

2

ISSN 0233-7673

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

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ
И КРИОМЕДИЦИНЫ



1998

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ



ПУПОВИННАЯ КОРДОВАЯ КРОВЬ ЧЕЛОВЕКА КАК ИСТОЧНИК
ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ КЛЕТОК ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕ-
НЕНИЯ. ЧАСТЬ II. ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Гольцев А. Н., Калиниченко Т. А.

ПОИСК *IN VITRO* ОПТИМАЛЬНЫХ ДЛЯ УСИЛЕНИЯ КРИОДЕ-
СТРУКЦИИ ПАРАМЕТРОВ УЛЬТРАЗВУКА *Есьман С. С., Рикберг А. Б.,*
Бакай Э. А., Сергиенко В. П.

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБОВ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО
ХРАНЕНИЯ НА АНТИОКСИДАНТНУЮ АКТИВНОСТЬ ФОЛЛИКУ-
ЛЯРНОЙ ЖИДКОСТИ ЧЕЛОВЕКА *Грищенко В. И., Геродес А. Г.,*
Никитченко Ю. В.

Главный редактор **В.И.Грищенко**

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

Editor-in-Chief **V.I.Grishchenko**

EDITORIAL BOARD

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

EDITORIAL COUNCIL

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

2

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

1998

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

Гольцев А. Н., Калиниченко Т. А. Пуповинная кордовая кровь человека как источник гемопозитических клеток для клинического применения. Часть II. Иммунологическая характеристика	3
Есьман С. С., Рихберг А. Б., Бакай Э. А., Сергиенко В. П. Поиск <i>in vitro</i> оптимальных для усиления криодеструкции параметров ультразвука	22
Гордиенко Е. А., Смольянинова Е. И., Коваленко И. Ф. Определение и сравнительное изучение биофизических параметров ооцитов и эмбрионов мыши в водных растворах проникающих криопротекторов	27
Козлова В. Ф., Юрченко Т. Н., Щетинский М. И., Репин Н. В. Особенности морфофункционального состояния организма гетеротермных животных в цикле гибернация-пробуждение	32
Кравченко Л. П., Белоус А. М., Шанина И. В. Длительное холодное хранение клеток печени в системах <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i>	39
Марченко В. С., Бабийчук В. Г., Ломакин И. И., Шило А. В., Ломако В. В. Проницаемость гематоэнцефалического барьера для кардиотропных лекарственных веществ при кра-ниоцеребральной гипотермии	42
Рамазанов В. В., Семенченко А. Ю., Воловельская Е. Л., Мельник Э. С., Бондаренко В. А. Действие протеолитической обработки на холодовый шок эритроцитов	46
Бондаренко Т. П., Легач Е. И. Секретирующая способность адренокортикальной ткани новорожденных и половозрелых свиней при действии низких температур	50

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

Грищенко В. И., Геродес А. Г., Никитченко Ю. В. Влияние различных способов низкотемпературного хранения на антиоксидантную активность фолликулярной жидкости человека	55
---	----

КРИОМЕДИЦИНА

Волошина Н. Н. Оптимизация криохирургического лечения больных с фоновыми заболеваниями шейки матки	60
Волошина Н. Н., Луценко Н. С. Комплексное криохирургическое лечение фоновых заболеваний шейки матки при папилломавирусном инфицировании	64
Лубенкова Н. В. Криохирургическое лечение псевдозрозий шейки матки, развивающихся на фоне гарднереллеза	67

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Грищенко В. И., Межидов С. Х. Об увеличении экстинкции хромофорной группы белка в присутствии клеток	72
--	----

CONTENTS

THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

Goltsev A. N., T. A. Kalinichenko T. A. Human umbilical cord blood as a source of hemopoietic cells for clinical application. Part II. Immunologic characteristics	3
Yesman S. S., Rikberg A. B., Bakai E. A., Sergiyenko V. P. An <i>in vitro</i> search for ultrasound parameters which are optimum for enhancement of cryodestruction	22
Gordiyenko E. A., Smolyaninova E. I., Kovalenko I. F. Identification and comparative study of biophysical parameters of murine oocytes and embryos in aqueous solutions of penetrating cryoprotectants	27
Kozlova V. F., Yurchenko T. N., Schetinsky M. I., Repin M. V. Peculiar features of the morphofunctional state of a heterothermic organism in a hibernation-arousal bout	32
Kravchenko L. P., Belous A. M., Shanina I. V. Long-term cold storage of liver cells in the <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> systems	39
Marchenko V. S., Babiychuk V. G., Lomakin I. I., Shilo A. V., Lomako V. V. Permeability of the blood-brain barrier to cardiotropic drugs during craniocerebral hypothermia	42
Ramazanov V. V., Semenchenko A. Yu., Volovelskaya E. L., Meïnik E. S., Bondarenko V. A. Influence of proteolytic treatment on cold shock of red cells	46
Bondarenko T. P., Legach E. I. Secretory ability of the adrenocortical tissue of newborn and mature pigs under the action of low temperatures	50

CRYOPRESERVATION OF BIOSYSTEMS

Grischenko V. I., Gerodes A. G., Nikitchenko Yu. V. Action of various methods of low temperature storage on the antioxidative activity of human follicular fluid	55
--	----

CRYOMEDICINE

Voloshina N. N. Optimization of cryosurgical treatment of patients with accompanying diseases of the neck of the uterus	60
Voloshina N. N., Lutsenko N. S. Complex cryosurgical treatment of accompanying diseases of uterus neck at papilloma virus infectioning	64
Lubenkova Y. V. Cryosurgical treatment of cervical pseudoerosion developed on the background of gardnereliosis	67

BRIEF COMMUNICATIONS

Grischenko V. I., Mezhdov S. Kh. On a rise in extinction of the chromophoric group of the protein in the presence of cells	72
--	----

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

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

Научный редактор В. И. Луговой

Редактор Л. А. Рябина

Компьютерный набор и верстка: И. Г. Пятигорская

Подп. в печ. 27.05.98. Формат 70x108/16. Бум. тип. № 1. Печать офсетная. Усл. печ. л. 9,4. Тираж 350 экз. Цена договорная. Оригинал-макет подготовлен в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины. Отпечатано в Харьковской городской типографии № 16, 310003, Харьков, ул. Университетская, 16. Зак.

**ПУПОВИННАЯ КОРДОВАЯ КРОВЬ ЧЕЛОВЕКА КАК ИСТОЧНИК
ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ КЛЕТОК ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ.
ЧАСТЬ II. ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА**

На основании обзора клинических и экспериментальных исследований проанализированы особенности иммунных взаимодействий пуповинной кордовой крови (ПКК) с организмом реципиента при пересадке ПКК с целью восстановления иммуногемопоэза. Рассматриваются данные литературы, касающиеся фенотипических характеристик и функциональной зрелости иммунокомпетентных клеток ПКК, что обусловлено некоторой неоднозначностью и противоречивостью результатов экспериментальных исследований в этой области и их трактовок. В работе приводятся вероятные механизмы участия клеточных и гуморальных звеньев иммунитета в развитии иммунных конфликтов в посттрансплантационном периоде, в частности, болезни "трансплантат против хозяина", а также реакции "трансплантат против лейкоза". Затрагиваются вопросы возможности управления антиопухолевой цитотоксичностью ПКК с помощью методов молекулярного моделирования.

Особенности проявления иммунореактивности ПКК. Вероятно, одним из самых больших преимуществ ПКК, в сравнении с другими источниками стволовых клеток, является ее меньшая иммунологическая реактивность, что обуславливает снижение риска развития болезни "трансплантат против хозяина" — БТПХ (graft-versus-host disease — GVHD). По данным международных центров, обрабатывающих информацию о клиническом применении гемопоэтических клеток (ГК) ПКК человека [9, 17–19, 37], после их применения в качестве источника кроветворной ткани в меньшей степени имеют место проявления иммунного конфликта в виде реакции ТПХ, чем у реципиентов с трансплантатом костного мозга (КМ) подобной степени совместимости [10, 28, 48]. По данным Broxmeyer Н.Е. [9], при проведении около 300 трансплантаций ПКК, выполненных к концу 1996 г. при различных опухолевых и неопухолевых заболеваниях, были использованы как клетки сиблингов, так и неродственные аллогенные клетки, сохранявшиеся в криоконсервированном состоянии. При этом пары донор–реципиент либо были полностью HLA-идентичными, либо имели различия по 1, 2 или 3 антигенам HLA-аллелей. На фоне высокого приживления трансплантата симптомы БТПХ либо отсутствовали вообще, либо отмечалось наличие слабых ее проявлений. О сходных результатах трансплантаций ПКК доложено другими авторами (табл. 1).

Ученые и клиницисты ведущих североамериканских и европейских центров по пересадкам ПКК считают, что результаты таких трансплантаций обнадеживают, так как даже в случаях неполного соответствия по HLA-локусам пар донор–реципиент на фоне относительно высокой степени приживления трансплантата отмечаются тенденции к снижению частоты развития БТПХ III–IV-й стадий, а также к высокой чувствительности ее проявлений к первичной стероидотерапии независимо от степени тяжести.

Современные данные о трансплантациях КМ (ТКМ) с целью восстановления гемопоэтической системы реципиентов с различными степенями ее угнетения свидетельствуют о высоком риске развития тяжелой БТПХ в посттрансплантационном периоде (табл. 2). Причем при условиях трансплантации аллогенного HLA-совместимого КМ около половины больных с развившейся БТПХ погибает [2]. Проблема миелотрансплантаций еще больше усугубляется



Т а б л и ц а 1

Результаты трансплантаций ПСК (по данным литературы)¹

Ис-точ-ник	Кол-во ТПКК (n), в том числе по поводу опухолевых заболеваний	Степень совмести-мости пар донор-реципиент	Частота приживления	Выживаемость	Частота (кол-во (n)) случаев БТПХ	Чувствительность проявлений БТПХ к первичной стероидо-терапии	Частота (кол-во рецидивов (n)) выживших реципиентов с опухолевыми заболеваниями
[48]	n=18, по поводу опухолевых заболеваний — 12 (ОЛ, ХМЛ)	Отличались по 1-3 HLA-аллелям (n=11) ² ; HLA-совместимые (n=7) ²	100%	До 6 мес — 65%	Острая: III-IV-й степени — 11%; II-IV-й степени — 50%; IV-й степени — 6% (n=1)	Чувствительны к МП в большинстве случаев	25% (n=2, у обоих во время ТПКК были рецидивы миелоидного ОЛ)
[28]	n=25, по поводу опухолевых заболеваний — 12 (ОЛ, ХМЛ, НБ)	Отличались по 1-3 HLA-аллелям (n=24) ² ; HLA-совместимые (n=1) ²	92% (отторжение — у 2 реципиентов, одному из которых ТПКК проводилась во время рецидива ОЛ, второму — во время blastного криза (ХМЛ))	До 100 дней — 64%; общая — 48%	Острая: III-й степени — 10% (у 2 пациентов, один из которых имел различия с донором по HLA-B-аллели, а другой — HLA-B- и HLA-DRB1-аллелям); II-III-й степеней — 43%; IV-й степени — 0%; хроническая — 10% (n=2 из 21)	Чувствительны к МП во всех случаях	20% (n=2, один из них с БТПХ II-й степени, другой — не был под наблюдением)
[18]	n=87, по поводу опухолевых заболеваний — 55 (ОЛ, ХМЛ, МДС, НХЛ, НБ)	HLA-идентичные сиблинги (n=42); отличались по 1-3 HLA-аллелям n=41, из них (n=24) ² и (n=17) ³ ; HLA-совместимые (n=4) ²	78%	Свыше 2 лет — 45%	Острая: II-й степени — 21% HLA-идентичных транспл.; 60% не полностью идентичных транспл.; IV-й степени — 0%; хроническая — 12% реципиентов, выживших более 90 дней		40% выживших свыше 2 лет (n=10), главным образом у больных с запущенными случаями лейкомии

Примечание.

¹ — Трансплантация ПСК (ТПКК) производилась в основном пациентам группы высокого риска;² — пары донор-реципиент не связаны семейным родством;³ — пары донор-реципиент связаны семейным родством;

трудностью подбора гистосовместимых пар донор–реципиент, а именно тем, что только от 25 до 40% больных имеют потенциальных HLA-совместимых сиблингов [2, 17, 26], а эффективность подбора HLA-совместимых неродственных доноров составляет примерно 20% на $5 \cdot 10^5$ потенциальных доноров [17].

Т а б л и ц а 2

Частота развития БТПХ после трансплантаций КМ (по данным литературы)

Источ- ник	Частота проявления БТПХ после ТКМ	Степень совместимости пар донор– реципиент при ТКМ	Форма и степень проявления БТПХ
[8, 26]	До 30–37% ¹	Большинство пар совместимы по HLA-локусам, не состоят в родстве	Острая форма III–IV-й степеней
[26]	До 47% ²	То же ³	То же
[8]	До 62% ¹	Не полностью совместимы по HLA-локусам, не состоят в родстве	—"
[17]	До 80% ²	Совместимы и не полностью совместимы по HLA-локусам, не состоят в родстве	Тяжелой степени
[17]	До 30% ²	HLA-идентичные сиблинги	То же
[2]	До 40–60% ²	Совместимы по HLA-локусам, состоят и не состоят в родстве	—"
[26]	До 55% ²	Большинство пар совместимы по HLA-локусам, не состоят в родстве ³	Хроническая форма

Примечание.

¹ — Реципиенты возрастной группы до 18 лет; ² — реципиенты всех возрастных групп;

³ — 66% пар донор–реципиент совместимы по HLA-A, -B и -DR антигенам, 33% — имеют отличия по одному HLA-антигену, 1% — имеют отличия по более чем одному антигену ($n = 462$) [26]; ТКМ — трансплантация КМ.

С другой стороны, при попытках предотвращения развития иммунного конфликта между миелотрансплантатом и реципиентом различными путями, а именно: минимизацией генетических различий, элиминацией зрелых Т-лимфоцитов и др., на фоне снижения риска развития острой и хронической БТПХ повышается риск рецидивов онкологических и онкогематологических заболеваний [2], то есть отмечается позитивная корреляция между БТПХ и реакцией “трансплантат против лейкоза” (РТПЛ) [6]. Существует предположение, что такого рода закономерность может привести к снижению активности ТПЛ при трансплантации ПКК, менее активной в отношении инициации БТПХ, снижая тем самым эффективность лечения больных с опухолевыми процессами [37]. Однако такое опасение не находит практического подтверждения при анализе результатов трансплантаций ПКК пациентам с лейкомиями [17, 19], а также с другими заболеваниями опухолевой природы (табл. 1). Так, у пациентов группы высокого риска, выживших после трансплантаций аллогенных неродственных ГК различной степени совместимости свыше года, риск развития рецидива опухолевого заболевания составляет от 25 до 40% при ТПКК [18, 28, 48] и от 57 до 60% при ТКМ [8]. В этом же ракурсе можно рассматривать и работу Vilmer E. et al. [46], свидетельствующую об отсутствии у реципиента рецидива острой В-клеточной лейкемии в течение 1 года наблюдения после трансплантации не полностью идентичной по системе HLA ПКК от донора–сиблинга.

В качестве противоположных предыдущему примеру следует рассматривать результаты трансплантации идентичной по HLA-A, -B, -C и -D/DR генотипам, но различной по АВО-системе ПКК от донора–сиблинга пациенту с

ювенильной хронической миелолейкемией [47]. У реципиента на 225-й день после ТПКК развился рецидив основного заболевания на фоне отсутствия проявлений острой или хронической БТПХ. По мнению авторов, рецидив может быть проявлением рефрактерной (резистентной к миелодепрессивной терапии) лейкемии, что подтверждается спонтанной пролиферацией гранулоцитарно-макрофагальных колониеобразующих единиц из числа мононуклеаров периферической крови реципиента, являющейся патофизиологическим дефектом при ювенильной хронической миелолейкемии.

По мнению большинства авторов [17, 19, 37, 47 и др.], неоднозначность полученных к настоящему времени данных о бифункциональной активности ПКК, а именно ее РТПХ- и РТПЛ-активности, определяет необходимость дальнейшего накопления и обобщения результатов по трансплантациям ПКК, их тщательному клиническому и иммунологическому анализу. Становится очевидным, что все еще до конца не решены такие серьезные проблемы, как определение зависимости успеха трансплантаций ПКК от степени допустимости пределов неполной идентичности по системе HLA в сиблинговых и несвязанных семейным родством парах донор–реципиент. И все же относительное снижение частоты и выраженности случаев БТПХ в посттрансплантационном периоде после ТПКК на фоне отсутствия роста частоты рецидивов опухолевых процессов наводит на мысль о различных механизмах восстановления иммунокомпетентной сферы реципиента в этой ситуации и после пересадок КМ [45].

Зависимость проявления иммунореактивности ПКК от структурно-функциональных параметров иммунокомпетентных клеток. Известно, что реакция ТПХ является иммунологическим процессом, в который в той или иной степени вовлекаются все звенья иммунной системы [2]. Следовательно, феномен редуцированной ТПХ-активности ПКК может быть обусловлен самыми различными причинами, изменяющими патогенетические механизмы реализации иммуноагрессии и развития БТПХ. По Billingham, для развития РТПХ, помимо глубокой длительной иммуносупрессии реципиента, необходимо присутствие на его клетках трансплантационных антигенов, отсутствующих у донора, а также наличие иммунокомпетентных клеток в трансплантате [2]. Для понимания особенностей иммунореактивности неонатальных клеток ПКК и их способности инициировать БТПХ следует прежде всего учесть тот факт, что эффекторными клетками РТПХ являются зрелые посттимические Т-лимфоциты [2, 6]. С другой стороны, БТПХ сама по себе может не быть полностью ответственна за развитие ТПЛ-эффекта, скорее это связано с активностью критически важных для его развития эффекторных клеточных популяций, таких как Т-клетки, естественные киллеры (ЕК), ЕК-подобные клетки [6]. Именно с этих позиций необходимо характеризовать состав иммунокомпетентных клеток (ИКК) ПКК, в частности, особенности их фенотипических характеристик и функциональной активности.

Несмотря на достаточное число работ, в которых проанализирован количественный и качественный состав Т-лимфоцитов ПКК здоровых новорожденных, мнения исследователей относительно степени их зрелости противоречивы. По результатам более ранних работ, ПКК человека не имеет существенных особенностей как состава лимфоцитов [14, 24, 43], так и их функциональных параметров [20, 31] в сравнении с периферической кровью взрослых (ПКВ). Примерно 50% лимфоцитов ПКК являются фенотипически зрелыми Т-клетками (ОКТ3⁺/ОКТ11⁺), из которых около 50% составляет субпопуляция хелперов/индукторов (ОКТ4⁺) и около 25% — супрессоров/цитотоксических Т-клеток (ОКТ8⁺/ОКТ6⁺).

токсических клеток (ОКТ8⁺) [24, 43]. Однако расширение спектра моноклональных антител, идентифицирующих мембранные структуры клеток ПКК, позволило сделать заключение о том, что популяции и субпопуляции лимфоцитов из этого источника гемопоэтической ткани имеют свои отличительные черты. Так, использование клеточного сортирования для сравнения лимфоидных клеток ПКК и ПКВ продемонстрировало существенные различия в их субпопуляционном составе, выражающиеся увеличенным содержанием в ПКК неактивированных, незрелых клеток и клеток-супрессоров [17]. По мнению некоторых исследователей, около половины лимфоцитов ПКК находятся в стадии начальной активации [21], так как на их мембране при наличии ОКТ10-антигена (фенотип активированных Т-лимфоцитов) отсутствует антиген HLA-DR, являющийся вторым маркером активированных Т-клеток [3, с. 109]. Наряду с этим, от 14 до 24% Т-клеток ПКК экспрессируют антиген ОКТ6, относящийся к дифференцировочным маркерам тимоцитов коркового вещества [21, 32], что также подтверждает присутствие в ПКК незрелых клеток Т-ряда.

Серьезное внимание изучению качественных и количественных параметров Т-лимфоцитов ПКК человека уделено в работе Haggis D. et al. [22]. Авторами были проведены исследования по систематизации фенотипических и функциональных характеристик ПКК в сравнении с ПКВ. Результаты исследований показали, что в ПКК содержание Т-клеток с фенотипами CD4⁺, CD8⁺, CD3⁺ ниже, чем в ПКВ, что совпадает с результатами [13, 21], а также с данными Торубаровой Н.А. и др. [5], изучавших фенотипические особенности клеток ПКК в сравнении с ПК детей (ПКД) в возрасте от 3 до 12 лет. При этом в ПКК отмечается более высокое соотношение клеток с фенотипом CD4⁺ (хелперы/индукторы) к клеткам с фенотипом CD8⁺ (супрессоры/цитотоксические клетки), чем в ПКВ (2,4 — в ПКК и 1,7 — в ПКВ) [22] и ПКД (2,3 — в ПКК и 2,0 — в ПКД) [5]. Более детальный анализ состава лимфоцитов показал, что в ПКК содержится меньшее количество Т-клеток с фенотипом CD3/TCR- α/β ⁺, чем в ПКВ, в то время как Т-клетки с фенотипом CD3/TCR- γ/δ ⁺ встречаются с такой же частотой, как и среди лимфоцитов ПКВ (от 1 до 3%) [22]. Вместе с тем оказалось, что степень экспрессии CD3-антигена на Т-клетках ПКК ниже, чем на Т-клетках ПКВ. Это обстоятельство может свидетельствовать о промежуточной стадии созревания Т-лимфоцитов ПКК. Подтверждением служит тот факт, что большинство Т-клеток ПКК имеют фенотип ранних Т-лимфоцитов — CD45RA. Кроме того, особенностью лимфоцитов ПКК является присутствие среди них клеток, экспрессирующих антиген CD38 (ОКТ10) — маркер всех Т-клеток, проходящих внутриклеточную дифференцировку [5]. Такие особенности мембранных структур клеток могут указывать на сниженную способность Т-лимфоцитов ПКК к иммунному ответу по классическому пути, а именно: активации Т-лимфоцитов с участием TCR-, CD3-, CD4- и CD8-структур [1]. В пользу принадлежности Т-лимфоцитов ПКК к популяции менее зрелых клеток Т-ряда свидетельствует и факт выявления среди них малых субпопуляций с фенотипами CD3⁻8⁺ и CD3⁻7⁺, являющихся предшественниками для линии Т-клеток, и отсутствующих в популяции лимфоцитов ПКВ [22]. Еще одной особенностью фенотипа лимфоцитов ПКК, характеризующей их как клетки со специфической иммунореактивностью, следует считать отсутствие рецептора к интерлейкину-2 (Ил-2) (аналог CD25), в то время как около 4% лимфоцитов ПКД от 3 до 12 лет уже имеют этот рецептор [5]. К тому же около 30% лимфоцитов ПКК

отнесены к так называемым “нулевым” клеткам по причине отсутствия маркеров каких-либо иммунокомпетентных клеток на их поверхности [5].

Анализ приведенных данных дает основания считать, что ПКК человека содержит более примитивные, т.е. менее зрелые популяции Т-лимфоцитов, чем ПК детей и взрослых. Следовательно, для ИКК ПКК существует большая вероятность индукции иммунологической толерантности, что является чрезвычайно важным моментом при использовании этой ткани в качестве аллогенного гемопоэтического трансплантата.

Данные, полученные при изучении характеристик других ИКК ПКК, также подтверждают сниженную иммунореактивность этой ткани. Так, около 50% ее В-клеток имеют антиген незрелых лимфоцитов — CD5, а отсутствие экспрессии на большинстве В-клеток ПКК антигена ОКВ7, являющегося маркером зрелых В-клеток, свидетельствует в пользу их незрелости. Вместе с тем антиген HLA-DR встречается на них с частотой, подобной В-клеткам ПК детей старшего возраста [5]. Следует отметить, что существуют различия в ответах ранних и зрелых В-клеток на анитела к IgM и на поливалентные антигены [3, с. 153], обусловленные особенностями иммунобиологии этих клеток. В частности, примечательны различия, связанные со способностью к восстановлению иммуноглобулиновых рецепторов, устраненных в результате шеддинга после их контакта с лигандом. Ранние В-клетки, в отличие от “зрелых”, не способны к их ресинтезу и в дальнейшем остаются функционально неактивными. Таким образом, воздействие поливалентного антигена может стать для незрелой В-клетки негативным “толерогенным” сигналом даже при его очень низких концентрациях. Возможно, этим обусловлена способность ранних В-клеток новорожденных индуцировать толерантность к компонентам собственного организма. Можно предположить, что воздействие антигенов реципиента на незрелые В-клетки трансплантата способно стать таким “толерогенным” сигналом. Механизм лиганд-рецепторных взаимодействий такого рода реализуется на уровне незрелых (пре-В-клеток), экспрессирующих преимущественно тяжелые цепи иммуноглобулинов. Как известно, в цитоплазме ранних, быстро размножающихся пре-В-клеток содержатся μ -цепи IgM. Легкие цепи начинают экспрессироваться по мере дифференцировки В-лимфоцитов и имеются как на зрелых В-клетках, так и на незрелых [3, с. 161]. Следовательно, факт превышения в ПКК процента В-клеток с тяжелыми цепями над процентом В-клеток с легкими цепями может служить косвенным доказательством в пользу незрелости В-клеток ПКК.

Важной характеристикой любой иммунокомпетентной ткани является состояние входящих в нее ЕК-клеток ($CD16^+$), принимающих активное участие в реализации иммунных реакций в посттрансплантационном периоде, особенно в процессах, связанных с развитием противоопухолевой цитотоксичности. Согласно результатам [22], существенных различий в количественном содержании $CD16^+$ -клеток в ПКК и ПКВ не отмечается. Однако тот факт, что для ЕК-клеток ПКК характерна сниженная литическая активность в отношении клеток опухолевой линии K562, определил необходимость более детального анализа их структурно-функциональных параметров. Оказалось, что эти клетки содержат значительную субпопуляцию с фенотипом $CD16^+ CD56^-$, в то время как среди ЕК-клеток ПК были обнаружены исключительно субпопуляции с фенотипами $CD16^+ CD56^+$ и $CD16^- CD56^+$. Выявленные в ПКК $CD16^+ CD56^-$ -клетки, обладающие сниженной или полностью отсутствующей литической активностью против K562, по всей вероятности, являются прекурсорами функционально более зрелых $CD16^+ CD56^+$ -клеток. В свою очередь,

CD16⁺CD56⁺-клетки в ПКК обладают литической активностью в диапазоне от ее отсутствия до почти эквивалентной CD16⁺CD56⁺-клеткам ПК. Более того, очевидно, что CD16⁺CD56⁺-ЕК-клетки ПКК потенциально способны созреть фенотипически и функционально в более дифференцированные CD16⁺CD56⁺-клетки, так как семидневная инкубация с интерлейкином-2 (Ил-2) или Ил-12 индуцирует в некоторых, но не всех делящихся и неделящихся CD16⁺CD56⁺-клетках экспрессию CD56-маркера [15].

Важной особенностью ПКК является ее сниженная антиген-презентирующая способность, что объясняется не только немногочисленным содержанием клеток, экспрессирующих антигены HLA II-класса [5, 22], но и более низким уровнем экспрессии этих антигенов на мембране в сравнении с клетками ПК [22].

При исследовании моноцитов ПКК (МПКК) на предмет наличия рецепторов, определяющих функциональную активность клеток в межклеточных иммунных реакциях, были получены данные, свидетельствующие о более низком содержании этих клеток, чем в ПКД (табл. 3). Так, в популяции МПКК определялось меньше антиген-презентирующих клеток, клеток с рецепторами иммунной адгезии, а также рецепторами к Fc-фрагменту иммуноглобулина [5].

Т а б л и ц а 3

Мембранные антигенные структуры моноцитов ПКК (данные Торубаровой Н.А. и др. [5])

Антиген	Концентрация клеток с указанным маркером в ПКК, %	Концентрация клеток с указанным маркером в ПК детей от 3 до 12 лет, %
ИКDR	18,8	31,3
ИКО1	5,0	26,0
ИКО11	11,7	29,8
Sig ⁺	8,95	24,9

Примечание. ИКDR и ИКО1 — антигены HLA класса II; ИКО11 — α-цепь LFA — антиген, обеспечивающий функцию иммунной адгезии; Sig⁺ — фиксированные на мембране иммуноглобулины, по наличию которых можно судить об активности рецептора к Fc-фрагменту иммуноглобулина.

Таким образом, анализ данных литературы характеризует ПКК человека как лимфогемопозитическую ткань, содержащую фенотипически менее зрелые, чем в ПК, субпопуляции ИКК. Не исключено, что такая “фенотипическая незрелость”, будучи неразрывно связанной с функцией клеток, определяет особенности реализации механизмов, способствующих снижению выраженности иммунных конфликтов при трансплантации ПКК.

Сопоставление результатов исследований, оценивающих функциональную зрелость ИКК ПКК, дополняет представление об особенностях ее иммунологического статуса.

Одной из важнейших функций клеток, относящихся к акцессорно-регуляторным и эффекторным элементам лимфогемопозитической системы, является способность продуцировать различные цитокины. Баланс и общее количество продуцируемых ИКК цитокинов управляет состоянием клеточно-обусловленного иммунитета и системного воспалительного процесса, развивающегося как в “интактном” организме, так и после трансплантации аллогенной иммунокомпетентной ткани. В широком спектре методических подходов к идентификации продукции лимфокинов наиболее надежным является тест с применением Ил-зависимого роста клеточных культур в системе *in vitro* [3, с. 129]. Так, для оценки продукции Ил-2 используют специфические Ил-2-зависимые линии Т-клеток. Не исключена также возможность измерения уровней Ил-2 и интерферона-γ (ИФ-γ) радиоиммунологическими методами. По данным

Kowano Y. et al. [25], лимфоциты ПКК не продуцируют Ил-2 и нечувствительны к действию этого медиатора в аутологичной смешанной лимфоцитарной реакции, что можно объяснить отсутствием на лимфоцитах ПКК рецептора к Ил-2 [5]. И все же определенные условия позволяют индуцировать способность клеток отвечать на Ил-2 [25]. Было обнаружено, что стимулированными клетками ПКК являются Т-клетки с фенотипом ОКТ4⁺, чувствительность которых к Ил-2, а также продукция ими Ил-2 активировались молекулами HLA-DR и HLA-DQ не-Т-клеток. Интересно, что исходные плотности этих антигенов на мембране не-Т-клеток ПКК оказались ниже, чем на клетках ПКВ. Возможно, этим объясняется сниженная активность синтеза Ил-2 лимфоцитами ПКК (0,65 МЕ), стимулированными фитогемагглютинином (ФГА), по сравнению с лимфоцитами ПКД (до 5,6 МЕ), которая была обнаружена при использовании в качестве тест-системы клеточной линии CTLL [5]. Значительное увеличение экспрессии HLA-DQ отмечено [25] после воздействия на не-Т-клетки ПКК ИФ-γ, что сопровождалось проявлением способности Т-клеток ПКК продуцировать Ил-2, а также отвечать на его добавление к смешанной культуре. Данный факт свидетельствует о несовершенстве функции не-Т-клеток ПКК, которое проявляется при постановке аутологичной смешанной лимфоцитарной реакции. Однако существует возможность коррекции их функции посредством усиления экспрессии HLA-DQ-антигена под действием экзогенного ИФ-γ и повышения аутокринной активности, т.е. функционального созревания лимфоцитов ПКК при воздействии ИФ-γ и Ил-2 в плане продукции и акцепции регуляторных цитокинов, в частности Ил-2 [25].

С целью выяснения причин функциональной неполноценности Т-клеток ПКК, таких как цитолиз, пролиферация в ответ на антигенную стимуляцию и др., была определена способность этих клеток к продукции различных медиаторов (Ил-2, Ил-4, Ил-6, ИФ-γ, ФНО-α (фактор некроза опухоли-α), ГМ-КСФ (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор)) в условиях стимуляции Ил-2, ФГА, ФГА+Ил-2 [22]. Как показали результаты исследований, основанных на использовании метода обратной транскриптазно-полимеразной реакции — reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), клетки ПКК не способны спонтанно продуцировать лимфокиновые mRNA. Тем не менее в отличие от лимфоцитов ПКВ, которые не реагировали на добавление Ил-2, этот лимфокин вызывал продукцию клетками ПКК низких уровней mRNA Ил-4, средних уровней mRNA Ил-2 и больших количеств mRNA ГМ-КСФ. В свою очередь, добавление к лимфоцитам ПКК митогена ФГА вызвало увеличение продукции Ил-4 и Ил-6 до средних уровней без увеличения продукции Ил-2 и ГМ-КСФ, наблюдаемой при добавлении Ил-2. Продукция ФНО-α была либо едва определяемой, либо отрицательной, как и продукция ИФ-γ. Двойная стимуляция клеток ПКК ФГА+Ил-2 не изменила уровни лимфокиновых mRNA, полученные после стимуляции только ФГА, что подтверждалось аналогичной продукцией ИФ-γ и ФНО-α. В свою очередь лимфоциты ПКВ, стимулированные митогеном ФГА, продуцировали достаточно высокие уровни mRNA каждого из лимфокинов, а двойная стимуляция ФГА и Ил-2 вызвала некоторое повышение продукции mRNA ИФ-γ [22].

Таким образом, клетки ПКК более предрасположены к продукции ГМ-КСФ, чем Ил-2, Ил-4, и тем более Ил-6, при всех условиях стимуляции. Такая степень выраженности продукции колониестимулирующего медиатора является отличительной чертой ПКК относительно клеток ПКВ, значительно уступающих в его продукции. Особенности продукции регуляторных цитокинов может свидетельствовать о предрасположенности клеток ПКК нарабатывать

преимущественно гемopoэтические факторы роста на этой стадии своего развития. Более того, стимуляция ПКК с помощью Ил-2 перед трансплантацией ее клеток реципиенту может быть полезной для преимущественного гемopoэтического восстановления.

Крайне важно, что клетки ПКК ни при каких условиях не проявляли способности нарабатывать значительные количества ИФ- γ и ФНО- α [22, 39], относящиеся к классу цитотоксических лимфокинов (лимфотоксин и ИФ- γ действуют синергично: ИФ- γ стимулирует в клетках образование рецепторов лимфотоксина и тем самым повышает их чувствительность к его воздействию [3, с. 131]). Это обстоятельство может объяснить отсутствие генерации цитотоксических клеток ПКК в ответ на митогенную стимуляцию [22].

В то же время остается неясным, почему клетки ПКК не могут пролиферировать, подобно лимфоцитам ПКВ, при стимуляции ФГА на фоне проявленной ими способности к продукции Ил-2 [22, 39]. Возможно, что клеточная пролиферация ПКК ингибируется Ил-4, уровень секреции которого в ПКК сопоставим, а при некоторых условиях стимуляции даже превышает ПКВ [22]. Вполне возможно, что в ПКК в большей концентрации, по сравнению с ПКВ, присутствуют $CD4^+$ Т-хелперы типа 2 (Тх-2) (а может быть, и более ранние их предшественники — $CD4^+$, “тип 0”), продуцирующие Ил-4 [27]. Данный медиатор, как известно, проявляет ингибирующее влияние в отношении цитотоксической активности Т-клеток, что также сопоставимо со сниженным цитотоксическим эффектом ПКК.

