

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

Институт проблем криобиологии
и криомедицины

4
2001

ISSN 0233-7673

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

Institute for Problems of Cryobiology
and Cryomedicine

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ



PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY

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

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

Главный редактор В. И. ГРИЩЕНКО

Editor-in-Chief V. I. GRISHCHENKO

Редакционная коллегия

Editorial Board

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

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

Редакционный совет

Editorial Council

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

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

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

State Registration Certificate:
KB Series № 98 of 23.09.93

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

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

e-mail: cryo@online.kharkov.ua

e-mail: cryo@online.kharkov.ua

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

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

Материал, защищенный авторским правом

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

Попова Л. Д., Стеценко С. А. Оценка стабильности биологических мембран методом хемилюминесценции	3
Грищенко В. И., Черкашина И. В., Кучков И. Н., Гапон А. А., Микулинский Ю. Е., Юрченко Г. Г. Влияние перфторана на подвижность и переживаемость спермиев человека при гипотермии . .	8
Грищенко В. И., Гордиенко О. И., Гончарук Е. И. Влияние перфторана на осмотическую хрупкость эритроцитов человека	12
Марченко В. С., Бабийчук В. Г. Кардиорегуляторная функция гематоэнцефалического барьера при резонансной гипотермии	17

КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЕ БИООБЪЕКТОВ

Гальченко С. Є. Вплив довгострокового зберігання на еритроцити, заморожені з великими швидкостями охолодження	30
Горбунов Л. В., Антоненко Т. С., Безуглый Н. Д. Изучение влияния изменения скорости замораживания на сохранность эмбрионов млекопитающих	36
Линник Т. П., Бизикина О. В. Криоконсервирование спермы петухов. II. Криопротекторная активность амидов и диолов	43
Репин Н. В., Репина С. В., Солодовник В. Ф., Чебан М. И. Кварцевый термопреобразователь ДАП.ТЦ-05 для устройств регулирования температуры	52
Стегний М. Ю., Дикий И. Л., Стегний Б. Т., Гольцев А. Н. Сравнительная оценка эффективности методов криоконсервирования и лиофилизации вирусного материала	56

КРИОМЕДИЦИНА

Строна В. И., Демин Ю. А., Шарлай Т. М. Пути миграции криоконсервированных кроветворных клеток эмбриональной печени при трансплантации в эксперименте	61
Бызов В. В., Высеканцев И. П., Гальченко С. Е., Сандомирский Б. П. Влияние эндобронхиального введения экстракта криоконсервированных фрагментов ксеноселезенки на некоторые факторы местного иммунитета в комплексной терапии больных с абсцессами легких	65

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Цымбал Л. В. Исследование термоиндуцированных изменений микроструктуры крови методом спинового зонда	71
Тимченко Н. Н., Розанова Е. Д., Кучеренко Ю. В. Спектральные свойства фетального гемоглобина после замораживания-оттаивания в растворах глицерина и 1,2-пропандиола	73

This One



NW8C-BL7-574N

4
2001

PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY

CONTENTS

THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

<i>Popova L. P., Stetsenko S. A.</i> Estimation of the Stability of Biological Membranes by Chemiluminescence Method	3
<i>Grischenko V. I., Cherkashina I. V., Kuchkov I. N., Gapon A. A., Mikulinsky Yu. E., Yurchenko G. G.</i> Perftoran Effect on Some Functional Characteristics of Human Spermatozoa under Hypothermia	8
<i>Grischenko V. I., Gordienko O. I., Goncharuk E. I.</i> Perftoran Effect on Osmotic Fragility of Human Erythrocytes	12
<i>Marchenko V. S., Babichuk V. G.</i> Cardiorespiratory Function of Blood Brain Barrier under Resonance Hypothermia	17

CRYOPRESERVATION OF BIOSYSTEMS

<i>Galchenko S. E.</i> Effect of Long-Term Storage on the Erythrocytes Frozen with High Cooling Rates	30
<i>Gorbunov L. V., Antonenko T. S., Bezugly N. D.</i> Studying the Influence of the Character of Change in Freezing Rate on Mammalian Embryos Integrity	36
<i>Linnik T. P., Bizikina O. V.</i> Fowl Sperm Cryopreservation. II. Amide and Diol Cryoprotective Activity	43
<i>Repin N. V., Repina S. V., Solodovnik V. F., Cheban M. I.</i> Quartz Thermoconverter DAP.TC-05 for the Devices for Temperature Regulation	52
<i>Stegniy M. Yu., Dikiy I. L., Stegnyy B. T., Goltsev A. N.</i> Comparative Evaluation of Efficiency of the Methods for Cryopreservation and Lyophilization of Viral Material	56

CRYOMEDICINE

<i>Strona V. I., Demin Yu. A., Sharlay T. M.</i> Migration Ways of Cryopreserved Embryonic Liver Haemopoietic Cells at Transplantation in Experiment	61
<i>Byzov V. V., Vysekantsev I. P., Galchenko S. Ye., Sandomirskiy B. P.</i> Effect of Endobronchial Introduction of Extract of Cryopreserved Xenospleen Fragments on Some Local Immunity Factors in Complex Therapy of Patients with Lungs Abscesses	65

BRIEF COMMUNICATIONS

<i>Tsymbal L. V.</i> Spin-Probe Study of Thermoinduced Changes in Blood Microstructure	71
<i>Timchenko N. N., Rozanova E. D., Kucherenko Yu. V.</i> Spectral Properties of Fetal Hemoglobin after Freeze-Thawing in Glycerol and 1,2-Propanediol Solutions	73

Оценка стабильности биологических мембран методом хемилюминесценции

Л. Д. ПОПОВА, С. А. СТЕЦЕНКО

Харьковский государственный медицинский университет

Estimation of the Stability of Biological Membranes by Chemiluminescence Method

L. P. POPOVA, S. A. STETSENKO

Kharkov State Medical University

Изучено влияние полиэтиленгликолей (ПЭГ) и производных нонилбензолов (НБ) на фосфолипидный состав эритроцитов и гепатоцитов, проницаемость мембран для K^+ и интенсивность биохемилюминесценции (БХЛ) тканей и биологических жидкостей. Обнаружены повышение содержания лизофосфолипидов в мембранах гепатоцитов и эритроцитов, повышение проницаемости эритроцитарных мембран для ионов K^+ , возрастание интенсивности БХЛ тканей и биологических жидкостей у животных, подвергнутых воздействию исследованных ксенобиотиков. Показана зависимость между изученными показателями, что дает возможность рассматривать БХЛ как быстрый и эффективный метод оценки стабильности биологических мембран.

Вивчено вплив поліетиленгліколей (ПЕГ) та похідних нонілбензолів (НБ) на фосфоліпідний склад еритроцитів і гепатоцитів, проникність мембран для K^+ та інтенсивність біохемілюмінесценції (БХЛ) тканин і біологічних рідин. Виявлено підвищення вмісту лізофосфоліпідів у мембранах гепатоцитів та еритроцитів, проникності еритроцитарних мембран для іонів K^+ , зростання інтенсивності БХЛ тканин і біологічних рідин у тварин, на які впливають досліджувані ксенобіотики. Показана залежність між вивченими показниками, що дає змогу розглядати БХЛ як швидкий та ефективний метод оцінки стабільності біологічних мембран.

The influence of polyglycols and nonylbenzole derivatives on hepatocyte and erythrocyte phospholipid composition membrane permeability to K^+ and intensity of biochemiluminescence of tissues and biological liquids was studied. The increase of lysolipid concentration in hepatocyte and erythrocyte membranes, enhancing erythrocyte membrane permeability to K^+ , increasing intensity of biochemiluminescence of tissues and biological liquids were found. Correlation between investigated parameters is the base to consider biochemiluminescence as rapid and effective method of membrane stability indication.

Такие поверхностно-активные вещества (ПАВ), как производные НБ и ПЭГ, широко применяются в различных отраслях промышленности (машиностроительной, радиотехнической, фармацевтической, химической, авиационной и др.), а ПЭГ также в медицине как пролонгаторы лекарственных средств, при низкотемпературном консервировании костного мозга, крови, жидких сред глаза, эмбрион-плацентарных тканей (клетки эмбриональной печени, плацента, эмбриональная нервная ткань) и других биологических объектов. Введение вместе с биоматериалом криопротекторов определяет актуальность исследований тонких биохимических механизмов влияния этих веществ на организм теплокровных животных и человека. В силу особенностей химического строения, физико-химических свойств и биотрансформации в организме данные ксенобиотики могут оказывать как прямые, так и опосредованные мембранотропные эффекты. Опосредованное влияние изучаемых ПАВ на биологические мембраны реализуется через активацию свободнорадикального окисления и перекисного окисления липидов (ПОЛ). Об этом свидетельствуют полученные нами данные о накоплении диеновых конъюгатов и малонового диальдегида в печени и сыворотке крови, снижении

Such surficially active substances (SAS) as nonylbenzene derivatives and PEG are widely applied in different fields of industry (machine building, radiotechnical, pharmaceutical ones), and PEGs are also used in medicine as prolongators for therapeutic means at low-temperature preservation of bone marrow, blood, liquid media of eye, embryo-placental tissues (embryonic liver cells, placenta, embryonic neuronal tissue) and other biological tissues. Introduction of cryoprotectants together with biomaterial determines an actuality of investigations of fine biochemical mechanisms of these substances effect on an organism of homoiothermal animals and a human being. Due to peculiarities of chemical structure, physical and chemical properties and biotransformation in an organism given xenobiotics may manifest both direct and indirect membrane-tropic effects. Indirect effect of studied SAS on biological membranes is realized through the activation of free-radical oxidation and lipid peroxidation (LPO). Obtained by us data on the accumulation of diene conjugates and malone dialdehyde in liver and blood serum, on the decrease of recovered glutathione, on the change of enzyme activity of antioxidative protection in rats, subjected to SAS effect, testify to this fact [2, 6].

восстановленного глутатиона, изменении активности ферментов антиоксидантной защиты у крыс, подвергнутых воздействию ПАВ [2, 6].

Цель работы — изучение влияния НБ и ПЭГ на состояние биологических мембран и определение роли хемилюминесцентных методов в оценке их стабильности. Было исследовано влияние данных веществ на фосфолипидный состав мембран эритроцитов и гепатоцитов, проницаемость мембран эритроцитов для K^+ , а также изучена БХЛ тканей и биологических жидкостей.

Работа выполнена на крысах линии Вистар массой 150–180 г, которым перорально зондом ежедневно вводили НБ (ФОМ-9, неонолы ФОМ 9-4, ФОМ 9-12, ФОМ 9-20) и ПЭГ (Л-202, Л-402, Л-502, Л-503, Лд-703, Л-1502) в дозе 1/100 ДЛ₅₀. Длительность введения веществ — до 30 сут. Образцы веществ представлены НПО «Синтез ПАВ» (г. Шебекино, Белгородская обл., Россия).

Экстракцию липидов проводили по методу Кейтса [4]. Для разделения индивидуальных фосфолипидов на фракции использовали двухмерную тонкослойную хроматографию [9]. Количественное содержание общих и индивидуальных фосфолипидов в липидных экстрактах оценивали по количеству неорганического фосфора, который определяли с помощью молибденового реактива с последующим колориметрированием. Соотношение фосфолипидных фракций рассчитывали в процентах фосфора фосфолипидов каждой фракции к сумме фосфора всех липидов, принятых за 100%.

Проницаемость эритроцитарных мембран для ионов K^+ измеряли по 2 показателям: скорости самопроизвольного выхода ионов K^+ в бескальцевую среду и скорости индуцированного специфическим ионофором (валиномицином) выхода ионов K^+ . Интенсивность БХЛ, индуцированной 0,5%-м раствором перекиси водорода, измеряли на хемилюминиметре ХЛМ-1Ц-01 [1]. Результаты оценивали по интенсивности и кинетике протекания реакции свечения после добавления индукента.

Данные экспериментов (табл. 1 и 2) свидетельствуют о более существенном влиянии ПЭГ на фосфолипидный состав эритроцитов и гепатоцитов по сравнению с НБ. Так, в гепатоцитах ПЭГ процентное содержание фосфатидилхолина (ФХ) и кардиолипина (КЛ) повышают, снижая содержание фосфатидилинозитолов (ФИ) и сфингомиелинов (СМ). Соотношение фосфатидилэтанолламинов (ФЭ) и фосфатидилсеринов (ФС) остается без изменений. Статистически достоверно возрастало содержание лизоформ фосфатидилхолинов (ЛФХ) и фосфатидилэтанов (ЛФЭА).

Производные НБ изменяли процентное содержание только СМ и ЛФХ, направленность этих изменений была такой же, как и при воздействии ПЭГ.

Влияние ПЭГ на процентное соотношение СМ и ФС в гепатоцитах и эритроцитах существенно отличалось. Так, в эритроцитах ПЭГ снижали про-

The aim of given work was to investigate the NB and PEG effect on the state of biological membranes and determine the role of chemiluminescent methods in the estimation of their stability. The effect of given substances on phospholipid composition of erythrocytes and hepatocytes membranes, erythrocytes membrane permeability for K^+ , as well as BCL of tissues and biological fluids has been investigated.

The work was carried-out on 150–180 g Wistar rats, which every day were per-orally injected with NB (MPB 9, neonols MPB 9-4, MPB 9-12, MPB 9-20) and PEG (L-202, L-402, L-502, L-503, Ld-703, L-1502) in 1/100 DL₅₀. Duration of the preparations injection is up to 30 days.

Lipid extraction was done according to Keits' method [4]. To divide single phospholipids into fractions the two-dimensional thin layer chromatography was used [9]. Quantitative content of total and single phospholipids in lipid extracts was estimated on the quantity of non-organic phosphorus, being evaluated by means of molybdenum reagent with further colorimetry. Ratio of phospholipid fractions was calculated in percentage of phosphorus phospholipids to total number of phosphorus of all lipids, which were assumed as 100%.

Permeability of erythrocyte membranes for K^+ ions was measured according to two indices: rate of spontaneous release of K^+ ions into potassium free medium and the rate of induced with specific ionophore (valinomycin) output of K^+ ions. BCL intensity, induced by 0.5% hydrogen peroxide solution was measured by means of CLM-1Ц-01 chemiluminometer [1]. Results were estimated on the intensity and kinetics of the luminescence reaction after an inducement addition.

Data of experiments (Tables 1, 2) testify to more significant PEG effect on a phospholipid content of erythrocytes and hepatocytes comparing to NB. In hepatocytes PEG increase the phosphatidylcholine (PC) and cardiolipin (CL) content, decreasing phosphatidylinositols (PI) and sphingomyelins (SM). Percentage ratio of phosphatidylethanolamines (PEA) and phosphatidylserines (PS) remains unchangeable. Content of PC PEA lipophorms manifested statistically true increase.

NB derivatives changed the percentage of just SM and PCL, and direction of these changes was the same as under the PEG effect.

PEG effect on the percentage ratio of SM and PS in hepatocytes and erythrocytes significantly differed. In erythrocytes PEG decreased the percentage of PS, and SM under the effect of these substances in erythrocytes considerably augmented. These differences, probably, are related to a special role of liver in a lipid and phospholipid exchange. Biosynthesis of phospholipids in liver is essential not just for providing renewal and adaptation of structural phospholipids in membranes of liver itself, but also for phospholipid formation, which are transported by blood lipoproteins to other tissues [5].

Таблица 1

Table 1

Влияние ПАВ (1/100 ДЛ₅₀) на фосфолипидный состав эритроцитов
Effect of SAS (1/100 DL₅₀) on a phospholipid content of erythrocytes

Вещества Substances	Фракции фосфолипидов, % Phospholipid fractions, %				
	ФЭ / PE	ФХ / PC	СМ / SM	ФС / PS	ЛФХ / PCL
Контроль / Control	21,6 ± 1,7	43,9 ± 1,2	11,9 ± 0,7	12,4 ± 0,8	3,5 ± 0,6
Л-202 / L-202	22,1 ± 1,6	48,6 ± 0,7*	17,8 ± 0,9*	8,1 ± 0,4*	7,4 ± 0,5*
Л-402 / L-402	22,6 ± 1,3	48,2 ± 0,9*	15,4 ± 1,0*	8,8 ± 0,5*	7,6 ± 0,4*
Л-1502 / L-1502	21,6 ± 1,7	46,9 ± 0,6*	16,9 ± 0,7*	9,1 ± 0,3*	6,5 ± 0,3*
Контроль / Control	22,5 ± 1,5	48,5 ± 1,9	12,8 ± 0,9	11,2 ± 0,9	3,8 ± 0,9
ФОМ 9 / MPB 9	20,5 ± 1,3	47,4 ± 1,6	17,5 ± 1,4*	8,9 ± 2,7	6,8 ± 0,6*
Неонол ФОМ 9-4 / Neopol MPB 9-4	21,6 ± 1,8	47,8 ± 1,5	16,8 ± 1,7*	9,9 ± 1,5	7,3 ± 0,7*
Неонол ФОМ 9-20 / Neopol MPB 9-20	24,0 ± 2,2	47,5 ± 3,8	17,4 ± 1,6*	11,2 ± 2,4	6,2 ± 0,6*

Примечание. * — различия с контролем статистически достоверны.
Note. * — differences with the control are statistically true.

Таблица 2

Table 2

Влияние ПАВ (1/100 ДЛ₅₀) на фосфолипидный состав гепатоцитов
Effect of SAS (1/100 DL₅₀) on a phospholipid content of hepatocytes

Вещества Substances	Фракции фосфолипидов, % Phospholipid fractions, %							
	ФЭ PE	ФХ PC	СМ SM	ФС PS	ЛФЭА PEAL	ЛФХ PCL	ФИ PI	КЛ KL
Контроль / Control	23,6 ± 1,6	38,4 ± 2,1	15,8 ± 1,1	9,8 ± 0,7	1,5 ± 0,4	1,6 ± 0,5	7,6 ± 0,1	0,60 ± 0,09
Л-202 / L-202	21,2 ± 1,6	43,6 ± 1,3*	11,1 ± 0,7*	10,4 ± 0,9	4,2 ± 0,7*	5,0 ± 0,7*	3,8 ± 0,3*	0,81 ± 0,03*
Л-402 / L-402	20,0 ± 1,5	42,6 ± 0,9*	11,0 ± 0,7*	10,4 ± 1,3	6,5 ± 1,2*	4,6 ± 0,8*	4,5 ± 0,4*	0,78 ± 0,02*
Контроль / Control	23,3 ± 2,1	39,3 ± 3,1	16,0 ± 0,9	9,0 ± 1,2	1,3 ± 0,6	1,0 ± 0,4	7,7 ± 0,4	0,5 ± 0,1
ФОМ 9 / MPB 9	22,4 ± 1,3	41,8 ± 3,5	10,8 ± 1,2*	10,6 ± 0,9	4,6 ± 0,5*	4,9 ± 0,3*	3,3 ± 0,6*	0,80 ± 0,25
Неонол ФОМ 9-4 / Neopol MPB 9-4	21,5 ± 1,8	39,6 ± 2,8	11,3 ± 0,9*	11,4 ± 1,2	6,2 ± 0,7*	5,2 ± 0,6*	4,4 ± 0,7*	0,6 ± 0,2

Примечание. * — различия с контролем статистически достоверны.
Note. * — differences with the control are statistically true.

центное содержание ФС, а СМ под влиянием этих веществ в эритроцитах достоверно повышалось. Эти отличия, возможно, связаны с особой ролью печени в обмене как липидов, так и фосфолипидов. Биосинтез фосфолипидов в печени необходим не только для обеспечения обновления и приспособления структурных фосфолипидов в мембранах самой печени, но и для образования фосфолипидов, которые транспортируются липопротеинами крови к другим тканям [5].

Так как КЛ являются основными липидными компонентами мембран митохондрий, изменение их концентрации, а вследствие этого и липидного окружения ферментов митохондриальных мембран может быть одной из причин нарушения процессов биоэнергетики, о чем свидетельствуют полученные нами результаты о снижении активности сукцинат-дегидрогеназы и АТФазы в печени [7].

Производные НБ в гепатоцитах повышали содержание лизоформ и снижали содержание СМ. Следует отметить, что повышение содержания лизоформ в фосфолипидных фракциях гепатоцитов и эритроцитов под влиянием НБ и ПЭГ было практически одинаковым.

Изменения в фосфолипидном составе эритроцитов и гепатоцитов (в частности, накопление ЛФХ и ЛФЭА) свидетельствуют о снижении стабильности биологических мембран под влиянием данных ксенобиотиков. Подтверждением нарушения проницае-

As CL are the main lipid components of mitochondria membrane, the change in their concentration, and therefore a lipid environment of mitochondrial membrane enzymes, can be one of the causes of the impairment of bioenergetics processes, obtained by us results testify to a decrease in succinate dehydrogenase and ATPase activity in liver [7].

NB derivatives in hepatocytes increased lysophorm content and decreased the content of SM. It should be noted that an increase of lysophorm content in phospholipid fractions of hepatocytes and erythrocytes under the effect of NB and PEG was practically the same.

Changes in phospholipid content of erythrocytes and hepatocytes (in particular, PCL and PEAL) testify to a decrease of biological membranes stability under the effect of xenobiotics. The results of experiments on the investigation of the effect of SAS on the rate of K⁺ ions releasing out of erythrocytes are the confirmation of the injury of membrane permeability under the effect of SAS.

All the studied PEG significantly (by 12–15 times) increased free K⁺ releasing out of erythrocytes and by 40–86% the ones induced by valinomycin (Table 3). Antibiotic valinomycin is ionophore, binding K⁺ ions in a specific way, promoting to its

мости мембран под воздействием ПАВ служат результаты экспериментов по изучению их влияния на скорость выхода ионов K^+ из эритроцитов.

Все исследованные ПЭГ существенно (в 12–15 раз) повышали свободный и на 40–86% — индуцированный валиномицином выход K^+ из эритроцитов (табл. 3). Антибиотик валиномицин является ионофором, специфически связывающим ионы K^+ , тем самым способствуя его транспорту через биологические мембраны, а это связано с его липофильной природой. Изменения в фосфолипидном составе мембран эритроцитов, очевидно, облегчают роль валиномицина как переносчика ионов K^+ .

Таблица 3

Влияние ПЭГ (1/100 ДЛ₅₀) на проницаемость мембран эритроцитов для K^+ , мкмоль/мин·10⁶ эритроцитов

Вещества	Свободный выход K^+	Выход K^+ , индуцированный валиномицином
Контроль	0,100 ± 0,008	6,15 ± 0,26
Л-402	1,53 ± 0,04*	10,47 ± 0,35*
Л-502	1,44 ± 0,03*	11,15 ± 0,37*
Л-1502	1,260 ± 0,025*	9,72 ± 0,43*
Л-503	1,400 ± 0,018*	8,15 ± 0,30*

Примечание. * — различия с контролем статистически достоверны.

Повышение процентного содержания лизоформ фосфолипидов, нарушение проницаемости мембран, очевидно, являются следствием активации ПОЛ [2, 6]. Это подтверждается и результатами БХЛ тканей и биологических жидкостей. БХЛ биосубстратов и биологических жидкостей характеризует интенсивность свободнорадикального окисления тканевых липидов и служит основным тестом в комплексной диагностике свободнорадикальной патологии [3].

Как видно из табл. 4 и 5, оба класса исследуемых ПАВ повышали интенсивность БХЛ приблизительно в 2 раза. Результаты БХЛ хорошо коррелировали с интенсивностью ПОЛ, изменениями в структуре мембран и их проницаемости. Эта же закономерность отмечалась в [8]. Было обнаружено, что у крыс с высокой судорожной готовностью повышено образование активных форм кислорода — инициаторов свободнорадикальных процессов. При этом накопления продуктов ПОЛ не выявлено. Только в печени наблюдалось повышение концентрации малонового диальдегида. Фосфолипидный состав синапсом головного мозга, мембран гепатоцитов и эритроцитов изменялся незначительно. Эти данные хорошо

Таблица 4

Интенсивность БХЛ органов и сыворотки крови белых крыс при воздействии ПЭГ (1/100 ДЛ₅₀)

Вещества	Сыворотка крови	Печень	Головной мозг	Надпочечники
	Интенсивность БХЛ, имп/с			
Контроль	280 ± 20	820 ± 30	370 ± 23	400 ± 20
Лд-703	638 ± 12*	1 860 ± 44*	680 ± 18*	128 ± 25*
Л-503	582 ± 23*	1 223 ± 55*	620 ± 51*	805 ± 11*
Л-402	560 ± 21*	1 120 ± 26*	530 ± 26*	1060 ± 19*
Л-1502	608 ± 43	1 123 ± 19*	615 ± 33*	780 ± 15*

Примечание. * — различия с контролем статистически достоверны.

transport through biological membranes, and this is related to its lipophylic nature. Changes in a phospholipid content of the erythrocytes membranes, obviously, makes easier the role of valinomycin as a transporter of K^+ ions.

Table 3

PEG effect (1/100 DL₅₀) on permeability of erythrocytes' membranes for K^+ , $\mu\text{mol}\cdot 10^6$ erythrocytes

Substances	Free K^+ releasing out	K^+ releasing out induced by valinomycin
Control	0.100 ± 0.008	6.15 ± 0.26
L-402	1.53 ± 0.04*	10.47 ± 0.35*
L-502	1.44 ± 0.03*	11.15 ± 0.37*
L-1502	1.260 ± 0.025*	9.72 ± 0.43*
L-503	1.400 ± 0.018*	8.15 ± 0.30*

Note. * — differences with the control are statistically true.

Augmentation of the percentage of phospholipid lysophorms, injury of membrane permeability is, obviously, the consequence of LPO activation [2, 6]. This is also confirmed by the results of BCL of tissues and biological fluids, BCL of biosubstrates and biological fluids characterizes intensity of tissue lipids and is the main test in a complex diagnostics of free-radical pathology [3].

As the Tables 4 and 5 showed, both classes of studied SAS increased BCL intensity about twice. The results on BCL correlated with LPO intensity, changes in the membrane structure and their permeability. The same regularity was observed as reported in the paper [8]. We revealed that in rats with a high spasmodic readiness the formation of active oxygen forms, initiators of free-radical processes, was increased. Thereat no accumulation of LPO products was revealed. Just in the liver an increase of MDA concentration was observed. Phospholipid content of brain synaptosomes, hepatocyte membranes and erythrocytes slightly changed. These data are confirmed by the results of BCL. Thus, just in the liver an increase of Fe^{2+} -induced BCL was noted, in brain luminol-dependent BCL, depending on the presence of hydroxilic radical and superoxide anion (i.e. initiators of free-radical processes) was increased. In the blood serum of animals with a high spasmodic readiness an intensity of BCL did not increase.

Table 4

BCL intensity of organs and blood serum of white rats under PEG effect (1/100 DL₅₀)

Substances	Blood serum	Liver	Brain	Adrenals
	BHL intensity, imp/s			
Control	280 ± 20	820 ± 30	370 ± 23	400 ± 20
LD-703	638 ± 12*	1 860 ± 44*	680 ± 18*	128 ± 25*
L-503	582 ± 23*	1 223 ± 55*	620 ± 51*	805 ± 11*
L-402	560 ± 21*	1 120 ± 26*	530 ± 26*	1060 ± 19*
L-1502	608 ± 43	1 123 ± 19*	615 ± 33*	780 ± 15*

Note. * — differences with the control are statistically true.

Таблица 5

Интенсивность БХЛ сыворотки крови и мочи белых крыс при воздействии производных НБ (1/100 ДЛ₅₀)

Вещества	Интенсивность БХЛ, имп/с, в течение (сут)			
	Сыворотка крови		Моча	
	15	30	15	30
Контроль	976,4 ± 28,5	1 020,3 ± 40,6	750,8 ± 20,7	830,9 ± 18,4
ФОМ 9	1 809,3 ± 58,7 *	2 150,8 ± 79,3 *	1 379,6 ± 57,2 *	1 656,3 ± 59,2 *
Неонол ФОМ 9-4	1 730,6 ± 54,8 *	1 890,8 ± 31,4 *	1 206,8 ± 35,4 *	1 380,4 ± 50,3 *
Неонол ФОМ 9-12	1 700,2 ± 62,4 *	1 720,5 ± 46,3 *	1 166,2 ± 30,8 *	1 420,6 ± 33,8 *

Примечание. * — различия с контролем статистически достоверны.

согласуются с результатами БХЛ. Так, только в печени обнаружено повышение Fe²⁺-индуцированной БХЛ, в головном мозге повышена люминолзависимая БХЛ, которая индуцировалась от присутствия гидроксильного радикала и супероксидного аниона (т.е. инициаторов свободнорадикальных процессов). В сыворотке крови животных с высокой судорожной готовностью интенсивность БХЛ не увеличивалась.

Биохемилюминесценция используется как интегральный показатель интенсивности протекания свободнорадикальных процессов и ПОЛ. Хемилюминограммы несут также информацию о суммарной мощности системы антиоксидантной защиты. Сопоставление полученных нами данных о состоянии компонентов антиоксидантной системы (ферментативных и неферментативных), накоплении первичных и вторичных метаболитов ПОЛ, изменении проницаемости мембран и их фосфолипидного состава с результатами спонтанной и индуцированной БХЛ дает основание рассматривать БХЛ как быстрый и эффективный метод оценки стабильности биологических мембран. При этом важно сочетание разных индукторов (Fe²⁺, люминола, перекиси водорода), а также полная расшифровка хемилюминограмм.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барабой В. А., Орел В. Н., Карнаух И. М. Перекисное окисление и радиация. — Киев: Наук. думка, 1991. — 256 с.
2. Жуков В. И., Стеценко С. А., Пивень В. И. и др. Биологическая активность детергентов — производных нонилбензолов в связи с проблемой охраны водных объектов. — Белгород, 2000. — 237 с.
3. Журавлев А. И. Спонтанная биохемилюминесценция животных тканей // Биохемилюминесценция. — М., 1983. — С. 3–29.
4. Кейтс М. Техника липидологии. — М.: Мир, 1975. — 322 с.
5. Мак-Мюррей У. Обмен веществ у человека. — М.: Мир, 1980. — 366 с.
6. Попова Л. Д. Влияние диолов на антиоксидантную систему эритроцитов // Гигиена населенных мест. — Киев, 2000. — С. 117–120.
7. Попова Л. Д. Влияние полиэтиленгликолей на активность ферментов мембран митохондрий // Материалы научно-практ. конф. "Региональные проблемы охраны здоровья населения Центрального Черноземья". — Белгород, 2000. — С. 580–584.
8. Попова Л. Д. Перекисное окисление липидов в головном мозге крыс с разным уровнем судорожной готовности // Биол. вестник. — 1998. — № 1. — С. 46–49.
9. Vaskovsky V. E., Terekhiv T. A. URTTC of phospholipids mixtures containing phosphatidyl glycerols // J. High Res. Chromatogr. — 1979. — 2, № 11. — P. 671–672.

Поступила 20.03.2001

Biochemiluminescence is used as an integral index of the intensity of free-radical and LPO processes. Chemilumino-grams are the transporters of information about a total power of the system of antioxidative protection. Comparison of the obtained data on the state of components of antioxidative system (enzymic and non-enzymic), accumulation of initial and secondary LPO metabolites, change of the membrane perme-

Table 5

BCL intensity of blood serum and urine of white rats under effect of NB derivatives (1/100 DL₅₀)

Substances	BCL intensity, imp/s, during, days			
	Blood serum		Urine	
	15	30	15	30
Control	976.4 ± 28.5	1 020.3 ± 40.6	750.8 ± 20.7	830.9 ± 18.4
MPB 9	1 809.3 ± 58.7 *	2 150.8 ± 79.3 *	1 379.6 ± 57.2 *	1 656.3 ± 59.2 *
Neonol MPB 9-4	1 730.6 ± 54.8 *	1 890.8 ± 31.4 *	1 206.8 ± 35.4 *	1 380.4 ± 50.3 *
Neonol MPB 9-12	1 700.2 ± 62.4 *	1 720.5 ± 46.3 *	1 166.2 ± 30.8 *	1 420.6 ± 33.8 *

Note. * — differences with the control are statistically true.

ability and their phospholipid content with the results of spontaneous and induced BCL gives us the grounds to consider chemiluminescence as a rapid and efficient method for the estimation of the stability of biological membranes. Thereat combination of various induc-ents (first of all, Fe²⁺, luminol, hydrogen peroxide), as well as a complete decoding of chemilumonograms are important.

REFERENCES

1. Baraboy V. A., Orel V. N., Karnaukh I. M. Lipid peroxidation and radiation. — Kiev: Nauk. Dumka, 1991. — 256 p.
2. Zhukov V. I., Stetsenko S. A., Piven' V. I. et al. Biological activity of detergents, derivatives of nonylbenzols in respect of the problem of the care of aqueous objects. — Belgorod, 2000. — 237 p.
3. Zhuravlev A. I. Spontaneous biochemiluminescence of the animal tissues // Biochemiluminescence. — M., 1983. — P. 3–29.
4. Keits M. The technique of lipidology. — M.: Mir, 1975. — 322 p.
5. McMurrey U. Metabolism in a human being. — M.: Mir, 1980. — 366 p.
6. Popova L. D. Diol effect on the erythrocytes antioxidative system. Hygiene of populated regions. — Kiev, 2000. — P. 117–120.
7. Popova L. D. Effect of polyethylene glycols on enzyme activity of mitochondria membranes // Abstracts of Scientific Practical Conference "Regional Problems of Health Care of the Population in the Central Region of Black Earth Soil". — Belgorod, 2000. — P. 580–584.
8. Popova L. D. Lipid peroxidation in the brain of rats with different level of spasmodic readiness // Biological vestnik. — 1998. — № 1. — P. 46–49.
9. Vaskovsky V. E., Terekhiv T. A. URTTC of phospholipids mixtures containing phosphatidyl glycerols // J. High Res. Chromatogr. — 1979. — 2, № 11. — P. 671–672.

Accepted in 20.03.2001

Влияние перфторана на подвижность и переживаемость спермиев человека при гипотермии

В. И. ГРИЩЕНКО, И. В. ЧЕРКАШИНА, И. Н. КУЧКОВ, А. А. ГАПОН,
Ю. Е. МИКУЛИНСКИЙ, Г. Г. ЮРЧЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Perftoran Effect on Some Functional Characteristics of Human Spermatozoa under Hypothermia

V. I. GRISCHENKO, I. V. CHERKASHINA, I. N. KUCHKOV, A. A. GAPON,
Yu. E. MIKULINSKY, G. G. YURCHENKO

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

Исследовано влияние газотранспортного кровезаменителя "Перфторан" (ПФ) на подвижность спермиев при нормоспермии в условиях гипотермического хранения при 10 °С. Показано, что наиболее эффективной концентрацией ПФ является 40% по объему. Сравниваются кинетические характеристики спермиев в спермальной плазме и растворе Хенкса, содержащих ПФ. Показано, что добавление ПФ к спермиям в растворе Хенкса позволяет продлить переживаемость клеток при гипотермии до 102 ч. Рассматриваются возможные механизмы влияния ПФ на спермии человека при гипотермии.

Досліджено вплив газотранспортного кровозамінника "Перфторан" (ПФ) на рухливість спермій при нормоспермії в умовах гіпотермічного збереження при 10 °С. Показано, що найбільш ефективною концентрацією ПФ є 40% за об'ємом. Порівнюються кінетичні характеристики спермій у спермальній плазмі і розчині Хенкса, що містять ПФ. Показано, що додання ПФ до спермій у розчині Хенкса дозволяє продовжити тривалість життя клітин при гіпотермії до 102 год. Розглядаються можливі механізми впливу ПФ на спермії людини при гіпотермії.

The effect of gas-transport blood substitute "Perftoran" (PF) on spermatozoa motility under normospermia under conditions of hypothermic storage at 10 °C was studied. It has been shown, that the most efficient concentration of PF is 40% v/v. Kinetic characteristics of spermatozoa in sperm plasma and Henks solution, containing PF, are under comparison. It has been demonstrated, that PF adding to spermatozoa in Henks solution enables to prolong the survival of cells under hypothermia up to 102 hrs. Possible mechanisms of PF effect on human spermatozoa under hypothermia are considered.

Наряду с криоконсервированной спермой во вспомогательных репродуктивных технологиях часто используют клетки, хранившиеся при гипотермии. Это связано с необходимостью повторной инсеминации спермой, реинсеминации яйцеклеток или отсрочкой инсеминации их после созревания. Кроме того, при использовании гипотермии можно избежать криоповреждения спермиев в процессе замораживания-отогрева и сохранить акросому клеток. Известно [1], что существующие способы криоконсервирования и гипотермического хранения спермиев человека не позволяют после деконсервирования получать клетки с восстановленными в полной мере морфофункциональными характеристиками. В связи с этим все большую актуальность приобретают способы повышения функциональной активности отогретых клеток. Накоплено достаточно фактов, свидетельствующих о положительном действии различных физико-химических факторов на спермии человека. По данным [6–9] введение в состав физиологических сред биологически активных веществ позволяет значительно увеличить оплодотворяющую способность отогретой суспензии клеток.

Использование в биологии и медицине газотранспортных сред на основе перфторуглеродных

Along with cryopreserved sperm in auxiliary reproductive technologies the cells, stored under hypothermia, are frequently used. This is related to the necessity of repeated insemination by sperm, re-insemination of oocytes or postponing their insemination after getting mature. In addition, when using hypothermia one can avoid cryodamage of spermatozoa in the process of freeze-thawing and preserve cell acrosome. It is known [1], that existing ways of cryopreservation and hypothermic storage of human spermatozoa do not allow after freeze-thawing to receive the cells with completely recovered morphofunctional characteristics. In this connection the ways of increasing functional activity of thawed cells gain more actuality. Quite sufficient amount of facts, testifying to a positive effect of various physical and chemical factors on human spermatozoa has been accumulated. According to data [6–9] the introduction into the composition of physiological media of biologically active substances permits to significantly enhance fertilising ability of thawed cell suspension.

The usage of gas-transport media on the base of perfluor-carbonic emulsions in biology and medicine is stipulated by the possibility of stimulation of respiration process as a main source of energy and integral index of cell viability. Gas-transport perfluor-carbonic blood substitute PF is the most widely distributed [2–4].

эмульсий обусловлено возможностью стимуляции процесса дыхания как основного источника энергии и интегрального показателя жизнеспособности клеток. Наиболее широкое распространение получил газотранспортный кровезаменитель ПФ [2–4].

Целью нашей работы являлось изучение влияния ПФ на функциональные характеристики спермиев человека при гипотермическом хранении. Материалом исследования служили эякуляты от доноров с нормоспермией, хранившиеся при 37 (контроль) и 10 °C. Исследования проводили с помощью микроскопа МБИ-10 с увеличением $\times 400$. Качество спермы до и после гипотермии определяли по характеру движения 100 клеток в каждой пробе и выражали в процентах подвижных спермиев, движущихся прямолинейно поступательно. Эксперименты были разделены на 2 серии. В первой серии был сделан подбор эффективных рабочих концентраций ПФ. Влияние препарата на клетки определяли по максимальной подвижности спермиев при варьировании его содержания в суспензии. Установлено, что ПФ в диапазоне концентраций от 0 до 12,5% (с шагом 2,5) приводил к достоверному увеличению подвижности спермиев при его содержании в среде инкубации 2 и 10% (рис. 1). Однако эффект наблюдался в течение 1 ч. При увеличении времени инкубации до 5 ч подвижность клеток была практически одинаковой во всех исследуемых группах клеток.

Смещение концентрационного диапазона ПФ в область от 10 до 50% (с шагом 5) привело к достоверно высокому уровню подвижности спермиев в течение 30 ч инкубации (рис. 2). Таким образом, полученные нами данные позволяют сделать вывод, что эффективной рабочей концентрацией ПФ в суспензии спермиев следует считать 40% по объему.

Во второй серии экспериментов изучалось влияние ПФ на подвижность спермиев после гипотермического хранения. Наблюдение за характером и продолжительностью движения клеток позволило установить, что через 24 ч в контроле все клетки были неподвижны. В суспензии, которая содержала ПФ в выбранной концентрации, отмечались единичные подвижные спермии на фоне большого числа местно качающихся клеток (рис. 3). Для ак-

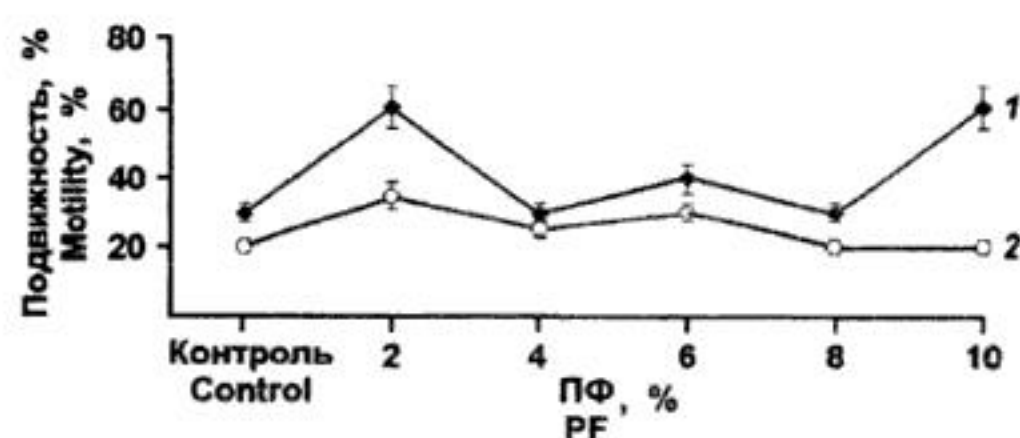


Рис. 1. Влияние различных концентраций ПФ на подвижность спермиев человека: 1 – 1 ч; 2 – 5 ч.

Fig. 1. Effect of various concentrations of PF on the motility of human spermatozoa: 1 – 1 hour; 2 – 5 hrs.

The aim of our work was the investigation of PF effect on functional characteristics of human spermatozoa under hypothermic storage. Ejaculates of donor's with normospermia, stored at 37 (control) and 10 °C served as the material for research. The investigations were carried-out by means of MBI-10 microscope with $\times 400$ magnification. The sperm quality before and after hypothermia was examined on the character of movement of 100 cells in each sample and were expressed in percentage of progressively and forwardly moving motile spermatozoa. Experiments were divided into two series. In the first series of experiments we selected effective working concentrations of PF. The effect of the preparation on cells was determined on maximum motility when varying its content in suspension. It has been shown, that PF within the concentration range from 0 to 12.5% (with the step 2.5) resulted in a statistical true increase in the motility of spermatozoa at its content in the incubation medium 2 and 10% (Fig. 1). However the effect was observed during 1 hr. When increasing the incubation time up to 5 hrs, the motility of cells was practically similar for all studied groups of cells.

The shifting of PF concentration range to the region from 10 to 50% (with the step 5) resulted in statistically high level of motility of spermatozoa within 30 hrs of incubation (Fig. 2). Thus the obtained by us data enable to conclude, that 40% v/v concentration should be considered as an efficient working concentration of PF in spermatozoa suspension.

In the second series of experiments we studied the effect of PF on the motility of spermatozoa after hypothermic storage. Observation of the character and duration of cell movement allowed to establish, that in 24 hrs in the control all cells were immotile. In suspension with PF under selected concentration, single motile spermatozoa at the background of big number of locally swinging cells (Fig. 3) were noted. For the activation of stopped cells we used pentoxifylline, applied for auxiliary reproductive technologies at the stage of sperm preparing to artificial insemination [7, 10]. Adding of 3.5 mM pentoxifylline into the

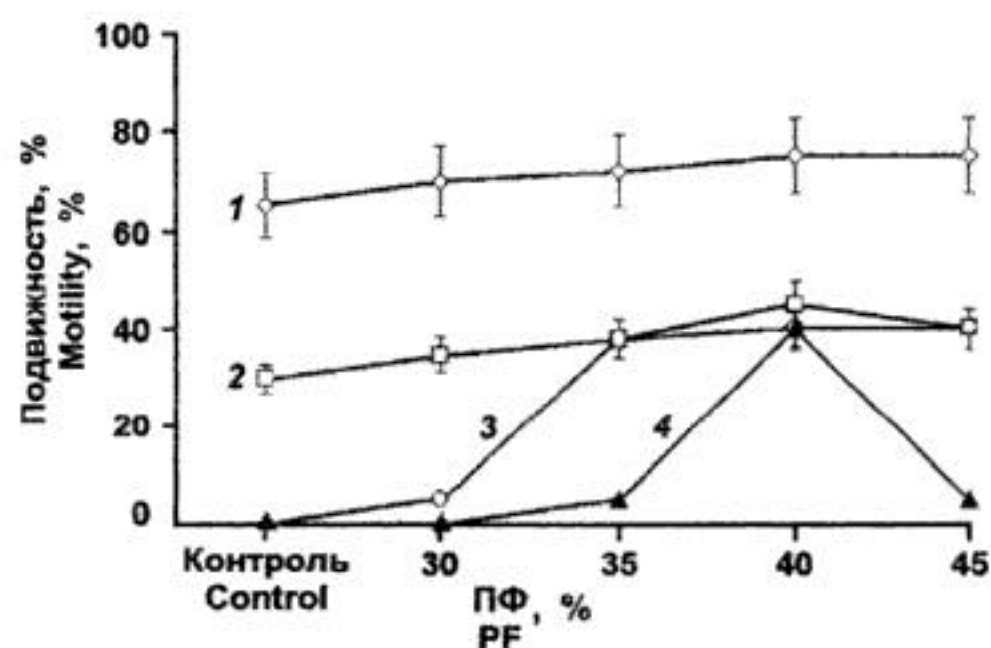


Рис. 2. Влияние различных концентраций ПФ на подвижность нативных спермиев: 1 – 1 ч; 2 – 5 ч; 3 – 24 ч; 4 – 30 ч.

Fig. 2. Effect of various concentrations of PF on the motility of native spermatozoa: 1 – 1 hour; 2 – 5 hrs; 3 – 24 hrs; 4 – 30 hrs.

тивации остановившихся клеток использовали пентоксифиллин, применяемый во вспомогательных репродуктивных технологиях на этапах подготовки спермы к искусственной инсеминации [7, 10]. Добавление в среду 3,5 мМ пентоксифиллина приводило к активации подвижности спермиев только в эякулятах, содержащих ПФ. Клетки в контрольной суспензии при этом же воздействии оставались неподвижными. Спермии, активированные с помощью пентоксифиллина, сохраняли высокую подвижность в течение 6 ч. Это продлило общее время инкубации до 48 ч. Следует отметить, что спермии находились в семенной плазме, поэтому, как мы полагаем, после 24 ч гипотермического хранения ее буферная емкость снизилась, что привело к закислению среды и последующей остановке клеток.

Для проверки данного предположения нами была поставлена серия экспериментов, в которых семенная плазма была заменена раствором Хенкса, что позволило увеличить переживаемость клеток в контроле до 48 ч (рис. 4). В растворе Хенкса, содержащем 40% ПФ, спермии сохраняли подвижность в течение 77 ч. Внесение в среду после 77 ч инкубации 3,5 мМ пентоксифиллина, как и в предыдущей серии экспериментов, не привело к активации клеток в контроле. Однако в содержащей ПФ суспензии клетки увеличили свою подвижность до начального исходного уровня, что позволило зафиксировать полную остановку спермиев только после 102 ч инкубации.

Следует отметить, что по данным Joel Ch., а также [6] сперма *in vitro* при комнатной температуре может сохранять свою подвижность в течение 12–24 ч, а при гипотермическом хранении (8–10 °C) морфофункциональные свойства клеток при нормоспермии сохраняются в течение 48 ч [5]. Рассмотренные экспериментальные данные указывают на то, что воздействие ПФ на подвижность спермиев человека значительно увеличивает переживаемость клеток в суспензии при гипотермии. Очевидно, что ПФ оказывает свое влияние на клетки через способность растворять в себе кислород, яв-



Рис. 3. Влияние ПФ на подвижность спермиев человека после гипотермического хранения: 1 – контроль; 2 – 40% ПФ.

Fig. 3. Effect of PF on the motility of human spermatozoa after hypothermic storage: 1 – control; 2 – 40% PF.

medium resulted in the activation of sperm motility only in PF-containing ejaculates. Cells in the control suspension at the same effect remained immotile. Spermatozoa, activated with PF, preserved a high motility during 6 hrs. This prolonged a total incubation time up to 48 hrs. It should be noted, that spermatozoa were in semen plasm, so as we suppose after 24 hrs of hypothermic storage its buffer capacity reduced, that resulted in the oxidation of medium and following cell stopping.

To check this supposition we have set the series of experiments, where semen plasm was substituted Henks solution, that enabled to increase cell survival in the control up to 48 hrs (Fig. 4). In Henks solution, containing 40% PF, spermatozoa preserved motility within 77 hrs. Introduction into the medium of 3.5 mM pentoxifylline after 77 hrs' incubation as well as in previous series of experiments did not result in the activation of cells in the control. However in the suspension, containing PF, the cells enhanced their motility up to initial level, that enabled to fix a complete stop of spermatozoa only after 102 hrs of incubation.

It should be noted, that according to literature data [6], as well as Joel Ch., *in vitro* sperm at room temperature can preserve its motility within 12–24 hrs and under hypothermic storage (8–10 °C) morphological properties of cells at normospermia are preserved during 48 hrs [5]. Considered experimental data point to the fact that PF effect on the motility of human spermatozoa significantly increases the cell survival in a suspension under hypothermia. Some characteristic peculiarities of this effect should be noted. It is obvious that PF affects the cells via the ability to dissolve oxygen in it, being the gas-transport perfluor-carbonic blood substitute. It is known, also [1], that fructolysis in human spermatozoa is the main energetic process, providing ATP synthesis in these cells. Therefore we suppose that introduction of PF into medium results in non-specific activation of res-

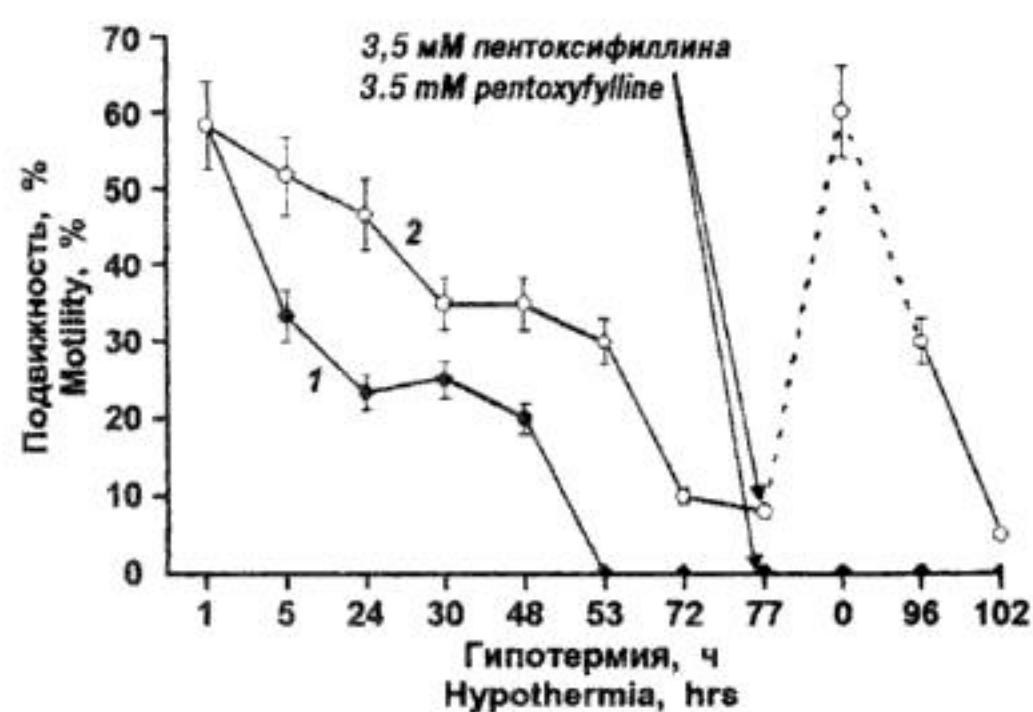


Рис. 4. Влияние ПФ на подвижность спермиев человека после гипотермического хранения в среде Хенкса: 1 – контроль; 2 – 40% ПФ.

