка четко контурировалось углубление, которое достигало субхондральной кости. Дефект был заполнен фиброретикулярной тканью. Края хрящевой раны были округлены. В части суставного хряща, прилегающего к ране, хондроциты отсутствовали. На некотором отдалении от дефекта хондроциты были в стадии некроза и некробиоза. Окраска матрикса была неравномерной. Вблизи дефекта определялось выраженное снижение базофилии матрикса. На остальной части суставного хряща латерального и медиального мыщелков бедренной кости изменений не было выявлено.

Фиброретикулярная ткань в зоне дефекта характеризовалась невысокой плотностью малодифференцированных клеток и клеток фибробластического ряда. Проявлялись единичные более крупные и округлые клетки, которые можно было отнести к хондробластическим.

После введения в сустав крыс мезенхимальных клеток эмбрионов человека были отмечены отличительные особенности, которые касались структурной организации ткани, заполняющей дефект. В отличие от контроля фиброретикулярная ткань, расположенная в области дефекта, характеризовалась высокой плотностью округлых и крупных клеток хондробластического ряда, а также наличием межуточного вещества, которое (при окраске толуидиновым синим) давало метахромазию, что свидетельствует о накоплении гликозаминогликанов. На основании характеристики клеток и межуточного вещества фиброретикулярной ткани можно утверждать, что она приближается по строению к хондробластической ткани.

На 14-е сутки дефект у животных контрольной группы был заполнен волокнистым хрящом с небольшими участками хондроида. В суставном хряще, окружающем дефект, дистрофические нарушения хондроцитов и матрикса сохранялись. Местами выявлялись единичные небольшие изогенные группы с крупными, ярко окрашивающимися хондроцитами.

На 14-е сутки после травматического повреждения и одновременной трансплантации криоконсервированных мезенхимальных клеток эмбрионов дефект в хряще был заполнен молодой гиалиновой хрящевой тканью, которая характеризовалась наличием многочисленных крупных хондробластов и ярко окрашивающимся толуидиновым синим матриксом.

В суставном хряще вблизи дефекта выявлялись репаративные изменения, которые были связаны с нормализацией окраски матрикса, повышением плотности хондроцитов.

Проведенное экспериментальное исследование показало, что трансплантация суспензии жизнеспособных криоконсервированных мезенхимальных клеток эмбрионов человека 5–7 недель гестации одновременно с травматическим повреждением суставного хряща крыс ускоряет темпы формирования репаративной бластемы. Об этом свидетельствует более высокая плотность соединительно-тканных клеток в ткани, заполняющей дефект. Введение данного препарата также стимулирует хондрогенную дифференцировку клеток в бластеме, на что указывает формирование в более ранние сроки гиалиновой хрящевой ткани в дефекте. Механизм действия эмбриональных препаратов требует проведения глубоких фундаментальных исследований. Тем не менее представленные результаты указывают на перспективность лечения некоторых ортопедических заболеваний клеточной трансплантацией.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Репин В. С., Сухих Г. Т.* Медицинская клеточная биология.– М.: БЭБиМ, 1998.– 199 с.
2. *Oreffo R. O. C., Bord S., Triffit J. T.* Skeletal progenitor cells and ageing human population // Clin. Sci.– 1988.– № 4.– P. 549–555.
3. *Triffit J. T.* The stem cell of the osteoblast // Principles of Bone Biology / Ed. by M. Zaidi.– San Diego, 1996.– P. 39–50.

Поступило 21.03.2001

stained by hematoxylin and eosin, as well as picrofuchsin by the Van-Gison's method.

In the control series of the experiments on the 7th day in an articular cartilage of the condyle we clearly observed the contours of the recess, which reached the subchondral bone. The defect was filled by a fibroreticular tissue. The edges of a cartilaginous wound were rounded. In the part of an articular cartilage, adjoining to the wound there were no chondrocytes. At some distance from the defect chondrocytes were at the stage of necrosis and necrobiosis. The matrix staining was irregular. Near by the defect a manifested decrease in matrix basophilia was determined. On the rest part of an articular cartilage of lateral and medial femur condyles any changes were not revealed.

Fibroreticular tissue in the defect zone was characterized by a not high density of slightly differentiated cells and those of fibroblast series. The single, larger and roundish cells, which might be related to the chondroblastic ones, were manifested.