Исследования причин сниженной функциональной активности лимфоцитов ПКК и неонатальной ПК в иммунных реакциях, проведенные Saito Sh. et al. [38], позволяют объяснить такого рода феномен с позиций сниженной экспрессии рецепторов Ил-2 фетальными и неонатальными лимфоцитами в сравнении с лимфоцитами ПКВ. В частности, было показано, что экспрессия Ил-2-рецепторной γ -цепи (Ил-2R γ), являющейся также рецептором для Ил-4, Ил-7, Ил-9, Ил-15 на лимфоцитах ПКК, составляет только 1/3 степени экспрессии этой же цепи на лимфоцитах ПКВ. Редуцированная экспрессия γ -цепи наблюдалась на всех $CD4^+$ -, $CD8^+$ -, $\gamma\delta$ -Т-клетках, В-клетках, $CD16^+$ и $CD56^{bright(ярких)}$ ЕК ПКК. После 3 дней культивирования *in vitro* ПКК и крови новорожденных 3-дневного возраста экспрессия γ -цепи достигала 2/3 уровня экспрессии на клетках взрослых, что свидетельствует о быстром функциональном созревании лимфоцитов после рождения [38].

С целью объяснения механизмов функциональной незрелости Т-клеток ПКК на молекулярном уровне была предпринята попытка непосредственной стимуляции их сигнальных трансдукционных путей с помощью активатора опухоли — tumor promoter — 12-*o*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (ТРА) и ионофора кальция (А 23187) [34]. Было установлено, что при такой стимуляции Т-клетки ПКК не способны достигать уровня пролиферации Т-клеток взрослого, проявляя функциональную незрелость. Феномен, по мнению авторов, обусловлен тем, что сигнальные трансдукционные пути, возникшие сразу после выхода Т-клеток из тимуса в ПКК, все еще сохраняют незрелость регуляторного механизма. Однако в подобного рода опытах по изучению ответа Т-клеток на стимуляцию конкавалином А было показано, что Т-клетки ПКК способны экспрессировать сходные со взрослыми Т-клетками уровни Ил-2-рецепторов, продуцировать одинаковые количества Ил-2 и отвечать пролиферацией подобно взрослым Т-клеткам с экзогенным рекомбинантным Ил-2 [25, 34]. Такое несоответствие результатов объясняется, по-видимому, различными механизмами активационного действия стимуляторов на клетку, а также

клеточной гетерогенностью состава Т-клеток ПКК. При изучении механизма клеточной активации значительные преимущества над клеточными митогенами имеют ТРА и А 23187, так как они действуют не через специфические рецепторы на клеточных поверхностях, а непосредственно на интрацеллюлярные мишеневые молекулы — активаторы функциональной активности Т-лимфоцитов. Эти реагенты, действуя вместе, сильно стимулируют Т₃-Ti- и Ил-2-медиаторные сигнальные трансдукционные пути. В частности, ТРА влияет на одно из звеньев биохимического механизма активации Т-клеток — протеинкиназу С, а ионофор кальция А 23187 поднимает уровень внутриклеточного кальция (Ca^{2+}) [34]. Увеличение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} активирует различные ферментные системы, что в итоге приводит к стимуляции синтеза Т-клеткой РНК, белка и Ил-2 [3, с. 111]. Незрелость внутриклеточных трансдукционных сигнальных путей Т-клеток ПКК выражается в низкой эффективности индукции активации в фазах активации и пролиферации по сравнению с Т-клетками ПКВ. В свою очередь такая сниженная функциональная активность подразумевает значительно меньшую способность экспрессировать Ил-2-, HLA-DR-рецепторы, индуцировать выраженную степень сродства Ил-2Р-комплексов, продуцировать молекулы Ил-2, непосредственно участвующих в процессе индукции пролиферации. Такого рода особенности прямо коррелируют с функциональной незрелостью Т-клеток ПКК [34].

Не вызывает сомнений, что для разработки соответствующих методов предупреждения развития иммунных конфликтов при пересадке гемопоэтической ткани необходимо иметь достаточно четкое представление о патофизиологических основах развития ситуации в организме реципиента. В настоящее время накоплены достаточные экспериментальные и клинические доказательства причастности дисрегуляции продукции цитокинов к индукции и развитию БТПХ [27]. В ее патогенез вовлечены многочисленные цитокины, причем при тяжелой форме БТПХ наблюдается избыток продукции некоторых из них [11, 27, 39, 40]. Степень клеточного иммунного ответа и развитие системно-воспалительных реакций после трансплантации аллогенного КМ предположительно определяются балансом цитокинов, продуцируемых двумя типами клеток-хелперов: Тх-1 CD4^+ (Ил-2, ИФ- γ , ФНО- α , ФНО- β) и Тх-2 CD4^+ (Ил-4, Ил-5, Ил-6, Ил-10, Ил-13). Между типами Тх-1 и Тх-2 существуют конкурентные взаимоотношения, поскольку цитокины Тх-1 угнетают функцию Тх-2-клеток, и наоборот [27]. Krenger W., Ferrara J. считают, что если цитокины, продуцируемые вторым типом Тх могут ингибировать продукцию провоспалительных цитокинов Ил-2 и ФНО- α , то сдвиг в сторону цитокинов типа-2 в начальном ответе донорских Т-клеток на аллоантигены хозяина может изменить характер цитокиновой продукции после трансплантации аллогенного КМ, т.е. являться одним из вариантов предупреждения и лечения острой БТПХ. Такого рода вмешательство с целью специфической минимизации ответа донорских Т-клеток на аллоантигены хозяина и уменьшения проявлений БТПХ является альтернативой истощению Т-клеток при клинической трансплантации КМ, часто являющейся причиной повышенного риска релапса опухоли и снижения приживления миелотрансплантата [27, 40].

Типичным примером значимости изменения концентрации цитокинов типа-1 и типа-2 для трансплантата является беременность. Эмбрион рассматривается как аллотрансплантат, который, являясь потенциальной мишенью для материнской иммунной системы из-за наличия антигенов главного комплекса гистосовместимости отца, в норме не отторгается до момента рождения. Развитие угрозы прерывания беременности иммунологической природы

протекает на фоне снижения продукции цитокинов типа-2. Концепция “иммунологической толерантности зачатия” отводит цитокинам Т-клеточного происхождения центральную роль в регуляции как выживания, так и отторжения фетального аллотрансплантата [36].

Chen N. et al. предлагают модель “неонатальной толерантности”, обусловленную усилением цитокинов типа-2 и минимизацией цитокинов типа-1 при инициальном иммунном ответе на аллотрансплантат. Их данные подтверждают концепцию, что толерантность является результатом “иммунопереадресованности” в пользу “толерогенных” $CD4^+$ -клеток, продуцирующих второй тип цитокинов. Одновременное манипулирование продукцией цитокинов типа-1 и типа-2 в посттрансплантационном периоде может увеличить выживаемость органного аллотрансплантата [11]. Продукция Тх-2-типа цитокинов может играть центральную роль в индукции и поддержании аллотрансплантационной толерантности. Вполне возможно, что показатель Тх-1/Тх-2 лежит в основе понимания всего комплекса механизмов отторжения и толерантности при трансплантации (Suthanthiran M., Strom T., Nickerson P. et al., цит. по [36]).

Спектр характерных особенностей ИКК ПКК не ограничивается примерами, приведенными выше. Lee S. et al. [30] обнаружили различия между мононуклеарами (МН) ПКК и ПКВ в протеин-продукции и регуляции генной экспрессии Ил-12 как цитокина, участвующего в осуществлении многих биологических функций ЕК и Т-клеток. Оказалось, что протеин-продукция и Ил-12 mRNA-экспрессия в активированных МН ПКК снижены в сравнении с МН ПКВ, причем период полужизни Ил-12mRNA, продуцированной активированными МН ПКК, был почти в 3 раза короче. Такие различия в Ил-12-продукции, по мнению авторов, являются вторичными по отношению к измененной посттрансплантационной регуляции. Сниженная способность МН ПКК к продукции Ил-12 в ответ на стимуляцию может способствовать снижению продукции ИФ- γ и ЕК-клеточной цитотоксичности, тем самым частично участвуя в формировании “незрелости” клеточного иммунитета, инициирующего менее выраженную БТПХ при трансплантациях ПКК [29, 30]. Однако, с нашей точки зрения, сниженная способность МН ПКК продуцировать Ил-12 может иметь как раз первостепенное значение в минимизации проявлений БТПХ при ТПКК, поскольку именно Ил-12 является ведущим триггерным медиатором, активирующим функцию Тх-1-клеток [27, 36].

Приведенные сравнительные экспериментальные данные относительно лимфокиновой продукции лимфоцитами ПКК и ПКВ наводят на мысль о существовании некоторого природного смещения цитокинового профиля ПКК в сторону медиаторов типа 2. Вместе с тем существуют и несколько противоречащие такому утверждению данные о более низких показателях максимума продукции Ил-4 стимулированными с помощью липополисахарида — ЛПС и ФГА МН ПКК в сравнении с МН ПКВ [39]. Известно, что ФГА и ЛПС воздействуют преимущественно на популяции функционально зрелых ИКК. В таком случае не исключено, что для Тх типа-2 указанные реагенты не являются “оптимальными” стимуляторами продукции Ил-4. И все же, если данные о смещении баланса цитокинпродукции клетками ПКК в сторону лимфокинов типа-2 будут подтверждены дальнейшими исследованиями, это может быть убедительным объяснением феномена снижения риска развития тяжелой БТПХ у реципиентов с трансплантатом ПКК.

Представив реактивность иммунокомпетентной ткани в образе “пирамиды”, цитотоксичность клеток можно считать более высоким ее уровнем по отношению к их экзокринной функции, так как активность продукции цито-

кинов является одним из промежуточных этапов формирования цитотоксичности и определения степени ее выраженности.

Многие исследователи обращались к изучению этой функции клеток ПКК, используя различные методики. В частности, Harris D.T. et al. [22] провели исследования цитотоксичности лимфоцитов ПКК, экспонируя их с определенными стимуляторами в среде культивирования от 5 до 7 дней. Так, для исследования ЕК-активности использовалась клеточная линия K562 эритролейкемии человека. Для детерминации цитотоксичности, опосредованной лимфокин-активированными киллерными клетками (ЛАКК), были выбраны ЕК-резистентные клеточные линии IM9 (В-клеточная лимфома человека) и P815 (мышьяная мастоцитома). И, наконец, добавление ФГА было использовано для определения смешанной тотальной цитотоксичности в культурах (лектин-зависимой клеточной цитотоксичности (ЛЗКЦ)). Прежде всего, авторами не было обнаружено какой-либо литической активности интактных клеток ПКК. Однако культивирование в течение 12 ч, а также 5–7 сут с высокими дозами Ил-2 (1000 ед/мл) сопровождалось быстрым развитием значительной ЕК-литической активности. Этот показатель стимулированных ФГА или ФГА+Ил-2 клеток был в тех же пределах, что и при культивировании клеток только с Ил-2. ЛАК-клеточная активность эффекторных клеток ПКК не повышалась, так как имела место ингибция лизиса ЕК-резистентных клеток-мишеней (и IM9, и P815) без добавления лектина. Для сравнения, интактные лимфоциты ПКВ проявляли ЕК-литическую активность против K562-мишеней. После культивирования при аналогичных условиях с Ил-2 развивался ЛАКК-цитотоксизм как против K562-, так и против IM9-мишеней. Добавление только митогена или комбинации ФГА с Ил-2 еще в большей степени повышало литическую активность ЕК-клеток и ЛАКК. Таким образом, полученные данные продемонстрировали принципиальные различия инициации и реализации цитотоксических эффекторных реакций клетками ПКК и ПКВ. Такого рода феномен, вероятно, связан с особенностями Т-клеток ПКК, а именно, сниженной цитокинрецепцией, а также несвершенством внутриклеточных молекулярных механизмов активации этих клеток, о чем упоминалось выше [34, 38]. С целью более детального анализа возможных причин, обуславливающих данный феномен, клетки ПКК и ПКВ, полученные в результате культивирования, были проанализированы с помощью проточной цитометрии [22]. Несмотря на то, что количества $CD3^+$ -клеток в культурах ПКК и ПКВ были сходными, суспензии ПКК содержали меньшее количество $CD8^+$ -клеток. Большинство клеток, обнаруженных в каждой из ПКК-культур, имели $CD4^+$ -фенотип. Количественных отличий в содержании ЕК-клеток ($CD3^+CD16^+$) отмечено не было, что, по мнению авторов, свидетельствует об отсутствии дефицита в ПКК этого типа эффекторных клеток. Тем не менее было обращено внимание на наличие качественных различий субпопуляций этих клеток в суспензиях ПКК и ПКВ: при культивировании ПКК формировалась популяция клеток, относящихся к фенотипу $CD16^+ TCR\alpha/\beta^+$, чего не наблюдалось в культурах лимфоцитов ПКВ. Возможно, именно эти клетки могут отвечать за реализацию неспецифической литической активности, которая, в свою очередь, может быть необходимой для потенциальной способности активированных ПКК-клеток проявлять ТПЛ-активность [22].

Вместе с тем необходимо учитывать, что на этапах онтогенетического развития четкой корреляции между клеточно-опосредованным лимфолизисом и реакцией в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ) не существует. Так, Granberg Ch., Hirvonen T. [20] не выявили способности к клеточному лимфолизису

(КЛ) изолированных из тимуса и селезенки плодов от 12 до 23 недель гестации лимфоцитов, хотя при постановке СКЛ с целью приготовления эффекторных клеток отмечалось наличие четких проявлений реакции. По данным этих же авторов, лимфоциты ПКК время от времени проявляют вполне развитую способность к КЛ, хотя в среднем она все же примерно в два раза ниже, чем у лимфоцитов ПКВ. При исследовании пролиферативной способности в ответ на различные антигенные стимулы было обнаружено, что Т-клетки ПКК слабо реагируют на митоген, но показывают высокие уровни аутоиндуцированной пролиферации в СКЛ [22]. Такая активность может быть результатом повышенного ответа аутореактивных иммунокомпетентных клонов в пуле неонатальных клеток, возможно, в дальнейшем элиминируемых путем положительной и отрицательной селекции в периферических лимфоидных органах [1]. Как и следовало ожидать, стимуляция Ил-2 или ФГА, а также их комбинацией вызывает довольно низкий пролиферативный ответ клеток ПКК, в то время как лимфоциты ПКВ проявляют значительную пролиферативную активность в ответ на все возможные варианты такого рода стимуляции. Важно, что клетки ПКК минимально пролиферируют в ответ на стимуляцию опухолевыми клетками, имеющими различия по HLA-антигенам (клетки В-клеточной лимфомы IM9 несут HLA-антигены классов I и II; клетки Т-клеточной лейкемии человека HSB несут HLA-антигены класса I). При этом пролиферирующими являются клетки, проявляющие высокий уровень неспецифической литической активности. Остается неясным, могут ли какие-либо из этих клеток генерировать также антиген-специфическую цитотоксичность. В то же время лимфоциты ПК способны к выраженной пролиферации в ответ на стимуляцию этими же опухолевыми клеточными линиями [22]. Таким образом, становится очевидным, что в ПКК содержатся ИКК, которые слабо отвечают на антигенную стимуляцию, а генерированные при этом клетки в первую очередь являются ЕК или ЕК-подобными клетками.

Очередной раз обобщая приведенные выше данные, можно прийти к выводу, что ПКК человека содержит более примитивные (незрелые) популяции ИКК, чем ПКВ. Такое заключение является весьма важным, так как опровергает предположения некоторых авторов о наличии в ПКК высоко цитотоксических эффекторных клеток [31], что само по себе избавляет от необходимости элиминации из трансплантата ПКК зрелых антиген-реактивных Т-лимфоцитов с целью минимизации РТПХ. Сохранение этих клеток в трансплантате ПКК обеспечивает возможность реализации ее противоопухолевой активности, т.е. развития ТПЛ-реакции [6]. Данные о составе популяций и функциональной активности ЕК и ЕК-подобных клеток ПКК свидетельствуют о возможности и их участия в реализации ТПЛ-эффектов. В пользу этого свидетельствует факт наличия характерной для ПКК популяции $CD16^+ TCR\alpha/\beta^+$, предположительно отвечающей в активированной форме за ТПЛ-реакцию. Совместно с ними в противоопухолевом эффекте могут участвовать и содержащиеся в значительном количестве в ПКК $CD16^+ CD56^-$ клетки. Хотя они и проявляют сниженную литическую активность в отношении опухолевых клеток K562, однако могут вступать во взаимодействие с мишенью. Эти клетки способны созреть до $CD56^+$ -положительных полноценных ЕК-клеток под действием цитокинов Ил-2 и Ил-12 [15], а также до клеток, проявляющих противоопухолевую ЛАК-цитотоксичность [45]. Активация лимфоцитов ПКК отмечается и под действием рекомбинантного Ил-2, о чем свидетельствует повышение их цитотоксической активности в отношении K562 и COLO-клеток. Значительное превосходство цитотоксичности ак-

тивированных лимфоцитов ПКК над ПКВ реализовалось за счет преимущественной генерации $CD56^+$ ЕК-клеток. Выраженное формирование в данном случае $CD56^+$ -клеток могло быть следствием более высокого, чем на зрелых периферических лимфоцитах, уровня поверхностной экспрессии рецепторов Ил-2 R_β (p 75) [33]. Интересно, что устойчивая цитотоксичность и рост активированных фетальных ЕК могут быть одним из механизмов реализации феномена “гибридной резистентности” во время беременности, обеспечивая “нейтрализацию” аллореактивных материнских ИКК, преодолевающих плацентарный барьер. Подобного рода клетки, реализующие механизм “гибридной резистентности” могут принимать участие и в реализации реакции ТПЛ после введения ПКК пациентам с опухолевыми заболеваниями.

Таким образом, кроме утверждения фенотипической и функциональной незрелости лимфоцитов ПКК, определяющей снижение риска развития БТПХ после ее трансплантации в сравнении с трансплантациями КМ и ПК, есть основания считать, что ПКК является также источником противоопухолевых цитотоксических эффекторных клеток. Такие качественные характеристики могут быть использованы как основополагающие для применения новейших *ex vivo*- и *in vivo*-методик иммунотерапии с целью увеличения антиопухолевой цитотоксичности ПКК [15, 22, 29, 33, 45].

В последнее время начаты работы в этом направлении. Так, Indes J. et al. [23] показали, что Ил-12 в комбинации с низкой дозой Ил-2 значительно увеличивают ЕК- и ЛАК-активность ПКК против SK-N-MC и NB-100 нейробластомной клеточной линии. Оказалось, что Т-клетки ПКК, наряду с NB-100- и SK-N-MC-клетками, являются удачными мишенями для Ил-12-ретровирусной трансдукции. Эти трансдуцированные клетки продуцируют уровни Ил-12 mRNA и белка в 3–5 раз превышающие базовые. В перспективе предполагается исследовать действие Ил-12-трансдуцированных Т-клеток ПКК, NB-100- и SK-N-MC -клеток с низкими дозами Ил-2 при трансплантациях CD34+ стволовых клеток ПКК человека иммунодефицитным мышам (hu/NOD/SCID) с предопухолевыми процессами. Целью таких исследований является повышение иммунной функции ПКК *in vivo* с помощью Ил-12/Ил-2, а удачно Ил-12-трансдуцированные специфические опухолевые клетки предполагается применять в качестве активаторов противоопухолевой активности.

В свою очередь Suen Y. et al. [44] показали, что компенсация “незрелости” клеточного иммунитета ПКК при экзогенной стимуляции Ил-12 ее моноцит-истощенных мононуклеарных клеток происходит за счет увеличения продукции ИФ- γ , ЕК- и ЛАК-цитотоксичности, что повышает противоопухолевый потенциал ПКК в посттрансплантационном периоде. Кроме того, авторы подтвердили, что стимуляция Ил-12 в сочетании с низкой дозой Ил-2 может снизить риск развития рецидива опухолевого заболевания после трансплантации ПКК за счет увеличения ЕК- и ЛАК-активности.

Сопутствующие факторы, определяющие иммунореактивность ПКК. При рассмотрении ПКК в качестве одного из главных источников гемопоэтических клеток при лечении тех или иных патологий лимфогемопоэтической системы и ее преимуществ в сравнении с КМ и ПК в плане иммунореактивности необходимо учитывать факт возможного присутствия в ПКК иммунокомпетентных клеток материнской крови. Степень “загрязнения” неонатальной крови материнскими Т-лимфоцитами — один из основных вопросов, требующих дальнейшего рассмотрения с целью выяснения значимости этой проблемы и соответственно унификации методик применения ПКК в качестве трансплантата. Предел проникновения клеток из материнской гемоциркуляции в

фетальную до и во время родов не известен, но он может быть достаточно высоким [17, 31, 37, 42]. При этом контаминация ПКК материнскими Т-лимфоцитами, неполностью идентичными с HLA-антигенами плода, может способствовать развитию (ужесточению выраженности) БТПХ после трансплантации этой ПКК [31, 41]. Вероятность развития такой ситуации требует разрешения следующих вопросов: 1) присутствуют ли лимфоциты в образцах собранной ПКК; 2) если да, то как часто это встречается и каковы при этом максимальные уровни “загрязнения”; 3) каковы допустимые пределы загрязнения, не влияющие на приживление и функцию трансплантата [37].

Одним из доказательств существования трансплацентарного переноса материнских лимфоцитов является наличие химеризма у более чем 25% детей с тяжелыми комбинированными иммунодефицитами (сообщение R. O'Reilly, 1992, цит. по [37]). По мнению Rubinstein P. et al. [37], возможно, что такое проникновение материнских лимфоцитов в циркуляцию ребенка случается и у здоровых новорожденных. Несмотря на то, что случаи обнаружения материнских лимфоцитов или их DNA в крови здоровых новорожденных являются скорее редкостью, чем правилом [7, 16, 42, 47], большинство авторов все же склонны считать необходимым проведение исследований для усовершенствования методик обнаружения материнских лимфоцитов в ПКК [7, 35, 37, 41, 42]. Такая необходимость определяется клиническими данными о, хотя и единичных, однако массивных переносах крови от матери к плоду, а следовательно, возможностью существования в виде исключения значительных уровней загрязнения образцов ПКК материнскими клетками. Так, Rubinstein P. et al. [37] тестировали 17 образцов ПКК на наличие DNA материнских клеток. Используя методические подходы с высокой разрешающей способностью (выявление одной материнской клетки на 10 000 клеток плода), авторы не обнаружили ни в одном из исследованных образцов материнских DNA. По результатам более поздних исследований идентификации материнской DNA в ПКК [42] с применением высокочувствительного метода полимеразной цепной реакции в 10 из 47 экземпляров было идентифицировано присутствие материнских структур. В трех положительных случаях материнские DNA определялись в сепарированных полиморфноядерных мононуклеарах и Т-лимфоцитах на тех же уровнях, что и в цельной крови. Пределы “загрязнения” материнскими клетками были на уровне: одна материнская клетка на 10^4 – 10^5 ядерных клеток ПКК. По мнению авторов, присутствие материнских клеток на таких низких уровнях не влияет на развитие БТПХ при клинических трансплантациях, но не исключает трансмиссии вирусов (в частности ВИЧ) от инфицированной матери к ребенку.

Таким образом, угроза проникновения в ПКК материнских полуаллогенных по отношению к трансплантату по системе HLA Т-лимфоцитов в количествах, способных вызвать БТПХ у реципиента этой ПКК, представляется теоретически возможной, хотя практических подтверждений таким уровням контаминаций ПКК в настоящее время нет. И все же такая теоретическая возможность определяет необходимость тестирования всех образцов ПКК, предназначенных для трансплантации, на содержание материнских Т-лимфоцитов. Особую значимость такие исследования приобретают при условии необходимости введения экстраординарно больших образцов ПКК [7].

Еще одним отрицательным моментом при трансплантации ПКК может явиться присутствие в результате трансплантационного переноса в составе плазмы ПКК материнских антител к унаследованному плодом HLA-антигенам отца [37]. Наличие в образце ПКК таких антител может влиять на при-

живление и функционирование гемопоэтических предшественников в организме реципиента. Хотя сообщений о наличии таких материнских антител в плазме уже приготовленных к трансплантации экземпляров не было, все же считается необходимым проведение исследований по изучению *in vitro* их действия на трансплантируемые гемопоэтические клетки. Очевидно, не будет необходимости в заострении внимания на этой проблеме, если удалять плазму при приготовлении трансплантата.

Одной из особенностей трансплантата ПКК является отсутствие противoinфекционного иммунитета. Реципиенты плацентарной крови при восстановлении костномозгового кроветворения могут стать иммунологически незащищенными против некоторых важных инфекций, так как доноры ПКК не подвергались вакцинациям и воздействию распространенных инфекционных агентов, которыми взрослые доноры обычно иммунизированы [37]. С целью повышения способности трансплантата ПКК к защите хозяина от инфекции предложена иммунизация лимфоцитов плацентарной крови *in vitro* (Wade Parks, 1991, цит. по [37]). С другой стороны, хорошо известно, что острая форма БТПХ встречается тем реже, чем моложе донор кроветворной ткани [4, 17], а также чем меньше в его анамнезе вирусных заболеваний. Такая закономерность является следствием ограничения активации клеточного звена иммунитета и иммунной системы в целом антигенными раздражителями на протяжении жизни [17]. Следовательно, редуцированная способность ПКК осуществлять противoinфекционную защиту как результат отсутствия сенсibilизации ее ИКК антигенными раздражителями в онтогенезе, с одной стороны, является недостатком, с другой — преимуществом трансплантируемого материала. Кроме того, следует учитывать, что в снижении иммунореактивности неонатальной крови определяющими могут быть многие другие факторы. Так, известны примеры снижения иммунореактивности при введении в организм антител [3, с. 135]. Например, для предотвращения первичной сенсibilизации резус-антигеном резус-отрицательным беременным вводят анти-D-антитела. Подобно этому подавляется иммунный ответ новорожденных при их вакцинации персистирующими материнскими антителами. В таком случае трансплацентарный перенос в кровь донора материнских антител к HLA-антигенам отца может сыграть свою роль в подавлении развития РТПХ при родственных аллотрансплантациях ПКК с такого рода антителами в случае, если реципиент и донор являются сибсами, различными по этим антигенам.

Еще один механизм антигенспецифического подавления реакции на аллотрансплантат развивается при так называемом состоянии “специфической гипореактивности” [3, с. 253]. По предположению Бернета и Феннера, потенциальные антигены при возможности взаимодействия с иммунологически незрелыми лимфоидными клетками в пренатальном периоде лишают ИКК возможности в будущем реализовать специфический иммунный ответ против себя. Чужеродные клетки, попадая в организм до рождения, в дальнейшем воспринимаются его иммунной системой как свои. Уже получена такого рода иммунологическая толерантность при искусственном введении антигенов в пре- или неонатальном периоде [3, с. 151]. Существование у человека природно-специфической иммунологической толерантности к неунаследованным материнским антигенам уже частично доказано [12]. Таким образом, трансплантаты плацентарной крови могут быть особенно подходящими для реципиентов, чьи несовместимые с донором HLA-антигены являются неунаследованными материнскими антигенами для донора [37]. Если такая закономерность подтвердится дальнейшими наблюдениями, будут повышены

шансы подбора адекватного донора для пациентов, имеющих доноров-сиблингов, не полностью идентичных по HLA-антигенам, при условии, что эти антигены являются материнскими. Уже произведена удачная трансфузия такого трансплантата, когда донор и реципиент, являясь сиблингами, были идентичны по HLA-DR -аллелям, но отличались по HLA-A и -B-аллелям материнского происхождения [46].

Таким образом, детальный анализ особенностей ПКК как иммунокомпетентной ткани позволяет сделать ряд важных выводов, относящихся главным образом к прикладным аспектам трансплантологии, иммунологии, иммуногематологии. Фенотипическая и функциональная незрелость ИКК ПКК, выражающаяся прежде всего в особенностях популяционного состава эффекторных клеток, диспропорции продукции медиаторов и чувствительности к ним, сниженной цитотоксической реактивности, является предпосылкой формирования иммунологической толерантности этой ткани, что клинически выражается в снижении частоты и выраженности проявлений БТПХ после ТПКК, по сравнению со случаями ТКМ. Тем не менее потенциал противоопухолевой цитотоксичности позволяет надеяться на эффективность этой ткани в плане развития ТПЛ-эффекта. Наиболее предпочтительно применение ПКК при отсутствии потенциального HLA-идентичного донора КМ, как при родственных, так и при неродственных трансплантациях, так как редуцированная ТПХ-активность дает возможность использовать эти клетки в ситуациях неполной совместимости пар донор-реципиент. При этом еще предстоит выяснить степень допустимости таких различий. Вполне возможно, что в случае трансплантации неполностью совместимых клеток ПКК существует меньшая угроза рецидива опухолевого заболевания у реципиента, чем при применении родственных HLA-идентичных клеток ПКК, КМ и ПК. Однако это предположение следует подтвердить практическими наблюдениями.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Головизнин М.В. "Периферизация" процессов тимической селекции Т-лимфоцитов как причина развития аутоиммунных заболеваний // Иммунол. – 1993. – № 5. – С. 4–8.
2. Окулов В.Б., Афанасьев Б.В. Иммунологические аспекты трансплантации костного мозга // Вопр. иммунол. – 1992. – 38, № 4–6. – С. 387–396.
3. Ройт А. Основы иммунологии. – М.: Мир, 1991. – 328 с.
4. Сведенцов Е.П., Шарыгин С.Л., Епифанов Н.С., Матвеев Г.А. Болезнь "трансплантат против хозяина" // Клин. медицина. – 1993. – 71, № 5. – С. 19–23.
5. Торубарова Н.А., Кошель И.В., Яцык Г.В. Кроветворение плода и новорожденного. – М.: Медицина, 1993. – 208 с.
6. Antin J.H. Graft-versus-leukemia: no longer an epiphenomen // Blood. – 1993. – 82, № 8. – P. 2273–2277.
7. Auerbach A.D., Liu Q., Pollack M.S. et al. Prenatal identification of potential donors for umbilical cord blood transplantation for Fanconi anemia // Transfusion. – 1990. – 30, № 8. – P. 682–687.
8. Balduzzi A., Gooley T., Anasetti C. et al. Unrelated donor bone marrow transplantation in children // Blood. – 1995. – 86, № 8. – P. 3247–3256.
9. Broxmeyer H.E. Placental cord blood preservation for clinical bone marrow transplantation // The 33-rd Annual Meeting of the Society for Cryobiology. – Indianapolis, Indiana, USA, 1996. – P. 4.
10. Broxmeyer H.E., Kurtzberg J., Gluckman E. et al. Umbilical cord blood hematopoietic stem and repopulating cells in human clinical transplantation // Blood Cells. – 1991. – 17, № 2. – P. 313–329.
11. Chen N., Field E.H. Enhanced type 2 and diminished type 1 cytokines in neonatal tolerance // Transplantation. – 1995. – 59, № 7. – P. 933–941.
12. Claas F.H.J., Gijbels Y., van der Velden-de Munck J., van Rood J.J. Induction of B cell unresponsiveness to noninherited maternal HLA antigens during fetal life // Science. – 1988. – 241, № 4874. – P. 1815–1817.
13. Foa R., Giubellino M.C., Fierro M.T. et al. Immature T lymphocytes in human cord blood identified by monoclonal antibodies: a model for the study of the differential pathway of T cells in humans // Cell. Immunol. – 1984. – 89. – P. 194–201.
14. Fotund O., Kaplan S. et al. Characterisation of lymphocyte subpopulation in human cord blood using the immunogold staining technique Europe // J. Hematol. – 1987. – 39. – P. 18–22.

15. Gaddy J., Broxmeyer H.E. Functionally and phenotypically distinct cord blood CD16⁺CD56⁻ (natural killer (NK) cells may be precursors of mature CD16⁺CD56⁺ NK cells // *Blood*.– 1995.– 86, № 10, suppl. 1.– P. 715a.
16. Gluckman E., Broxmeyer H.E., Friedman H.S., Auerbach A.L. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical cord blood from an HLA-identical sibling // *N. Engl. J. Med.*– 1989.– 321, № 7.– P. 1174–1189.
17. Gluckman E., Devergie A., Thierry D. et al. Clinical applications of stem cell transfusion from cord blood and rationale for cord blood banking // *Fetal Liver Transplantation*.– 1992.– Suppl.– P. 114–117.
18. Gluckman E., Rocha V., Boyer Chammard A. et al. Results of cord blood transplants in Europe // *Blood*.– 1996.– 88, suppl. 1.– P. 485a.
19. Gluckman E., Traineau R., Brossard Y. et al. Placental cord blood banking and transplant // *Blood*.– 1995.– 86, № 10, suppl. 1.– P. 389a.
20. Granberg Ch., Hirvonen T. Cell-mediated lympholysis by fetal and neonatal lymphocytes in sheep and man // *Cell. Immunol.*– 1980.– 51, № 1.– P. 13–22.
21. Griffiths-Chu S., Patterson J., Berger C. et al. Characterisation of immature T-cell subpopulation in neonatal // *Blood*.– 64, № 1.– P. 296–300.
22. Harris D.T., Schumacher M.J., Locascio J. et al. Phenotypic and functional immaturity of human umbilical cord blood T lymphocytes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.– 1992.– 89, N21.– P. 10006–10010.
23. Indes J., Knoppel E., Chang L. et al. Successful and effective in vitro transduction of cord blood isolated T-cells and tumor cell lines with an interleukin-12 producing retrovirus: implications for future molecular immunotherapy post cord blood transplantation // *Blood*.– 1995.– 86, № 10, suppl. 1.– P. 574a.
24. Jacoby D., Oldstone M. Delineation of suppressor and helper activity within the OKT4-defined T-lymphocyte subset in human newborn // *J. Immunol.*– 1983.– 131.– P. 1765–1770.
25. Kawano Y., Noma T., Yata J. Improvement of decreased interleukin-2 (IL-2) responsiveness and production in autologous mixed-lymphocyte reaction of cord blood lymphocytes by interferon- γ and IL-2 and the role of HLA-DQ antigen // *Cell. Immunol.*– 1987.– 110, № 1.– P. 56–67.
26. Kernan N.A., Bartsch G., Ash R.C. et al. Analysis of 462 transplantations from unrelated donors facilitated by the National Marrow Donor Program // *N. Engl. J. Med.*– 1993.– 328, № 9.– P. 593–602.
27. Krenger W., Ferrara J.L.M. Graft-versus-host disease and the Th1/Th2 paradigm // *Immunol. Research*.– 1996.– 15, № 1.– P. 50–73.
28. Kurtzberg J., Laughlin M., Graham M.L. et al. Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients // *N. Engl. J. Med.*– 1996.– 335, № 3.– P. 157–166.
29. Lee S.M., Suen Y., Chang L. et al. Decreased interleukin-12 from activated cord versus adult peripheral blood mononuclear cells and upregulation of interferon- γ , natural killer, and lymphokine-activated killer activity by IL-12 in cord blood mononuclear cells // *Blood*.– 1996.– 88, № 3.– P. 945–954.
30. Lee S., Suen Y., Knoppel E., Cairo M.S. Decreased interleukin-12 mRNA expression and protein production from activated cord vs. adult mononuclear cells: possible role in the decreased incidence of graft-vs-host disease post cord blood transplant // *Blood*.– 1995.– 86, № 10, suppl. 1.– P. 163a.
31. Linch D.C., Brent L. Can cord blood be used? // *Nature*.– 1989.– 340, № 6236.– P. 676.
32. Lucivero G., Bell'oso A., Dannone A. et al. Phenotypic immaturity of T- and B- lymphocytes in cord blood of fullterm normal neonatal // *Biol. Neonata*.– 1983.– 44, № 5.– P. 303–308.
33. Malygin A.M., Timonen T. Nonmajor histocompatibility complex-restricted killer cells in human cord blood: generation and cytotoxic activity in recombinant interleukin-2 supplemented cultures // *Immunology*.– 1993.– 79.– P. 506–508.
34. Matsuzaki N., Saji F., Okada T. et al. Demonstration of functional immaturity of signal transduction pathways in human cord T cells // *Cell. Immunol.*– 1989.– 124, № 2.– P. 252–263.
35. Petit Th., Raynal B., Socie G. et al. Highly sensitive polymerase chain reaction methods show the frequent survival of residual recipient multipotent progenitors after non-T-cell-depleted bone marrow transplantation // *Blood*.– 1994.– 84, № 10.– P. 3575–3583.
36. Piccinni M.-P., Romagnani S. Regulation of fetal allograft survival by hormone-controlled Th1- and Th2-type cytokines // *Immunol. Res.*– 1996.– 15, № 2.– P. 141–150.
37. Rubinstein P., Rosenfield R.E., Adamson J.W., Stevens C.E. Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution // *Blood*.– 1993.– 81, № 7.– P. 1679–1690.
38. Saito Sh., Morii T., Umekade H. et al. Expression of the interleukin-2 receptor γ chain of cord blood mononuclear cells // *Blood*.– 1996.– 87, № 8.– P. 3344–3350.
39. Sautois B., Fillet G., Beguin Y. Comparison of in vitro production of cytokines by stimulated mononuclear cells from cord or adult blood: possible relevance to allogeneic transplantation // *Blood*.– 1995.– 86, № 10, suppl. 1.– P. 223a.
40. Smith S.R., Termimell C., Pennline K.J. et al. Inhibitory effects of recombinant human interleukin 10 on disease manifestations in a P $\rightarrow$ F₁ model of acute graft versus host disease // *Transplantation*.– 1995.– 59, № 6.– P. 890–896.
41. Socie G., Gluckman E., Carosella E. et al. Search for maternal cells in human umbilical cord blood by polymerase chain reaction amplification of the minisatellite sequences // *Blood*.– 1994.– 83, № 2.– P. 340–344.