Fig. 4. Effect of PF on the motility of human spermatozoa after hypothermic storage in Henks medium: 1 – control; 2 – 40% PF.

ляясь газотранспортным перфторуглеродным кровезаменителем. Известно также [1], что фруктолиз в спермиях человека — основной энергетический процесс, обеспечивающий синтез АТФ в этих клетках. Следовательно, как мы полагаем, внесение в среду ПФ приводит к неспецифической активации процесса дыхания, а увеличение уровня цАМФ в спермиях с помощью пентоксифиллина повышает способность клеток усваивать растворенный в среде кислород. Данные теоретические рассуждения требуют дальнейших экспериментальных обоснований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белоус А. М., Грищенко В. И., Парашук Ю. С. Криоконсервация репродуктивных клеток.— Киев: Наук. думка, 1986.— 207 с.
2. Белоярцев Ф. Ф. Медико-биологические аспекты применения эмульсий перфторуглеродов.— Пуццино, 1983.— 186 с.
3. Иваницкий Г. Р. Биофизика на пороге нового тысячелетия: перфторуглеродные среды и газотранспортные кровезаменители.— Пуццино, 2000.— С. 24.
4. Иваницкий Г. Р., Мороз В. В. Перфторорганические соединения в биологии и медицине.— Пуццино, 1999.— 286 с.
5. Крамар М. И. Влияние гипотермии на морфологические и функциональные свойства спермиев человека: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Харьков, 1990.— 17 с.
6. Порудоминский И. М. Половые расстройства у мужчин.— М.: Медгиз, 1960.— 279 с.
7. Aparicio N. J., De Turner E. A., Schwarstein L., Turner D. Effect of phosphodiesterase inhibitors on human sperm motility // *Andrologia*.— 1980.— 12.— P. 49–54.
8. Colon J. M., Ginsburg F., Lessing J. B. et al. The effect of relaxin and prostaglandin E2 on the motility of human spermatozoa // *Fertil. Steril.*— 1986.— 46, № 6.— P. 1133–1139.
9. Fakih H., MacLusky N., De Cherney A. et al. Enhancement of human sperm motility and velocity *in vitro*: effects of calcium and creatine phosphate // *Fertil. Steril.*— 1986.— 46, № 5.— P. 938–944.
10. Jackie M. R., Ress W. C. L., Hull M. G. R. Effect of caffeine and pentoxifylline on the motility and metabolism of human spermatozoa // *J. Reprod. Fertil.*— 1990.— 90.— P. 147–156.

Поступила 16.10.2001

piration process and an increase of cAMP level in spermatozoa with pentoxifylline increases the cell ability to assimilate the dissolved in the medium oxygen. These theoretical considerations require further experimental substantiation.

REFERENCES

1. Belous A. M., Grischenko V. I., Paraschuk Yu. S. Cryopreservation of reproductive cells.— Kiev: Nauk. Dumka, 1986.— 207 p.
2. Beloyartsev F. F. Medical and biological aspects of application of emulsion of perfluor-carbons.— Puschino, 1983.— 186 p.
3. Ivaniitsky G. P. Biophysics on the threshold of new millenium: perfluor-carbonic media and gas-transport blood substitutes.— Puschino, 2000.— P. 24.
4. Ivaniitsky G. P., Moroz V. V. Perfluor-organic compounds in biology and medicine.— Puschino, 1999.— 286 p.
5. Kramar M. I. Effect of hypothermia on morphological and functional properties of human spermatozoa: Author abstract of the thesis for obtaining Candidate of biological sciences degree.— Kharkov, 1990.— 17 p.
6. Porudominsky I. M. Sexual disorders in men.— M.: Medgiz, 1960.— 279 p.
7. Aparicio N. J., De Turner E. A., Schwarstein L., Turner D. Effect of phosphodiesterase inhibitors on human sperm motility // *Andrologia*.— 1980.— 12.— P. 49–54.
8. Colon J. M., Ginsburg F., Lessing J. B. et al. The effect of relaxin and prostaglandin E2 on the motility of human spermatozoa // *Fertil. Steril.*— 1986.— 46, № 6.— P. 1133–1139.
9. Fakih H., MacLusky N., De Cherney A. et al. Enhancement of human sperm motility and velocity *in vitro*: effects of calcium and creatine phosphate // *Fertil. Steril.*— 1986.— 46, № 5.— P. 938–944.
10. Jackie M. R., Ress W. C. L., Hull M. G. R. Effect of caffeine and pentoxifylline on the motility and metabolism of human spermatozoa // *J. Reprod. Fertil.*— 1990.— 90.— P. 147–156.

Accepted in 16.10.2001

Влияние перфторана на осмотическую хрупкость эритроцитов человека

В. И. ГРИЩЕНКО, О. И. ГОРДИЕНКО, Е. И. ГОНЧАРУК

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Perftoran Effect on Osmotic Fragility of Human Erythrocytes

V. I. GRISCHENKO, O. I. GORDIENKO, E. I. GONCHARUK

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

Изучено влияние перфторана на осмотическую хрупкость и плотность вероятности распределения эритроцитов по индексу сферичности при температурах 37, 16 и 3 °С. Показано, что при снижении температуры возрастает удельный вес клеток с меньшим индексом сферичности. Добавление перфторана не приводит к достоверному изменению исследованных характеристик.

Вивчено вплив перфторану на осмотичну крихкість і щільність імовірності розподілу еритроцитів за індексом сферичності при температурах 37, 16 і 3 °С. Показано, що при зниженні температури зростає питома вага клітин з меншим індексом сферичності. Додавання перфторану не приводить до достовірної зміни досліджуваних характеристик.

Perftoran effect on osmotic fragility and density of probability of erythrocyte distribution by sphericity index under the temperatures of 7, 16 and 3 °C was studied. It was demonstrated, that at a decrease in the temperature there was the augmentation of cell density with less index of sphericity. Perftoran adding does not result in a statistically true change in the studied characteristics.

Перфторан — субмикронная эмульсия на основе перфторорганических соединений. Кроме эффективности при кровопотерях, нарушениях мозгового кровообращения, интоксикациях, расстройствах микроциркуляции [5], он оказывает стабилизирующее действие на мембраны эритроцитов и гепатоцитов в условиях острой гипоксии [9], при отравлениях и интоксикациях [2]. Перфторуглероды, частично растворяясь в мембранах эритроцитов, делают их более эластичными, что противодействует повреждающим факторам, увеличивая время “жизни” эритроцитов в кровеносном русле [10]. При циркуляции в кровеносном русле некоторая часть перфторуглеродов постепенно растворяется в мембранах кардиомиоцитов, что повышает их устойчивость к ишемии [4].

Стабилизирующее действие перфторана на клеточные мембраны, его положительное влияние на реологические свойства крови и микроциркуляцию дали основание предположить, что перфторан может оказаться полезной добавкой при криоконсервировании. Учитывая, что осмотический фактор является одним из важнейших на всех этапах криоконсервирования, мы исследовали влияние перфторана на осмотическую хрупкость эритроцитов в диапазоне температур 3–37 °С. Экспериментальное изучение этого показателя осуществляли методом малоуглового рассеяния [6]. Для измерения в ячейку прибора [7], содержащую 3 мл раствора хлорида натрия в диапазоне от 0,15 до 0,05 М, помещали эритроциты (порядка 3 мкл) и по интенсивности их рассеяния определяли зави-

Perftoran is a submicron emulsion at the base of perfluor organic compounds. In addition to the efficiency at hemorrhages, disorders of brain blood circulation, intoxications, microcirculation disorders [5] it has a stabilising effect on erythrocyte and hepatocyte membranes under acute hypoxia conditions [9], at poisonings and intoxications [2]. Perfluorocarbons, being partially dissolved in erythrocyte membranes, make them more elastic, that opposes to damaging factors, by augmenting the “life” time of erythrocytes in blood channel [10]. When circulating in blood channel, a certain part of perfluorocarbons is gradually solved in the membranes of cardiomyocytes, that increases their resistance to ischemia.

Perftoran stabilising effect to cellular membranes, its positive effect on blood rheological properties and microcirculation gave the reason to suppose, that perftoran could be useful additive during cryopreservation. Taking into account, that osmotic factor is one of the important ones at all stages of cryopreservation, we studied perftoran effect on erythrocyte osmotic fragility within the temperature range of 3–37 °C. Experimental study of this index was carried-out using the method of small-angle scattering [6]. For measuring the erythrocytes (about 3 µl) were placed into the device cell [7], containing 3 ml of sodium chloride solution within the range from 0.15 to 0.05 M and according to the intensity of their scattering one determined the dependence of relative quantity of non-hemolysed erythrocytes on the solution tonicity within the mentioned range. In contrast to the routine method [3], our method allows to avoid the errors,

симость относительного количества негемолизированных эритроцитов от тоничности раствора в указанном диапазоне. В отличие от обычного метода [3] наш метод позволяет избежать ошибок, вносимых за счет дополнительного механического воздействия на клетки при центрифугировании, а также ускорить процедуру определения осмотической хрупкости. В [6] нами было показано, что осмотическая хрупкость эритроцитов достаточно сильно варьирует для разных доноров, что связано с их состоянием и является отражением динамического равновесия между количеством ретикулоцитов, которые выбрасываются в периферическую кровь из костного мозга, и количеством старых эритроцитов, которые разрушаются в селезенке [11]. Большой разброс указанного показателя для разных доноров затрудняет изучение влияния других факторов на эту характеристику.

Усредненные по пяти донорам интегральные кривые осмотической хрупкости в трех точках температурного диапазона представлены на рис. 1. Из приведенных экспериментальных кривых видно, что осмотическая хрупкость эритроцитов возрастает при снижении температуры. Дифференциальные кривые в координатах плотности распределения клеток по индексу сферичности (рис. 2) показывают, что удельный вес клеток с меньшим индексом сферичности возрастает при снижении температуры до 16 °C. На кривых, кроме обычного максимума с индексом сферичности 1,48, который наблюдается на кривых при температуре 37 °C, появляется максимум с индексом сферичности 1,28. При дальнейшем снижении температуры до 3 °C удельный вес клеток с индексом сферичности 1,28 возрастает, что отражается на кривой плотности вероятности распределения клеток по индексу сферичности ростом второго максимума.

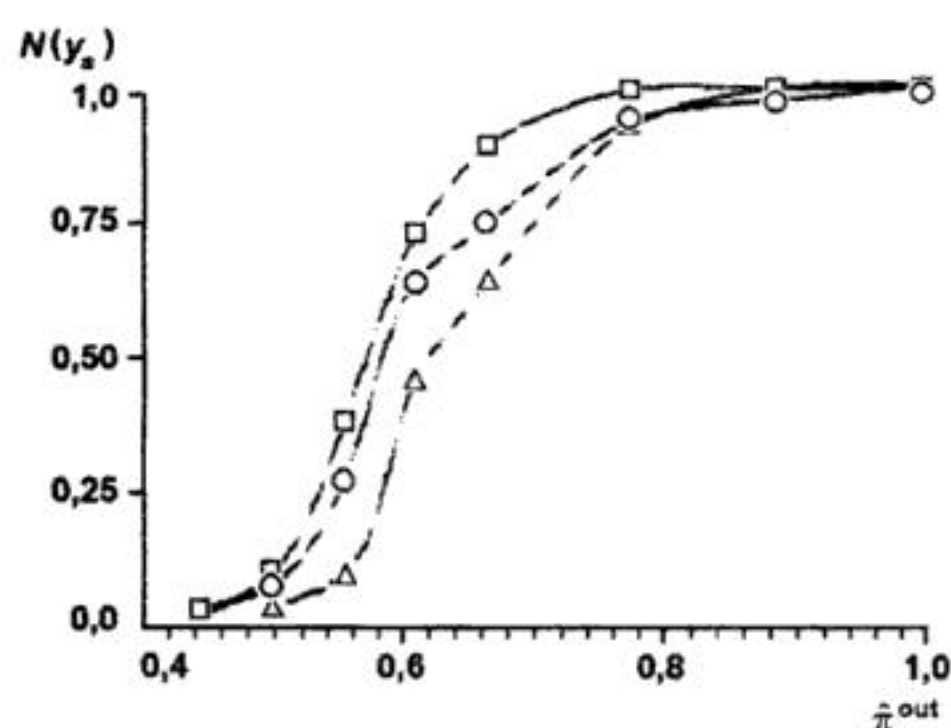


Рис. 1. Осмотическая хрупкость эритроцитов человека при температуре, °C: Δ — 37, $\circ$ — 16, $\square$ — 3. N — относительное количество сохранившихся клеток в растворе; π — относительная осмолярность раствора.

Fig. 1. Osmotic fragility of human erythrocytes at the temperature, °C: Δ — 37, $\circ$ — 16, $\square$ — 3. N — relative number of preserved cells in solution; π — relative osmolarity of solution.

introduced due to additional mechanical effect on cells during centrifuging, as well as to accelerate the procedure of determination of osmotic fragility. We demonstrated [6], that erythrocyte osmotic fragility quite strongly varied for different donors, that was related to their state and was the reflection of dynamical equilibrium between a number of reticulocytes, which were released into a peripheral blood from bone marrow and a number of old erythrocytes, that are destroyed in spleen [11]. Big spread of the mentioned index for different donors complicates the effect study of another factors on this characteristic.

Averaged by five donors integral curves of osmotic fragility in three points of temperature range are presented in the Fig. 1. Presented experimental curves show, that osmotic fragility of erythrocytes increases with temperature decrease. Differential curves in the coordinates of cell distribution density by sphericity index (Fig. 2) demonstrate, that a density of cells with less index of sphericity increases during temperature reduction down to 16 °C. In the curves, except ordinary maximum with sphericity index of 1.48, observed in the curves under the temperature of 37 °C, the maximum with sphericity index of 1.28 appears. At further temperature decrease down to 3 °C cell density with 1.28 sphericity index increases, that is reflected in the curve of density of cell distribution probability according to sphericity index by a growth of the second maximum.

Perftoran adding into a cellular suspension with a final concentration from 5 to 50% resulted to a certain shift of integral curves to the side of the reduction of osmotic fragility at the temperatures of 37 and 16 °C. Thereat, an increase in concentration from 5 to 10% strengthened perftoran effect, but the further augmentation of its concentration in the suspension did not influence the effect. These results are in accordance with the authors' data [4], who demonstrated, that the

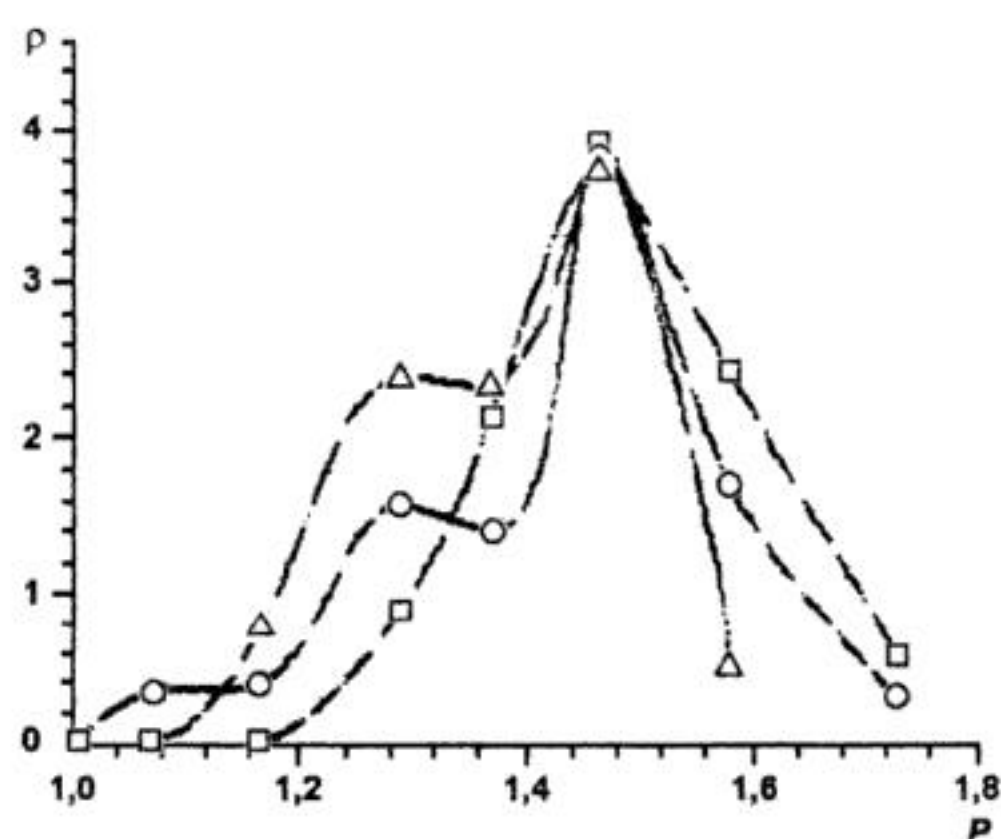


Рис. 2. Плотность вероятности ρ распределения эритроцитов по индексу сферичности P при температуре, °C: Δ — 37, $\circ$ — 16, $\square$ — 3.

Fig. 2. Probability density ρ of erythrocyte distribution by sphericity index P at the temperature, °C: Δ — 37, $\circ$ — 16, $\square$ — 3.

Добавление перфторана в клеточную суспензию с конечной концентрацией от 5 до 50% приводило к некоторому смещению интегральных кривых в сторону уменьшения осмотической хрупкости при температурах 37 и 16 °C. При этом увеличение концентрации от 5 до 10% усиливало действие перфторана, дальнейшее же повышение его концентрации в суспензии не влияло на эффект. Эти результаты согласуются с данными авторов [4], которые показали, что повышение устойчивости миокарда к ишемии не связано с времязависимым увеличением содержания перфторуглеродов в мембранах кардиомиоцитов. Этот эффект обусловлен присутствием какой-то минимальной пороговой концентрации перфторуглеродов в мембранах, после которой их действие стабилизируется.

Кривые осмотической хрупкости эритроцитов до и после добавления перфторана в суспензию в конечной концентрации 10% представлены на рис. 3 и 5. Как видно из кривых, уменьшение осмотической хрупкости эритроцитов в присутствии перфторана более выражено при 16 °C. Такие же результаты были получены для температур 20, 18 и 15 °C. Однако смещение кривых осмотической хрупкости во всех случаях не очень значительно. Форма кривых плотности вероятности распределения клеток по индексу сферичности, а также расположение максимумов этих кривых практически не изменяются (рис. 4, 6). Это свидетельствует о том, что взаимодействие с мембранами эритроцитов, если оно имеет место, является поверхностным и практически не изменяет площади их мембран. Такой результат согласуется с тем, что состав перфторана, разработанного в качестве кровезаменителя, подбирался таким образом, чтобы результирующая эмульсия не обладала сильным модифицирующим мембраны клеток действием [10]. В состав перфторана, кроме F-декалина, сильно модифицирующего мембраны клеток, введен специально синтезированный для этой цели перфтор-N

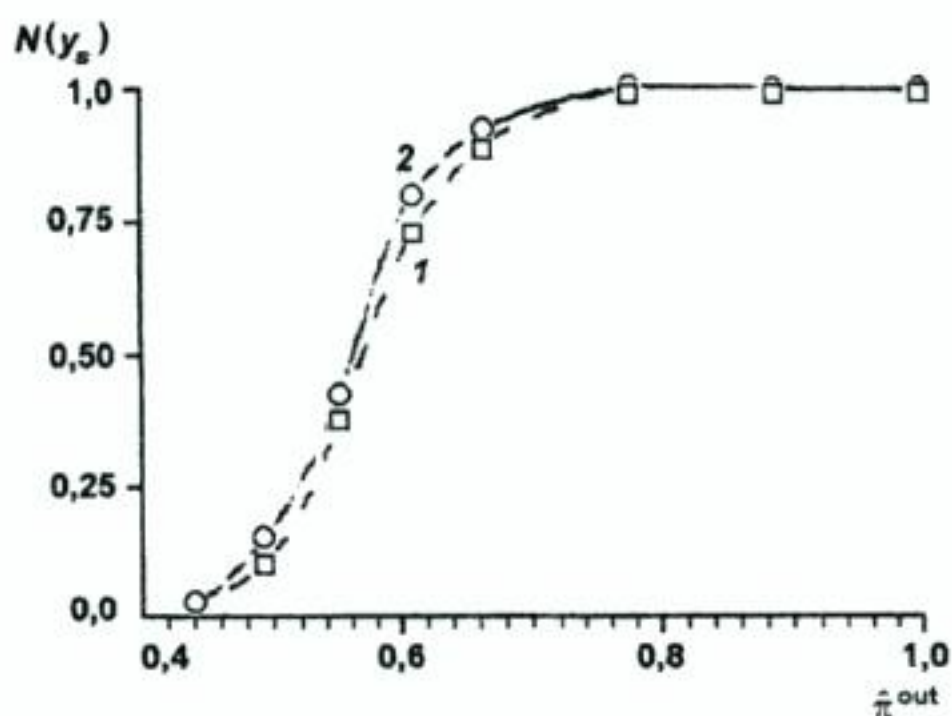


Рис. 3. Осмотическая хрупкость эритроцитов человека при 37 °C до (1) и после добавления перфторана с конечной концентрацией 10% (2).

Fig. 3. Osmotic fragility of human erythrocytes at 37 °C before (1) and after perfluorane adding with 10% final concentration (2).

augmentation of myocardium resistance to ischemia was not related to a time-dependent increase in the content of perfluorocarbons in cardiomyocyte membranes. This effect is stipulated by the presence of some minimum threshold concentration of perfluorocarbons in membranes, after which their effect is stabilised.

Curves of erythrocyte osmotic fragility before and after perfluorane adding into suspension under final concentration of 10% are presented in the Fig. 3 and 5. The curves show, that a decrease in erythrocyte osmotic fragility in the presence of perfluorane is more manifested at 16 °C. The same results were obtained for the temperatures of 20, 18 and 15 °C. However the shift of osmotic fragility curves is not very significant in all the cases. The shape of density curves of cell distribution probability by sphericity index, as well as the placement of maxima of these curves do not practically change (Fig. 4, 6). This testifies to the fact, that the interaction with erythrocyte membranes, if there is any, is surface one and does not practically change their membrane area. Such a result confirms the fact, that the composition of perfluorane, developed as blood-substitute, was selected by such a way, that a resulting emulsion would not have a strong modifying effect on cell membrane [10]. In perfluorane composition, except F-decalin, highly modifying cell membranes, one introduced a specially synthesised for this purpose perfluor-N (4-methylcyclohexyl) of piperidine, being a moderately lypophilic. This component increased the emulsion resistance and "put-out" a reactive effect of F-decalin.

Slight shift of integral curve to the side of an increase in osmotic fragility is observed under the temperature of 3 °C (Fig. 7). Differential curve in the coordinates of distribution density by sphericity index (Fig. 8) has more smoothed out shape with less value

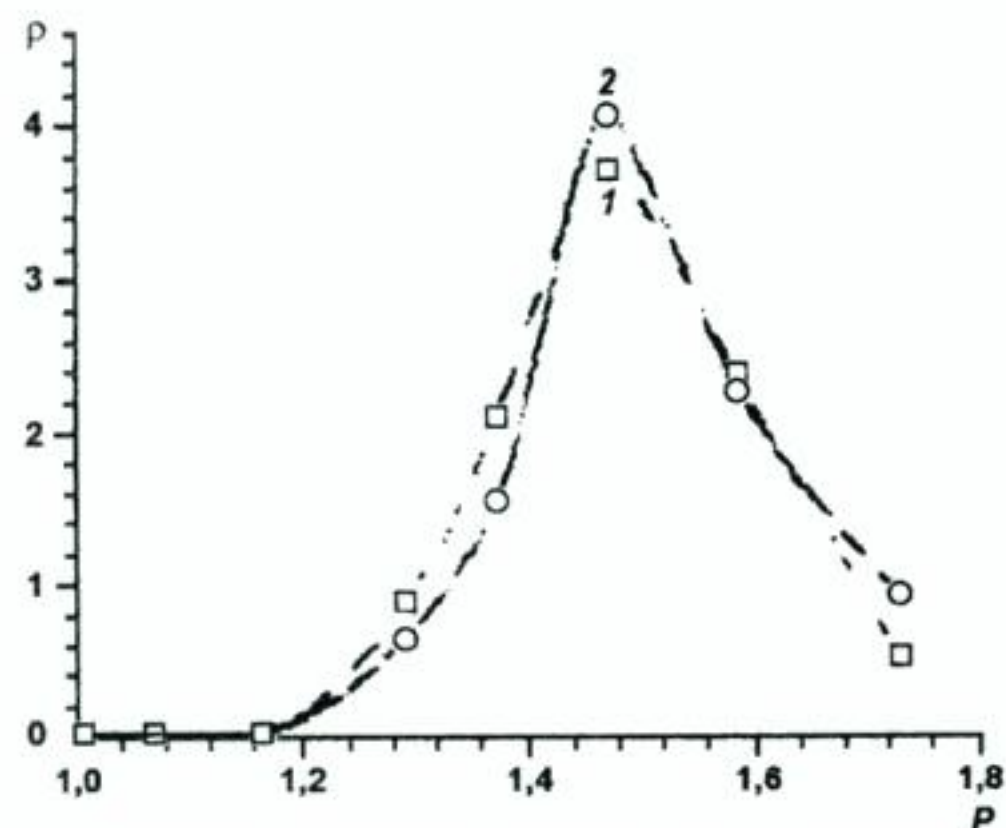


Рис. 4. Плотность вероятности распределения эритроцитов по индексу сферичности при 37 °C до (1) и после добавления перфторана с конечной концентрацией 10% (2).

Fig. 4. Probability density of erythrocyte distribution by sphericity index at 37 °C before (1) and after perfluorane adding with 10% final concentration (2).

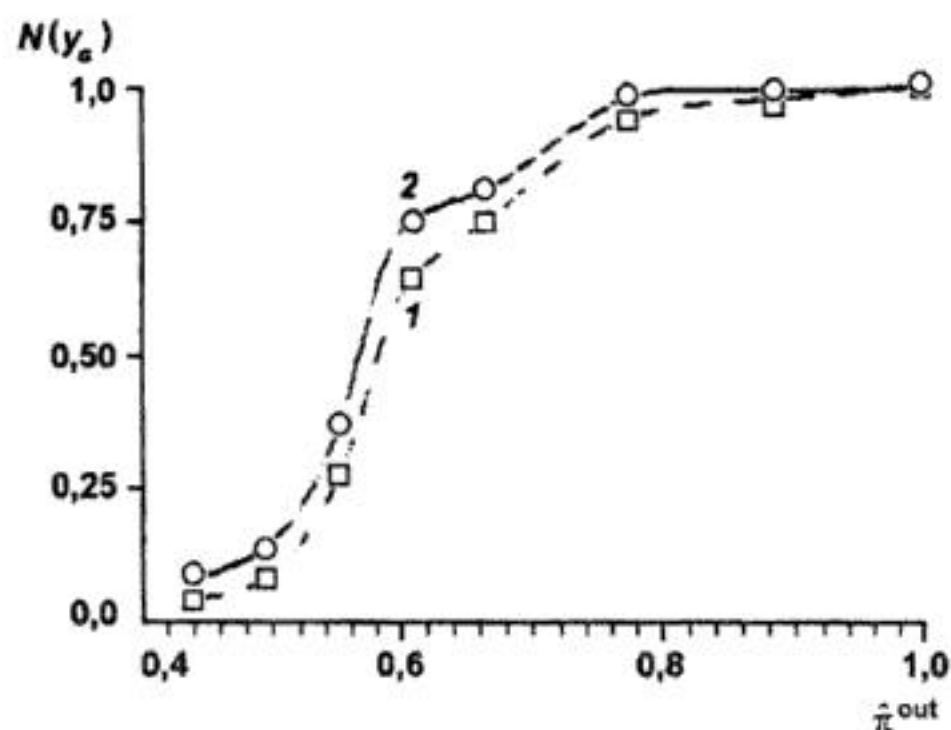


Рис. 5. Осмотическая хрупкость эритроцитов человека при 16 °С до (1) и после добавления перфторана с конечной концентрацией 10% (2).

Fig. 5. Osmotic fragility of human erythrocytes at 16 °C before (1) and after perftoran adding with 10% final concentration (2).

(4-метилциклогексил) пиперидина, который является умеренно липофильным. Этот компонент повышает устойчивость эмульсии и "гасит" реактивное действие F-декалина.

При температуре 3 °С наблюдается незначительное смещение интегральной кривой в сторону увеличения осмотической хрупкости (рис. 7). Дифференциальная кривая в координатах плотности распределения по индексу сферичности (рис. 8) имеет более сглаженную форму с меньшим значением максимума для индекса сферичности 1,48 и большим удельным весом клеток с меньшим индексом сферичности.

Такая разнонаправленность действия перфторана при температурах 37–15 и 3 °С может быть связана с тем, что при температурах 8–12 °С в мембранах эритроцитов происходит температурозависимый фазовый переход липидов. О наличии такого перехода свидетельствуют данные многих авторов [1], а также результаты наших исследований [8]. Возможно, более существенное изменение формы кри-

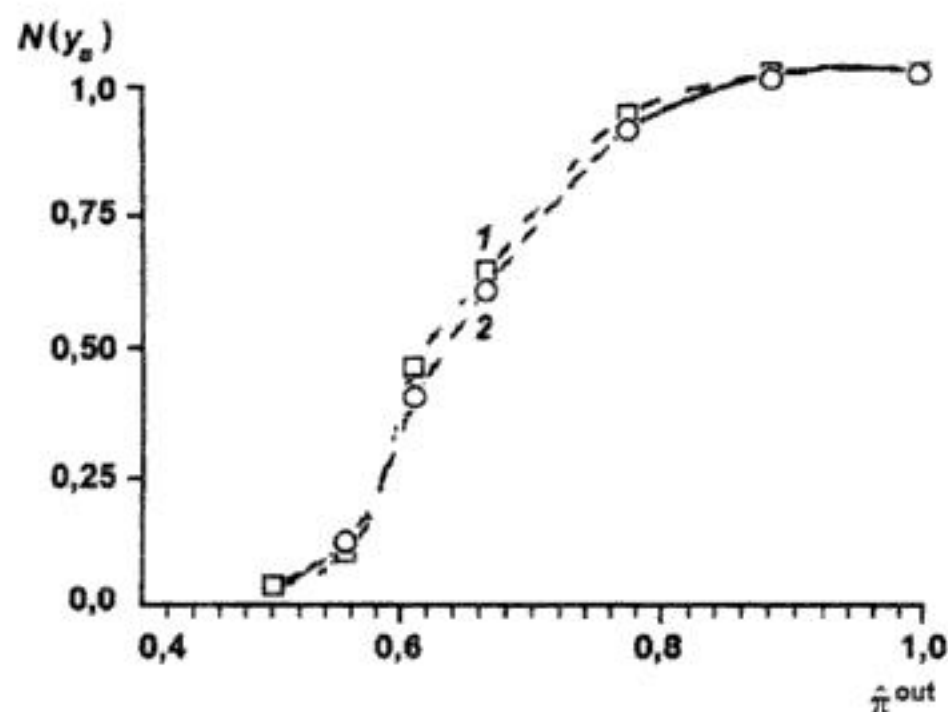


Рис. 7. Осмотическая хрупкость эритроцитов человека при 3 °С до (1) и после добавления перфторана с конечной концентрацией 10% (2).

Fig. 7. Osmotic fragility of human erythrocytes at 3 °C before (1) and after perftoran adding with 10% final concentration (2).

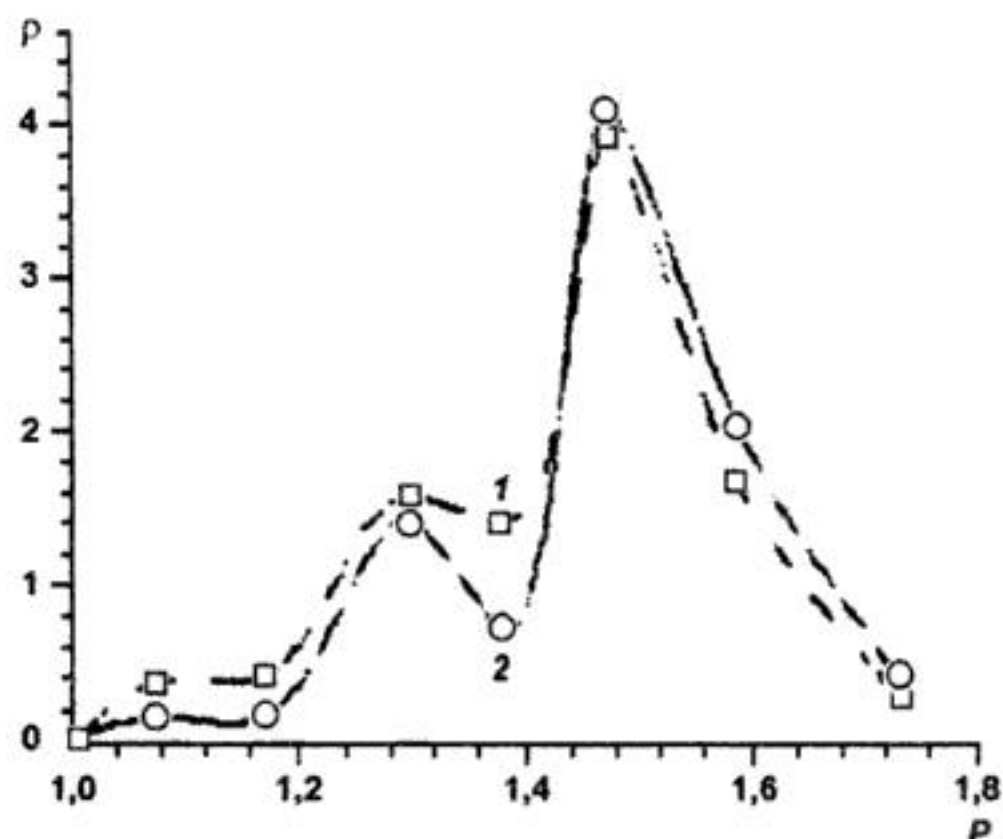


Рис. 6. Плотность вероятности распределения эритроцитов по индексу сферичности при 16 °С до (1) и после добавления перфторана с конечной концентрацией 10% (2).

Fig. 6. Probability density of erythrocyte distribution by sphericity index at 16 °C before (1) and after perftoran adding with 10% final concentration (2).

of maximum for sphericity index of 1.48 and a greater density of cells with less sphericity index.

Such difference of directions of perftoran effect under the temperatures of 37–15 and 3 °C can be related to the fact, that in erythrocyte membranes under the temperatures of 8–12 °C a temperature-dependent phase transition of lipid occurs. The presence of such a transition is testified by the data [1], as well as by the results of our investigations [8]. Probably, more significant change in the shape of density curve of erythrocyte distribution probability by sphericity index under 3 °C and some increase in osmotic fragility under this temperature are related to perfluorocarbons effect on the process of phase transition in erythrocyte membranes.

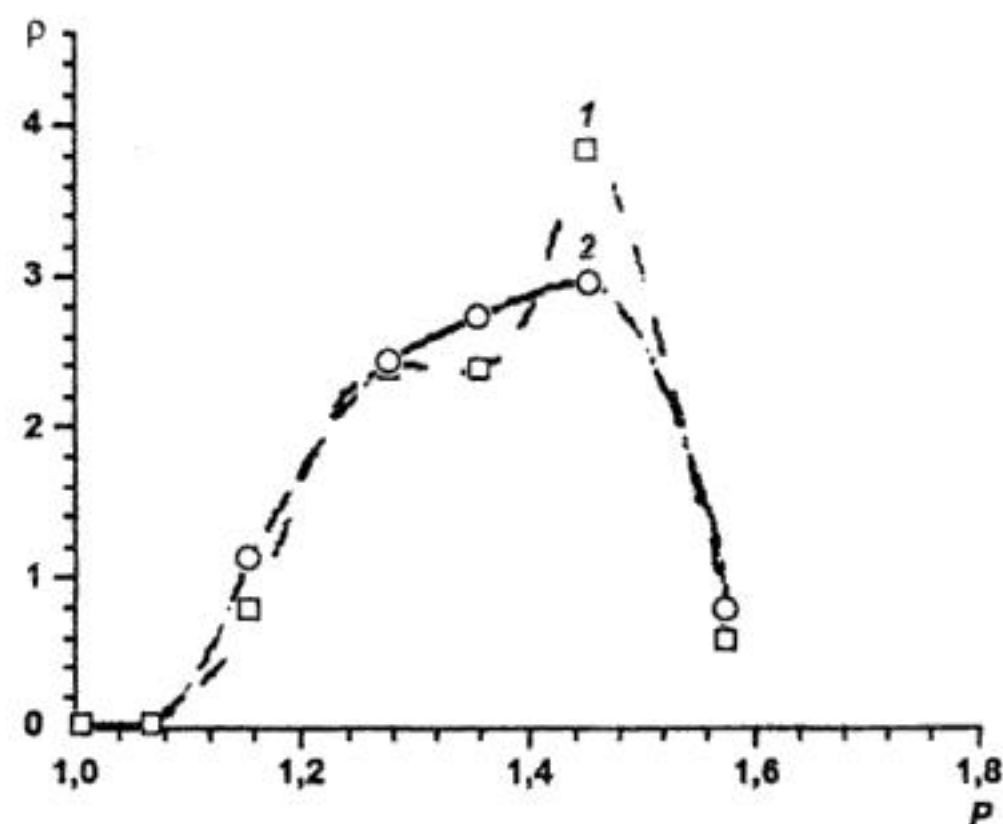


Рис. 8. Плотность вероятности распределения эритроцитов по индексу сферичности при 3 °С до (1) и после добавления перфторана с конечной концентрацией 10% (2).

Fig. 8. Probability density of erythrocyte distribution by sphericity index at 3 °C before (1) and after perftoran adding with 10% final concentration (2).

вой плотности вероятности распределения эритроцитов по индексу сферичности при 3 °С и некоторое увеличение осмотической хрупкости при этой температуре связаны с влиянием перфторуглеродов на процесс фазового перехода в мембранах эритроцитов.

В целом отличия, полученные при добавлении перфторана в суспензию эритроцитов, недостоверны из-за большого разброса данных для разных доноров. Также можно сделать вывод, что осмотические нагрузки, которым подвергаются клетки при определении осмотической хрупкости (таким нагрузкам они могут подвергаться и в течение цикла криоконсервирования), являются намного более сильным фактором, чем возможное стабилизирующее влияние перфторана на плазматические мембраны эритроцитов при его добавлении в кровь. В то же время охлаждение до околонулевых температур на фоне осмотических нагрузок остается достаточно сильным повреждающим фактором.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белоус А. М., Бондаренко В. А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. — Киев: Наук. думка, 1982. — 256 с.
2. Волжина Н. Г., Волжин А. О., Газимагомедова М. М. Физиологически активные вещества на основе перфторуглеродов в военной медицине. — СПб., 1997. — С. 19–20.
3. Вопросы биофизики, биохимии и патологии эритроцитов. — М.: Наука, 1967. — 352 с.
4. Воробей С. И., Иваницкий Г. Р., Ладилев Ю. В. и др. Модификация мембран клеток перфторуглеродами как возможный механизм уменьшения степени ишемического повреждения миокарда // ДАН СССР. — 1988. — 299, № 1. — С. 228–230.
5. Голубев А. М. Перфторан — плазмозаменитель с функцией транспорта кислорода // Бюл. эксперим. биол. и мед. — 1998. — 125, № 5. — С. 484–492.
6. Гордієнко Є. О., Гордієнко О. І., Коваленко І. Ф. та ін. Фізико-математичний аналіз та експериментальне вивчення щільності розподілу еритроцитів донорської і пуповинної крові людини за індексом сферичності // Вісн. Харк. ун-ту № 488, Біофіз. вісник. — 2000. — Вип. 1(6). — С. 75–78.
7. Гордієнко О. І., Коваленко І. Ф., Паніна Ю. Є. Фізико-математична модель та експериментальне вивчення явища гіпотонічного гемолізу // Доп. НАН України. — 1998. — № 11. — С. 173–176.
8. Гордієнко О. І., Емец Б. Г., Жиликова Т. А., Шейкин В. И. Температурная зависимость водной диффузионной проницаемости мембран эритроцитов в средах с различной ионной силой // Биол. мембраны. — 1985. — 2, № 3. — С. 310–314.
9. Давыдова Е. В., Новожилова А. П., Шилов В. В. и др. Физиологически активные вещества на основе перфторуглеродов в военной медицине. — СПб., 1997. — С. 30–31.
10. Иваницкий Г. Р. Биофизика на пороге нового тысячелетия: перфторуглеродные среды и газотранспортные кровезаменители // Рос. биомед. журн. — 2000. — № 12. — С. 1–30.
11. Кассирский И. А., Алексеев Г. А. Клиническая гематология. — М.: Медицина, 1970. — 800 с.

Поступила 26.06.2001

In the whole, the differences, obtained when adding perftoran in erythrocyte suspension are not statistically true due to a large spread of the data for different donors. We can conclude as well, that the osmotic loadings, to which the cells are subjected when determining an osmotic fragility (but they can be subjected to such loadings within the cycle of cryopreservation), are much more strong factor, than a possible stabilising perftoran effect on erythrocyte plasmatic membranes when adding it into blood. At the same time, cooling down to about zero temperatures at the background of osmotic loadings remains quite a strong damaging factor.

REFERENCES

1. Belous A. M., Bondarenko V. A. Structural changes in biological membranes at cooling. — Kiev: Nauk. dumka, 1982. — 256 p.
2. Volzhina N. G., Volzhin A. O., Gazimagomedova M. M. Physiologically active substances at the base of perftorcarbons in military medicine. — SPb., 1997. — P. 19–20.
3. Questions of biophysics, biochemistry and erythrocyte pathology. — M.: Nauka, 1967. — 352 p.
4. Vorobej S. I., Ivanitsky G. R., Ladilov Yu. V. et al. Cell membrane modification by perftorcarbons as a possible mechanism of the reduction of myocardium ishemical damage degree // DAN of USSR. — 1988. — 299, № 1. — P. 228–230.
5. Golubev A. M. Perftoran is plasm substitutor with oxygen transport function // Buleten' eksperimental'noj biologii i meditsiny. — 1998. — 125, № 5. — P. 484–492.
6. Gordienko E. A., Gordienko O. I., Kovalenko I. F., et al. Physical and mathematical analysis and experimental study of erythrocyte distribution density of donor and human cord blood by sphericity index // Visnyk Kharkivs'kogo Universytetu № 488, Biofizychnyj Visnyk. — 2000. — Issue 1 (6). — P. 75–78.
7. Gordienko O. I., Kovalenko I. F., Panina Yu. E. Physical and mathematical model and experimental study of hypotonic hemolysis phenomenon // Reports of the Nat. Acad. of Sci. of Ukraine. — 1998. — № 11. — P. 173–176.
8. Gordienko O. I., Emets B. G., Zhilyakova T. A., Shejkin V. I. Temperature dependence of aqueous diffusive permeability of erythrocyte membranes in the media with different ion strength // Biologicheskie membrany. — 1985. — 2, № 3. — P. 310–314.
9. Davydova E. V., Novozhilova A. P., Shilov V. V. et al. Physiologically active substances at the base of perfluorcarbons in military medicine. — SPb., 1997. — P. 30–31.
10. Ivanitsky G. R. Biophysics at the eve of new millenium: perfluorcarbon media and gas-transport blood substitutes // Rossijsky Biomeditsinsky Zhurnal. — 2000. — № 12. — P. 1–30.
11. Kassirsky I. A., Alekseyev G. A. Clinical hematology. — M.: Meditsina, 1970. — 800 p.

Accepted in 26.06.2001

Кардиорегуляторная функция гематоэнцефалического барьера при резонансной гипотермии

В. С. МАРЧЕНКО, В. Г. БАБИЙЧУК

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Cardioregulatory Function of Blood Brain Barrier under Resonance Hypothermia

V. S. MARCHENKO, V. G. BABIYCHUK

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

Делается вывод о целесообразности интеграции в современные концепции общего адаптационного синдрома положений о триггерных возможностях нейротрансмиттерных механизмов функционирования гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), поскольку от уровня его проницаемости зависят адаптивные реакции сердечно-сосудистой и центральной нервной систем на стрессоры разной модальности и интенсивности. Применение резонансной гипотермии (РГ) выявило диапазон адаптационных возможностей ГЭБ старых животных. Центральная нервная система 2-годовалых крыс теряет пластичность, не поддерживает верхний диапазон воздействий в секундном ритме, поэтому для снижения как резистентности ГЭБ, так и гипертензии наиболее эффективна РГ с частотой 0,05 Гц.

Робиться висновок про доцільність інтеграції в сучасні концепції загального адаптаційного синдрому положень про тригерні можливості нейротрансмітерних механізмів функціонування гематоенцефалічного бар'єра (ГЕБ), оскільки від рівня його проникності залежать адаптивні реакції серцево-судинної і центральної нервової систем на стресори різної модальності й інтенсивності. Застосування резонансної гіпотермії (РГ) виявило діапазон адаптаційних можливостей ГЕБ старих тварин. Центральна нервова система 2-річних щурів втрачає пластичність, не підтримує верхній діапазон впливів у секундному ритмі, тому для зниження як резистентності ГЕБ, так і гіпертензії найбільш ефективна РГ із частотою 0,05 Гц.

The authors conclude on the expediency of integration into modern concepts of general adaptation syndrome the notions about trigger possibilities of neurotransmitter mechanisms of blood brain barrier (BBB), because on the level of its permeability depend adaptive reactions of cardio-vascular and central nervous system on stressors of different modality and intensity. Application of resonance hypothermia (RH) revealed the range of adaptation capabilities of BBB of old animals. Central nerve system of two-years' rats lose the plasticity, does not support an upper range of effects in second rhythm, so for reducing both BBB resistance and hypertension the most efficient is RH with 0.05 Hz frequency.

В настоящее время не вызывает сомнений тот факт, что при стрессах разного генеза существенно повышается проницаемость ГЭБ [2, 13–15]. Поэтому оправданно ввести в современные концепции общего адаптационного синдрома [16] представления о функциональной активности ГЭБ. При некоторых состояниях организма свойства барьера изменяются настолько, что повышается его проницаемость для многих биологически активных веществ [1, 2, 6, 13]. Это может привести к изменению постоянства внутренней среды мозга, вызвать компенсаторные реакции организма в системах кровообращения, дыхания, терморегуляции и т.п. В этой связи для коррекции патологического напряжения функциональных систем организма можно использовать явления перекрестной адаптации к стрессорам разной модальности и интенсивности. Такого рода проблемы удобно изучать на сердечно-сосудистой системе (ССС) при гипотермии, полагая, что различные программы охлаждения могут стимулировать разные симпато-парасимпатические взаимодействия [1, 6, 7, 11]. В последние годы успешно развиваются новые терапевтические методы лечения, направленные на активацию собствен-

Nowadays the fact is of no doubt that under stresses of different genesis the permeability of BBB increases [2, 13–15]. So, it is expedient to include into modern concepts of general adaptation syndrome [16] the notions about functional activity of BBB. Under some states of an organism the barrier properties changes in such a way, that its permeability increases for many biologically active substances [1, 2, 6, 13]. This can lead to the change in the constant state of brain inner medium, cause compensatory reactions of an organism in the systems of blood circulation, respiration, thermoregulation etc. In this connection for regulating pathological tension of functional systems of an organism one can use the phenomena of crossed adaptation to stressors of different modality and intensity. It is convenient to investigate these problems in cardio-vascular system (CVS) under hypothermia, when assuming, that various cooling programmes can stimulate different sympatho-parasympathetic interactions [1, 6, 7, 11]. Recently new therapeutic methods of treatment, directed to the activation of own protective systems of an organism are under successful

ных защитных систем организма [1, 6]. К ним относится так называемая резонансная терапия, использующая с лечебной целью различные виды сенсорной стимуляции с точно подобранными частотными параметрами, соответствующими индивидуальным ЭЭГ-осцилляторам [6, 10, 12]. Лечебная гипотермия с учетом индивидуальных особенностей секундной биоэлектрической активности головного мозга может оказаться эффективным методом стимуляции нервной и ССС организма при повышении функциональной активности ГЭБ [1, 6, 12]. Этот метод является наиболее актуальным при коррекции нарушений ССС старого организма, когда собственные регуляторные системы теряют пластичность, а уровень компенсаторных механизмов весьма индивидуален.

Цель работы — определить роль уровня проницаемости ГЭБ для норадреналина (НА) и ацетилхолина (АХ) в кардиорегуляторном, гипотензивном действии РГ.

Эксперименты проводились на 12- и 24-месячных белых крысах. Были выбраны и использованы: рефлексогенная модель гипертонии (эмоционально-болевой стресс, усиленный периодической иммобилизацией), РГ с частотами доминирующих диапазонов сверхмедленных биотоков [4, 6];

вариационная пульсография (100–500 кардиоинтервалов) и спектрально-корреляционный анализ ЭКГ и ЭЭГ (30–100 с реализации) [1, 2].

В качестве индикатора адаптационных реакций организма на эмоционально-болевой стресс (ЭБС) использовали следующие физиологически значимые показатели частоты сердечных сокращений (ЧСС): мода M_o , амплитуда моды AM_o , вариационный размах ΔX , индекс напряжения регуляторных систем $ИН = AM_o / 2\Delta X M_o$, индекс вегетативного равновесия $ИВР = AM_o / \Delta X$, вегетативный показатель ритма $ВПР = 1 / M_o \Delta X$; I_k — второе значение функции автокорреляции; m_0 — аргумент первого отрицательного значения функции автокорреляции; медленные волны первого порядка S_m ; медленные волны второго порядка S_0 .

В нашем случае M_o указывает на наиболее вероятный уровень функционирования синусового узла системы кровообращения, в основном гуморальный путь регуляции. Показатель AM_o отражает мобилизующий эффект централизации управления ритмом сердца, обусловленном влиянием симпатического отдела вегетативной нервной системы. Показатель ΔX связан с активностью парасимпатической нервной системы (влияние блуждающих нервов на дыхательные изменения сердечного ритма обычно преобладает над недыхательными). Следует учитывать, что при повышении амплитуды медленных волн ΔX будет зависеть от состояния подкорковых нервных центров больше, чем от тонуса парасимпатической нервной системы. Показатель $ИВР$ указывает на соотношение активности симпатического и парасимпатического отделов

организма при успешном развитии [1, 6]. So-called resonance therapy, using with the aim of treatment different types of sensor stimulation with accurately selected frequency parameters, corresponding to individual EEG-oscillators [6, 10, 12] is referred to them.

Therapeutic hypothermia with the account of individual peculiarities of a second bioelectrical activity of brain can occur to be an efficient method of stimulation of nervous and CVS of an organism at the increase in functional activity of BBB [1, 6, 12]. This method is the most actual under the correction of disorders of CVS of an old organism when own regulatory systems lose the plasticity and the level of compensatory mechanisms are quite individual.

The aim of work is to determine the role of the level of BBB permeability for noradrenaline (NA) and acetyl choline (ACh) in cardioregulatory, hypotensive effect of RH.