After introducing into the rat's joint of mesenchymal cells of human embryos we observed distinctive peculiarities, which were related to structural organization of tissue, filling the defect. In spite of the control a fibroreticular tissue, being located in the defect are, was characterized by a high density of rounded and big cells of chondroblastic series, as well as by the presence of interstitial substance, which (during staining with toluidine blue) gave metachromasia, that testified to the accumulation of glycosaminoglycanes. Basing on cell characteristics and interstitial substance of fibroreticular tissue we can affirm, that it approaches by the structure to a chondroblastic tissue.

To the 14th day the defect in animals of the control group was filled with a fibrillar cartilage with small parts of chondroid. In articular cartilage, surrounding the defect, the dystrophic impairments of chondrocytes and matrix remained. Single small isogenic groups with large, brightly stained chondrocytes were somewhere revealed.

To the 14th day after traumatic damage and a simultaneous transplantation of cryopreserved mesenchymal cells of embryos the defect in the cartilage was filled with a young hyaline cartilaginous tissue, which was characterized by the presence of many large chondroblasts and brightly stained with toluidine blue matrix.

In an articular cartilage near by to the defect we revealed the reparative changes, related to the normalization of matrix staining, to an increase in chondrocyte density.

The conducted experimental study demonstrated, that the transplantation of viable cryopreserved mesenchymal cell suspension of human embryos of the 5–7 gestation week simultaneously with a traumatic damage of rat's articular cartilage accelerated the rates of the reparative blastema formation. The higher density of connective cells in the tissue, filling the defect, testifies to this fact. The introduction of the given preparation also stimulates a chondrogenous cell differentiation in blastema, to which points the formation of hyaline cartilaginous tissue in the defect in the earlier terms. The action mechanism of embryonic preparations requires the performance of deep fundamental investigations. Nevertheless the results presented point to the perspective of treatment of some orthopedic diseases by cellular transplantation.

REFERENCES

1. *Repin V. S., Sukikh G. T.* Medical cellular biology.– M.: Big Encyclopaedia of Biology and Medicine, 1998.– 199 p.
2. *Oreffo R. O. C., Bord S., Triffit J. T.* Skeletal progenitor cells and ageing human population // Clin. Sci.– 1988.– № 4.– P. 549–555.
3. *Triffit J. T.* The stem cell of the osteoblast // Principles of Bone Biology / Ed. by M. Zaidi.– San Diego, 1996.– P. 39–50.

Accepted in 21.03.2001

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043: 612.014.4

UDC 57.043: 612.014.4

Функциональные характеристики криоконсервированной органной культуры надпочечников новорожденных поросят

А. В. ГЕРАЩЕНКО, Т. П. БОНДАРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Functional Characteristics of Cryopreserved Organ Culture of Newborn Piglet's Adrenal Glands

A. V. GERASCHENKO, T. P. BONDARENKO

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

Сохранение структурной целостности эндокринных тканей является весьма важным фактором, обеспечивающим стероидогенез и секрецию гормонов. Полученные экспериментальные данные [2] свидетельствуют о том, что замораживание адренокортикоцитов в присутствии 5%-го димексида позволяет сохранить их структурную целостность при двухэтапном замораживании. Цель работы — выяснить, изменяются ли функциональные характеристики замороженного эндокринного материала в зависимости от сроков хранения. Нами были проведены исследования по определению секретирующей способности адренокортикоцитов после отогрева при отсутствии и действии стимуляторов стероидогенеза. В работе использовали 5-дневную культуру надпочечников новорожденных поросят. Стимуляторами стероидогенеза были взяты синактен (синтетический аналог адренокортикотропного гормона) и экстракт гипофиза, содержащий природный гормон. Определение 11-ОКС проводили флуориметрическим методом [6], белок измеряли по Бредфорду [3].

Проведенные эксперименты по изучению уровня секреции 11-ОКС криоконсервированной культурой надпочечников новорожденных поросят после 1-го дня, 3-х месяцев, 1-го года низкотемпературного хранения свидетельствуют, что базальная секреция гормонов в замороженных образцах находится на уровне 85% от контроля (за 100% взят уровень 11-ОКС нативной 5-дневной культуры перед замораживанием), что соответствует количеству сохранившихся клеток. Стимулируемая секреция сохраняется на уровне контрольных образцов, что важно для трансплантации образцов экспериментальным животным, когда трансплантант должен подчиняться законам обратной связи, то есть регуляции биологически активными веществами, в нашем случае - адренокортикотропным гормоном (АКТГ). Поскольку в экспериментах мы не наблюдали различий в стимулируемой секреции гормонов нативными и криоконсервированными адренокортикоцитами, можно предположить, что рецепторы, находящиеся на поверхности эндокринных клеток и ответственные за взаимодействие с АКТГ, не повреждены.