42. Socie G., Petit T., Gluckman E. et al. A highly sensitive polymerase chain reaction method reveals the ubiquitous presence of maternal cells in human umbilical cord blood // *Blood*.– 1995.– 86, № 10, suppl. 1.– P. 392a.
43. Solinger A. Immature T-lymphocytes in human neonatal blood // *Cell. Immunol.*– 1985.– 91.– P. 115–122.
44. Suen Y., Chang L., Qian J. et al. IL-12 enhanced IFN- γ protein production NK, and LAK cytotoxicity in cord monocyte depleted mononuclear cells: potential for immunotherapy post cord blood transplantation // *Blood*.– 1995.– 86, № 10, suppl. 1.– P. 977a.
45. Verbik D.J., Gross T.G., Pirruccello S.J. et al. Immunophenotypic and functional analysis of umbilical cord blood cells in comparison with bone marrow and peripheral blood stem cells: potential clinical applications // *Blood*.– 1995.– 86, № 10, suppl. 1.– P. 573a.
46. Vilmer E., Sterkers G., Rahimy C. et al. HLA-mismatched cord blood transplantation in a patient with advanced leukemia // *Transplantation*.– 1992.– 53, № 5.– P. 1155–1157.
47. Wagner J.E., Broxmeyer H.E., Byrd R.L. et al. Transplantation of umbilical cord blood after myeloablative therapy: analysis of engraftment // *Blood*.– 1992.– 79, № 7.– P. 1874–1881.
48. Wagner J.E., Rosenthal J., Sweetman R. et al. Successful transplantation of HLA-mismatched umbilical cord blood from unrelated donors: analysis of engraftment and acute graft-versus-host disease // *Blood*.– 1996.– 88, № 3.– P. 795–802.

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

Поступила 20.02.98

А. М. ГОЛЬЦЕВ, Т. О. КАЛИНИЧЕНКО

ПУПОВИННА КОРДОВА КРОВ ЛЮДИНИ ЯК ДЖЕРЕЛО ГЕМОПОЕТИЧНИХ КЛІТИН ДЛЯ КЛІНІЧНОГО ЗАСТОСУВАННЯ. ЧАСТИНА II. ІМУНОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

На підставі огляду клінічних і експериментальних досліджень проаналізовано особливості імунних взаємодій пуповинної кордової крові (ПКК) з організмом реципієнта при пересадці ПКК з метою відновлення імуногемопоезу. Розглядаються дані літератури стосовно фенотипічних характеристик та функціональної зрілості імункомпетентних клітин ПКК, що обумовлено деякою нерівнозначністю та суперечністю результатів експериментальних досліджень у цій галузі, та їх тлумачень. В роботі також приведені імовірні механізми участі клітинних і гуморальних ланок імунітету в розвитку імунних конфліктів у післятрансплантаційному періоді, зокрема, хвороби "трансплантат проти хазяїна", а також реакції "трансплантат проти лейкозу". Порушуються питання можливості управління протипухлинною цитотоксичністю ПКК за допомогою методів молекулярного моделювання.

A. N. GOLTSEV, T. A. KALINICHENKO

HUMAN UMBILICAL CORD BLOOD AS A SOURCE OF HEMOPOIETIC CELLS FOR CLINICAL APPLICATION. PART II. IMMUNOLOGIC CHARACTERISTICS

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

A survey of clinical and experimental studies was done to analyze the distinguishing features of the immune interactions (umbilical cord blood (UCB)) with the recipient organism during its transplantation with the aim of recovering immunohemopoiesis. The authors discuss the reported data on the phenotypic characteristics and functional maturity of the immunocompetent cells of UCB, which is due to somewhat ambiguous and contradictory results of the experimental research in this field and their interpretation. The authors also speculate on the probable mechanisms of involvement of the cell and humoral links of the immunity into the development of the immune conflicts in the posttransplantation period, in particular, of a "graft versus host" disease, as well as of the probability of development of a "graft versus leukemia" reaction. A possible control over the antitumor cytotoxicity of UCB using methods of molecular modelling is discussed.

С.С.Есьман, А.Б.Рикберг, Э.А.Бакай, В.П.Сергиенко**ПОИСК *IN VITRO* ОПТИМАЛЬНЫХ ДЛЯ УСИЛЕНИЯ КРИОДЕСТРУКЦИИ ПАРАМЕТРОВ УЛЬТРАЗВУКА**

Исследовалось влияние ультразвука (УЗ) малой мощности с частотами 26, 230, 880 и 4000 кГц на криповреждения монослоя L-клеток, используемого в качестве экспериментальной модели ткани *in vitro*. Монослой охлаждали со скоростью 6 °С/мин до –15 °С с внесением ледяной затравки при –1 °С и отогревали со скоростью около 15 °С/мин, что близко к условиям, реализующимся на периферии зоны замораживания в криохирургии. УЗ включали на 1–1,5 мин на одном из этапов цикла: до начала охлаждения, при охлаждении выше 0 °С, при охлаждении ниже 0 °С, при отогреве, после отогрева. Степень усиления криодеструкции зависела как от этапа применения УЗ, так и его частоты. При воздействии в положительной области температур более эффективными оказались средние частоты (230 кГц), в отрицательной — низкие (26 кГц). Высокие частоты оказывали слабое влияние на развитие криповреждений. Полученные данные свидетельствуют о существовании различных механизмов действия УЗ в областях температур выше и ниже 0 °С.

За последние 20 лет накоплен обширный экспериментальный и клинический материал по применению ультразвука малой мощности как модифицирующего фактора в криохирургии. Показано, что ультразвук в терапевтических дозах, не вызывающих разрушения клеток и тканей, в сочетании с действием низких температур может усиливать криповреждения тканей [3–5, 8], а также сокращать сроки репарации после воздействия [3].

Для применения в различных областях медицины разработан ряд криоультразвуковых аппаратов, работающих на частотах 880 кГц (КУД-Г, КУД-К Института физики НАН Украины) и 1,2–1,7 МГц (“Криотон” Научно-инженерного центра МЗ Украины, “Мороз” Харьковского ПО “Монолит”). Однако оптимальные для усиления криодеструкции режимы применения и частоты ультразвука, равно как и механизмы его действия на замораживаемые биоткани, требуют дальнейшего исследования.

В работе [2] на монослоях клеточной культуры изучено влияние ультразвука малой мощности с частотой 880 кГц на криповреждения клеток в зависимости от температурной области или этапа охлаждения-отогрева, на котором действует ультразвук. Показано, что клеточный монослой можно использовать для моделирования *in vitro* первичных криповреждений в ультразвуковом поле; полученные результаты согласуются с экспериментальными и клиническими данными.

В настоящей работе с целью предварительного отбора оптимальных для усиления криодеструкции параметров ультразвука нами изучено влияние на криповреждения клеток *in vitro* ультразвука с частотами 26, 230, 880 и 4000 кГц при воздействии на различных этапах охлаждения-отогрева.

Исследование выполнено на монослойной культуре L-клеток (линия L-529.C3H трансформированных метилхолантеном мышинных фибробластов). Клетки выращивали на стеклянных пластинках размером 5×7 мм толщиной 0,2 мм в среде 199 с добавлением антибиотиков (100 ед/мл пенициллина и 50 ед/мл стрептомицина) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки при 37 °С. В эксперименте использовали стекла со сплошными монослоями, формировавшимися обычно на 4-е сут роста.

Замораживание-отогрев и УЗ-облучение клеток осуществляли в специально сконструированных камерах. На частоте 880 кГц использовали камеру с кварцевым преобразователем, описанную в [1, 2]; для УЗ-облучения на частотах 4000 и 230 кГц — пьезокерамические преобразователи. Посеребренный пьезокерамический диск (ЦТС-19) диаметром 12 мм и толщиной 0,5 мм с ре-

зонансной частотой 4 МГц был впаян в тонкостенный латунный цилиндр, теплоизолированный снаружи пенопластом. Диск охлаждался снизу парами азота. Для уменьшения радиального градиента температуры подача азота осуществлялась с периферии, а сток — по центральной трубке. Измерительный спай термопары (медь–константан) был припаян к верхней поверхности преобразователя. Второй преобразователь (керамика ЦТС-19) толщиной 10 мм имел боковую поверхность, близкую к конической, с верхним диаметром 16 и нижним 12 мм. Преобразователь был приклеен эпоксидной смолой ко дну медного стакана с внутренним диаметром 12 и толщиной 1 мм. Термопара была припаяна к верхней поверхности дна стакана, охлаждаемого парами азота в теплоизолированной пенопластом камере. УЗ-колебания пьезокерамических преобразователей возбуждались генератором ГЗ-112/1. Камера с медным стаканом использовалась и для экспериментов с частотой 26 кГц, только источником ультразвука в этом случае служил наконечник магнито-стрикционного преобразователя прибора УРСК-1 с горизонтальной площадкой на торце 6 × 8 мм, вводимый сверху в раствор над образцом.

Стекла с монослоями L-клеток помещались на дно одного из металлических стаканов (или поверхность пьезокерамического диска) вплотную к спаю термопары, заливались 0,5 мл раствора Хенкса и охлаждались со скоростью 6 °С/мин от 20 до – 15 °С с внесением ледяной затравки при – 1 °С, а затем отогревались со скоростью около 15 °С/мин до комнатной температуры с помощью встроенных во все камеры проволочных электронагревателей. Действие ультразвука продолжительностью от 1 до 1,5 мин накладывалось на одном из этапов охлаждения-отогрева, или же до начала охлаждения, или после окончания отогрева. Циклы замораживания-отогрева в сочетании с ультразвуком периодически чередовали с циклами без ультразвука. При описанных режимах криовоздействия погрешность измерений температуры, включающая перепады по поверхности стекол и искажения показаний термопар в УЗ-поле, не превышала 1 °С.

Выживаемость клеток после воздействия определяли с помощью контрастного люминесцентного теста на целостность мембран [6]. Сразу после отогрева (или последующего УЗ-облучения) клетки окрашивали раствором диацетата флуоресцеина и бромида этидия в течение 10 мин, а затем по люминесценции, наблюдаемой в микроскопе МУФ-3 при возбуждении в области 365 нм, вели подсчет выживших и погибших клеток. В каждом образце насчитывалось от 700 до 1300 клеток. Процент выживаемости определялся отношением числа клеток с зеленым свечением к общему числу подсчитанных клеток. Контрольные монослои содержали от 98 до 100% жизнеспособных клеток. Ниже приведены проценты выживаемости, усредненные по числу опытов (от 4 до 12 в каждой постановке) с указанием стандартной ошибки среднего. Достоверность различий оценивалась по критерию Стьюдента.

С целью определения для каждой ультразвуковой частоты таких плотностей энергии и экспозиции, при которых ультразвук не оказывал бы заметного повреждающего действия на клетки в монослое и не вызывал их вымывания с подложки, был проведен предварительный эксперимент. Клеточные монослои подвергали ультразвуковому воздействию при 20 и 0 °С без последующего замораживания. После ультразвуковых воздействий с параметрами, использованными в последующих экспериментах (плотность энергии от 1 до 1,8 Дж/м³, экспозиция от 1 до 1,5 мин в зависимости от частоты ультразвука), выживаемость клеток составила от 95 до 100%. Результаты замораживания-отогрева в сочетании с ультразвуковым воздействием приведены в таблице.

Выживаемость L-клеток в монослое после криоультразвукового воздействия

Номер группы	Этап применения ультразвука	Выживаемость, %	Процент от криоконтроля
Частота 26 кГц, плотность энергии 1 Дж/м ³ , экспозиция 60 с			
1	Криоконтроль (без УЗ)	55,8 ± 3,5 ^a	100
	Перед охлаждением при 20 °С	38,8 ± 4,2 ^b	69,5 ± 11,9
	При охлаждении от 6 до 0 °С	47,4 ± 1,7 ^{ab}	84,9 ± 8,4 ²
	При охлаждении от -1 до -6 °С	10,5 ± 1,8 ^a	18,8 ± 4,4 ^{2,3,4}
	При отогреве от -14 до 0 °С	9,8 ± 2,0 ^a	17,6 ± 4,7 ^{3,4}
	После отогрева при 20 °С	59,2 ± 3,2 ^a	106,1 ± 12,4 ^{2,3}
Частота 230 кГц, плотность энергии 1,2 Дж/м ³ , экспозиция 90 с			
2	Криоконтроль (без УЗ)	52,2 ± 2,4 ^a	100
	Перед охлаждением при 20 °С	21,4 ± 3,0 ^b	41,0 ± 7,7 ³
	При охлаждении от 9 до 0 °С	23,1 ± 3,9 ^b	44,2 ± 9,5 ¹
	При охлаждении от -1 до -9 °С	23,2 ± 4,0 ^b	44,5 ± 9,8 ^{1,3,4}
	При отогреве от -15 до 0 °С	17,9 ± 3,0 ^b	34,2 ± 7,4 ^{3,4}
	После отогрева при 20 °С	37,3 ± 2,0 ^a	71,4 ± 7,1 ¹
Частота 880 кГц, плотность энергии 1,2 Дж/м ³ , экспозиция 60 с			
3	Криоконтроль (без УЗ)	57,6 ± 2,0 ^a	100
	Перед охлаждением при 20 °С	42,2 ± 4,5 ^{ba}	73,3 ± 10,4 ²
	При охлаждении от 6 до 0 °С	39,3 ± 2,8 ^{ba}	68,2 ± 7,2
	При охлаждении от -1 до -6 °С	46,0 ± 4,4 ^b	79,9 ± 10,4 ^{1,2}
	При отогреве от -15 до -1 °С	33,4 ± 2,9 ^a	58,0 ± 7,0 ^{1,2,4}
	После отогрева при 20 °С	42,2 ± 1,4 ^{ba}	73,3 ± 5,0 ¹
Частота 4 МГц, плотность энергии 1,8 Дж/м ³ , экспозиция 90 с			
4	Криоконтроль (без УЗ)	46,8 ± 2,4 ^a	100
	Перед охлаждением при 20 °С	36,5 ± 11,2 ^{ab}	78,0 ± 27,9
	При охлаждении от 9 до 0 °С	34,4 ± 2,9 ^b	73,5 ± 10,0
	При охлаждении от -1 до -9 °С	50,8 ± 9,2 ^{ab}	108,5 ± 25,2 ^{1,2}
	При отогреве от -15 до 0 °С	44,9 ± 4,2 ^a	95,9 ± 13,9 ^{1,2,3}
	После отогрева при 20 °С	45,5 ± 4,5 ^{ab}	97,2 ± 14,0

Примечание. В таблице приведены средние значения ± *m*. Значения выживаемости в пределах данной частотной группы, не имеющие одинаковых буквенных индексов, различаются достоверно (*P* < 0,05). Цифровые индексы означают достоверное (*P* < 0,05) отличие от значений для аналоговых этапов в группах с указанными номерами.

Достоверный эффект усиления криоповреждений наблюдается при действии ультразвука с частотой 230 и 880 кГц на любом этапе охлаждения-отогрева, а также перед охлаждением и после отогрева. Эффект максимален при действии ультразвука с частотой 26 кГц на этапах охлаждения ниже 0 °С и отогрева. На частоте 4 МГц усиление криоповреждений наблюдается лишь при действии ультразвука на этапе охлаждения до 0 °С.

В то же время очевидно, что частоты 880 кГц и выше не являются оптимальными для усиления криодеструкции ультразвуком. С этой точки зрения вообще высококачественные колебания оказались менее эффективными. Понижение же частоты до 230 кГц усиливает эффект при воздействии ультразвука на всех этапах цикла замораживания-отогрева. Дальнейшее понижение частоты еще более усиливает эффект при действии ультразвука в области отрицательных температур как на этапе охлаждения, так и на этапе отогрева, но ухудшает результаты при действии до начала охлаждения и при охлаждении до 0 °С, а после отогрева вообще не оказывает эффекта. Применение ультразвука после отогрева оказалось наименее удачным и на других частотах.

В целом, если рассматривать результаты в зависимости от этапа наложения ультразвука, то можно разделить две области. На рис. 1 приведены частотные зависимости УЗ-эффекта в области положительных температур, на рис. 2 — в области отрицательных. В первом случае мы имеем U-образные, а

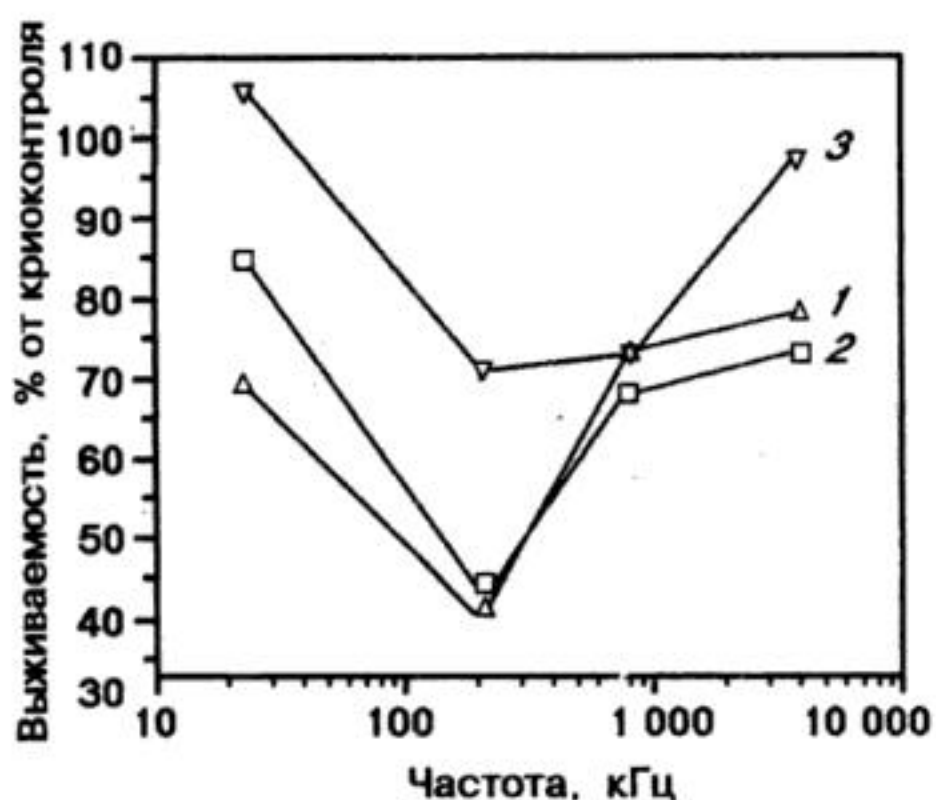


Рис. 1. Частотные зависимости криоультразвукового эффекта в области температур выше 0 °С. Ультразвук применялся: 1 — перед охлаждением, 2 — при охлаждении, 3 — после отогрева

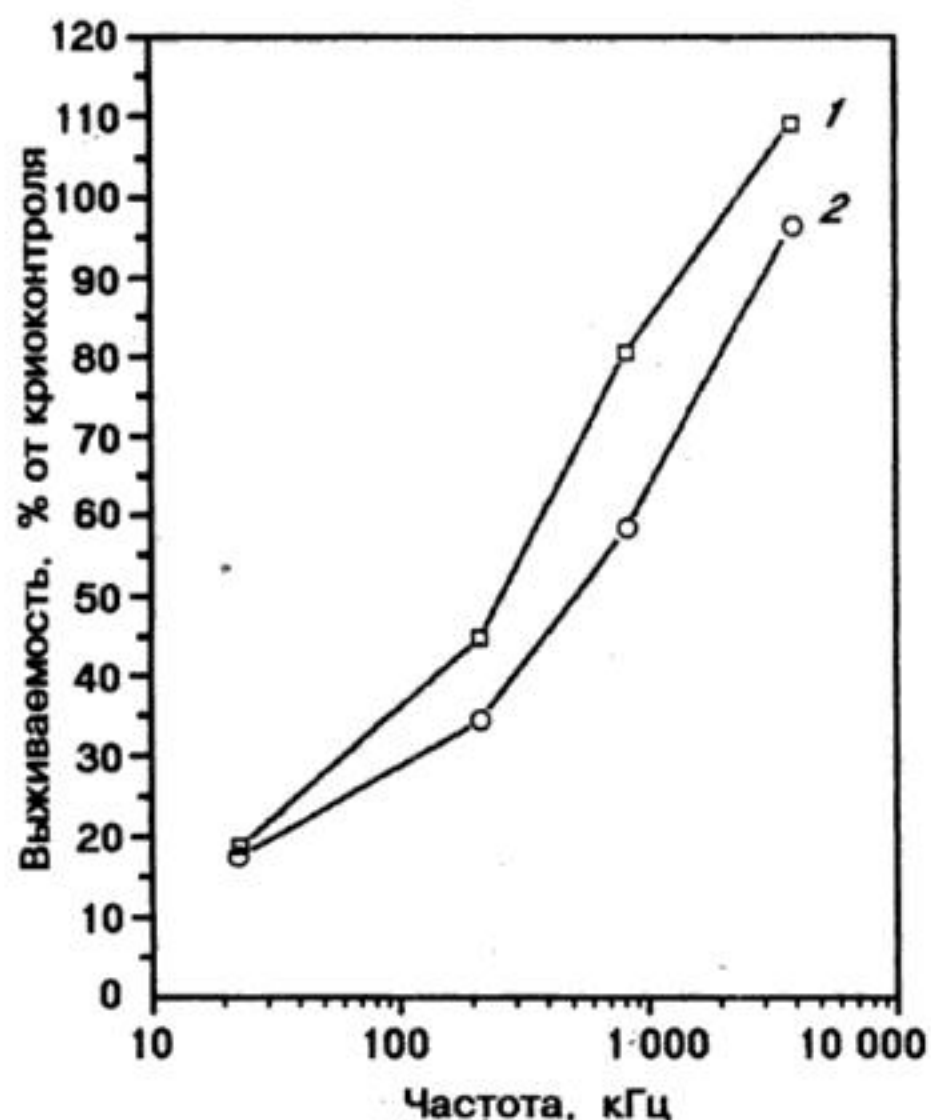


Рис. 2. Частотные зависимости криоультразвукового эффекта в области температур ниже 0 °С. Ультразвук применялся: 1 — при охлаждении, 2 — при отогреве

ний с колеблющимися кристаллами льда, особенно на низких частотах, где велики амплитуды колебаний. При одинаковой плотности энергии ультразвука амплитуда колебательных смещений обратно пропорциональна частоте и с уменьшением частоты от 4 000 до 26 кГц возрастает на два порядка, достигая нескольких десятых долей микрона при плотности энергии около 1 Дж/м³. В то же время выживаемость клеток после замораживания-отогрева при УЗ-облучении ниже 0 °С уменьшается с понижением частоты, достигая минимального значения в 10% при 26 кГц, самой низкой из использованных частот.

Результаты настоящего исследования указывают возможности повышения эффективности комбинированного применения замораживания и ультразвука

во втором монотонные кривые. Такое различие свидетельствует в пользу существования различных механизмов действия ультразвука на замораживаемые клетки.

Облучение L-клеток в монослое до начала охлаждения и в околонулевой области температур до начала льдообразования значительно уменьшает выживаемость после замораживания-отогрева на всех частотах, в то время как такое же по параметрам облучение при 20 и 0 °С без последующего замораживания оказывается практически безвредным для клеток. Следовательно, можно говорить об ультразвуковой сенсibilизации клеток в монослое к последующим криоповреждениям. Такая сенсibilизация может быть связана с нарушениями проницаемости и барьерных свойств клеточных мембран в УЗ-поле [7], которые сами по себе обратимы, но при замораживании могут приводить к необратимым последствиям. С точки зрения сенсibilизации клеток к замораживанию более эффективными оказались средние частоты в области 230 кГц.

В области отрицательных температур действие ультразвука осуществлялось либо на этапе формирования и роста льда при охлаждении, либо на этапе его рекристаллизации и плавления при отогреве. В обоих случаях результаты близки (рис. 2). Вероятно, усиление криоповреждений ультразвуком на этих этапах связано в первую очередь с прямыми механическими повреждениями клеток за счет соударе-

малой мощности для разрушения тканей. Полученные данные являются основанием для дальнейшего развития исследований в эксперименте *in vivo* с использованием различных режимов УЗ-облучения, особенно с применением ультразвука в диапазоне частот ниже 880 кГц, с перспективой разработки новой криоультразвуковой аппаратуры.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Есьман С. С., Лыков И. Г., Рикберг А. Б. Влияние ультразвука на переохлаждение воды и некоторых биологических сред // Криобиология. – 1986. – № 1. – С. 15–18.
2. Есьман С. С., Рикберг А. Б., Сергиенко В. П. Усиление криодеструкции ультразвуком. Моделирование на клеточном монослое // Криобиология. – 1989. – № 1. – С. 28–32.
3. Запорожан В. Н., Хаит О. В., Рикберг А. Б., Бакай Э. А. Криоультразвуковая терапия доброкачественных заболеваний шейки матки // Криобиология и криомедицина. – 1983. – Вып. 12. – С. 64–69.
4. Рикберг А. Б. Усиление криповреждений опухолей с помощью ультразвука малой интенсивности (экспериментальное исследование): Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Киев, 1982. – 23 с.
5. Рикберг А. Б., Кузьменко А. П., Андрейченко А. П. и др. Морфогистохимическая и ультраструктурная характеристика селезенки и карциномы Герена на различных этапах криоультразвукового воздействия // Механизмы криповреждения и криозащиты биологических структур. – Киев: Наук. думка, 1977. – С. 78–79.
6. Dankberg F., Persidsky M. D. A test of granulocyte membrane integrity and phagocytic function // Cryobiology. – 1976. – 13, № 5. – P. 430–432.
7. Gershoy A., Nyborg W. L. Perturbation of plant-cell contents by ultrasonic micro-irradiation // J. Acoust. Soc. of Amer. – 1973. – 54. – P. 1356–1367.
8. Klug W., Faber C., Busse St. Verstärkung der Kryodestruktion durch Ultraschallenergie // Z. exp. Chir. Transplant. künstl. Organe. – 190. – 23. – P. 60–62.

Научный и инженерно-технологический центр “Сонар”
НАН Украины, г. Киев

Поступила 02.04.97

С. С. ЕСЬМАН, О. В. РИКБЕРГ, Е. О. БАКАЙ, В. П. СЕРГИЕНКО

ПОШУК *IN VITRO* ОПТИМАЛЬНИХ ДЛЯ ПІДСИЛЕННЯ КРІОДЕСТРУКЦІЇ ПАРАМЕТРІВ УЛЬТРАЗВУКУ

Науковий і інженерно-технологічний центр “Сонар” Національної Академії наук України, м. Київ

Досліджувався вплив ультразвуку (УЗ) невеликої потужності з частотою 26, 230, 880 і 4000 кГц на кріопшкодження моношару L-клітин, який використовувався як експериментальна модель тканини *in vitro*. Моношари охолоджували зі швидкістю 6 °С/хв до –15 °С із внесенням льодяного запалу при –1 °С і відігрівали зі швидкістю майже 15 °С/хв, що близько до умов, які реалізуються на периферії зони заморожування в кріохірургії. УЗ включали на 1–1,5 хв на одному з етапів циклу: до початку охолодження, при охолодженні вище 0 °С, при охолодженні нижче 0 °С, при відігріванні, після відігрівання. Ступінь підсилення кріодеструкції залежала як від етапу застосування УЗ, так і його частоти. При дії у позитивній області температур більш ефективними виявлялись середні частоти (230 кГц), у негативній — низькі (26 кГц). Високі частоти мало впливали на розвиток кріопшкоджень. Отримані дані свідчать про існування різних механізмів дії УЗ в областях температур вище і нижче 0 °С.

S. S. YESMAN, A. B. RIKBERG, E. A. BAKAI, V. P. SERGIYENKO

AN *IN VITRO* SEARCH FOR ULTRASOUND PARAMETERS WHICH ARE OPTIMUM FOR ENHANCEMENT OF CRYODESTRUCTION

SONAR Research Centre of the National Ukrainian Academy of Sciences, Kyiv

The authors investigated the influence of a low-capacity ultrasound (US) with the frequencies of 26, 230, 880 and 4 000 kHz on the cryoinjuries to the monolayer of the L-cells, which was used as the experimental model of the tissue *in vitro*. The monolayers were cooled down with the rate of 6 °C/min down to –15 °C, introducing ice nucleation at –1 °C, and thawed at a rate of about 15 °C/min, which was close to the conditions, being realized at the periphery of the zone of freezing and cryosurgery. The US was applied for 1–1.5 min at one of the stages of the cycle: prior to cooling, during cooling above 0 °C, during cooling below 0 °C, during thawing, and after thawing. The extent of enhancement of cryodestruction was dependent both on the stage of the US application and on its frequency. Medium frequencies turned out to be the most effective during cooling in the range of positive temperatures (230 kHz), and low frequencies (26 kHz) — in the range of negative temperatures. High frequencies poorly affected development of cryoinjuries. The data obtained testify to the existence of different mechanisms of the US action in the range of temperatures above and below 0 °C.

Е.А.Гордиенко, Е.И.Смолянинова, И.Ф.Коваленко**ОПРЕДЕЛЕНИЕ И СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ БИОФИЗИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ООЦИТОВ И ЭМБРИОНОВ МЫШИ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ ПРОНИКАЮЩИХ КРИОПРОТЕКТОРОВ**

На основе синтеза экспериментального метода световой микроскопии и численного моделирования на ЭВМ осмотического поведения клеток в неизотонических условиях определены и изучены биофизические параметры яйцеклеток и эмбрионов мыши в водных растворах проникающих криопротекторов в зависимости от их концентрации, времени экспозиции клеток в растворе и стадии развития эмбриона. На основе собственных и литературных данных предложено объяснение действия криозащитных веществ, принадлежащих к различным классам химических соединений, на клеточные структуры.

Осмотические явления, связанные с переносом различных веществ через избирательно проницаемые мембраны клеток, вносят значительный вклад в их повреждение и защиту на всех этапах цикла низкотемпературного консервирования.

Согласно классическим представлениям двухфакторной теории [9], среди параметров, описывающих поведение клеток при их криоконсервировании наиболее важными являются транспортные характеристики самих клеток, так как именно они определяют такие режимные параметры криоконсервирования клеточных суспензий, как продолжительность экспозиции клеток в криозащитном растворе, скорость охлаждения, условия удаления криопротектора из среды суспендирования и др.

Экспериментальное моделирование этапов цикла низкотемпературного консервирования клеточных суспензий таких, например, как экспозиция клеток в неизотонических растворах криозащитных веществ, позволяет изучить осмотическое поведение клеток при контакте с растворами криопротекторов, а также определить транспортные характеристики клеточных мембран и тем самым создать теоретическую основу для оптимизации программ криоконсервации биологических объектов.

Целью работы было определение коэффициентов проницаемости мембран яйцеклеток и эмбрионов мыши на ранних стадиях дробления для молекул воды и проникающих криопротекторов в зависимости от содержания последних в среде экспозиции, стадии развития эмбриона и динамики изменения концентрации криопротектора и веществ внутри клеток, не проникающих через клеточные мембраны, в процессе их изотермической экспозиции в исследуемых растворах.

Объектами исследования служили яйцеклетки, одно- и двухклеточные эмбрионы мыши, полученные от самок мышей гибрида F_1 (CBWAxC57BL). Для получения большого количества клеток применялся метод суперовуляции [1] с использованием 8 МЕ сыворотки жеребых кобыл (СЖК) и 12 МЕ человеческого хорионического гонадотропина (ХГ), введенных подопытным животным с интервалом 46–48 ч. После введения ХГ самок подсаживали для осеменения к самцам той же линии. Половые клетки получали путем промывания отпрепарированных яйцеводов забитых самок физиологической средой Дюльбекко при комнатной температуре по стандартной методике [1]. Яйцеклетки получали через 12–16 ч после введения ХГ, одноклеточные (зиготы) и двухклеточные эмбрионы — через 20–24 и 44–48 ч соответственно после определения беременности самок.

В работе использовали водные растворы диметилсульфоксида (ДМСО) и 1,2-пропандиола (1,2-ПД) — криопротекторов, наиболее часто применяемых для криоконсервации эмбрионов млекопитающих. Концентрации исследуемых растворов составляли: 0,3; 1,28; 2,56; 3,84 и 1,32; 2,6; 3,95 М соответственно. Основными методами исследования в работе были: метод световой микроскопии и метод численного моделирования поведения клеток в неизотонических растворах на ЭВМ на основе уравнений термодинамики необратимых процессов прерывных систем [2, 6, 7]. Микроскопическое наблюдение осмотической реакции клетки на контакт с неизотоническим раствором криопротектора сопровождалось кинорегистрацией. Затем негативное изображение клетки проецировалось на однородную по толщине бумагу и путем измерения веса изображения клетки определяли кинетику изменения относительной площади

изображения клетки.