Experiments were carried-out in 12 and 24-months white rats. We have chosen and used the following ways:

reflexogenic model of hypertension (emotional-pain stress, strengthened by periodic immobilisation), RH with the frequencies of dominating ranges of ultraslow biocurrents [4, 6];

variation pulsography (100–500 cardiointervals) and spectral-correlation analysis of ECG and EEG (30–100 realisation seconds) [1, 2].

As an indicator of adaptation reactions of an organism on emotional-pain stress (EPS) we used the following physiologically significant indices of the frequency of cardiac contractions (FCC); mode (M_o); mode amplitude (AM_o); variation swing (ΔX); tension index of regulatory systems ($TI = AM_o / 2\Delta X M_o$), index of vegetative balance ($IVB = AM_o / \Delta X$); vegetative index of rhythm ($VIR = 1 / M_o \Delta X$); I_k — the second value of the autocorrelation function; m_0 — argument of the first negative value of the autocorrelation function; slow waves of the first order (S_m); slow waves of the second order (S_0).

In our case M_o points to the most probable level of functioning of sinus node of blood circulation mainly humoral way of regulation. The AM_o index reflects mobilising effect of centralisation of the control by heart rhythm, stimulated by the effect of sympathetic compartment of vegetative nervous system. The ΔX index is related to the activity of parasympathetic nervous system (the effect of vagus nerves on respiratory changes in cardiac rhythm usually prevail in comparison with non-respiratory). It should be taken into account that when increasing the amplitude of slow waves ΔX will depend on the state of subcortex nerve centres in a greater extent than on the tonus of parasympathetic nervous system. The

ЦНС; ИН отражает степень напряжения централизации управления сердечным ритмом [1, 2].

Эти параметры мы дополнили рядом показателей спектрально-корреляционного анализа сверхмедленной биоэлектрической активности, что позволило непосредственно судить об активности корко-подкорковых взаимоотношений в динамике стресса. Кроме того, было изучено состояние важнейшего звена системы обратных связей — активность ГЭБ, проницаемость которого оценивалась радиоизотопным методом [1, 6].

По исходным показателям ЧСС различали животных с преобладанием тонуса парасимпатической и симпатической нервной систем, с равновесием вегетативного гомеостаза. Крыс, переживших трехнедельный ЭБС, разделили на 3 группы: 1) погибли в течение 1–3 сут после воздействий; 2) тяжелое состояние (адинамичные, легковозбудимые, с повышенной судорожной готовностью); 3) удовлетворительное состояние.

Животные 3-й группы в исходном состоянии отличались слабым напряжением регуляторных механизмов, сдвигом вегетативного гомеостаза в парасимпатическую сторону, более низким тоном нервного канала регуляции и значительно увеличенным вариационным размахом. На 21-е сутки стресса наблюдались достоверный сдвиг вегетативного гомеостаза в симпатическую сторону и повышение тонуса регуляторных механизмов в основном за счет уменьшения ΔX .

Крысы 2-й группы в исходном состоянии характеризовались равновесием вегетативного гомеостаза, средним напряжением регуляторных механизмов, средними значениями AMo , ΔX . На 21-е сутки стресса у животных этой группы также наблюдались выраженный сдвиг вегетативного гомеостаза в симпатическую сторону и значительное повышение напряжения регуляторных механизмов.

У крыс 1-й группы с наиболее выраженным напряжением регуляторных механизмов и значительным преобладанием тонуса симпатической нервной системы в исходном состоянии на 21-е сутки стрессового воздействия показатели статистического анализа сердечного ритма существенно не менялись, отмечалось лишь некоторое повышение тонуса симпатической нервной системы и напряжения регуляторных механизмов.

В динамике развития ЭБС по статистическим показателям кардиоинтервалов не было выявлено существенных возрастных отличий (табл. 1, 2).

На основании анализа результатов проведенных исследований можно заключить, что животные, обладающие в исходном состоянии высоким напряжением регуляторных механизмов, повышенным тоном симпатической нервной системы, наиболее устойчивы к относительно кратковременным экстремальным ЭБС и наименее устойчивы к более длительным стрессовым воздействиям. Крысы, в исходном состоянии имеющие низкое напряжение

index IVB points to the ratio of the activity of sympathetic and parasympathetic compartments of CNS; TI reflects the degree of tension of the centralisation of the control under cardiac rhythm [1, 2].

These parameters were added by us with some indices of spectral and correlation analysis of ultraslow bioelectrical activity, that enabled to directly judge about the activity of cortex-subcortex relationship in the stress dynamics. Besides, we studied the state of the most important link of the system of reversible bonds — the activity of BBB, permeability of which was estimated by radioisotope method [1, 6].

On initial indices the FCC the animals were different with the prevailing of the tonus of parasympathetic and sympathetic nervous system with the balance of vegetative homeostasis. The rats survived 3-weeks EPS were divided into 3 groups: 1) died within 3 days after the effect; 2) severe state (adynamic, easily excited, with an increased spastic readiness); 3) in satisfactory state.

Animals of the third group in initial state differed by a slight tension of regulatory mechanisms, shift of vegetative homeostasis into parasympathetic side, lower tonus of nerve channel of regulation and significantly increased variation swing. To the 21st day of stress there was a statistically considerable shift of vegetative homeostasis to sympathetic side and an increase in the tonus regulatory mechanisms, mainly due to the reduction of ΔX .

Rats of the 2nd group in initial state were characterised by the balance of vegetative homeostasis, an average tension of regulatory mechanisms, average values of AMo , ΔX . To the 21st day of stress in animals of this group a manifested shift of vegetative homeostasis to sympathetic side and considerable rise in tension of regulatory mechanisms was also observed.

In the rats of the first group with the most manifested tension of regulatory mechanisms and significant predomination of the tonus of sympathetic nervous system in initial state to the 21st day of stress effect of the indices of statistical analysis of cardiac rhythm did not significantly change, just an increase in the tonus of sympathetic nervous system and tension of regulatory mechanisms were noted.

In the dynamics of the development of EPS on statistical indices of cardiointervals no considerable age differences were found (Tables 1, 2).

On the basis of the analysis of results of performed investigations one can conclude, that the animals in an initial state with a high tension of regulatory mechanisms, increased tonus of sympathetic nervous system are the most resistant to relatively short-term extreme EPS and the least resistant to more prolonged stress effects. The rats in an initial state having a low tension of regulatory mechanisms and increased tonus

Таблица 1

Статистические показатели динамического ряда кардиоинтервалов у 12-месячных крыс с разной устойчивостью к стрессу

Statistical indices of dynamic row of cardiointervals in 12-months rats with different resistance to stress

Группа Group	Mo		AMo		ΔX		ИБР IVB		ИН TI	
	Контроль Control	21-е сутки The 21st day	Контроль Control	21-е сутки The 21st day	Контроль Control	21-е сутки The 21st day	Контроль Control	21-е сутки The 21st day	Контроль Control	21-е сутки The 21st day
1	120 ± 2	123 ± 3	33,5 ± 3	32 ± 4	6 ± 1	6,5 ± 0,5	5,2 ± 0,5	5,5 ± 1	(20 ± 2) · 10 ⁻³	0,02 ± 0,001
2	122 ± 3	121 ± 3	23,4 ± 2,1	31 ± 4*	7 ± 1,5	6,5 ± 0,7	3 ± 0,3	5,3 ± 0,8*	(10 ± 1) · 10 ⁻³	0,02 ± 0,001*
3	121 ± 5	128 ± 5	15,5 ± 1,4	21 ± 3*	10 ± 2	8,9 ± 1	1,3 ± 0,3	3 ± 0,5*	(5 ± 0,01) · 10 ⁻³	0,01 ± 0,001*

Примечание. * — различия по сравнению с контрольными значениями достоверны (P < 0,05).

Note. * — differences in comparison with the control values are significantly true (P < 0.05).

Таблица 2

Статистические показатели динамического ряда кардиоинтервалов у 24-месячных крыс с разной устойчивостью к стрессу

Statistical indices of dynamic row of cardiointervals in 24-months rats with different resistance to stress

Группа Group	Mo		AMo		ΔX		ИБР IVB		ИН TI	
	Контроль Control	21-е сутки The 21st day	Контроль Control	21-е сутки The 21st day	Контроль Control	21-е сутки The 21st day	Контроль Control	21-е сутки The 21st day	Контроль Control	21-е сутки The 21st day
1	121 ± 1	122 ± 2	33,1 ± 3	31 ± 3	7 ± 1	6,3 ± 0,4	5,4 ± 0,3	5,6 ± 1	(20 ± 4) · 10 ⁻³	0,02 ± 0,001
2	123 ± 2	120 ± 3	23,2 ± 2,2	30 ± 2*	6 ± 1,8	6,6 ± 0,5	3 ± 0,1	5,1 ± 0,7*	(10 ± 2) · 10 ⁻³	0,02 ± 0,001*
3	122 ± 3	126 ± 3	14,5 ± 1,1	20 ± 2*	9 ± 2	8,7 ± 1,2	1,4 ± 0,2	3 ± 0,4*	(5 ± 0,02) · 10 ⁻³	0,01 ± 0,001*

Примечание. * — различия по сравнению с контрольными значениями достоверны (P < 0,05).

Note. * — differences in comparison with the control values are significantly true (P < 0.05).

регуляторных механизмов и повышенный тонус парасимпатической нервной системы, наименее устойчивы на первых этапах стресса, но выживают при длительном ЭБС. Крысы с равновесием вегетативного гомеостаза и средним напряжением регуляторных механизмов в исходном состоянии характеризуются средней устойчивостью на всех стадиях ЭБС.

Тем не менее у крыс всех групп к 21-м суткам ЭБС формировалась устойчивая артериальная гипертензия, причем значительное повышение кровяного давления сохранялось, по крайней мере, 3 недели после окончания воздействий.

Таким образом, в условиях длительного ЭБС при напряжении механизмов адаптации включение в процесс управления более высоких уровней приводит к значительной централизации управления и соответствующим изменениям ИН, увеличению AMo, m_0 , S_0 , уменьшению Mo, ΔX , S_m . Процессы адаптации и лабилизации, возникающие в системе управления, ведут к повышению активности подкорковых центров, участвующих в регуляции ритма сердца. Результатом перенапряжения нервных центров является иррадиация возбуждения на соседние центры, в том числе активация нижележащих уровней управления. При этом наблюдаются однонаправленные изменения регуляторных показателей, повышается тонус симпатического и парасимпатического отделов автономной нервной системы. У крайне неустойчивых к ЭБС и погибших животных отмечались дискоординированные

of parasympathetic nervous system, the least resistant at the first stages of stress, survive under long-term EPS. The rats with the balance of vegetative homeostasis and average tension of regulatory mechanisms in an initial state are characterised with an average resistance at all the stages of EPS.

Nevertheless in the rats of all groups to the 21st day of EPS a stable arterial hypertension was formed, meanwhile a significant rise in blood pressure was kept at least during 3 weeks after effect ceasing.

Thus under conditions of long-term EPS under the tension of mechanisms of adaptation the inclusion to the control process of higher levels results in a significant centralisation of the control and corresponding changes in TI, increase in AMo, m_0 , S_0 , reduction of Mo, ΔX , S_m . Adaptation and labilisation processes appearing in the control system, lead to an increase of the activity of subcortex centres, participating in the regulation of heart rhythm. The result of overtension of nerve centres is irradiation of excitation to the neighbouring centres, including the activation of lower located levels of the control. In this case one-directed changes in regulatory indices are observed, the tonus of sympathetic and parasympathetic compartments of autonomous nervous system increases. In very non-resistant to EPS and died animals there were found a discoordinated changes in the indices (e.g. Mo increase with the reduction in ΔX or simultaneous

изменения показателей (например, увеличение Mo при уменьшении ΔX или одновременное повышение медленных и дыхательных волн сердечного ритма), указывающие на неудовлетворительную адаптацию. Можно сделать вывод, что процессы адаптации к ЭБС зависят не только от функционального резерва организма, но и от активности стратегических механизмов регуляции. К последним, безусловно, относится и ГЭБ как структурно-функциональная основа медленной управляющей системы организма [1, 6].

Усреднение по всем группам животных показывает, что гипертензия, вызванная ЭБС, сопровождается следующими изменениями биоэлектрических показателей ЭКГ и ЭЭГ. Преобладает симпатическая регуляция сердечного ритма, что выражается в уменьшении моды распределения сердечных интервалов, повышении AMo , увеличении ИВР, ВПР, ИН. Наряду с этим, отмечалось нарушение формы кривой распределения. Она была асимметричной с преобладанием уменьшенных интервалов RR, что свидетельствовало о наличии переходных процессов все более выраженной тахикардии. При изучении формы кривых распределения выяснилось, что большинство из них резко отличается от нормального распределения случайных величин, характерного для интактных животных в покое. Автокорреляционный анализ рядов кардиоинтервалов гипертензивных крыс продемонстрировал крутой спад автокорреляционной функции, характеризующий слабую организацию ряда, преобладание автономного контура регуляции сердечного ритма (рис. 1). При спектральном анализе отмечается значительное уменьшение энергии волн с большим периодом, характеризующее резкую депрессию высших уровней регуляции кровообращения. Интересно, что биоэлектрическая активность головного мозга животных этой экспериментальной группы, наряду с типичными стресс-изменениями (депрессия основной ритмики, нарушение процессов пространственной синхронизации,

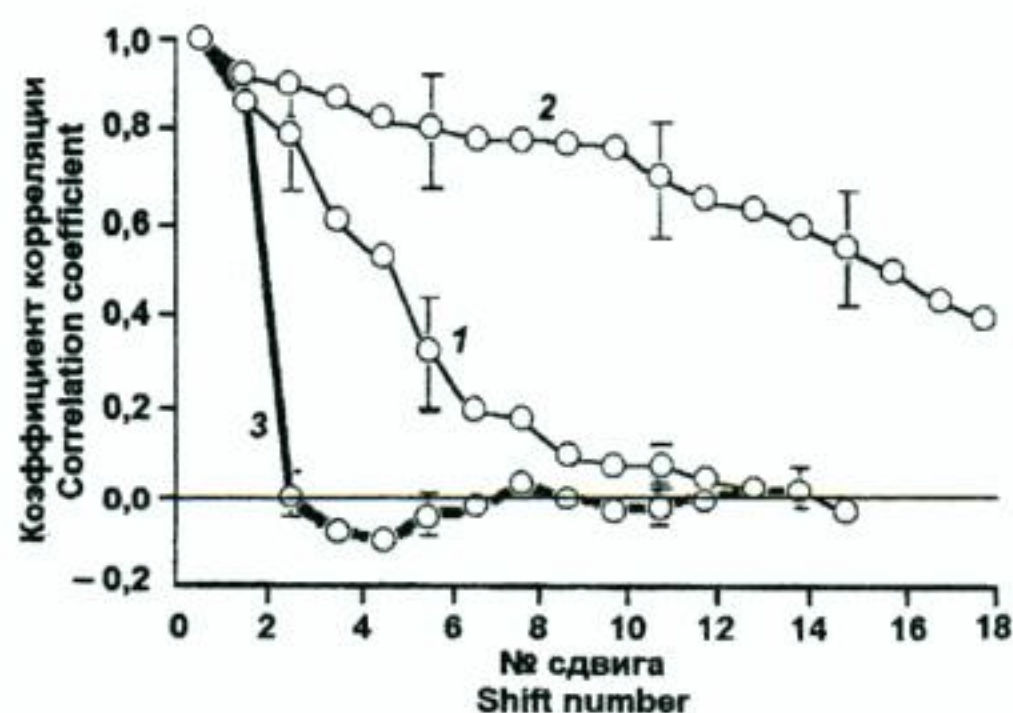


Рис. 1. Автокорреляционные функции динамического ряда значений продолжительности сердечного цикла при ЭБС.

Fig. 1. Autocorrelational functions of dynamic row of values of cardiac cycle duration at EPS.

increase in slow and respiratory waves of cardiac rhythm), pointing to unsatisfactory adaptation. One can conclude, that adaptation processes to EPS depend not only on functional reserve of an organism, but also on the activity of strategic regulation mechanisms. To the latter, for sure, BBB is referred as structural and functional base of slow controlling system of an organism [1, 6].

An averaging on all groups of animals shows, that hypertension, caused by EPS is accompanied by following changes in bioelectrical indices of ECG and EEG. The predomination of sympathetic regulation of cardiac rhythm, that is manifested in a reduction of the mode of distribution of cardiac intervals, a rise in AMo , increase in IVB, VIR and TI. Along with this there was a disorder in the shape of distribution curve. It was asymmetric with prevailing of decreased intervals of RR, that testified to the presence of transition processes of more and more manifested tachycardia. When studying the shape of distribution curves it was revealed, that the majority of them sharply differed from normal distribution of random values, characteristic for intact animals in a rest. Autocorrelation analysis of rows of cardiointervals of hypertensive rats demonstrated a drastic drop of autocorrelation function, characterising a weak organisation of the row, predomination of autonomous contour of cardiac rhythm regulation (Fig. 1). Under spectral analysis a significant reduction in energy of waves with a big period, characterising a sharp depression of higher levels of blood circulation regulation. It is interesting that bioelectrical activity of brain of the animals of this experimental group together with typical stress-changes (depression of main rhythmic, disorder of the processes of spatial synchronisation, episodes of paroxysmal activity etc.) was characterised with similar to ECG dynamics of spectral and correlation indices (Fig. 2).

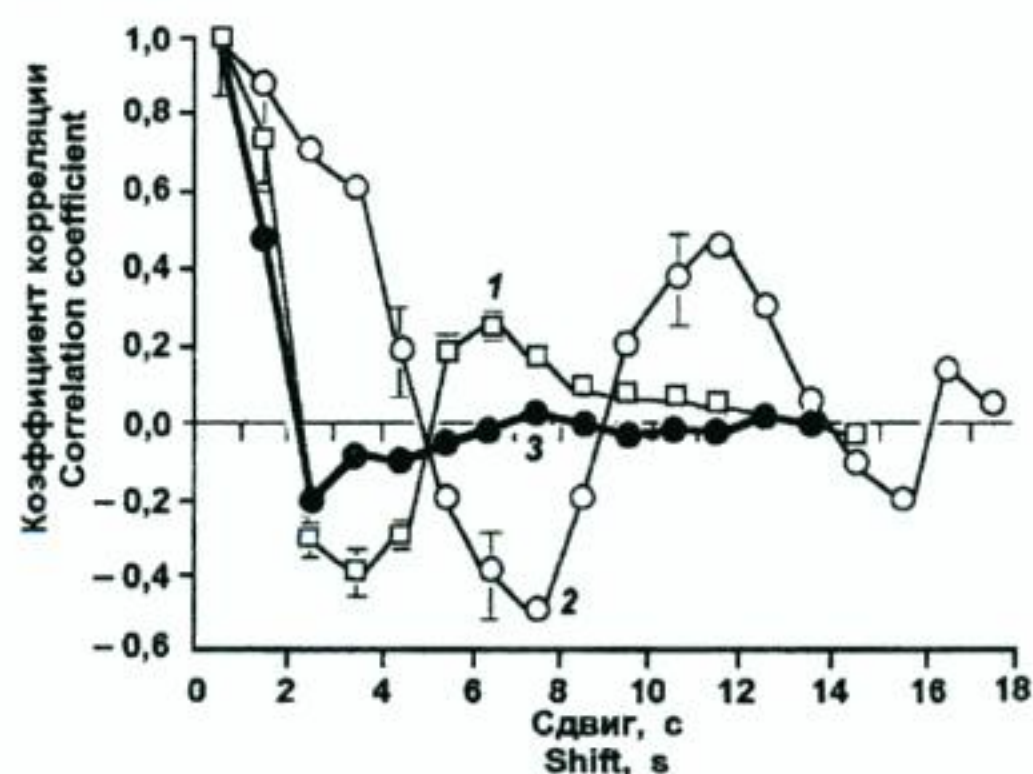


Рис. 2. Автокоррелограммы секундного ритма сверхмедленной биоэлектрической активности при ЭБС.

Fig. 2. Autocorrelogrammes of second rhythm of ultraslow bioelectrical activity at EPS.

эпизоды пароксизмальной активности и т.п.), характеризовалась динамикой спектрально-корреляционных показателей (рис. 2), сходной с ЭКГ.

По всей видимости, прогрессивно развивались процессы по типу эффекта Баркрофта (снижение variability параметров, характеризующих состояние физиологических функций) [10]. Этому способствовало не столько выраженное повышение проницаемости ГЭБ для НА и АХ (рис. 3, 4), сколько резкое нарушение ее динамики (синфазность поступления в мозг). Феномены такого рода неизбежно приводили к срыву адаптационных возможностей ССС, к стойкой гипертензии (> 200 мм рт.ст.), частой гибели животных (до 50%).

Роль ГЭБ в реализации общего адаптационного синдрома отметили Л. С. Штерн, Г. Н. Кассиль и Я. А. Росин [5, 9, 13]. По [5] стрессор возбуждает кору и лимбико-ретикулярную систему, что приводит к высвобождению НА, который, действуя на адренореактивные элементы ретикулярной формации, повышает тонус симпатических центров, активизируя симпатико-адреналовую систему. Это ведет к усилению синтеза НА в мозговом слое надпочечников и увеличению его содержания в крови. При высокой реактивности гормонального звена симпатико-адреналовой системы катехоламин (КА) проходит через ГЭБ, поступает в адренореактивные элементы заднего отдела гипоталамуса, активирует образование адренокортикотропного гормона, что приводит к выбросу в кровь кортикостероидов. Ряд веществ, связывая кортикостероиды, не позволяют им проникать через ГЭБ и нарушают обратную связь, что может привести к истощению системы гипоталамус–гипофиз–кора надпочечников при стрессовых воздействиях.

Наши данные подтверждают большое значение ГЭБ в развитии стресса. Результаты экспериментов согласуются с концепцией о “вегетативном гуморальном рефлекс” [9]. Такие рефлекс подобны нервным только по аналогии и состоят: а) из рецептора (образование метаболита медиатора); б) центростремительного пути (циркуляция медиатора в артериальной крови); в) центрального механизма (прохождение метаболита медиатора через ГЭБ); г) центробежного пути (может быть и нервным, и нейрогуморальным). При этом восстановление исходного состояния физиологического процесса после стрессовых воздействий рассматривается как качественно новое состояние. Движение всего регуляторного процесса совершается по своеобразным спиральям, а не по кругу. Наши данные экспериментально подтвержда-

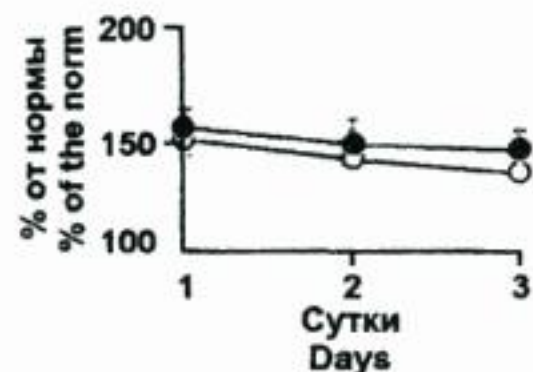


Рис. 3. Проницаемость ГЭБ 12-месячных крыс после ЭПС.

Fig. 3. BBB permeability of 12-months rats after EPS.

ние исходного состояния физиологического процесса после стрессовых воздействий рассматривается как качественно новое состояние. Движение всего регуляторного процесса совершается по своеобразным спиральям, а не по кругу. Наши данные экспериментально подтвержда-

Probably, the processes on the type of the Barcroft's effect (reduction of variability of the parameters, characterising the state of physiological functions) progressively developed [10]. A sharp impairment in its dynamics (phase coincidence of entering the brain) rather than manifested increase in BBB permeability for NA and ACh (Fig. 3, 4) contributed to this. Phenomena of this type inevitably resulted in the failure of adaptation possibilities of CVS to a resistant hypertension (> 200 mm of mercury column), frequent death of animals (up to 50%).

BBB role in realisation of general adaptation syndrome was noted by L. S. Shtern, G. N. Kassil and Ya. A. Rosin [5, 9, 13]. According the paper [5] the stressor excites the cortex and limbic-reticular system, that results in NA release, which affecting adreno-reactive elements of reticular formation, increases the tonus of sympathetic centres, by activating sympathetic-adrenal system. This leads to the strengthening of NA synthesis in brain layer of adrenal glands and increase in its content in blood. Under high reactivity of hormonal link of sympathetic-adrenal system the catechol amine (CA) passes the BBB, enters to adreno-reactive elements of posterior part of hypothalamus, activates the formation of adrenocorticotrophic hormone, that results in the release to the blood of corticosteroids. Some substances by binding corticosteroids do not permit them to penetrate through BBB and impair a reverse connection, that may lead to the exhaustion of the hypothalamus–adrenal cortex system under stress effects.

Our data confirm a great value of BBB in the development of stress. The results of experiments are in the accordance with the concept about “vegetative humoral reflex” [9]. Such reflexes are similar to nerve ones only on analogy and consist of: a) receptor (formation of mediator metabolite); b) centripetal way (circulation of mediator in arterial blood); c) central mechanism (passing of mediator metabolite through BBB); d) centrifugal way (can be both nerve and neurohumoral). In this case the recovery of initial state of physiological process after stress effects is considered as qualitatively new state. Movement of the whole regulatory process occurs along the certain helixes but not along the circle. Our data experimentally confirm the thoughts of Ya. A. Rosin about the fact, that physiological process, characterising with an increase in the tonus of sympathetic nerve system via some regulatory mechanisms (nerve and

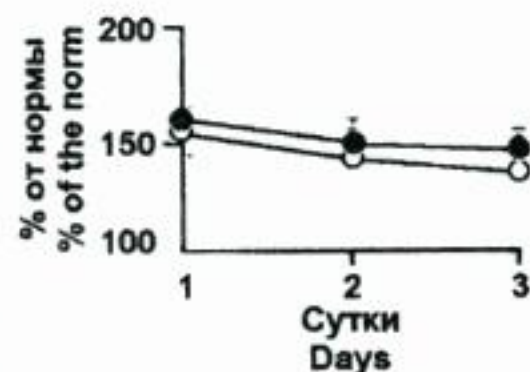


Рис. 4. Проницаемость ГЭБ 24-месячных крыс после ЭПС.

Fig. 4. BBB permeability of 24-months rats after EPS.

ют представления Я. А. Росина о том, что физиологический процесс, характеризующийся повышением тонуса симпатической нервной системы через ряд регуляторных механизмов (нервных и гуморальных), заменяется противоположным состоянием — активацией парасимпатических центров [9]. Можно выделить три линии функциональных систем нейрогуморальной регуляции вегетативных процессов: 1) взаимодействие между симпатическим и парасимпатическим отделами нервной системы; 2) обратная связь, в основе которой находится функция ГЭБ (регуляция проницаемости для холиномиметиков, адреномиметиков и других биоактивных веществ, которые переключают активацию одного отдела вегетативной нервной системы на другой); 3) обратная нервная связь как функция сосудистых рефлексогенных зон и интерорецепторов [9].

Опираясь на приведенные выше концепции, можно уточнить и конкретизировать простейшую двухконтурную модель [2] регуляции активности ССС при стрессорных воздействиях (рис. 5). При максимальном упрощении сложнейшую систему нейрогуморальной и гормональной регуляции ритма сердца, которая а priori является многоконтурной, в первом приближении можно представить в виде всего двух контуров: центрального и автономного. Центральный контур состоит из уровней А, Б и В, а автономный — из синусового узла, который непосредственно связан с ССС и через нее с системой дыхания и нервными центрами, обеспечивающими рефлекторную регуляцию кровообращения.

humoral) is replaced by opposite state — activation of parasympathetic centres [9]. One can define three lines of functional systems of neurohumoral regulation of vegetative processes: 1) interaction between sympathetic and parasympathetic compartments of nervous systems; 2) reverse connection in the base of which is BBB function (permeability regulation for cholinomimetics, adrenomimetics and other bioactive substances, which switch the activation of one compartment of nervous system to another); 3) reverse nerve connection as the function of vascular reflexogenic zones and interoceptors [9].

Proceeding from the mentioned above concepts one can elucidate and make clear the simplest two-contour model [2] of the regulation of CVS activity under stressor effects (Fig. 5). During maximum simplifying the most complicated system of neurohumoral and hormonal regulation of heart rhythm, which a priori is multicontour, in the first approach can be presented in just two contours: central and autonomous. Central contour consists of the levels A, B, C and autonomous does of sinus node, which directly connected to CVS via it with respiration system and nerve centres, providing reflector regulation of blood circulation.

The contour itself of autonomous regulation is the sinus node-nucleus of vagus nerve system. In the system respiratory deviations in the duration of cardiac cycle appear and are kept. Central effect can either affect directly sinus node via sympathetic nerves and

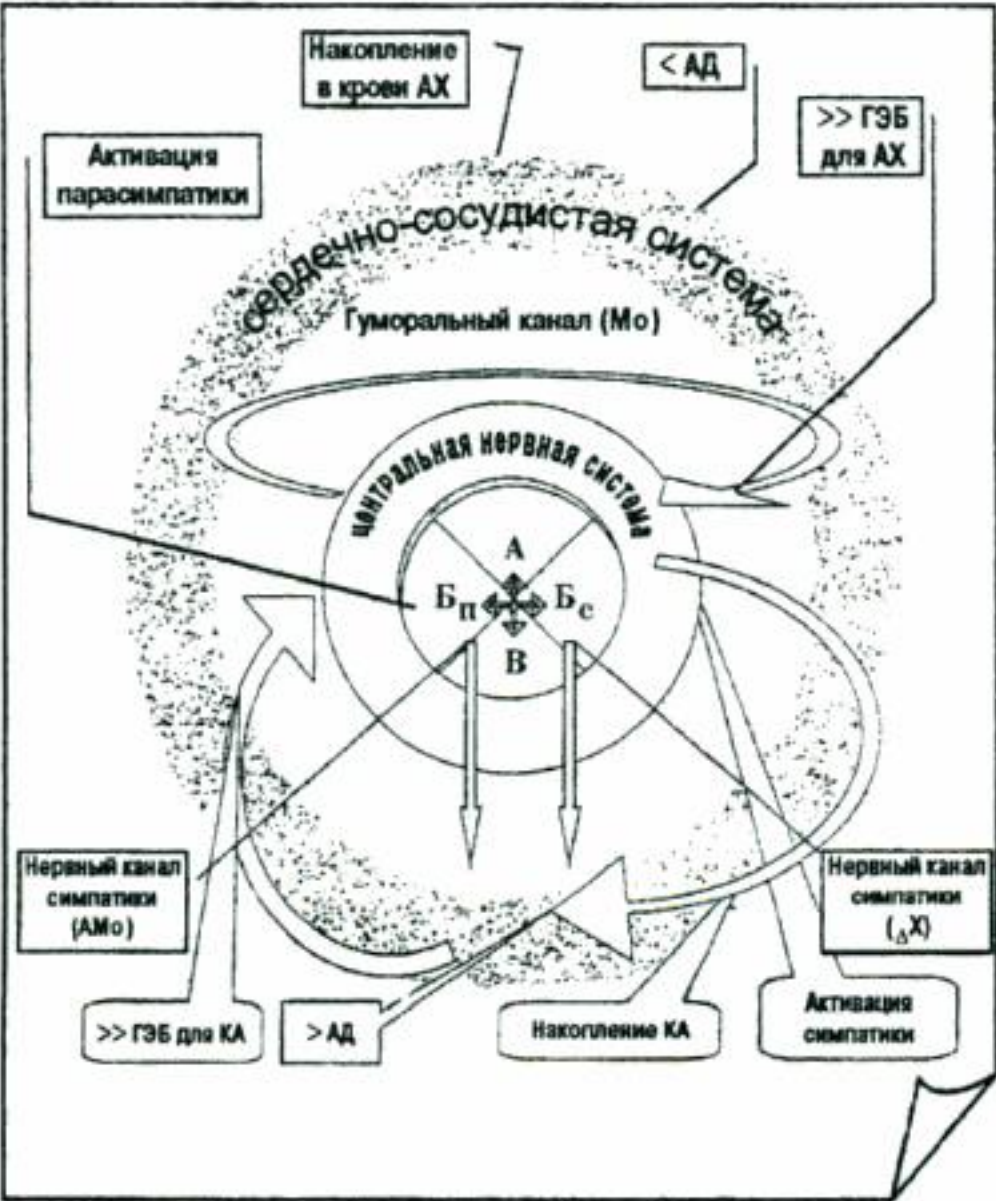


Рис. 5. Гипотетическая модель управления ритмом сердца на основе принципа двойной спирали регуляции физиологических процессов.

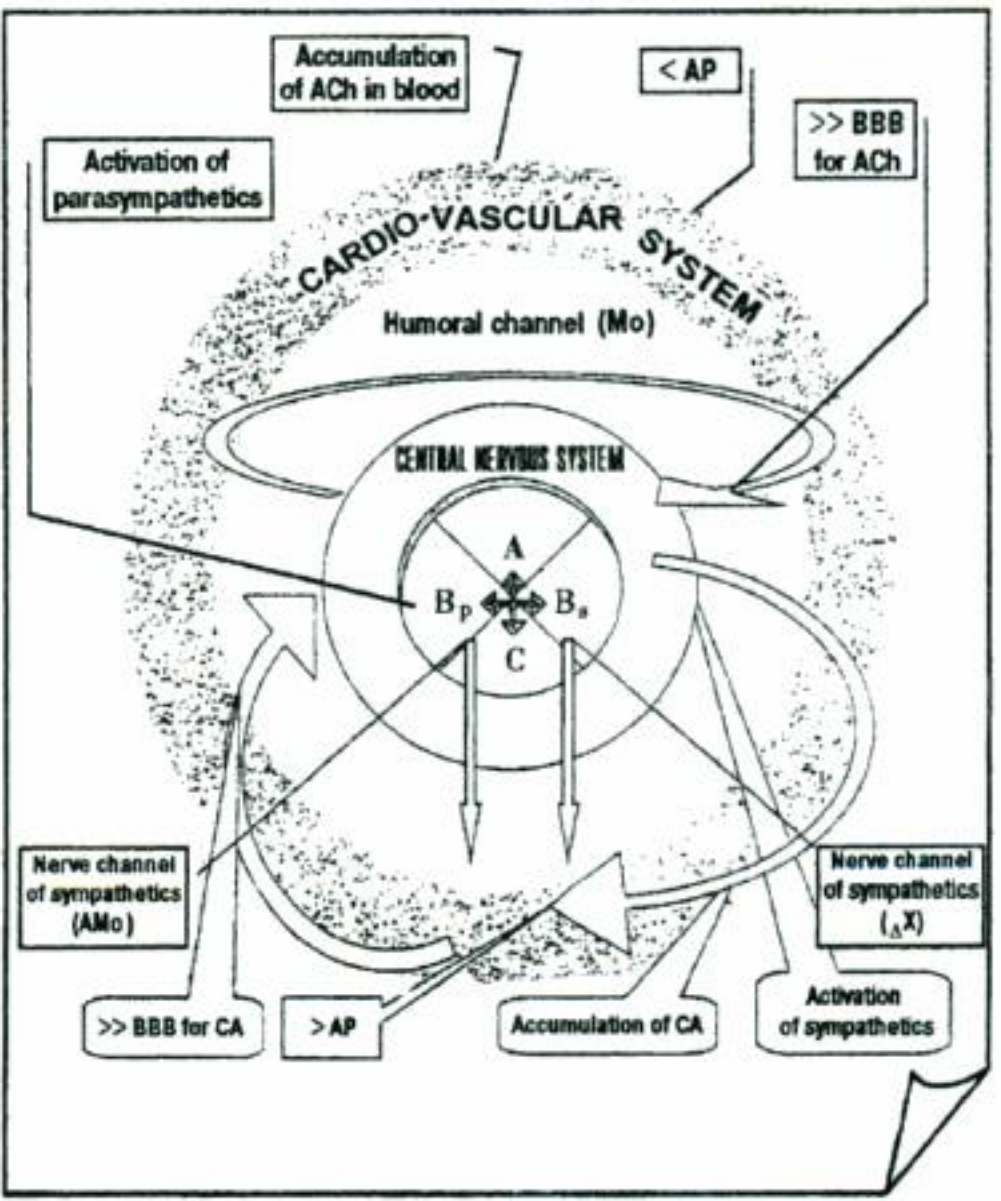


Fig. 5. Hypothesis model of controlling the rythm of heart on the base of the principle of duoble spiral regulation of physiological processes.

Собственно контуром автономной регуляции является система синусовый узел–ядро блуждающего нерва. В системе возникают и поддерживаются дыхательные колебания продолжительности сердечного цикла. Центральные влияния могут либо воздействовать непосредственно на синусовый узел через симпатические нервы и гуморальный канал регуляции, либо осуществляться изменением центрального тонуса ядра блуждающих нервов.

Уровень В центрального контура управления сердечным ритмом, названный “внутрисистемным” [2], функционально и анатомически представляет единое целое с нервными структурами, участвующими в автономной регуляции. Этот уровень включает вазомоторные центры, обеспечивающие локальную и общую адаптацию сосудистой системы к изменениям ударного и минутного объема крови. Таким образом, уровень В представляет собой часть системы экстракардиальной регуляции кровообращения.

Уровень Б обеспечивает гомеостатическое межсистемное уравнивание и воздействует на другие уровни как нервным, так и гуморальным путем. На этом уровне происходит активация адренергических или холинергических механизмов (B_c , B_n : симпато-парасимпатические подуровни), постоянно действует система гипоталамус–гипофиз–кора надпочечников.

Уровень А — это системы, обеспечивающие взаимодействие организма с внешней средой [2]. Безусловно, данная модель (рис. 5) не может претендовать на полноту отражения даже основных механизмов регуляции активности ССС. Но мы использовали эту схему как удобное “приближение” логического построения экспериментального материала.

Характерной чертой ЭБС является крайнее напряжение регуляторных механизмов. Нейрогуморальная “спираль” прямых и обратных связей “сжимается” до предела (высокая проницаемость ГЭБ для АХ и НА практически синфазна, что может приводить к срывам нормального функционирования механизмов обратных связей). Необходимо было подобрать воздействия, способные снять напряжение, “раскрутить спираль”, восстановить систему прямых и обратных связей.

Мы обратили внимание, что одним из способов раскачки установочных точек гомеостаза являются холодовые воздействия [6, 8]. В частности, различные программы гипотермии способны изменять проницаемость ГЭБ для эрго- и трофотропных веществ, что и определило стратегию следующей серии экспериментов. При ритмических холодовых воздействиях происходила кардинальная перестройка паттернов биоэлектрической активности (БЭА), коррелирующая со сложной динамикой изменения проницаемости ГЭБ. На разных этапах РГ значения функций автокорреляции и когерентнос-

humoral channel of regulation or be accomplished by the change in central tonus of the nucleus of vagus nerves. The level C of central contour of the control of cardiac rhythm called as “intrasystem” [2], functionally and anatomically represents an integral unity with nerve structures, participating in autonomous regulation. This level triggers vasomotor centres, providing local and general adaptation of vascular system to the changes of stroke and minute blood volume. Thus the level C represents the part of system of extracardial regulation of blood circulation.

The level B provides homeostatic intersystem balancing and affects other levels both by nerve and humoral way. At this level the activation of adrenergic or cholinergic mechanisms occurs (B_s , B_p : sympathetic–parasympathetic sublevels), constantly acts the system: hypothalamus–hypophysis–adrenal cortex.

The level A of this system is the systems, providing the interaction of an organism with an environment [2]. Obviously, this model (Fig. 5) can not pretend to the completeness of reflecting even the activity of main mechanisms of CVS regulation. But we used this scheme as a convenient “approximation” of logic structure of experimental material.

The characteristic feature of EPS is extreme tension of regulatory mechanisms. Neurohumoral “spiral” of direct and reverse connections “shrink” to the limit (high permeability of BBB for ACh and NA is practically phase coincident, that can result in the failures of normal functioning of the mechanisms of reverse connections). It was necessary to select the effects capable to cancel the tension and “untwist the spiral”, to recover the system of direct and reverse connections.

We paid the attention, that one of the ways of the swinging of set points of homeostasis is cold effects [6, 8]. In particular, various programmes of hypothermia are capable to change the permeability of BBB for ergo- and trophotropic substances, that determined the strategy of the next series of experiments.

Under rhythmic effect a cardinal re-arrangement of patterns of bioelectrical activity (BEA) occurred, which correlated with a complicated dynamics of the change in BBB permeability. At different stage of RH the values of the function of autocorrelation and coherence within a second range of frequencies vary from subzero to limiting with multiple power differentials of BEA spectrum; BBB permeability during several minutes of cooling increases in 3–4 times, falls down to zero, returns to the norm and gain sharply increases (Fig. 6).

These processes result in synchronous variations of vegetative status of an organism, to complete sympathetic parasympathetic switches up to the change of the sign of cardiotropic effects. In this case different

ти в секундном диапазоне частот варьируют от околоулевых до предельных с многократными перепадами мощности спектра БЭА; проницаемость ГЭБ в течение нескольких минут охлаждения увеличивается в 3–4 раза, падает до нуля, возвращается к норме и снова резко возрастает (рис. 6).

Эти процессы приводят к синхронным колебаниям вегетативного статуса организма, к полным симпато- парасимпатическим переключениям вплоть до смены знака кардиотропных эффектов. При этом обнаружены различные формы процессов регуляции (табл. 3). Снижение Мо при возрастании ΔX и АМо, низкие значения I_k, m₀, S₀ и S_m свидетельствуют о значительных перестройках в

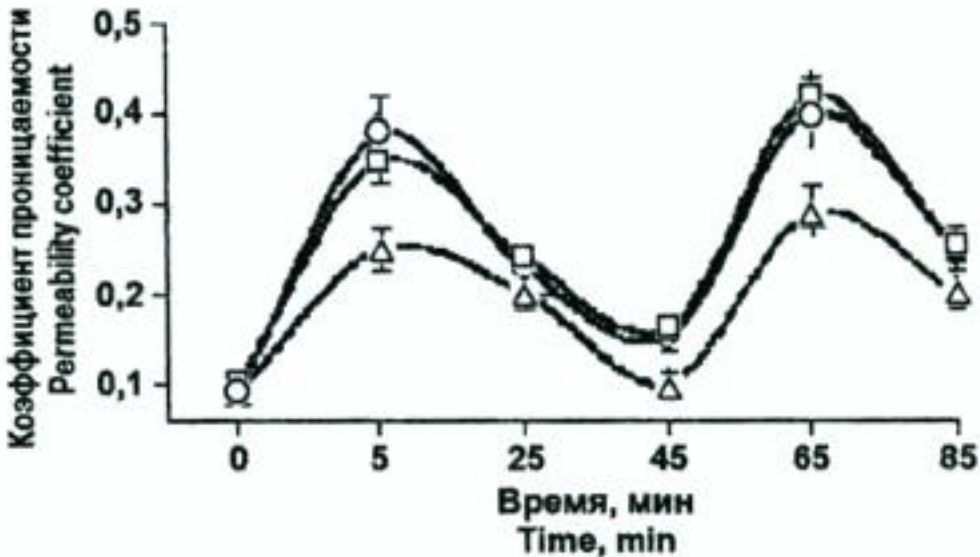


Рис. 6. Проницаемость ГЭБ для ³Н-НА 12-месячных крыс при 0,2 РГ.

Fig. 6. BBB permeability for ³H-NA of 12-months rats at 0.2 RH.

Таблица 3

Table 3

Статистические показатели динамического ряда кардиоинтервалов при ритмической гипотермии

Statistical indices of dynamic row of cardiointervals under rhythmic hypothermia

Показатели Indices	Мо	ΔX	АМо	ИН TI	ИВР IVB	ВПР VIR	I _k	m ₀	S _m
РГ RH	76,4 ± 6,1*	110,5 ± 3,1*	135,9 ± 5,2*	120,2 ± 4,4*	111,1 ± 3,3*	120,2 ± 5,4*	20,1 ± 7,1**	26,4 ± 6,4**	60,4 ± 6,3**

Примечание. * — различия по сравнению с контрольными значениями, принятыми за 100%, достоверны (P < 0,05), ** — P < 0,01.

Note: Differences in comparison with the control values, assumed for 100%, statistically significant (P < 0.05), ** — P < 0.01

механизмах симпатических и парасимпатических звеньев регуляции и некотором преобладании активности парасимпатической нервной системы.

По нашему мнению, в условиях гипотермии эти изменения могут быть связаны с проникновением КА в гипоталамус, где он оказывает парасимпатическое влияние на центры ССС.

Результаты исследований показали, что на 45- и 65-й минутах холодового воздействия при системном введении АХ и НА соответственно наблюдается центральный эффект на ЧСС, т.е. НА снижает, а АХ ускоряет сердцебиение (табл. 4). При инъекции НА на фоне 0,1 РГ ЧСС уменьшается линейно, хотя и напоминает так называемую отрицательную лестницу (феномен Вудвордса) [10]. В подобных условиях при введении АХ изменения ЧСС носят квазисинусоидальный характер положительной лестницы (феномен Боудичи) [10]. Причем периоды повышения ЧСС сменяются снижением сердечной ритмики с частотой 0,1–0,2 Гц. Такое влияние нейротрансмиттера на динамику ЧСС при 0,1 РГ должно отражать особенности проницаемости ГЭБ. Максимумы проницаемости для ³Н-НА и ³Н-АХ приходятся на разные этапы 0,1 РГ в полном соответствии с моментом их центральных эффектов (табл. 4).

Физиологическая целесообразность повышения проницаемости ГЭБ при гипотермии заключается в необходимости поддержки усиленного функцио-

forms of regulation processes were found (Table 3). Mo reduction with the increase ΔX and АМо, low values of I_k, m₀, S₀ and S_m testify to considerable re-arrangements in the mechanisms of sympathetic and parasympathetic links of regulation and some prevailing of the activity of parasympathetic nervous system.

From our point of view, under hypothermia conditions these changes can be related to the penetration of CA into hypothalamus, where it affects parasympathetically the centres of CVS.

The results of studies showed, that to the 45 and 65th minutes of cold effect under system introduction of ACh and NA, correspondingly a central effect on FCC reduced linearly, that is NA decreased and ACh accelerated heart beating (Table 4). When injecting NA at the background of 1 RH the FCC

Reduces linearly, although it looks like so-called negative stairs (Woodwardth phenomenon) [10]. In

Таблица 4

Effect of rhythmic hypothermia on BBB and FCC permeability on the background of system introduction of NA and ACh

Pharmacophone	Parameters	Duration of 0.1 RH, min			
		0	45	65	85
NA	FCC, % of the norm	115 ± 5	110 ± 4	60 ± 5*	105 ± 6
³ H-NA	Kp	0.13 ± 0.04	0.2 ± 0.05	0.5 ± 0.04*	0.19 ± 0.05
ACh	FCC, % of the norm	80 ± 5	120 ± 6*	80 ± 5	75 ± 5
³ H-ACh	Kp	0.12 ± 0.03	0.45 ± 0.01*	0.18 ± 0.05	0.2 ± 0.06

Notes. * — differences in comparison with an initial value (0 min), are statistically true (P < 0.01); Kp — ratio of specific radioactivity of brain to the one of blood.

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. * — различия по сравнению с исходным значением (0 мин) достоверны ($P < 0,01$); Кп — отношение удельной радиоактивности мозга к удельной радиоактивности крови.

нирования доминирующих нейротрансмиттерных процессов головного мозга поступающими из крови биогенными аминами в качестве локальных нейрогомонов.

Таким образом, парадоксальные кардиотропные эффекты при гипотермии обусловлены повышенным уровнем проницаемости ГЭБ. Вероятность такого рода феноменов важно учитывать в практической медицине при проведении гипотермии с лечебной целью. Интересно было использовать специфичный эффект “мягкого стресса” триггерных режимов охлаждения для “смягчения” последствий “жесткого”, например ЭБС.

Анализ результатов экспериментов по влиянию 0,1 РГ на гипертензивных крыс показал, что при системном введении НА и у этой группы животных происходило замедление ЧСС (центральный эффект). Однако наблюдалась определенная несогласованность показателей динамики ЧСС у крыс 12- и 24-месячного возраста. Ритмическая гипотермия стимулирует (через изменение ГЭБ) вегетативную нервную систему и прежде всего ее главный интегратор — гипоталамус. А ведь именно нервное звено регуляции ЧСС страдает при старении в первую очередь. Возможно, именно поэтому мы не выявили существенных возрастных особенностей в гуморальном звене цепи обратных связей — “последнего рубежа защиты” стареющих систем регуляции. Изменение симпатки и парасимпатки при ритмическом охлаждении происходит периодически, в противофазе, синхронно с изменением проницаемости ГЭБ для КА и АХ. Чтобы правильно подобрать ритм воздействия, важно знать время первичного ответа системы (в данном случае повышения проницаемости ГЭБ). У взрослых животных — это 8-е воздействие при частоте 0,1 Гц, причем увеличение частоты в 2 раза сдвигает время ответа. У старых животных отмечены вариabельность первичного ответа (8-е воздействие с большой дисперсией при 0,1 Гц), отсутствие адекватного сдвига ответа при увеличении частоты воздействия до 0,2 Гц (рис. 7), жесткий стабильный ответ на 8-е воздействие при частоте 0,05 Гц. Охлаждение 24-месячных крыс именно в этом ритме приводило к

similar conditions when injecting ACh the FCC have quasi-sinusoidal character (positive stairs, Boudichi phenomenon) [10]. Thereat the periods of an increase in FCC are changed with a reduction of cardiac rhythmicity with a frequency of 0.1–0.2 Hz. Such an effect of neurotransmitter on the dynamics of FCC at 0.1 RH should reflect the peculiarities of BBB permeability. Maximums of permeability for ³H-NA and ³H-ACh fit different stages of 0.1 RH in a complete correspondence with the moment of their central effects (Table 4).

Physiological expediency of an increase of BBB permeability under hypothermia consists in the necessity of the support of strengthening of functional dominating neurotransmitter processes of brain entering from blood biogenic amines as local neurohormones.

Thus an increased level of permeability of BBB stipulates paradoxical cardiotropic effects under hypothermia. It is very important to take into account the probability of such type phenomena in practical medicine when conducting hypothermia with a therapeutic aim. It was interesting to use a specific effect of “mild stress” for instance EPS.

The analysis of the results of experiments on the effect of 0.1 RH on hypertensive rats showed, that under system introduction of NA in this group of animals too the slowing of FCC (central effect) occurred. However there was a certain discoordination of indices of the FCC dynamics in rats of 12 and 24-months age. Rhythmic hypothermia stimulates (via change in BBB) vegetative nervous system and first of all its main integrator — hypothalamus. And it is nerve link of regulation of CVS is primarily affected during ageing. Probably, due to this fact we did not reveal significant age peculiarities in humoral link of the chain of reverse connections — “the last border of protection” of ageing systems of regulation. The change in sympathetics and parasympathetics under rhythmic cooling occurs periodically in antiphase,

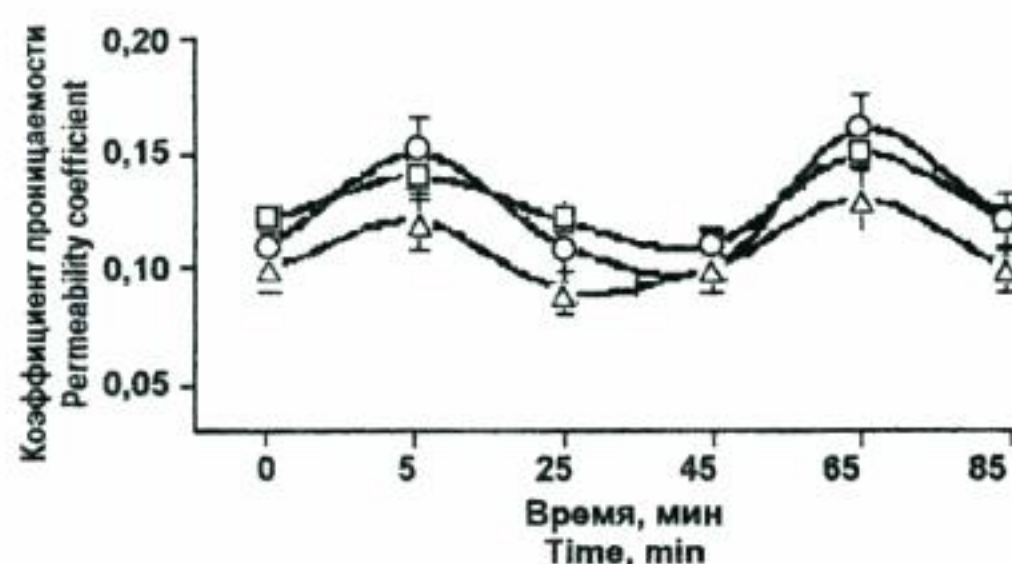


Рис. 7. Проницаемость ГЭБ для ³H-НА 24-месячных крыс при 0,2 РГ.