Способность размороженной органной культуры утилизировать экзогенный холестерин послужила предпосылкой для постановки экспериментов по повторному культивированию данных образцов, хотя культуры надпочечников относятся к неперевиваемым культурам. Однако мы исходили из того, что до 8–10 сут культивирования культура клеток адренокортикальной ткани наращивает способность к образованию гормонов и росту секретируемого гормона, хотя и имеет меньшие скорости этих процессов [2, 4].

Из рис. 1 видно, что после размораживания органная культура адренокортикоцитов сохраняет свои способности к росту, выработке и секреции гормонов. На 2-е сутки культивирования с добавлением экстракта гипофиза уровень секреции отличался от первоначального больше, чем в 2 раза. На 3-и сутки культивирования после замораживания-отогрева адренокортикоциты сохраняли способность к выработке и секреции гормонов как при отсутствии, так и при действии стимулятора стероидогенеза, однако скорость секреции гормонов замедлялась. При этом следует отметить, что клетки культуры содержали определенное количество гормона. Согласно [2, 5] максимум стероидогенеза и секреции гормонов для органной культуры адренокортикоцитов определяется на 5-е сутки культивирования, а затем наблюдается выход на плато с дальнейшим снижением роста и скорости стероидогенеза и секреции гормонов. С учетом 5 дней культивирования до замораживания в нашем случае после криоконсервирования это будут 6–8-суточные культуры. Тогда

Preservation of structural integrity of endocrine tissues is a quite important factor, providing steroidogenesis and hormone secretion. The obtained experimental data [2] testify to the fact, that the freezing of adrenocorticocytes in the presence of 5% dimexide allows to preserve their structural integrity at two-step freezing. The aim of the work was to reveal whether the functional characteristics of frozen endocrine material change depending on the storage terms. We carried out the investigations on determination of adrenocorticocyte secreting ability after thawing during absence and presence of steroidogenesis stimulators. In the work the 5 day culture of newborn piglet's adrenal glands was used. As steroidogenesis stimulators we took synakten (synthetic analogue of adrenocorticotropic hormone) and hypophysis extract, containing natural hormone. Determination of 11-OCS was performed using a fluorimetric method [6], protein was measured according to Bradford [3].

The experiments accomplished on studying the level of 11-OCS secretion of cryopreserved culture of newborn piglet's adrenal glands after 1 day, 3 months, 1 year of low temperature storage testify to the fact, that basal hormone secretion in frozen samples is at the level of 85% of the control (for 100% the 11-OCS level of a native 5-day culture prior to freezing was taken), that corresponds to the number of preserved (сохранившихся) cells. Stimulating secretion remains at the level of control samples, that is important for the transplantation of samples to experimental animals, where a transplant should submit to feedback laws, i.e. to the regulation by biologically active substances, in our case, adrenocorticotropic hormone (ACTH). Since in the experiments we did not observe the differences in a stimulating secretion of hormones by native or cryopreserved adrenocorticocytes we can suppose that the receptors, being on the surface of endocrine cells and responsible for the interaction with ACTH, are not damaged.

The capability of frozen-thawed organ culture to utilize exogenous cholesterol served as a premise to set the experiments on repeated culturing of given samples, although the cultures of adrenal glands are related to non- recultured cultures. However we proceeded from the fact, that up to 8–10 days of culturing the cell culture of adrenocortical tissue intensifies the capability for hormones production and a secreting hormone growth, although has lower rates of these processes [2, 4].

It is seen from the Fig. 1 that after freeze-thawing an organ culture of adrenocorticocytes keeps its ability for growth, producton and secretion of hormones. To the 2nd day of culturing with adding hypophysis extract the level of secretion differed from the initial one more than twice. By the 3rd culturing day after freeze-thawing adrenocorticocytes preserve the ability for hormone production and secretion both at the absence and presence of steroidogenesis stimulator, but the hormone secretion rate slows down. Thereat it should be mentioned, that cells of culture contained a certain number o hormone. According to the data [2, 5] the maximum of steroidogenesis and hormone secretion for the adrenocorticocytes organ culture is determined on the 5th day of culturing and then the output to the plateau with the following decrease in the growth and rate of steroidogenesis and hormone secretion. Taking into account 5 days of culturing prior to freezing in our case after cryopreservation it will be the 6–8th day cultures. Then the fall of the secretion level may be related both to the terms of culturing and the slowing down of the culture growth rate, that can be explained by some changes in cell characteristics, caused by low temperature effect.