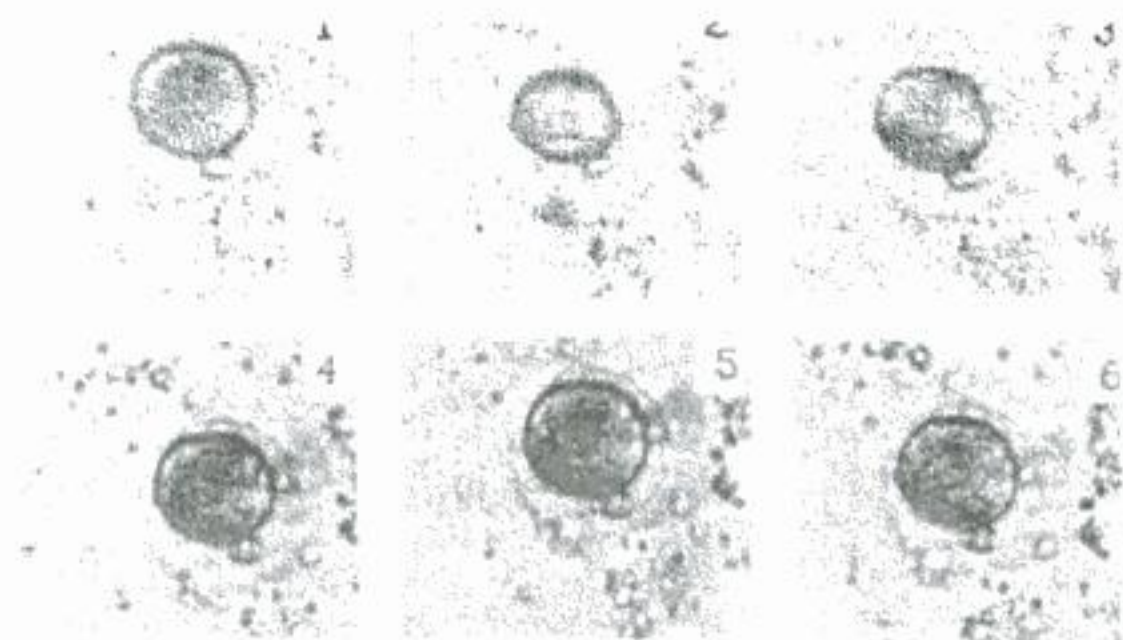


Рис. 1. Осмотическая реакция одноклеточного эмбриона мыши при его экспозиции в 3,84 М-водном растворе ДМСО: 1 — натив, 2 — 15 с, 3 — 2 мин, 4 — 5 мин, 5 — 10 мин, 6 — 20 мин

При переносе в растворы осмотически активных веществ клетки изменяют свой объем пропорционально осмотическому давлению среды (рис. 1). Однако определить объем клеток в экспериментах такого рода можно только косвенно; так, в процессе наблюдения и кинорегистрации можно зафиксировать и измерить лишь площадь поперечного сечения изображения клетки.

Значения коэффициентов проницаемости плазматических мембран яйцеклеток и эмбрионов мыши для молекул воды (L_p) и криопротектора (K_p), а также долю осмотически неактивных веществ в клетке (α) определяли следующим образом. Экспериментальную зависимость относительной площади изображения клетки от времени экспозиции аппроксимировали численным решением на ЭВМ уравнений Кедем-Качальского путем подбора наилучших значений L_p , K_p и α (методом наименьших квадратов), которые фигурируют в этих уравнениях [2, 6, 7].

Статистическую обработку цифровых данных проводили по методу Стьюдента [3] с доверительным интервалом для вероятности попадания в него $P = 0,95$.

Как видно из табл. 1, проницаемость мембран одно- и двухклеточных эм-

Таблица 1

Зависимость коэффициентов проницаемости мембран яйцеклеток и эмбрионов мыши для молекул воды и ДМСО и объемной доли осмотически неактивных внутриклеточных веществ от стадии развития (температура 25 °С; концентрация ДМСО 3,84 М)

Стадия	$L_p \cdot 10^{13}, \text{м}^3/\text{Нс}$	$K_p \cdot 10^7, \text{м/с}$	α
Яйцеклетка	$1,00 \pm 0,05$	$1,9 \pm 0,06$	$0,32 \pm 0,04$
Зигота	$1,02 \pm 0,06$	$5,2 \pm 0,07$	$0,30 \pm 0,05$
Двухклеточный эмбрион	$1,05 \pm 0,05$	$5,3 \pm 0,07$	$0,29 \pm 0,04$

рионов мыши для молекул воды L_p не отличается от значений этого параметра для неоплодотворенной яйцеклетки, тогда как численное значение коэффициента проницаемости мембран эмбрионов мыши для молекул криопротектора K_p достоверно увеличивается по сравнению с его значением для неоплодотво-

ренной яйцеклетки. Это свидетельствует о том, что эмбрионы на ранних стадиях развития легче насытить криопротектором, чем неоплодотворенную яйцеклетку, и, по-видимому, обеспечить лучшую криозащиту на последующих этапах криоконсервирования. Этот результат, на наш взгляд, может объяснить, почему успешно применяемые к эмбрионам млекопитающих программы криоконсервирования не дают таких же высоких результатов при криоконсервировании ооцитов [8].

Данные, представленные в табл. 2 и 3, показывают, что исследуемые характеристики клеток сильно зависят от содержания криопротектора в среде экспозиции. Увеличение концентрации ДМСО приводит к достоверному уменьшению значений как L_p , так и K_p (табл. 2). При использовании растворов 1,2-ПД значения транспортных характеристик плазматических мембран эмбрионов мыши, наоборот, демонстрируют тенденцию к увеличению с возрастанием содержания этого криопротектора в среде экспозиции (табл. 3). Численные данные этих параметров близки для обоих криопротекторов. Так как в экспериментах мы исключили из среды экспозиции непроницающее вещество, то полученные данные, по-видимому, свидетельствуют о прямом химическом воздействии криозащитных веществ на клеточные структуры и, прежде всего, на плазматические мембраны клеток. Различия можно объяснить разными механизмами влияния на мембраны и цитоскелетные структуры клеток использованных в работе криопротекторов, которые принадлежат к различным классам химических соединений [4]. Такие предположения хорошо согласуются с литературными данными. Так, в [5] показано, что криозащитные вещества, принадлежащие к различным классам химических соединений (ДМСО, этиленгликоль, формамид), оказывают влияние на электрические характеристики эмбрионов мыши, вызывая различной степени деполяризацию мембранного потенциала, а также увеличение или уменьшение входного сопротивления клетки. При этом имели место как концентрационная зависимость изменения этих параметров для каждого криопротектора, так и различия между характером воздействия каждого криопротектора. Проведя сравнительное исследование влияния ДМСО и 1,2-ПД на сохранность одноклеточных эмбрионов кролика, Vincent C. с соавторами [12] показали, что эти криопротекторы по-разному влияют на реологические свойства цитоскелетных белков, в частности F-актиновых комплексов как *in vivo*, так и *in vitro*. Например, 1,2-ПД вызывал частичную или полную деполимеризацию F-актиновых комплексов, тогда как ДМСО таких изменений не вызывал. Несмотря на прямые и косвенные свидетельства о химическом воздействии криозащитных добавок на

Т а б л и ц а 2
Зависимость коэффициентов проницаемости мембран двухклеточных эмбрионов мыши для молекул воды и ДМСО от концентрации криопротектора (температура 25 °С)

Концентрация ДМСО, М	$L_p \cdot 10^{13}$, м ³ /Нс	$K_p \cdot 10^7$, м/с
0,3	14,20±0,10	5,32±0,06
1,28	9,62±0,46	15,00±0,20
2,56	3,70±0,60	8,10±0,32
3,84	1,05±0,05	5,30±0,07

Т а б л и ц а 3
Зависимость коэффициентов проницаемости мембран двухклеточных эмбрионов мыши для молекул воды и 1,2-ПД от концентрации криопротектора (температура 25 °С)

Концентрация 1,2-ПД, М	$L_p \cdot 10^{13}$, м ³ /Нс	$K_p \cdot 10^7$, м/с
1,32	0,87±0,18	3,30±0,20
2,6	1,16±0,31	3,00±0,34
3,95	1,45±0,40	4,15±0,6

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Биология развития млекопитающих. Методы* / Под ред. М. Манк. – М.: Мир, 1990. – 406 с.
2. Гордиенко Е.А., Коваленко И.Ф. Осмотическая реакция клеток на контакт с гипертоническими средами и охлаждение // *Криобиология*. – 1989. – № 3. – С. 3–7.
3. Планирование эксперимента в исследовании технологических процессов / под. ред. Э. К. Лецкого. – М.: Мир, 1977. – 552 с.
4. Пушкарь Н.С., Шраго М.И., Белоус А.М., Калугин Ю.В. Криопротекторы. – К.: Наук. думка, 1978. – 204 с.
5. Чекурова Н.Р., Кислов А.Н., Вепринцев Б.Н. Действие криопротекторов на электрические характеристики клеточной мембраны эмбрионов мыши // *Криобиология*. – 1990. – № 1. – С. 25–29.
6. Katchalsky A., Kedem O. Thermodynamics of slow processes in biological system // *Biophys.J.* – 1962. – 2. – P. 53–78.
7. Kedem O., Katchalsky A. A physical interpretation of the phenomenological coefficients of membrane permeability // *J.Gen.Physiol.* – 1961. – 45. – P. 143–179.
8. Leibo S.P. Fundamental cryobiology of mouse ova and embryos // *The Freezing of Mammalian Embryos* / (Ciba Found. Symp. 52) / Ed. K.Elliot, J.Wheeler. – Amsterdam: Elsevier. – 1977. – P. 69–96.
9. Mazur P., Leibo S.P., Chee E.H. Y. A two factor hypothesis of freezing injury // *Exp. Cell. Res.* – 1972. – 71. – P. 345–385.
10. Miyamoto H., Ishibashi T. Survival of mouse embryos frozen-thawed slowly or rapidly in the presence of various cryoprotectants // *J. Exp. Zool.* – 1983. – 226. – P. 123–127.
11. Shaw J.M., Trouson A.O. Effect of dimethylsulfoxide and protein concentration on the viability of two-cell mouse embryos frozen with a rapid freezing technique // *Cryobiology*. – 1989. – 26, № 5. – P. 413–421.
12. Vincent C., Gerard P., Edith P. et al. Comparative effect of cryoprotectants on rabbit embryos cytoskeleton // *Cryo-Lett.* – 1987. – 8, № 6. – P. 356–361.

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

Поступила 11.11.97

Є. О. ГОРДІЄНКО, Є. І. СМОЛЯНИНОВА, І. Ф. КОВАЛЕНКО

ВИЗНАЧЕННЯ ТА ПОРІВНЯЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ БІОФІЗИЧНИХ ПАРАМЕТРІВ ООЦИТІВ ТА ЕМБРІОНІВ МИШІ У ВОДНИХ РОЗЧИНАХ ПРОНИКАЮЧИХ КРІОПРОТЕКТОРІВ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

На підставі синтезу експериментального методу світлової мікроскопії та чисельного моделювання за допомогою ЕОМ осмотичної поведінки клітин у неізотонічних умовах були визначені біофізичні параметри яйцеклітин та ембріонів миші у водних розчинах проникаючих криопротекторів залежно від їх концентрації, часу експозиції клітин у розчині та стадії розвитку ембріона. На підставі власних та літературних даних пропонується пояснення впливу криозахисних речовин, що належать до різних класів хімічних сполучень, на клітинні структури.

E. A. GORDIYENKO, E. I. SMOLYANINOVA, I. F. KOVALENKO

IDENTIFICATION AND COMPARATIVE STUDY OF BIOPHYSICAL PARAMETERS OF MURINE OOCYTES AND EMBRYOS IN AQUEOUS SOLUTIONS OF PENETRATING CRYOPROTECTANTS

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

Using synthesis of the experimental method of light microscopy and a PC-aided numeric modelling of the osmotic behavior of cells under non-isotonic conditions, the authors studied the biophysical parameters of the murine oocytes and embryos in aqueous solutions of penetrating cryoprotectants depending on their concentration, time of exposure of cells in the solution and stage of the embryo development. On the basis of their own data and those reported in the literature the authors speculate on the action of cryoprotective substances, which belong to different classes of chemical compounds, onto the cell structures.

В.Ф.Козлова, Т.Н.Юрченко, М.И.Щетинский, Н.В.Репин**ОСОБЕННОСТИ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ
ОРГАНИЗМА ГЕТЕРОТЕРМНЫХ ЖИВОТНЫХ
В ЦИКЛЕ ГИБЕРНАЦИЯ–ПРОБУЖДЕНИЕ**

Представлены результаты морфологического исследования организма гетеротермов в активных фазах баутов. Показано, что период гибернация–пробуждение не является индифферентным даже для высокоадаптированных к холоду в естественных условиях зимнеящих животных. Он несет стрессорный компонент, вызывает распад гликопротеиновых и липидных комплексов, альтерацию клеток, тканей и органов, одновременно включая в них механизмы защиты и компенсации, направленные на поддержание гомеостаза в замкнутом цикле самодостаточности.

Познание закономерностей естественного гипобиоза гетеротермов, обеспечивающих самодостаточность организма без поступления экзогенного питания на протяжении всей зимы, актуально для прогноза развития компенсаторно-приспособительных процессов в организмах гомойотермных животных и человека, находящихся в различных криобиологических ситуациях и других экстремальных условиях. Несмотря на повышенный интерес к этой проблеме, многие аспекты холодовой адаптации требуют дальнейшего изучения [1, 4–6, 10]. В то же время ученым-естествоиспытателям следует обратить внимание на то, что, проводя эксперименты на животных, они берут на себя большую ответственность, поскольку вмешательство в естественный ход эволюции с позиций ведической философии как методологии науки, охватывающей все сферы знания, ведет не только к дисбалансу экологии, но и к духовной деградации общества [7]. Принцип “не навреди” должен быть приоритетным не только в узкоспециальном аспекте, но и в глобальных масштабах. Решением проблемы оправданности эксперимента в определенной мере может служить тезис — минимум объектов исследований для получения максимума достоверной научной информации.

Такие подходы были применены в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины при изучении естественного гипобиоза гетеротермов, когда каждый индивидуум подвергался комплексному обследованию с учетом различных уровней структурной организации и использованием физиологических, биохимических, биофизических, морфологических и других современных методов исследования, что позволило получить ряд новых важных объективных данных о феномене зимней спячки [1–3, 5, 8, 9].

Нами проведено системное изучение особенностей морфофункционального состояния внутренних органов зимнеящих якутских длиннохвостых сусликов (*Citellus undulatus*), находящихся в фазах гибернации (РТ 4–6 °С), пробуждения и бодрствования (РТ 35–37 °С). Вопросы гибернации животных были освещены нами ранее в [2, 5, 9]. Цель настоящего сообщения — показать выявленные закономерности развития структурно-функциональных перестроек клеток, тканей и органов пробуждающихся и активных сусликов.

Эксперименты проведены зимой (январь, февраль) в условиях вивария. Животные содержались в специально оборудованных для зимней спячки клетках при температуре –5,5 °С. Пробуждающихся и активных сусликов декапитировали и проводили патолого-анатомическое вскрытие, отбирая образцы внутренних органов (сердца, легких, печени, почек, желудка, кишечника, селезенки, надпочечников и головного мозга) для гистологического и гистохимического исследований. Образцы фиксировали в 10%-м растворе формалина, заливали в целлоидин-парафин, срезы толщиной 7 мкм окраши-

вали гематоксилином Эрлиха и эозином. Для определения комплекса полисахаридных соединений ставилась сочетанная реакция по Моури. Гликозаминогликаны в структурах выявляли альциановым синим, гликопротеины — реактивом Шиффа. Нейросекреторное вещество в нейронах супраоптических и паравентрикулярных ядер гипоталамуса окрашивали альдегид-фуксином по Гомори. Фосфолипиды идентифицировали во всех органах суданом черным В, нейтральные жиры — суданом III и IV (на криостатных срезах). Проведенное исследование позволило установить, что морфофункциональное состояние внутренних органов сусликов после их пробуждения характеризуется гиперактивацией процессов кровообращения, гипертрофией и дистрофией клеток паренхимы, распадом гликопротеиновых и липидных комплексов.

В сердце наблюдается гиперемия сосудов гемоциркулярного русла, большинство капилляров “закрытого” типа переходят в “открытые”, их просветы расширены, заполнены кровью. Отмечается легкое набухание соединительно-тканной основы органа, в ней определяются гликопротеины, липиды и следы гликозаминогликанов. В миокарде саркоплазма мышечных клеток неравномерно окрашивается красителями, не везде просматривается ее поперечная исчерченность. Наряду с крупными светлыми кардиомиоцитами (КМЦ) располагаются группы темных клеток с контрактурными изменениями и тонкие вытянутые дегидратированные миоциты с нитевидными ядрами. В паренхиме органа отмечается потеря гликогена и липидов.

У зимних сусликов, не впадавших в спячку, миокард характеризуется относительно равномерным кровенаполнением сосудов, активным морфофункциональным состоянием соединительно-тканной основы и паренхимы с умеренным содержанием гликопротеинов и липидов. В нем преобладают (до 70%) крупные светлые КМЦ с сохраненной поперечной исчерченностью и гипертрофированными ядрами с периферическим расположением глыбок гетерохроматина.

У гибернирующих животных уменьшается дыхательная поверхность легких и происходит физиологическая редукция малого круга кровообращения [5]. Респираторный отдел характеризуется участками дистелектаза, что также можно рассматривать как физиологическую атрофию альвеол. После пробуждения сусликов в легких возобновляется гемоциркуляция в сосудах с растяжением их стенок и с кровенаполнением микроциркуляторного русла. Местами отмечается повреждение интимы кровеносных сосудов и отслоение клеток слизистой оболочки бронхов, уменьшение ее складчатости, повышается секреция бокаловидных клеток бронхов. Наблюдается “раздувание” респираторного отдела легкого, его бронхиол, альвеолярных ходов и мешков, а также альвеол (рис. 1). Уменьшаются очаги дистелектаза и истончаются межальвеолярные перегородки, встречаются эмфиземоподобные участки альвеол с разрывом стенок. В интерстициальной ткани, наряду с липидами и гликопротеинами, выявляются гликозаминогликаны, способствующие гидратационным процессам в легких. У зимних сусликов, не впадавших в спячку, легкие — воздушные с активными воздушно-кровяными барьерами.

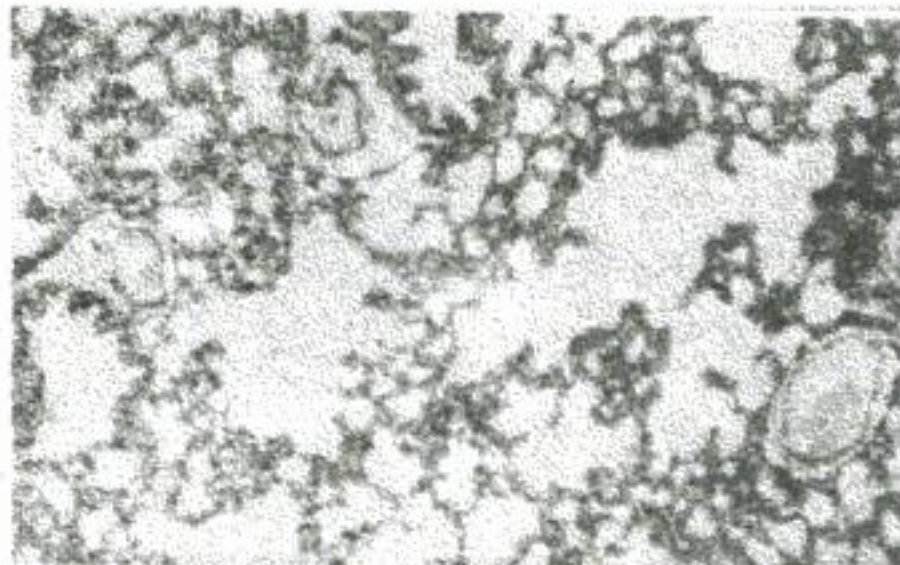


Рис. 1. Характерная структура легкого активного суслика. Гематоксилин и эозин. $\times 60$. Уменьшение при репродуцировании 2/3

После пробуждения печень сусликов характеризуется резкой гиперактивацией всех протекающих процессов с элементами оводнения и дистрофии тканей в отличие от дегидратированной гипобиотической паренхимы органа гибернарующих животных. Кровеносные сосуды равномерно кровенаполнены, их стенки разрыхлены, эндотелий набухший. В портальных зонах соединительно-тканной основы отмечаются уменьшение содержания липидов и гликопротеинов и появление гликозаминогликанов, играющих важную роль в поддержании водно-солевого гомеостаза микрорайона. Округлены и увеличены в размерах Купферовы клетки, в некоторых случаях они содержат фагоцитозные пузырьки и превращаются в свободные макрофаги.

Вариабельностью морфофункционального состояния отличается паренхима печени. В ней обнаруживается полиморфный состав гепатоцитов: от гипертрофированных, активно функционирующих клеток до дистрофически измененных и погибающих (рис. 2). Наряду с двуядерными, определяется до 20% одноядерных гепатоцитов в виде гигантских полиплоидных клеток с гиперхромными ядрами, плотноупакованными крупными глыбками гетерохроматина. Встречаются также митотически делящиеся гепатоциты ($0,9 \pm 0,2\%$). Но самый показательный морфологический ориентир для печени описываемых экспериментальных животных — появление гепатоцитов на различных стадиях жирового перерождения и гидропической дистрофии, разбросанных диффузно в паренхиме или располагающихся гроздьями преимущественно в зонах триад. Степень выраженности дистрофических изменений в печени у различных индивидуумов различна, она коррелирует с потерями клетками гликогена (рис. 3).

Печень активных сусликов, не впавших в зимнюю спячку, умеренно кровенаполнена. Она представлена относительно однородным клеточным составом паренхимы, в которой преобладают эозинофильные гепатоциты с округлыми светлыми ядрами и равномерно расположенным хроматином. В зонах триад располагаются темные гликогенсодержащие гепатоциты с гиперхромными ядрами. В реактивном состоянии находятся эндотелиоциты синусоидов и Купферовы клетки.

Было показано [5, 9] гомеостатирование энтеральной среды гибернарующих животных за счет эндогенных факторов. У спящих сусликов происходит полное отключение полостного пищеварения в желудочно-кишечном тракте, наблюдается торможение функции эпителиоцитов желудка и развитие примембранного и внутриклеточного пищеварения. Стенка желудка проснувшихся сусликов растянута, гидратирована. Слизистая оболочка образует ворсинооб-

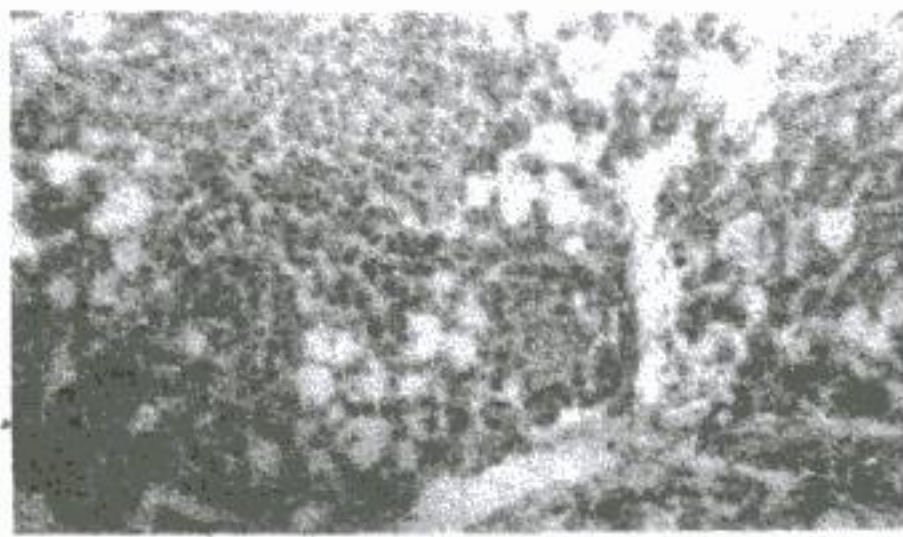


Рис. 2. Жировая дистрофия печени суслика после пробуждения. Гематоксилин и эозин. $\times 60$. Уменьшение при репродуцировании 2/3

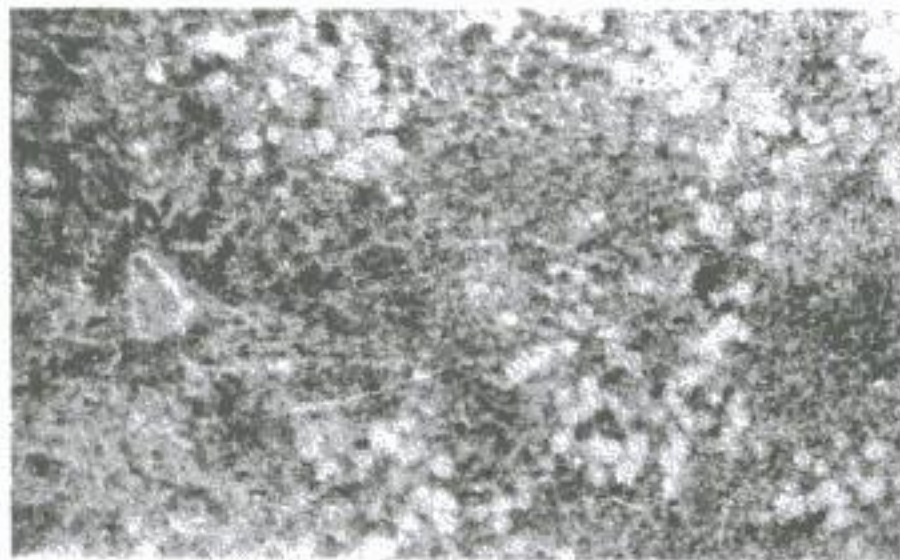


Рис. 3. Жировая дистрофия гепатоцитов, потеря ими гликогена после пробуждения суслика. Окраска по Моури. $\times 60$. Уменьшение при репродуцировании 2/3

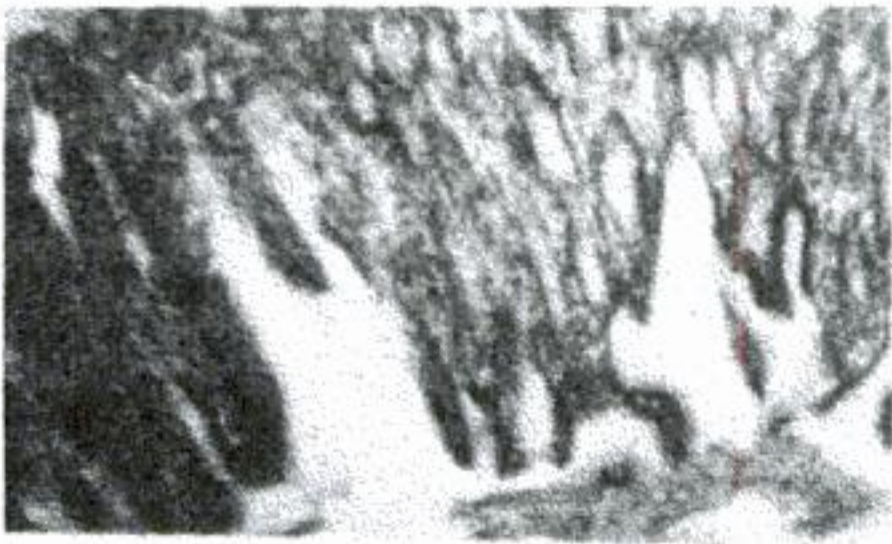


Рис. 4. Кишечный тип строения слизистой оболочки желудка проснувшегося суслика. Гематоксилин и эозин. $\times 60$. Уменьшение при репродукции 2/3



Рис. 5. Отслоение пластов мукоидных эпителиоцитов желудка проснувшихся сусликов. Окраска по Моури. $\times 60$. Уменьшение при репродукции 2/3

разные выросты, напоминая кишечный тип строения (рис. 4). Деятельность покровного эпителия и фундальных желез желудка активизирована, в области перешейка встречаются митотически делящиеся клетки. Отмечаются отслоение и гибель целых пластов эпителиоцитов, содержащих большое количество мукоидных веществ, включая гликопротеины и гликозаминогликаны (рис. 5).

У животных, не впадавших в зимнюю спячку, слизистая оболочка желудка в основном сохраняет целостность и активность покровного эпителия, особенно желудочных ямок, фундальных желез, а также соединительно-тканной основы.

Двенадцатиперстная кишка проснувшихся сусликов отличается общим оводнением и активизацией структур, усилением крово- и лимфообращения, а также признаками повреждения отдельных эпителиоцитов. Чаще это касается каемчатых клеток ворсинок, теряющих свои апикальные части в просвет кишечника. Бокаловидные клетки, как правило, не повреждаются и интенсивно вырабатывают секрет, богатый гликопротеинами и гликозаминогликанами. Увеличиваются в размерах энтероциты либеркюновых крипт как малодифференцированные цилиндрические клетки, так и высокоспециализированные клетки Панета с ацидофильной зернистостью в цитоплазме. В рыхлой волокнистой соединительной ткани органа появляется большое количество лимфоцитов, плазматических клеток и эозинофилов. Общебиологический интерес для специалистов представляет наличие в одном из экспериментов в просвете кишечника гельминта, относящегося к классу нематод, перенесшего периоды баутов. Можно полагать, что в аварийной ситуации он сам может служить источником пищи для своего хозяина.

У сусликов, не впадавших в спячку, двенадцатиперстная кишка умеренно кровенаполнена, клеточные элементы стромы активизированы. В подслизистой основе органа развиты бrunnerовы железы и типичные лимфоидные фолликулы с расширенными герминативными центрами и диффузной лимфоидной инфильтрацией ворсинок.

Энтероциты содержат крупные светлые ядра, функционально напряжены, местами наблюдается апоптоз клеток. В зонах кишечных либеркюновых крипт встречаются митотически делящиеся эпителиоциты. Бокаловидные клетки ворсинок наполнены секретом обычного состава.

У проснувшихся сусликов по сравнению со спящими, для которых характерны признаки редукции сосудистой системы и застойные явления, заметно меняется морфофункциональное состояние почек. Возникает резкое усиление почечного кровотока, которое дает особую нагрузку юкстамедуллярной, распределительной зоне, в которой осуществляется основной избыточный сброс крови. При этом происходит увеличение юстагломерулярных клеток, растяжение

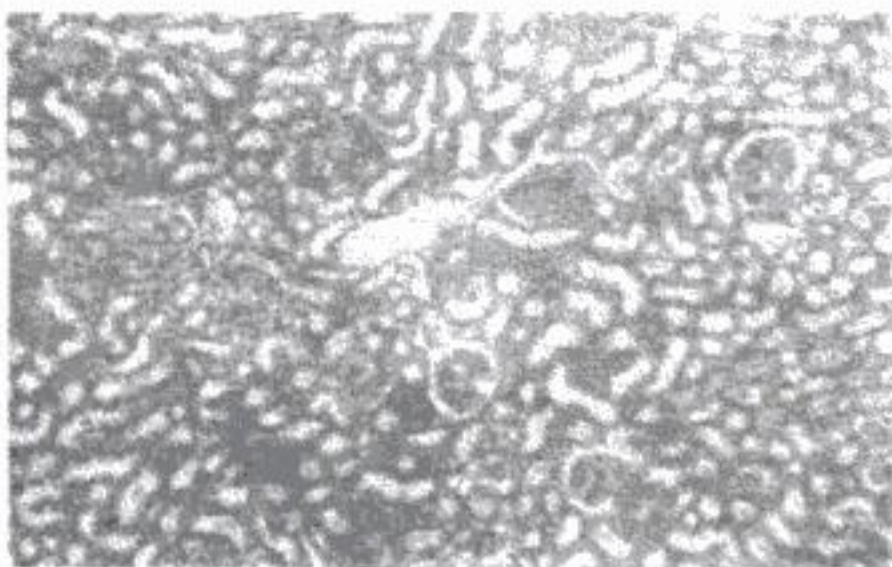


Рис. 6. Кровенаполнение капилляров и набухание тканей почек сусликов после пробуждения. Гематоксилин и эозин. $\times 60$. Уменьшение при репродукции 2/3

вергается эпителий проксимальных и дистальных извитых канальцев. В их просветах встречается клеточный детрит. Почечные тельца изменяются мало, в них исчезают застойные явления, лишь в отдельных случаях наблюдается утолщение их базальных мембран и листков капсулы. Собирательные трубки без содержимого, имеют обычное строение.

Почки сусликов, не впадавших в спячку, характеризуются умеренным кровенаполнением сосудов и оводнением тканей, значительным содержанием фосфолипидов в соединительно-тканной основе и равномерным распределением нейтральных жиров в паренхиме. В реактивном состоянии находятся клеточные элементы стромы. Эпителиальная выстилка почечных канальцев относительно сохранена, но в просветах канальцев и собирательных трубок встречается клеточный детрит, что свидетельствует о предшествующем повреждении клеток и быстрых восстановительных процессах в органе.

В отличие от децонирующей селезенки спящих сусликов, селезенка активных зимних сусликов менее кровенаполнена. Стенки сосудов разрыхлены как и ретикулярная основа красной пульпы. В ней отмечают гемолиз эритроцитов и макрофагальная активность. В трабекулах просматривается гиперплазия гладкомышечных клеток. Лимфатические фолликулы селезенки содержат расширенные герминативные центры, в которых преобладают малодифференцированные ретикулярные клетки и лимфобласты, большие и средние лимфоциты, встречаются клетки в состоянии апоптоза (рис. 7). Маргинальная зона, расположенная вокруг лимфатических фолликулов, увеличена в размере в связи с полнокровием и мукоидным набуханием ее соединительно-тканной основы, богатой гликопротеинами и гликозаминогликанами. Это, возможно, связано с тем, что именно в маргинальной зоне находятся все основные крове-

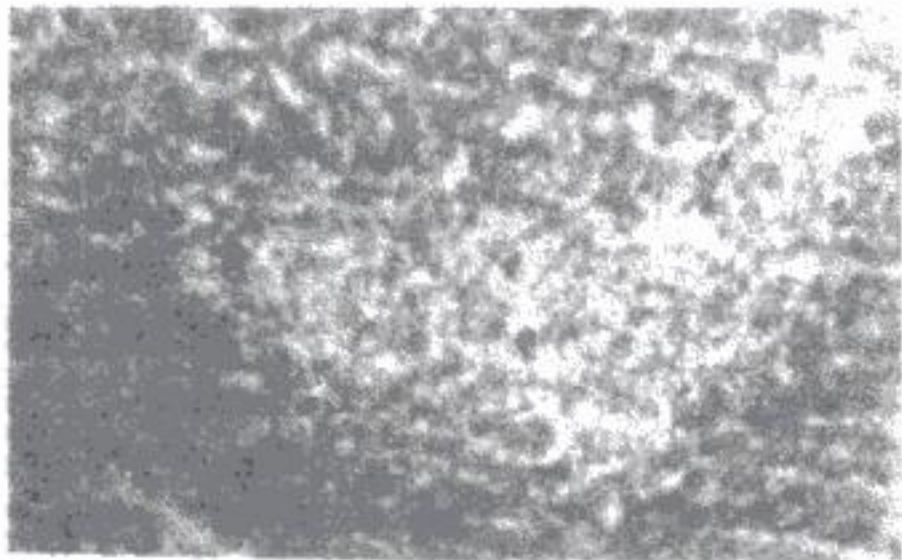


Рис. 7. Расширение герминативного центра лимфатического фолликула селезенки активного суслика. Гематоксилин и эозин. $\times 60$. Уменьшение при репродукции 2/3

гипертрофированных стенок дуговых артерий, расщепление их внутренней и наружной эластических мембран. В дольковых артериях выявляются развитые мышечно-эластические образования, регулирующие поступление крови в гломерулы. Наблюдается набухание интимы сосудов, эндотелия капилляров, оводнение тканей почек, уменьшение в них липидов и гликопротеинов, увеличение в зоне сосочка гликозаминогликанов (рис. 6).