Fig. 7. BBB permeability for ³H-NA of 24-months rats at 0.2 RH.

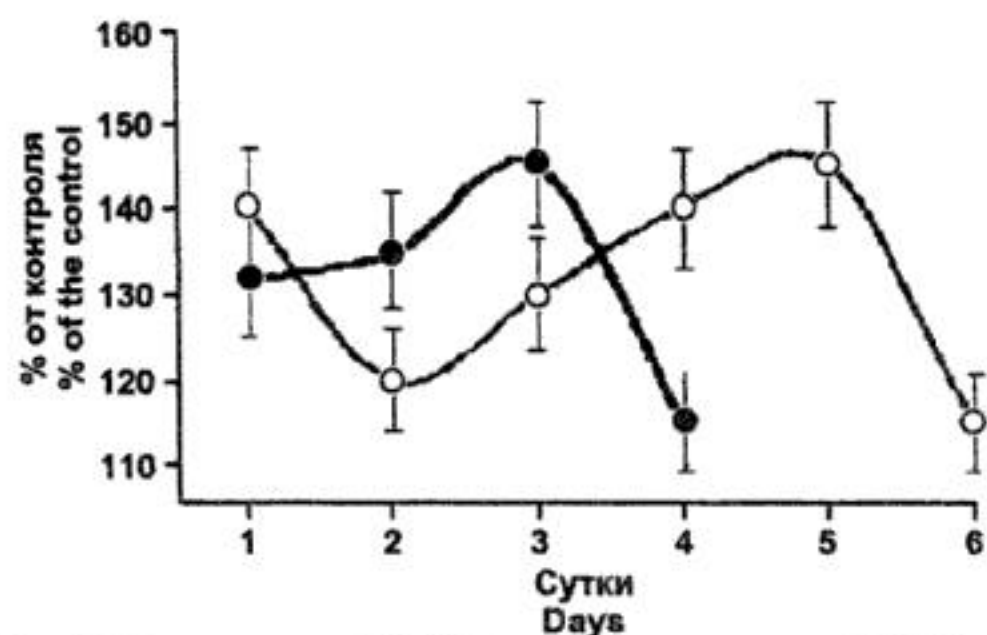


Рис. 8. Проницаемость ГЭБ 12-месячных крыс после 0,05 РГ.

Fig. 8. BBB permeability of 12-months rats after 0.05 RH.

максимальному повышению проницаемости ГЭБ (рис. 8, 9). Следует считать частоту воздействия 0,05 Гц для старых животных наиболее эффективной для стимуляции защитных систем организма. Резонансное усиление противофазных колебаний проницаемости ГЭБ для симпато- и парасимпатомиметиков после гипотермии гипертензивных животных приводило к естественной переходной ритмике функционирования ГЭБ от охлажденного к эутермному мозгу (рис. 8–11), при этом устойчиво нормализовалось кровяное давление (табл. 5).

Таким образом, достоверно установлено, что при артериальной гипертензии, вызванной длительным ЭБС, в 1,5–2 раза увеличивается проницаемость ГЭБ для НА и АХ. Снижение резистентности ГЭБ для этих нейромедиаторов синфазно и не отличается в различных структурах головного мозга, происходит неспецифическое, "аварийное" повышение уровня проницаемости.

При ритмической гипотермии в 3–4 раза повышается проницаемость ГЭБ для НА и АХ. Но в этих условиях снижение резистентности ГЭБ имеет черты специфичности. Следует говорить о направленном повышении функциональной активности ГЭБ. Динамические характеристики проницаемости для АХ и НА находятся в противофазе и различны в разных структурах мозга.

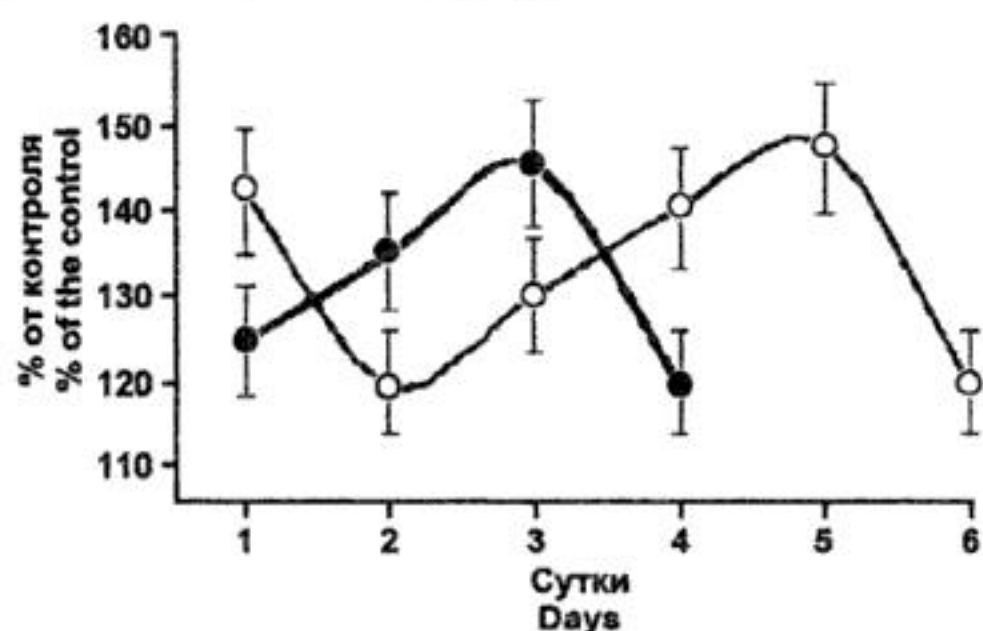


Рис. 10. Проницаемость ГЭБ 12-месячных гипертензивных крыс после 0,05 РГ.

Fig. 10. BBB permeability of 12-months hypertensive rats after 0.05 RH.

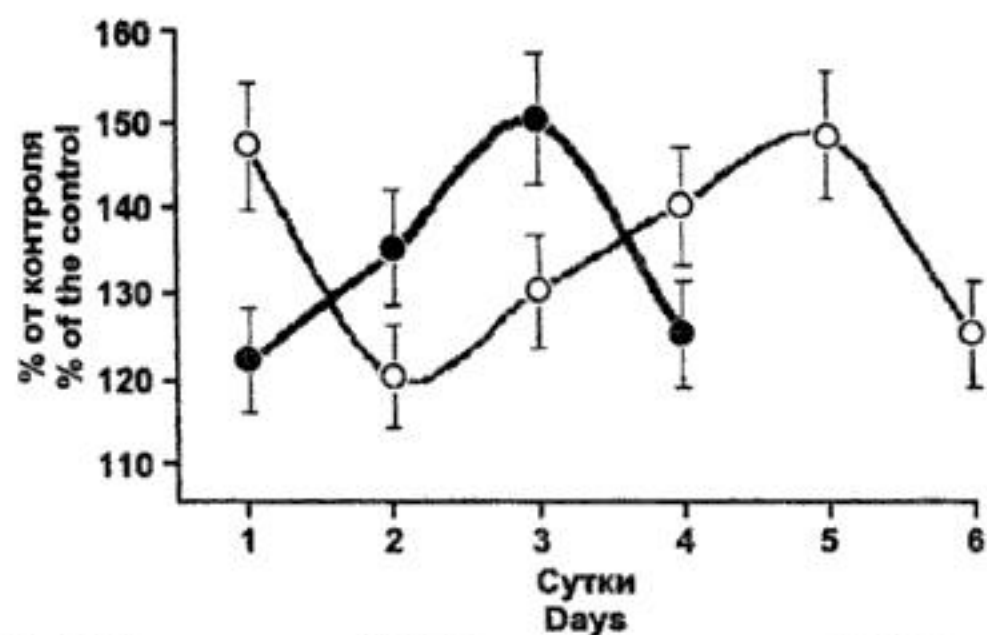


Рис. 9. Проницаемость ГЭБ 24-месячных крыс после 0,05 РГ.

Fig. 9. BBB permeability of 24-months rats after 0.05 RH.

synchronously with the change in BBB permeability for CA and ACh. In order to correctly select the rhythm of effect it is important to know the time of primary response of the system (in this case an increase of BBB permeability). In adult animals this is the 8th effect at the frequency of 0.1 Hz and the increase in the frequency in two times shifted the time of response. In old animals there was found the variability of primary response (the 8th effect with a big dispersion at 0.1 Hz), the absence of adequate shift of the response under an increase of the frequency of the effect up to 0.2 Hz (Fig. 7), a rigid stable response to the 8th effect at the frequency of 0.05 Hz. Cooling of 24-months rats namely in this rhythm resulted in maximum rise in BBB permeability (Fig. 8, 9). The frequency of the effect of 0.05 Hz for old animals should be considered as the most effective to stimulate protective systems of an organism. Resonance strengthening of antiphase variations of permeability for BBB for sympathetic parasympathetics after hypothermia of hypertensive animals resulted in natural transit rhythmicity of BBB functioning from cooled to eutermic brain (Fig. 8–11), in this case blood pressure normalised in a stable way.

Thus, it was statistically true established that under arterial hypertension, caused by long-term EPS

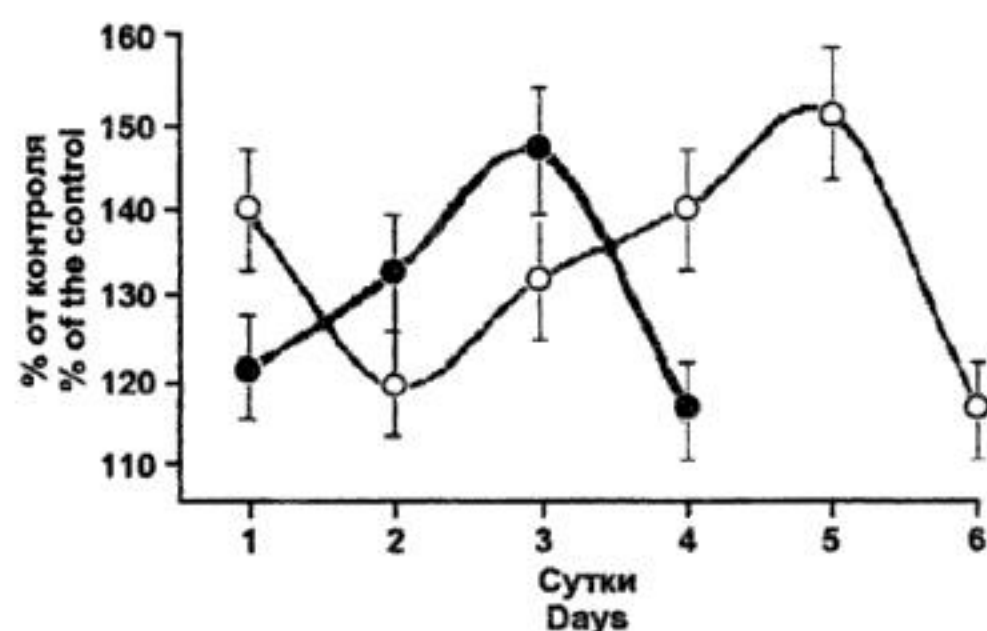


Рис. 11. Проницаемость ГЭБ 24-месячных гипертензивных крыс после 0,05 РГ.

Fig. 11. BBB permeability of 24-months hypertensive rats after 0.05 RH.

Таблица 5

Table 5

Изменение кровяного давления 12- и 24-месячных гипертензивных крыс после ритмической гипотермии

Change in blood pressure of 12 and 24-months hypertensive rats after rhythmic hypothermia

Воздействия Effects	Дни эксперимента Days of experiment						
	Исходное состояние Initial state	13	21	24	26	32	39
ЭБС 12-месячных крыс EPS of 12-months rats	101 ± 8	157 ± 13*	212 ± 13*	215 ± 10*	210 ± 11*	194 ± 9*	202 ± 12*
ЭБС 24-месячных крыс EPS of 24-months rats	111 ± 9	166 ± 15*	222 ± 17*	225 ± 15*	210 ± 10*	200 ± 10*	195 ± 12*
ЭБС и РГ 12-месячных крыс EPS and RH of 12-months rats	100 ± 5	155 ± 10*	185 ± 13*	221 ± 8*	111 ± 5	104 ± 4	99 ± 4
ЭБС и РГ 24-месячных крыс EPS and RH of 24-months rats	97 ± 7	145 ± 11*	165 ± 11*	180 ± 7*	116 ± 5	110 ± 6	100 ± 4

Примечание. * — различия по сравнению с исходными значениями достоверны ($P < 0,05$). ЭБС прекращали на 21-е сутки, РГ проводили на 24-е сутки.

Note. * — differences in comparison with initial ones are statistically true ($P < 0.05$). EPS was stopped to the 21st day, RH was done to the 24th day.

Динамика проницаемости ГЭБ крыс, перенесших длительный ЭБС, после РГ стабилизируется, соответствует естественному резонансно усиленному гипотермией ритму. Нормализуются артериальное давление гипертензивных животных, статистические и спектрально-корреляционные характеристики динамического ряда кардиоинтервалов ЭКГ и ЭЭГ.

Применение гипотермической нагрузки выявляет диапазон адаптационных возможностей ГЭБ старых животных. У 12-месячных крыс 0,05–0,2 РГ одинаково эффективно повышает проницаемость ГЭБ, вызывая характерный паттерн биоэлектрической активности мозга с доминированием в спектре частот 0,1–0,4 Гц (феномен удвоения ритма). У 24-месячных животных для снижения как резистентности проницаемости ГЭБ, так и гипертензии наиболее эффективна РГ с частотой 0,05–0,1 Гц. У 2-годичных крыс ЦНС менее пластична, не отслеживает верхний диапазон воздействий в секундном ритме.

Исходя из вышеизложенного, мы предлагаем использовать в практической криомедицине общие положения разработанного экспериментального способа повышения проницаемости ГЭБ для лекарственных веществ. Необходимо иметь в виду, что ритмическое холодовое воздействие на организм с частотой ~0,1 Гц уже в первые 10–15 мин может привести к повышению проницаемости ГЭБ, достаточному для проявления центральных (парадоксальных) эффектов системно введенных кардиотропных препаратов. В современных концепциях общего адаптационного синдрома полезно учитывать триггерные возможности нейротрансмиттерных механизмов функционирования ГЭБ, поскольку от уровня его проницаемости зависят адаптивные реакции CCC и ЦНС на стрессоры

in 1.5–2 times the BBB permeability increased. The reduction of BBB resistance for these neuromediators is phase-coincident and does not differ in various structures of brain, non-specific, “accidental” increase of permeability level occurs.

Under rhythmic hypothermia in 3–4 times the permeability of BBB for NA and ACh increases. But under these conditions the reduction of BBB resistance has the features of specificity. We should speak about directed increase in functional activity of BBB. Dynamic characteristics of permeability for ACh and NA are in antiphase and different in various brain structures.

Dynamics of BBB permeability in rats survived long-term EPS after RH stabilises, corresponds to natural resonance strengthened by hypothermia rhythm. Arterial pressure of hypertensive animals, statistic and spectral-correlational characteristics of dynamic row of cardiointervals of ECG and EEG.

Application of hypothermic loading reveals the range of adaptation possibilities of BBB of old animals. In 12-months rats 0.05–0.2 RH in a similar way effectively increase the BBB permeability, causing characteristic pattern of bioelectrical activity of brain with prevailing within the spectrum of frequencies 0.1–0.4 Hz (phenomenon of rhythm doubling). In 24-months animals for the reduction of both resistance of BBB permeability and hypertension are the most effective with the frequency of 0.05–0.1 Hz. In 2 years’ rats the CNS has less plasticity, does not trace the upper range of the effects in a second rhythm.

Due to mentioned above we propose to use in practical medicine general regulations of developed experimental way for increasing BBB permeability for medications. It should be noted that rhythmic cold effect on an organism with the frequency of ~0.1 Hz

разной модальности и интенсивности. В свою очередь функциональная активность ГЭБ подконтрольна этим системам во взаимодействии с общей неспецифической и иммунной защитой организма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабийчук Г. А., Марченко В. С., Ломакин И. И., Белостоцкий А. В. Нейрофизиологические процессы охлажденного мозга. — Киев: Наук. думка, 1992. — 208 с.
2. Баевский Р. М., Кириллов О. И., Клецкин С. З. Математический анализ изменений сердечного ритма при стрессе. — М.: Наука, 1984. — 222 с.
3. Белова Т. И. Устойчивость гематоэнцефалического барьера при эмоциональном стрессе. — Харьков: Прапор, 1990. — С. 20–26.
4. Ведяев Ф. П., Воробьева Т. М. Модели и механизмы эмоциональных стрессов. — Киев: Здоров'я, 1983. — 136 с.
5. Кассиль Г. Н. Некоторые гуморально-гормональные и барьерные механизмы стресса // Актуальные проблемы стресса. — Кишинев: Штиинца, 1976. — С. 100–175.
6. Марченко В. С. К концепции экзистозенцефалической системы охлажденного мозга. Часть 1 // Пробл. криобиологии. — 1997. — № 4. — С. 14–20.
7. Меерсон Ф. З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических поражений сердца. — М.: Медицина, 1984. — 269 с.
8. Пастухов Ю. Ф. Явление сезонного гипометаболизма млекопитающих // Термофизиология. Информ. бюл. Вып. 2. — Минск, 1991. — С. 7–18.
9. Росин Я. А. Регуляция функций. — М.: Наука, 1984. — 172 с.
10. Словарь физиологических терминов. — М.: Наука, 1987. — 449 с.
11. Судаков К. В., Тараканов О. П., Юматов Е. А. Кросс-корреляционный вегетативный критерий эмоционального стресса // Физиол. человека. — 1995. — 21, № 3. — С. 87–95.
11. Федотчев А. И., Бондарь А. Т. Неспецифические механизмы адаптации ЦНС к прерывистым раздражениям, спектральная структура ЭЭГ и оптимальные параметры ритмических сенсорных воздействий // Успехи физиол. наук. — 1996. — 27, № 4. — С. 44–61.
13. Штерн Л. С. Гисто-гематические барьеры и нейрогуморальная регуляция. — М.: Наука, 1981. — 316 с.
14. Mayhan W. G. Role of nitric oxide in disruption of the blood-brain barrier during acute hypertension // Brain Res. — 1995. — 686, № 1. — P. 99–103.
15. Oztas B., Kaya M. The effect of acute hypertension on blood-brain barrier permeability to albumin during experimentally induced epileptic seizures // Pharmacol. Res. — 1991. — 23, № 1. — P. 41–46.
16. Selye H. Stress without distress. — New York: Hodder & Stoughton, 1974. — 135 p.

Поступила 24.07.2001

even during the first 10–15 min can result in an increase in BBB permeability, essential for the manifestation of central (paradoxical) effects of introduced cardiotropic preparations with the system. In modern concepts of general adaptation syndrome the trigger possibilities of neurotransmitter mechanisms of BBB functioning are useful to be taken into account, because adaptive responses of cardio-vascular system and CNS to stressors of various modality and intensity depend on the level of its permeability. In its turn, functional activity of BBB is under control for these systems in interaction with general non-specific and immune protection of an organism.

REFERENCES

1. Babijchuk G. A., Marchenko V. S., Lomakin I. I., Belostotsky A. V. Neuro-physiological processes of cooled brain. — Kiev: Naukova Dumka, 1992. — 208 p.
2. Baevsky R. M., Kirillov O. I., Kletskin S. Z. Mathematical analysis of changes of cardiac rhythm under stress. — M.: Nauka, 1984. — 222 p.
3. Belova T. I. Resistance of blood brain barrier under emotional stress. — Kharkov: Prapor, 1990. — P. 20–26.
4. Vedyayev F. P., Vorobyeva T. M. Models and mechanisms of emotional stress. — Kharkov: Prapor, 1990. — P. 20–26.
5. Kassil G. N. Some humoral-hormonal and barrier mechanisms of stress // Actual problems of stress. — Kishinev: Shtiintsa, 1976. — P. 100–175.
6. Marchenko V. S. On the concept of existostoenkephalic system of the cooled brain. Part 1 // Problems of Cryobiology. — 1997. — № 4. — P. 14–20.
7. Meerson F. Z. Pathogenesis and preventing of stressor and ischemic impairments of heart. — M: Meditsina, 1984. — 269 p.
8. Pastukhov Yu. F. Phenomenon of seasonal hypometabolism of mammals // Thermophysiology. Inform. Bul. Issue 2. — Minsk, 1991. — P. 7–18.
9. Rosin Ya. A. regulation of functions. — M: Nauka, 1984. — 172 p.
10. Vocabulary of physiological terms. — M: Nauka, 1987. — 449 p.
11. Sudakov K. V., Tarakanov O. P., Yumatov E. A. Cross-correlational vegetative criterion of emotional stress // Fiziologiya cheloveka. — 1995. — V. 21, № 3. — P. 87–95.
12. Fedotchev A. I., Bondar A. T. Non-specific mechanisms of CNS adaptation to interrupted excitations, spectral structure of EEG and optimum parameters of rhythmic sensor effects // Uspehi fiziol. Nauk. — 1996. — 27, № 4. — P. 44–61.
13. Shtern L. S. Histo-hematic barriers and neurohumoral regulation. — M: Nauka, 1981. — 316 p.
14. Mayhan W. G. Role of nitric oxide in disruption of the blood-brain barrier during acute hypertension // Brain Res. — 1995. — 686, № 1. — P. 99–103.
15. Oztas B., Kaya M. The effect of acute hypertension on blood-brain barrier permeability to albumin during experimentally induced epileptic seizures // Pharmacol. Res. — 1991. — 23, № 1. — P. 41–46.
16. Selye H. Stress without distress. — New York: Hodder & Stoughton, 1974. — 135 p.

Accepted in 24.07.2001

Вплив довгострокового зберігання на еритроцити, заморожені з великими швидкостями охолодження

С. Е. ГАЛЬЧЕНКО

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Effect of Long-Term Storage on the Erythrocytes Frozen with High Cooling Rates

S. E. GALCHENKO

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

Вивчався вплив зберігання еритроцитів в умовах низькотемпературного банку протягом 10 років на рівень гемолізу, метаболічні показники і на стійкість мембран до перекисного окислення. Показано, що стабільність цих показників при довгостроковому зберіганні залежить від початкових умов кріоконсервування.

Изучалось влияние хранения эритроцитов в условиях низкотемпературного банка в течение 10 лет на уровень гемолиза, метаболические показатели и устойчивость мембран к перекисному окислению. Показано, что стабильность этих показателей при долгосрочном хранении зависит от начальных условий кріоконсервирования.

The effect of storage of erythrocytes under low-temperature bank conditions during 10 years on the hemolysis level, metabolic indexes and stability of membranes to peroxidation has been studied. It has been shown that the stability of these indexes under long term storage depends on the initial cryopreservation conditions.

Основна задача кріоконсервування — це створення відповідного запасу біологічного матеріалу з метою використання в наукових дослідженнях, у клінічній практиці, зберігання генетичного фонду і т.д., а від цього залежить і можливий граничний термін його зберігання. Цей термін при зберіганні генетичного матеріалу, колекцій мікроорганізмів, культур тканин, деяких біоматеріалів клінічного призначення може складати десятки років.

При цьому, якщо вплив факторів кріоконсервування на зберігання біологічних об'єктів досліджено досить детально [2, 5], то впливу терміну зберігання на якість кріоконсервованого матеріалу приділяється значно менше уваги. У кріобіологічній літературі мало робіт, присвячених цій проблемі [7].

Виходячи з теоретичних міркувань, можна припустити, що в замороженому матеріалі, хоч і повільно, але можуть відбуватися фізичні зміни: перекристалізація замороженого розчину і як наслідок збільшення розміру кристалів, кристалізація аморфної фази, а також розтріскування твердої матриці з умерзшими клітинами чи тканинами, що призведе до їх механічного пошкодження або до пошкодження в результаті електричного пробою, який може виникнути внаслідок розподілу зарядів при розтріскуванні [4, 6]. Особливо великий вплив на пошкодження біологічних об'єктів можуть мати ці фактори при надшвидкому охолодженні матеріалу під час кріоконсервування. Це може бути пов'язано з тим, що в цьому випадку формуються кристали невеликого розміру, схильні до

The main task of cryopreservation is making a certain stock of biological material with the aim of usage in researches, clinical practice, genetic fund preservation etc, and feasible term of its storage depends on this fact. This term can make the decades when storing gene material, collections of microorganisms, tissue cultures, some biomaterials for clinical application.

Thereat in spite of the fact that the effect of cryopreservation factors on the storage of biological objects has been studied in details [2, 5], the effect of a storage term on the quality of cryopreserved material is insufficiently investigated. There are just single works in cryobiological literature devoted to this problem [7].

In addition, considering theoretical conceptions, it should be supposed, that in a frozen material such physical changes as re-crystallisation of a frozen solution and due to this augmentation of a crystal size, crystallisation of amorphous phase, as well as cracking of a solid matrix with frozen cells and tissues, may occur slowly, that will result in their mechanical injury or one due to electric break-down, which can occur in the result of a charge distribution during cracking [4, 6]. The most important effect on the damage of biological objects can be demonstrated by these factors under a rapid cooling of material during cryopreservation. This can be related to the fact, that in this case when small crystals capable of re-crystallisation are formed, a partial vitrification is feasible, and in a frozen sample significant thermal tension is developed.

рекристалізації, можлива часткова вітрифікація, а в замороженому зразку розвиваються значні термічні напруження.

У даній роботі ми вивчали вплив довгострокового зберігання на рівень гемолізу еритроцитів, на їх здатність відновлювати зовнішній окислювач, а також стійкість мембран до перекисного окислення в залежності від швидкості охолодження, кріопротектора, його концентрації і терміну зберігання.

Кров донорів отримували на Харківській станції переливання крові. Еритроцити відмивали фізіологічним розчином з pH 7,4. Еритромасу розводили тим же розчином у співвідношенні 1:1. Розчини кріопротекторів подвійної концентрації додавали краплями до еритроцитів, ретельно перемішуючи. Кінцева концентрація — 5, 10 і 20%. Суспензію клітин розфасовували в контейнери з алюмінієвої фольги товщиною 30 мкм. Товщина шару рідини в контейнері — 0,3 мм. Кріоконсервування проводили за допомогою мідних блоків, охолоджених у рідкому азоті, і теплоізолюючих прокладок з фторопласту різної товщини [3]. Середні швидкості охолодження становили 1 000, 3 000, 8 000 і 80 000 °C/хв. Матеріал відігрівали на водяній бані з температурою 37 °C. Від ПЕО-1500 еритроцити відмивали фізіологічним, а від гліцерину цукрозними розчинами.

Рівень гемолізу еритроцитів визначали спектрофотометрично у відсотках; 100%-й гемоліз отримували додаванням до суспензії 0,2%-го тритону X-100. Швидкість відновлення фериціаніду калію вимірювали за допомогою платинового електроду [1]. Концентрація фериціаніду — 500, глюкози — 10, аскорбінової кислоти — 50, метиленового синього — 5 мкмоль.

Стійкість еритроцитів до перекисного окислення оцінювали по світлосумі хемілюмінесценції, індукованої перекисом водню. Для цього в ячейку хемілюмінметра, що містила 1 мл фізіологічного розчину (pH 7,4) і 100 мкл еритромаси, додавали 200 мкл 5%-го розчину перекису водню і реєстрували світлосуму.

У табл. 1 подано дані щодо рівня гемолізу еритроцитів у залежності від терміну зберігання в низькотемпературному банку. У даному випадку кріопротектором був гліцерин у концентраціях 5, 10 і 20%. Терміни зберігання становили 1 місяць, 5 і 10 років. Як видно, через 5 років зберігання рівень гемолізу не відрізняється від початкового ні при яких умовах кріоконсервування. Через 10 років він зростає при швидкості охолодження 3 000 °C/хв і концентрації гліцерину 10 і 20%, а при швидкості 8 000 °C/хв — при концентрації кріопротектора 10%. При швидкості охолодження 80 000 °C/хв зростання гемолізу не спостерігається. Можливо, це пов'язано з тим, що початковий гемоліз дуже великий.

Якщо при кріоконсервуванні еритроцитів використовувався ПЕО-1500, то при швидкостях охолодження 1 000 і 8 000 °C/хв рівень гемолізу прак-

The effect of long-term storage on the level of erythrocytes hemolysis, their capability to recover an environmental oxidant, as well as membrane stability to peroxidation depending on cooling rates, cryoprotectant and its concentration and term of storage has been investigated in given work.

Donors' blood was obtained at Kharkov station of blood transfusion. Erythrocytes were washed-out by means of physiological solution, pH 7.4. Erythromass was diluted with the same solution in the ratio of 1:1. Cryoprotectant solutions of double concentration were added to erythrocytes by drops, with thoroughly mixing. Final concentration made 5, 10 and 20%. Cell suspension was packed into 30 μm aluminum foil containers. Thickness of a liquid layer in a container made 0.3 mm. Cryopreservation was carried-out by means of copper blocks, cooled with liquid nitrogen, and heat-insulating fluoroplastic gaskets with various thickness [3]. Average cooling rates made 1 000, 3 000, 8 000 and 80 000 °C/min. Material was thawed on 37 °C water bath. Erythrocytes were washed-out of PEO-1500 by physiological solution, and out of glycerol by sucrose solutions.

The level of erythrocytes hemolysis was determined spectrophotometrically in percentage, 100% hemolysis was obtained by adding of 0.2% triton X-100 to the suspension.

The rate of potassium ferric cyanide recovery was measured by means of platinum electrode [1]. Concentration was the following: ferric cyanide — 500, glucose — 10, ascorbic acid — 50, methylene blue — 5 μM .

Erythrocytes stability to lipid peroxidation was estimated on a chemiluminescence sum-light, induced by hydrogen peroxide. With this aim into the chemiluminometer cell, which contained 1 ml of physiological solution (pH 7.4) and 100 μl of erythromass, 200 μl of 5% hydrogen peroxide solution was added, and light-sum was recorded.

Table 1 demonstrated the data on the level of erythrocytes hemolysis depending on the term of storage in low-temperature bank. Glycerol in 5, 10, 20% was used in the given case as a cryoprotectant. Storage terms made 1 month, 5 and 10 years. As you can see, in 5 years of storage the level of hemolysis does not differ on initial one under any condition of cryopreservation. In 10 years the hemolysis increases under the conditions of 3 000 °C/min cooling rate and glycerol concentration of 10 and 20%, but at the rate of 8 000 °C/min the rise is observed with 10% cryoprotectant concentration. Probably, this is related to the fact, that an initial hemolysis is quite significant.

In the case when PEO-1500 was used for erythrocytes cryopreservation, under cooling rates of 1 000 and 8 000 °C/min hemolysis level practically did not change under a long-term storage (Table 2). Under other cooling rates hemolysis increase during storage is sometimes observed. The fact that the minimum of initial hemolysis and absence of its augmentation are

Таблиця 1

Рівень гемолізу еритроцитів (%) у залежності від концентрації гліцерину, швидкості охолодження і терміну зберігання

Концент- рація глі- церину, %	Термін зберіган- ня	Швидкість охолодження, °C/хв			
		1 000	3 000	8 000	80 000
5	1 міс	10,4 ± 0,7	49,3 ± 6,9	27,2 ± 4,4	90,0 ± 5,4
	5 років	14,3 ± 2,4	58,1 ± 3,9	31,6 ± 3,4	94,1 ± 4,2
	10 років	17,5 ± 3,6	63,3 ± 4,1	34,4 ± 3,2	95,3 ± 3,0
10	1 міс	10,0 ± 1,2	9,2 ± 2,2	8,4 ± 2,0	92,5 ± 1,3
	5 років	13,2 ± 1,8	17,4 ± 2,8	13,1 ± 1,8	95,6 ± 3,2
	10 років	13,5 ± 2,4	20,3 ± 2,1*	15,2 ± 1,6*	96,7 ± 2,4
20	1 міс	60,9 ± 3,0	40,3 ± 3,5	40,6 ± 5,4	91,3 ± 2,3
	5 років	64,1 ± 3,1	51,5 ± 3,4	44,7 ± 4,1	93,6 ± 3,2
	10 років	65,8 ± 2,6	53,8 ± 3,2*	46,0 ± 2,6	95,7 ± 4,3

Примітка. * — відмінності достовірні в порівнянні з терміном зберігання 1 місяць, $p < 0,05$.

тично не змінюється при довгостроковому зберіганні (табл. 2). При інших швидкостях охолодження в окремих випадках спостерігається зростання гемолізу під час зберігання.

Таблиця 2

Рівень гемолізу еритроцитів (%) у залежності від концентрації ПЕО-1500, швидкості охолодження і терміну зберігання

Концент- рація ПЕО- 1500, %	Термін зберіган- ня	Швидкість охолодження, °C/хв			
		1 000	3 000	8 000	80 000
5	1 міс	13,2 ± 2,6	51,0 ± 5,7	48,4 ± 4,3	74,6 ± 2,4
	5 років	15,8 ± 2,4	58,8 ± 4,3	49,4 ± 3,6	84,5 ± 4,1
	10 років	17,2 ± 3,7	61,0 ± 2,4	49,5 ± 3,0	88,7 ± 4,5*
10	1 міс	3,5 ± 0,3	13,1 ± 2,3	24,2 ± 5,1	65,2 ± 3,7
	5 років	4,2 ± 1,6	15,2 ± 1,8	27,1 ± 3,1	72,6 ± 3,2
	10 років	5,5 ± 2,2	16,0 ± 2,0	29,8 ± 2,3	75,3 ± 2,6
20	1 міс	32,7 ± 2,4	32,7 ± 2,4	46,1 ± 4,7	96,9 ± 2,0
	5 років	33,4 ± 1,9	48,2 ± 2,9*	48,7 ± 3,2	98,3 ± 2,2
	10 років	35,0 ± 2,3	50,8 ± 4,1*	49,3 ± 4,6	97,0 ± 2,4

Примітка. * — відмінності достовірні в порівнянні з терміном зберігання 1 місяць, $p < 0,05$.

Спільним для всіх досліджених випадків є те, що мінімум початкового гемолізу і відсутність його зростання спостерігаються при швидкості охолодження 1 000 °C/хв. При інших швидкостях охолодження таке зростання в деяких випадках відбувається. Таким чином, можна зробити висновок, що під час тривалого низькотемпературного зберігання еритроцитів можливе зростання рівня їх гемолізу в залежності від умов кріоконсервування.

Рівень гемолізу еритроцитів дає інформацію про значні пошкодження плазматичної мембрани клітин. Важливим показником стану клітин після кріоконсервування є рівень їх метаболізму, зокрема інтенсивність обміну відновними еквівалентами між клітинами і зовнішнім середовищем. При цьому в модельній ситуації роль зовнішньої редокс-системи може виконувати феріціанід калію, який не здатний проникати через клітинні мембрани і дозволяє проводити реєстрацію його відновлення полярографічним методом [1]. Енергетичний метаболізм еритроцитів представлений гліколізмом і гек-

observed at the rate of 1 000 °C/min is the same characteristic for all studied cases. Under other cooling rates such an increase occurs several cases. Thus, it should be assumed that during long-term low temperature storage of erythrocytes an increase of the level of their hemolysis is feasible depending on the cryopreservation conditions.

Table 1

The level of erythrocytes hemolysis (%) depending on the glycerol concentration, cooling rate and term of storage

Glycerol concent- ration, %	Term of storage	Cooling rate, °C/min			
		1 000	3 000	8 000	80 000
5	1 month	10,4 ± 0,7	49,3 ± 6,9	27,2 ± 4,4	90,0 ± 5,4
	5 years	14,3 ± 2,4	58,1 ± 3,9	31,6 ± 3,4	94,1 ± 4,2
	10 years	17,5 ± 3,6	63,3 ± 4,1	34,4 ± 3,2	95,3 ± 3,0
10	1 month	10,0 ± 1,2	9,2 ± 2,2	8,4 ± 2,0	92,5 ± 1,3
	5 years	13,2 ± 1,8	17,4 ± 2,8	13,1 ± 1,8	95,6 ± 3,2
	10 years	13,5 ± 2,4	20,3 ± 2,1*	15,2 ± 1,6*	96,7 ± 2,4
20	1 month	60,9 ± 3,0	40,3 ± 3,5	40,6 ± 5,4	91,3 ± 2,3
	5 years	64,1 ± 3,1	51,5 ± 3,4	44,7 ± 4,1	93,6 ± 3,2
	10 years	65,8 ± 2,6	53,8 ± 3,2*	46,0 ± 2,6	95,7 ± 4,3

Note. * — differences are statistically true comparing to the storage term of 1 month, $p < 0,05$.

Table 2

The level of erythrocytes hemolysis (%) depending on the PEO-1500 concentration, cooling rate and term of storage

PEO- 1500 concent- ration, %	Term of storage	Cooling rate, °C/min			
		1 000	3 000	8 000	80 000
5	1 month	13,2 ± 2,6	51,0 ± 5,7	48,4 ± 4,3	74,6 ± 2,4
	5 years	15,8 ± 2,4	58,8 ± 4,3	49,4 ± 3,6	84,5 ± 4,1
	10 years	17,2 ± 3,7	61,0 ± 2,4	49,5 ± 3,0	88,7 ± 4,5*
10	1 month	3,5 ± 0,3	13,1 ± 2,3	24,2 ± 5,1	65,2 ± 3,7
	5 years	4,2 ± 1,6	15,2 ± 1,8	27,1 ± 3,1	72,6 ± 3,2
	10 years	5,5 ± 2,2	16,0 ± 2,0	29,8 ± 2,3	75,3 ± 2,6
20	1 month	32,7 ± 2,4	32,7 ± 2,4	46,1 ± 4,7	96,9 ± 2,0
	5 years	33,4 ± 1,9	48,2 ± 2,9*	48,7 ± 3,2	98,3 ± 2,2
	10 years	35,0 ± 2,3	50,8 ± 4,1*	49,3 ± 4,6	97,0 ± 2,4

Note. * — differences are statistically true comparing to the storage term of 1 month, $p < 0,05$.

The level of erythrocytes hemolysis provides an information about significant damages of plasmatic membrane of cells. The level of cell metabolism, in particular, an intensity of exchange with recovered equivalents between cells and environment, is an important index of a cell state after cryopreservation. Thereat in a model situation the role of environmental redox-system can be played by potassium ferric cyanide, which is not capable of penetrating through cellular membranes and allowing, this situation gives the possibility to carry-out the recording of its recovery by the polarography method [1]. Energetic metabolism of erythrocytes is represented by glycolysis and hexosomonophosphate shunt (HMPS). It was shown [9], that HMPS, but not glycolysis, provided ferric cyanide recovery in the erythrocytes suspension

созомонофосфатним шунтом (ГМФШ). Було показано [9], що ГМФШ, а не гліколіз, забезпечує відновлення фериціаніду в суспензії еритроцитів і, таким чином, є можливість оцінити рівень забезпеченості еритроцитів НАДФН. Підтримання рівня НАДФН в еритроцитах є необхідною умовою для їх нормального функціонування. Це пов'язано з тим, що НАДФН-залежна глутатіонредуктаза підтримує високий рівень відновлення SH-глутатіону, який використовується глутатіонзалежною пероксидазою для розкладу органічних перекисів, які утворюються в процесі перекисного окислення ліпідів і таким чином забезпечується цілісність еритроцитів. Кріоконсервування, як відомо, може призводити до активації перекисних процесів [2].

У табл. 3 і 4 наведено дані щодо швидкості відновлення фериціаніду калію еритроцитами в залежності від швидкості охолодження, кріопротектора і терміну низькотемпературного зберігання. Вимірювання проводились у середовищі без добавок, а також у присутності глюкози і глюкози з аскорбатом або метиленовим синім. Додавання глюкози в середовище пов'язане з тим, що вона є практично єдиним субстратом окислення в еритроцитах і в її присутності знімається обмеження метаболічної активності через недостатність ендогенних субстратів. Аскорбат, доданий до розчину, виконує роль переносника еквівалентів через мембрану [1]. Таким чином, аскорбат у відповідній концентрації знімає обмеження щодо транспорту відновних еквівалентів в зовнішнє середовище. Лімітуючим фактором ГМФШ еритроцитів є доступність окисленої форми кофактора — НАДФ⁺. Відомо, що метиленовий синій здатний окислювати НАДФН і знімати це обмеження. Крім того, він, як і аскорбат, може переносити відновлювальні еквіваленти на фериціанід [1, 8]. У цьому випадку знімаються всі обмеження на інтенсивність метаболізму та транспорт відновних еквівалентів з клітини в зовнішнє середовище.

Як видно з табл. 3 і 4, інтенсивність відновлення фериціаніду калію еритроцитами, замороженими зі швидкістю охолодження 1 000 °C/хв у присутності

[9] and due to this there was an opportunity to estimate the level of providing NADPH for erythrocytes. Maintenance of NADPH level in erythrocytes is an essential condition for their normal functioning. This is related to the fact that NADPH-dependent glutathione reductase maintains a high level of SH-glutathione recovery, which is used by glutathione-dependent peroxidase for the decay of organic peroxides, formed during the process of lipid peroxidation and due to this fact erythrocytes integrity is provided. As it is known cryopreservation can result in the activation of peroxidative processes [2].

Tables 3 and 4 demonstrate the data on the rate of potassium ferric cyanide recovery by erythrocytes depending on a cooling rate, cryoprotectant and term of low temperature storage. Measurements were done in an additive-free medium, as well as in the presence of glucose and glucose with ascorbate or methylene blue. Glucose adding to the medium is related to the fact that this is practically a single oxidation substrate in erythrocytes, and in its presence a limitation of metabolic activity is cancelled due to the insufficiency of endogenous substrates. Ascorbate, added to solution, is playing the role of transporter of equivalents through a membrane [1]. Thus, ascorbate under a certain concentration cancels the limitation as for transport of the renewed equivalents into an environment. Accessibility of acidified form of co-factor — NADFH is a limiting factor of HMPS of erythrocytes. It is known that methylene blue is capable of acidifying NAPH and cancel this limitation. In addition, methylene blue, like as ascorbate, capable of transporting the renewed equivalents on ferric cyanide [1, 8]. In this case all the limitations as for the metabolism intensity and transport of recovered equivalents out of a cell into an environment, are canceled.

As the Tables 3 and 4 show, an intensity of potassium ferric cyanide recovery by erythrocytes, frozen

Таблиця 3
Швидкість відновлення фериціаніду калію еритроцитами (мкмоль/хв) у залежності від терміну зберігання і швидкості охолодження. Кріопротектор — 10%-й гліцерин

Добавки	Швидкість охолодження, °C/хв	Термін зберігання		Контроль
		1 місяць	10 років	
Без добавок	1 000	6,4 ± 0,4	7,3 ± 0,5	7,2 ± 0,6
	3 000	4,4 ± 0,3 ¹	2,8 ± 0,2 ^{1,2}	
	8 000	6,2 ± 0,5	3,7 ± 0,2 ^{1,2}	
Глюкоза	1 000	7,2 ± 0,5	7,7 ± 0,6	8,4 ± 0,7
	3 000	6,7 ± 0,4	3,4 ± 0,3 ^{1,2}	
	8 000	6,9 ± 0,5	4,3 ± 0,2 ^{1,2}	
Глюкоза + аскорбат	1 000	14,4 ± 1,2	13,5 ± 1,1 ¹	18,4 ± 1,5
	3 000	10,1 ± 0,8 ¹	8,9 ± 0,5 ¹	
	8 000	14,1 ± 1,2 ¹	9,0 ± 0,6 ^{1,2}	
Глюкоза + метиленовий синій	1 000	51,3 ± 3,2	53,6 ± 4,3	59,2 ± 4,9
	3 000	46,0 ± 3,3	44,9 ± 3,3 ¹	
	8 000	49,3 ± 4,0	46,0 ± 3,4 ¹	

Примітки. ¹ — відмінності достовірні в порівнянні з контролем, *p* < 0,05; ² — відмінності достовірні в порівнянні з 1 місяцем зберігання, *p* < 0,05.

Table 3
The rate of recovery of potassium ferric cyanide by erythrocytes (μmol/min) depending on the term of storage and cooling rate. 10% glycerol is a cryoprotectant

Additives	Cooling rate, °C/min	Term of storage		Control
		1 month	10 years	
Without additives	1 000	6.4 ± 0.4	7.3 ± 0.5	7.2 ± 0.6
	3 000	4.4 ± 0.3 ¹	2.8 ± 0.2 ^{1,2}	
	8 000	6.2 ± 0.5	3.7 ± 0.2 ^{1,2}	
Glucose	1 000	7.2 ± 0.5	7.7 ± 0.6	8.4 ± 0.7
	3 000	6.7 ± 0.4	3.4 ± 0.3 ^{1,2}	
	8 000	6.9 ± 0.5	4.3 ± 0.2 ^{1,2}	
Glucose + ascorbate	1 000	14.4 ± 1.2	13.5 ± 1.1 ¹	18.4 ± 1.5
	3 000	10.1 ± 0.8 ¹	8.9 ± 0.5 ¹	
	8 000	14.1 ± 1.2 ¹	9.0 ± 0.6 ^{1,2}	
Glucose + methylene blue	1 000	51.3 ± 3.2	53.6 ± 4.3	59.2 ± 4.9
	3 000	46.0 ± 3.3	44.9 ± 3.3 ¹	
	8 000	49.3 ± 4.0	46.0 ± 3.4 ¹	

Notes. ¹ — differences are statistically true depending on the control, *p* < 0.05; ² — differences are statistically true comparing to 1 month of storage, *p* < 0.05.

Таблиця 4

Швидкість відновлення фериціаніду калію еритроцитами (мкмоль/хв) у залежності від терміну зберігання і швидкості охолодження. Кріопротектор — 10%-й ПЕО-1500

Добавки	Швидкість охолодження, °C/хв	Термін зберігання		Контроль
		1 місяць	10 років	
Без добавок	1 000	6,8 ± 0,5	7,1 ± 0,6	7,2 ± 0,6
	3 000	4,2 ± 0,3 ¹	4,4 ± 0,3 ¹	
	8 000	3,3 ± 0,2 ¹	2,6 ± 0,2 ^{1,2}	
Глюкоза	1 000	7,9 ± 0,6	7,8 ± 0,8	8,4 ± 0,7
	3 000	6,6 ± 0,5	6,2 ± 0,5 ¹	
	8 000	3,7 ± 0,5 ¹	2,9 ± 0,1	
Глюкоза + аскорбат	1 000	16,3 ± 1,7	16,9 ± 1,9	18,4 ± 1,5
	3 000	11,4 ± 1,1 ¹	10,5 ± 0,8 ¹	
	8 000	8,1 ± 0,6 ¹	9,2 ± 0,7 ¹	
Глюкоза + метиленовий синій	1 000	55,7 ± 6,3	57,8 ± 6,9	59,2 ± 4,9
	3 000	48,0 ± 4,1	46,7 ± 3,1	
	8 000	39,9 ± 2,9 ¹	38,8 ± 3,2 ¹	

Примітки. ¹ — відмінності достовірні в порівнянні з контролем, $p < 0,05$; ² — відмінності достовірні в порівнянні з 1 місяцем зберігання, $p < 0,05$.

ПЕО-1500 практично не змінюється (незалежно від добавок) при їх зберіганні в рідкому азоті до 10 років і не відрізняється від контрольних значень. При заморожуванні в присутності гліцерину і швидкостях охолодження 3 000 і 8 000 °C/хв досліджені показники через 10 років зберігання відрізняються від контрольних значень. У деяких випадках достовірні відмінності спостерігаються і в порівнянні з 1 місяцем зберігання. Це свідчить про те, що не тільки заморожування з цими швидкостями негативно впливає на метаболізм еритроцитів, але й довгострокове зберігання може призводити до збільшення пошкоджень клітин. Той факт, що в присутності глюкози з переносниками відновних еквівалентів у середовищі інкубації швидкість відновлення фериціаніду калію не зменшується після 10 років зберігання, порівняно з 1 місяцем, може свідчити про те, що після довгострокового зберігання клітин з них у більшій мірі вимиваються ендogenous субстрати і аскорбат. Це може бути також пов'язано з тим, що еритроцити, консервовані з таким проникним кріопротектором, як гліцерин, необхідно від нього відмивати. При цьому пошкодження мембран, які уже виникли, можуть збільшуватись, бо в еритроцитах, заморожених з непроникним кріопротектором ПЕО-1500, зменшення швидкості відновлення фериціаніду калію під час зберігання не спостерігається, за виключенням одного випадку (табл. 4). Звичайно, не виключається і можливість того, що ПЕО-1500 більш ефективно захищає заморожений матеріал при його довгостроковому зберіганні.

У табл. 5 приведено дані світлосуми індукованої перекисом водню хемілюмінесценції еритроцитів після відігріву, яка відображає їх стійкість до перекисного окислення. Чим більша світлосума, тим менша стійкість. Хемілюмінесценція еритроцитів до заморожування не реєструється. Як видно з таблиці, ця стійкість після заморожування зменшується, що спостерігається також у процесі зберігання матеріалу, якщо заморожування проводилося в присутності гліцерину і при швидкостях охолодження 3 000 і 8 000 °C/хв. При використанні ПЕО-1500 таке збільшення спостерігається тільки в

Table 4

The rate of recovery of potassium ferric cyanide by erythrocytes ($\mu\text{mol}/\text{min}$) depending on the term of storage and cooling rate. 10% PEO-1500 is a cryoprotectant

Additives	Cooling rate, °C/min	Term of storage		Control
		1 month	10 years	
Without additives	1 000	6.8 ± 0.5	7.1 ± 0.6	7.2 ± 0.6
	3 000	4.2 ± 0.3 ¹	4.4 ± 0.3 ¹	
	8 000	3.3 ± 0.2 ¹	2.6 ± 0.2 ^{1,2}	
Glucose	1 000	7.9 ± 0.6	7.8 ± 0.8	8.4 ± 0.7
	3 000	6.6 ± 0.5	6.2 ± 0.5 ¹	
	8 000	3.7 ± 0.5 ¹	2.9 ± 0.1	
Glucose + ascorbate	1 000	16.3 ± 1.7	16.9 ± 1.9	18.4 ± 1.5
	3 000	11.4 ± 1.1 ¹	10.5 ± 0.8 ¹	
	8 000	8.1 ± 0.6 ¹	9.2 ± 0.7 ¹	
Glucose + methylene blue	1 000	55.7 ± 6.3	57.8 ± 6.9	59.2 ± 4.9
	3 000	48.0 ± 4.1	46.7 ± 3.1	
	8 000	39.9 ± 2.9 ¹	38.8 ± 3.2 ¹	

Notes. ¹ — differences are statistically true depending on the control, $p < 0.05$; ² — differences are statistically true comparing to 1 month of storage, $p < 0.05$.

with the cooling rate of 1 000 °C/min, in the presence of PEO-1500 remains practically unchangeable (not depending on the additives) during their storage in liquid nitrogen up to 10 years and does not differ on the control values. When freezing in the presence of glycerol and with freezing rates of 3 000 and 8 000 °C/min the indices under study in 10 years of storage differ from the control values. In some cases statistically true differences are also observed when comparing with 1 month of storage. This fact testified to the fact that not just freezing with such rates negatively affected erythrocytes metabolism, but also long-term storage could result in an increase of cell damages. The fact that in the presence of glucose with the transporters of recovered equivalents in an incubation medium the rate of potassium ferric cyanide renewal did not decrease in 10 years of storage comparing to 1 month, may testify that after a long-term cell storage, endogenous substrates and ascorbate were washed-out of them in a considerable extent. This also can be related to the fact that erythrocytes, frozen with such a penetrating cryoprotectant as glycerol, should be washed-out of it. Thereat the membrane damages, which have already appeared, could increase, because in the erythrocytes, frozen with PEO-1500 non-penetrating cryoprotectant, the reduction of a recovery rate of potassium ferric cyanide during storage has not been observed, excluding a single case (Table 4). Actually, the possibility of the fact that PEO-1500 protects efficiently the frozen material during its long-term storage, is not excluded.