In order to verify the supposition that the fall of the hormone secretion level can be related to the culture growth slowing down

Матеріал, захищений авторським правом

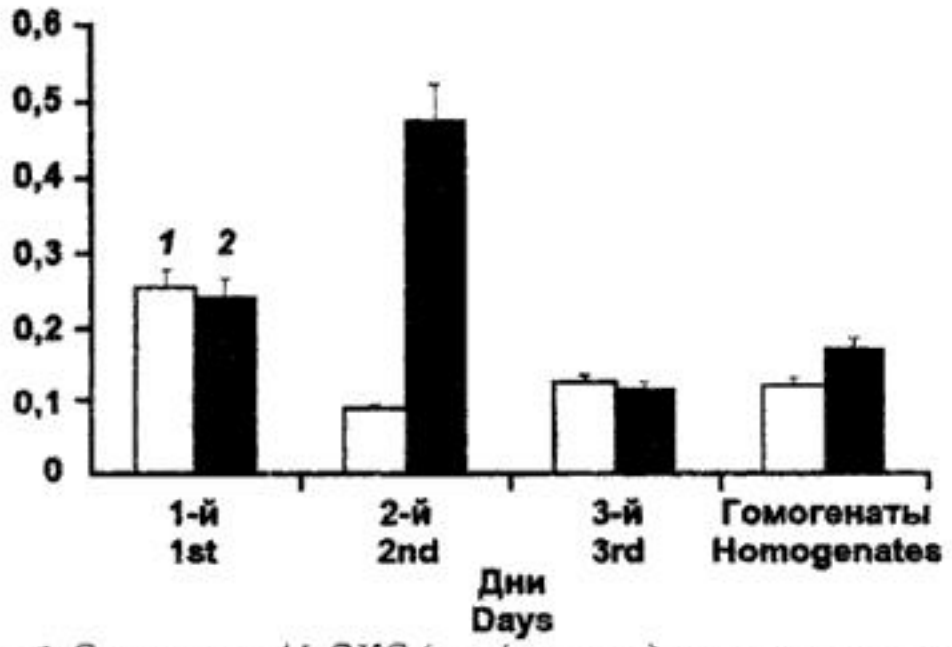


Рис. 1. Содержание 11-ОКС (мкг/мг ткани) в среде культивирования и гомогенатах размороженной культуры надпочечников новорожденных поросят в течение 3-х дней культивирования: *1* — контроль; *2* — с экстрактом гипофиза.

Fig. 1. 11-OCS content (μg/mg of tissue) in the culturing medium and homogenates of newborn piglets' frozen-thawed adrenal gland culture within 3 days of culturing: *1* — control; *2* — with hypophysis extract.

падение уровня секреции может быть связано как со сроками культивирования, так и с замедлением скорости роста культуры, что можно объяснить некоторыми изменениями характеристик клеток, вызванными действием низких температур.

Для проверки предположения, что падение уровня секреции гормонов может быть связано с замедлением роста культуры, мы проводили измерение содержания белка в культуральной среде и гомогенатах культуры.Известно, что для каждой ткани и клетки характерно определенное соотношение между белком и другими внутриклеточными компонентами, поэтому мы считали возможным судить о росте культуры по накоплению ее белковой массы [1, 7].

Из рис. 2 видно, что как при введении в среду культивирования стимулятора стероидогенеза (экстракта гипофиза), так и при его отсутствии на 2-е сутки культивирования размороженной культуры, помещенной заново в условия, обеспечивающие ее рост, происходит увеличение массы белка, т.е. рост культуры. Это согласуется с данными, полученными при исследовании секретирующей способности 11-ОКС данной культуры (рис. 1). Из анализа данных рис. 1 и 2 можно сделать вывод, что по всей видимости процессы, наблюдаемые нами, обусловлены не факторами, связанными с действием низких температур, а сроками культивирования, которые в условиях in vitro приводят к замедлению роста культуры и ее перерождению.