Дистрофическим изменениям подвергается эпителий проксимальных и дистальных извитых канальцев. В их просветах встречается клеточный детрит. Почечные тельца изменяются мало, в них исчезают застойные явления, лишь в отдельных случаях наблюдается утолщение их базальных мембран и листков капсулы. Собирательные трубки без содержимого, имеют обычное строение.

Почки сусликов, не впадавших в спячку, характеризуются умеренным кровенаполнением сосудов и оводнением тканей, значительным содержанием фосфолипидов в соединительно-тканной основе и равномерным распределением нейтральных жиров в паренхиме. В реактивном состоянии находятся клеточные элементы стромы. Эпителиальная выстилка почечных канальцев относительно сохранена, но в просветах канальцев и собирательных трубок встречается клеточный детрит, что свидетельствует о предшествующем повреждении клеток и быстрых восстановительных процессах в органе.

В отличие от децонирующей селезенки спящих сусликов, селезенка активных зимних сусликов менее кровенаполнена. Стенки сосудов разрыхлены как и ретикулярная основа красной пульпы. В ней отмечают гемолиз эритроцитов и макрофагальная активность. В трабекулах просматривается гиперплазия гладкомышечных клеток. Лимфатические фолликулы селезенки содержат расширенные герминативные центры, в которых преобладают малодифференцированные ретикулярные клетки и лимфобласты, большие и средние лимфоциты, встречаются клетки в состоянии апоптоза (рис. 7). Маргинальная зона, расположенная вокруг лимфатических фолликулов, увеличена в размере в связи с полнокровием и мукоидным набуханием ее соединительно-тканной основы, богатой гликопротеинами и гликозаминогликанами. Это, возможно, связано с тем, что именно в маргинальной зоне находятся все основные крове-

носные сосуды, входящие в фолликул и изливающие там свою кровь. В этой зоне определяется много лимфоцитов и эритроцитов, в основном без признаков разрушения.

Надпочечники активных зимних сусликов увеличены в размерах по сравнению с репрессированными нитевидными надпочечниками спящих животных. Они равномерно и умеренно наполнены кровью. Отмечается реактивное состояние клеток соединительно-тканной основы, легкий

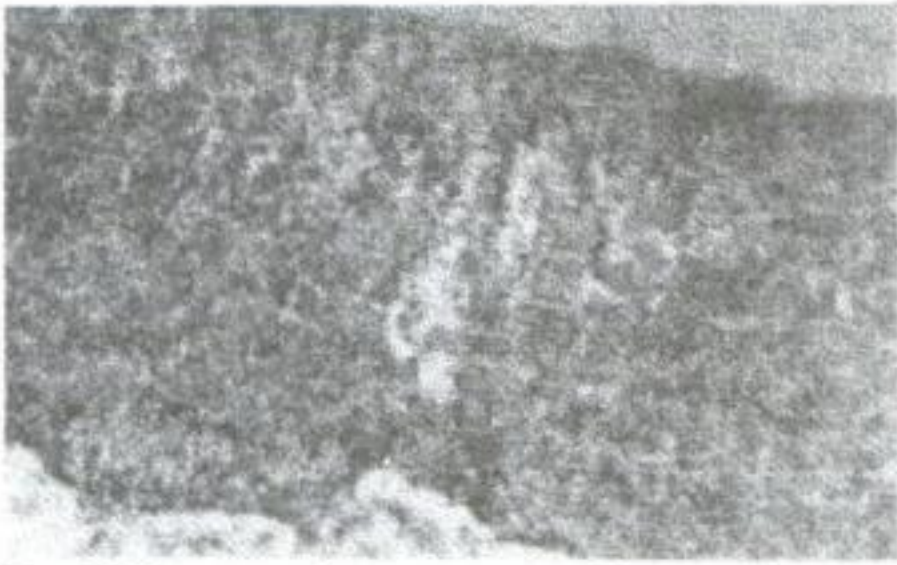


Рис. 8. Гипертрофия клеток клубочковой и пучковой зон коры надпочечников активного суслика. Гематоксилин и эозин. $\times 60$. Уменьшение при репродуцировании 2/3

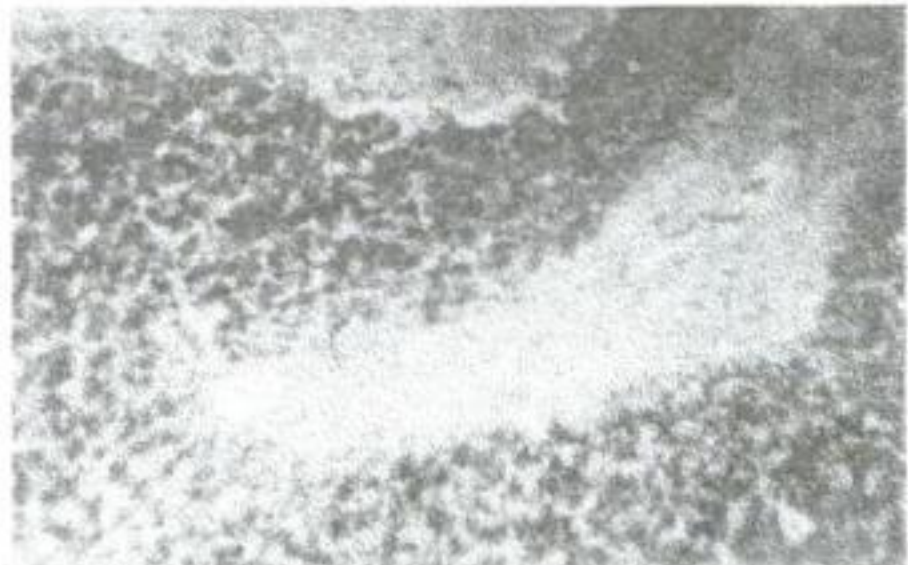


Рис. 9. Рыхлое расположение клеток мозжечка активного суслика. Гематоксилин и эозин. $\times 60$. Уменьшение при репродуцировании 2/3

интерстициальный отек, однако с увеличением клубочковой и пучковой зон система эпителиальных тяжей коркового вещества сохраняет свою характерную пространственную ориентацию. Клетки этих зон гипертрофированы, содержат светлые округлые ядра, но в некоторых случаях выявляются карнопикноз и порционный некроз цитоплазмы. В клетках пучковой зоны обнаруживается дисбаланс содержания липидов: потеря нейтральных жиров одними клетками и насыщенность ими других (рис. 8).

Хромафинные образования мозгового вещества представлены крупными округлыми клетками с полиплоидными ядрами и секреторными пузырьками в цитоплазме, симпатическими нейронами и нервными волокнами, а также кровенаполненными синусоидными капиллярами. В целом морфофункциональное состояние надпочечников характеризуется гиперактивацией протекающих процессов как в корковом, так и в мозговом слоях.

У активных зимних сусликов отмечается полнокровие сосудов мягкой мозговой оболочки и тканей головного мозга, а также их оводнение. В связи с этим увеличиваются периваскулярные пространства и уменьшается плотность расположения клеток на единицу площади, особенно в молекулярном и наружном зернистом слоях коры полушарий головного мозга, а также в мозжечке (рис. 9).

Активизируется морфофункциональное состояние нейронов коры и гипоталамуса, а также макро- и микроглии (рис. 10). Клетки в большинстве случаев гипертрофируются, теряют базофильную зернистость, но Шифф-положительны. Их крупные светлые ядра содержат диффузно расположенный хроматин. Нейроны паравентрикулярных и супраоптических ядер бедны нейросекретом. Слегка набухшими выглядят олигодендроциты и астроциты, округляются и увеличиваются в размерах глиальные макрофаги. В тканях головного мозга определяется высокое содержание липидов и гликопротеинов.

Таким образом, в результате проведенного исследования выявлены закономерности развития структурно-функциональных перестроек внутренних органов гетеротермных животных в цикле гибернация-пробуждение, характеризующиеся состоянием напряжения всех изучаемых систем с элементами гипертрофии и альтерации клеток, а также процессами гиперактива-

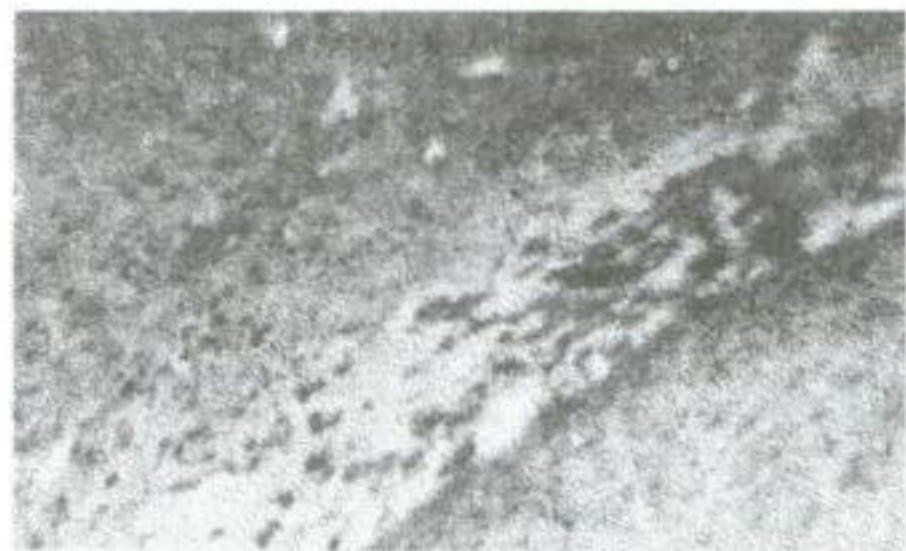


Рис. 10. Активизация морфофункционального состояния клеток супраоптического ядра гипоталамуса суслика после пробуждения. Гематоксилин и эозин. $\times 60$. Уменьшение при репродуцировании 2/3

ции кровообращения и функции органов, направленных на поддержание нового уровня гомеостаза организма.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоус А. М., Загнойко В. И., Гулевский А. К. Биологическая активность и механизм действия пептидов, регулирующих процесс гибернации // Пробл. криобиологии. – 1996. – № 1. – С. 12–21.
2. Говоруха Т. П., Козлова В. Ф., Ретин Н. В. Морфологические изменения в печени сусликов при естественном гипобиозе // Пробл. криобиологии. – 1994. – № 4. – С. 27–31.
3. Жегунов Г. Ф. Особенности адаптации сердца зимоспящих животных // Пробл. криобиологии. – 1993. – № 3. – С. 21–32.
4. Загоруйко Г. Е. Кинетика структурных изменений миокарда сусликов в процессе пробуждения во время зимней спячки // Пробл. криобиологии. – 1992. – № 2. – С. 3–12.
5. Козлова В. Ф., Юрченко Т. Н. Структурные аспекты адаптации зимнеящих животных // Пробл. криобиологии. – 1996. – № 3. – С. 44–52.
6. Механизмы природных гипометаболических состояний: Сб. науч. тр. – Пушино: ПНЦ ИБК АН СССР. – 165 с.
7. Сингх Т. Д. Заметки об эволюции // Основы научного знания: Информ. бюл. № 2. – М., 1993. – С. 9–11.
8. Щенявский И. И. Исследование механизмов холодоустойчивости эритроцитов длиннохвостых сусликов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1994. – 16 с.
9. Kozlova V. F., Yurchenko T. N., Govorukha T. P., Sharlaj T. M. Structural basis of homeostasis of heterothermic animals during natural hypobiosis // 31 stannual meeting program and abstracts "Cryo'94". – Kyoto, Japan, 1994. – P. 34.
10. Wang L. C. H. Mammalian hibernation // The effects of low temperatures on biological systems. – London, 1985. – P. 349–385.

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

Поступила 20.06.97

В. П. КОЗЛОВА, Т. М. ЮРЧЕНКО, М. І. ЩЕТИНСЬКИЙ, М. В. РЕПІН

ОСОБЛИВОСТІ МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ОРГАНІЗМУ ГЕТЕРОТЕРМНИХ ТВАРИН У ЦИКЛІ ГІБЕРНАЦІЯ–ПРОБУДЖЕННЯ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Представлено результати морфологічного дослідження організму гетеротермів в активних фазах баутів. Показано, що період гібернація–пробудження не є індиферентним навіть для високо-адаптованих до холоду в природних умовах зимовосплячих тварин. Він несе стресорний компонент, викликає розпад глікопротеїнових і ліпідних комплексів, альтерацію клітин, тканин і органів, одночасно включаючи в них механізми захисту і компенсації, які спрямовані на підтримку гомеостазу в замкненому циклі самодостатності.

V. F. KOZLOVA, T. N. YURCHENKO, M. I. SCHETINSKY, M. V. REPIN

PECULIAR FEATURES OF THE MORPHOFUNCTIONAL STATE OF A HETEROTHERMIC ORGANISM IN A HIBERNATION-AROUSAL BOUT

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

The authors present the results on studying the organisms of heterothermic animals in the active phases of the bouts. A hibernation-arousal bout was shown not to be indifferent even for the hibernating animals, which became strongly cold-adapted under natural conditions. It involves a stress component, induces degradation of glycoprotein and lipid complexes, alteration of cells, tissues and organs, simultaneously triggering the mechanisms of compensation and protection in them, aimed towards maintaining homeostasis in a self-sufficient closed cycle.

Л.П.Кравченко, А.М.Белоус, И.В.Шанина**ДЛИТЕЛЬНОЕ ХОЛОДОВОЕ ХРАНЕНИЕ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ
В СИСТЕМАХ *IN VIVO* И *IN VITRO***

Изучалось влияние длительного холодового хранения (при 0 °С) на функциональные свойства гепатоцитов в системах *in vivo* и *in vitro*. Результаты исследования показали, что клетки печени более чувствительны к ишемическим факторам повреждения в системе *in vivo*, чем в системе *in vitro*, в связи с резким снижением уровня макроэргов и интенсификации перекисного окисления липидов.

Свойство клетки в условиях *in vivo* поддерживать внутренний гомеостаз и сохранять регуляцию общего метаболизма лежит в основе жизнедеятельности организма, а степень сохранения гомеостаза после выделения клеток или тканевых препаратов определяет его функционально-метаболическую полноценность *in vitro*. Свежевыделенные гепатоциты сохраняют интенсивность метаболизма по многим показателям в условиях нормотермии, близкой к перфузируемой печени [3, 4]. Однако не выяснена степень сохранения свойств клеток на этапах их длительного холодового хранения в системах *in vivo* и *in vitro* при температурах 0–4 °С, т.е. в условиях, использующихся для создания запасов клеток и органов с целью применения в экспериментальной биологии, фармакологии и медицине [5, 7]. Поэтому целью исследования было изучение влияния длительного хранения клеток при 0 °С на функциональные свойства гепатоцитов, находящихся в состоянии *in vivo* и *in vitro*.

Эксперименты проводили на крысах линии Вистар массой 200–250 г. Гепатоциты выделяли из печени крыс по разработанному нами неферментативному методу [2]. Использовали суспензию изолированных гепатоцитов с жизнеспособностью не менее 90%, определяемой по окрашиванию 0,6-процентным трипановым синим. После выделения гепатоциты ресуспендировали в сахарозосодержащем растворе (ССР). Печень анестезированных животных перфузировали *in situ* охлажденным ССР, насыщали этим раствором и переводили в специальные бюксы, которые находились во льду. Образцы суспензии изолированных гепатоцитов и целой печени исследовались после 30-минутного (контроль), 24-, 48- и 72-часового хранения при 0 °С. Оценку образцов проводили по уровню накопления малонового диальдегида (МДА) в трех реакциях (начальной, спонтанной и аскорбатзависимой) по методу [8], по содержанию АТФ, определяемому по методу [1], и степени перераспределения уровня аланинаминотрансферазы (АЛАТ).

Ранее нами установлено, что использование натрий- и калийсодержащих растворов при холодовом хранении (4 °С) суспензии изолированных гепатоцитов не предотвращало повреждения клеток, так как в этих растворах происходило их резкое набухание уже после 6–12-часового хранения при 4 °С. Применение для холодового хранения гепатоцитов раствора, содержащего сахарозу и альбумин, способствовало более длительному (до 72 ч) сохранению жизнеспособных клеток [6].

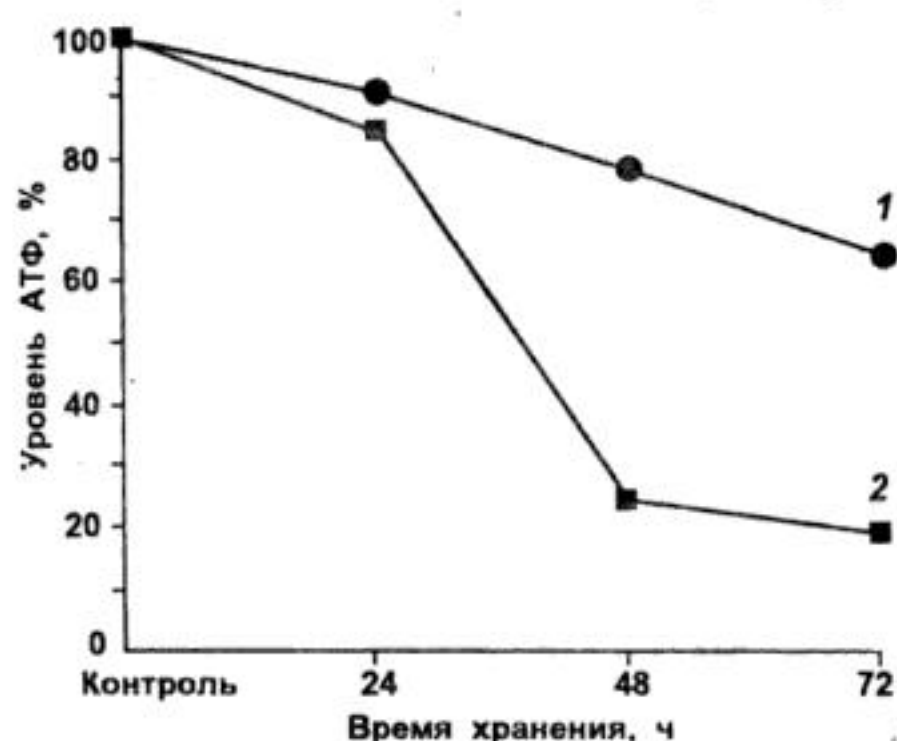
Из таблицы видно, что на этапах холодового хранения при 0 °С как изолированных гепатоцитов, так и целой печени происходит линейное увеличение концентраций МДА в исследуемых образцах. Продукция МДА более интенсивна в образцах целой печени по сравнению с образцами изолированных гепатоцитов, в которых его концентрация была в 2,6–3,5 раза выше в сравнении с контролем спустя 72 ч хранения для каждой из реакций определения МДА.

Уровень образования МДА в образцах на этапах холодового хранения при 4 °С

Уровень реакции	Время хранения образцов, ч				*
	Контроль	24	48	72	
Изолированные гепатоциты, нмоль/млн					
Начальный	0,21±0,05	0,28±0,03	0,35±0,03	0,44±0,03	2,0
Спонтанный	0,42±0,02	0,55±0,04	0,68±0,05	0,74±0,06	1,8
Аскорбат-иницированный	0,86±0,06	1,08±0,07	1,23±0,06	1,34±0,07	1,6
Целая печень, нмоль/мг белка					
Начальный	0,23±0,03	0,37±0,03	0,57±0,04	0,71±0,07	3,0
Спонтанный	0,36±0,06	0,66±0,06	0,97±0,07	1,27±0,15	3,5
Аскорбат-иницированный	0,55±0,06	0,95±0,09	1,21±0,09	1,44±0,18	2,6

Примечание. * — достоверное увеличение образования МДА после 72 ч холодового хранения исследуемых образцов по сравнению с контролем (30 мин)

Несколько другая зависимость изменения АТФ отмечена при изучении его уровня на этапах холодового хранения в исследуемых образцах (рисунок). После суточного хранения количество АТФ как в изолированных гепатоцитах, так и в целой печени составляло 85–90% от исходного контрольного уровня. После 48 ч хранения изолированных гепатоцитов уровень АТФ был низким и составлял 10–15%, а при хранении целой печени — около 50%.



Уровень АТФ в образцах на этапах холодового хранения при 0 °С: 1 — суспензия изолированных гепатоцитов, 2 — целая печень

Дальнейшее хранение образцов при 0 °С способствовало небольшому снижению уровня АТФ в суспензии изолированных гепатоцитов (65–70% от контроля). После 72-часового холодового хранения целой печени уровень АТФ в ткани снижался до 15–20% и был очень низким по сравнению с допустимыми физиологическими нормами, что объясняется гетерогенностью материала. Изолированные гепатоциты представляют собой более однородную популяцию выделенных из ткани печени паренхиматозных клеток, которые уже на этапе выделения претерпели определен-

ный отбор по степени стабильности к воздействию окружающей среды. При охлаждении печени гетерогенная популяция клеток по-разному реагирует на различные температурно-осмотические факторы. Вследствие этого чаще возникают нарушения структуры ткани, которые ведут к резкому снижению их энергообеспечения, хотя причина может быть и не только в этом. Следовательно, охлаждение изолированных гепатоцитов до 0 °С хорошо переносится суспензией клеток, если средой хранения является сахароза, которая способствует сохранению осмотических свойств клеток, а соответственно их формы и объема.

При исследовании уровня перераспределения АЛАТ после хранения образцов при 0 °С не было выявлено резкого различия этого показателя на всех этапах консервации. При хранении образцов в сахарозосодержащем растворе не наблюдалось достоверного изменения в уровне активности АЛАТ на

етапах холодового хранения по сравнению с контролем. Из этого можно сделать вывод, что данный фермент не претерпевает существенных изменений в составе гепатоцитов после длительного гипотермического хранения.

Таким образом, среда, содержащая непроникающие компоненты (сахароза, альбумин), способна сохранять метаболический уровень изолированных гепатоцитов при 0 °С более 48 ч, а целой печени только 24 ч. Клетки печени оказались более чувствительными к повреждающим факторам гипотермического хранения (0 °С) в системе *in vivo*, чем в системе *in vitro* вследствие резкого снижения уровня макроэргов и интенсификации процессов перекисного окисления липидов. Суспензия изолированных гепатоцитов, длительно хранящаяся при 0 °С в специальных средах, может быть широко использована в области клеточной биологии, фармакологии и экспериментальной медицины, так как клетки печени *in vitro* сохраняют свои метаболические свойства на достаточно высоком уровне. Хранение целой печени при этих температурах ограничено 24 ч, если средой холодового хранения служит 0,25 М сахароза, содержащая 1% бычьего сывороточного альбумина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Атауллаханов Ф. И., Пичугин А. В. Модификация люциферин-люциферазного метода определения концентрации АТФ в эритроцитах // Биофизика. – 1981. – Т. XXVI, вып. 1. – С. 86–89.
2. Пат. 14080 України, МКП⁵ С. 12 № 5/00. Спосіб здобуття ізольованих гепатоцитів / Л. П. Кравченко, А. М. Андрієнко, О. А. Семенченко // Опубл. 25.04.97. Бюл. № 2.
3. Berry M., Friend D. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells // J. Cell. Biol. – 1969. – № 43. – P. 506–520.
4. Baur H., Kasperek S., Pfaffs E. Criteria of viability of isolated liver cells // Hoppe-Seyler Ztschr. Physiol. Chem. – 1975. – 356, № 6. – P. 827–838.
5. Fuller B. Storage of cells and tissues at Hypothermia for clinical use // Symposia of Soc. Exp. Biol., № XXXI, 1987. – P. 341–362.
6. Kravchenko L., Andrienko A., Belous A., Shanina I. Long-term storage of isolated liver cells at hypothermia // Cryo-Letters. – 1994. – № 3. – P. 135–144.
7. Southard J., Gulic T., Ametani M. et al. Important components of the UW-solution // Transplantation. – 1990. – 49, № 2. – P. 251–257.
8. Yagi K. Assay for serum lipid peroxide level and its clinical significance. In: Yagi K. Lipid peroxides in biology and medicine. – N.Y. – Academ. Press. – 1982. – P. 223–242.

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

Поступила 19.02.97

Л. П. КРАВЧЕНКО, А. М. БЕЛОУС, І. В. ШАНИНА

ДОВГОСТРОКОВЕ ХОЛОДОВЕ ЗБЕРІГАННЯ КЛІТИН ПЕЧІНКИ В СИСТЕМАХ *IN VIVO* ТА *IN VITRO*

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Вивчався вплив довгострокового холодового зберігання (при 0 °С) на функціональні властивості гепатоцитів у системах *in vivo* та *in vitro*. Результати дослідження показали, що клітини печінки до ішемічних факторів пошкодження (0 °С) більш чутливі в системі *in vivo*, ніж в системі *in vitro*, в зв'язку з різким зниженням рівня макроергів та перекисного окислення ліпідів.

L. P. KRAVCHENKO, A. M. BELOUS, I. V. SHANINA

LONG-TERM COLD STORAGE OF LIVER CELLS IN THE *IN VIVO* AND *IN VITRO* SYSTEMS

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

The authors investigated the action of the long-term cold storage (at 0 °C) on the functional parameters of hepatocytes in the *in vivo* and *in vitro* systems. The results obtained have shown that the liver cells are more susceptible to the ischemic factors of the injury in the *in vivo* system as compared with the *in vitro* system, due to a rapid reduction in the level of macroergs and intensification of lipid peroxidation.

В.С.Марченко, В.Г.Бабийчук, И.И.Ломакин, А.В.Шило, В.В.Ломако**ПРОНИЦАЕМОСТЬ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА
ДЛЯ КАРДИОТРОПНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ
ПРИ КРАНИОЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ГИПОТЕРМИИ**

Показано, что в условиях краниocereбральной гипотермии (КЦГ) могут существенно изменяться взаимоотношения центрального и автономного контуров регуляции сердечной деятельности, поэтому повышается вероятность парадоксальных реакций организма на применение кардиотропных препаратов. Изменение знака хронотропного эффекта катехоламина (КА) и ацетилхолина (АХ) при гипотермии в значительной степени обусловлено повышенным уровнем проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) охлажденного мозга, что необходимо учитывать в практической медицине при проведении гипотермии с лечебной целью.

Эффективное применение КЦГ при различных патологиях сердечно-сосудистой системы предполагает использование комплекса лекарственных веществ. Однако в условиях КЦГ могут существенно изменяться взаимоотношения центрального и автономного контуров регуляции сердечной деятельности [1–5], что повышает вероятность парадоксальных реакций организма на применение кардиотропных препаратов. Это обусловлено тем, что ряд веществ, в эутермных условиях не проникающих через ГЭБ, обладает противоположным действием при системном и центральном способах введения [5]. Охлаждение организма вызывает кардинальные перестройки нейродинамики мозга, приводящие к повышению проницаемости ГЭБ [1–3]. Поэтому на фоне гипотермии следует ожидать смену знаков батмо-, дромо-, ино-, тоно-, хроно-, кардиотропных эффектов КА [4] и усиление симпатического действия веществ, обладающих парасимпатическим эффектом. В связи с этим было изучено влияние норадреналина (НА), адреналина (А) и ацетилхолина (АХ) на частоту сердечных сокращений (ЧСС) при различных уровнях проницаемости ГЭБ охлажденного мозга.

Эксперименты проводились на белых крысах массой 180–220 г. Функциональное состояние ГЭБ оценивалось радиоизотопным методом при ритмической гипотермии (РГ) с частотой воздействия на каудальные терморецепторы 0,1 Гц (0,1 РГ) и КЦГ [1–3], которую осуществляли на аппарате программного охлаждения, созданном в СКТБ совместно с ОП ИПКиК НАНУ. Ритмическую гипотермию проводили на установке, состоящей из электрогенератора и электроэнцефалографа, подключенных к планшетному потенциометру, у которого каретка с пером была заменена контейнером с холодной водой (0–5 °С), соединенным по системе сообщающихся сосудов с дном специальных камер для региональной гипотермии наркотизированных или интактных животных. Частоту сердечных сокращений определяли по кардиограмме, регистрируемой на электроэнцефалографе BST-1 во втором стандартном отведении с последующей математической обработкой 100 кардиоинтервалов на ЭВМ СМ-4 по программе SERO и КОПГ. Рассчитывали следующие показатели: моду (M_o), амплитуду моды (AM_o), вариационный размах (ΔX), индекс напряжения регуляторных систем (ИН), медленные волны первого порядка (Sm), медленные волны второго порядка (So) [2].

Результаты экспериментов показали, что при гипотермии до 35 °С и ниже 30 °С катехоламины, введенные в кровяное русло, повышают сердцебиение, а при инъекции в передний отдел гипоталамуса приводят к урежению ЧСС. Однако существует температурный диапазон (32±1) °С, в пределах которого системное введение КА вызывает центральный эффект, т.е. А и НА не повы-

шают, а понижают ЧСС (табл. 1). Это может свидетельствовать об увеличении проницаемости ГЭБ для данных веществ, что и подтвердили радиоизотопные исследования. Было показано, что при охлаждении животных до 32 °С более чем в 2 раза повышается проницаемость ГЭБ для ³Н-А и ³Н-НА, которые при нормотермии, поверхностной или более глубокой гипотермии в мозг не проникали (табл. 1).

Т а б л и ц а 1

Влияние КЦГ на ЧСС и проницаемость ГЭБ при системном введении катехоламинов

Условия экспериментов	Частота сердечных сокращений (% от нормы)		Кп ГЭБ	
	А	НА	³ Н-А	³ Н-НА
Контроль	120±3	115±2	0,06±0,01	0,16±0,05
КЦГ 35 °С	115±5	110±5	0,07±0,01	0,17±0,06
КЦГ 32 °С	75±3*	80±3*	0,27±0,02*	0,3±0,06*
КЦГ 28 °С	112±5	109±6	0,05±0,009	0,15±0,04

Примечание. А — адреналин гидрохлорида (0,1%-й раствор) 0,5 мл/100 г; ³Н-А — 5 мкл раствора 1 мКи/1 мкл; НА — норадреналин гидротартрата (0,2%-й раствор) 0,5 мл/100 г; ³Н-НА — 5 мкл раствора 1 мКи/1 мкл; Кп — коэффициент проницаемости (отношение удельной радиоактивности мозга к удельной радиоактивности крови); * — различия по сравнению с контролем достоверны ($P < 0,05$).

Для выявления более тонких закономерностей при этих процедурах был проведен анализ сердечного ритма с привлечением специальных математических средств [2]. При этом было обнаружено (табл. 2), что показатели математического анализа сердечного ритма при КЦГ отражают различные формы процессов регуляции. Возрастание Мо (указывающее на наиболее вероятный уровень функционирования системы кровообращения) при малоизмененном вариационном размахе ΔХ (показателе, связанном с активностью парасимпатической нервной системы) и АМо (показателе, отражающем мобилизующий эффект централизации управления ритмом сердца, обусловленном влиянием симпатического отдела вегетативной нервной системы) свидетельствует о значительных перестройках в механизмах симпатических и парасимпатических звеньев регуляции. Низкие значения I_k , m_0 (I_k — второе значение функции автокорреляции; m_0 — аргумент первого отрицательного значения функции автокорреляции), физиологический смысл которых заключается в оценке степени и характера влияния центрального контура на автономный, So (отражающего активность межсистемного уровня управления) и Sm (характеризующего состояние подкорковых нервных центров), а также падение ИН (характеризующего смещение вегетативного гомеостаза) свидетельствуют о преобладании активности парасимпатической нервной системы. По нашему мнению, в условиях гипотермии эти изменения могут быть связаны с проникновением КА в гипоталамус, где они оказывают парасимпатическое влияние на центры сердечно-сосудистой системы. Следовательно, статистические характеристики динамического ряда кардиоинтервалов при гипотермии могут свидетельствовать об изменении проницаемости ГЭБ гипоталамуса для катехоламинов.

Т а б л и ц а 2

Влияние периферически введенного НА на параметры сердечной деятельности на фоне действия КЦГ

Показатели	Характер воздействия	
	наркоза	КЦГ
Мо	0,228 ±0,005	0,036 ±0,010
ΔХ	36,8 ±3,8	40,0 ±0,1
АМо	64,6 ±2,6	74,6 ±5,4
ИН	40,4 ±2,8	26,8 ±0,5
I_k	0,33 ±0,02	0,09 ±0,06
m_0	3,6 ±0,3	1,0 ±0,01
So	2,09 ±0,03	1,48 ±0,06
Sm	1,91±0,01	1,56 ±0,04

Необходимо отметить, что в условиях КЦГ не было обнаружено достоверного повышения ЧСС на фоне системного введения АХ. Однако, по нашему мнению, этот факт не может свидетельствовать о низкой проницаемости ГЭБ для АХ при гипотермии, так как центральный эффект АХ мог быть “замаскирован”. АХ, в отличие от КА, вызывает наряду с отрицательным и слабый положительный кардиотропный эффект. Показано, что блуждающие нервы оказывают на сердце как отрицательные, так и положительные дромо-, ино-, хронотропные влияния, обусловленные, по-видимому, переключением преганглионарных волокон не только на холинергические, но и на адренергические внутрисердечные нейроны [4]. Поэтому взаимоотношения “сердечных эффектов” КА и АХ были изучены и при ритмической гипотермии, способной более сильно по сравнению с КЦГ активировать ГЭБ [2, 3].

Т а б л и ц а 3

Влияние ритмической гипотермии на проницаемость ГЭБ и ЧСС на фоне системного введения НА и АХ

Фармакофон	Параметры	Длительность 0,1 РГ, мин			
		0	45	65	85'
НА	ЧСС, % от нормы	115±5	110±4	60±5*	105±6
³ H-НА	Кп	0,13±0,04	0,2±0,05	0,5±0,04*	0,19±0,05
АХ	ЧСС, % от нормы	80±5	120±6*	80±5	75±5
³ H-АХ	Кп	0,12±0,03	0,45±0,01*	0,18±0,05	0,2±0,06

Примечание. НА — норадреналин гидротартрат (1 мг/100 г); Н-НА (5 мкл; 1 мкК/1 мкл); АХ — ацетилхолин хлористый (10 мг/100 г); Н-АХ (5 мкл; 1 мкК/1 мкл); Кп — коэффициент проницаемости (отношение удельной радиоактивности мозга к удельной радиоактивности крови); * — различия по сравнению с исходными значениями (0 мин) достоверны ($P < 0,01$).