Table 5 shows the data on a light sum of induced by hydrogen peroxide chemiluminescence of erythrocytes after thawing, which illustrates their stability to peroxidation. The less stability is, the light sum is bigger. Erythrocytes chemiluminescence before freezing has not been recorded. As the table show, this stability decreases after thawing, this also is observed during the process of a material storage in the case if freezing

одному випадку (табл. 5). Ці факти свідчать, що пошкодження мембран клітин під час зберігання можуть збільшуватися і це може сприяти вимиванню з них метаболітів та переносників відновних еквівалентів і, як наслідок, приводити до зменшення швидкості відновлення фериціаніду калію. У цьому випадку збільшується також навантаження на метаболічну систему клітин, бо частина НАДФН буде використовуватись глутатіонпероксидазою для антиоксидантного захисту і при дефіциті ендogenous субстрату буде спостерігатись зменшення швидкості відновлення зовнішнього окислювача.

Таблиця 5

Світлосума хемілюмінесценції еритроцитів (відн. од.), індукованої H_2O_2 , в залежності від кріопротектора, терміну зберігання і швидкості охолодження. Концентрація кріопротектора 10%

Кріопротектор	Термін зберігання	Швидкість охолодження, °C/хв		
		1 000	3 000	8 000
Гліцерин	1 міс	23 ± 2	31 ± 3	20 ± 2
	5 років	22 ± 2	43 ± 3*	39 ± 4*
	10 років	25 ± 3	58 ± 6*	41 ± 3*
ПЕО-1500	1 міс	5 ± 1	34 ± 3	46 ± 5
	5 років	7 ± 1	36 ± 4	59 ± 6
	10 років	7 ± 2	37 ± 3	54 ± 5

Примітка. * — відмінності достовірні в порівнянні з терміном зберігання 1 місяць, $p < 0,05$.

Таким чином, отримані результати дозволяють зробити висновок, що збереження еритроцитів при довгостроковому зберіганні в умовах низькотемпературного банку в значній мірі залежить від режиму кріоконсервування. У залежності від вибраного режиму якість матеріалу може залишатись або на одному рівні, або при не оптимальних умовах кріоконсервування змінюватись.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балмуханов Б. С., Замула С. В., Атауллаханов Ф. И. Потенциометрическое исследование окислительно-восстановительных систем эритроцитов человека с помощью феррицианида калия // Биохимия.— 1975.— 45, Вып. 5.— С. 945–949.

2. Белоус А. М., Бондаренко В. А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении.— Киев: Наук. думка, 1985.— 257 с.

3. Гальченко С. Е. Особенности криоконсервирования биологических объектов с применением больших скоростей охлаждения: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Харьков, 1990.— 16 с.

4. Грищенко В. И., Моисеев В. А., Зинченко А. В. О диэлектрическом пробое мембран при низких температурах // Докл. АН СССР.— 1989.— 308, № 1.— С. 215–217.

5. Грищенко В. И., Чуйко В. А., Пушкар Н. С. Криоконсервация тканей и клеток эндокринных органов.— Киев: Наук. думка, 1993.— 242 с.

6. Зинченко А. В., Мусатова И. Б. Электрические явления в водных растворах полиэтиленгликолей при охлаждении-нагреве // Пробл. криобиологии.— 1993.— № 3.— С. 40–43.

7. Линник Т. П., Грищенко В. И., Артеменко А. Б., Терещенко А. В. Влияние длительного низкотемпературного хранения спермы петухов на ее оплодотворяющую способность // Пробл. криобиологии.— 2000.— № 3.— С. 64–71.

8. Лукьянова Л. Д., Балмуханов Б. С., Уголев А. Т. Кислородзависимые процессы в клетке и ее функциональное состояние.— М.: Наука, 1982.— 301 с.

9. Srivastava S. K., Awasthi Y. C., Bentler E. Organic hydroperoxides // Biochem. J.— 1974.— 139.— P. 289–295.

Надійшла 22.05.2001

was done in the presence of glycerol and at the freezing rates of 3 000 and 8 000 °C/min. When using PEO-1500 such an increase is observed just in a single case (Table 5). These facts testify to the fact that the damage of cell membranes during storage can increase and this fact may promote to washing metabolites and transporters of recovered equivalents out of them and, as a result, cause a reduction of recovery rate of potassium ferric cyanide. In this case the loading on a cell metabolic system also rises, because a part of NADPH will be used by glutathione peroxidase with the aim of antioxidative protection and at the deficit of endogenous substrate a reduction of a recovery rate of environmental acidifier will be observed.

Table 5

The light sum of erythrocytes chemiluminescence (relative units), induced by H_2O_2 depending on the cryoprotectant, term of storage and cooling rate. Cryoprotectant concentration is 10%.

Cryoprotectant	Term of storage	Cooling rate, °C/min		
		1 000	3 000	8 000
Glycerol	1 month	23 ± 2	31 ± 3	20 ± 2
	5 years	22 ± 2	43 ± 3*	39 ± 4*
	10 years	25 ± 3	58 ± 6*	41 ± 3*
PEO-1500	1 month	5 ± 1	34 ± 3	46 ± 5
	5 years	7 ± 1	36 ± 4	59 ± 6
	10 years	7 ± 2	37 ± 3	54 ± 5

Note. * — differences are statistically true comparing to the storage term of 1 month, $p < 0.05$.

Thus obtained results allowed to conclude that erythrocytes preservation at long-term storage under the conditions of low temperature bank significantly depended on the cryopreservation regimen. Depending on the selected regimen the material quality can be kept at a certain level, in another case under unfavorable conditions of cryopreservation it can be reduced.

REFERENCES

1. Balmukhanov B. S., Zamula S. V., Ataullakhanov F. I. Potentiometric investigation of oxidative-recovering systems of human erythrocytes by means of potassium ferric cyanide // Biokhimiya.— 1975.— 45, Issue 5.— P. 945–949.

2. Belous A. M., Bondarenko V. A. Structural changes of biological membranes under cooling.— Kiev: Nauk. Dumka, 1985.— 257 p.

3. Galchenko S. E. Peculiarities of biological object cryopreservation using high cooling rates: Author's Abstract of Thesis for Candidate Degree obtaining.— Kharkov, 1990.— 16 p.

4. Grischenko V. I., Moiseev V. A., Zinchenko A. V. About dielectric break-down in membranes under low temperatures // Reports of the National Academy of Sciences of the Ukraine.— 1989.— 308, № 1.— P. 215–217.

5. Grischenko V. I., Chuyko V. A., Pushkar N. S. Cryopreservation of tissues and cells of endocrine organs.— Kiev: Nauk. dumka, 1993.— 242 p.

6. Zinchenko A. V., Musatova I. B. Electrical phenomenon in aqueous solutions of polyethylene glycols under cooling-heating // Problems of Cryobiology.— 1993.— № 3.— P. 40–43.

7. Linnik T. P., Grischenko V. I., Artemenko A. B., Tereschenko A. V. Effect of long-term low temperature storage of fowl sperm on its fertilizing ability // Problems of Cryobiology.— 2000.— № 3.— P. 64–71.

8. Lukyanova L. D., Balmukhanov B. S., Ugolev A. T. Oxygen-dependent processes in a cell and its functional state.— M.: Nauka, 1982.— 301 p.

9. Srivastava S. K., Awasthi Y. C., Bentler E. Organic hydroperoxides // Biochem. J.— 1974.— 139.— P. 289–295.

Accepted in 22.05.2001

Изучение влияния изменения скорости замораживания на сохранность эмбрионов млекопитающих

Л. В. ГОРБУНОВ, Т. С. АНТОНЕНКО, Н. Д. БЕЗУГЛЫЙ

Харьковский биотехнологический центр, пос. Кулинич

Studying the Influence of the Character of Change in Freezing Rate on Mammalian Embryos Integrity

L. V. GORBUNOV, T. S. ANTONENKO, N. D. BEZUGLY

Kharkov Biotechnological Center, Kulnichi

Для повышения технологичности процесса криоконсервирования биообъекта и получения широкого спектра скоростей охлаждения ($0,1-16,67\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) разработано и испытано устройство, основанное на пассивном остывании термоблока в горловине сосуда Дьюара. Устройство позволяет реализовать оптимальный режим замораживания различных типов половых клеток и эмбрионов изменением характерного времени охлаждения термоблока и погружением его на разные уровни в горловину сосуда Дьюара X-34Б(А) и X-5. Для проверки работоспособности устройства заморожены эмбрионы мыши и крупного рогатого скота (КРС), уровень сохранности которых составил $90,3 \pm 3,5\%$ ($n = 72$) и $90,8 \pm 1,1\%$ ($n = 414$) соответственно.

Для підвищення технологічності процесу криоконсервування біооб'єкта й одержання широкого спектра швидкостей охолодження ($0,1-16,67\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{хв.}$) розроблено і випробувано пристрій, заснований на пасивному остиганні термоблока в горловині судини Дьюара. Пристрій дозволяє реалізувати оптимальний режим заморожування різних типів статевих клітин і ембріонів за допомогою зміни характерного часу охолодження термоблока та занурення його на різні рівні в горловину судини Дьюара X-34Б(А) і X-5. Для перевірки працездатності пристрою заморожено ембріони миші і великої рогатої худоби, рівень збереження яких склав $90,3 \pm 3,5\%$ ($n = 72$) і $90,8 \pm 1,1\%$ ($n = 414$) відповідно.

To make the process of biological object cryopreservation more technological and to obtain a wide range of cooling rates ($0.1-16.67\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$) we have developed and tested the device, based on passive cooling of thermo-block in Dewar vessel neck. This device enables the realising of an optimal freezing regimen for various types of sexual cells and embryos by means of changing the characteristic time of thermo-block cooling and of immersing the thermo-block to various levels of Dewar vessel X-34B (A) and X-5 neck. To test the applicability of this device we have frozen the mouse and cattle embryos. The integrity rate was $90.3 \pm 3.5\%$ ($n = 72$) and $90.8 \pm 1.1\%$ ($n = 414$) correspondingly.

В настоящее время ооциты и эмбрионы млекопитающих замораживают с помощью двух альтернативных технологий: медленных скоростей замораживания ($B_f \leq 100\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) и высоких ($B_f \geq 2 \cdot 10^3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$). Главными достоинствами первой технологии являются более высокие уровни сохранности биообъекта [7, 8, 10], а недостатком — низкая технологичность [8]. Повышение технологичности процесса замораживания на основе использования медленных скоростей охлаждения возможно с применением устройств, основанных на пассивном остывании термоблока в горловине сосуда Дьюара [5]. Однако существующий способ замораживания, разработанный для криоконсервирования эмбрионов КРС, позволяет реализовать фиксированную скорость замораживания ($B_f \approx 0,3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$).

Для решения биотехнологических задач необходимо замораживать эмбрионы и ооциты разных видов животных, оптимальная скорость охлаждения которых может значительно отличаться. Цель данной работы — создание устройства, которое позволило бы реализовать разные характеры изменения скорости замораживания в определенном температурном диапазоне и установить степень их влияния на уровень сохранности биообъекта.

Now one has frozen the mammalian oocytes and embryos using two alternative technologies: with slow freezing rates ($B_f \leq 100\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$) and with rapid ones ($B_f \geq 2 \cdot 10^3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$). The main advantage of the first technology is higher integrity rate of biological object [7, 8, 10], and its disadvantage is low technological ability. Making the freezing process based using slow cooling rates more technological is possible when using the devices based on passive cooling of thermo-block in Dewar vessel neck [5]. However the existing method elaborated for cattle embryo cryopreservation allows the realizing of fixed freezing rate ($B_f \approx 0.3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$).

To solve the biotechnological tasks it is necessary to freeze the embryos and oocytes of various animal species, which optimal cooling rate can significantly vary. The aim of this work is the creating of device, which would allow the realizing of various characters of change in freezing rates within a certain temperature range and the determining of their influence extent on biological object integrity rate.

As a container for freezing we used the Uhlenhuth tubes ($V = 0.75\text{ ml}$) and plastic straws ($d = 2\text{ mm}$, $V = 200\text{ }\mu\text{l}$). Sample temperature was measured with a chrome-aluminium vs. copper-aluminium thermocouple (measuring head diameter 0.3 mm) and posistor CT-17-380 Ohm, standardised by thermocouple

Контейнером для замораживания служили пробирки Уленгута ($V = 0,75$ мл) и пластиковые соломинки ($d = 2$ мм, $V = 200$ мкл). Температуру образца измеряли с помощью хромель-копелевой термопары (диаметр измерительной головки $0,3$ мм) и позистора СТ-17-380 Ом, откалиброванного по показаниям термопары. Режим снижения температуры регистрировали графопостроителем Н-307. Каждый эксперимент состоял из 10 опытов. Среднюю величину изменения скорости снижения температуры при замораживании вычисляли в температурном диапазоне от -5 до -25 °C и от -5 до -30 °C по формуле учета средневзвешенной величины [4]. Эмбрионы замораживали с переменной скоростью в устройстве, основанном на пассивном охлаждении термоблока в горловине сосудов Дьюара Х-34А, Х-34Б и Х-5, а с постоянной — в замораживателе ЗЭМ4 [3]. Размораживали эмбрионы в водяной бане при 40 °C. В качестве криопротектора использовали 1 М и $1,2$ М растворы глицерина. Инициация кристаллообразования в пробирках Уленгута осуществлялась при -6 °C касанием охлажденным пинцетом нижней ее части, а в соломинках за счет "самопосева" льда [6].

Основным объектом исследования были эмбрионы КРС, модельным — эмбрионы мыши на стадии развития от поздней морулы до экспандированной бластоцисты. Жизнеспособность эмбрионов после криоконсервирования оценивали морфологически. Полученные результаты статистически обрабатывали на ЭВМ по общепринятым методикам с применением стандартной программы "Stadia".

Устройство, разработанное нами для криоконсервирования эмбрионов КРС, основано на пассивном остывании термоблока в горловине сосудов Дьюара Х-34А и Х-34Б [5]. Его стоимость на порядок ниже стоимости существующих аналогов, работающих по принципу активной подачи хладагента в замораживаемую камеру, а результаты сохранности деконсервированных эмбрионов КРС остаются на относительно высоком уровне — 90% [1]. Модификация данного устройства дает возможность реализовать оптимальный режим замораживания различных типов биообъектов изменением характерного времени охлаждения термоблока и погружением его на разные уровни в горловину сосуда Дьюара [2]. Использование особых термодинамических свойств воздуха позволяет получить различные скорости замораживания. Относительно низкая теплопроводность воздуха ($0,03$ Вт/м·°C) дает возможность получить минимальную скорость замораживания при степени открытости контейнера 0% ($0,1$ °C/мин), а высокая конвекционная способность — реализовать максимальную скорость охлаждения при 20% открытости термоблока ($5,8$ °C/мин).

В устройстве (рис. 1) использовался термоблок, степень открытости которого изменяется за счет

readings. Temperature decrease regimen was recorded with H-307 graph plotter. Each experiment consists of 10 sessions. The average value of change in temperature decrease rate at freezing was determined within temperature range from -5 to -25 °C and from -5 to -30 °C using the formula of accounting the weighted average value [4]. Embryos freezing with varying rate was performed in the device based on passive cooling of thermo-block in neck of Dewar vessel X-34A, X-34-B and X-5, and this one with constant rate was done in the ZEM4 freezer [3]. Embryos were thawed in water bath at 40 °C. Glycerol solutions of 1 M and 1.2 M were used as a cryoprotectants. Initiation of crystal formation in Uhlenhuth tubes was made at -6 °C by touching its bottom with cooled forceps and in straws it was due to ice "self-seeding" [6].

The main objects of investigation were cattle embryos, and the model ones were mouse embryos (at the development stage from morula to expanded blastocyst). Embryos viability after freezing was morphologically estimated. Obtained results were statistically processed with the standard methods using "Stadia" software.

Elaborated by us device for cattle embryos cryopreservation is based on passive cooling of thermo-block in neck of Dewar vessel X-34A and X-34B [5]. Its cost is about ten times cheaper in respect of the existing analogues, which work according to the principle of active supplying of cooling agent to freezing chamber, but the values of thawed cattle embryos integrity remain relatively high: 90% [1]. Modification of this device makes possible the realising of an optimal regimen of freezing of various biological objects types by means of changing the characteristic time of thermo-block cooling and of immersing the thermo-block to various levels of Dewar vessel neck [2]. Using of the special thermodynamic properties of air allows the obtaining of various freezing rates. Relatively low thermal conductivity of air (0.03 W/m·°C) gives the possibility of obtaining the minimum freezing rate at the container opening extent of 0% (0.1 °C/min), and a high convection ability allows the realising of the maximum cooling rate at the 20% of container opening (5.8 °C/min).

In the device (Fig. 1) we used the thermo-block, which opening extent is varied by means of various case position from a binding arm with a disk. In this case the thermo-block opening extent varies continuously from 0 to 100% , and the cooling rate varies from 0.1 to 16.67 °C/min for Uhlenhuth tubes (Table 1) and to 23.3 °C/min for plastic straws with thermo-block immersing level from 6.1 to 22.5 cm, correspondingly for its each opening extent. The elaborated device allows the obtaining of the following regimens: a regimen for short-term storage of sexual cells and embryos — from room temperature to 0 °C; a regimen of freezing of mammalian embryos and embryos — from 0 to -32 °C, a regimen of freezing of reproductive cells and tissues fragments — from 0 to -70 °C.

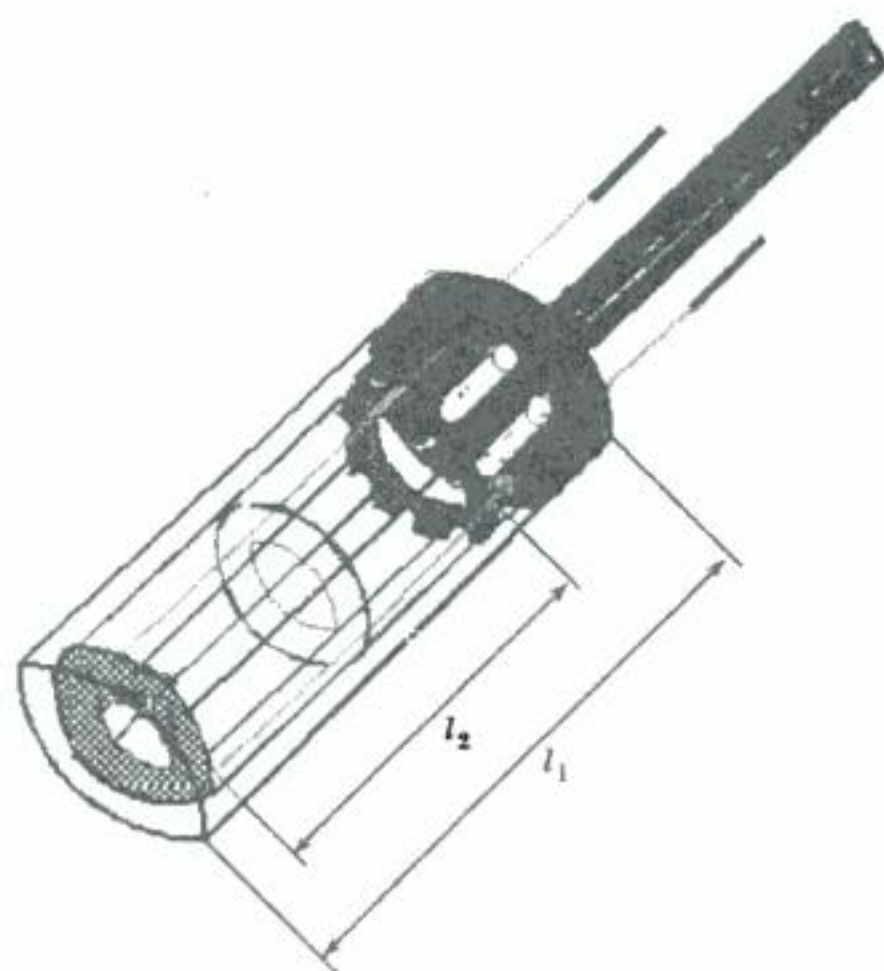
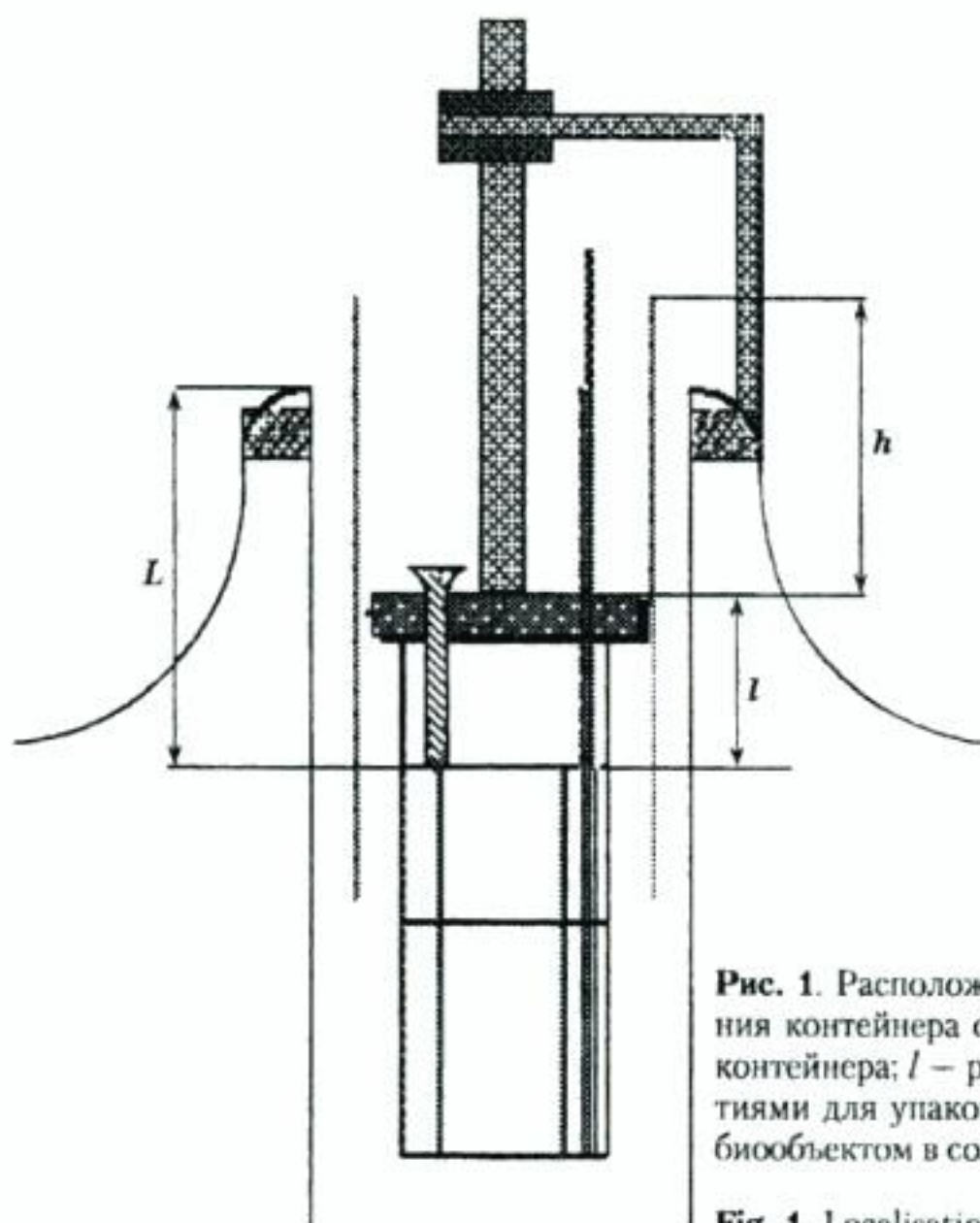


Рис. 1. Расположение термоблока в горловине сосуда Дьюара: L — глубина погружения контейнера от верхнего края горловины сосуда Дьюара; h — степень поднятости контейнера; l — расстояние между местом нахождения биообъекта и диском с отверстиями для упаковок (3,5 см); l_1 — высота контейнера (10 см); l_2 — расстояние между биообъектом в соломинке и ограничительной пластиной (6,5 см).

Fig. 1. Localisation of thermo-block in Dewar vessel neck: L — container immersing depth from the top edge of Dewar vessel neck; h — container lifting extent; l — distance between bioobject placing and disc with apertures for specimens (3.5 cm); l_1 — container height (10 cm); l_2 — distance between bioobject in straw and limiting plate (6.5 cm).

различного расположения корпуса относительно крепежного кронштейна с диском. При этом степень открытости термоблока меняется непрерывно от 0 до 100%, а скорость охлаждения — от 0,1 до 16,67 °C/мин для пробирок Уленгута (табл. 1) и до 23,3 °C для пластиковых соломинок с глубиной погружения термоблока от 6,1 до 22,5 см соответственно для каждой степени его открытости. Разработанное устройство позволяет воспроизводить следующие режимы: режим, предназначенный для краткосрочного хранения половых клеток и эмбрионов от комнатной температуры до 0 °C; режимы замораживания эмбрионов и ооцитов млекопитающих от 0 до -32 °C; режимы замораживания репродуктивных клеток и фрагментов тканей от 0 до -70 °C.

Для установления основных технологических параметров конкретных режимов замораживания различных типов биообъектов нами получено регрессионное уравнение, позволяющее по глубине

To determine the main technological parameters of distinct regimens of various biological objects freezing we have obtained a regression equation, that allows the determining of the final freezing temperature with the accuracy of ± 3 °C (for the container opening extent $S \leq 90\%$) by the L , the thermo-block immersing level, and S , its opening extent:

$$T_K(L, S) = L^2[b_4(1 - K_S) + b_3K_S] + L[b_5(1 - K_S) + b_2K_S] + b_6(1 - K_S) + b_1K_S,$$

where K_S and b_i are regression coefficients: $K_S = 1 - S/90$, $b_1 = -20.3$, $b_2 = 6.968$, $b_3 = -0.6143$, $b_4 = -0.3482$, $b_5 = 5.943$, $b_6 = -27.45$. It corresponds to an experimental value of freezing regimens reproducibility when meeting the laboratory norms ($T_{\text{room}} = 20 \pm 5$ °C) and technical requirements of Dewar vessel exploitation (cooling agent filling level of vessel is 25–100%).

Таблица 1

Зависимость скорости замораживания от глубины погружения термоблока и степени его открытости при различной конечной температуре охлаждения для пробирок Уленгута

Dependence of freezing rate vs. thermo-block immersing depth and its opening extent at various final cooling temperatures for Uhlenhuth tubes

Конечная температура, °C Final temperature, °C	Скорости замораживания (°C/мин) при различной степени открытости термоблока (%) и глубине погружения (см) Freezing rates (°C/min) at various thermo-block opening extent (%) and immersing depth (cm)							
	$S = 0$		$S = 35$		$S = 50$		$S = 100$	
	B	L	B	L	B	L	B	L
0 ± 1	0,14	6,1	0,37	7,3	0,41	8,6	0,58	7,5
-30 ± 3	0,22	12,5	0,45	13,5	0,61	15	2,76	16
-71 ± 5	0,69	16,3	1,04	17,8	1,19	19	8,5	20,5
-100 ± 5	1,03	18,5	2	20,2	2,91	21,7	16,67	22,5

погружения термоблока L и степени его открытости S определять конечную температуру замораживания с точностью до $\pm 3^\circ\text{C}$ для степени открытости контейнера $S \leq 90\%$:

$$T_K(L, S) = L^2[b_4(1 - K_S) + b_3K_S] + L[b_5(1 - K_S) + b_2K_S] + b_6(1 - K_S) + b_1K_S,$$

где K_S , b_i — коэффициенты регрессии: $K_S = 1 - S/90$, $b_1 = -20,3$, $b_2 = 6,968$, $b_3 = -0,6143$, $b_4 = -0,3482$, $b_5 = 5,943$, $b_6 = -27,45$.

Это соответствует экспериментальной величине повторяемости режимов замораживания при соблюдении лабораторных норм ($T_{\text{комн}} = 20 \pm 5^\circ\text{C}$) и технических условий использования сосудов Дьюара (уровень заполнения сосуда хладагентом 25–100%).

Успешное применение замораживателя на базе сосудов Дьюара X-34A и X-34B позволило определить его оптимальные параметры для сосуда X-5 (рис. 2). Разброс температуры относительно средней величины в сосуде X-5 (при имитации условий транспортировки) составил $\pm 5^\circ\text{C}$, тогда как в сосуде X-34B при стационарных условиях (без механического воздействия) — $\pm 2,5^\circ\text{C}$. Основываясь на результатах полученных распределений температуры в сосуде X-5, реализованы два режима: режим краткосрочного хранения около 0°C при глубине погружения контейнера в горловину сосуда Дьюара на 2,4 см и режим замораживания до -32°C ($L = 4,4$ см). Степень разброса температуры при реализации данных режимов соответствовала дисперсии распределения температуры в сосуде X-5 ($\pm 5^\circ\text{C}$). Столь значимая величина разброса температуры требует дополнительного контроля режима охлаждения в процессе замораживания и если необходимо корректировать этот режим изменением глубины погружения замораживателя в сосуд. Контроль и поддержание температуры осу-

Successful application of the freezer based on Dewar vessels X-34A and X-34B allows the determining of its optimal parameters for the vessel X-5. The temperature changes near the average temperature in X-5 vessel (when imitating transportation conditions) made $\pm 5^\circ\text{C}$, whereas the one for X-34B vessel under stationary conditions (without mechanic influences) made $\pm 2.5^\circ\text{C}$. Basing on the results of obtained temperature distribution in X-5 vessel the following regimens were realised: the regimen of short-term storage at 0°C with the container immersion level in Dewar vessel neck of 2.4 cm and the freezing regimen down to -32°C ($L = 4.4$ cm). When realising these regimens the temperature spreading extent corresponded to the dispersion of temperature distribution X-5 vessel ($\pm 5^\circ\text{C}$). Such a significant value of temperature spreading requires an additional control of cooling regimen at freezing process and, when needed, the correcting of this regimen with changing the immersing level of the freezer in vessel. The control and keeping of temperature are carrying out with the CT-17-380 Ohm posistor with an accuracy of 2°C . The advantage of this thermal gauge is the necessity absence of using of an amplifier, as it is done in case of thermocouple measuring, the second one is the exclusion of an immediate placing in the medium with biological object. A divergence of temperature indications in medium and in site of thermal gauge, caused by the influence of temperature gradient at the given cooling temperatures, is taken into account when making their standardisation.

To check the working capacity of proposed device we froze mice embryos, the integrity of which made $90.3 \pm 3.5\%$ ($n = 65/72$). This testifies to the possibility of applying the device both in laboratory and industrial conditions, to which a wide variation of environmental temperature, transportation process and possible absence of electrical energy could be referred. Total mass of its manual transportation for big distances is about 7 kg.

Two-factor theory of bioobject cryodamage by Mazur, defining an optimal rate of freezing of different types of mammalian sexual cells and embryos, is based on application of constant cooling rate [9]. Freezing of embryos with variable rate permits to realise the integrity of frozen-thawed bioobject at the same high level as at freezing with constant rate. The answer to the question: how the two-factor theory of cryodamage will act at the conditions of varying freezing rates, might be received after additional performance of the complex of the experimental studies. Probably they not only would add this theory but on its base they enable to develop a new technology of cryopreservation.

It is of common knowledge, that optimal freezing rate for cattle embryos, $0.3^\circ\text{C}/\text{min}$, determines essential extent of cell dehydration and by this prevents the formation of intracellular ice. In this case the cells are within several hours in hypertonic solution. To reduce fatal consequences of lyotropic effect is possi-

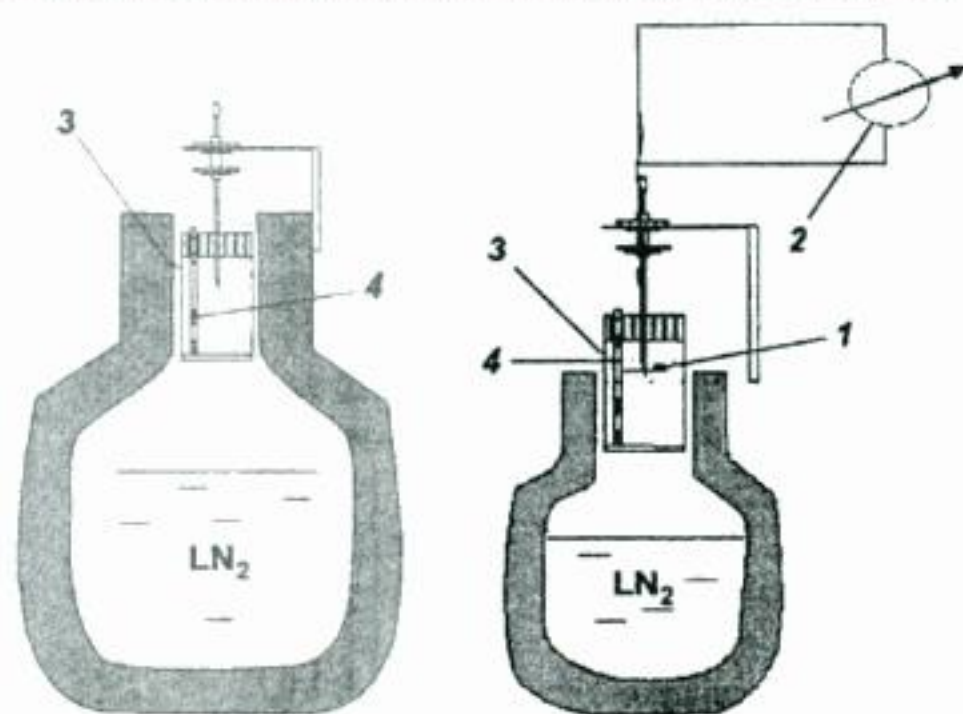


Рис. 2. Устройства для замораживания биообъекта: а — лабораторное X-34Б ($V = 35$ л); б — полевое X-5 ($V = 5$ л); 1 — термодатчик; 2 — измеритель сопротивления; 3 — термоблок с креплением; 4 — пластиковая соломинка, содержащая биообъект.

Fig. 2. Devices for bioobject freezing: а — the laboratory one, X-34B ($V = 35$ l); б — the field one, X-5 ($V = 5$ l); 1 — thermal gauge; 2 — resistance measurer; 3 — thermo-block with fastening; 4 — plastic straw with bioobject.

ществляются при помощи позистора СТ-17-380 Ом с точностью до 2 °С. Преимущество данного термодатчика в отсутствии необходимости использовать усилитель, как при измерениях, осуществляемых термопарой, а также в исключении его непосредственного помещения в среду с биообъектом. Расхождение показаний температуры в среде и месте нахождения термодатчика, вызванное влиянием ее градиента при заданных скоростях охлаждения, учитывается при проведении его калибровки.

Для проверки работоспособности предлагаемого устройства замораживали эмбрионы мыши, уровень сохранности которых составил $90,3 \pm 3,5\%$ ($n = 65/72$). Это свидетельствует о возможности применения устройства как в лабораторных, так и в производственных условиях, к которым следует отнести широкую вариацию окружающей температуры, процесс транспортировки и возможное отсутствие электроэнергии. Общая масса его ручной транспортировки на большие расстояния около 7 кг.

Двухфакторная теория криоповреждения биообъекта Мейзура, определяющая оптимальную скорость замораживания различных типов половых клеток и эмбрионов млекопитающих, основана на применении постоянной скорости охлаждения [9]. Однако эта величина не обязательно должна быть постоянной. Замораживание эмбрионов с переменной скоростью позволяет реализовать сохранность деконсервированного биообъекта на таком же высоком уровне, как и при замораживании с постоянной скоростью. Ответ на вопрос, как двухфакторная теория криоповреждения будет проявлять себя в условиях изменяющихся скоростей замораживания, может быть получен после дополнительного проведения комплекса экспериментальных исследований. Возможно, они не только дополнят эту теорию, но и на ее основе позволят разработать новую технологию криоконсервирования.

Общезвестно, что оптимальная скорость замораживания для эмбрионов КРС 0,3 °С/мин задает необходимую степень обезвоживания клеток и тем самым препятствует образованию внутриклеточного льда. При этом клетки пребывают в течение нескольких часов в гипертоническом растворе. Снизить пагубность лиотропного эффекта можно за счет оптимизации характера изменения скорости замораживания (применения ускоренных режимов). Нами на протяжении длительного времени проводилось криоконсервирование эмбрионов мыши и КРС разными способами с обязательным соблюдением одинаковой средней величины скорости замораживания (0,3 °С/мин) при охлаждении до -30 °С. Величины же скоростей замораживания в температурном диапазоне до -25 °С составляли: при замораживании в соломинках в сосуде Дьюара Х-34А - 0,6, в сосуде Х-34Б - 0,5, для пробирок Уленгута - 0,4 °С/мин, тогда как в замораживателе ЗЭМ4 скорость оставалась постоянной - 0,3 °С/мин. Уровни сохранности эмбрионов КРС при криоконсервировании с вышеперечисленными скоростями, имеющими различный характер изменения, составляли: $90 \pm 5,5$ ($n = 30$), $92 \pm 2,0$ ($n = 176$), $89,6 \pm 2,3$ ($n = 170$) и $87,7 \pm 4,0\%$ ($n = 68$) соответственно, то есть приблизительно были одинаковы. Это свидетельствует о том, что

ble due to optimisation of the character of the change in the freezing rate (when applying accelerated regimens). We during a long time cryopreserved the embryos of mice and cattle by different ways with obligatory keeping the similar mean value of freezing rate (0.3 °С/мин) when cooling down to -30 °С. The values of freezing rates within temperature range from -25 °С made: when freezing in the straws in Dewar vessel X-34А 0.6, in the vessel X-34Б - 0.5, for Uhlenhuth tubes - 0.4 °С/мин, whereas in the freezer ZEM4 the rate remain constant, 0.3 °С/мин. The rates of integrity of cattle embryos during cryopreservation with the listed above rates, having various character of change, made: 90 ± 5.5 ($n = 30$), 92 ± 2.0 ($n = 176$), 89.6 ± 2.3 ($n = 170$) and $87.7 \pm 4.0\%$ ($n = 68$), correspondingly, that is they were approximately similar. This testifies to the fact that the character of change in freezing rate within determined temperature range down to -25 °С has its optimal value at similar mean rate of freezing 0.3 °С/мин within temperature range down to -30 °С for mice and cattle embryos.

To determine admissible area of change in freezing rate we used the proposed device. Thermo-block was submerged to given depth for reaching final temperature of bioobject cooling -28 ± 2 °С. The time of preliminary cooling of the block was from 0 to 60 min, when the Uhlenhuth tube or straw were placed in it and maintained during 90 min for cell dehydration after that the containers with bioobject were transferred into liquid nitrogen. An average cooling rate of straws and Uhlenhuth tubes down to -30 °С made 0.3 °С/мин and within the range from -5 to -25 °С had different values (Table 2, Fig. 3). To find the tolerance limit of the value of the change in the cooling rate mice embryos were cryopreserved with accelerated freezing regimen. When using cooling rate of 0.3 °С/мин within temperature range from -5 down to -25 °С the integrity of $90.3 \pm 3.5\%$ ($n = 72$) was obtained, and at 2 °С/мин (accelerated regimen) made $77 \pm 7.7\%$ ($n = 30$). Although the increase in cooling rate in dehydration zone from 0.3 to 2 °С/мин results in the reduction of bioobject integrity, we suppose that application of accelerated regimen of freezing can be the base of development of new technology of cryopreservation of mammalian sexual cells and embryos, which will comprise the advantages of alternative freezing methods.

Reproducibility of freezing regimen for proposed device under laboratory conditions is determined by

Table 2
Dependence of freezing rate vs. time of thermo-block preliminary cooling

Time of thermo-block preliminary cooling, min	Mean cooling rate within the temperature range from -5 to -25 °С/мин	
	Uhlenhuth tubes	Plastic straws
0	0.4	0.5
20	0.8	1.4
40	1.1	2
60	2	3.3

характер изменения скорости замораживания в установленном диапазоне температур до -25°C имеет свое оптимальное значение при одинаковой средней скорости замораживания $0,3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ в диапазоне температур до -30°C для эмбрионов мыши и КРС.

Для определения допустимой области характера изменения скорости замораживания использовали предложенное устройство. Термоблок погружали на заданную глубину для достижения конечной температуры охлаждения биообъекта $-28 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Время предварительного охлаждения блока от 0 до 60 мин, затем в него помещали пробирку Уленгута или соломинку и выдерживали в течение 90 мин для обезвоживания клеток, после чего контейнеры с биообъектом переносили в жидкий азот. Средняя скорость охлаждения соломинок и пробирок Уленгута до -30°C составляла $0,3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, а в диапазоне от -5 до -25°C имела разные значения (табл. 2, рис. 3).

Таблица 2

Зависимость скорости замораживания от времени предварительного охлаждения термоблока

Время предварительного охлаждения термоблока, мин	Средняя скорость охлаждения в температурном диапазоне от -5 до $-25^{\circ}\text{C}/\text{мин}$	
	Пробирки Уленгута	Пластиковые соломинки
0	0,4	0,5
20	0,8	1,4
40	1,1	2
60	2	3,3

Для установления предельно допустимой величины характера изменения скорости охлаждения проведено криоконсервирование эмбрионов мыши ускоренным режимом замораживания. При использовании скорости охлаждения $0,3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ в температурном диапазоне от -5 до -25°C получена сохранность $90,3 \pm 3,5\%$ ($n = 72$), а при $2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ (ускоренный режим) — $77 \pm 7,7\%$ ($n = 30$). Хотя увеличение скорости охлаждения в дегидратационной зоне от $0,3$ до $2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ приводит к снижению сохранности биообъекта, нами выдвигается предположение, что применение ускоренного режима замораживания может быть основой разработки новой технологии криоконсервирования половых клеток и эмбрионов млекопитающих, которая будет включать преимущества альтернативных методов замораживания.

Повторяемость режима замораживания для предложенного устройства в лабораторных условиях определяется стабильностью распределения температуры в горловине сосуда Дьюара, что составляет $\pm 2,5^{\circ}\text{C}$ при условии заполнения сосуда не менее, чем на одну четверть от его общего объема. Индивидуальные свойства конкретного сосуда учитываются при настройке замораживателя, которая осуществляется каждые полгода. Повторяемость режимов охлаждения близка к общеизвестным способам криоконсервирования, основанным на активной подаче хладагента в замораживаемую камеру, что обусловлено термоинерционностью

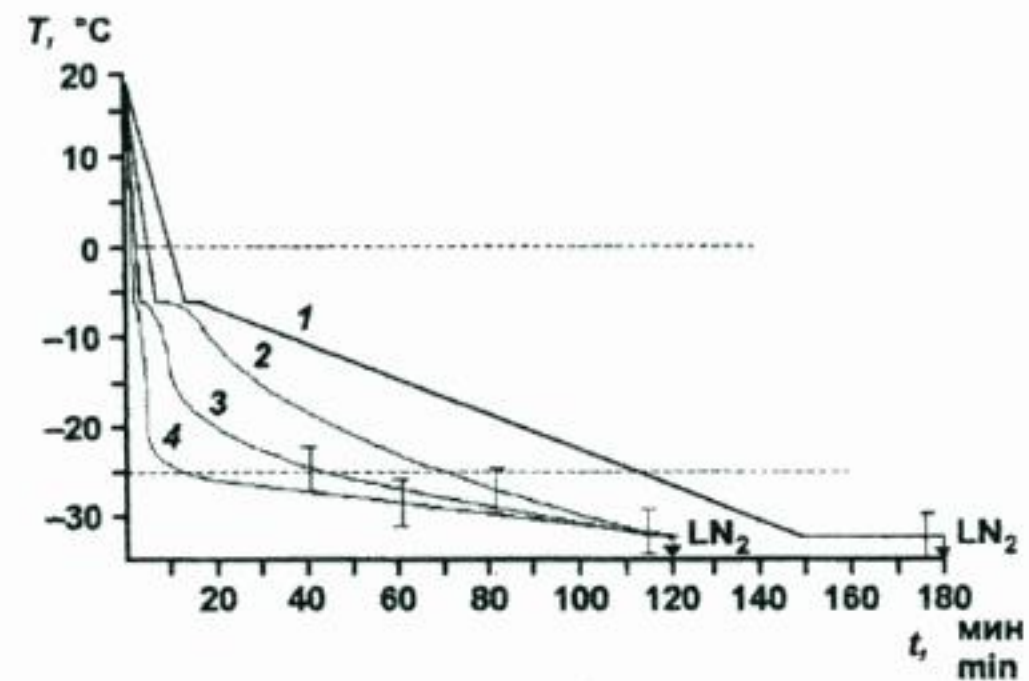


Рис. 3. Режимы замораживания эмбрионов млекопитающих в горловине сосуда Дьюара X-34Б: 1 — контролируемое программное замораживание с постоянной скоростью $0,3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$; 2 — режим пассивного замораживания в горловине сосуда Дьюара без предварительного охлаждения термоблока; 3 — в предварительно охлажденном термоблоке в течение 40 мин; 4 — в течение 60 мин.

Fig. 3. Regimens of mammalian embryos freezing in X-34B Dewar vessel neck: 1 — controlled programmable freezing with constant rate $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$; 2 — regimen of passive freezing in Dewar vessel neck without preliminary cooling of thermo-block; 3 — in preliminarily cooled thermo-block within 40 min; 4 — within 60 min.

the stability of temperature distribution in Dewar vessel neck, that makes $\pm 2.5^{\circ}\text{C}$ under condition of filling the Dewar not less than for 1/4th of its total volume. Individual properties of distinct vessel are taken into account when adjusting the freezer every half a year. The reproducibility of cooling regimens is close to commonly known cryopreservation ways, based on active supplying of cooling agent into freezing chamber, that is stipulated by thermal sluggishness of thermo-block and dosed supply of coolant. Temperature distribution for ZEM4 freezer makes $\pm 3^{\circ}\text{C}$ according to conducted measurements and passport data of device ($\pm 10\%$ within temperature range from 0 to -36°C). In addition no existing analogues permit to realise the freezing regimen with the rate, the character of the change of which would be close to the exponential dependence, describing the kinetics of bioobject dehydration. ZEM4 freezer enables to perform two regimens of cooling with constant rates: $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ from 20 to -7°C and $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ from -7 to -36°C , as well as from 20 to 0°C and from 0 to -36°C with the values of temperature change rate, correspondingly. Within temperature range from 0 to -35°C one can realise up to 9 cooling regimens with various rates and characters of their change. It is obvious that proposed device is inferior to existing analogues in technological ability of bioobject freezing process realisation with constant rate. However its application gives an opportunity to conduct investigations at different characters of freezing rate change up to given final temperatures, that is of certain scientific interest.

We believe, that essential condition for improvement of existing technologies as well as possibility of creation of new one is the optimisation of freezing rate

термоблока и порционной подачей хладагента. Разброс температуры для замораживателя ЗЭМ4 составляет $\pm 3^\circ\text{C}$ в соответствии с проведенными измерениями и паспортными данными устройства ($\pm 10\%$ в температурном диапазоне от 0 до -36°C). Кроме того, ни один из известных аналогов не позволяет реализовать режим замораживания со скоростью, характер изменения которой был бы близок к экспоненциальной зависимости, описывающей кинетику дегидратации биообъекта. Замораживатель ЗЭМ4 дает возможность осуществлять два режима охлаждения с постоянными скоростями: $1^\circ\text{C}/\text{мин}$ (от 20 до -7°C) и $0,3^\circ\text{C}/\text{мин}$ (от -7°C до -36°C), а также от 20 до 0°C и от 0 до -36°C с теми же величинами скорости изменения температуры соответственно. В температурном диапазоне от 0 до -35°C разработанного устройства можно реализовать до 9 режимов охлаждения с разными скоростями и характерами их изменения. Очевидно, что предложенное устройство уступает существующим аналогам в технологичности реализации процесса замораживания биообъекта с постоянной скоростью, однако его использование дает возможность проводить исследования при различных характерах изменения скорости замораживания до заданных конечных температур, что представляет определенный научный интерес.

Полагаем, что необходимым условием совершенствования существующих технологий, а также возможность создания новой является оптимизация характера изменения скорости замораживания ооцитов и эмбрионов млекопитающих повышением скорости охлаждения в области интенсивного кристаллообразования и снижением в области активной дегидратации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Безуглый Н. Д. Низкотемпературная консервация яйцеклеток и эмбрионов в биотехнологии воспроизведения сельскохозяйственных животных: Дис. ... докт. с/х наук. – Харьков, 1995. – 293 с.
2. Безуглый М. Д., Горбунов Л. В. Лабораторный прибор для замораживания биообъектов // НТБ. – Харьков, 1998. – № 75. – С. 83–87.
3. Замораживатель программный эмбрионов мобильный: Руководство по эксплуатации ЗЭМ4. – 1989. – 17 с.
4. Лакин Г. Ф. Биометрия. – М.: Высш. шк., 1980. – 352 с.
5. А. с. 1782568. МКИ⁵ А61Д19/04. Устройство для замораживания зародышей / Ф. И. Осташко, Н. Д. Безуглый, Е. Г. Валигура, Л. В. Горбунов. Заявлено 30.07.90. Опубл. 1992. – Бюл. изобр. – 1992. – № 4. – С. 35.
6. Пат. 1802700. МКИ⁵ А61Д19/00. Способ замораживания эмбрионов или яйцеклеток / Ф. И. Осташко, Н. Д. Безуглый, Е. Г. Валигура. Заявлено 29.03.91. Опубл. 1993. – Бюл. изобр. – 1993. – № 10. – С. 178.
7. De Paz P., Sanchez A. J., Fernandez J. G. et al. Sheep embryo cryopreservation by vitrification and conventional freezing // Theriogenology. – 1994. – 42. – P. 327–338.
8. Hiroto Uechi, Osamu Tsutsumi et al. Comparison of the effects of controlled-rate cryopreservation and vitrification on 2-cell mouse embryos and their subsequent development // Human Reproduction. – 1999. – 14, № 11. – P. 2827–2832.
9. Mazur P., Leibo S. P., Chu E. M. Y. A two-factor hypothesis of freezing injury // Exp. Cell Res. – 1972. – 71. – P. 345–355.
10. Sommerfeld V., Niemann H. Cryopreservation of bovine in vitro produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification // Cryobiology. – 1999. – 38. – P. 95–105.