Суммируя экспериментальные данные, можно заключить, что низкотемпературное хранение эндокринного материала не сопровождается существенными изменениями функциональных характеристик адренокортикоцитов новорожденных поросят. Они сохраняют способность к синтезу глюкокортикоидов с последующей их секрецией в среду культивирования. Полученные результаты позволяют сделать вывод о принципиальной возможности использования криоконсервированной органной культуры для коррекции гормонального статуса у экспериментальных животных с гипофункцией надпочечников.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бондаренко Т. П., Геращенко А. В., Кирюшина И. И.* Влияние димексида и экстрактов гипофиза на гормональную активность клеток культуры коры надпочечников новорожденных поросят // Пробл. криобиологии.– 1998.– № 3.– С. 55–58.
2. *Легач Е. И.* Влияние криоконсервирования на адренокортикальную ткань: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.– Харьков, 1998.– 18 с.
3. *Практическая* химия белка / Под ред. А. Дарбе.– М.: Мир, 1989.– 623 с.
4. *Тронько Н. Д., Богданова Т. И., Турчин И. С.* Ультраструктурная характеристика органных культур надпочечников новорожденных поросят // Эндокринология.– 1988.– 34, № 5.– С. 65–69.
5. *Турчин І. С.* Проблеми трансплантації культур клітин і тканин залоз внутрішньої секреції хворим з різними формами ендокринопатії // Ендокринологія.– 1996.– 1, № 2.– С. 6–13.
6. *Резников А. Г.* Методы определения гормонов.– Киев: Наук. думка, 1980.– 399 с.
7. *Fujiyama C., Masaki Z., Sugihara H.* Influence of extracellular matrix on the proliferation and differentiation of adrenocortical cells in culture // Pathol. Res. Pract.– 1993.– 189 (10).– P. 1205–1214.

Поступило 29.05.2001

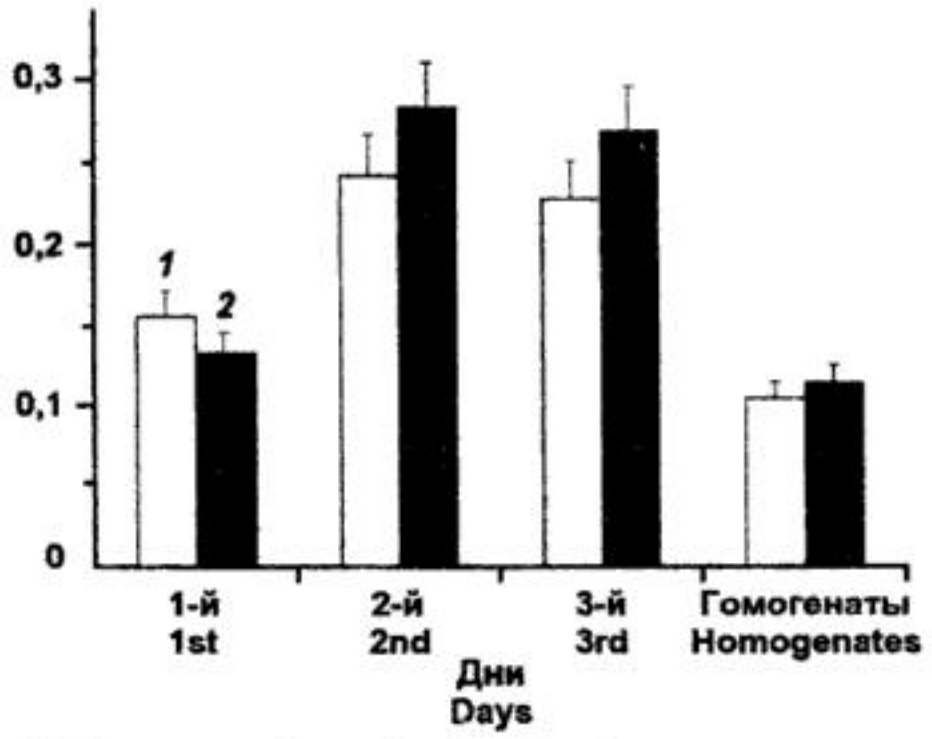


Рис. 2. Содержание белка (мг/мг ткани) в среде культивирования и гомогенатах размороженной культуры надпочечников новорожденных поросят в течение 3-х дней культивирования: *1* — контроль; *2* — с экстрактом гипофиза.