Результаты исследований показали, что на 45-й и 65-й мин холодового воздействия при системном введении АХ и НА соответственно наблюдается центральный эффект на ЧСС, т.е. НА не повышает, а снижает, а АХ не снижает, а ускоряет сердцебиение (табл. 3). При инъекции НА на фоне 0,1 РГ ЧСС уменьшается линейно, хотя и напоминает так называемую отрицательную лестницу (феномен Вудвордса) [4]. В подобных условиях при введении АХ изменения ЧСС носят квазисинусоидальный характер по типу положительной лестницы (феномен Боудичи) [4]. Причем периоды повышения ЧСС сменяются снижением сердечной ритмики, как правило, с частотой 0,1–0,2 Гц, сложным образом отслеживая ритм холодового воздействия. Такое влияние нейротрансмиттеров на динамику изменения ЧСС при 0,1 РГ должно в известной степени отражать особенности проницаемости ГЭБ. Анализ результатов радиоизотопных исследований показал, что общий уровень проницаемости ГЭБ при ритмической гипотермии почти в 2 раза выше, чем при “классической” КЦГ, а максимумы проницаемости для ³H-НА и ³H-АХ приходятся на разные этапы 0,1 РГ в полном соответствии с моментом их центральных эффектов (табл. 3). Можно предположить, что процессы повышения проницаемости ГЭБ для АХ и НА разнесены в пространстве и времени. Проницаемость ГЭБ для НА на основе его центрального действия на сердечный ритм объясняется “шлюзным механизмом”, т.е. последовательным открытием системы постоянно существующих каналов (например, в области плотных контактов эндотелиоцитов). Динамика ЧСС при системном введении АХ свидетельствует о том, что его поступление в мозг могло быть обеспечено появлением временных трансэндотелиальных каналов, пропускающих нейромедиатор с секундной ритмикой.

Повышение проницаемости ГЭБ при КЦГ, по-видимому, биологически значимо. Физиологическая целесообразность этого повышения заключается в необходимости “поддержки” усиленного функционирования доминирующих нейротрансмиссивных процессов охлажденного мозга поступающими из крови катехоламинами в качестве локальных нейrogормонов.

Таким образом, по нашему мнению, парадоксальные кардиотропные эффекты при гипотермии в значительной степени обусловлены повышенным уровнем проницаемости ГЭБ охлажденного мозга. Вероятность феноменов такого рода жизненно необходимо учитывать в практической медицине при проведении гипотермии с лечебной целью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бабийчук Г.А., Марченко В.С., Ломакин И.И., Белостоцкий А.В. Нейрофизиологические процессы охлажденного мозга. – Киев: Наук. думка, 1992. – 208 с.
2. Бабийчук Г.А., Марченко В.С., Шило А.В. и др. К механизмам регуляции проницаемости гемато-энцефалического барьера охлажденного мозга. Сообщение 2 // Пробл. криобиологии. – 1995. – № 2. – С. 3–9.
3. Марченко В.С., Бабийчук Г.А., Шило А.В. и др. К механизмам регуляции проницаемости гемато-энцефалического барьера охлажденного мозга. Сообщение 3 // Пробл. криобиологии. – 1995. – № 3. – С. 10–19.
4. Словарь физиологических терминов. – М.: Наука, 1987. – 488 с.
5. Stryken-Boudie H.A. Catecholamine receptors in nervous system. – Nijmegen, 1975. – 171 p.

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

Поступила 01.04.97

В. С. МАРЧЕНКО, В. Г. БАБИЙЧУК, І. І. ЛОМАКІН, О. В. ШИЛО, В. В. ЛОМАКО

ПРОНИКНІСТЬ ГЕМАТОЕНЦЕФАЛІЧНОГО БАР'ЄРА ДЛЯ КАРДІОТРОПНИХ ЛІКАРСЬКИХ РЕЧОВИН ПРИ КРАНІОЦЕРЕБРАЛЬНІЙ ГІПОТЕРМІЇ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Показано, що в умовах КЦГ можуть істотно змінюватись взаємовідносини центрального і автономного контурів регуляції серцевої діяльності, тому що підвищується ймовірність парадоксальних реакцій організму на введення кардіотропних препаратів. Зміна знаку хронотропного ефекту КА і АХ при гіпотермії в значній мірі обумовлена підвищенням рівнем проникності ГЕБ охолодженого мозку. Зазначені особливості необхідно враховувати в практичній медицині при проведенні гіпотермії з лікувальною метою.

V. S. MARCHENKO, V. G. BABIYCHUK, I. I. LOMAKIN, A. V. SHILO, V. V. LOMAKO

PERMEABILITY OF THE BLOOD-BRAIN BARRIER TO CARDIOTROPIC DRUGS DURING CRANIOCEREBRAL HYPOTHERMIA

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

The given research shows that during craniocerebral hypothermia (CCH) the interrelations of the central and autonomous circuits of regulation of the heart activity may be altered significantly, thus increasing the probability of paradoxical responses of the organism to application of cardiotropic drugs. A change of the sign of a chronotropic effect of catecholamine (KA) and acetyl choline (AC) during hypothermia is mainly due to a rise in the level of permeability of the blood-brain barrier (BBB) of the cooled brain. The reported specific features should be definitely taken into account in practical medicine when performing hypothermic therapy.

**В.В.Рамазанов, А.Ю.Семенченко, Е.Л.Воловельская, Э.С.Мельник,
В.А.Бондаренко**

ДЕЙСТВИЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ НА ХОЛОДОВОЙ ШОК ЭРИТРОЦИТОВ

Исследована чувствительность эритроцитов к холодовому шоку после обработки клеток протеолитическими ферментами. Выявлено, что обработка эритроцитов проназой и папаином снижает холодовую чувствительность клеток, а обработка трипсином не вызывает подобного эффекта. Модификация клеток проназой и трипсином снимает влияние диизотиоцианостильбендисульфоната (ДИДС) на холодовой шок эритроцитов. Обработка клеток папаином не выявляет указанного эффекта на действие ДИДС.

Модификация взаимодействий белков цитоскелета между собой или с мембраной приводит к изменениям в развитии холодовой и гипертонической чувствительности эритроцитов [1–3]. При этом предполагалось, что развитие чувствительности клеток связано с нарушением взаимодействий белка полосы 4.1 с белками цитоскелета [1], а приобретение осмотически индуцированной устойчивости к гипертоническому шоку — с модификацией взаимодействий белка полосы 3 с цитоскелетом [2]. Отмечено, что нарушение взаимодействий белка полосы 3 с цитоскелетом приводит к некоторому росту уровня холодового шока, и при этом присутствие ингибитора анионного транспорта ДИДС в значительно меньшей степени влияет на развитие данного процесса [2]. В связи с этим было исследовано комбинированное влияние протеолитической модификации эритроцитов и обработки клеток ДИДС на чувствительность эритроцитов к холодовому шоку.

В опытах использовали эритроциты донорской крови. Протеолитическую обработку и обработку эритроцитов ДИДС производили в изотонической среде, содержащей 150 ммоль/л NaCl, 10 ммоль/л трис-HCl (*pH* 7,4). Трипсин, проназу ("Calbiochem"), папаин ("Merck") добавляли в количествах соответственно 200, 200, 1000 мкг/мл суспензии клеток (20%-й гематокрит), ДИДС в концентрации 20 мкмоль/л и инкубировали 60 мин при 37 °С. Клетки отмывали холодным буфером, содержащим ингибитор сериновых протеаз фенилметилсульфонилфлюорид (ФМСФ) ("Serva") в концентрации 1 ммоль/л или йодоацетамид ("Serva") в той же концентрации при обработке папаином [5, 6].

Для получения мембранных белков эритроциты лизировали на ледяной бане (10% НТС) в растворе, содержащем 7 ммоль/л NaCl, 5 ммоль/л фосфата, 1 ммоль/л ФМСФ, 1 ммоль/л ЭДТА ("Calbiochem") в течение 10 мин. Лизат центрифугировали при 15 000 об/мин 15 мин при 4 °С. Осадок мембран отмывали 4 раза лизирующим буфером. Интегральные белки мембран эритроцитов получали следующим образом. Тени эритроцитов суспендировали в 0,1 моль/л растворе NaOH, инкубировали на ледяной бане в течение 10 мин, осаждали 15 мин при 15 000 об/мин (4 °С) и два раза отмывали тем же раствором [5]. Электрофоретическое исследование мембранных белков производили по методу, описанному в [3]. Холодовой шок эритроцитов осуществляли в растворе, содержащем 1,2 моль/л NaCl.

На рис. 1 представлены результаты исследования холодового шока эритроцитов после обработки клеток ДИДС и протеолитическими ферментами. Обработка эритроцитов ДИДС снижает их чувствительность к охлаждению в данной среде. Обработка проназой и папаином также приводит к снижению устойчивости клеток к холодовому шоку, а трипсин не оказывает заметного влияния. Дополнительная обработка эритроцитов ДИДС более снижает чув-

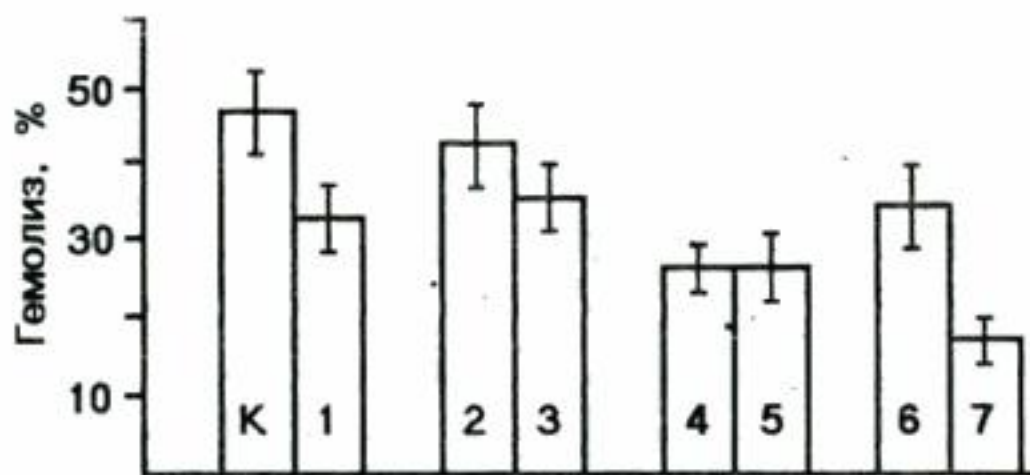


Рис. 1. Влияние обработки ДИДС, трипсином, проназой, папаином на чувствительность эритроцитов к охлаждению в течение 10 мин до 0 °С после 10-минутной инкубации при 37 °С в среде, содержащей 1,2 моль/л NaCl: 1 — ДИДС, 2, 3 — трипсин, 4, 5 — проназа, 6, 7 — папаин; 3, 5, 7 — клетки, дополнительно обработанные ДИДС; К — контроль

ствительность только в клетках, обработанных папаином, тогда как влияния указанного реагента в клетках, модифицированных трипсином и проназой, не выявляется.

Электрофоретический анализ белков мембранных везикул, содержащих белок полосы 3, показал, что обработка эритроцитов трипсином приводит к незначительной деструкции белка полосы 3, а обработка клеток проназой или папаином приводит к значительному расщеплению данного белка (рис. 2).

Таким образом, обработка трипсином, приводящая к незначительному расщеплению белка полосы 3, вероятно, из-за примеси в препарате химотрипсина [5] не изменяет чувствительности эритроцитов к холодовому шоку. В то же время обработка клеток проназой или папаином, в результате которой происходит деструкция белка полосы 3 (рис. 2), снижает уровень гемолиза эритроцитов после охлаждения (см. рис. 1). Дополнительная обработка эритроцитов ингибитором анионного транспорта ДИДС вызывает дополнительное снижение чувствительности к холодовому шоку только клеток, обработанных папаином.

Известно, что обработка эритроцитов ингибитором анионного транспорта ДИДС приводит к модификации взаимодействий белка полосы 3 с белками цитоскелета [5]. При этом до 10% спектрина и анкирина не экстрагируется из мембранных везикул, содержащих белок полосы 3. В то же время модификация ДИДС-предобработанных клеток трипсином или проназой устраняет описанный эффект ДИДС. Обработка трипсином не приводит к расщеплению белка полосы 3, поэтому авторы [5] заключили, что эффект действия ДИДС на взаимодействие белка полосы 3 с белками цитоскелета опосредуется интегральным белком, чувствительным к указанному ферменту. Так как обработка папаином не устраняет влияния ДИДС на холодовой шок (см. рис. 1), то можно предположить, что этот протеолитический фермент не расщепляет указанного трипсин-чувствительного белка.

Таким образом, действие ДИДС на чувствительность эритроцитов к холодовому шоку может опосредоваться через его влияние на взаимодействие белка полосы 3 с белками цитоскелета. Данное предположение хорошо согласуется с подобным выводом, полученным при исследовании

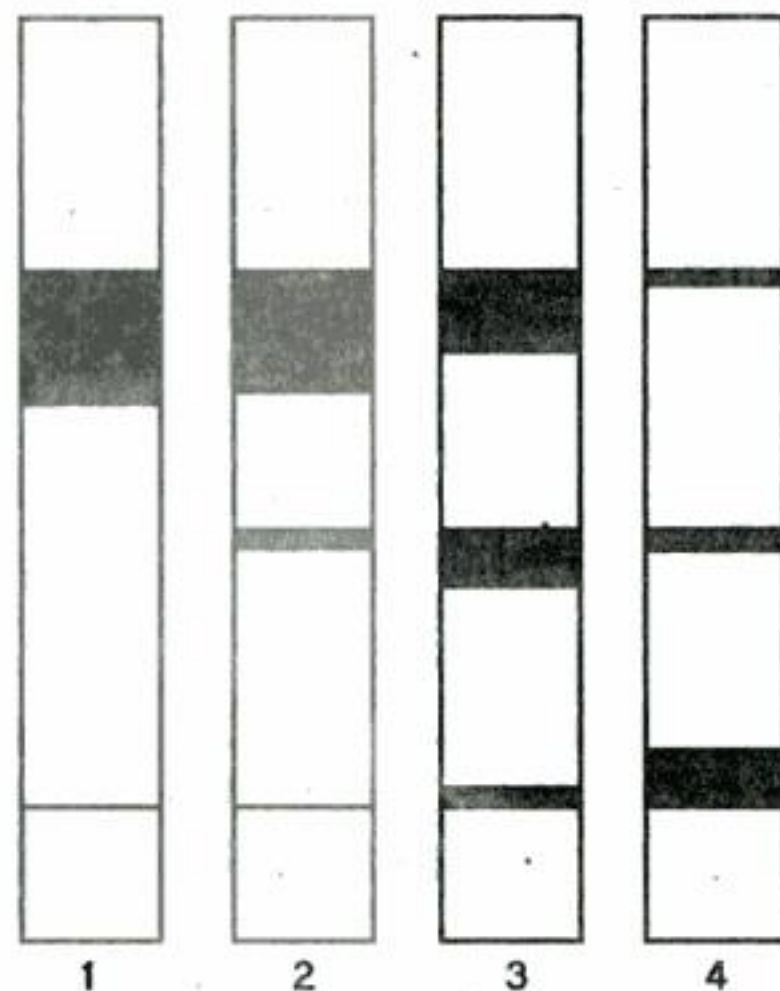


Рис. 2. Электрофорез белков мембранных везикул, содержащих белок полосы 3, полученных после протеолической обработки эритроцитов: 1 — контроль, 2 — трипсин, 3 — проназа, 4 — папаин

довании комбинированного действия парахлормеркурийбензоата и ДИДС на холодовой и гипертонический шок эритроцитов [2].

Кроме того, известно, что обработка эритроцитов проназой или папаином приводит к удалению во внешнюю среду пептидного фрагмента белка полосы 3 в 5 кД [6]. Такой результат ведет к ингибированию анионного транспорта и снижает способность ингибиторов связываться с мембранами. При обработке эритроцитов трипсином этого не выявляется [6]. Надо отметить, что отщепление указанного фрагмента при обработке эритроцитов папаином не снимает действия ДИДС на холодовой шок (см. рис. 1). Из этого можно предположить, что обработка папаином не вызывает деструкции неидентифицированного белка, который чувствителен к трипсину и проназе. Необходимо заметить также и то, что снижение способности стильбеновых ингибиторов связываться с белком полосы 3 в папаинизированных клетках [6] не устраняет эффекта ДИДС на холодовой шок (см. рис. 1). Данную ситуацию можно объяснить в рамках двухступенчатого механизма взаимодействия ДИДС с анионным каналом [7]. В первые секунды происходит взаимодействие сульфонатных групп ингибитора с анион-транспортными сайтами белка полосы 3. Затем изотиоционатные группы взаимодействуют ковалентно с остатками аминокислот лизина на гидрофобном фрагменте анионного канала. Наиболее вероятно, что эффект ДИДС на связывание белков цитоскелета проявляется на стадии ковалентного взаимодействия ингибитора с анионным каналом, начиная с 5-й мин обработки эритроцитов указанным модификатором. Так как обработка происходит в течение 60 мин, сниженное сродство ингибитора к анионному каналу, вероятно, не является лимитирующим фактором для проявления эффекта ДИДС [5].

Для того чтобы в какой-то мере подтвердить вышеописанную ситуацию, эритроциты были обработаны в обратном порядке: сначала ДИДС, затем протеолитическими ферментами. В данном случае (рис. 3) также происходит аддитивное влияние ДИДС и папаина на снижение холодового шока эритроцитов. Можно сказать, что действия ДИДС и папаина на холодовую чувствительность клеток проявляются по-разному. Обработка проназой или трипсином не вызывает значительного изменения уровня холодового шока ДИДС-модифицированных эритроцитов и этот результат не противоречит вышеописанным предположениям.

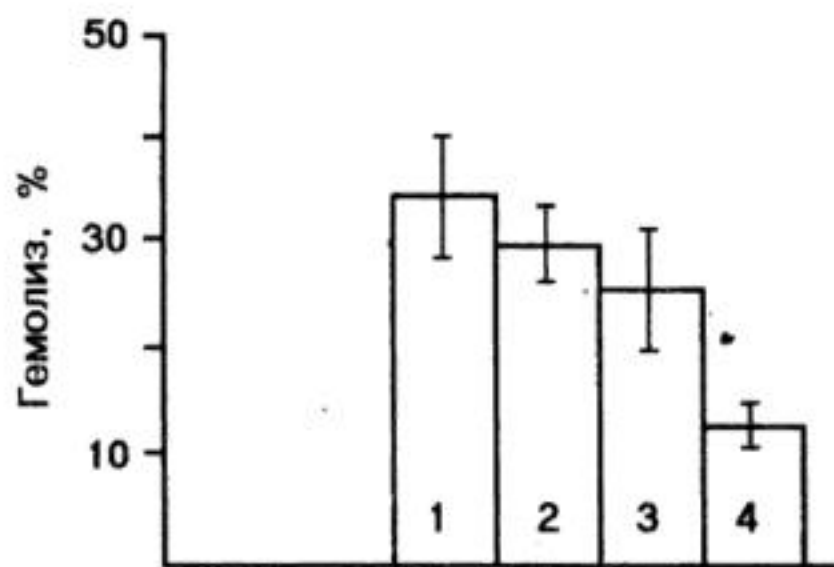


Рис. 3. Влияние предобработки ДИДС и последующей обработки протеолитическими ферментами на чувствительность эритроцитов к охлаждению в течение 10 мин до 0 °С после 10-минутной инкубации при 37 °С в среде, содержащей 1,2 моль/л NaCl: 1, 2, 3, 4 — эритроциты, предобработанные ДИДС; 2, 3, 4 — дополнительная обработка соответственно трипсином, проназой, папаином

Таким образом, полученные результаты с использованием протеолитических ферментов и ДИДС позволяют сделать вывод о том, что развитие чувствительности эритроцитов к холодовому шоку определяется модификацией взаимодействия белка полосы 3 с белками цитоскелета. Такая модификация может опосредоваться минорными интегральными белками, чувствительными к обработке клеток трипсином и проназой. Развитие холодового и гипертонического шока связано с изменениями взаимодействий белка полосы 4.1 в цитоскелете [1]. Белок полосы 4.1, являясь составной частью цитоскелета, может взаимодействовать с

интегральными белками эритроцитов, гликофорином А, С, а также с белком полосы 3 [4]. Поэтому результаты данной работы вносят дополнение к гипотетическому механизму развития чувствительности и устойчивости эритроцитов к холодовому шоку. Развитие холодовой чувствительности эритроцитов связано с модификацией взаимодействий белка полосы 4.1 с белками цитоскелета [1]. Кроме того, данный процесс может определяться взаимодействием белка полосы 3 с цитоскелетом опосредованно через белок полосы 2.1 (анкерин) [2] и, возможно, через белок полосы 4.1.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

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., Руденко С.В., Бондаренко В.А. Влияние модификаторов цитоскелета на чувствительность эритроцитов к гипертоническому шоку при повышении осмолярности среды прединкубации // Пробл. криобиологии. – 1994. – № 2. – С. 11–16.
3. Рамазанов В.В., Семенченко А.Ю., Воловельская Е.Л. и др. Влияние прочности связи периферических белков с мембранами на гипертонический шок эритроцитов // Пробл. криобиологии. – 1996. – № 3. – С. 8–12.
4. Haest C. W. M. Interactions between membrane skeleton proteins and the intrinsic domain of the erythrocyte membrane // Biochim. Biophys. Acta. – 1982. – 694. – P. 331–352.
5. Hsu L., Morrison M. The interaction of human erythrocyte band 3 with cytoskeletal components // Arc. Biochem. Biophys. – 1983. – 227, № 1. – P. 31–38.
6. Jennings M. L., Adams M. F. Modification by papain of the structure and function of band 3, the erythrocyte anion transport protein // Biochemistry. – 1981. – 20. – P. 7118–7123.
7. Jennings M. Oligomeric structure and the anion transport function of human erythrocyte band 3 protein // J. Membrane Biol. – 1984. – 80. – P. 105–117.

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

Поступила 16.09.97

В. В. РАМАЗАНОВ, О. Ю. СЕМЕНЧЕНКО, Е. Л. ВОЛОВЕЛЬСЬКА, Е. С. МЕЛЬНИК,
В. А. БОНДАРЕНКО

ВПЛИВ ПРОТЕАЛІТИЧНОЇ ОБРОБКИ НА ХОЛОДОВИЙ ШОК ЕРИТРОЦИТІВ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Досліджена чутливість еритроцитів до холодового шоку після обробки клітин протеолітичними ферментами. Виявлено, що обробка еритроцитів проназою та папаїном знижує холодову чутливість клітин, а обробка трипсином подібного ефекту не викликає. Модифікація клітин проназою та трипсином знімає вплив дії зотиоціаностильбендисульфату (ДІДС) на холодовий шок еритроцитів. Обробка клітин папаїном не виявляє вказаного ефекту на дію ДІДС.

V. V. RAMAZANOV, A. YU. SEMENCHENKO, E. L. VOLOVELSKAYA, E. S. MELNIK,
V. A. BONDARENKO

INFLUENCE OF PROTEOLYTIC TREATMENT ON COLD SHOCK OF RED CELLS

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

The authors investigated the susceptibility of red cells to cold shock following treatment of the cells with proteolytic enzymes. They found that treatment of the red cells with pronase and papain reduces cold susceptibility of the cells, while treatment with trypsin does not bring about a similar effect. Modification of the cells with pronase and trypsin eliminates the influence of diisothiocyanostylbene disulphonate (DIDS) on the cold shock of red cells. Treatment of the cells with papain does not induce the above response to the action of DIDS.

Т.П.Бондаренко, Е.И.Легач**СЕКРЕТИРУЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ АДРЕНОКОРТИКАЛЬНОЙ ТКАНИ
НОВОРОЖДЕННЫХ И ПОЛОВОЗРЕЛЫХ СВИНЕЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ
НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР**

Исследованы влияние низких температур и димексида (ДС), а также механизм модифицирующего действия ДС на стимулируемую секретирующую функцию аденокортикальной ткани новорожденных поросят и половозрелых свиней. Установлено, что ткань новорожденных животных обладает большей устойчивостью к действию низких температур по сравнению с тканью взрослых животных.

Многочисленные препараты глюкокортикоидов, которые широко применяются в эндокринологии, не всегда обеспечивают адекватные потребности организма. С точки зрения клинической эффективности ряд исследователей [2] отдают предпочтение трансплантационным методам лечения, среди которых особо отмечают эффективность ксенотрансплантации культур клеток аденокортикальной ткани новорожденных поросят [3]. Широкое применение в клинической практике трансплантационных методов лечения возможно лишь при условии разработки оптимальных методов криоконсервации, обеспечивающих при длительном хранении биологического материала сохранение его структуры и функциональной активности. С целью сохранения после низкотемпературного воздействия структурных и функциональных характеристик биологического материала используют защитные агенты, которые в зависимости от их концентрации, условий обработки и экспозиции биологического материала с ними могут вызывать модулирующее и токсическое действие на клетки и ткани [6]. В связи с этим целью данного исследования явилось изучение секретирующей способности аденокортикальной ткани животных при действии низких температур, криопротекторов и стимуляторов стероидогенеза.

Объектом исследования служила аденокортикальная ткань новорожденных поросят, доставляемых из совхоза-комбината "Слобожанский", Чугуевского р-на, Харьковской обл., и половозрелых животных, надпочечники которых доставлялись сразу же после забоя на Харьковском мясокомбинате. Поросят суточного возраста забивали гильотинированием и осуществляли экстирпацию надпочечников. В ряде случаев использовали также ткань гипофиза от этих же животных. Из аденокортикальной ткани готовили 10%-е гомогенаты. В качестве стимуляторов стероидогенеза использовали синактен и 0,5–2,5%-е гомогенаты гипофиза. Замораживание осуществляли по 2-этапной программе [1] в присутствии 1–10%-й концентрации ДС. Секрецию кортизола регистрировали флуориметрическим микрометодом [7].

При постановке экспериментов по влиянию низких температур на аденокортикальную ткань новорожденных поросят мы исходили из посылки, что используемый криопротектор должен быть фармакопейным препаратом, который не требовал бы удаления перед трансплантацией, с одной стороны, а также обладал бы эффективностью по отношению к основной функции нашего объекта — не угнетал секрецию гормонов, с другой стороны. Предыдущие разработки отдела [2] дали возможность сделать выбор и использовать для криоконсервации ДС (фармакопейная форма диметилсульфоксида), который был эффективнее 1,2-пропандиола и обладал к тому же противоишемическим действием, к которому весьма чувствительна аденокортикальная ткань [5].

Т а б л и ц а 1

Влияние ДС и синактена на адренокортикальную ткань новорожденных поросят и половозрелых свиней

Объект исследования	Содержание кортизола, нмоль/л · мг ткани			
	0	1	5	10
Адренокортикальная ткань половозрелых свиней	ДС, %			
	8,39± 0,51	8,58± 0,51	8,08± 0,73	7,7± 1,0
	ДС + 0,2 ЕД/мл синактена			
	9,38± 0,80	10,22± 2,0	7,99± 1,29	7,46± 1,70
Адренокортикальная ткань новорожденных поросят	ДС, %			
	16,55± 0,85	16,56± 1,05	16,25± 1,01	15,70± 1,07
	ДС + 0,2 ЕД/мл синактена			
	29,27± 1,02	29,04± 1,20	28,90± 1,12	27,70± 1,04

Примечание. * — статистически значимые результаты по сравнению с контролем.

Как видно из данных, представленных в табл. 1, ДС видоизменял секреторную функцию адренокортикальной ткани. 1%-я концентрация ДС в инкубационной среде приводила к незначительному увеличению уровня секреции клетками надпочечников половозрелых животных, но не изменяла уровень секреции клеток, полученных от новорожденных поросят. Увеличение концентрации до 5–10% приводило к угнетению секреции гормонов, особенно выраженному в случае 10%-й концентрации криопротекторов. Полученные результаты не были статистически значимы, поэтому можно говорить лишь о некоторых тенденциях изменения секреторной способности клеток. Однако известно, что криопротекторы в зависимости от продолжительности экспозиции биоматериала с ним могут проявлять свое токсическое действие [6]. В нашем случае при 30-минутной инкубации гомогенатов адренокортикальной ткани этого отрезка времени, очевидно, было недостаточно для проявления токсического действия. Но поскольку ДС быстро проникает в клетку и заменяет внутриклеточную воду, можно предположить, что это обстоятельство может повлиять, например, на ответ клеток на стимуляторы стероидогенеза, с одной стороны, а также на поведение клеток в условиях их замораживания-отогрева, с другой стороны, когда при снижении температуры в результате вымораживания жидкой фазы реальная концентрация криопротектора резко возрастет. Как видно из данных, представленных в табл. 1, синтетический аналог адренокортикотропного гормона — синактен — обладал стимулирующим действием только в случае нативных клеток и обработанных 1%-м ДС. Причем это было характерно как для ткани взрослых животных, так и новорожденных поросят. 5- и 10%-е концентрации ДС снимали активирующее действие синактена на стероидогенез.

Обработка клеток свежеприготовленными гомогенатами гипофизов, полученных от тех же животных и используемых в виде 0,5–2,5%-х концентраций (конечная в инкубационной среде), показала, что только 0,5%-е концентрации приводили к увеличению уровня секреции. Повышение концентрации гомогенатов гипофиза в инкубационной среде сопровождалось нелинейным падением уровня стимулируемой секреции. Известно, что многие биологически активные вещества выступают в роли катализаторов того или иного процесса только в определенных концентрациях. При достижении больших концентраций наблюдается обратный эффект — они выступают в роли ингибиторов. В качестве примера можно привести эффект ионов Ca^{++} на фосфолипазу A_2 : 0,5–2 мМ концентрации Ca^{++} активируют ферментативную активность, а

более высокие — ингибируют. При высоких концентрациях Ca^{++} ингибитор фосфолипазной активности этилендиамидтетраацетат (комплексон Ca^{++}) выступает как катализатор [4]. По всей видимости, мы имеем дело с аналогичными эффектами, особенно в случае криопротекторов, когда существенным образом меняются барьерные характеристики мембраны.

Имеются сведения о том, что адренокортикотропный гормон сам по себе существенно влияет на транспорт катионов, оказывая влияние на стероидогенез через изменение синтеза аскорбиновой кислоты, но и его действие на клетку также опосредовано концентрацией внеклеточных катионов [4]. Поэтому можно предположить, что изменение катионного транспорта под влиянием

криопротекторов может привести к различному перераспределению синтезирующего гормона. Для выяснения данного обстоятельства нами были проведены следующие эксперименты. Равные навески ткани инкубировались 30 мин в присутствии и в отсутствие стимуляторов стероидогенеза. После центрифугирования в супернатанте определяли уровень гормонов, осадки разрушали детергентом (1%-й тритон х-100) и определяли в них уровень гормона. Один образец обрабатывался детергентом без разделения на осадок и надосадок и в нем определялся уровень гормонов. Анализ этих данных позволил выявить, что в перерасчете на 1 г ткани адренокортикальная ткань синтезирует кортизола в 1,5 раза больше

в присутствии стимуляторов, однако способность ткани удерживать, а не секретировать кортизол возрастает в 1,3 раза, т.е. происходит замедление скорости секреции гормонов. В пользу данного предположения свидетельствуют данные, представленные на рис. 1, которые отражают концентрационную зависимость величины $[\text{кортизол}]_н / [\text{кортизол}]_о$ от присутствия в образце гомогенатов гипофиза, где $[\text{кортизол}]_н$ — количество гормона, секретируемое нативной тканью, $[\text{кортизол}]_о$ — количество гормона, секретируемое в присутствии того или иного количества гомогената гипофиза. Видно, что имеется экс-

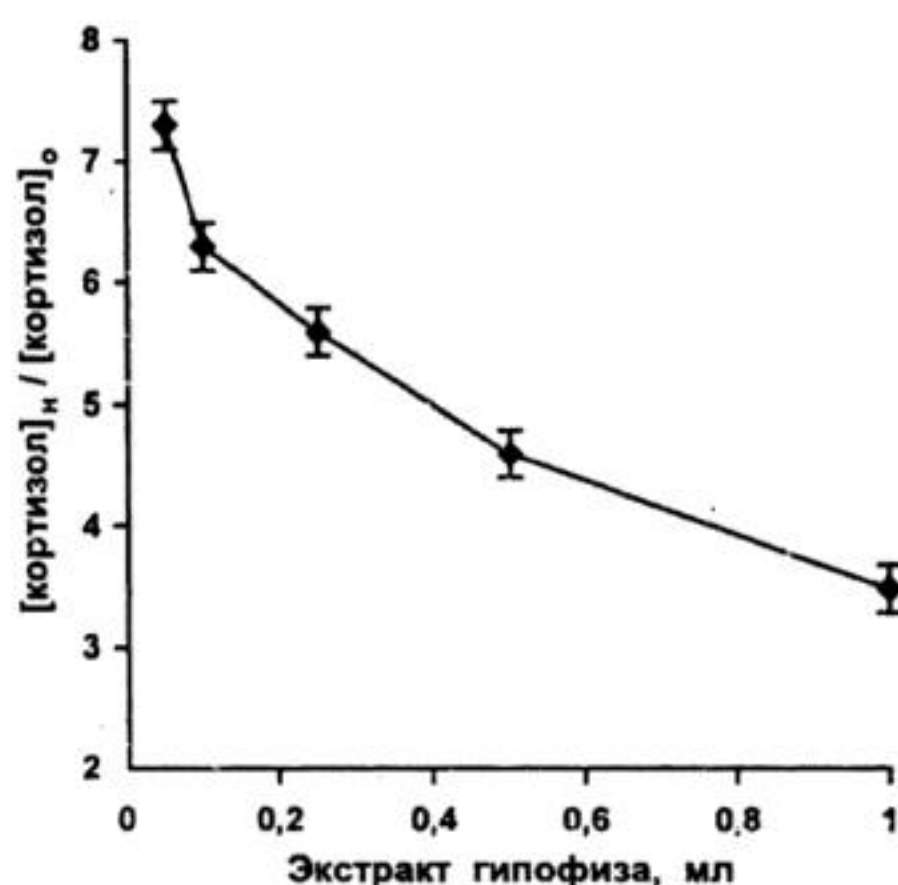


Рис. 1. Концентрационная зависимость изменения параметра $[\text{кортизол}]_н / [\text{кортизол}]_о$ адренокортикальной ткани полновозрелых свиней в присутствии в инкубационной среде экстрактов гипофиза

Т а б л и ц а 2

Уровень секреции кортизола после инкубации криоконсервированной адренокортикальной ткани новорожденных поросят и полновозрелых свиней в присутствии ДС ($n = 6$)

Условия эксперимента	Содержание кортизола	
	нмоль/л · мг ткани	% от контроля
Половозрелые свиньи		
Контроль	25,4±1,1	
Замораживание без криопротектора	8,4±1,2	33
с 1% ДС	9,1±1,0	36
с 5% ДС	19,4±1,3*	78
с 10% ДС	16,5±1,5	65
Новорожденные поросята		
Контроль	31,0±1,1	
Замораживание без криопротектора	18,7±1,3	60
с 1% ДС	19,3±1,1	62
с 5% ДС	26,4±1,2*	84
с 10% ДС	23,3±1,4*	74

Примечание. * — статистически значимые результаты по сравнению с контролем.