Поступила 26.04.2001

change character for oocytes and embryos of mammals by means of the increase of cooling rate in the area of intensive crystal formation and reduction in the area of active dehydration.

REFERENCES

1. Bezugly N. D. Low temperature preservation of oocytes and embryos in reproduction biotechnology of agriculture animals: Thesis for obtaining of doctor's degree of agricultural sciences. – Kharkov, 1995. – 293 p.
2. Bezugly N. D., Gorbunov L. V. Laboratory device for bioobjects freezing // NTB. – 1998. – № 75. – Kharkov. – P. 83–87.
3. Embryos mobile programmable freezer: ZEM4 Exploitation manual. – 1989. – 17 p.
4. Lakin G. F. Biometry. – M.: Vysshaya shkola, 1980. – 352 p.
5. Author's certificate 1782568 ICI⁵ A61D19/04. Device for embryos freezing / F. I. Ostashko, N. D. Bezugly, Ye. G. Valigura, L. V. Gorbunov. Applied 30.07.90. Publ. 1992. – Bul. of Inventions. – 1992. – № 4. – P. 35.
6. Patent 1802700 ICI⁵ A61D19/00. Method for freezing embryos or oocytes / F. I. Ostashko, N. D. Bezugly, Ye. G. Valigura. Applied 29.03.91. Publ. 1993. – Bul. of Inventions. – 1993. – № 10. – P. 178.
7. De Paz P., Sanchez A. J., Fernandez J. G. et al. Sheep embryo cryopreservation by vitrification and conventional freezing // Theriogenology. – 1994. – 42. – P. 327–338.
8. Hiroto Uechi, Osamu Tsutsumi et al. Comparison of the effects of controlled-rate cryopreservation and vitrification on 2-cell mouse embryos and their subsequent development // Human Reproduction. – 1999. – 14, № 11. – P. 2827–2832.
9. Mazur P., Leibo S. P., Chu E. M. Y. A two-factor hypothesis of freezing injury // Exp. Cell Res. – 1972. – 71. – P. 345–355.
10. Sommerfeld V., Niemann H. Cryopreservation of bovine in vitro produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification // Cryobiology. – 1999. – 38. – P. 95–105.

Accepted in 26.04.2001

Криоконсервирование спермы петухов II. Криопротекторная активность амидов и диолов

Т. П. ЛИННИК

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

О. В. БИЗИКИНА

НИИ птицеводства УААН, Борки, Харьковская обл.

Fowl Sperm Cryopreservation II. Amide and Diol Cryoprotective Activity

T. P. LINNIK

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

O. V. BIZIKINA

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

Изучена криопротекторная активность 16 соединений двух гомологических рядов амидов и диолов при криоконсервировании спермы петухов. Показано, что в ряду амидов лучшими криопротекторами являются N,N-диметилформамид (ДМФА), N-метилацетамид (МАЦ) и N,N-диметилацетамид (ДМАЦ), в ряду диолов — этиленгликоль (ЭГ), 1,2-пропандиол (1,2-ПД) и 2,3-бутандиол (2,3-БД). По степени уменьшения криопротекторной активности указанные вещества распределились в ряд: ДМФА > ДМАЦ > 1,2-ПД > МАЦ > ЭГ > 2,3-БД. Установлена корреляция между криопротекторной активностью веществ и их криоскопической константой. Предложено использовать криоскопическую константу в дополнении к другим характеристикам гидрофильности веществ в доэкспериментальном скрининге эффективных криозащитных агентов.

Вивчена криозахисна активність 16 з'єднань двох гомологічних рядів амідів і діолів при криоконсервуванні сперми півнів. Показано, що в ряді амідів кращими криопротекторами є N,N-диметилформамід (ДМФА), N-метилацетамід (МАЦ) і N,N-диметилацетамід (ДМАЦ), у ряді діолів — етиленгліколь (ЕГ), 1,2-пропандіол (1,2-ПД) і 2,3-бутандіол (2,3-БД). За ступенем зменшення криозахисної активності зазначені речовини розподілилися в ряд: ДМФА > ДМАЦ > 1,2-ПД > МАЦ > ЕГ > 2,3-БД. Установлена кореляція між криопротекторною активністю речовин і їх криоскопічною константою. Запропоновано використовувати криоскопічну константу як доповнення до інших характеристик гідрофільності речовин у доекспериментальному скринінгу ефективних криозахисних агентів.

Cryoprotective activity of 16 compounds of two homologous series of amides and diols at fowl sperm cryopreservation was studied. It was shown, that in amide series the best cryoprotectants were N,N-dimethyl formamide (DMFA), N,N-methyl acetamide (MAC) and N,N-dimethyl acetamide (DMAC), in diol series: ethylene glycol, 1,2-propanediol (1,2-PD) and 2,3-butanediol (2,3-BD). On the degree of cryoprotective activity reduction the mentioned substances were distributed in the series: DMFA > DMAC > 1,2-PD > MAC > EG > 2,3-BD. Correlation between cryoprotective activity of substances and their cryoscopic constant was established. Cryoscopic constant was proposed for usage in addition to other characteristics of wetting ability of substances in a pre-experimental screening of effective cryoprotective agents.

Глубокие исследования в области криоконсервирования спермы птиц, в частности спермы петухов, начались в 70-е годы [11, 12]. Но, как и для спермы большинства других видов животных, около 50% сперматозоидов петухов не восстанавливают своих функций после оттаивания. Поэтому хорошие показатели оплодотворенности яиц и вывода молодняка обеспечиваются за счет увеличения кратности осеменения и повышения в 8–10 раз концентрации сперматозоидов по сравнению с используемой при осеменении свежей спермой. Кроме того, разработанные способы криоконсервирования спермы петухов имеют ряд недостатков технологического порядка: результаты не стабильны, трудно воспроизводимы, особенно на разных породах петухов. Таким образом, несмотря на достигнутые успехи в области криоконсервирования

Profound investigations in the field of poultry sperm, in particular for fowl sperm cryopreservation have been started in the 70-s [11, 12]. However, as for sperm of majority of other kinds of animals, about 50% of fowl spermatozoa do not recover their functions after thawing. Therefore the good indices of egg fertilization extent of hatching of young birds are provided due to an increase in the insemination multiplicity and spermatozoa concentration in 8–10 times in comparison with fresh sperm used at the insemination. In addition the developed ways of fowl sperm cryopreservation have some technological disadvantages: the results are not stable, hardly reproducible, especially in different fowl breed. Thus, in spite of the successes achieved in the field of fowl sperm cryopreservation, the methods proposed are far from perfection.

спермы петухов, предложенные методы далеки от совершенства.

Практически ни один метод криоконсервирования спермы птиц не обходится без использования криозащитных сред, главным компонентом которых являются криопротекторы. Именно состав и физико-химические свойства защитной среды определяют эффективность низкотемпературной консервации объекта. Но до сих пор поиск эффективных криопротекторов, не обладающих цитотоксичным действием, и оптимизация многокомпонентных криозащитных сред проводятся эмпирически. Не ясна природа токсичности криопротекторов, не существует общепризнанной концепции механизма их защитного действия. "Коллигативная теория", получившая наиболее широкое распространение, не может объяснить ряд экспериментальных фактов и не дает надежного прогнозирования эффективности криопротекторов, так как не учитывает особенности конкретных биологических объектов. Поэтому исследование зависимости токсичности и криопротекторной активности веществ от их физико-химических свойств, особенно в гомологических рядах с постепенно усложняющейся структурой, до настоящего времени остается в центре внимания криобиологов.

Цель данной работы — сравнительное изучение криопротекторной активности двух гомологических рядов соединений диолов и амидов, представители которых (ЭГ, ДМФА и ДМАЦ) применяются при криоконсервировании спермы петухов [11].

Получение и методы оценки жизнеспособности спермы петухов описаны в [7]. Оплодотворяющую способность спермы определяли следующим образом. Осеменение кур криоконсервированной спермой проводили первые два дня подряд, затем один раз в 3–4 дня. Доза осеменения 0,12–0,13 мл. Оплодотворяющую способность спермы учитывали по развитию эмбриона после 1–2 сут инкубации путем вскрытия яиц или же на 7-й день инкубации при их овоскопировании.

Для криоконсервирования спермы использовали два метода замораживания: в гранулах и пайетах. В гранулах объемом 0,05 мл замораживание проводили на фторопластовой, дополнительно гидрофобизированной подложке (температура подложки -135°C) на лабораторной установке. Гранулы выдерживали 30 с, затем погружали в азот. Размораживали гранулы на предметном стекле с интегральной скоростью около $400^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Сперму для замораживания в пайетах разбавляли криозащитной средой в соотношении 1:1 при температуре $20\text{--}25^{\circ}\text{C}$, затем охлаждали в течение 20–30 мин до 4°C и добавляли криопротектор с концентрацией до 1,5 М. Сперму в пайетах замораживали на программном замораживателе УОП-3 (ИПККиК НАНУ) со скоростью охлаждения $3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до начала кристаллизации, выдерживали 1–3 мин на плато кристаллизации, затем замораживали до

The methods practically can not do without usage of cryoprotective media, which main component are cryoprotectants. Namely, the composition and physical and chemical properties of cryoprotective medium determine the efficiency of low temperature preservation of an object. However up today the search for effective cryoprotectants without cytotoxic effect and the optimisation of polycomponent cryoprotective media have been carried out empirically. The nature of cryoprotectants toxicity is not clear, there is not a commonly recognised conception of the mechanism of their cryoprotective effect. "Colligative theory", gained the widest spreading, can not explain the series of experimental factors and does not provide a reliable forecast of cryoprotectant efficiency, because it does not take into account the peculiarities of certain biological objects. Therefore the study of the dependency of toxicity and cryoprotective activity of substances, especially, in homologous series with gradually complicating structure, has remained until now in the centre of cryobiologists' attention.

The aim of this work was a comparative study of cryoprotective activity of two homologous series of diol and amide compounds, which representatives (ethylene glycol, N,N-dimethyl formamide and N,N-dimethyl acetamide) are applied when cryopreserving the fowl sperm [11].

Procurement and evaluation methods of fowl sperm viability are described in the paper [7]. Sperm fertilising ability was determined by the following way. Poultry insemination by cryopreserved sperm was performed during first two days, then one time in 3–4 days. Insemination dose was 0.12–0.13 ml. Sperm fertilising ability was taken into consideration according to the embryo development after 1–2 days of incubation by means of egg opening or by the 7th day of incubation at their ovoscopy.

For sperm cryopreservation we used two methods of freezing: in granules and pailletes. Freshly obtained sperm was diluted by a cyoprotective medium in 1:1 ratio at the temperature of $20\text{--}25^{\circ}\text{C}$, then cooled within 20–30 min down to 4°C and a cryoprotectant with the concentration within the range from 0.5 to 1.5 M was added. In granules with volume of 0.05 ml the freezing was carried-out on fluoroplastic additionally water-repellency treated embedding (with temperature of -135°C) on laboratory scale-plant. Granules exposed 30 s, then were immersed into nitrogen. Granules were frozen-thawed on a covering glass with an integral rate about $400^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Sperm in pailletes was frozen by a programmable freezing УОП-3 (Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine) with $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ freezing rate up to the crystallisation begin, exposed for 1–3 min at the crystallisation plateau, then frozen with the rate of $25\text{--}30^{\circ}\text{C}/\text{min}$ down to -20°C and -80°C with the rate of $70^{\circ}\text{C}/\text{min}$, further immersed into a liquid ni-

-20 °C со скоростью 25-30 °C/мин и до -80 °C со скоростью 70 °C/мин, далее погружали в жидкий азот. Размораживали сперму в водяной бане при 40 °C.

Для разбавления спермы использована среда следующего состава, г: глутамат натрия — 2,85; фруктоза — 0,5; инозит — 0,25; ацетат магния — 0,07; ацетат калия — 0,5 в 100 мл воды. Осмотичесность 370 мОсморь/кг, рН 6,9.

Исследованы 8 соединений ряда диолов и 8 соединений ряда алифатических амидов (табл. 1). Все соединения марки "ч.д.а." и "х.ч." дополнительно очищали и идентифицировали общепринятыми методами [1]. Для описания структуры веществ применяли собственные и литературные данные их физико-химических характеристик [2, 3, 5, 8] (табл. 2). Методы измерения физико-химических свойств веществ приведены в [6, 8]. Криоскопическая константа рассчитана общепринятым способом [1].

trogen. Sperm was frozen-thawed at a water bath at 40 °C.

For sperm dilution one used the medium of the following composition, g: sodium glutamate — 2.85; fructose — 0.5; inositol — 0.25; manganese acetate — 0.07; potassium acetate — 0.5 in 100 ml of water. Osmotic pressure was 370 mOsm/kg, pH 6.9.

Eight compounds of diol series of aliphatic amides (Table 1) were studied. All compounds of "chemically pure" and "pure for analysis" labels were additionally purified and identified using the commonly acquired methods [1]. For describing the structure of substances we applied own and literature data of their physical and chemical characteristics [2, 3, 5, 8] (Table 2). The methods for measuring physical and chemical properties of substances are presented in the [6, 8]. Cryoscopic constant was calculated by a commonly used method [1].

Таблица 1

Table 1

Сохранность сперматозоидов петухов после замораживания-оттаивания в присутствии амидов и диолов
Integrity of fowl spermatozoa after freeze-thawing in the presence of amides and diols

Вещество Substance	Подвижность после замораживания, % Motility after freezing, %	Количество спермиев, % Spermatozoa number, %		Абсолютная переживаемость S, усл. ед Absolute survival S, relative units
		с целыми мембранами головки with integral head membranes	с целыми акросомами with integral acrosomes	
Амиды / Amides:				
Формамид (ФА) Formamide (FA)	8 ± 5	13,7 ± 0,7	10,4 ± 1,1	34
Ацетамид (АЦ) Acetamide (AC)	17 ± 4	34,5 ± 0,5	18,1 ± 1,3	44
N-метилацетамид (МАЦ) N-methylacetamide (MAC)	56 ± 5	69,4 ± 0,4	36,4 ± 0,7	132
N,N-диметилформамид (ДМФА) N,N-dimethylformamide (DMFA)	55 ± 3	68,5 ± 0,3	39,6 ± 0,4	143
N,N-диметилацетамид (ДМАЦ) N,N-dimethylacetamide (DMAC)	50 ± 5	66,1 ± 0,3	32,8 ± 0,9	125
Ацетилморфолин (АЦМОР) Acethylmorpholine (ACMOR)	15 ± 5	17,7 ± 1,2	8,4 ± 1,3	84
N-(β-оксиэтил)ацетамид (ОЭА) N-(β-oxyethyl) acetamide (OEA)	10 ± 5	15,5 ± 1,4	9,3 ± 1,7	74
N,N-(β-диоксиэтил)ацетамид (ДОЭА) N,N-(β-dioxyethyl)acetamide (DOEA)	8 ± 4	21,4 ± 1,6	2,6 ± 0,6	42
Диолы / Diols:				
Этиленгликоль (ЭГ) Ethylene glycol (EG)	39 ± 4	42,1 ± 0,3	20,2 ± 0,7	122
1,3-пропандиол (1,3-ПД) 1,3-propanediol (1,3-PD)	15 ± 5	16,8 ± 0,9	5,2 ± 0,4	18
1,2-пропандиол (1,2-ПД) 1,2-propanediol (1,2-PD)	48 ± 3	51,7 ± 0,5	29,4 ± 1,2	128
2-метоксиэтанол (2-МЭ) 2-metoxyethanol (2-ME)	20 ± 5	24,7 ± 1,2	11,6 ± 0,8	82
1,4-бутандиол (1,4-БД) 1,4-butanediol (1,4-BD)	20 ± 5	12,6 ± 0,7	9,3 ± 0,6	75
1,3-бутандиол (1,3-БД) 1,3-butanediol (1,3-BD)	15 ± 5	12,4 ± 0,9	8,4 ± 0,7	55
2,3-бутандиол (2,3-БД) 2,3-butanediol (2,3-BD)	36 ± 5	40,3 ± 1,1	14,1 ± 0,7	116
1,2-бутандиол (1,2-БД) 1,2-butanediol (1,2-BD)	5 ± 3	10,7 ± 0,6	3,4 ± 0,6	19

Таблица 2

Table 2

Физико-химические свойства веществ ряда амидов и диолов

Physical and chemical properties of substances of amide and diol series

Вещество Substance	Молекулярная масса Molecular mass	Температура заморозания чистых веществ, °C [5] Temperature of freezing of pure substances, °C [5]	Температура плавления 35%-х растворов, °C Melting temperature of 35% solutions, °C	Теплота смешения с водой, Дж/моль Heat of mixing with water, J/M	Растворимость солей в 50%-х растворах веществ при 0 °C, моль/л Solubility of salts in 50% solutions of substances constant under 0 °C, M/l		Криоскопическая константа, град·кг/моль Cryoscopic constant, degree·kg/M	
					NaCl	KCl	$K_{\text{рас}} / C_{\text{sol}}$	[5]
Амиды / Amides:								
ФА / FA	45,04	2,6	-18,5	-65	3,10	2,03	2,4	2,57
АЦ / AC	59,07	81	-15,4	-393	2,32	1,09	3,0	3,80
МАЦ / MAC	73,10	30,6	-23,4	405	1,69	0,646	5,2	5,77
ДМФА / DMFA	73,10	-61	-15,1	660	2,27	0,772	4,2	4,40
ДМАЦ / DMAC	87,12	20	-14,8	946	1,44	0,522	3,7	—
АЦМОР / ACMOR	129,06	—	-8,2	676	2,37	0,908	3,0	—
ОЭА / OEA	103,12	—	-10,8	507	2,13	1,06	3,4	—
ДОЭА / DOEA	147,0	—	-5,4	482	2,42	0,24	2,3	—
Диолы / Diols:								
ЭГ / EG	62,07	-12,7	-17,8	670	2,95	1,64	3,2	—
1,3-ПД / 1,3-PD	76,10	-30	-14,1	735	2,25	0,95	3,1	—
1,2-ПД / 1,2-PD	76,10	-60	-17,0	846	2,01	0,93	3,7	—
2-МЭ / 2-ME	76,10	—	-18,0	1 410	1,90	0,89	3,9	—
1,4-БД / 1,4-BD	90,12	20,2	-11,4	540	1,88	0,77	2,9	—
1,3-БД / 1,3-BD	90,12	-77	-12,9	620	1,85	0,76	3,3	—
2,3-БД / 2,3-BD	90,12	19,0	-16,2	800	1,87	0,76	4,2	—
1,2-БД / 1,2-BD	90,12	—	-13,7	510	1,80	0,73	3,5	—

Примечание. Растворимость NaCl в воде 5,44 моль/л, KCl — 3,4 моль/л.

Note. NaCl solubility in water is 5.44 M/l, for KCl is 3.4 M/l.

В табл. 1 приведены данные о сохранности сперматозоидов петухов после замораживания-оттаивания в присутствии исследованных диолов и амидов. Оценка всех показателей сохранности сперматозоидов, кроме их переживаемости, проводилась сразу после оттаивания. Лучшие результаты получены с МАЦ, ДМАЦ и ДМФА из класса амидов и с ЭГ, 1,2-ПД и 2,3-БД из ряда диолов. Более высокую криопротекторную активность проявляют вещества, которые были менее цитотоксичны до замораживания [7]. При этом амиды сохраняют после оттаивания до 65% морфологически целых клеток и до 55% подвижных, в то время как под защитой диолов удается сохранить не более 48% сперматозоидов с поступательным движением и не более 50% морфологически целых клеток.

В табл. 3 представлены результаты определения оплодотворяющей способности криоконсервированной спермы петухов в присутствии 5 соединений ряда амидов и 4 веществ ряда диолов. При осеменении кур спермой, замороженной с остальными веществами, оплодотворенных яиц получить не удалось. Как видно из табл. 1 и 3, имеются некоторые расхождения между морфологической сохранностью сперматозоидов, криоконсервированных с исследуемыми веществами, и их оплодотворяющей способностью.

Учитывая морфологическую целостность клеток после оттаивания, вещества по степени уменьшения их криопротекторной активности распределяются в следующий ряд:

Table 1 shows the data on fowl spermatozoa integrity after freeze-thawing at the presence of studied diols and amides. The evaluation of all indices of spermatozoa integrity, except their survival, was carried-out just after thawing. The best results were obtained with MAC, DMAC and DMFA from amide series and with EG, 1,2-PD and 2,3-BD from diol series. The substances, which were less toxic before freezing [7] manifested a higher cryoprotective activity. Thereat the amides kept up to 65% of morphologically integral cells and up to 55% of motile ones after thawing, meanwhile under diol protection we managed to preserve not more, than 48% of progressively and forwardly moving spermatozoa and not more than 50% of morphologically integral cells.

Table 3 demonstrates the results of determination of fertilizing ability of fowl cryopreserved sperm in the presence of 5 compounds of amide series and 4 substances of diol ones. When inseminating hens with the sperm, frozen with the rest substances, we managed to obtain no fertilised eggs.

As it is seen from the Table 1 and 3 there are some deviations between morphologically integrity of spermatozoa, cryopreserved with the studied substances and their fertilizing ability.

Taking into consideration cell morphological integrity after thawing, the substances according to the degree of decrease in their cryoprotective activity are distributed in the following way:

MAC > DMFA > DMAC > 1,2-PD > EG > AC >
> 2,3-BD > 2-ME > ACMOR,

Таблица 3

Table 3

Оплодотворяющая способность спермы петуха, криоконсервированной в присутствии амидов и диолов
Fertilising ability of fowl sperm, cryopreserved in the presence of amides and diols

Вещество Substance	Количество яиц, заложённых на инкубацию, шт. Number of eggs, placed for incubation, pieces	Оплодотворенность яиц Fertilisation extent of eggs		Выводимость яиц Hatching of eggs		Вывод молодняка, % Hatching of young birds, %
		шт / pieces	%	шт / pieces	%	
Амиды / Amides:						
АЦ / AC	102	16	15,7	12	75,0	11,8
МАЦ / MAC	91	41	45,1	37	90,2	40,7
ДМАЦ / DMAC	179	125	69,8	104	83,2	58,1
АЦМОР / ACMOR	127	108	85,0	91	84,3	71,7
	117	3	2,6	3	100,0	2,6
Диолы / Diols:						
ЭГ / EG	91	39	42,9	34	87,2	37,4
1,2-ПД / 1,2-PD	91	56	61,5	43	76,8	47,3
2-МЭ / 2-ME	83	5	6,0	3	60,0	3,6
2,3-БД / 2,3-BD	82	23	28,0	13	56,5	15,9

МАЦ > ДМФА > ДМАЦ >
> 1,2-ПД > ЭГ > АЦ > 2,3-БД > 2-МЭ > АЦМОР,
в то время как по степени восстановления оплодотворяющей способности вещества в ряду распределяются по-иному:
ДМФА > ДМАЦ > 1,2-ПД > МАЦ > ЭГ >
> 2,3-БД > АЦ > 2-МЭ > АЦМОР.

Анализ данных показывает, что хорошая корреляция наблюдается между подвижностью сперматозоидов и сохранностью их цитоплазматических мембран, что согласуется с результатами исследований, полученными для сперматозоидов других видов животных [13, 15]. С оплодотворяющей способностью сперматозоидов в большей степени коррелирует целостность их акросом и переживаемость (см. табл. 1 и 3). Но процент оплодотворенных яиц, получаемых после искусственного осеменения криоконсервированной спермой, зависит не только от восстановления функций сперматозоидов после оттаивания, но в значительной степени от выбора кур и самой процедуры осеменения. Поэтому для оценки криопротекторной активности веществ следует учитывать весь комплекс показателей сохранности сперматозоидов.

Почему одни вещества эффективно защищают клетки от действия низких температур, а другие нет? Если рассматривать механизм криозащитного действия веществ на основе “коллигативной теории”, следует исходить из того, что криопротекторная активность не должна зависеть от химической структуры веществ, а только от их концентрации. Предполагалось, что способность криопротекторов создавать при вымораживании воды в клеточной суспензии незамерзающую фазу, разбавляющую повышенные концентрации солей, “пропорциональна числу молекул всех веществ, растворенных в данном объеме раствора, и не зависит от природы этих веществ” [14]. С одной стороны, смысл понятия “коллигативные свойства” тот же, что и в физической химии, но применяется для анализа явле-

meanwhile according to the degree of fertilising ability preservation the substances in the series are distributed in a different way:

DMFA > DMAC > 1,2-PD > MAC > EG >
> 2,3-BD > AC > 2-ME > ACMOR.

Data analysis demonstrates, that a good correlation is observed between spermatozoa motility and the integrity of their cytoplasmatic membranes, that is in accordance with the investigation results, obtained for spermatozoa of other animal kinds [13, 15]. The integrity of spermatozoa acrosomes and survival correlates in the greater extent with their fertilising ability (see Table 1 and 3). However the percentage of fertilised eggs, obtained after artificial insemination by cryopreserved sperm depends not only on the recovery of spermatozoa functions after thawing, but in a greater extent on hen selection and the insemination procedure itself. Therefore in order to estimate a cryoprotective activity of substances we should take into account all the complex of indices of spermatozoa integrity.

Why do some substances effectively protect cells from low temperature effect, but another do not? If we consider the mechanism of cryoprotective effect of substances at the base of “colligative theory”, we should proceed from the fact, that cryoprotective activity should not depend on chemical structure of substances, but only on their concentration. As it has been supposed, that the capability of cryoprotectants to create during water freezing a not-freezing phase in a cellular suspension, diluting the increased saline concentrations, is “proportional to molecule number of all substances, diluted in this volume of solution and does not depend on the nature of these substances” [14], so from one side the meaning of notion “colligative properties” is the similar, as in physical chemistry, but it is applied for phenomena analysis of another order. From another side, the main requirements made to the cryoprotectants (the capability to penetrate well into a cell, be a non-toxic under high

ний другого порядка, с другой — основные требования, предъявляемые криопротекторам (способность хорошо проникать в клетку, быть не токсичными в больших концентрациях, обладать высокой гидрофильностью), обусловлены определенным диапазоном физико-химических свойств [6, 8, 9] и, следовательно, лишь относительно “не зависят от природы веществ”. Следует учитывать, что этот вывод сделан по отношению к эритроцитам, не совсем типичным клеткам. Поэтому закономерности, полученные в экспериментах с эритроцитами, переносить на другие виды клеток следует с осторожностью, особенно на сперматозоиды, которые имеют сложную морфологию, неоднородную структуру и гетерогенную цитоплазматическую мембрану, отличающуюся по своим свойствам на разных участках.

В данной части исследования рассматриваются характеристики соединений, обуславливающие их сродство к воде, — гидрофильность и способность растворять электролиты (соли NaCl и KCl). В табл. 2 представлены физико-химические свойства веществ ряда амидов и диолов, достаточно адекватно отражающие характер и силу их взаимодействия с водой [3, 4], — теплоты смешения (или гидратации), температуры плавления водных растворов и криоскопическая константа. Признано [8, 9], что достаточными условиями для проявления криопротекторной активности веществ являются отсутствие у них высокой гидрофобности (коэффициент распределения в системе вода–октанол меньше 2), наличие сильной гидрофильности (температура эвтектики ниже -10°C , теплота смешения с водой не менее 600 Дж/моль) и способность хорошо растворять соли. Исследования были проведены на эритроцитах и по данным [8] все соединения, имеющие температуру плавления 35%-го раствора веществ ниже -11°C , отнесены к эффективным криопротекторам. При этом 8 веществ из изученных 15 соединений ряда диолов сохраняли эритроциты после оттаивания на одном уровне.

Как видно из табл. 2, все исследованные вещества, кроме АЦМОР и ДОЭА, имеют температуру плавления 35%-х водных растворов ниже -11°C , но криопротекторную активность по отношению к сперме петуха проявляют лишь 9 веществ из изученных 16. Действительно эффективными криопротекторами являются не более 5 соединений. При этом ФА с температурой плавления $-18,5^{\circ}\text{C}$ не оказывает криозащитного действия при замораживании спермы петуха, а АЦМОР с температурой плавления всего лишь $-8,2^{\circ}\text{C}$ позволяет сохранить до 15–20% морфологически целых клеток и оплодотворяющую способность, но на очень низком уровне (табл. 1 и 3). Таким образом, просто понижение температуры плавления водных растворов веществ не может служить критерием их криопротекторной активности. Поэтому для оценки степени гидрофильного взаимодействия ве-

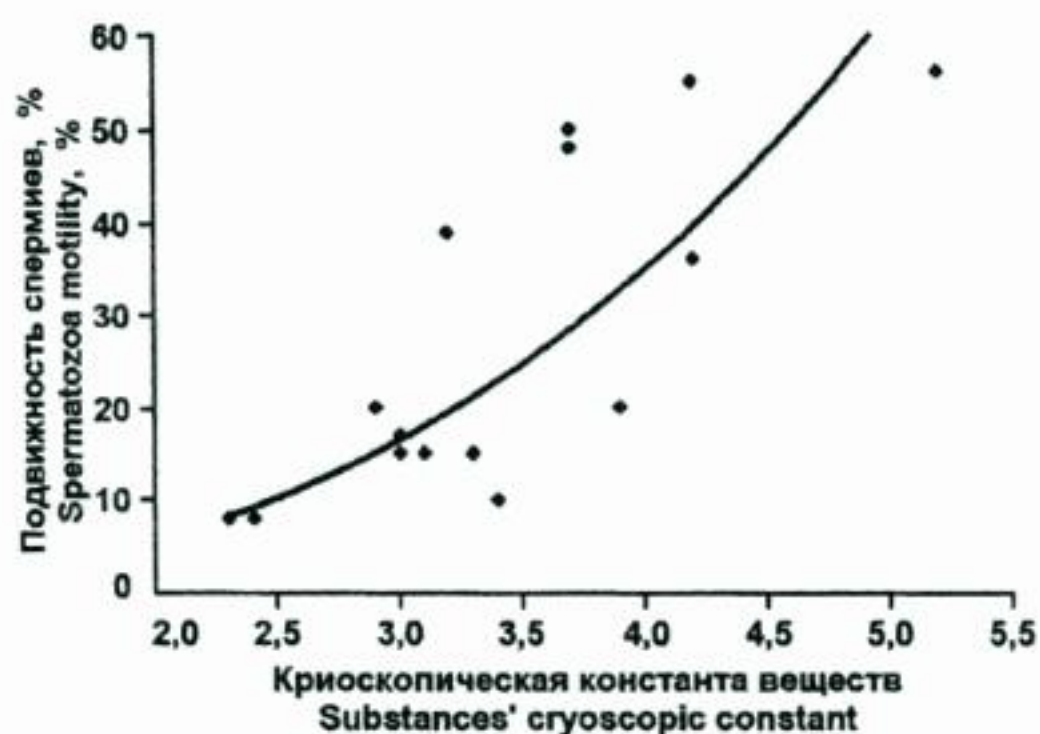
concentrations, to possess a high hydrophilic ability) are stipulated by certain range of physical and chemical properties [6, 8, 9], and, consequently, only relatively “do not depend on the nature of substances”. And, finally, it should be taken into account that this conclusion is made in respect to erythrocytes, not quite typical cells. Therefore the regularities, obtained during experiments with erythrocytes, should be transferred to other types of cells carefully, especially to spermatozoa, which have a complicated morphology, inhomogeneous structure and heterogeneous cytoplasmatic membrane, differing by its properties at various sites.

Characteristics of compounds, stipulating their affinity both in water: hydrophilic ability, and the capability to dissolve electrolytes (salts of NaCl and KCl) are considered in this part of investigations. The Table 2 shows the physical and chemical properties of substances of amide and diol series, reflecting quite adequately [3, 4] the character and power of their interaction with water: heat of mixing (or hydration), melting point of aqueous solution and a cryoscopic constant. It was recognised [8, 9], that the sufficient conditions for the manifestation of cryoprotective activity of substances were the absence in them of a high hydrophoby (distribution coefficient in water-ectanol system was lesser than 2), the presence of a high hydrophilic ability (namely, the temperature of eutectics was lower than -10°C , heat of mixing with water was not less than 600 J/M) and the capability to dissolve well the salts. The investigations were carried-out in erythrocytes and according to the data [8] all the compounds with the melting point of 35% solution of compounds lower than -11°C , were related to efficient cryoprotectants [8], in this case 8 substances of the studied 15 compounds of diol series preserved erythrocytes after thawing at the same level.

The Table 2 shows, that all studied substances, except ACMOR and DOEA have the melting point of 35% aqueous solutions lower than -11°C , but only 9 substances of 16 studied ones manifest a cryoprotective activity in respect of fowl sperm. Besides, not more than 5 compounds are really efficient cryoprotectants. Thereat FA with -18.5°C melting point does not cause a cryoprotective effect during fowl sperm freezing, but ACMOR with melting point of -8.2°C only preserves up to 15–20% of morphologically integral cells and fertilising ability, but at a very low level (Table 1 and 3). Thus, only a reduction of melting point of aqueous solutions can not serve as a criterion of their cryoprotective activity. Therefore in order to estimate the degree of hydrophilic interaction of substances with water we additionally used a cryoscopic constant, characterising a decrease in melting point of a solution, caused by 1 M of solved substance. Cryoscopic constant reflects and takes account of deviation causes of an ideal behaviour of solutions, for example, a strong hydration of substances or a solvent

ществ с водой дополнительно использована криоскопическая константа, которая характеризует понижение температуры плавления раствора, вызванное 1 М растворенного вещества. Криоскопическая постоянная отражает и учитывает причины отклонения от идеального поведения растворов, например, сильную гидратацию веществ или структурированность растворителя. На рисунке приведена зависимость криопротекторной активности веществ от их криоскопической константы. Как видно из рисунка и табл. 2, вещества с константой > 3 проявляют эффективную криопротекторную активность. Обнаружено, что это единственная физико-химическая характеристика веществ из изученных ранее [6, 8, 9, 14], достаточно хорошо коррелирующая со всеми показателями сохранности сперматозоидов, криоконсервированных под их защитой. Коэффициенты парной линейной корреляции между криоскопической константой и подвижностью сперматозоидов после оттаивания, числом спермиев с целыми мембранами головок и целыми акросомами равны 0,78; 0,76 и 0,73 соответственно. При этом в пределах одного гомологического ряда коэффициент корреляции еще выше. Например, для амидов — 0,87; 0,85 и 0,89. У диметилсульфоксида по данным [5] криоскопическая константа равна 4, что соответствует установленным пределам, необходимым для проявления криопротекторной активности.

Температура плавления водных растворов и криоскопическая константа отражают интегральную сущность взаимодействия веществ с водой. Но характер и энергию реакции в системе вещество–вода в большей степени определяет их теплота смешения. Вещества, признанные эффективными криопротекторами (табл. 2), имеют значения теплоты смешения с водой от 650 до 950 Дж/моль. Исключение составляют только 1,3-ПД и 2-МЭ. Известно [4], что экзотермичность реакции смешивания с водой органических соединений, имеющих различные функциональные радикалы, объясняется не только образованием сильных водородных связей между гидрофильными группами веществ и молекулами воды, но и гидрофобной гидратацией, т.е. выделение энергии происходит за счет увеличения либо количества, либо прочности Н-связей между молекулами воды в гидратных ячейках, окружающих неполярные алкильные радикалы. Метильные и метиленовые группы имеются у всех исследованных веществ, но, как видно, они вносят различный вклад в соотношение гидрофильной и гидрофобной гидратации, что и проявляется при смешивании с водой молекулы 2-МЭ. Таким образом, видимо, для проявления эффективной криопротекторной активности вещество должно взаимодействовать с водой через сильные водородные связи, т.е. энергия водородной связи вещество–вода должна быть выше энергии водородной связи вода–вода и вещество–вещество, а гидрофобная



Зависимость подвижности сперматозоидов, криоконсервированных под защитой диолов и амидов, от их криоскопической константы.

Dependence of spermatozoa motility, cryopreserved under diol and amide protection, on their cryoscopic constant.

structure. The Figure demonstrates the dependence of cryoprotective activity on substances on their cryoscopic constant. As it is seen from the Figure and the Table 2 the substances with the constant, higher than 3, manifest an effective cryoprotectant activity. In addition, it was found out, that it was the unique physical and chemical characteristic of substances from the studied earlier [6, 8, 9, 14], which correlated quite well with all indices of spermatozoa integrity, cryopreserved under their protection. So, the coefficients of twin linear correlation between cryoscopic constant and spermatozoa motility after thawing, spermatozoa number with integral head membrane and integral acrosomes equal to 0.78; 0.76 and 0.73, correspondingly. Thereat within the limits of one homologous series the coefficient of correlation is higher, for example, for amides: 0.87; 0.85 and 0.89. According to the data [5] a cryoscopic constant equals to 4, that corresponds to the limits established, necessary for manifestation of cryoprotective activity.

The temperature of melting of aqueous solutions and cryoscopic constant reflect an integral essence of substance interaction with water. However the character and the energy of reaction in substance–water system are in a greater extent determined by their heat of mixing. Substances, which manifested as effective cryoprotectants (Table 2) have high values of heat of mixing with water from 650 to 950 J/M. Only 1,3-PD and 2-ME are the exceptions. It is known [4] that exothermicity of reaction of the mixing with water of organic compounds with different functional radicals is explained not only by the creation of strong hydrogen bonds between hydrophilic groups of a substance and water molecules, but a hydrophobic hydration, i.e. energy release occurs due to an increase either of a number or tightness of H-bonds between water molecules in hydrate cells, which surround non-polar alkyl radicals. Methyl and methylene groups are in all studied substances, but, as it is seen, they make

гидратация — дополнительный компонент, вероятно, имеет более важное значение при способности растворов криопротекторов к стеклованию. Высказанное предположение можно подтвердить данными литературы. Энергия водородной связи вода–вода равна приблизительно 15,5 кДж/моль. Определено [4], что энергия водородной связи в системах ФА–H₂O и ФА–ФА также равна 15 кДж/моль, т.е. сравнима с энергией Н-связи вода–вода, но не превосходит ее, поэтому ФА является плохим криопротектором. Для метилзамещенных амидов (МАЦ, ДМФА и ДМАЦ) энергия Н-связи вещество–вода значительно выше и достигает значений около 17,5–18 кДж/моль. Считается, что в системах вода–спирт энергия Н-связи также выше, чем в системах вода–вода [3, 4], но точных значений для диолов в литературе обнаружить не удалось.

Второй аспект “коллигативной теории” базируется на способности криопротекторов снижать повышенные концентрации растворенных солей, возникающие при появлении кристаллов льда в среде в диапазоне температур от –3 до –35 °С. В табл. 2 представлены значения растворимости солей NaCl и KCl в 50%-х растворах исследуемых веществ. Из приведенных данных видно, что в растворах всех веществ растворимость солей значительно ниже, чем в воде (см. примечание к табл. 2). При этом в ряду диолов растворимость солей практически на одном уровне, исключение составляет ЭГ. Известно [5], что в ЭГ данные соли растворяются не хуже, чем в воде. Например, растворимость NaCl в чистом ЭГ при 0 °С выше, чем в водных растворах ЭГ и просто в воде, и составляет 7,4 моль/л (табл. 2). В ряду изученных амидов наблюдается значительная разница между полученными показателями. Так, в растворе ФА растворимость солей выше, чем в растворах диолов, а в растворах метилзамещенных амидов (ДМАЦ, МАЦ) значительно ниже, т.е. более эффективный криопротектор для спермы петухов (ДМФА) растворяет соли не лучше, чем остальные соединения, а МАЦ и ДМАЦ имеют даже самые низкие значения. Значит ли это, что гипотеза не имеет силы? Рассмотрим иной механизм влияния веществ на растворимость электролитов. Известно, что эффективная концентрация меньше общей концентрации растворенной соли на величину степени диссоциации: $[K^+] = [A^-] = \alpha C$. Степень диссоциации α сильных электролитов пропорциональна их растворимости. Следовательно, чем меньше растворимость соли, тем меньше степень диссоциации, а значит, и эффективная концентрация электролита в растворе. Из этого следует, что криопротекторы могут влиять на концентрацию солей переводом их из ионной в молекулярную форму и тем самым уменьшать повреждающее действие “эффектов раствора”, возникающих в процессе вымораживания воды в суспензии клеток. К тому же с понижением температуры растворимость солей падает сама по себе вплоть до

different contribution to the ratio of hydrophylic and hydrophobic hydration, that is manifested at the mixing with water of 2-ME molecule. Thus, apparently, in order to manifest an efficient cryoprotective activity the substance should interact with water through strong hydrogen bounds, i.e. the energy of hydrogen bound of substance-water should be higher than those of hydrogen bound of water -water and substance-substance, and hydrophobic hydration is an additional component, which probably has more manifested value at the capability of cryoprotectant solutions to vitrification. The supposition made can be confirmed by the literature data. The energy of water-water hydrogen bound approximately equals to 15.5 kJ/M. It was determined [4], that the energy of hydrogen bound in systems of FA–H₂O and FA–FA made 15 kJ/M as well, i.e. was comparable with the energy of water-water H-bound, but did not exceed it, and therefore was a bad cryoprotectant. For methyl-substituted amides (MAC, DMFA and DMAC) the energy of substance-water H-bound is considerably higher and reaches the values approximately 17.5–18 kJ/M. One considers, that in water-alcohol systems the energy of H-bound is higher, than in water-water systems [3, 4], but we did not manage to find in the literature precise values for diols and amides.

The second aspect of “colligative theory” is based on the capability of cryoprotectants to reduce the increased concentrations of solved salts, occurring during ice crystal appearance in the medium within temperature range from –3 to –35 °С. The Table 2 shows the values of solubilities for NaCl and KCl salts in 50% solutions of studied substances. The data mentioned demonstrate that in the solutions of all substances the solubility of salts is significantly lower, than in water (see notes to the Table 2). Thereat in diol series the solubility of salts is practically at the same level, excluding EG. However it is known, that in EG these salts are solved not worse, than in water, for example NaCl solubility in pure ethylene glycol at 0 °С higher than in EG aqueous solutions and simply in water and makes 7.4 M/l (Table 2). In the studied amide series we observe a considerable difference between the indices obtained. So, in FA solution the solubility of salts is higher, than in diol solutions, but in solutions of methyl-substituted amides (DMAC, MAC) is considerably lower, i.e. more efficient cryoprotectant for fowl sperm (DMFA) solves salts not better, than other compounds, but MAC and DMAC even have the lowest values. Does it mean that the hypothesis has no force? Let's consider another mechanism of the effect of substances to the solubility of electrolytes. It is known, that an efficient concentration is lesser than the total one of a solved salt by the value of dissociation degree: $[K^+] = [A^-] = \alpha C$. Dissociation degree α of strong electrolytes is proportional to their solubility. Consequently, the less the solubility of salt is, the less dissociation degree is, well then an efficient concentration of electrolyte in the

выпадения в осадок в виде кристаллов. Таким образом, криопротекторы могут снижать повреждающий фактор, вызванный "эффектами раствора", хотя его важность оспаривается [9, 15]. Но механизм криозащитного действия криопротекторов, вероятно, будет отличаться в той же степени, в какой различаются их структура и физико-химические свойства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Александров Ю. И. Точная криометрия органических веществ.— Л.: Химия, 1975.— 161 с.
2. Белоусов В. П., Морачевский А. Г. Теплоты смешения жидкостей.— Л.: Химия, 1970.— 282 с.
3. Белоусов В. П., Морачевский А. Г., Панов М. Ю. Тепловые свойства растворов неэлектролитов.— Л.: Химия, 1981.— 264 с.
4. Белоусов В. П., Панов М. Ю. Термодинамика водных растворов неэлектролитов.— Л.: Химия, 1983.— 265 с.
5. Карапетян Ю. А., Эйчис В. Н. Физико-химические свойства электролитных неводных растворов.— М.: Химия, 1989.— 252 с.
6. Линник Т. П. Зависимость криопротекторной активности соединений ряда амидов от их физико-химических свойств: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Харьков, 1986.— 19 с.
7. Линник Т. П., Бизикина О. В. Криоконсервирование спермы петухов. I. Цитотоксичность диолов и амидов // Пробл. криобиологии.— 2001.— № 2.— С. 72–79.
8. Пичугин Ю. И., Новиков А. Н. Зависимость цитотоксичности и криопротекторной активности диолов от их структуры и физико-химических свойств // Криоконсервирование клеток и тканей.— Харьков, 1989.— С. 15–28.
9. Пичугин Ю. И. Итоги и перспективы поиска новых эндоцеллюлярных криопротекторов // Пробл. криобиологии.— 1993.— № 2.— С. 3–10.
10. Сахацкий Н. И., Терещенко А. В., Артеменко А. Б. Экспресс-метод оценки оплодотворяющей способности замороженно-оттаянной спермы сельскохозяйственной птицы // С.-х. биология.— 1987.— № 12.— С. 77–80.
11. Chalah T., Seiguerin F., Blesbois E., Brillard J. P. In vitro comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility in vivo // Cryobiology.— 1999.— 39.— P. 185–191.
12. Hammerstedt R. N., Graham J. K. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol // Cryobiology.— 1992.— 29.— P. 26–38.
13. Leibo S. P., Bradley L. Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa/The male gamete: from basic science to clinical applications.— Cache River Press, 1999.— P. 502–516.
14. Lovelock J. E. The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing // Biochem. J.— 1954.— 56, № 2.— P. 265–270.
15. Watson P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function // Reprod. Fertil. Dev.— 1995.— 7.— P. 871–891.

Поступила 27.02.2001

solution is. It proceeds from this fact, that cryoprotectants can affect salt concentrations by transferring them from ion to molecular form and by this reducing a damaging effect of "solution effects", appearing within the process of water freezing in cell suspension. In addition with temperature decrease the solubility of salts falls down itself, until sedimentation as crystals. Thus, cryoprotectants can reduce a damaging factor, caused by "solution effects", although its importance is disputable [9, 15]. However, the mechanism of cryoprotective effect for cryoprotectants, probably will differ at the same degree as their structure and physical and chemical properties differ.

REFERENCES

1. Aleksandrov Yu. I. Accurate cryometry of organic substances.— L.: Khimiya, 1975.— 161 p.
2. Belousov V. P., Morachevsky A. G. Heats of mixings of fluids.— L.: Khimiya, 1970.— 282 p.
3. Belousov V. P., Morachevsky A. G., Panov M. Yu. Heat properties of non-electrolyte solutions.— L.: Khimia, 1981.— 264 p.
4. Belousov V. P., Panov M. Yu. Thermodynamics of non-electrolyte aqueous solutions.— L.: Khimia, 1983.— 265 p.
5. Karapetyan Yu. A., Ejchis V. N. Physical and chemical properties of electrolyte non-aqueous solutions.— M.: Khimia, 1989.— 252 p.
6. Linnik T. P. Dependence of cryoprotective activity of amide series compounds on their physical and chemical properties: Abstr. Thesis Cand. Biol. Sci.— Kharkov, 1986.— 19 p.
7. Linnik T. P., Bizikina O. V. Fowl sperm cryopreservation. I. Diol and amide cytotoxicity // Problems of cryobiology.— 2001.— № 2.— P. 72–79.
8. Pichugin Yu. I., Novikov A. N. Dependence of cytotoxicity and cryoprotective activity of diols on their structure and physical and chemical properties // Cell and tissue cryopreservation.— Kharkov, 1989.— P. 15–28.
9. Pichugin Yu. I. Results and perspectives of search for new endocellular cryoprotectants // Problemy kriobiologii.— 1993.— № 2.— P. 3–10.
10. Sakhaty N. I., Tereschenko A. V., Artemenko A. B. Express-method for estimation of fertilizing ability of frozen-thawed poultry sperm // Sel'skokhozyajstvennaya biologiya.— 1987.— № 12.— P. 77–80.
11. Chalah T., Seiguerin F., Blesbois E., Brillard J. P. In vitro comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility in vivo // Cryobiology.— 1999.— 39.— P. 185–191.
12. Hammerstedt R. N., Graham J. K. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol // Cryobiology.— 1992.— 29.— P. 26–38.
13. Leibo S. P., Bradley L. Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa/The male gamete: from basic science to clinical applications.— Cache River Press, 1999.— P. 502–516.
14. Lovelock J. E. The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing // Biochem. J.— 1954.— 56, № 2.— P. 265–270.
15. Watson P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function // Reprod. Fertil. Dev.— 1995.— 7.— P. 871–891.

Accepted in 27.02.2001

Кварцевый термопреобразователь ДАП.ТЦ-05 для устройств регулирования температуры

Н. В. РЕПИН, С. В. РЕПИНА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

В. Ф. СОЛОДОВНИК, М. И. ЧЕБАН

Национальный аэрокосмический университет им. Н. Е. Жуковского "ХАИ", г. Харьков

Quartz Thermoconverter DAP.TC-05 for the Devices for Temperature Regulation

N. V. REPIN, S. V. REPINA

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

V. F. SOLODOVNIK, M. I. CHEBAN,

National Aero-Space University named by N. E. Zhukovsky, Kharkov

Апробирован и предлагается для использования в исследовательских приборах, снабженных низкотемпературными приставками с системой регулирования температуры, кварцевый двухчастотный автогенераторный преобразователь температуры ДАП.ТЦ-05. Показаны высокая эффективность и надежность преобразователя при температурах до -100°C .

Був апробований та пропонується для застосування в дослідних приладах, які обладнані низькотемпературними пристроями з системою регулювання температури, кварцовий двохчастотний автогенераторний перетворювач температури ДАП.ТЦ-05. Показано високу ефективність і надійність перетворювача при температурах до -100°C .

Quartz double-frequency self-generator DAP.TC-05 temperature converter supplied with low-temperature adapters with the system for temperature regulation has been tested and proposed for the usage in research devices. A high efficiency and reliability of the converter under the temperatures up to -100°C has been demonstrated.

Для исследования термоиндуцированных изменений состояния биологических объектов используется широкий класс спектроскопических (ЭПР, ЯМР), электронно-микроскопических приборов и вспомогательного оборудования, тензодилатометров с низкотемпературными приставками, содержащими термодатчики — преобразователи температуры. Обычно в качестве датчиков температуры используются терморезисторы либо термопары. Для большинства криобиологических исследований наиболее интересной является область температур от физиологических (37°C) до -70 до -90°C , когда в охлаждаемой системе в основном завершаются процессы кристаллообразования. Как правило, в ходе исследований температура в термоблоке прибора должна измеряться в указанных пределах с точностью не ниже 1°C . При этом точность преобразователя температуры системы регулирования должна быть на порядок выше, т.е. на уровне $0,1^{\circ}\text{C}$. Желательно, чтобы такая точность обеспечивалась длительное (до 10 лет) время эксплуатации прибора. Тогда требуемая погрешность поддержания температуры не ниже 1°C будет определяться в основном теплоизоляционными и градиентными свойствами термоблока.

For the investigations of therminduced changes of the state of biological objects a wide spectrum of spectroscopic (EPR, NMR), electron microscopic devices and auxiliary equipment, tensodylatometers with low temperature adapters, containing thermosensors, which are the temperature converters has been used. Usually thermoresistors or thermocouples are used as the temperature sensors. For the majority of cryobiological investigations the temperature range from physiological (37°C) down to -70 to -90°C , when in a cooled system the processes of crystal formation are mainly finished, is the most interesting. As a rule, during investigations the temperature in the device thermoblock should be measured within the mentioned limits with the accuracy not less than 1°C . Thereat an accuracy of the temperature converter of the regulation system should be higher by an order, i.e. at the level of 0.1°C . It would be better if such an accuracy is provided for more prolonged time of the device exploitation (up to 10 years). In that case the required error of the temperature keeping not lower than 1°C would be determined, mainly, by heat-isolation and gradient properties of thermoblock.