Fig. 2. Protein content (μg/mg of tissue) in the culturing medium and homogenates of newborn piglets' frozen-thawed adrenal gland culture within 3 days of culturing: *1* — control; *2* — with hypophysis extract.

we carried out the measurement of protein content in cultural medium and culture homogenates. It is known that for each tissue and cell a certain ratio between protein and other intracellular components is typical, therefore we consider it possible to judge about the culture growth according to the accumulation of its protein mass [1, 7].

It is seen from the Fig. 2 that both at the introduction into the culturing medium of steroidogenesis stimulator (hypophysis extract) and at its absence, by the 2nd day of culturing of frozen-thawed culture, placed again under conditions, providing its growth, an augmentation of protein mass, i.e. culture growth occurs. It correlates with the data, obtained when investigating 11-OCS secreting ability of the given culture (Fig. 1). From the analysis of the Fig. 1 and Fig. 2 data we can conclude, that apparently the processes we observe are stipulated not by the factors, related to the low temperature effect, but the culturing terms, which under in vitro conditions result in the culture growth slowing down and its regeneration.

Summarizing the experimental data, we can conclude that low temperature storage of endocrine material is not accompanied with considerable changes in functional characteristics of newborn piglets' adrenocorticocytes. They keep the capability for glucocorticoid synthesis with the following their synthesis into the culturing medium. The results obtained allow to conclude about the possibility of cryopreserved organ culture usage for hormonal status correction in experimental animals with adrenal gland hypofunction.

REFERENCES

1. *Bondarenko T. P., Geraschenko A. V., Kiryushina I. I.* Effect of dimexide and hypophysis extracts on hormonal activity of cells of newborn piglet's adrenal cortex culture // Problemy kriobiologii.– 1998.– № 3.– P. 55–58.
2. *Legach E. I.* Cryopreservation effect on adrenocortical tissue: Abstr. Thesis Cand. Med. Sci.– Kharkov, 1998.– 18 p.
3. *Protein* practical chemistry / Ed. by A. Darbet.– M.: Mir, 1989.– 623 p.
4. *Tron'ko N. D., Bogdanova T. I., Turchin I. S. Ultrastructural characteristic of newborn piglet's adrenal gland organ cultures // Endokrinologiya.– 1988.– 34, № 5.– P. 65–69.*
5. Turchin I. S. Problems of transplantation of cell and tissue cultures of internal glands to patients with different types of endocrinopathy // Endokrinologiya.– 1996.– 1, № 2.– P. 6–13.
6. *Reznikov A. G.* Methods of hormone determination.– Kiev: Nauk. Dumka, 1980.– 39 p.
7. *Fujiyama C., Masaki Z., Sugihara H.* Influence of extracellular matrix on the proliferation and differentiation of adrenocortical cells in culture // Pathol. Res. Pract.– 1993.– 189 (10).– P. 1205–1214.

Accepted in 29.05.2001

Матеріал, захищений авторським правом

КРАВЧЕНКО Лидия Петровна

13 апреля 2001 года скончалась **Кравченко Лидия Петровна** – ученый-биохимик, старший научный сотрудник ИПКиК НАН Украины, кандидат биологических наук, лауреат премии им. А. В. Палладина.

С именем Лидии Петровны связано развитие теоретических и практических исследований в области консервирования изолированных клеток и целой печени в условиях гипотермических температур. Она разработала эффективную консервирующую среду для гипотермического хранения изолированных гепатоцитов и целой печени.

Кравченко Л. П. опубликовала более 110 научных работ, автор 6 изобретений. Под ее руководством выполнялся совместный научно-исследовательский грант Wellcome Trust (Великобритания).

Научная общественность, друзья, коллеги, ученики, родные и близкие глубоко скорбят в связи с безвременным уходом из жизни Лидии Петровны. Светлая память о добром, отзывчивом человеке сохранится в сердцах тех, кто был с ней рядом при жизни.

Lidiya Kravchenko Memorial Prize

A prize will be awarded in memory of Dr Lidiya Kravchenko, who contributed a great deal to the development of young scientists at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine over many years, and most particularly under the UNESCO Chair. Lidiya's scientific expertise was recognised internationally, and to commemorate this, the Chair will award a special certificate, and the sum of $350 (with $100 as a stipend direct to the winner, and $250 as a travel bursary which the winner can use towards attending an appropriate scientific meeting).

The persons eligible to enter for the prize are: members of the Institute for Cryobiology and Cryomedicine who are aspirants or who have been awarded their PhD degree within the past 5 years.