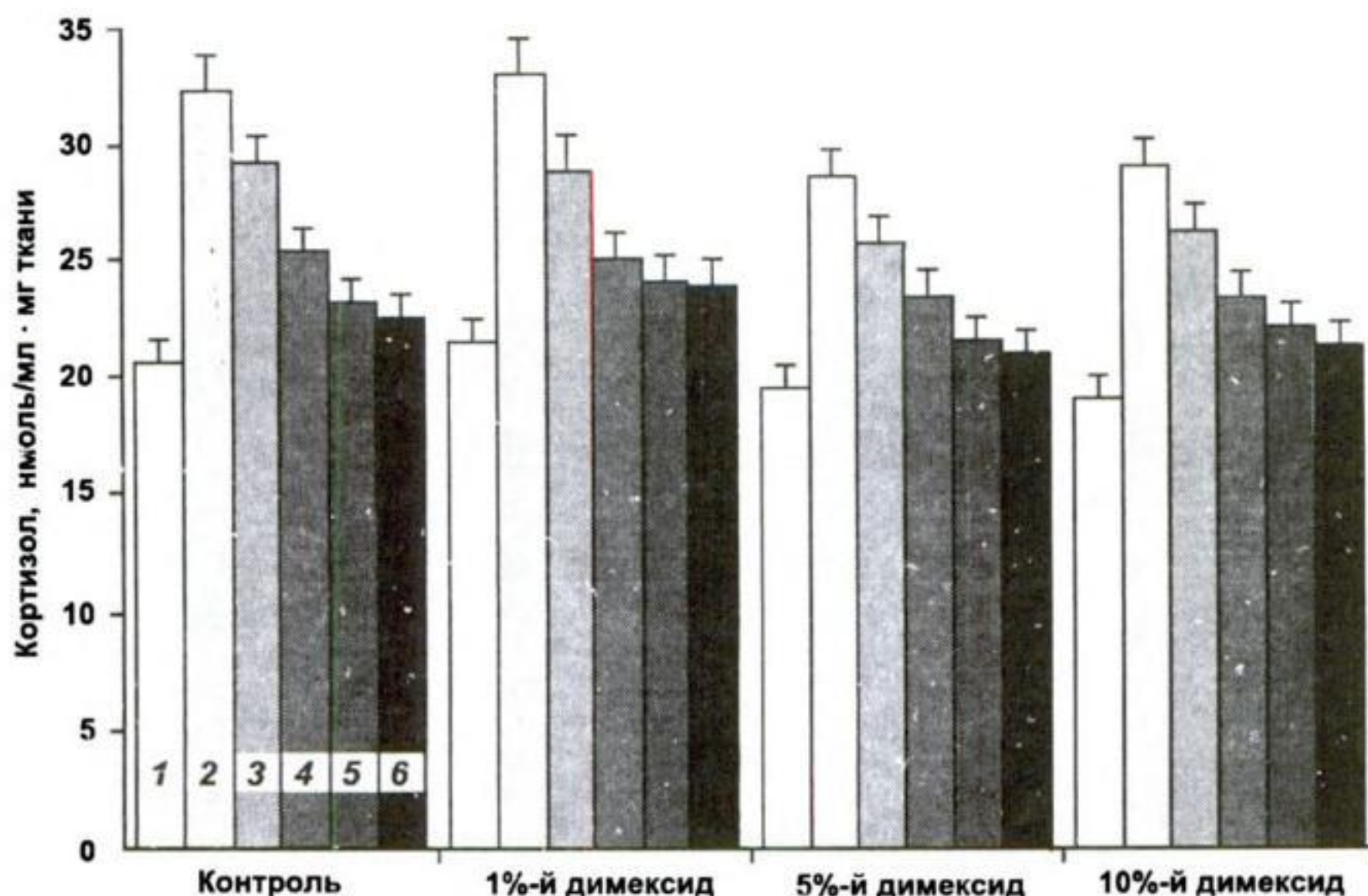


Рис. 2. Содержание кортизола в инкубационной среде срезов адренокортикальной ткани половозрелых свиней после 30 мин инкубации в присутствии димексида и различных концентраций 10%-х экстрактов гипофиза (мл): 1 — контроль, 2 — 0,05, 3 — 0,1, 4 — 0,25, 5 — 0,5, 6 — 1

пониженная зависимость исследуемого параметра от концентрации в среде гомогенатов гипофиза, т.е. с ростом концентрации экстрактов гипофиза отмечается нелинейное увеличение способности адренокортикальной ткани удерживать глюкокортикоиды, а следовательно, снижать скорость секреции. Низкие температуры могут изменить секреторную способность клеток.

Как видно из данных, представленных в табл. 2, низкотемпературное воздействие значительным образом видоизменяет секреторную способность клеток, при этом обращает на себя внимание криорезистентность адренокортикальной ткани новорожденных поросят по сравнению с тканью половозрелых животных. Максимально регистрируемая секреция имела место в присутствии 5%-й концентрации димексида. После обработки криоконсервированной ткани стимуляторами стероидогенеза мы получили результаты, согласно которым криоконсервированная ткань реагирует на введение стимуляторов более интенсивным выбросом гормонов (табл. 3).

При сравнении этих результатов с данными табл. 1 обращает на себя внимание тот факт, что криоконсервированная ткань реагирует на стимулятор стероидогенеза более сильным выбросом гормона: при сравнении с данными, представленными в табл. 2, можно говорить о разобщении процессов собственно

Таблица 3

Прирост стимулируемой секреции кортизола криоконсервированной тканью (в %) по отношению к нестимулируемой секреции (принята за 100%)

Условия эксперимента	Прирост, %	
	Половозрелые свиньи	Новорожденные поросята
Контроль	142	181
Замораживание с 1% ДС	141*	128
Замораживание с 5% ДС	176	183*
Замораживание с 10% ДС	170	178*

Примечание. * — статистически значимые результаты по сравнению с контролем.

секреции гормонов и секреции в присутствии стимуляторов. Кроме того, факторы, действующие при низкотемпературном воздействии, снимают, с одной стороны, ингибирующий эффект криопротекторов на секрецию, а с другой стороны, наоборот, препятствуют способности адренокортикальной ткани под влиянием стимуляторов стероидогенеза удерживать кортизол (рис. 1, 2).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. – Киев: Наук. думка, 1994, – с. 142.
2. Грищенко В.И., Чуйко В.А., Пушкарь Н.С. Криоконсервация тканей и клеток эндокринных органов. – Киев: Наук. думка, 1993. – 242 с.
3. Комиссаренко В.П., Турчин И.С. Новые методы лечения эндокринопатий. В кн.: Современные проблемы экспериментальной и клинической эндокринологии. Киев, 1987, – с. 193.
4. Комиссаренко И.В., Тронько Н.Д., Турчин И.С., и др. Содержание кортикостероидов и кортикотропная активность гипофиза у больных гипокортицизмом до и после трансплантации культур клеток коры надпочечников // Врачебное дело. – 1985. – 12.
5. Никитина В.В. Трансплантация надпочечников в клинике и эксперименте // Пробл. эндокринологии. – 1974. – 3. – с. 114–119.
6. Пушкарь Н.С., Шраго М.И., Белоус А.М., Калугин Ю.В. Криопротекторы. – Киев: Наук. думка, 1978.
7. Резников А.Г. Унифицированный флуориметрический метод определения неконъюгированных 11-ОКС (гидрокортизона и кортикостерона) в плазме крови // Методы определения гормонов. – Киев: Наук. думка, 1980. – с. 255–258.
8. Rydziel S., Canalis E. Cortisol represses insulin-like growth factor II receptor transcription in skeletal cell cultures // Endocrinology. – 1995. – V. 136, 10. – P. 254–260.

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

Поступила 03.02.98

Т. П. БОНДАРЕНКО, Е. І. ЛЕГАЧ

СЕКРЕТУЮЧА ЗДІБНІСТЬ АДРЕНОКОРТИКАЛЬНОЇ ТКАНИНИ НОВОНАРОДЖЕНИХ І СТАТЕВОЗРІЛИХ СВИНЕЙ ПРИ ДІЇ НИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУР

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Досліджено вплив низьких температур і димексиду (ДС) на секретуючу функцію адренокортикальної тканини новонароджених поросят та половозрілих свиней. Обговорюється механізм модифікуючої дії ДС на стимулюючу секретуючу функцію адренокортикальної тканини. Встановлено, що тканина новонароджених тварин, порівняно з тканиною дорослих, має більш високу стійкість до дії низьких температур.

T. P. BONDARENKO, E. I. LEGACH

SECRETORY ABILITY OF THE ADRENOCORTICAL TISSUE OF NEWBORN AND MATURE PIGS UNDER THE ACTION OF LOW TEMPERATURES

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

The action of low temperatures and dimexid on the secretory function of the adrenocortical tissue of the newborn and mature pigs was studied. The authors speculate on the mechanism of the modifying action on the secretory function of the adrenocortical tissue being stimulated. They found that the tissue of the newborn animals possess higher resistance to the action of low temperatures as compared with the tissue of mature animals.

В.И.Грищенко, А.Г.Геродес, Ю.В.Никитченко

**ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБОВ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО
ХРАНЕНИЯ НА АНТИОКСИДАНТНУЮ АКТИВНОСТЬ
ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТИ ЧЕЛОВЕКА**

Проведено исследование антиоксидантной и антирадикальной активности фолликулярной жидкости человека, а также влияния замораживания-оттаивания и длительного хранения на активность ферментов антиоксидантной системы данной биологической среды и ее способности перехватывать ОН-радикалы.

В последнее время важную роль в возникновении и развитии различного рода патологий и, в частности, бесплодия, отводят свободнорадикальному окислению липидов [5, 9, 13]. Так, в сперме в результате активации перекисного окисления липидов (ПОЛ) наблюдается нарушение проницаемости мембраны, снижение подвижности и оплодотворяющей способности сперматозоидов [4, 12]. Имеются данные [5] об уменьшении содержания продуктов перекисного окисления липидов в спермиях после проведенной антиоксидантной терапии. Частота оплодотворения на цикл экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) при этом существенно возросла. Это, безусловно, подтверждает версию о свободнорадикальном повреждении гамет как об одном из механизмов бесплодия.

Известно, что среды, используемые в настоящее время для культивирования активно-подвижной фракции спермиев, культивирования гамет и эмбрионов, а именно — среда Ham F-10, не исключают активации перекисного окисления липидов в культивируемых клетках и эмбрионах [6]. В свою очередь активация ПОЛ может приводить к снижению оплодотворяющей способности спермиев, дегенеративным изменениям в ооцитах и повышенной фрагментации эмбрионов [6].

Фолликулярная жидкость (ФЖ) является естественной средой развития ооцита и сферой окружения гамет в момент оплодотворения. Исследования [8] показали уменьшение содержания одного из токсичных продуктов ПОЛ — малонового диальдегида после инкубации спермы в ФЖ человека, что свидетельствует о защитном эффекте предварительной обработки сперматозоидов человеческой фолликулярной жидкостью. В связи с этим можно предположить наличие в этой среде особых систем, обладающих антиоксидантным действием, способных предохранить мембрану клеток от токсического влияния свободных радикалов. В связи с уникальностью операции по получению фолликулярной жидкости, моральными и этическими факторами, связанными с программой экстракорпорального оплодотворения, а также необходимостью использования ФЖ в дни, когда получить ее не представляется возможным, встал вопрос о возможности хранения данной биологической среды. Представляет интерес исследование влияния различных способов и длительности низкотемпературного хранения на активность ферментативной антиоксидантной системы ФЖ человека и ее способности перехватывать ОН-радикалы.

Цель данной работы — исследовать антиоксидантные и антирадикальные свойства фолликулярной жидкости человека и изучить влияние низких темпе-

ратур на активность ферментов антиоксидантной системы ФЖ для выбора оптимального режима низкотемпературного хранения.

Жидкость из фолликулов получали на 12–14-й день менструального цикла от женщин в возрасте 20–42 лет (средний возраст составил 31 год), участвующих в программе экстракорпорального оплодотворения на базе Центра репродукции и генетики г. Харькова. В качестве индукторов овуляции использовали человеческий менопаузный гонадотропин (Pergonal “Serono”) и фолликулостимулирующий гормон (Metrodin “Serono”). Динамику роста фолликулов исследовали посредством ультразвукового мониторинга. Фолликулярную жидкость аспирировали путем трансвагинальной пункции фолликулов через 34–35 ч после инъекции 5 000–10 000 ед. человеческого хорионального гонадотропина (Profasi “Serono”). Образцы делили на 2 части, хранили в холодильнике при 4 °С и – 12 °С в течение 3, 24 ч и 7 сут после получения жидкости. Оттаивание производили на водяной бане при 37 °С. Глутатионпероксидазную активность определяли по методу Palgia, Valentine (как описано в [2]) по окислению НАДФН в сопряженной глутатионредуктазной системе. Глутатион-s-трансферазную активность определяли спектрофотометрически [2] с 1-хлор-2,4-динитробензолом. Глутатионредуктазную активность определяли спектрофотометрически при 340 нм по убыли НАДФН [2]. Эффективность перехвата ОН-радикалов фолликулярной жидкости человека определяли по методу [11] в среде, содержащей 25 мМ калийфосфатного буфера, *pH* 7,4, 100 мкМ FeCl₃, 104 мкМ ЭДТА, 100 мкМ аскорбата, 1 мМ H₂O₂, 3 мМ дезоксирибозы. Инкубацию проводили 1 ч при температуре 37 °С. Спектр поглощения окрашенного продукта записывали на двухлучевом регистрирующем спектрофотометре “Specord UV VIS” (Германия).

Представленные в табл. 1 данные свидетельствуют о том, что ФЖ человека обладает селензависимой (I) глутатионпероксидазной активностью. Этот антиоксидантный фермент является основным ферментом, утилизирующим перекись водорода и токсичные продукты ПОЛ — гидроперекиси липидов. По данным [10], селензависимая глутатионпероксидазная активность плазмы крови человека составляет 108,6 нмоль/мл в минуту при 37 °С. Эти данные свидетельствуют о том, что глутатионпероксидазная активность ФЖ человека сравнима с активностью фермента в плазме крови.

В отличие от плазмы фолликулярная жидкость имеет и неселеновую (II–I) пероксидазу, активность которой была в 1,4 раза ниже, чем селензависимой глутатионпероксидазы. Важно подчеркнуть, что неселеновая глутатионперок-

Т а б л и ц а 1
Активность ферментов антиоксидантной системы фолликулярной жидкости человека (*n* = 11 – 13)

Вид активности	Фолликулярная жидкость человека нмоль/мл за 1 мин
Глутатионпероксидазная с H ₂ O ₂ (селензависимая, I)	133,7 ± 6,6
Глутатионпероксидазная с гидроперекисью кумола (общая, II)	228,5 ± 14,4
Глутатионпероксидазная (неселеновая, II–I)	95,0 ± 10,0
Глутатион-s-трансферазная	269,4 ± 40,6
Глутатионредуктазная	27,7 ± 2,1

сидаза является, по крайней мере, одним из изоферментов глутатион-s-трансферазы. Известно, что некоторые изоферменты глутатион-s-трансферазы могут утилизировать вторичные продукты ПОЛ — альдегиды [3]. Измерения активности этого фермента, проведенные с субстратом 1-хлор-2,4-динитробензол, позволили установить, что активность глутатион-s-трансферазы составляет 269,4 нмоль/мл в минуту (табл. 1).

Антирадикальная активность ОН-ловушек и фолликулярной жидкости человека

Варианты опыта	Единицы оптической плотности E	Ингибирование, %
Контроль	$1,27 \pm 0,01$	—
Фолликулярная жидкость (0,1 мл/мл реакционной среды)	$0,42 \pm 0,03^*$	$66,9 \pm 2,0$
Этанол (10 мМ)	$0,41 \pm 0,03^*$	$67,6 \pm 2,3$
Трис (оксиметил) Аминометан (10 мМ)	$0,43 \pm 0,03^*$	$66,0 \pm 2,6$

Примечание. * — $P < 0,05$ по отношению к контролю.

Обнаружена также существенная активность глутатионредуктазы — основного фермента, генерирующего восстановленный глутатион для глутатион-зависимой антиоксидантной системы. Таким образом, рассмотренные данные свидетельствуют о том, что фолликулярная жидкость человека имеет достаточно эффективную ферментативную антиоксидантную систему.

Неферментативная антиоксидантная система в клетке обычно характеризуется количеством и активностью истинных антиоксидантов — веществ, способных перехватывать, “тушить” свободные радикалы. Нами была исследована способность фолликулярной жидкости перехватывать один из высокотоксичных радикалов кислорода, ответственных за активацию ПОЛ, — ОН-радикал. Как видно из представленных в табл. 2 данных, 10% ФЖ ингибирует генерацию ОН-радикалов более чем на 66%. Это является соизмеримым с антирадикальной эффективностью известных перехватчиков ОН-радикалов (этанола и триса в концентрации 10 мМ). Не исключено, что именно эти качества в основном определяют положительное действие ФЖ на подвижность и оплодотворяющую способность спермиев в методиках выделения активно-подвижной фракции из эякулята, и обуславливают основной механизм сохранности ооцитов и эмбрионов при культивировании в программе экстракорпорального оплодотворения.

Проведенные ранее исследования [1, 7] влияния ФЖ, хранившейся 3–5 дней при -12°C , на подвижность спермиев показали достаточно высокие результаты, соизмеримые с нативной фолликулярной жидкостью. Однако такое хранение предполагает процесс замораживания-оттаивания, что может влиять на функциональные способности ФЖ. В работе сделано предположение о возможности краткосрочного хранения при более высоких температурах (4°C). В этом случае среда постоянно находится в жидкой фазе и исключается воздействие замораживания-оттаивания. Представлялось интересным выяснить степень проявления антиоксидантной и антирадикальной активности ФЖ, возможную длительность сохранности этих свойств при разных режимах хранения.

Как видно из представленных в табл. 3 данных, замораживание до -12°C и последующее оттаивание не приводило к существенному изменению селен-зависимой и неселеновой глутатионпероксидазной активности. Не обнаружено также значительных изменений глутатион-S-трансферазной и глутатионредуктазной активности (табл. 4) и способности ФЖ перехватывать ОН-радикалы (табл. 5). При хранении ФЖ при 4°C и -12°C в течение суток ни один исследуемый параметр достоверно не изменялся по сравнению с нативными образцами. При более длительном хранении в течение 7 сут при температуре 4°C селензависимая глутатионпероксидазная активность снижа-

лась в 1,5, а неселеновая — более чем в 2 раза (табл. 3). В то же время редуктазная активность снижалась в 1,2 раза, а глутатион-s-трансферазная — в 1,4 раза (табл. 4). Хранение при в течение 7 сут не приводило к достоверному снижению ни одного из исследуемых параметров (табл. 3, 4).

Т а б л и ц а 3

Влияние замораживания-оттаивания и длительности хранения на глутатионпероксидазную активность фолликулярной жидкости человека (нмоль НАДФН на 1 мл за 1 мин; $n = 5$)

Температура и время хранения	Глутатионпероксидазная активность с субстратами		
	H ₂ O ₂ (селензависимая, I)	гидроперекись кумола (общая, II)	неселеновая (II-I)
4 °C, 3 ч	123,8 ± 8,8	199,2 ± 14,1	75,4 ± 11,4
- 12 °C, 3 ч	123,7 ± 3,9	194,3 ± 11,9	70,7 ± 9,4
4 °C, 24 ч	122,5 ± 8,8	195,9 ± 13,2	73,4 ± 9,6
- 12 °C, 24 ч	124,2 ± 6,2	195,2 ± 13,3	71,0 ± 7,8
4 °C, 7 сут	86,5 ± 2,7*	133,5 ± 3,6*	47,2 ± 4,4*
- 12 °C, 7 сут	123,4 ± 4,5	195,0 ± 12,5	71,6 ± 9,7

Примечание. * — $P < 0,05$ по отношению к другим вариантам опыта.

Т а б л и ц а 4

Влияние замораживания-оттаивания и длительности хранения на глутатион-s-трансферазную и глутатионредуктазную активность фолликулярной жидкости человека (нмоль/мл за 1 мин; $n = 5$)

Температура и время хранения	Вид активности	
	глутатион-s-трансферазная	глутатионредуктазная
4 °C, 3 ч	232,7 ± 51,5	25,6 ± 3,0
- 12 °C, 3 ч	229,8 ± 60,2	25,8 ± 2,0
4 °C, 24 ч	228,1 ± 55,0	25,8 ± 1,8
- 12 °C, 24 ч	230,3 ± 58,4	25,7 ± 2,3
4 °C, 7 сут	198,4 ± 43,3*	22,4 ± 2,2*
- 12 °C, 7 сут	232,9 ± 50,0	26,2 ± 2,6

Примечание. * — $P < 0,05$ по сравнению с соответствующей активностью фолликулярной жидкости, хранившейся при - 12 °C в течение 7 сут (методом пар)

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что при 4 °C сохраняется активность ферментативной антиоксидантной системы, по крайней мере, в течение суток, после чего наблюдается постепенное снижение действенности всех ферментов антиоксидантной системы. Содержание при - 12 °C обеспечивает более длительную сохранность этих свойств (в нашем случае — 7 сут), а замораживание-оттаивание не оказывает заметного влияния на антиоксидантную и антирадикальную активность фолликулярной жидкости человека.

Т а б л и ц а 5

Влияние замораживания-оттаивания и длительности хранения на антирадикальную активность фолликулярной жидкости человека ($n = 5$)

Температура и время хранения	Ингибирование, %
4 °C, 3 ч	69,6 ± 2,3
- 12 °C, 3 ч	69,2 ± 2,3
4 °C, 24 ч	69,5 ± 2,0
- 12 °C, 24 ч	69,4 ± 2,7

В целом, полученные в настоящей работе данные позволяют заключить, что фолликулярная жидкость человека имеет достаточно мощную ферментативную антиоксидантную систему и обладает выраженной способностью к перехвату ОН-радикалов. При этом возможна реализация краткосрочного (в течение суток) сохранения ФЖ при 4 °C без изменения исследуемых свойств. Однако метод хранения в холодильнике при - 12 °C

підтримує довговременну і надійну збереженість активності ферментів антиоксидантної системи ФЖ і може бути рекомендован для використання в методиках нетрадиційного лічення безпліддя.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Геродес А.Г., Юрченко Г.Г., Крамар М.И. Применение фолликулярной жидкости в методиках повышения фертильности спермы. // Бесплодие. Вспомогательные репродуктивные технологии. Сб. научн. трудов симпозиума с междунар. участием 1997 г. под ред. Акад. УАННП Ф.В. Дахно, Киев: Ин-т репродуктивной медицины УАННП, 1997. – С. 154–157.
2. Лемешко В.В., Никитченко Ю.В., Свич И.В., Овсянников С.Е. Перекисное окисление липидов биологических мембран и его ферментативная регуляция при старении крыс // Укр. биохим. журн. – 1987. – 59, 2. – С. 50–57.
3. Beckett G.S., Hayes J.D. Plasma glutathione-s-transferase in man // J. Clin. Biochem. Nutr. – 1987. – 2. – P. 1–24.
4. Cummins J.M., Jequier A.M., Kan R. Molecular biology of human male infertility: links with aging, mitochondrial genetics and oxidative stress // Mol. Reprod. Dev. – 1994. – № 37. – P. 345–462.
5. Geva E., Bartoov B., Zabludovsky N. et al. The effect of antioxidant treatment on human spermatozoa and fertilization rate in an in vitro fertilization program // Fertil. Steril. – 1996. – 66, № 3. – P. 430–434.
6. Gomes E., Aitken J. Impact of in vitro fertilization culture media on peroxidative damage to human spermatozoa // Fertil. Steril. – 1996. – 65, № 4. – P. 880–882.
7. Grischenko V. I., Yurchenko G.G., Gerodes A.G., Kramar M.I. Follicular liquid effect on fertility of native and cryopreserved spermatozoa applied for immunological infertility treatment // Magdeburg, Germany. 3rd International forum of reproductive immunology – Joint Meeting – 12–15 June 1996. – P. 19.
8. Hamamah S., Lanson M., Barthemy C. et al. Decrease of malondialdehyde generation in human spermatozoa after human follicular fluid treatment / Abstracts of the 11th Annual Meeting of the EHSRE, Hamburg 1995 // Hum. Reprod. – 10. – P. 11–12.
9. Lewis S.E.M., Sterling E.S.L., Young I.S., Thompson W. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men // Fertil. Steril. – 1997. – 67, № 1. – P. 142–147.
10. Maddipati K.R., Marnett L.Z. Characterization of the major hydroxoperoxide reducing activity of human plasma // The J. Of Biological chemistry. – 1987. – 262, № 36. – P. 17398–17403.
11. Moorhouse P.C., Grootveld M., Halliwell B. et al. Allopurinol and oxypurinol are hydroxyl radical scavengers // Febs Lett. – 1987. – 213, № 1. – P. 23–28.
12. Selly M.U., Lacey M.J., Barnett M.R. et al. Content of significant amounts of a cytotoxic end-product of lipid peroxidation in human semen // J. Reprod. Fertil. – 1991. – № 92. – P. 291–298.
13. Zini A., de Lamirande E., Gagnon C. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa // Int. J. Androl. – 1993. – № 16. – P. 188–189.

Ин-т проблем криобиологии
и криомедицины НАН Украины, г. Харьков
НИИ биологии Харьковского гос. ун-та

Поступила 13.01.98

В. І. ГРИЩЕНКО, А. Г. ГЕРОДЕС, Ю. В. НІКІТЧЕНКО

ВПЛИВ РІЗНИХ СПОСОБІВ НИЗЬКОТЕМПЕРАТУРНОГО ЗБЕРІГАННЯ НА АНТИОКСИДАНТНУ АКТИВНІСТЬ ФОЛІКУЛЯРНОЇ РІДИНИ ЛЮДИНИ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків
ІДІ біології Харківського державного університету

Проведено дослідження антиоксидантної та антирадикальної активності фолікулярної рідини людини, а також впливу заморожування-відігріву та тривалого зберігання на активність антиоксидантної системи даного біологічного середовища та його здібності перехоплювати ОН-радикали.

V. I. GRISCHENKO, A. G. GERODES, YU. V. NIKITCHENKO

ACTION OF VARIOUS METHODS OF LOW TEMPERATURE STORAGE ON THE ANTIOXIDATIVE ACTIVITY OF HUMAN FOLLICULAR FLUID

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

Scientific-Research Institute for Biology of Kharkov State University

The authors conducted a study of the antioxidative and antiradical activity of the human follicular fluid, as well as of the action of freeze-thawing and long-term storage on the activity of enzymes of the antioxidative system of the given biological medium and its ability for intercept OH-radicals.

КРИОМЕДИЦИНА

УДК 618.146+615.832.9

Н.Н.Волошина

ОПТИМИЗАЦИЯ КРИОХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ С ФОНОВЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ШЕЙКИ МАТКИ

Проведено клинико-цитологическое изучение течения репаративных процессов на шейке матки после криохирургического лечения фоновых заболеваний. Показано, что криодеструкцию заболеваний шейки матки целесообразно проводить в первой фазе менструального цикла, так как восстановление эпителиального покрова происходит на 1–1,5 недели быстрее, чем при лечении во второй фазе менструального цикла.

Лечение больных с неопухолевыми заболеваниями шейки матки занимает центральное место в системе профилактических мероприятий по борьбе с раком шейки матки [2, 10]. Криолечение заболеваний шейки матки является эффективным методом лечения [4, 5, 7, 8], однако дискутируется вопрос о зависимости криолечения от фазы менструального цикла. Ряд авторов [3, 9, 11, 12] считают, что фаза менструального цикла на играет значительной роли для криолечения, поскольку такие осложнения как эндометриоз шейки матки и посткоагуляционный синдром, которые часто встречаются после диатермолечения, после криодеструкции бывают редко. Некоторые исследователи наблюдали развитие синдрома коагулированной шейки матки после криовоздействия [6]. Данные о сроках эпителизации после криовоздействия в зависимости от фазы менструального цикла в доступной литературе не найдены. Поэтому целью работы было изучение сроков эпителизации после криолечения фоновых заболеваний шейки матки в зависимости от фазы менструального цикла.

Объектом исследования была шейка матки женщин двух групп (165 человек), которым проводилось криолечение по поводу фоновых заболеваний шейки матки. В 1-й группе (73 женщины) криолечение было проведено в первой фазе менструального цикла, во 2-й (92 женщины) — во второй фазе менструального цикла.

По клинической характеристике группы были однородными. Средний возраст обследуемых женщин $29,2 \pm 1,02$ года. Из анамнеза выяснено, что 136 (82,4%) женщин имели роды или аборты, а 29 (17,5%) не беременели, из них у 12 (7,2%) было бесплодие. Гинекологические заболевания перенесли 87 (52,7%) женщин. Всем пациенткам проводилось комплексное клинико-лабораторное и инструментальное обследование, цитологическое и гистологическое исследование.

По характеру поражения шейки матки эктопия цилиндрического эпителия выявлена у 70 (43,4%), эктопия с участками трансформации и открытыми про-

токами у 32 (19,7%), ретенционные кисты у 27 (16,3%), участки эндометриоза у 51 (30,9%), простая лейкеплакия у 7 (4,2%). Длительность заболевания до года была у 37 (22,4%), от 1 года до 5 лет у 115 (69,7%), свыше 5 лет у 13 (7,9%) женщин.

Накануне криолечения всем пациенткам по показаниям проводились санация влагалища и этиотропное лечение. Криодеструкция проводилась с помощью автономного криогенного аппарата (КАГ-01). Наконечники подбирались в зависимости от формы и распространенности патологического процесса. Контроль заживления осуществляли при помощи кольпоскопии и цитологических мазков через 7–14 и 28 суток, 6 и 8 недель после криодеструкции. Мазки окрашивались по Романовскому–Гимзе. В мазках подсчитывали количество лимфоцитов, лейкоцитов и эпителиальных клеток, вычисляли индекс созревания и кариопикнотический индекс (КПИ). Полученные результаты обрабатывали методом вариационной статистики.

До лечения в мазках у всех женщин были выявлены клетки цилиндрического эпителия, увеличенное количество базальных клеток, наблюдалось нарушение дифференцировки многослойного плоского эпителия за счет уменьшения промежуточных эпителиальных клеток. Постоянно встречались клетки цилиндрического эпителия. Среди лимфо-лейкоцитарной клеточной популяции 95% представлены лейкоцитами, активно фагоцитирующими микрофлору. Количество лимфоцитов колебалось от 5 до 8%. В мазках были выявлены IV- и V-я степени чистоты влагалища. Палочка Додерлейна отсутствовала практически во всех мазках, превалировала неспецифическая кокковая флора.

Через 7 дней после криодеструкции при кольпоскопии на шейке матки определялся струп белого или светло-желтого цвета. В 1-й группе у ряда больных отмечалось краевое отторжение струпа с одновременным врастанием под него эпителиальной ткани. У 55% больных 2-й группы в этот период шли месячные. В мазках выявлялись детрит, кровь, что затрудняло подсчет клеток. Тип мазка — литический. Большинство эпителиальных клеток было разрушено, подсчет цитограммы затруднен. Степень чистоты влагалища — IV.

Через две недели после криолечения кольпоскопически наблюдалось полное отторжение струпа у 58 (78,5%) больных 1-й группы и у 24 (26,3%) 2-й группы. Отмечалась выраженная васкуляризация поверхности шейки матки. Цитологическая картина мазков шейки матки мало отличалась от мазков предыдущего срока. Мазки цитолитического типа в обеих группах, с большим количеством неспецифической микрофлоры, активно фагоцитируемой лейкоцитами. В 1-й группе на 2–5% увеличилось количество лимфоцитов. У женщин 2-й группы чаще встречался детрит, сохранялось повышенное количество базальных и парабазальных клеток на уровне 30–35% от всей эпителиальной популяции, что в 2–3 раза выше, чем в 1-й группе. Наблюдался умеренный рост количества промежуточных клеток, но количество поверхностных клеток оставалось на низком уровне у женщин 2-й группы. Клетки цилиндрического эпителия были выявлены у 8 (10%) женщин 1-й группы и у 26 (29%) — 2-й группы.

Через месяц (28–30) дней после криодеструкции при кольпоскопии определялась полная эпителизация шейки матки у 37 (50,7%) больных 1-й группы и у 11 (12%) 2-й группы. В мазках у женщин 1-й группы наблюдалось значительное уменьшение неспецифической микрофлоры. У 22 (30%) женщин в мазках определялись палочки Додерлейна, что в 2 раза чаще, чем у женщин 2-й груп-

пы. У женщин 1-й группы преобладали мазки III-й степени чистоты, во второй группе — IV-й степени чистоты влагалища. Как в 1-й, так и во 2-й группах умеренно снижалось количество гранулоцитов, но их фагоцитарная активность оставалась высокой. Увеличилось количество лимфоцитов. Динамика эпителиальных клеток имела разнонаправленный характер. У женщин 2-й группы сохранялось повышенное количество базальных клеток, увеличивалось число промежуточных клеток до 50%, но число поверхностных клеток оставалось в пределах 25–40%. У 10% женщин 2-й группы сохранялись в мазках клетки цилиндрического эпителия.

Динамика клеточной популяции эпителиальных клеток в 1-й группе была более однородна. На фоне низкого (до 30%) содержания базальных и промежуточных клеток (до 30%) увеличилось количество поверхностных клеток до 70–75%.

Через 6–8 недель (42–55 дней) полное выздоровление с нормальной кольпоскопической картиной отмечено у 68 (93,15%) женщин 1-й группы и у 72 (79,3%) 2-й группы. У женщин 1-й группы чаще определялись I- и II-я степени чистоты влагалища, у 15 (21%) женщин сохранялась III-я степень, у 6 (8,2%) — IV-я степень чистоты. Количество гранулоцитов снизилось в 2 раза до 2–5%, за исключением мазков с IV-й степенью чистоты. Среди эпителиальных клеток в 1-й группе резко уменьшено число базальных и промежуточных клеток, увеличено количество поверхностных клеток. Во 2-й группе количество базальных клеток снизилось до 10–15%, что выше, чем у женщин 1-й группы, и увеличилось число промежуточных и поверхностных клеток до 30 и 55% соответственно. Однако у 20 (21,7%) женщин 2-й группы сохранялись высокие показатели базальных клеток — более 20%.

При кольпоскопическом контроле отторжение струпа крионекроза в 1-й группе отмечено через $(12,9 \pm 1,38)$ дня, а во 2-й — через $(16,2 \pm 1,42)$ дня. Средние сроки эпителизации в 1-й группе составили $(6,3 \pm 0,34)$ недели, а во 2-й — $(7,6 \pm 0,21)$ недели. Сроки отторжения струпа и завершения эпителизации очага криодеструкции в пределах средних данных представлены в работах ряда авторов [2–4, 11].

Полученные результаты о более ранних сроках отторжения струпа, уменьшении воспалительных изменений в области очага криодеструкции и более быстрой эпителизации в 1-й группе по сравнению со 2-й группой женщин подтверждаются цитологическими исследованиями влагалищных мазков. К 28–42-му дню после криодеструкции динамика эпителиальных клеток у женщин 1-й группы приняла однородный характер, наблюдалось увеличение КПИ, что свидетельствует о нормализации эстрогенного фона и восстановлении процессов дифференцировки многослойного неороговевающего эпителия шейки матки.