Traditional thermoconverters on the base of thermoresistors and thermocouples provide an accuracy of the temperature convention of about 0.1°C during the

Традиционные термопреобразователи на основе терморезисторов и термопар обеспечивают требуемую точность преобразования температуры порядка 0,1 °C за время от 1 с до нескольких суток, но их долговременная стабильность невысока из-за процесса старения термочувствительных материалов. Известно [1], что большей эталонностью обладают кварцевые термочувствительные элементы на основе серийных кварцевых резонаторов (например среза ПЯ). Такие термочувствительные элементы обычно применяют в автогенераторных преобразователях температуры с частотным или цифровым выходом.

Цель работы — обосновать использование кварцевых двухчастотных автогенераторных преобразователей (ДАП) температуры (вариант ДАП.ТЦ-05) в системах ее регулирования и, в частности, в установке для замораживания-скалывания биологических объектов в вакууме [2]. Известно, что при сублимации льда со сколотой поверхности для выявления тонкой структуры биологического объекта оптимальной является температура -100 °C и ее снижение всего на 5–10 °C замедляет скорость сублимации практически на порядок [4]. В этой связи точность измерения температуры имеет существенное значение.

Предлагаемый нами термопреобразователь ДАП.ТЦ-05 (рис. 1) построен на основе двухчастотного автогенератора [4] на транзисторе VT1, содержит также два усилителя на транзисторах VT2, 3 и преобразователь “частота–код” (ПЧК) на микросхеме DD1 однокристального процессора. При этом конструктивно устройства на транзисторах VT1, 2 выполнены в виде выносного на кабеле пробника — двухчастотного автогенераторного преобразователя температуры в частоту (ДАПТЧ), а устройства на VT3, DD1 — в виде блока преобразователя “частота–цифра” (ПЧЦ), вмонтированного в разъем LPT порта компьютера.

Питание на ДАП.ТЦ-05 подается от порта компьютера, преобразование частоты в параллельный код поддерживается вшитой в ПЗУ процессора программой.

time from one to several days, but their long-term stability is not high due to the aging process of thermosensitive material. It is known [1], that quartz thermosensitive elements on the base of serial quartz resonators possess the highest standard degree. Such thermosensitive elements are usually applied in the temperature autogenerator converters (DAP.TC-05 variant) in the system of its regulation and, in particular, in the device for freeze-fractioning of biological objects in vacuum [2]. It is known that during ice sublimation from a fractured surface for the revealing of a fine structure of biological object the temperature of -100 °C and its decrease almost by 5–10 °C reduces the rate of sublimation by 10 times [4]. In this respect an accuracy of the temperature measuring is quite important.

Proposed by us thermoconverter DAP.TC-05 (Fig. 1) has been designed on the base of two-rate autogenerator [3] on VT1 transistor, also contained two amplifiers on VT2, 3 transistors and “frequency–code” converter (FCC) in DD1 microscheme of single-crystal processor. Thereat structurally the devices on VT1, 2 transistors are accomplished as a probe placed outside on a cable — double-frequency autogenerator temperature converter into frequency (DACTF), and devices on VT3, DD1 — as a block of “frequency–digit” converter (FDC), built-in into the LPT plug of a computer port.

Power on DAP.TC-05 is supplied from a computer port, frequency converting into a parallel code is maintained by a built-in into a processor permanent memory device (PMD) program.

In the device on transistor two oscillations of quartz frequencies are generated:

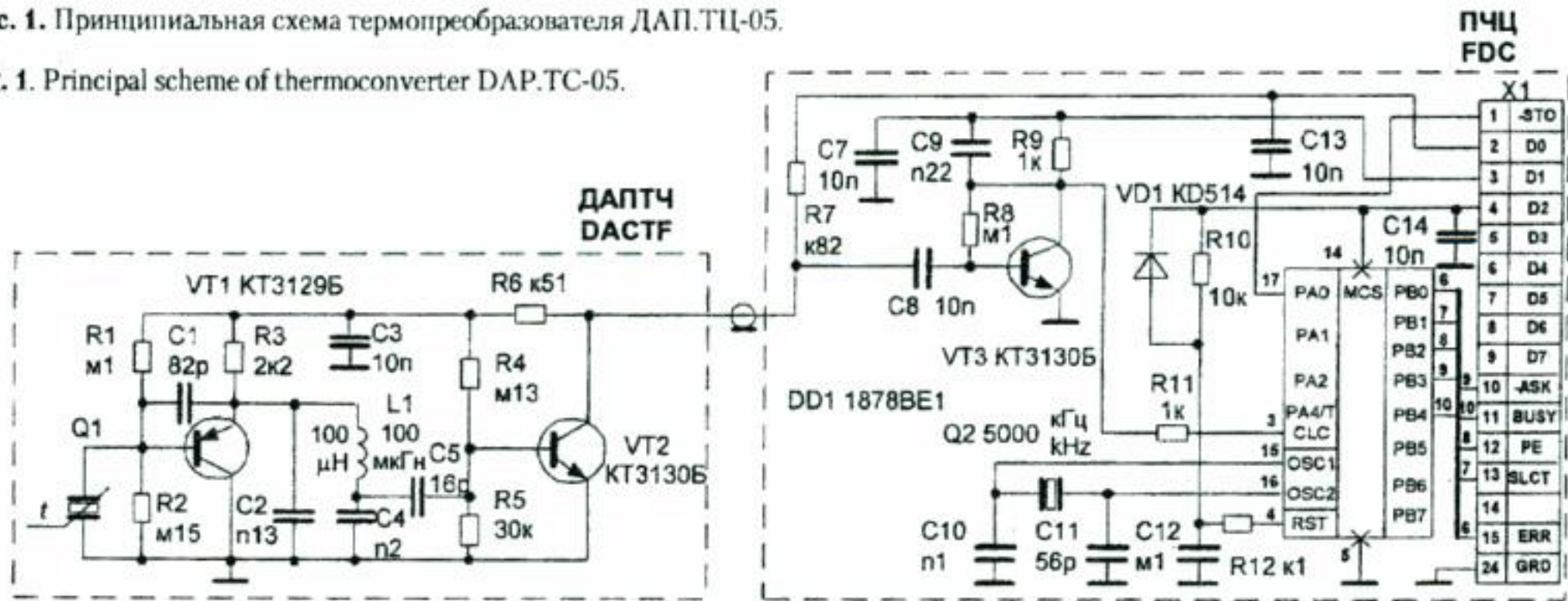
$$f_1 = f_{10} + a_1 \cdot t; f_2 = f_{20} + a_2 \cdot t,$$

where $f_{10} = 6.14$ MHz, $f_{20} = 5.0$ MHz, $a_1 = -215$ Hz/grad, $a_2 = 185$ Hz/grad, t — temperature of contact with quartz resonator Q1 medium. On L1C4-filter output a differential combinational frequency oscillation is observed:

$$f_p = f_{p0} + a_p \cdot t,$$

Рис. 1. Принципиальная схема термопреобразователя ДАП.ТЦ-05.

Fig. 1. Principal scheme of thermoconverter DAP.TC-05.



В ДАП на транзисторе генерируются два колебания кварцованных частот:

$$f_1 = f_{10} + a_1 \cdot t; f_2 = f_{20} + a_2 \cdot t,$$

где $f_{10} = 6,14$ МГц; $f_{20} = 5,0$ МГц; $a_1 = -215$ Гц/град; $a_2 = 185$ Гц/град; t — температура контактной с кварцевым резонатором Q1 среды.

На выходе L1C4-фильтра выделяется разностное комбинационное колебание частоты

$$f_p = f_{p0} + a_p \cdot t,$$

где $f_{p0} = f_{10} - f_{20} = 1,14$ МГц, $a_p = a_1 - a_2 = -400$ Гц/град.

Усиленное на транзисторе VT2 разностное колебание частоты f_p является выходным колебанием выносного пробника температуры ДАПТЧ. Таким образом, в ДАП реализуется дифференциальный принцип, за счет чего выходная частота f_{p0} уменьшается в 5–6 раз, а крутизна a_p характеристики преобразования температуры в частоту увеличивается примерно вдвое, т.е. относительный выигрыш по $\beta = a_p/f_{p0} = 4 \cdot 10^{-4}$ град $^{-1}$ составляет примерно порядок.

Погрешность преобразования частоты в цифру ПЧЦ определяется старением и температурной стабильностью частоты опорного резонатора Q2, которые имеют порядки 10^{-6} год $^{-1}$ и 10^{-7} град $^{-1}$ соответственно. Поскольку температура резонатора Q2, расположенного вне выносного пробника, изменяется при комнатной температуре не более, чем на 10 °C, можно считать, что нестабильности частоты резонатора за год и температурная не пре-

where $f_{p0} = f_{10} - f_{20} = 1,14$ MHz, $a_p = a_1 - a_2 = -400$ Hz/grad.

An increased on transistor differential VT2 frequency oscillation f_p is an output oscillation of a removed temperature probe DACTF. Thus in DAP a differential principle, due to which the f_{p0} output frequency decreases by 5–6 times, and the a_p slope of characteristics for the temperature converting into a frequency increases approximately twice, i.e. a relative advantage on $\beta = a_p/f_{p0} = 4 \cdot 10^{-4}$ grad $^{-1}$ makes about 10 times.

An error of the frequency converting into a digit (FDC) is determined by aging and temperature stability of the frequency of a supporting Q2 resonator with the following orders: 10^{-6} year $^{-1}$ and 10^{-7} grad $^{-1}$, correspondingly. As the temperature of Q2 resonator, located out of the removed changed probe under a room temperature not higher than by 10 °C, it can be considered that non-stabilities of the resonator frequency during a year and a temperature one do not exceed $\alpha = 10^{-6}$ value. Therefore an absolute error of the frequency converting into a code given to the temperature does not exceed the following value: $\alpha/\beta = 0,025$ °C. Within 4 years of exploitation and when changing a room temperature in the vicinity of Q2 resonator by 40 °C an error for the temperature converting will be ≤ 0.1 °C.

A structural scheme of the system of temperature regulation in thermoblock of a research device has been demonstrated in Fig. 2. The system for temperature regulation works in the following way: a the temperature value, which is lower at the FDC output,

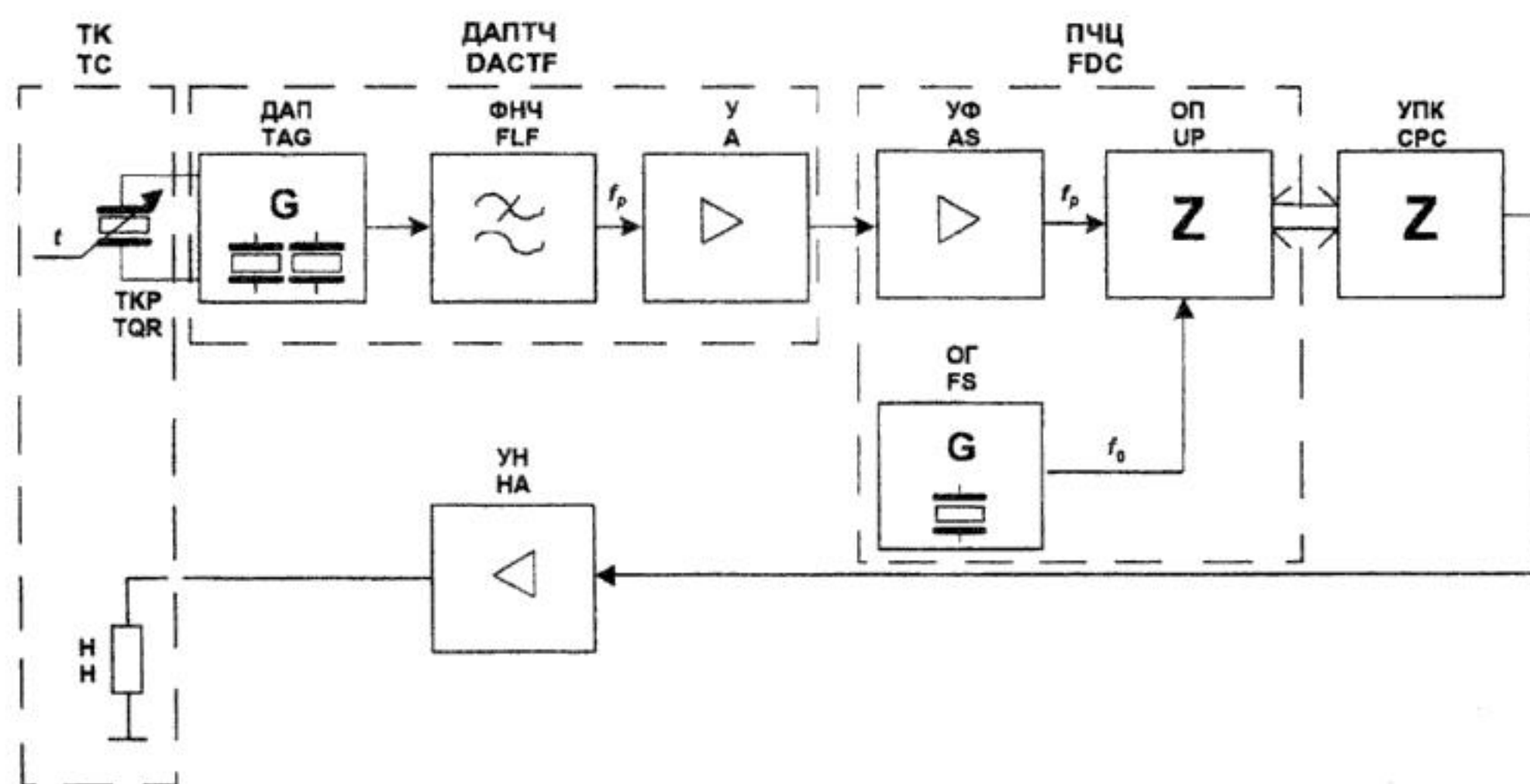


Рис. 2. Структурная схема системы регулирования температуры термоблока: ТК — термокамера (термоблок); ТКР — термочувствительный кварцевый резонатор; Н — нагреватель; УН — усилитель нагревателя; ФНЧ — фильтр нижних частот; У — усилитель; УФ — усилитель-формирователь; ОП — однокристальный процессор; ОГ — опорный генератор; УПК — управляющий персональный компьютер.

Fig. 2. Structural scheme of the system of the thermoblock temperature regulation: TC — thermochamber (thermoblock); TQR — thermosensitive quartz resonator; H — heater; HA — heater amplifier; FLF — filter of low frequencies; A — amplifier; AS — amplifier-shaper; UP — uni-crystal processor; FS — frequency standard; CPC — controlling personal computer.

вышают величину $\alpha = 10^{-6}$. Поэтому приведенная к температуре абсолютная погрешность преобразования частоты в код не превышает величины $\alpha/\beta = 0,025^\circ\text{C}$. За четыре года эксплуатации и при изменении комнатной температуры в окрестности резонатора Q2 на 40°C погрешность преобразования температуры будет $\leq 0,1^\circ\text{C}$.

Структурная схема системы регулирования температуры термоблока исследовательского прибора показана на рис. 2. Система терморегулирования работает следующим образом. При значении температуры на выходе ПЧЦ меньше заданной программно на одном из выходов LPT порта УПК формируется логическая "1", которая после усиления УН включает нагреватель Н. Программа взаимодействия с LPT-портом и закон изменения температуры в ТК вводятся в УПК с дискеты или винчестера.

Наряду с высокой эталонностью температуры коммутации нагревателя термоблока, достоинством предлагаемой системы регулирования является возможность изменения во времени температурного режима по заданному программными средствами закону. Кроме этого, ДАПТЧ и ПЧЦ имеют относительно простые схемное и конструктивное решения и, следовательно, низкую стоимость. В системе регулирования может использоваться как самый простой УПК, например, IBM PC с системой ДОС, так и компьютеры класса Pentium. Датчик ДАП.ТЦ-05 обеспечивает надежную работу в вакууме.

ЛИТЕРАТУРА

1. Малов В. В. Пьезорезонансные датчики. — М.: Энергоатомиздат, 1989. — 272 с.
2. А. с. № 1157387 (СССР). Устройство для скалывания биологических объектов в вакууме / Н. В. Репин, Б. А. Скорняков, В. П. Храмцов, А. Л. Вайсман. Заявлено 13.12.83. Оpubл. 22.01.85. БИ. — 1985. — № 9. — С. 154.
3. А. с. № 1747947 (СССР). Пьезокварцевый преобразователь температуры / В. Ф. Солодовник, В. А. Шевелев, М. И. Чебан и др. Заявлено 05.06.89. Оpubл. 15.07.92. БИ. — 1992. — № 26. — С. 150.
4. Robards A. W. Low temperature methods in biological electron microscopy. (Practical methods in electron microscopy; V. 10). — Amsterdam—New York—Oxford: Elsevier, 1985. — 551 p.

Поступила 7.11.2001

at one exit of LPT port of CPC a logical "1" is formed, which after the amplification of HA switches the heater H. The program for interaction with LPT port and the law for temperature change in TC are input into CPC with a floppy disk or hard disk.

Together with a high standard degree of the commutation temperature in a thermoblock heater, the opportunity of changing the temperature regimen within the time according to the law, set by a program regimen is an advantage of the proposed regulation system. In addition, DACTF FDC possesses relatively ordinary scheme and constructive decisions, and therefore, a low cost. In the regulation system both the simplest CPC, for example IBM PC with operational system DOS, and computers of Pentium class can be used. Temperature sensor DAP.TC-05 provides a reliable work in vacuum.

REFERENCES

1. Malov V.V. Piezo-resonance sensors. — M.: Energoatomizdat, 1989. — 272p.
2. Author's certificate № 1157387 (USSR). Device for fractioning of biological objects in vacuum / N. V. Repin, B. A. Skornyakov, V. P. Khramtsov, A. L. Vajsman. Accepted in 13.12.83. Published in 22.1.85. BI. — 1985. — № 19. — P. 154.
3. Author's certificate № 1747947 (USSR). Piezo-quartz temperature converter / V. F. Solodovnik, V. A. Shevelev, M. I. Cheban. Accepted in 05.06.89. Published 15.07.92. BI. — 1992. — № 26. — P. 156.
4. Robards A. W. Low temperature methods in biological electron microscopy (Practical methods in electron microscopy; V. 10). — Amsterdam—New York—Oxford: Elsevier, 1985. — 551 p.

Accepted in 7.11.2001

Сравнительная оценка эффективности методов криоконсервирования и лиофилизации вирусного материала

М. Ю. СТЕГНИЙ, И. Л. ДИКИЙ

Национальная фармацевтическая академия Украины, г. Харьков

Б. Т. СТЕГНИЙ

Институт птицеводства УААН, Борки, Харьковская область

А. Н. ГОЛЬЦЕВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Comparative Evaluation of Efficiency of the Methods for Cryopreservation and Lyophilization of Viral Material

M. Yu. STEGNIY, I. L. DIKIY

National Ukrainian Academy of Pharmacy, Kharkov

B. T. STEGNIY

Institute of Poultry Breeding, Ukrainian Academy of Agrarian Sciences of the Ukraine, Borki, Kharkov Region

A. N. GOLTSEV

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

Сравнение методов консервирования и хранения вирусного материала показало, что консервирование и хранение в жидком азоте является оптимальным и гарантирует сохранение исходной инфекционной и иммуногенной активности вирусов в течение двух лет (срок наблюдения).

Порівняння методів консервування та збереження вірусного матеріалу показало, що консервування та збереження в рідкому азоті є оптимальним і гарантує зберігання вихідної інфекційної і імунотенної активності вірусів до двох років (термін спостереження).

Comparison of the methods for preservation and storage of viral material demonstrated, that preservation and storage in liquid nitrogen was the optimum and guarantees preservation of initial infectious and immunogenic activity of the viruses within two years (observation term).

Важным направлением криобиологии и криомедицины является сохранение исходных биологических свойств различных вирусов в диагностическом материале, взятом от инфицированного биологического объекта, а также стандартных штаммов, что играет значительную роль в выделении и идентификации возбудителей вирусных инфекций. Особенно быстро вирусы инактивируются в таких биологических субстратах, как кровь, спинномозговая жидкость, моча, соскобы и смывы носоглотки, патологическом материале [3, 5].

Мы изучали возможности сохранения различных вирусов, использующихся при производстве человеческого лейкоцитарного интерферона на предприятиях биологической промышленности.

Preservation of initial biological characteristics of the viruses of standard strains, various viruses as the standards in a diagnostics, derived from an infected biological object for isolation and identification of pathogen is an important direction in cryobiology and cryomedicine.

Especially rapidly viruses inactivate in such biological substrates as blood, cerebrospinal fluid, urine, scrapings and lavages of rhinopharynx, pathological material [3, 5].

We investigated the possibility of preservation of various viruses, used when producing human leukocyte interferon in biological industry plants. These are Newcastle disease virus (NDV) ("H" vaccine strain), applied as interferon inductor and vesicular stomatitis

Это вирус болезни Ньюкасла — NDV (вакцинный штамм "Н"), применяемый как индуктор интерферона, и вирус везикулярного стоматита — VSV (штамм "Индиана"), который необходим для контроля противовирусной активности интерферона, а также некоторые вирусы, используемые в биотехнологии производства противовирусных вакцин в ветеринарной медицине: 1) "К-ИП" — вакцинный штамм вируса гепатита утят; 2) "Massachusetts" — штамм для изготовления вакцины против инфекционного бронхита кур; 3) "B8-78" — штамм для изготовления вакцины против синдрома снижения яйценоскости кур; 4) "BSB" — штамм для изготовления вакцины против вирусного энтерита гусей; 5) "SB1" — клеточно-ассоциированный штамм вируса герпеса группы В (второго серотипа), входящий в состав бивалентной вакцины против болезни Марека; 6) "FS 126" — свободный от клеток штамм вируса герпеса индеек (третьего серотипа), входящий в состав бивалентной вакцины против болезни Марека.

При исследовании эффективность режимов консервирования вирусов оценивалась по их исходной инфекционности и иммуногенности. Инфекционную активность вирусов определяли по их цитопатическому действию на клеточную культуру, вакцинных штаммов "К-ИП", "Massachusetts", "B8-78" — по патогенному действию на куриные эмбрионы, "BSB" — на гусиные. Инфекционный титр вирусов определяли по методу Риды и Менча, стандартное отклонение титра — по формуле Пиджи [1]. Иммуногенность вирусов определяли в соответствии с общепринятыми методами, которые изложены в технических условиях на вирусные вакцины. Вирусы замораживали на установке программного замораживания биообъектов с электронным блоком управления, разработанной в СКТБ и ОП ИПКиК НАН Украины. Лиофильное высушивание проводили на аппаратах камерного типа модели ТГ-50 фирмы "Хохвакуум" (Германия). Хранили вирусы в условиях гипотермии и умеренно низких температур в холодильниках соответственно при 4, -20, -40 °C.

Существует мнение, что многие вирусы можно успешно сохранять при температуре -20 °C [4]. Однако, используя те же режимы, мы установили, что данный метод не является оптимальным для хранения всех вирусов. Результаты наших исследований показали, что при хранении вакцинного штамма вируса болезни Ньюкасла при температуре -20 °C в течение года вирус терял активность и для ее восстановления необходимо было провести 2-3 "слепых пассажа" (последовательные пересевы вирусосодержащего материала в восприимчивые культуры клеток или куриные эмбрионы до появления в них явного цитопатического действия или патогенных изменений, которые обычно вызывает вирус при сохранении его инфекционной активности) на куриных эмбрионах. При неоднократном

virus (VSV) ("Indiana" strain), which is necessary to control antiviral interferon activity, as well as some viruses, used in the biotechnology of antiviral vaccines production in a veterinary medicine. They are: 1) "K-IP", vaccine strain of hepatitis virus in ducklings; 2) "Massachusetts", strain for the production of vaccine against infecting bronchitis in hen; 3) "B8-78", strain for production of vaccine against the syndrome of the decrease of oviposition in hen; 4) "BSB", strain for production of vaccine against viral enteritis in geese; 5) "SB1", cellular-associated strain of the B group viral herpes (the second serotype), which is the part of bivalent vaccine against the Marek's disease; 6) "FS 126" — free of cells strain of herpes virus in turkey-hen (the third serotype), which is the part of bivalent vaccine against the Marek's disease.

Efficiency of cryopreservation regimens of viruses was estimated on their initial infectioning and immunogeneity. Infectious activity of viruses was detected on their cytopathic effect on a cellular culture, "K-IP", "Massachusetts", "B8-78" vaccine strains was determined on the pathogenic effect on hen embryos, BSB effect on goose embryos. Infectious titer of viruses was determined by Rid' and Mench' method, standard deviation of titer was done by Picci formula [1]. Viruses immunogeneity was detected according to the methods, mentioned in "technical requirements" for viral vaccines. Viruses were frozen by means of programmable device for bioobjects freezing with electronic control block, elaborated in the Special Construction Technical Bureau and Experimental Production Unit of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine. Lyophilization was carried-out by means of apparatuses of chamber type of the TG-50 model, produced by "Chochvacuum" company (Germany). Viruses were stored under hypothermia conditions and moderately low temperatures in refrigerators under 4, -20 and -40 °C, correspondingly.

There is a notion, that many viruses can be successfully preserved under the temperature of -20 °C [4]. However, using the same regimens, we established, that the given method is not optimum for the storage of all viruses. The results of our investigations demonstrated, that during the storage of NDV vaccine strain under the temperature of -20 °C within a year, virus lost activity and to recover it two "blind passages" in hen embryos (step by step reinoculation of the viruses-containing material into susceptible cell cultures or hen embryos up to the appearance of evident cytopathic effect (CPE) in them or pathogenic changes, usually caused by virus when keeping its infectious activity) were necessary to be carried-out. During multiple freeze-thawing the virus completely inactivated. Storage of viral suspension under hy-

замораживании-оттаивании вирус полностью инактивируется. Хранение вирусной суспензии в условиях гипотермии (при 4 °C) без существенного снижения инфекционной активности возможно не более 30 сут.

Для сохранения вируса VSV применяли метод высушивания из замороженного состояния. При этом за основу были взяты методические подходы Звягина [2], модифицированные нами. Лиофилизацию осуществляли в ампулах с вирусной суспензией объемом 1 мл и титром инфекционной активности 7,5–8 lgТЦД_{50/мл}. Температура замораживания биологического объекта составляла –35 ÷ –47 °C с последующим высушиванием под вакуумом в течение 42–48 ч. В процессе лиофилизации инфекционная активность VSV снижалась на 2–3 lg по сравнению с исходной. Хранение лиофилизированного вируса осуществляли при температурах –20 и 4 °C. После хранения в течение года инфекционная активность восстанавливалась только после проведения 3–4 “слепых пассажей” и у вируса, хранившегося при температуре –20 °C, составляла 5,0 lgТЦД_{50/мл} (исходная 7,5–8 lgТЦД_{50/мл}). В случае хранения лиофилизированного вируса при 4 °C его активность за это же время снижалась на 5,5–6,0 lg по сравнению с исходной.

Вакцинный вирус инфекционного бронхита кур штамма “Massachusetts” хранили при –40 °C. Через год хранения при этой температуре наблюдалось снижение титра инфекционной активности вируса на 1 lg и при хранении других вакцинных штаммов вирусов в тех же условиях оно составляло 1–2 lg в течение года (таблица).

Оптимальным режимом консервирования для вакцинных штаммов “К-ИП”, “B8-78” и свободного от клеток штамма вируса герпеса индеек стало охлаждение в парах жидкого азота (–175 °C) в течение 10 мин с последующим погружением в жидкий азот (–196 °C). В этом случае вирусы не теряют исходной активности на протяжении двух лет (срок наблюдения).

pothemia conditions (4 °C) without considerable decrease of infectious activity is possible within not more than 30 days.

To preserve VSV virus the method of lyophilization from a frozen state was applied. At this time Zvyagin’s methodical approaches, modified by us, served as the base [2]. Lyophilization was done in the ampoules with viral suspension in the volume of 1 ml and 7.5–8 lgТЦД_{50/ml} titer of infectious activity. In this case the freezing temperature of biological object made –35–47 °C with following lyophilization under vacuum within 42–48 hrs. During lyophilization the VSV infectious activity decreased by 2–3 lg in comparison with initial one. Lyophilized virus was stored under the temperature of –20 and 4 °C. After 1 year storage and further conducting of two “blind passages” the virus activity, stored under the temperature of –20 °C made 5.0 lgТЦД_{50/ml} (initial one made 7.5–8 lgТЦД_{50/ml}). When storing lyophilized virus under 4 °C its activity at the same time decreased by 5.5–6.0 lg in comparison with initial one.

Vaccine virus of infectious bronchitis in hen of “Massachusetts” strain was stored under –40 °C. After 1 year’ storage under given temperature a decrease in the titer of infectious activity in virus by 1 lg was observed, when storing other vaccine strains of viruses under the same conditions it made 1–2 lg within a year (Table).

Cooling in liquid nitrogen vapors (–175 °C) within

Effect of the temperature regimens of storage on the viruses infection

Investigated strains of viruses	Initial infectious activity of viruses	Degree of viruses inactivation, lg, during 1 year’ storage under the temperatures, °C			
		4	–20	–40	–196
“H” vaccine strain	8.0 ± 0.1 lgТЦД _{50/0.1 ml}	8.0 ± 0.3	7.0 ± 0.3	3.0 ± 0.3	—
“Indiana” strain	8.0 ± 0.1 lgТЦД _{50/0.1 ml}	8.0 ± 0.3	7.0 ± 0.3	3.0 ± 0.3	1.0 ± 0.3
“K-IP”	6.0 ± 0.3 lgЭИД _{50/0.2 ml}	5.0 ± 0.3	5.0 ± 0.3	2.0 ± 0.3	—
“Massachusetts”	6.0 ± 0.1 lgЭИД _{50/0.2 ml}	5.0 ± 0.3	5.0 ± 0.3	1.0 ± 0.3	—
“B8-78”	6.0 ± 0.3 lgЭИД _{50/0.2 ml}	5.0 ± 0.3	5.0 ± 0.3	2.0 ± 0.3	—
“BSB”	7.0 ± 0.3 lgЭИД _{50/0.2 ml}	6.0 ± 0.3	5.0 ± 0.3	2.0 ± 0.3	—
“SB1”	6.0 ± 0.3 lgТЦД _{50/0.2 ml}	6.0 ± 0.1	6.0 ± 0.1	5.0 ± 0.3	—
“FS 126”	6.0 ± 0.3 lgТЦД _{50/0.2 ml}	5.0 ± 0.3	3.0 ± 0.3	3.0 ± 0.3	—

Note. The level of significance p < 0.05.

Влияние температурных режимов хранения на инфекционность вирусов

Исследованные штаммы вирусов	Исходная инфекционная активность вирусов	Степень инактивации вирусов, lg, в течение года хранения при температурах, °C			
		4	–20	–40	–196
Вакцинный штамм “Н”	8,0 ± 0,1 lgТЦД _{50/0,1 мл}	8,0 ± 0,3	7,0 ± 0,3	3,0 ± 0,3	—
Штамм “Индиана”	8,0 ± 0,1 lgТЦД _{50/0,1 мл}	8,0 ± 0,3	7,0 ± 0,3	3,0 ± 0,3	1,0 ± 0,3
“К-ИП”	6,0 ± 0,3 lgЭИД _{50/0,2 мл}	5,0 ± 0,3	5,0 ± 0,3	2,0 ± 0,3	—
“Massachusetts”	6,0 ± 0,1 lgЭИД _{50/0,2 мл}	5,0 ± 0,3	5,0 ± 0,3	1,0 ± 0,3	—
“B8-78”	6,0 ± 0,3 lgЭИД _{50/0,2 мл}	5,0 ± 0,3	5,0 ± 0,3	2,0 ± 0,3	—
“BSB”	7,0 ± 0,3 lgЭИД _{50/0,2 мл}	6,0 ± 0,3	5,0 ± 0,3	2,0 ± 0,3	—
“SB1”	6,0 ± 0,3 lgТЦД _{50/0,2 мл}	6,0 ± 0,1	6,0 ± 0,1	5,0 ± 0,3	—
“FS 126”	6,0 ± 0,3 lgТЦД _{50/0,2 мл}	5,0 ± 0,3	3,0 ± 0,3	3,0 ± 0,3	—

Примечание. Уровень значимости p < 0,05.

10 min with further immersion into liquid nitrogen (–196 °C) was the optimum cryopreservation regimen for “К-ИП”, “B8-78” vaccine strains, as well as for free of cells strain of herpes virus in turkey-hen. In this case no loss of initial activity in viruses within two years (observation term) was noted.

Strains, which are the part of bivalent vaccine against Marek’s disease, were separately stored.

Штаммы, входящие в состав бивалентной вакцины против болезни Марека, хранили отдельно. При этом клеточно-ассоциированный с первичными фибробластами 9-дневных куриных эмбрионов штамм "SB1" криоконсервировали в поддерживающей среде с добавлением 10% димексида со скоростью 1 град/мин до -40°C с последующим погружением в жидкий азот. Размораживание всех штаммов вирусов, хранившихся в жидком азоте, осуществляли на водяной бане при температуре $39-40^{\circ}\text{C}$.

Применение вышеназванных программ охлаждения до -196°C и размораживания позволило сохранить инфекционную активность и иммуногенность (80% и выше) вакцинных штаммов вирусов в течение двух лет (срок наблюдения). Хранение вируса NDV при температуре -20°C и лиофилизация VSV не обеспечивают сохранения их исходных биологических свойств. Для восстановления активности вирусов после хранения в течение года необходимо было провести несколько "слепых пассажей" на куриных эмбрионах. Кроме того, известно, что в процессе лиофилизации на биологические объекты, в том числе вирусы, оказывает воздействие гораздо больше неблагоприятных факторов, чем при криоконсервировании, что ведет к повреждению вирионов (возможно, их генетического материала) и как следствие этого к изменению исходных биологических свойств.

Анализируя полученные результаты по проблеме сохранения вышеперечисленных вирусов и их исходных биологических свойств, мы пришли к выводу, что штаммы вирусов, используемые в биопромышленности для производства противовирусных препаратов, необходимо замораживать по оптимальным программам их криоконсервирования и хранить исключительно в жидком азоте (-196°C). Однако, учитывая сложности транспортировки образцов, хранящихся в жидком азоте, необходима разработка и оптимальных режимов их лиофилизации.

Вирусные частицы представляют интерес как модельные объекты для изучения механизмов криоповреждения и криозащиты биологических систем, так как являются единственными формами жизни, паразитирующими на молекулярно-генетическом аппарате живой клетки. Исходя из этого, нами были проведены эксперименты по изучению возможности криоконсервирования вируса инфекционного ринотрахеита-пустуллезного вульвовагинита (ИРТ-ИПВ) крупного рогатого скота в чувствительной перевиваемой культуре клеток почки теленка (ПТ) на разных этапах его репродукции. В результате исследований установлено, что замораживание инфицированных клеток спустя 2, 6 и 24 ч с момента заражения не влияет на последующий выход инфекционных вирусных частиц.

Ведущее место среди клеточных культур, используемых для крупномасштабного культивиро-

Thereat cellular-associated with initial fibroblasts of 9-days' hen embryos "SB1" strain was cryopreserved under 10% DMSO solution with the rate of $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ down to -40°C with further immersion into liquid nitrogen. Thawing of all strains of viruses, stored in liquid nitrogen, was carried-out in a water bath under the temperature of $39-40^{\circ}\text{C}$.

Application of the mentioned above programs of cooling down to -196°C and freezing allowed to keep infectious activity and immunogeneity (80% and higher) in vaccine strains of viruses within two years (observation term). Storage of NDV virus under the temperature of -20°C and lyophilization of VSV one did not provide their initial biological characteristics. To recover viruses activity after their 1 year' storage it was necessary to carry-out several "blind passages" in hen embryos. Besides, it is known, that during the process of lyophilization more higher number of unfavorable factors in comparison with cryopreservation affect both biological object and viruses, that results in the damage of virions, probably, their genetic material, and as a result, to the change of initial biological characteristics.

Analyzing the obtained results on the problem of preservation of mentioned above viruses and their initial biological properties, we concluded, that it was necessary to freeze strains of viruses, used in bioindustry for production of antiviral preparations according to optimal programs of their cryopreservation and store just in liquid nitrogen (-196°C). However, taking into consideration the transporting of the samples, stored in liquid nitrogen, elaboration of optimal regimens of their lyophilization also is essential.

Viral particles are of great interest as model objects for studying the mechanisms of cryodamage and cryoprotection of biological systems, because they are the only forms of life, parasitizing in the molecular-genetic apparatus of alive cell. Proceeding from this fact, the experiments on studying of the possibility of infectious rhinotracheitis, pustular vulvovaginitis virus cryopreservation in cattle in a susceptible the re-cultured cell culture of calf kidney (CK) at various stages of its reproduction, were carried-out. In the results of experiments it was established, that virus cryostability in cells in 2 and 6 hrs from the moment of CK culture infection did not differ on one in 24 hrs from the beginning of cell infection.

FLK re-cultured line possesses a leading place among the cell cultures, used for large-scale culturing of leukosis virus with the aim of further obtaining of viral antigen for immunodiagnostics of this infection. This is the cell culture of sheep fetus kidney, chronically infected with the cattle leukosis virus. FLK and CK cultures were frozen according to optimal for cell cultures program under DMSO protection in 10%

вания вируса лейкоза с целью последующего получения вирусного антигена для иммунодиагностики этой инфекции, занимает перевиваемая линия FLK. Она представляет собой хронически инфицированную вирусом лейкоза крупного рогатого скота культуру клеток почки плода овцы. Клетки культуры FLK и ПТ замораживали по оптимальной для клеточных культур программе под защитой димексида в конечной концентрации 10% со скоростью 30–40 °C/мин до –28 °C с экспозицией при этой температуре в течение 15 мин с последующим быстрым погружением в жидкий азот [7]. После размораживания и удаления криопротектора производили высеv клеток с целью их последующего культивирования [6]. Восстановление процесса клеточной пролиферации и продукции вируса происходило после проведения 2–3 последовательных пересевов клеток, о чем свидетельствовала экспрессия вирусного антигена, оцененная радиоиммунным методом и иммуноферментным анализом.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Диагностика вирусных болезней животных* / Под ред. В. Н. Сюрин. – М.: Колос, 1980. – 399 с.
2. Звягин И. В., Хорьков И. А., Токарик Э. Ф. и др. Методические рекомендации по разработке режимов замораживания-высушивания биологических препаратов. – М.: Минсельхоз СССР, 1981. – 35 с.
3. Карышева А. Ф., Сюрин В. Н. Руководство по практической вирусологии. – Кишинев: Штиинца, 1980. – 210 с.
4. Никитин Е. Е., Звягин И. В. Замораживание и высушивание биологических препаратов. – М.: Колос, 1971. – 342 с.
5. *Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования* / Под ред. М. О. Биргера. – М.: Медицина, 1982. – 462 с.
6. Стегний М. Ю., Дикий И. Л., Стегний Б. Т. Особенности криоконсервирования клеток, инфицированных вирусами // *Експериментальна і клінічна медицина*. – 1999. – № 2. – С. 111–113.
7. *Холодовой стресс и биологические системы* / Под ред. А. А. Цуцаевой. – Киев: Наук. думка, 1991. – 174 с.

Поступила 18.12.2000

final concentration with the rate of 30–40 °C/min down to –28 °C with exposure under the given temperature within 15 min with further rapid immersion into liquid nitrogen [7]. After freeze-thawing and cryoprotectant removal inoculation of cells with the aim of further culturing [6] was done. Recovery of the process of cell proliferation and virus production occurred after 2–3 consecutive inoculations of cells, expression of viral antigen, estimated by means of radio immune method (RIM) and immune-enzymic analysis (IEA) testified to this fact.

REFERENCES

1. *Diagnostics of viral diseases in animals* / Ed. by V. N. Syurin. – M.: Kolos, 1980. – 399 p.
2. Zvyagin I. V., Khorkov I. A., Tokarik E. F. et al. Methodical recommendations on the elaboration of freezing-lyophilization regimens of biological preparations. – M.: Ministry of Agriculture of the USSR, 1981. – 35 p.
3. Karysheva A. F., Syurin V. N. Manual for practical virology. – Kishinev: Shtinitsa, 1980. – 210 p.
4. Nikitin E. E., Zvyagin I. V. Freezing and lyophilization of biological preparations. – M.: Kolos, 1971. – 342 p.
5. *Manual for microbiological and virusological methods for investigation* / Ed. by M. O. Birger. – M.: Meditsina, 1982. – 462 p.
6. Stegnyy M. Yu., Dikiy I. L., Stegnyy B. T. Peculiarities of cell cryopreservation, infected with viruses // *Experimental and clinical medicine*. – 1999. – № 2. – P. 111–113.
7. *Cold stress and biological systems* / Ed. by A. A. Tsutsayeva. – Kiev: Naukova dumka, 1991. – 174 p.

Accepted in 18.12.2000

Пути миграции криоконсервированных кроветворных клеток эмбриональной печени при трансплантации в эксперименте

В. И. СТРОНА, Ю. А. ДЕМИН, Т. М. ШАРЛАЙ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Migration Ways of Cryopreserved Embryonic Liver Haemopoietic Cells at Transplantation in Experiment

V. I. STRONA, Yu. A. DEMIN, T. M. SHARLAY

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

Изучено распределение криоконсервированных клеток эмбриональной печени (ККЭП), меченых по тритию, в организме животных после трансплантации. Показано, что тропность ККЭП к органам различна.

Вивчено розподіл криоконсервованих клітин ембріональної печінки (ККЕП), які мічені за тритієм, в організмі тварин після трансплантації. Показано, що тропність ККЕП до органів різна.

Authors studied a distribution of cryopreserved embryonic liver cells (CELC), tritium labelled, in organism of animal after transplantation. It is shown that the CELC are differently tropic to various organs.

Одна из наиболее актуальных проблем трансплантации — отсутствие достаточного количества донорских органов и тканей. Альтернативой трансплантации органов является клеточная терапия, цель которой — восстановить или улучшить биологическую функцию поврежденных тканей или органов [5].

Каждая фетальная клетка при благоприятном микроокружении может дать самообновляющийся, долгоживущий полноценный росток функциональной ткани в организме реципиента. Важнейшим компонентом эмбриофетальной клеточной терапии является замещение в органах реципиентов поврежденных специализированных клеток [2].

Использование клеток-предшественников гемопоэза для ауто- и аллогенной трансплантации стало привычным в клинической практике [3]. В процессе жизнедеятельности организма и после трансплантации клетки-предшественники гемопоэза активно мигрируют в костный мозг, а также при необходимости в периферическую кровь [5]. Что и как определяет местожительство (homing) стволовых клеток, недостаточно изучено. Понимание этого вопроса откроет неограниченные перспективы направленной доставки клеток к поврежденным тканям. Более того, остаются неизученными вопросы о распределении клеток-предшественников гемопоэза после трансплантации в организме реципиента с модельной экспериментальной патологией, а также когда и каким образом транспланти-

One of the top-priority problems of transplantation is the lack of sufficient quantity of donor organs and tissues. Alternative to the organ transplantation is cell therapy, which aim is a recovery or improvement of biological function of damaged tissues or organs [5].

Each fetal cell under favourable microenvironment can give a start to self-renewing, long-living integral lineage of functional tissue in a recipient's organism. The major component of embryonic-foetal cell therapy is the substitution of damaged specialised cells in recipients' organs [2].

Using of haemopoietic stem cells for auto- and allogeneic transplantation became routine in clinic [3]. In process of organism vital activity and after transplantation haemopoietic stem cells actively migrate to bone marrow and, when needed, to peripheral blood [5]. What determines and which is the way of determining the stem cells homing, this question is insufficiently studied. Understanding of this problem will reveal wide perspectives for directed delivery of cells to damaged tissues. Moreover, remains unstudied a problem of haemopoietic stem cells distribution after transplantation in organism of recipient with model experimental pathology, and also when and how the transplanted cells are delivered to target organs, to pathological site. Especially, when we deal with transplantation of ELC preparation, which has an evident cell polymorphism.

The aim of investigation is to determine the ways and terms of ELC migration at transplantation in model of experimental traumatic haemophthalm.

рованные клетки доставляются к органам-мишеням, к патологическому очагу, особенно когда речь идет о трансплантации препарата КЭП, обладающего выраженным клеточным полиморфизмом.

Цель исследования — определить пути и время миграции КЭП при трансплантации на модели экспериментального травматического гемофтальма.

КЭП получали после забоя самок сроком беременности 3 недели. Выделение и криоконсервирование клеток осуществляли по методу, разработанному в ИПКиК НАН Украины [1]. Препарат трансплантировали беспородным половозрелым кролям-самцам с травматическим гемофтальмом. Чтобы трансплантированные кроветворные КЭП можно было идентифицировать в организме реципиента, в клеточную суспензию вводили меченый предшественник синтеза ДНК. Для этого после размораживания клеточной суспензии (исходная концентрация клеток $50 \cdot 10^6/\text{мл}$) к ней добавляли ростовую среду в соотношении 1:1 и ^3H -тимидин (удельная активность 49 мБк/мМ) в концентрации 0,2 мБк на 1 мл суспензии клеток. Инкубирование клеток с меченым предшественником проводили при 37°C в течение 60 мин, после чего не включившийся изотоп удаляли из суспензии 2-кратной отмывкой ростовой средой.

Осадок ресуспендировали в ростовой среде, концентрация клеток для введения была доведена до $16 \cdot 10^6/\text{мл}$. Из этой суспензии отбирали аликваты по 100 мкл, наносили на миллипоровые фильтры, которые затем высушивали, отмывали 10%-м раствором трихлоруксусной кислоты и подсчитывали радиоактивность в диоксановом сцинтилляторе на счетчике "Бекман" (США) [4].

Интенсивность включения меченого предшественника в КЭП, который затем трансплантировали животным, составляла 33 631 имп/мин/ 10^6 клеток. Меченые по тритию клетки вводили кролям внутривенно и парабульбарно в дозе 1,0 и 0,5 мл соответственно. Забой животных проводили через 1, 6 и 24 ч после введения клеток, изымали различные органы, из которых делали навески ткани 50–70 мг и помещали в сцинтилляционные флаконы с диоксановым сцинтиллятором. Радиоактивность проб считали на счетчике "Бекман" в импульсах в минуту на 10^6 клеток или пересчитывали на 10 мг ткани.

Отдельно исследовали оболочки травмированного глаза, стекловидное тело. Левый глаз служил контролем. Предварительно на правом глазу животных моделировали травматический гемофтальм. Укол иглы в глаз проводили на расстоянии 6 мм от лимба, отсасывали 0,5 мл стекловидного тела, внутрь глаза вводили 0,5 мл крови, предварительно набранной из ушной вены того же кролика.

The ELC were obtained from perished female rabbits to the 3rd week of pregnancy. Cell isolation and cryopreservation were performed under the method elaborated in IPC&C of the Natl. Acad. Sci. of the Ukraine [1]. The preparation was transplanted to breedless mature male rabbits with traumatic haemophthalm. For identification of transplanted haemopoietic ELC in recipient organism the labelled DNA synthesis precursor was added to the suspension. For this aim after thawing of cell suspension (initial cell concentration $50 \cdot 10^6/\text{ml}$) there was the adding of the growth medium in 1:1 ratio and ^3H -thymidine (specific activity 49 mBc/mM) in concentration of 0.2 mBc to 1 ml of cell suspension. Incubation of cells with labelled precursor was performed at 37°C during 60 min, then non-incorporated isotope was removed out of suspension with twice washing-out with growth medium.

The sediment was resuspended in growth medium, cell concentration for injection was made to achieve $16 \cdot 10^6/\text{ml}$. From this suspension the 100 μl aliquots were taken and put on millipore filters, which were then dried, washed out with 10% trichlor acetate and radioactivity was counted up in dioxane scintillator by Beckman counter [5].

Intensity of labelled precursor incorporation to CELC, which was then transplanted to animals, made 33 631 imp./min/ 10^6 cells. Tritium labelled cells were injected to rabbits intravenously and parabolbarily in the dose of 1.0 and 0.5 ml, correspondingly. Animals were perished in 1, 6 and 24 hours after cell injection, then the various organs were taken out (withdrawn) and the tissue parts of 50–70 mg weight were prepared and placed to scintillation flasks with dioxane scintillator. Radioactivity of samples was counted up with Beckman counter in impulses per minute on 10^6 cells or re-counted per 10 mg of tissue.

Separately the traumatised eye membranes and vitreous body were studied. The left eye was a control. Preliminarily on animals' right eye a traumatic haemophthalm was modelled. The needle injection was made at a distance of 6 mm from limb, 0.5 ml of vitreous body was pumped out, and 0.5 ml of blood, preliminarily taken from otic vein of the rabbit, was injected into eye.

We have investigated the migration ways of transplanted cells in the presence of an evident pathological site, the traumatic haemophthalm in recipient's organism. In 1 hour after transplantation the tritium labelled ELC were found in experimental eye membranes with impulse quantity of 208 per 10 mg of tissue, in vitreous body it made 67 impulses per 10 mg of tissue. In tissues and vitreous body of control eye the radioactive label was not found, that testifies to the absence of transplanted cells in this organ (Table).

Нами исследованы пути миграции трансплантированных клеток при наличии в организме реципиента выраженного патологического очага — травматического гемофтальма. Через 1 ч после трансплантации меченые по тритию КЭП определялись в оболочках опытного глаза с количеством импульсов 208 на 10 мг ткани, в стекловидном теле того же глаза — 67 импульсов на 10 мг ткани. В тканях и стекловидном теле контрольного глаза радиоактивная метка не наблюдалась, что свидетельствует об отсутствии трансплантированных клеток в этом органе (таблица).

Распределение меченых клеток по ³H-тимидину ККЭП после трансплантации в эксперименте

Ткани и органы	Интенсивность включения ³ H-тимидина, имп/мин/10 мг ткани		
	1 ч	6 ч	24 ч
Оболочки правого глаза	208,4	37	—
Стекловидное тело правого глаза	67	77,5	29
Оболочки левого глаза	—	123	—
Стекловидное тело левого глаза	—	—	—
Печень	12,2	—	7
Суспензия костного мозга (·10 ⁶ клеток)	50 143	12 109	2 386
Гомогенат тимуса	18,2	—	—
Гомогенат сердца	6 140	3 860	4 330
Костный мозг из грудины	45 260	7 570	9 020
Легкие (гомогенат)	—	—	46

Через 6 ч после трансплантации картина несколько изменялась. В оболочках опытного глаза уменьшалось количество трансплантированных клеток, о чем свидетельствует снижение уровня счета, в стекловидном теле количество меченых клеток возрастало, что, по-видимому, связано с активной миграцией трансплантированных клеток из оболочек глаза в стекловидное тело к месту кровоизлияния. В это же время радиоактивная метка начинает прослеживаться в оболочках контрольного глаза. В стекловидном теле меченые клетки не определяются.

Через 24 ч после трансплантации в оболочках опытного глаза меченые клетки отсутствуют. В стекловидном теле радиоактивная метка наблюдается, хотя количество импульсов снижается. В этот период наблюдения в контрольном глазу меченые клетки отсутствуют.