The format for the application will be: an essay in English of 4 000 words (approximately) on any topic in cryobiology of the applicant's own choice. The essay should be divided into 3 sections: (1) an introduction to the problem; (2) a review of recent knowledge and other published articles in this field; (3) a discussion of how the subject could be taken forward in the next few years.

The essay should be typed on computer in **Times New Roman** or similar format, with single word-spacing. This will mean that the text will be between 8–10 pages (without the reference list). The language should be the candidate's own English; candidates may ask advice from colleagues or supervisors, but they must write the articles themselves. Small mistakes in spelling or grammar will not be penalised, but the ideas and writing must come from the candidates themselves. Candidates may cite no more than 20 references to support their ideas. These should be in the format used for the journal Cryobiology (see below) in a list at the end of the essay. This will mean another 2-3 essay pages making a total of about 12–13 pages. The essays should be given as two printed copies, and an electronic form, to Professor Valentin Grischenko by **31st September 2001**. A panel of Professors unknown to the Institute will then be asked to judge the essays, and a winner will be announced by December 2001.

The references should be cited in the essay in the format of Cryobiology (journal of the Society for Cryobiology – see the Library copies). This means that the reference list is organised in the alphabetical order of the authors' names at the end of the essay, and given a number. The names, full title, journal name, volume number, pages and year should be given. For example:

1. Amann R. and Pickett B. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *J. Equine Vet. Sci.* 7, 145–173 (1987).
2. Bavister B., Leibfreid M. & Liebermann G. Development of pre-implantation of the embryos of the golden hamster in a defeined culture medium. *Biol. Reprod.* 28, 983–999 (1983).
3. Chen J., Ji W., Yang S. and Shi L. Semen cryopreservation in the Tibetan macaque (Macaca thibetana) — comparison of different cooling programs and freezing media. *Zool. Res.* 40, 74-81 (1994).

The numbers of the reference list should then be used in the text of the essay where appropriate. If in doubt, consult the Library copies of Cryobiology. For example:

The two cryopreservation media examined here (TEST and TTE) have been successfully used to cryopreserve cynomolgus monkey and Japanese macaque spermatozoa (22, 33, 37). Tollner et al (37) reported 56% post-thaw motility of macaque spermatozoa using TEST medium, whereas in other studies (5, 23) spermatozoa frozen with TTE medium had lower motility.

Матеріал, захищений авторським правом

PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY

International journal

Published quartery by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the Ukrainian Academy of Sciences in Russian and English with abstracts in Ukrainian

A medium for members of the scientific, engineering and medical professions concerned with low temperatures

Interdisciplinary publication encompassing chemical, biochemical, physiological, biophysical approaches to living cells and tissue research at low temperatures

World circulation

ADVERTISEMENTS FOR INSERTIONS IN 4 ISSUES

Inside front cover	$400
Inside back cover	$325
Back cover	$450
Ordinary full page	$150
Ordinary half page	$100

Postage included

Payment should be sent to a/c 4070104 of the Institute For Problems of Cryobioilogy and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, EXIMBANK UKRAINE, Branch in Kharkov, 61005 Kharkov, Ukraine

Advertising inquiries should be addressed to
Editor-in-Chief **V. I. Grischenko**
Institute for Problems of Cryobioilogy and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine
23, Pereyaslavskaya Str., 61015 Kharkov, Ukraine
Tel. (0572) 72-41-43

Матеріал, захищений авторським правом

Научные редакторы *В. И. Луговой, Т. Н. Юрченко*
Редактор *Е. Д. Пазыч*
Компьютерный набор и верстка:
И. Г. Пятигорская

Scientific Editors *V. I. Lougovoy, T. N. Yurchenko*
Editor *E. D. Pazych*
DTP-work by *I. G. Pyatigorskaya*

Подписано в печать 12.06.2001. Формат 60×84 1/8. Бум. тип. № 1. Печать офсетная. Усл. печ. л. 13,02. Тираж 350 экз.
Цена договорная. Отпечатано МЧП "Райдер", г. Харьков, ул. Артема, 4.

Матеріал, захищений авторським правом

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY

2
2001

Индекс 70474

Index 70474

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

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

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

Subscription orders should be addressed to

Editor-in-Chief V. I. Grishchenko
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine
23 Pereyaslavskaya Str., 61015 Kharkov, Ukraine
Tel. (0572) 72-41-43
Fax (0572) 72-00-84
E-mail: cryo@online.kharkov.ua

Матеріал захищений авторським правом