Более длительное сохранение мазков цитологического типа, в которых преобладают базальные и парабазальные клетки, у женщин 2-й группы можно объяснить сниженным уровнем эстрогенов, так как им криодеструкция проводилась во II-й фазе менструального цикла. Поскольку эстрогены являются гормонами, стимулирующими пролиферацию многослойного плоского эпителия [1], то процессы естественной репарации эпителия шейки матки у женщин 2-й группы происходили на 1–1,5 недель позже, чем у женщин 1-й группы, которым криодеструкция была проведена в эстрогенной фазе.

Таким образом, криодеструкцию фоновых заболеваний шейки матки целесообразно проводить в I-й фазе менструального цикла, так как восстановле-

ние структуры эпителиального покрова шейки матки происходит на 1–1,5 недель быстрее, чем при лечении во II-й фазе цикла.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арсентьева М. Г. Кольпоцитологические исследования в диагностике и терапии эндокринных гинекологических заболеваний. – М.: Медицина, 1977. – 367 с.
2. Василевская Л. Н. Кольпоскопия. – М.: Медицина, 1986. – 158 с.
3. Гришина О. А. Применение криокоагуляции для лечения некоторых патологических изменений шейки матки и остроконечных кондилом: Автореф. дис... канд. мед. наук. – Харьков, 1979. – 16 с.
4. Грищенко В. И., Гришина О. А. Сравнительная оценка криохирургического и диатермохирургического методов лечения предопухолевых заболеваний шейки матки // Специальные методы исследования, диагностики и лечения злокачественных опухолей. – Днепропетровск. – 1979. – с. 71.
5. Запорожская В. Н. Возможность усиления биологического действия низких температур при лечении патологии шейки матки // Советская медицина. – 1981. – 12. – с. 112–114.
6. Каунов Л. А., Сотникова Л. Г. Синдром коагулированной шейки матки после криодеструкции закисью азота // Акушерство и гинекология. – 1986. – 5. – С. 48–49.
7. Коханевич Е. В., Ильяшенко Н. А. Комплексная диагностика и комбинированное лечение предрака и рака шейки матки. – Киев: Здоров'я, 1976. – 165 с.
8. Коханевич Е. В., Ганина К. П., Жестокова А. Е. и др. Комплексная диагностика и дифференцированное лечение предрака и рака шейки матки // Всесоюз. симпозиум. "Ранняя диагностика, лечение предопухолевых и опухолевых заболеваний шейки матки и диспансеризация женского населения": Тез. докл. Псков–Ленинград. – 23–24 мая 1985. – С. 105–106.
9. Ожиганова З. О. О методике криогенного воздействия при предопухолевых заболеваниях шейки матки // Акушерство и гинекология. – 1980. – 9. – С. 46–48.
10. Прилепская В. Н., Новикова М. Ю., Ежова Л. С. Диагностика и лечение лейкоплакии шейки матки // Акушерство и гинекология. – 1995. – 1. – С. 54–57.
11. Шведова Л. А., Обручков А. С., Сергеев Е. И. Криогенное лечение фоновых заболеваний шейки матки как один из методов профилактики рака // Лечение и реабилитация онкологических больных. – Кишинев. – 1988. – С. 135–136.
12. Matanui S. Factors affecting the cold trans during cryotherapy // Acta Chir. Hung. – 1990. – 31(1). – P. 33–37.

Женская консультация МСЧ "Коммунар", г. Запорожье

Поступила 12.02.98

Н. М. ВОЛОШИНА

ОПТИМІЗАЦІЯ КРІОХІРУРГІЧНОГО ЛІКУВАННЯ ХВОРИХ З ФОНОВИМИ ЗАХВОРЮВАННЯМИ ШИЙКИ МАТКИ

Жіноча консультація МСЧ "Комунар", м. Запоріжжя

Проведено клініко-цитологічне вивчення процесів репарації шийки матки після кріохірургічного лікування фонових захворювань. Показано, що кріодеструкцію захворювань шийки матки доцільно робити в першій фазі менструального циклу, тому що відновлення епітеліального шару відбувається на 1–1,5 тижнів швидше, ніж при лікуванні у другій фазі циклу.

N. N. VOLOSHINA

OPTIMIZATION OF CRYOSURGICAL TREATMENT OF PATIENTS WITH ACCOMPANYING DISEASES OF THE NECK OF THE UTERUS

Women Consultation at Medical Sanitary Station "Kommunar", Zaporozhie

The author conducted a clinical-cytologic study of the occurrence of the reparative processes of the neck of the uterus following cryosurgical treatment of the accompanying diseases. Cryodestruction of the diseases of the neck of the uterus was shown to be better conducted in the first phase of a menstrual cycle, since recovery of the epithelial coat occurs by 1–1.5 weeks faster as compared with the treatment in the second phase of a menstrual cycle.

Н.Н.Волошина, Н.С.Луценко**КОМПЛЕКСНОЕ КРИОХИРУРГИЧЕСКОЕ ЛЕЧЕНИЕ ФОНОВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ШЕЙКИ МАТКИ ПРИ ПАПИЛЛОМАВИРУСНОМ ИНФИЦИРОВАНИИ**

Выявлено, что использование только деструктивных методов лечения фоновых заболеваний шейки матки при папилломавирусном инфицировании недостаточно эффективно. Показано, что применение тиотриазолина после криодеструкции уменьшает сроки эпителизации на 1,5–2 недели и снижает рецидив в два раза.

Профилактика рака шейки матки основывается на выявлении фоновых заболеваний и их своевременном и адекватном лечении, так как злокачественные процессы обычно возникают на предшествующем неблагоприятном фоне [2, 5, 10, 11]. Значительная роль в этиопатогенезе заболеваний шейки матки придается экзогенным факторам, в частности различным инфекционным агентам. Так, онкогенный вирус папилломы человека (ВПЧ), поражая эктоцервикс, вызывает клинический или субклинический кондиломатоз [1, 4, 8, 9]. В последние годы отмечается значительный рост вирусных инфекций, их прямая связь с ростом сексуальной активности и снижением общего и местного иммунитета больных [4, 7, 9]. Деструктивные методы лечения фоновых и предопухолевых заболеваний шейки матки при наличии папилломавирусной инфекции гениталий являются недостаточно эффективными. Заживление и восстановление структуры эпителиального покрова шейки матки происходит медленно, отмечаются частые рецидивы заболеваний — от 15 до 50% [1, 2, 5, 8, 10]. Для лечения кондиломатоза применяются интерфероны. Но данные об эффективности такого лечения разноречивы [1, 5, 10]. Целью исследования явилось повышение эффективности криохирургического лечения фоновых заболеваний шейки матки в сочетании с папилломавирусной инфекцией. Для этой цели использован новый отечественный препарат, обладающий иммуномодулирующим, противовирусным и противовоспалительным действием — тиотриазолин [6].

Нами проведено обследование и лечение 40 женщин в возрасте от 18 до 35 лет, у которых заболевания выявлены при профилактических осмотрах. Средний возраст пациенток $22,3 \pm 1,7$ года, 30 (75%) из них были в возрасте до 25 лет. Средний возраст пациенток при начале половой жизни $17,5 \pm 0,5$ года, причем 20 (50%) обследуемых женщин начали половую жизнь в возрасте 15–16 лет. У 23 (57,5%) больных к началу заболевания были 2 и более половых партнеров, а у 6 (15%) — частая их смена. Из 40 женщин у 25 (62,5%) были срочные роды, у 8 (20%) — преждевременные, у 4 (10%) — бесплодие более трех лет. В анамнезе у 28 (70%) пациенток были искусственные аборты, у 10 (25%) — самопроизвольные. 32 (80%) больных в прошлом перенесли воспалительные заболевания, чаще сальпингоофориты, метроэндометриты после абортов. В группе обследуемых женщин выявлена высокая частота бактериальных и вирусных инфекций (хламидиоз, трихомониаз, гонорея, бактериальный вагиноз) — у 34 больных (85%). При опросе больных выяснено, что только 10% женщин использовали презервативы и другие барьерные методы контрацепции. 30% женщин использовали гормональные одно-, двух- и трехфазные контрацептивы. Многие женщины предохранялись по биологическому календарю или путем прерванного полового акта. Также выяснено, что 22 (55%) женщины курили. При первичном осмотре большинство пациенток

(30, 75%) не предъявляли жалоб, что характерно для бессимптомного течения фоновых заболеваний и ВПЧ-инфекции [2, 9, 11]. В анамнезе у 40% женщин отмечено диатермо- и криолечение, лечение коагулирующими средствами эктопии цилиндрического эпителия. Рецидивы заболеваний шейки матки у данной группы женщин наступили через 6–12 месяцев после лечения. Обследование пациенток включало осмотр в зеркалах, взятие мазков для бактериоскопии и цитологического исследования, расширенную кольпоскопию, цервикоскопию, а также прицельную биопсию под контролем кольпоскопии.

С целью выявления сопутствующей инфекции нижнего отдела полового тракта всем больным проведены исследования для определения трихомониаза, кандидозного вульвовагинита, хламидиоза и бактериального вагиноза. При выявлении инфекции всем пациенткам проводилась предварительная санация влагалища (этиотропное лечение).

Кольпоскопические картины у больных с кондиломатозом шейки матки были представлены различными сочетаниями эктопии цилиндрического эпителия, зоны трансформации с участками уксусно-белого эпителия, пунктации, полей метаплазии. При расширенной кольпоскопии определялись участки, подозрительные на папилломавирусную инфекцию. Из этих мест брали мазок для цитологического исследования и производили ножевую биопсию. Всем пациенткам при помощи цитобрашей производился соскоб цервикального канала. При цитологическом исследовании выявлены следующие признаки ВПЧ-инфекции: койлоцитоз клеток плоского эпителия, дискератоз, паракератоз, гиперкератоз. Однако более важным с точки зрения диагностики является наличие койлоцитоза, который уже много лет рассматривается как признак вирусного поражения клетки [3, 5, 10, 11].

Заключительным этапом обследования с целью выявления характера патологического процесса на шейке матки была прицельная биопсия. Диагноз койлоцитоза установлен у 70% женщин.

Частота и характер гистологических признаков при неосложненном кондиломатозе представлены в таблице. У 53% больных указанные признаки встречались в сочетании.

Для лечения фоновых заболеваний шейки матки, включая кондиломатоз, применяли криодеструкцию. Криолечение проводили криохирургическим аппаратом КАГ-01, изготовленным Одесским институтом холодильной промышленности. Всем пациенткам с признаками кондиломатоза проведена 2-цикловая криокоагуляция. Средняя длительность замораживания 3–4 мин, оттаивания 3–4 мин. После криолечения все пациентки были разделены на две группы. Первая группа больных (20 женщин) получала титотриазолин в свечах по 0,25 ректально и по 0,25 интравагинально в течение 10 дней после криолечения. Вторая группа (20 женщин) после криодеструкции в течение 10 дней получала свечи с маслом облепихи интравагинально (общепризнанный метод ведения после криодеструкции). Комплексное клинико-лабораторное обследование проводилось после криолечения через 10–14, 28 дней, 8 недель, 3, 6 и 12 месяцев и 2 года.

В первой группе полное выздоровление отмечено у 70% больных через 4–8 недель. Средний срок эпителизации $5,6 \pm 1,1$ недель. Кольпоскопические

Частота морфологических признаков при папилломавирусном инфицировании шейки матки

Признаки	К-во наблюдений	%
Койлоцитоз	28	70
Кондилома	6	15
Гиперкератоз	10	25
Паракератоз	8	20
Лейколимфоцитарная инфильтрация	12	30
Акантоз	6	15
Ангиоматоз	4	10

исследования — отсутствие атипичного эпителия, морфологические — отсутствие койлоцитов. У 25% больных наблюдалось уменьшение очага поражения, отсутствие дисплазии и койлоцитов при цитологическом обследовании. У 5 пациенток отмечались кольпоскопически поля метаплазии через 8 недель после криолечения; при цитологическом контроле в мазках — единичные койлоциты.

Во второй группе больных эпителизация поверхности шейки матки после криодеструкции была более медленной — до 7–9 недель. Средние сроки эпителизации $7,2 \pm 1,3$ недели. У 10% пациенток отмечалось инфицирование крионекроза, и неполная эпителизация произошла у 30% женщин. Нормальная кольпоскопическая картина через 8 недель была у 50% пациенток второй группы, через 3 месяца еще у 15% больных состояние улучшилось (положительная динамика).

При изучении отдаленных результатов через 12 месяцев, 1,5 и 2 года рецидивы фоновых заболеваний выявлены в 2 раза реже (15%) у пациенток первой группы, чем у женщин из второй группы (30%), что свидетельствует о более высокой эффективности комплексного криохирургического лечения с включением тиотриазолина при фоновых заболеваниях шейки матки в сочетании с папилломавирусным инфицированием.

В заключение можно сделать следующие выводы:

- с учетом высокой контаминации влагалища патогенной флорой у пациенток с фоновыми заболеваниями шейки матки, больные подлежат специальному обследованию с последующим этиотропным лечением;
- применение только деструктивных методов для лечения фоновых заболеваний шейки матки в сочетании с кондиломатозом не дает полного излечения и ведет к частым рецидивам заболевания (до 30%);
- комплексная терапия, включающая криодеструкцию патологического очага на шейке матки с последующим применением тиотриазолина по предлагаемой схеме, дает высокую эффективность (до 95%) лечения фоновых процессов на шейке матки при папилломавирусном инфицировании и уменьшает частоту рецидивов в два раза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баринский И., Полевая Т., Шуваева Н. Лечение эпителиальной дисплазии шейки матки противовирусными препаратами (первый опыт) // *Врач.* — 1994. — № 6. — С. 27–29.
2. Ежова Л. С. Папилломавирусная инфекция гениталий. Морфологические особенности и диагностика // *Заболевания шейки матки.* — М., 1997. — С. 43–46.
3. Исакова Л. М., Ганина К. П., Иванова И. М. Патогномичные признаки папилломавирусной инфекции человека в диагностическом материале шейки матки // *Архивы патологии.* — 1990. — 52, № 12. — С. 39–42.
4. Исакова Л. М., Сенчук А. Я., Иванова И. М. Состояние местного иммунитета при рецидивирующих дисплазиях шейки матки // *Клиническая онкология.* — К.: Здоров'я, 1990. — Вып. 10. — С. 55–58.
5. Коханевич Е. В., Ганина К. П., Суменко В. В. Кольпоцервикоскопия. — К.: Вища школа, 1997. — 56 с.
6. Мазур І. А., Книш Є. Г., Стець В. Р. та інші. Морфоліній 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат, фкий проявляє гепато-протекторну, ранозаживляючу і протівірусну активність. Пат. України № 1988 за 1993 р.
7. Gonzales-Sanchez J. L., Rodrigues de Santiago J. D., Pena-Sandoval M. Tratamiento del virus del papilloma humano (VPH) del cervix con criocirugia // *Ginecol. Obstet. Mex.* — 1991. — May. — 59. — P. 164–168.
8. Mohanty K. C., Lowe J. W. Cold coagulation therapy in the treatment of histologically diagnosed subclinical human papilloma virus (HPV) infection of the cervix // *Br. J. Clin. Pract.* — 1991. — Summer. — 45(2). — P. 102–104.
9. Mark W. Human papillomavirus infection // *J. of the American Acad. of Dermatology.* — 1990. — Apr. — 22, № 4. — P. 547–566.

10. Mateos-Burgillo J. F., Rodriguez-Zarauz R. Diagnosis, treatment and follow-up of H.P.V.-CIN // Eur. J. Gynecol. Oncol.– 1995.–16(1).– P. 48–53.
11. Tate J. E., Reznick M., Sheets E. E., Crump C. P. Absence of Papillomavirus DNA in normal tissue adjacent to most cervical intraepithelial neoplasms // Obstet. Gynecol.– 1996.–87, № 6.– P. 257–260.

Женская консультация МСЧ “Коммунар”, г. Запорожье
Запорожский ин-т усовершенствования врачей

Поступила 27.04.98

Н. М. ВОЛОШИНА, Н. С. ЛУЦЕНКО

КОМПЛЕКСНЕ КРІОХІРУРГІЧНЕ ЛІКУВАННЯ ФОНОВИХ ЗАХВОРЮВАНЬ ШІЙКИ МАТКИ ПРИ ПАПІЛОМАВІРУСНОМУ ІНФІКУВАННІ

Жіноча консультація МСЧ “Комунар”, м. Запоріжжя
Запорізький Інститут удосконалення лікарів

Доведено, що використання тільки деструктивних методів лікування фонових захворювань шийки матки при папіломавірусному інфікуванні не достатньо ефективне. Застосування тіотріазоліну після кріодеструкції прискорює строки репарації на 1,5–2 тижні та зменшує кількість рецидивів в два рази.

N. N. VOLOSHINA, N. S. LUTSENKO

COMPLEX CRYOSURGICAL TREATMENT OF ACCOMPANYING DISEASES OF UTERUS NECK AT PAPILLOMA VIRUS INFECTIONING

Women Consultation at Medical Sanitary Station “Kommunar”, Zaporozhie,
Zaporozhie Institute of Physicians Advanced Training

It has been revealed that the usage of only destructive methods of treatment of accompanying diseases of uterus neck at papilloma virus infectioning is not quite efficient. It has been shown that the application of thiotriazolinum after cryodestruction reduces the terms of epithelization by 1,5-2 weeks and decreases twice the relapse.

УДК 618.146+615.832.9

Н.В.Лубенкова

КРИОХИРУРГИЧЕСКОЕ ЛЕЧЕНИЕ ПСЕВДОЭРОЗИЙ ШЕЙКИ МАТКИ, РАЗВИВАЮЩИХСЯ НА ФОНЕ ГАРДНЕРЕЛЛЕЗА

Предложен комплексный метод лечения псевдоэрозий шейки матки в сочетании с гарднереллезом, включающий криохирургический метод и этиотропное лечение инфекции.

Патология шейки матки является одним из наиболее часто встречающихся гинекологических заболеваний и по данным [3] составляет 15%. Поэтому современная диагностика и проведение эффективных методов ее лечения являются основой профилактики рака шейки матки.

Установление правильного диагноза заболеваний шейки матки процесс трудоемкий и сложный в связи с большим разнообразием их этиологии и патогенетических механизмов, они зачастую существуют в различных комбинациях, каждая из которых требует индивидуального диагностического подхода и изучения. Значительно повышает процент правильной диагностики использование нескольких методов исследования [5]. Одним из наиболее часто встречающихся фоновых заболеваний шейки матки является псевдоэрозия. Этиология ее до конца еще не ясна, считают, что она полиэтиологична. Заслуживает внимания предположение о значительной роли в возникновении псевдоэрозий персистирующей инфекции. Известно, что шейка матки может быть потенциальным резервуаром этой инфекции [6].

Существует множество схем лечения псевдоэрозий шейки матки, из которых методом выбора является криовоздействие [1]. Результаты криодеструкции, длительность эпителизации шейки матки и стойкость полученных результатов зависит от многих причин. Одним из важных факторов эффективности криотерапии является наличие у женщин инфекции. Она может осложнять, утяжелять и удлинять дальнейшее течение процесса и нарушать выздоровление после криовоздействия.

Гарднереллез, по старой номенклатуре *Haemophilus vaginalis*, является очень распространенной половой инфекцией, весьма часто осложняющей течение различных фоновых заболеваний шейки матки и до настоящего времени не вполне изученной. Для гарднереллеза характерно увеличение уровня *pH* выше 4,5, что неблагоприятно сказывается на росте во влагалище ацидофильных организмов. *Gardnerella vaginalis* способствует интенсификации процесса отторжения эпителиальных клеток, особенно в условиях алкалоза. В результате образуются патогномичные для этого заболевания “ключевые клетки”. Основным признаком гарднереллеза у пациенток являлся вагинальный запах, часто описываемый как “рыбный”. Метод диагностики гарднерелл — выявление в мазках, окрашенных по Граму, “ключевых клеток”, но наиболее достоверным считается метод полимеразной цепной реакции (ПЦР-метод). М. Ашкенази и Дж. Генри-Сухет (1987) указывали, что для выявления гарднерелл следует использовать тест с КОН и хроматографию. По их мнению этот метод обладает высокой специфичностью, но малой чувствительностью.

Исследование проведено с целью выработки новых комплексных терапевтических подходов к лечению псевдоэрозий шейки матки, развивающихся на фоне гарднереллеза. В основу лечения положен метод криодеструкции в сочетании с адекватной этиотропной дифференцированной противовоспалительной и иммунокорректирующей терапией.

Всего было изучено 30 случаев сочетания псевдоэрозий шейки матки и гарднереллезной инфекции. Псевдоэрозии выявлялись у женщин при профилактических осмотрах. Больные наблюдались и проходили лечение в кабинете патологии шейки матки женской консультации Адлеровского района г. Сочи либо в гинекологическом отделении Адлеровской городской больницы.

Больным проводились уточнение анамнеза, характеристики жалоб, клиническое обследование, бимануальное исследование, назначение анализов крови и мочи. Существенную роль в диагностике псевдоэрозий играла простая и расширенная кольпоскопия. Под контролем кольпоскопа при необходимости производили и забор материала для биопсии.

После установления диагноза псевдоэрозии шейки матки назначалась схема лечения, обязательно включавшая в себя криохирургическое лечение. После криовоздействия продолжали клиническое наблюдение за больными, назначали повторные лабораторные обследования. При выявлении гарднереллезной инфекции женщинам назначали дополнительное этиотропное лечение. Повторные обследования пациенток проводили через один и два месяца после криовоздействия.

Обследованные женщины были репродуктивного возраста — от 20 до 41 года. Наибольшее число (21) наблюдений приходилось на возраст 21–30 лет. Средний возраст был 27,4 года.

В анамнезе пациенток отмечались детские инфекции, ОРЗ, тонзиллиты, реже хронический бронхит, пневмония, пиелонефрит.

Все женщины в прошлом переносили гинекологические заболевания в виде эрозий и псевдоэрозий (28), аднексита (2), кольпита (4) или их сочетаний.

Длительность псевдоэрозий колебалась от 2 месяцев до 4 лет, наиболее часто она была 2–3 года (15). Впервые выявлена псевдоэрозия у трех женщин, длительность 2 месяца и полгода — у двух больных. Женщины лечились амбулаторно консервативно, без эффекта. Криохирургического лечения ранее не проводилось.

Аднексит в прошлом был у двух женщин несколько лет назад. Согласно данным из их историй болезни при выписке наблюдалось полное рассасывание воспалительного инфильтрата.

Подавляющее большинство женщин были замужем. В первом браке состояло 27, во втором — 1 больная. Две пациентки были не замужем. Все мужья были клинически здоровыми. Начало половой жизни пациентки отмечали в возрасте 16–22 лет.

С целью предохранения от беременности 19 женщин использовали ВМС, 8 — бактериологический метод, 1 — гормональную контрацепцию, 2 — не предохранялись вовсе.

Все женщины в прошлом имели беременности: одну — 4, две — 3, три — 14, четыре — 7, пять — 2. В 18 случаях в анамнезе имели место одни, в 12 — двое родов. Лишь три женщины не имели аборт. У остальных в прошлом были один (9), два (15), три (2) аборта. У одной женщины было 4 аборта. Все аборты были медицинскими, осложнений после них не наблюдалось.

При поступлении большинство пациенток никаких жалоб не предъявляли, у некоторых женщин отмечались умеренные бели, реже нарушение менструального цикла, нерезкие боли в нижних отделах живота и пояснице, кровянистые контактные выделения.

При бимануальном исследовании женщин тело матки, придатки и яичники были без патологических изменений. Что касается шейки матки, то при обследовании ее с помощью зеркал во всех случаях определялась патология. В случаях с длительным анамнезом псевдоэрозий она была несколько утолщена и уплотнена. Деформации шейки не наблюдалось.

Кольпоскопически у 24 пациенток выявлена железистая эктопия с зоной трансформации, у 6 — железистая эктопия без зоны трансформации.

Участок замещения многослойного плоского эпителия влажной части шейки матки цилиндрическим эпителием имел четкие ровные контуры, иногда более или менее выраженные сосочковые разрастания ярко красного цвета. С целью получения более полной картины участок эктопии обрабатывали 3%-м раствором уксусной кислоты. Размеры этих участков и их кольпоскопическая характеристика варьировали в разных случаях в зависимости от размеров эктопии, ее давности, наличия участков трансформации, наплыва многослойного плоского эпителия на поверхность цилиндрического. Данные кольпоскопического исследования свидетельствовали о наличии у женщин псевдоэрозий.

При бактериоскопическом исследовании мазки из канала шейки матки окрашивались по Граму. При первичном исследовании у большинства женщин были выявлены признаки кольпита. В мазках определялось увеличенное количество лейкоцитов: в 7 случаях — 10–15, в 10 — 15–20, в 13 — 20–25 экземпляров, а также палочки (8), кокки (2) и в основном — смешанная флора (20).

При сочетании псевдоэрозии с кольпитом перед криообработкой шейки матки женщинам в течение 3–15 дней проводилась санация половых путей. С этой целью использовались дезинфицирующие и противовоспалительные растворы, назначались гипохлорид, хлоргексидин, диоксидин, протаргол, местно применяли вагинальные таблетки клиона Д, клотримазина, полижинакс.

Криохирургическое лечение проводили за 1–7 дней до очередной менструации или на первой неделе после нее.

Для криохирургического лечения использовали аппарат АКГ-1, работающий на закиси азота контактным способом. Через 15–20 мин у женщин из половых путей появлялись светлые, жидкие, водянистые выделения — лимфорея. В послеоперационном периоде на 3–14-е сутки женщина осматривалась. Обращали внимание на характеристику струпа и особенности лимфореи.

Еще до взятия повторных мазков и посевов из цервикального канала, влагалища и уретры обращала на себя внимание резко зловонная с “рыбным” запахом лимфорея, которая имела охристо-желтый цвет. Такого же цвета был и желеобразный струп. Нередко выделения из-под струпа имели желтовато-пенистый вид. При этом женщины иногда предъявляли жалобы на тянущие боли внизу живота.

Данные бактериоскопического исследования свидетельствовали об усилении воспалительных изменений. Наблюдалось увеличение количества лейкоцитов, изменялся характер влагалищной флоры.

После криохирургического лечения у женщин бактериоскопически значительно чаще диагностировалась смешанная инфекция, увеличилось число наблюдений с наличием в мазках палочек и кокков. Во влагалищных мазках появились “ключевые клетки”.

ПЦР-метод во всех случаях выявил гарднереллез, в связи с чем пациенткам было назначено этиотропное лечение.

Для лечения гарднереллеза женщинам назначали трихопол (per os 2 таблетки 2 раза в день и 1 таблетку во влагалище), тинидазол, тиберал, влагалищный крем “Далацин”, эубиотики, тампоны с мазью “Ируксон”, спринцевание, ванночки или тампоны с лактобактерином, свечи “Ацилакт” и др. препараты. Схемы лечения были с индивидуальными особенностями.

Сроки эпителизации шейки матки после криовоздействия у женщин с псевдоэрозиями и лечения гарднереллеза были в среднем 3–4 недели и не превышали один месяц, тогда как по данным других авторов [2] наиболее часто они были в пределах 5–8 недель и более.

Кольпоскопически влагалищная часть шейки матки покрывалась нежным эпителием и к концу первого месяца после криообработки приобретала нормальный вид. Эпителий хорошо окрашивался раствором Люголя. За это время исчезали и симптомы гарднереллеза.

В контрольных мазках, сделанных через один месяц после криохирургического лечения псевдоэрозии и этиопатогенетического лечения гарднереллеза, в двух случаях лейкоциты не определялись, в 27 наблюдениях они не превышали 10 экземпляров в поле зрения и лишь у одной женщины их было 10–15 экземпляров. Изменялась также и флора влагалища и канала шейки матки. В мазках значительно преобладали палочки (20 случаев), реже встречались кокки (10). Смешанная флора не определялась.

Контрольный повторный гинекологический осмотр пациенток, ранее имевших псевдоэрозии, развившиеся на фоне гарднереллеза, через два месяца после криохирургического лечения и этиотропной терапии гарднереллеза патологии шейки матки не выявил. Результаты ПЦР-метода также были отрицательными.

Таким образом, после проведенной криодеструкции псевдоэрозии в результате удаления нескольких миллиметров слизистой оболочки шейки матки вглубь и охлаждения подлежащих слоев эпителия, по-видимому, активизиру-

ется гарднереллезная инфекция, которая проявляется как в клинической картине, так и в дополнительных методах исследования. Можно полагать, что инфекция существовала и ранее до оперативного вмешательства, но была асимптомной и не выявлялась при лабораторных методах исследования. Проведенное после криообработки этиотропное лечение гарднереллеза способствовало не только интенсивной регенерации многослойного плоского эпителия, но и позволило санировать супружескую пару от половой инфекции, что имеет огромное социальное значение в обществе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Грищенко В. И., Щербина Н. А., Потапова Л. В. Применение низкотемпературных воздействий в акушерстве и гинекологии // Вестн. Росс. ассоц. акуш.-гинеколог. – 1996. – 2. – С. 74–77.
2. Гришина О. А. Применение криокоагуляции для лечения некоторых патологических изменений шейки матки и остроконечных кондилом // Дис.... канд. мед. наук. – Харьков. – 1978. – С. 188.
3. Серов В. Н., Цветаева Т. Ю., Шаповаленко С. А. Комплексное лечение урогенитальных негонорейных инфекций у женщин репродуктивного возраста // Мед. фарм. вестн. – 1996. – 4–5. – С. 32–37.
4. Askienazy M., Henry-Suchet J. Contribution a l'etude des vaginites a Gardnerella. Controle de l'efficacite du metronidazole a propos 507 cas // Gynecologie. – 1987. – 36, № 6. – P. 435–439.
5. Beuret T., Sadoul G. Condylomes cervicaux: Diagnostic integre colpomicrocolposcopique et cytohistologique // Ferzil. Contracept. Sexual. – 1988. – 16, № 6. – P. 489–491.
6. Keith Z., Greinin M., Method M., Hidvegi D. Za cervicite: antecedant delinfection pelvienne une mise au point // Ferzil. Contracept. Sexual. – 1989. – 17, № 6. – P. 931–940.

Женская консультация Адлерского р-на, г. Сочи

Поступила 20.05.98

Н. В. ЛУБЕНКОВА

КРІОХІРУРГІЧНЕ ЛІКУВАННЯ ПСЕВДОЕРОЗІЙ ШИЙКИ МАТКИ, ЯКІ РОЗГОРТАЮТЬСЯ НА ФОНІ ГАРДНЕРЕЛЛЕЗУ

Жіноча консультація Адлерського району м. Сочи

Запропоновано комплексний метод лікування псевдоерозій шийки матки сполучно з гарднереллезом, який включає криохірургічний метод та етіотропне лікування інфекції.

N. V. LUBENKOVA

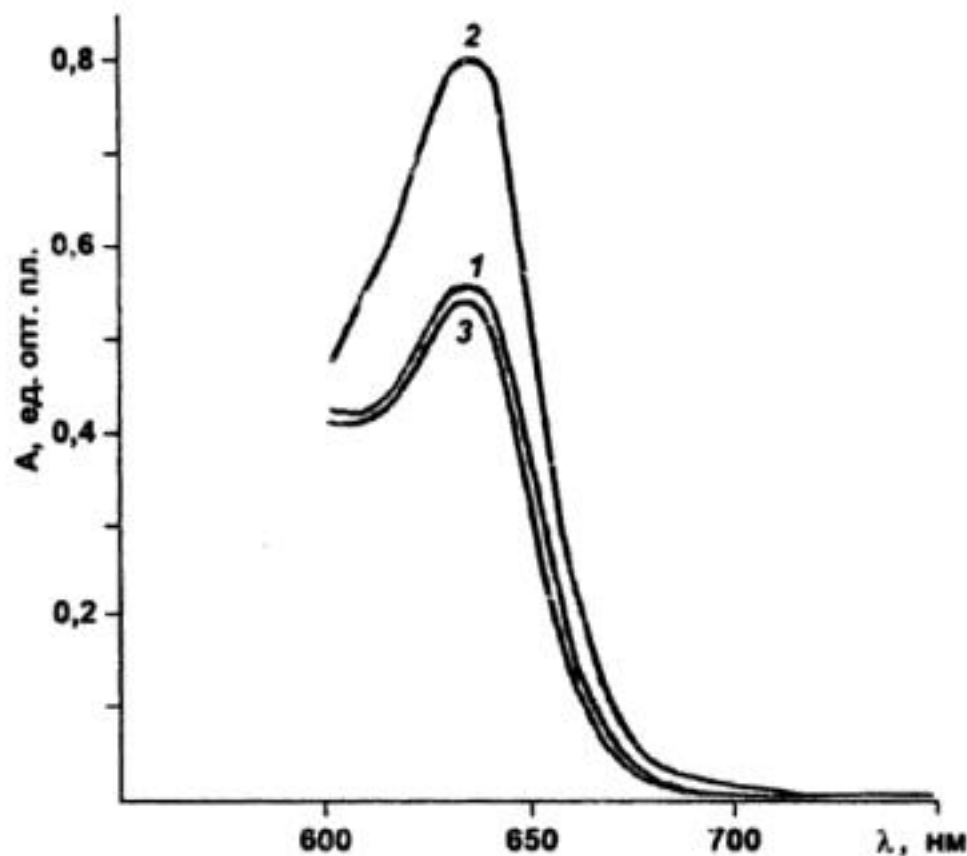
CRYOSURGICAL TREATMENT OF CERVICAL PSEUDOEROSION DEVELOPED ON THE BACKGROUND OF GARDNERELLESIS

Women Consultation of Adler region, Sochi

Complex method in the treatment of cervical pseudoerosion in combination with gardnerelosis including cryosurgical method and etiotropic treatment of infection was proposed.

В.И.Грищенко, С.Х.Межидов

**ОБ УВЕЛИЧЕНИИ ЭКСТИНКЦИИ ХРОМОФОРНОЙ ГРУППЫ БЕЛКА
В ПРИСУТСТВИИ КЛЕТОК**



Экстинкция хромофорной группы белка в физиологическом растворе натрия хлорида, содержащем $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л ферроцианида калия и 5 ммоль/л натрий-фосфатного буфера, pH 7,2: 1 — в исходном растворе до добавления клеток; 2 — в присутствии клеток в исходном растворе; 3 — в надосадке после удаления клеток путем центрифугирования

В криобиологии часто приходится проводить исследование суспензий клеток, когда часть клеток разрушена. Проведение таких исследований обусловлено необходимостью выяснения механизмов криповреждения и криозащиты с целью создания новых и совершенствования существующих криобиологических технологий. При спектрофотометрическом исследовании таких объектов возникает вопрос: влияют ли клетки на спектр исследуемого вещества?

В качестве исследуемого объекта выбран хромофорсодержащий белок, так как это позволяет проводить исследования в широком диапазоне длин волн. Проведенные исследования показали (рис.), что в присутствии клеток происходит увеличение экстинкции хромофорной группы белка. В настоящем изучаются причины, приводящие к такому увеличению экстинкции, и влияние на нее различных факторов.

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

Поступило 31.03.98

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

2¹⁹⁹⁸

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

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

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

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

ISSN 0233-7673 ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ. 1998. № 2. 1-72 ИНДЕКС 70474