Таким образом, трансплантированные клетки обладают выраженной тропностью к патологическому очагу. Именно меченые клетки прослеживаются в очаге поражения, что указывает на активное участие их в рассывании гемофтальма, т.е. в ликвидации патологического очага. Интересен факт появления через 6 ч меченых клеток в оболочках контрольного (интактного) глаза. Возможно, это обусловлено своеобразной перекрестной реакцией с травмированного глаза на здоровый. Однако, не

Distribution of ³H-labelled CELC after transplantation in experiment

Tissues and organs	Intensity of ³ H-thymidine incorporation, imp./min/10 mg of tissue		
	1 hour	6 hrs	24 hrs
Right eye membranes	208.4	37	—
Right eye vitreous body	67	77.5	29
Left eye membranes	—	123	—
Left eye vitreous body	—	—	—
Liver	12.2	—	7
Bone marrow cells suspension (·10 ⁶ cells)	50 143	12 109	2 386
Thymus homogenate	18.2	—	—
Heart homogenate	6 140	3 860	4 330
Breast bone marrow	45 260	7 570	9 020
Lungs (homogenate)	—	—	46

In 6 hours after transplantation we observed some changes. In experimental eye membranes the quantity of transplanted cells decreased, that is confirmed by reduced counting level. The quantity of labelled cells in vitreous body increases, that is probably associated with an active migration of transplanted cells from eye membranes to haemorrhage site in vitreous body. At the same time the radioactive label can be traced in control eye membranes. The labelled cells in vitreous body were not traced.

In 24 hours after transplantation the labelled cells in experimental eye membranes were not found. The radioactive label in vitreous body was observed, although the impulse quantity decreased. At this observation period the labelled cells were absent in control eye.

Thus, the transplanted cells are evidently tropic to the pathological site. The labelled cells are traced in the damage site, that testifies to their active participation in haemophthalm resorption, i.e. in disappearance of pathological site. There is an interesting fact of appearing of labelled cells in control (intact) eye membranes in 6 hours. Probably, it is caused by an original crossed reaction from traumatised to healthy eye. However, the cells leave the eye globe, when they have not found their target (a haemorrhagia in vitreous body), that is confirmed by the absence of impulses in 24 hours of observation.

In 6 hours after transplantation the impulses quantity in all studied organs decreases, that confirms their gradual elimination from blood flow and sedimentation in target organs. There were no labelled cells in thymus homogenate.

In 24 hours there was the same tendency for radioactive label reduction in bone marrow and some increase of impulse quantity in cardiac tissue and appearance of labelled cells in lungs.

Thus, after intravenous transplantation of CELC there is usual cell distribution in recipient's haemopoietic tissues, in regions of haemopoietic microenvironment and pathological site. A part of cells sedi-

найдя своей мишени (кровоизлияния в стекловидном теле), клетки покидают глазное яблоко, о чем свидетельствует отсутствие импульсов через 24 ч наблюдения.

Через 6 ч после трансплантации количество импульсов во всех исследованных органах снижалось, что подтверждает их постепенную элиминацию из кровотока и оседание в органах-мишенях. В гомогенате тимуса меченые клетки отсутствовали.

Через 24 ч наблюдается такая же тенденция к снижению радиоактивной метки в костном мозге, некоторое повышение количества импульсов в ткани сердца и появление меченых клеток в легких.

Таким образом, после внутривенной трансплантации ККЭП в организме реципиента определяется обычное распределение клеток в кроветворных тканях, в областях кроветворного микроокружения, а также патологического очага. Часть клеток оседает в различных органах, лишенных кроветворного микроокружения. Наблюдается выраженная тропность к патологическому очагу с самых ранних сроков после трансплантации, что может указывать на функциональную активность ККЭП в ликвидации экспериментального гемофтальма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Грищенко В. І., Снурніков О. С., Дьомін Ю. А. та ін. Заготівля, кріоконсервування та клінічне застосування ембріональних та фетальних клітин людини в офтальмологічній практиці: Метод. рекомендації.— Харків, 2000.— 15 с.
2. Грищенко В. І. Достижения и перспективы развития клеточной и тканевой терапии // Международный мед. журн.— 1999.— 5, № 4.— С. 6–10.
3. Byrne V. X., Russel N. H. Peripheral blood stem cell transplants // J. Cell Pathol.— 1998.— № 51.— P. 351–355.
4. Fleock A., Manro H. The precision of ultraviolet adsorption measurement in the Schmidt-Thanhauser procedure for nucleic acid estimation // Biochem. Biophys. Acta.— 1962.— № 55.— P. 571–578.
5. Whetton A. D., Yrahain J. J. Homing and mobilization in the stem cell niche // Trends in Cell Biology.— 1999.— № 9.— P. 233–238.

Поступила 16.10.2001

ments in various organs, deprived of haemopoietic microenvironment. There is an evident tropicity to pathological sites from the earliest terms after transplantation, that can demonstrate the functional activity of CELC in disappearance of experimental haemophthalm.

REFERENCES

1. Grischenko V. I., Snurnikov A. S., Demin Yu. A. et al. Collection, cryopreservation and clinical application of human embryonic and foetal cells in ophthalmologic practice: Methodical recommendations.— Kharkov, 2000.— 15 c.
2. Grischenko V. I. Achievements and perspectives in development of cell and tissue therapy // Mezhdunar. Med. Zhurn.— 1999.— 5, № 4.— P. 6–10.
3. Byrne V. X., Russel N. H. Peripheral blood stem cell transplants // J. Cell Pathol.— 1998.— № 51.— P. 351–355.
4. Fleock A., Manro H. The precision of ultraviolet adsorption measurement in the Schmidt-Thanhauser procedure for nucleic acid estimation // Biochem. Biophys. Acta.— 1962.— № 55.— P. 571–578.
5. Whetton A. D., Yrahain J. J. Homing and mobilization in the stem cell niche // Trends in Cell Biology.— 1999.— № 9.— P. 233–238.

Accepted in 16.10.2001

Влияние эндобронхиального введения экстракта криоконсервированных фрагментов ксеноселезенки на некоторые факторы местного иммунитета в комплексной терапии больных с абсцессами легких

В. В. БЫЗОВ, И. П. ВЫСЕКАНЦЕВ, С. Е. ГАЛЬЧЕНКО, Б. П. САНДОМИРСКИЙ
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Endobronchial Introduction of Extract of Cryopreserved Xenospleen Fragments on Some Local Immunity Factors in Complex Therapy of Patients with Lungs Abscesses

V. V. BYZOV, I. P. VYSEKANTSEV, S. Ye. GALCHENKO, B. P. SANDOMIRSKIY
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Изучено влияние эндобронхиального введения экстракта криоконсервированных фрагментов ксеноселезенки (ЭКФКС) на некоторые показатели местного иммунитета в комплексном лечении больных с абсцессами легких. Применение эндобронхиального введения ЭКФКС в комплексной терапии больных с абсцессами легких позволило сократить сроки восстановления некоторых показателей местного иммунитета до нормы.

Вивчено вплив ендобронхіального введення екстракту криоконсервованих фрагментів ксеноселезінки (ЕКФКС) на деякі показники місцевого імунітету в комплексному лікуванні хворих з абсцесами легень. Застосування ендобронхіального введення ЕКФКС в комплексній терапії хворих з абсцесами легень дозволило скоротити терміни оновлення деяких показників місцевого імунітету до норми.

The authors studied the effect of endobronchial introduction of cryopreserved xenospleen fragments extract (CXSFE) on some indices of local immunity in complex treatment of patients with lungs abscesses. Application of endobronchial introduction of CXSFE in complex therapy of patients with lungs abscesses allowed to reduce the terms of recovery of some indices of local immunity.

Гнойно-деструктивные заболевания легких (ГДЗЛ) являются многофакторными заболеваниями. К одному из основных факторов относится нарушение целостности и функций местных систем и механизмов защиты бронхов и легких.

Перспективным направлением в лечении больных с гнойно-септическими заболеваниями, в том числе и ГДЗЛ, является использование для детоксикационной терапии ксеноселезенки либо путем перфузии крови через экстракорпорально подключенную селезенку или ее срезы и фрагменты, либо внутривенного введения перфузата ксеноселезенки [1, 2]. Последний метод вызывает повышенный интерес, так как помимо детоксикационных свойств у перфузата ксеноселезенки обнаружили и иммуномодулирующий эффект. В литературе имеются сообщения о местном применении препарата, в частности перфузат использовали для промывания плевральной полости у больных с эмпиемой плевры [3].

Цель работы — изучение факторов местного иммунитета у больных с абсцессами легких, получавших курс лечения с использованием ЭКФКС.

В Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины из криоконсервированных фрагментов свиной селезенки был получен водный экстракт. Технология получения этого препарата

Lungs purulent-destructive diseases (LPDD) are multifactor ones. One of these factors is the impairment of integrity and functions of local systems and mechanisms of bronchi and lungs protection.

There is a perspective direction in treatment of patients with purulent-septic diseases, including LPDD, which consists in using in detoxicative therapy the xenospleen transplantation, the blood perfusion via extracorporally connected spleen or its sections or fragments or intravenous injection of xenospleen perfusate [1, 2]. The latter one is of great interest, because in addition to detoxicative properties of xenospleen perfusate one found the immunomodulating effect. There are some literature data on local application of the preparation, in particular for lavaging the pleural cavity in patients with pleura empyema [3].

The aim of this work is to study the local immunity factors in patients with lungs abscesses, which were treated with CXSFE.

Aqueous extract from cryopreserved pork spleen fragments was obtained at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine. The technology of preparation obtaining allows the maximum reducing of its cost price, comparing with the ones obtained

позволяет максимально снизить его себестоимость по сравнению с перфузатами ксеноселезенки, получаемыми по другим технологиям, гарантирует отсутствие контаминации микроорганизмами. Установлено, что хранение экстракта при -6°C до 20 сут не приводит к изменению его качественного и количественного состава. Экстракт применяли в городской клинической больнице № 13 для эндобронхиального введения больным с абсцессами легких.

В основную группу входили больные с абсцессами легких, которым в комплекс консервативных лечебных мероприятий были включены эндобронхиальные заливки ЭКФКС через микротрахеостому по 5 мл 2 раза в сутки в течение 10 дней. Непосредственно перед процедурой ЭКФКС отогревали на водяной бане при 38°C .

Контрольную группу составляли больные с аналогичными заболеваниями. Она была сходна с основной по полу, возрасту и тяжести клинических проявлений. У больных контрольной группы в лечебный комплекс входили эндобронхиальные заливки 1%-го раствора диоксидина.

Материалом для исследования служила мокрота больных. Определяли количественное соотношение альвеолярных макрофагов (АМ) и сегментоядерных нейтрофилов (СЯН), а также их функциональное состояние. Тестами для оценки функционального состояния АМ и СЯН служили: активность фагоцитоза (АФ), фагоцитарное число (ФЧ), завершенность фагоцитоза, оцениваемая по НСТ-тесту. Объектом фагоцитоза были стандартные суспензии бактерий *S. aureus* 209. Кроме того, исследовалось содержание в мокроте секреторного IgA, α -интерферонов и лизоцима. Все показатели определяли по стандартным методикам.

Для получения контрольных показателей (условно принятая норма) у практически здоровых мужчин и женщин, не имеющих хронической патологии и не перенесших в последние 6 месяцев никаких заболеваний, исследовали мокроту (5 мл). В мокроте определяли количество АМ, СЯН, их функциональную активность, количество секреторного иммуноглобулина А и α -интерферонов.

При изучении количественного соотношения АМ и СЯН в мокроте больных до начала курса лечения было установлено значительное увеличение этого соотношения (табл. 1). Исследование функционального состояния АМ и СЯН до начала комплексной терапии показало наличие различий в их способности к фагоцитозу — активность фагоцитоза АМ была ниже показателей нормы, а СЯН не отличалась от показателей нормы. Фагоцитарное число АМ и СЯН не отличалось от показателей нормы, а НСТ-тест был выше (табл. 2). При проведении комплексного лечения без введения ЭКФКС активность фагоцитоза АМ на 5–7-е сутки начала повышаться и достигала значений принятой нормы на 10–12-е сутки, а НСТ-тест на 10–12-е сутки снижался, но оставался выше показателей

with other technologies, guarantees the absence of microbial contamination. It is established that extract's storage at -6°C up to 20 days does not cause the changes of its qualitative and quantitative content.

The extract was applied at Kharkov City Clinical Hospital № 13 for endobronchial introduction in patients with lungs abscesses.

The main group was consisted of patients with lungs abscesses, who received both the standard therapy and endobronchial introduction of 5 ml CXSFE via microtracheostoma twice a day during ten days. CXSFE was thawed on water bath at 38°C directly before the procedure.

The control group consisted of patients with the same diseases. It was similar to the main group on sex and age distribution and severity of clinical indices. The therapy complex for patients from the control group contained the endobronchial introductions of 1% dioxidine solution.

Patients' sputum was the investigation material. We determined the quantitative ratio of alveolar macrophages (AM) and segmented neutrophils (SN), and also their functional state. We used the following tests for estimation of AM and SN functional state: phagocytosis activity (PhA), phagocytic number (PhN), phagocytosis completeness, determined with NBT-test. Standard suspensions of *S. Aureus* 209 bacteria were the objects for phagocytosis. Additionally we studied sputum content of secretory IgA, α -interferons and lysozyme. All indices were determined using standard techniques.

To obtain the control indices (the specifically assumed norm) we studied the sputum of actually healthy men and women with no chronic pathologies and no diseases during recent 6 month. We have determined in sputum the number of AM, SN, their functional activity, amount of secretory immunoglobulin A and α -interferons.

Studying the quantitative ratio of AM and SN in patients' sputum before starting the therapy we have established the considerable increase of this ratio (Table 1). Investigation of AM and SN functional state before the start of complex therapy showed the presence of differences in its phagocytosis ability: activity of AM phagocytosis was statistically true lower than normal indices, and that of SN did not differ from normal indices. AM and SN phagocytic number did not differ from the norm, and NBT-test was higher (Table 2). When carrying-out the complex treatment without CXSFE introduction the AM phagocytosis activity in 5–7 days increases and reaches the assumed norm values in 10–12 days, the NBT-test in 10–12 days decreases, but remains higher than the indices of specifically assumed norm. Under complex treatment with CXSFE introduction the activity of phagocytosis recovered even to the 5–7th days, and NBT-test within with this term reduced and to the 10–12th days did not differ from corresponding index in the group of healthy men and women. The activity

Таблица 1

Table 1

Динамика содержания альвеолярных макрофагов и сегментоядерных нейтрофилов в мокроте больных с абсцессами легких (n = 40) при комплексном лечении без и с введением ЭКФКС

Dynamics of the content of alveolar macrophages and segmented neutrophils in sputum of patients with lungs abscesses (n = 40) under complex treatment with or without CXSFE introduction

Клетки Cells	Группы больных Groups of patients	Значения исследованных показателей в группе здоровых мужчин и женщин (n = 28) Values of studied indices in the group of healthy men and women (n = 28)	Содержание клеток, %, после введения препарата, сут Content of cells, %, after preparation introduction, days			
			До введения ЭКФКС или до начала курса лечения Before introduction of CXSFE or before the start of treatment course	1	5-7	10-12
			$\bar{x} \pm S\bar{x}$	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	$\bar{x} \pm S\bar{x}$
Альвеолярные макрофаги Alveolar macrophages	Комплексная терапия без введения ЭКФКС Complex therapy without CXSFE introduction	81,4 ± 4,5	34,6 ± 5,1 $P_1 < 0,05$	30,1 ± 4,7 $P_1 < 0,05$ $P_2 > 0,05$	38,3 ± 4,2 $P_1 < 0,05$ $P_2 > 0,05$	51,4 ± 4,4 $P_1 < 0,05$ $P_2 < 0,05$
Сегментоядерные нейтрофилы Segmented neutrophils		18,6 ± 4,1	65,4 ± 4,8 $P_1 < 0,05$	69,9 ± 4,2 $P_1 < 0,05$ $P_2 > 0,05$	61,7 ± 4,4 $P_1 < 0,05$ $P_2 > 0,05$	48,6 ± 4,5 $P_1 < 0,05$ $P_2 < 0,05$
Альвеолярные макрофаги Alveolar macrophages	Комплексная терапия с введением ЭКФКС Complex therapy with CXSFE introduction	81,4 ± 4,5	32,0 ± 5,5 $P_1 < 0,05$	29,8 ± 5,1 $P_1 < 0,05$ $P_2 > 0,05$	43,9 ± 4,8 $P_1 < 0,05$ $P_2 > 0,05$	70,2 ± 4,3 $P_1 < 0,05$ $P_2 < 0,05$
Сегментоядерные нейтрофилы Segmented neutrophils		18,6 ± 4,1	68,0 ± 5,2 $P_1 < 0,05$	70,2 ± 4,9 $P_1 < 0,05$ $P_2 > 0,05$	56,1 ± 4,5 $P_1 < 0,05$ $P_2 > 0,05$	29,8 ± 4,6 $P_1 < 0,05$ $P_2 < 0,05$

Примечания. $\bar{x}$ — среднее арифметическое; $S\bar{x}$ — среднеквадратичное отклонение; P_1 — уровень доверительной вероятности между значениями $\bar{x}$ в группе здоровых мужчин и женщин и у больных; P_2 — уровень доверительной вероятности между значениями $\bar{x}$ до и в процессе лечения.

Notes. $\bar{x}$ — the mean value; $S\bar{x}$ — standard deviation; P_1 — the level of confidence probability between the values $\bar{x}$ in the group of healthy men and women and in patients; P_2 — the level of confidence probability between the values $\bar{x}$ before and in the process of treatment.

условно принятой нормы. При комплексном лечении с введением ЭКФКС активность фагоцитоза восстанавливалась уже на 5–7-е сутки, НСТ-тест в этот срок снижался и на 10–12-е сутки не отличался от соответствующего показателя в группе здоровых мужчин и женщин. Активность фагоцитоза СЯН у больных контрольной группы оставалась в пределах показателей условно принятой нормы, с 5–7-х суток повышалась по сравнению со значениями до начала лечения. Фагоцитарное число СЯН не изменялось на протяжении 10–12 суток. НСТ-тест на 10–12-е сутки снижался, но оставался выше показателей нормы. При проведении комплексной терапии с введением ЭКФКС активность фагоцитоза СЯН также с 5–7-х суток повышалась по сравнению с исходными значениями, но не превышала показателей нормы. Фагоцитарное число превышало на 10–12-е сутки исходные значения, но не отличалось от соответствующего показателя в группе здоровых мужчин и женщин. НСТ-тест начинал понижаться с 5–7-х суток и нормализовался на 10–12-е сутки. Проведение комплексной терапии без и с введением ЭКФКС обуславливало уменьшение соотношения СЯН/АМ за счет увеличения количества АМ и уменьшения доли СЯН. У больных, которым вводили ЭКФКС, эта тенденция

of phagocytosis of SN in patients of the control group remained within the limits of specifically assumed norm, since the 5–7th days it increased when comparing with the values before the treatment start. SN phagocytic number did not change during 10–12 days. NBT-test to 10–12th days reduced, but remained higher than norm indices. When conducting complex therapy with CXSFE introduction the SN phagocytosis activity also increased starting from the 5–7th days in comparison with initial values, but did not exceed the norm indices. Phagocytic number exceeded to the 10–12th days initial values, but did not differ from corresponding index in the group of healthy men and women. NBT-test began reducing from the 5–7th days and normalised to the 10–12th days. Performing the complex therapy with and without introduction of CXSFE stipulated the decrease in the ratio of SN/AM due to enhancing of AM number and reducing SN part. In patients with CXSFE introduction this tendency was more manifested. Besides, CXSFE introduction stipulated more intensive increase of phagocytosis activity of AM and SN, an increase of phagocytic number and recovery to the normal values of NBT-test.

Таблица 2

Table 2

Функциональное состояние альвеолярных макрофагов и сегментоядерных нейтрофилов в мокроте больных с абсцессами легких (n = 40) при комплексном лечении без и с введением ЭКФКС

Functional state of alveolar macrophages and segmented neutrophils in sputum of patients with lungs abscesses (n = 40) under complex treatment with or without CXSFE introduction

Клетки Cells	Показатели Indices	Значения исследо- вавшихся показа- телей в группе здоровых мужчин и женщин (n = 28) Values of studied indices in group of healthy men and women (n = 28)	Группы больных Groups of patients	Значения показателей функциональной активности клеток при лечении в течение, сут Values of indices of functional activity of cells during treatment, duration, days			
				До введения ЭКФКС или до начала курса лечения Before introduction of CXSFE or before the start of treatment course	1	5-7	10-12
				$\bar{x} \pm S\bar{x}$	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	$\bar{x} \pm S\bar{x}$
Альвеолярные макрофаги Alveolar macrophages	Активность фагоцитоза Activity of phagocytosis	50-70	A	43,0 ± 2,4 $P_1 < 0,05$	43,8 ± 2,3 $P_1 < 0,05$ $P_2 > 0,05$	45 ± 2,2 $P_1 < 0,05$ $P_2 > 0,05$	52 ± 2,6 $P_1 > 0,05$ $P_2 < 0,05$
			B	43,7 ± 2,1 $P_1 < 0,05$	43,2 ± 2,5 $P_1 < 0,05$ $P_2 > 0,05$	48,1 ± 2,4 $P_1 > 0,05$ $P_2 > 0,05$	64,5 ± 2,3 $P_1 > 0,05$ $P_2 < 0,05$
	Фагоцитарное число Phagocytic number	3-6,5	A	3,2 ± 0,2 $P_1 > 0,05$	3,2 ± 0,4 $P_1 > 0,05$ $P_2 > 0,05$	3,4 ± 0,3 $P_1 > 0,05$ $P_2 > 0,05$	3,6 ± 0,2 $P_1 > 0,05$ $P_2 > 0,05$
			B	3,2 ± 0,3 $P_1 > 0,05$	3,2 ± 0,3 $P_1 > 0,05$ $P_2 > 0,05$	3,9 ± 0,3 $P_1 > 0,05$ $P_2 > 0,05$	6,4 ± 0,4 $P_1 > 0,05$ $P_2 < 0,05$
	НСТ-тест NBT-test	8-12	A	24,2 ± 3,1 $P_1 < 0,05$	22,8 ± 2,9 $P_1 < 0,05$ $P_2 > 0,05$	18,3 ± 2,1 $P_1 < 0,05$ $P_2 > 0,05$	16,2 ± 2,3 $P_1 < 0,05$ $P_2 < 0,05$
			B	25,1 ± 2,7 $P_1 < 0,05$	25,1 ± 2,1 $P_1 < 0,05$ $P_2 > 0,05$	16,4 ± 2,2 $P_1 < 0,05$ $P_2 < 0,05$	14,1 ± 2,4 $P_1 > 0,05$ $P_2 < 0,05$
Сегментоядерные нейтрофилы Segmented neutrophils	Активность фагоцитоза Activity of phagocytosis	40-80	A	36,4 ± 2,7 $P_1 > 0,05$	36,3 ± 2,4 $P_1 > 0,05$ $P_2 > 0,05$	41,4 ± 4,2 $P_1 > 0,05$ $P_2 < 0,05$	55,3 ± 4,5 $P_1 > 0,05$ $P_2 < 0,05$
			B	36,8 ± 2,4 $P_1 > 0,05$	36,6 ± 3,1 $P_1 > 0,05$ $P_2 > 0,05$	54,8 ± 3,6 $P_1 > 0,05$ $P_2 < 0,05$	72,1 ± 4,2 $P_1 > 0,05$ $P_2 < 0,05$
	Фагоцитарное число Phagocytic number	6-9	A	6,8 ± 0,3 $P_1 > 0,05$	6,7 ± 0,4 $P_1 > 0,05$ $P_2 > 0,05$	7,2 ± 0,4 $P_1 > 0,05$ $P_2 > 0,05$	7,5 ± 0,3 $P_1 > 0,05$ $P_2 > 0,05$
			B	6,7 ± 0,3 $P_1 > 0,05$	6,7 ± 0,4 $P_1 > 0,05$ $P_2 > 0,05$	7,8 ± 0,3 $P_1 > 0,05$ $P_2 > 0,05$	8,3 ± 0,3 $P_1 > 0,05$ $P_2 < 0,05$
	НСТ-тест NBT-test	10-15	A	30,4 ± 2,7 $P_1 < 0,05$	30,2 ± 3,1 $P_1 < 0,05$ $P_2 > 0,05$	26,1 ± 2,8 $P_1 < 0,05$ $P_2 > 0,05$	21,8 ± 3,0 $P_1 < 0,05$ $P_2 < 0,05$
			B	31,1 ± 3,2 $P_1 < 0,05$	31,3 ± 2,8 $P_1 < 0,05$ $P_2 > 0,05$	20,3 ± 2,6 $P_1 < 0,05$ $P_2 < 0,05$	17,6 ± 2,4 $P_1 > 0,05$ $P_2 < 0,05$

Примечания. А — без введения ЭКФКС; В — с введением ЭКФКС; $\bar{x}$ — среднее арифметическое; $S\bar{x}$ — среднеквадратичное отклонение; P_1 — уровень доверительной вероятности между значениями $\bar{x}$ в группе здоровых мужчин и женщин и у больных; P_2 — уровень доверительной вероятности между значениями $\bar{x}$ до и в процессе лечения.

Notes. A — without CXSFE introduction; B — with CXSFE introduction; $\bar{x}$ — the mean value; $S\bar{x}$ — standard deviation; P_1 — the level of confidence probability between the values $\bar{x}$ in the group of healthy men and women and in patients; P_2 — the level of confidence probability between the values $\bar{x}$ before and in the process of treatment.

была более выраженной. Кроме того, введение ЭКФКС обуславливало более интенсивное повышение активности фагоцитоза АМ и СЯН, повышение ФЧ и восстановление до нормы значений НСТ-теста.

При изучении содержания секреторного IgA у всех больных было установлено незначительное повышение его концентрации по сравнению с группой здоровых мужчин и женщин, однако эти различия были недостоверными (табл. 3). У больных контрольной группы его содержание повышалось на 5–7-е сутки и снижалось на 10–12-е сутки, оставаясь выше показателей условной нормы. После введения ЭКФКС концентрация секреторного IgA также максимально повышалась на 5–7-е сутки и понижалась на 10–12-е. При этом его концентрация у этих больных при всех сроках наблюдения была выше, чем у больных, получавших терапию без введения ЭКФКС.

Таблица 4

Содержание α-интерферонов в мокроте больных с абсцессами легких при комплексном лечении без и с введением ЭКФКС

Content of α-interferons in sputum of patients with lungs abscesses under complex treatment with or without CXSFE introduction

Группы больных Groups of patients	Концентрация α-интерферонов, пг/мл, в течение, сут Concentration of α-interferons, pg/ml, duration, days			
	До введения ЭКФКС или до начала курса лечения Before introduction of CXSFE or before the start of treatment course	1	5–7	10–12
	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	$\bar{x} \pm S\bar{x}$
Комплексное лечение без введения ЭКФКС (n = 40) Complex therapy without CXSFE introduction (n = 40)	52,1 ± 2,3 P ₁ < 0,05	52,4 ± 1,9 P ₁ < 0,05 P ₂ > 0,05	60,3 ± 2,5 P ₁ < 0,05 P ₂ < 0,05	48,3 ± 2,1 P ₁ < 0,05 P ₂ > 0,05
Комплексное лечение с введением ЭКФКС (n = 40) Complex therapy with CXSFE introduction (n = 40)	52,4 ± 2,1 P ₁ < 0,05	53,2 ± 2,5 P ₁ < 0,05 P ₂ > 0,05	69,1 ± 2,7 P ₁ < 0,05 P ₂ < 0,05	55,1 ± 2,5 P ₁ < 0,05 P ₂ > 0,05

Примечания. Концентрация α-интерферонов в мокроте контрольной группы (n = 28) составляла 40,0 ± 2,1 пг/мл; $\bar{x}$ — среднее арифметическое; $S\bar{x}$ — среднеквадратичное отклонение; P₁ — уровень доверительной вероятности между значениями $\bar{x}$ в группе здоровых мужчин и женщин и у больных; P₂ — уровень доверительной вероятности между значениями $\bar{x}$ до и в процессе лечения.

Notes. Concentration of α-interferons in sputum of the control group (n = 28) made 40.0 ± 2.1 pg/ml; $\bar{x}$ — the mean value; $S\bar{x}$ — standard deviation; P₁ — the level of confidence probability between the values $\bar{x}$ in the group of healthy men and women and in patients; P₂ — the level of confidence probability between the values $\bar{x}$ before and in the process of treatment.

Таблица 3

Содержание секреторного иммуноглобулина А в мокроте больных с абсцессами легких при комплексном лечении без и с введением ЭКФКС

Content of secretory IgA in sputum of patients with lungs abscesses under complex treatment with or without CXSFE introduction

Группы больных Groups of patients	Концентрация секреторного IgA, г/л, в течение, сут Concentration of secretory IgA, g/l, duration, days			
	До введения ЭКФКС или до начала курса лечения Before introduction of CXSFE or before the start of treatment course	1	5–7	10–12
	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	$\bar{x} \pm S\bar{x}$
Комплексное лечение без введения ЭКФКС (n = 40) Complex therapy without CXSFE introduction (n = 40)	22,0 ± 1,2 P ₁ > 0,05	22,9 ± 1,9 P ₁ > 0,05 P ₂ > 0,05	28,4 ± 1,7 P ₁ < 0,05 P ₂ < 0,05	24,5 ± 1,9 P ₁ < 0,05 P ₂ > 0,05
Комплексное лечение с введением ЭКФКС (n = 40) Complex therapy with CXSFE introduction (n = 40)	22,2 ± 1,4 P ₁ > 0,05	24,3 ± 2,2 P ₁ > 0,05 P ₂ > 0,05	35,8 ± 2,1 P ₁ < 0,05 P ₂ < 0,05	31,3 ± 2,3 P ₁ < 0,05 P ₂ < 0,05

Примечания. Концентрация секреторного IgA в мокроте контрольной группы (n = 28) составляла 17,8 ± 1,2 г/л; $\bar{x}$ — среднее арифметическое; $S\bar{x}$ — среднеквадратичное отклонение; P₁ — уровень доверительной вероятности между значениями $\bar{x}$ в группе здоровых мужчин и женщин и у больных; P₂ — уровень доверительной вероятности между значениями $\bar{x}$ до и в процессе лечения.

Notes. Concentration of secretory IgA in sputum of the control group (n = 28) made 17.8 ± 1.2 g/l; $\bar{x}$ — the mean value; $S\bar{x}$ — standard deviation; P₁ — the level of confidence probability between the values $\bar{x}$ in the group of healthy men and women and in patients; P₂ — the level of confidence probability between the values $\bar{x}$ before and in the process of treatment.

When studying the content of secretory IgA in all patients a slight increase in its concentration was found when comparing with the healthy men and women, but these differences were not significantly true (Table 3). In patients of the control group its content increased to the 5–7th days and reduced to the 10–12th days, keeping the level higher than specifically assumed norm. After CXSFE introduction the concentration of secretory IgA also maximally increased to the 5–7th days and reduced to the 10–12th days. In this case its concentration in the patients with all observation terms was higher than in patients received the therapy without CXSFE introduction.

The content of α-interferon in patients' sputum exceeded corresponding indices in the group of healthy men and women (Table 4). When conducting of complex treatment with and without introduction of CXSFE the concentration of α-interferons increased by reaching maximum values to the 5–7th days and reduced at the 10–12th

Содержание α -интерферонов в мокроте больных превышало соответствующие показатели в группе здоровых мужчин и женщин (табл. 4). При проведении комплексного лечения без и с введением ЭКФКС концентрация α -интерферонов повышалась, достигая максимальных значений на 5–7-е сутки, и понижалась на 10–12-е сутки до исходных значений. Концентрация α -интерферонов после введения ЭКФКС была выше, чем у больных контрольной группы.

При изучении содержания лизоцима в мокроте было установлено, что у всех наблюдавшихся больных его содержание оказалось ниже средних показателей в нормальном бронхиальном секрете — $1,5 \pm 0,6$ мг/мл (норма 5–8 мг/мл). Введение ЭКФКС повышало содержание лизоцима до $6,5 \pm 1$ мг/мл, а на 10–12-е сутки — до $8,0 \pm 1,1$ мг/мл. У больных контрольной группы его содержание на 10–12-е сутки не превышало $2,2 \pm 1,3$ мг/мл (рисунок).

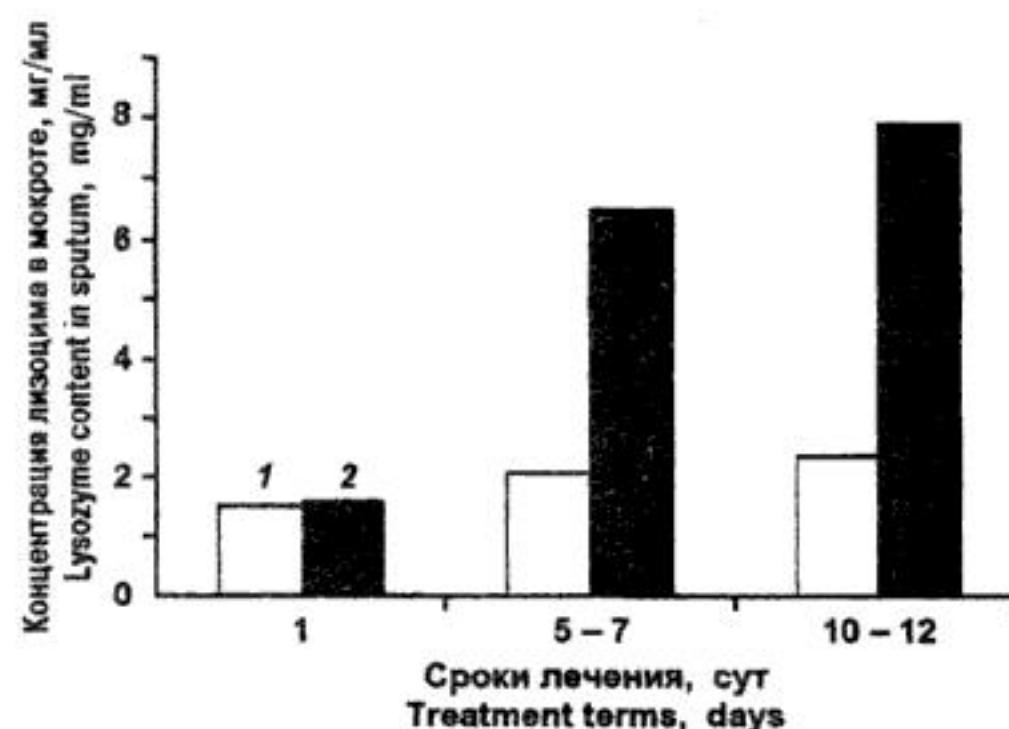
Следует отметить, что за весь период лечения с применением эндобронхиального введения ЭКФКС и наблюдения до 3-х лет после окончания курса лечения не было отмечено каких-либо осложнений или неблагоприятных последствий.

Таким образом, у больных с абсцессами легких наблюдаются нарушения местного иммунитета бронхолегочной системы. Применение эндобронхиального введения ЭКФКС в комплексной терапии больных с абсцессами легких способствует более раннему восстановлению показателей местного иммунитета до значений нормы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зубков В. И., Силантьев В. В., Деев В. А. и др. Применение ксеноселезенки в лечении гнойно-септических осложнений // *Клінічна хірургія*.— 2000.— № 12.— С. 43–44.
2. Никонов С. Д., Цыпин А. Б., Макаров А. А. и др. Первый опыт применения перфузата ксеноселезенки в лечении больных с обширными гнойно-деструктивными заболеваниями легких и плевры // *Грудная и сердечно-сосудистая хирургия*.— 1991.— № 2.— С. 42–45.
3. Опанасенко Н. С. Использование методов экстракорпоральной детоксикации и афферентного воздействия на организм при лечении гнойно-воспалительных заболеваний легких и плевры // *Клінічна хірургія*.— 1997.— № 3–4.— С. 89–92.

Поступила 11.09.2001



Динамика уровня содержания лизоцима в мокроте больных основной группы в сравнении с контрольной: 1 — контрольная группа; 2 — основная группа.

Dynamics of the level of lysozyme content in sputum of patients of main group in comparison with the control: 1 — control group; 2 — main group.

days down to initial values. Concentration of α -interferons after CXSFE introduction was higher than in patients of the control group.

When studying the content of lysozyme in sputum it was found that in all examined patients its content occurred to be lower than mean indices in normal bronchial secretion — 1.5 ± 0.6 mg/ml (norm — 5–8 mg/ml). CXSFE introduction increased the content of lysozyme up to 6.5 ± 1 mg/ml, and to the 10–12 days up to 8 ± 1.1 mg/ml. In the control group patients its content to the 10–12th days did not exceed 2.2 ± 1.3 mg/ml (Figure).

It should be noted that within the whole period of treatment when applying endobronchial introduction of CXSFE and monitoring up to 3 years after finishing the treatment course, no complications or unfavourable consequences were observed.

Thus in patients with lungs abscesses we observed the disorders of local immunity of bronchial and lungs system. Application of endobronchial CXSFE introduction in complex therapy of patients with lungs abscesses contributes to earlier recovery of indices of local immunity to the norm values.

REFERENCES

1. Zubkov V. I., Silantiev V. V., Deyev V. A. et al. Xenospleen application in treatment of purulent-septic complications // *Klinichna Khirurgiya*.— 2000.— № 12.— P. 43–44.
2. Nikonov S. D., Tsypin A. B., Makarov A. A. et al. First experience of xenospleen perfusate application when treating patients with extensive pyo-destructive diseases of lungs and pleura // *Grudnaya i Serdechno-sosudistaya Khirurgiya*.— 1991.— № 2.— P. 42–45.
3. Opanasenko N. S. Usage of the methods of extracorporeal detoxication and afferent effect on an organism during treatment of pyo-inflammatory diseases of lungs and pleura // *Klinichna Khirurgiya*.— 1997.— № 3–4.— P. 89–92.

Accepted in 11.09.01

Исследование термоиндуцированных изменений микроструктуры крови методом спинового зонда

Л. В. ЦЫМБАЛ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Spin-Probe Study of Thermoinduced Changes in Blood Microstructure

L. V. TSYMBAL

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

Анализ абсолютных и активационных параметров подвижности гидрофильного спинового зонда в водной среде позволяет получать информацию о межмолекулярных взаимодействиях в цитоплазме эритроцитов [3]. В настоящей работе предложенный экспериментальный подход применен для исследования микроструктуры донорской и кордовой крови при охлаждении.

Спин-меченые образцы готовили, как описано в [3]. Использовали кровь донора, а также кордовую кровь, эритроцитарную массу и плазму кордовой крови человека.

Спектры ЭПР зонда ТЕМПОН регистрировали на спектрометре ER-100D "Bruker" (Германия) в диапазоне температур 37–0 °C. Частоту вращательной подвижности зонда рассчитывали по формуле [2].

Использованный в данной работе параметр ν вращательной подвижности зонда, определенный по центральной и высокочастотной компонентам спектра ЭПР, позволяет опосредованно судить об изменении структуры сетки водородных связей в воде [3]. Было проведено сравнительное исследование термоиндуцированных структурных переходов в "чистой воде", а также в воде плазмы и крови.

На рисунке представлены температурные зависимости подвижности зонда в водных системах по мере усложнения их состава. В "чистой воде", содержащей 100 мкМ зонда, наблюдаются температурозависимые переходы, характеризующие изменение микроструктуры системы вода-зонд ТЕМПОН вследствие изменения межмолекулярных взаимодействий между молекулами зонда и воды (кривая 1). По-видимому, сохранение или модификация этих переходов должны отражать соответственно сохранение или изменение структуры воды при растворении в ней дополнительных примесей. Профиль кривой 2 свидетельствует о хорошем совпадении температур переходов в воде и в плазме, что согласуется также с характером немонотонных изменений прочности водородных связей в водно-солевых растворах глобулярных белков [1]. Кривая 3 демонстрирует изменение структуры сетки водородных связей в водно-белковой системе плазмы при наличии в ней клеток. Видно, что изменяются число и характер экстремумов на кривой, что отражает, по-видимому, влияние клеточной поверхности на структуру объемной воды в крови. Резкое уменьшение микровязкости

Аррениусовы зависимости частоты вращательной подвижности зонда ТЕМПОН в различных системах: 1 — вода; 2 — плазма кордовой крови; 3 — донорская кровь; 4 — цитоплазма донорских эритроцитов в составе крови; 5 — цитоплазма кордовых эритроцитов в физиологическом растворе NaCl; 6 — цитоплазма эритроцитов в осадке; 7 — цитоплазма кордовых эритроцитов в осадке.

Arrhenius dependencies of rotation mobility frequency of TEMPON probe in various systems: 1 — water; 2 — cord blood plasma; 3 — donor blood; 4 — cytoplasm of donor erythrocytes in blood composition; 5 — cytoplasm of cord erythrocytes in NaCl physiological solution; 6 — erythrocyte cytoplasm in sediment; 7 — cord erythrocyte cytoplasm in sediment.

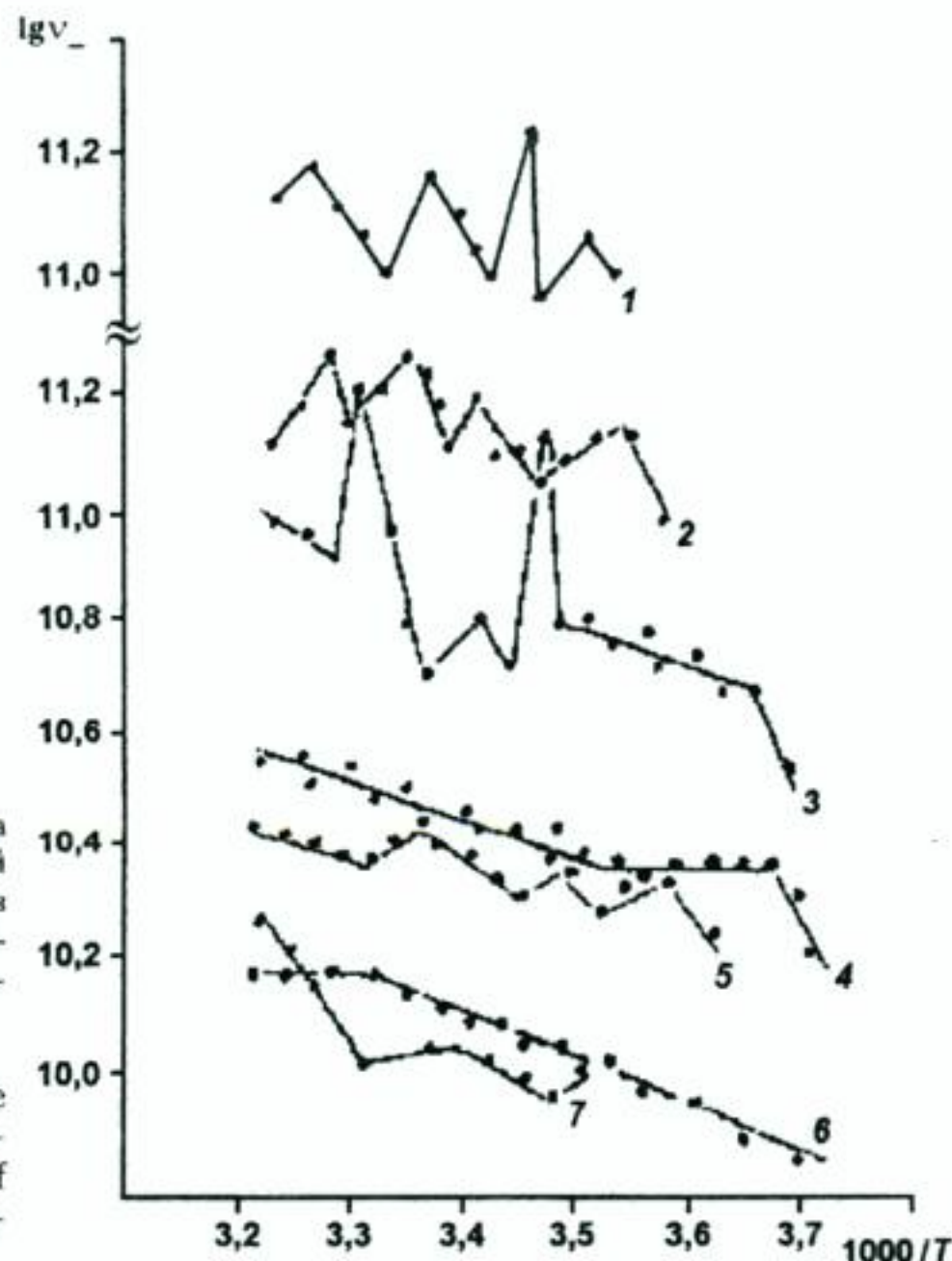
Analysis of absolute and activation parameters of hydrophilic spin probe mobility in an aqueous medium allows obtaining the information on intermolecular interactions in erythrocyte cytoplasm [3]. In this work the proposed experimental approach was applied for investigating the microstructure of donor and cord blood under cooling.

Spin-labelled samples were prepared as it was described in the paper [3]. We used donor blood, as well as cord blood, erythrocyte mass and human cord blood plasma.

EPR spectra of TEMPON probe were recorded by ER-100D spectrophotometer of "Bruker" (Germany) within temperature range of 37–0 °C. The frequency of probe rotational mobility was calculated according to the formula [2].

Used in this work the ν parameter of probe rotation motility, determined on central and high-field components of EPR spectrum, allows to indirectly judge about the change in the structure of hydrogen bonds network in water [3]. Comparative study of thermoinduced structural transitions in "pure water", as well as in plasma and blood water, was performed.

The figure shows temperature dependencies of probe mobility in aqueous systems with complication of their composition. In "pure



крови при охлаждении до 30 °C может играть важную роль в механизмах гомеостаза на уровне организма.

Существенная иммобилизация подвижности зонда в цитоплазме эритроцитов в крови обнаружена при удалении плазмы (кривые 4 и 6). В этом случае изменение структуры растворителя модулируется водно-белковыми взаимодействиями в цитоплазме, причем концентрирование клеток приводит не только к увеличению микровязкости цитоплазмы (кривая 6), но и к изменению структуры водно-белковой матрицы, о чем свидетельствует исчезновение термоиндуцированного структурного перехода при 10 °C.

При исследовании температурозависимых изменений микровязкости цитоплазмы кордовых эритроцитов (в сравнении с донорскими) обнаружены уменьшение этого параметра при физиологической температуре и увеличение зависимости от температуры структуры цитоплазмы при охлаждении (кривая 7). Некоторое разбавление кордовой эритроцитом физиологическим раствором приводило к уменьшению микровязкости цитоплазмы, а также увеличению немонотонности температурной зависимости параметра подвижности зонда (кривая 5). Можно заключить, что различия активационных параметров вращения зонда в цитоплазме кордовых и донорских эритроцитов при охлаждении до температуры перехода около 30 °C отражают различия динамической структуры цитоплазмы этих клеток, обусловленные, очевидно, внутриклеточными белками.

Таким образом, регистрируемые с помощью гидрофильного зонда изменения межмолекулярных взаимодействий в цитоплазме эритроцитов различного происхождения могут отражать изменения конформационного состояния и, как следствие, водно-белковых взаимодействий внутриклеточных белков. Характер термоиндуцированных изменений микровязкости водно-белковой системы крови может быть общим для других жидкостей организма и иметь информативное значение за счет существования протяженной сети водородных связей и возможности [1] бесконтактного взаимодействия их компонентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кайварайнен А. И. Термодинамический анализ процессов в трехкомпонентной системе вода-ионы-макромолекулы. Механизмы термоиндуцированных переходов в системе. Дестабилизация растворителя и взаимодействие белок-белок и белок-клетка через растворитель // *Биофизика*. – 1988. – 33, № 3. – С. 540.
2. Лихтенштейн Г. И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии. – М.: Наука, 1974. – 256 с.
3. Цымбал Л. В. Влияние неспецифических факторов на динамическую структуру цитоплазмы эритроцитов // *Пробл. криобиологии*. – 2000. – № 3. – С. 8–15.

Поступило 13.03.2001

water", containing 100 μ M of probe, we observed temperature-dependent transitions, characterising the microstructure change in the water-TEMPON probe system due to the change intermolecular interactions between probe and water molecules (curve 1). Apparently, the keeping or modification of these transitions should reflect the preservation or change in water structure during dissolution in it of the additives, correspondingly. The profile of curve 2 testifies to a good coincidence of transition temperatures in water and plasm, that correlates with the character of non-monotone changes of hydrogen bounds tightness in aqueous-saline solutions of globular proteins [1]. Curve 3 demonstrates the change in the structure of hydrogen bounds lattice in plasm aqueous-protein system at the presence of cells in it. It is seen, that the number and the character of extrema on the curve change, that, apparently, reflects the effect of cellular surface on the structure of volumetric water in blood. A sharp decrease in blood microviscosity under cooling down to 30 °C can play an important role in homeostasis mechanisms at an organism's level.

A considerable immobilisation of probe mobility in erythrocyte cytoplasm in blood was revealed during plasm removal (curves 4 and 6). In this case the change in a solvent structure is modulated by aqueous-protein interactions in cytoplasm, and the concentrating of cells results not only in an increase in cytoplasm microviscosity (curve 6) as well, but in the change in aqueous-protein matrix structure, that is testified by the disappearance of thermoinduced structural transition under 10 °C.

When investigating temperature-dependent changes in plasm microviscosity of cord erythrocytes in comparison with donor ones we revealed a decrease in this parameter under physiological temperature and an increase in the dependence of cytoplasm structure on the temperature under cooling (curve 7). Certain dilution of cord erythrocyte mass by physiological solution resulted in a decrease in cytoplasm microviscosity, as well as in an augmentation of the non-monotonicity of temperature dependence of probe mobility parameter (curve 5). We can conclude, that the differences of activation parameters of probe rotation in cytoplasm of cord and donor erythrocytes under cooling down to the transition temperature about 30 °C reflect the differences of cytoplasm dynamic structure of these cells, obviously, stipulated by intracellular proteins.

Thus, the recorded by means of hydrophil probe changes of intermolecular interactions in erythrocyte cytoplasm of different origin can reflect the changes of conformational protein state and, as a result, of intracellular aqueous-protein interactions. The character of thermoinduced changes in microviscosity of blood aqueous-protein system can be common for other fluids of an organism and have an informative value due to the existence of extended network of hydrogen bounds and the possibility [1] of contact-free interaction of their components.

REFERENCES

1. Kajvarajnen A. I. Thermodynamic analysis of processes in a three-component system of water-ions-macromolecules. Mechanisms of thermoinduced transitions in a system. Destabilisation of a solvent and protein-protein and protein-cell interaction through a solvent // *Biofizika*. – 1988. – 33, № 3. – P. 540.
2. Likhtenshtein G. I. Method of spin labels in molecular biology. – M.: Nauka, 1974. – 256 p.
3. Tsybmal L. V. Effect of non-specific factors on dynamical structure of erythrocyte cytoplasm // *Problems of cryobiology*. – 2000. – № 3. – P. 8–15.

Accepted in 13.03.2001

Спектральные свойства фетального гемоглобина после замораживания-оттаивания в растворах глицерина и 1,2-пропандиола

Н. Н. ТИМЧЕНКО, Е. Д. РОЗАНОВА, Ю. В. КУЧЕРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Spectral Properties of Fetal Hemoglobin after Freeze-Thawing in Glycerol and 1,2-Propanediol Solutions

N. N. TIMCHENKO, E. D. ROZANOVA, Yu. V. KUCHERENKO

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

Для успешного криоконсервирования эритроцитов крови используются криопротекторы глицерин и 1,2-пропандиол (1,2-ПД), позволяющие сохранить целостность клеток, хорошо проникающие через клеточную мембрану. Эти криопротекторы должны обеспечивать сохранность основного внутриэритроцитарного белка — гемоглобина. Интенсивное использование в медицине кордовой крови, характеризующейся высоким содержанием фетального гемоглобина (HbF), разработка методов её криоконсервирования обуславливают интерес к исследованию не только гемоглобина А (HbA), входящего в состав эритроцитов взрослых доноров, но и HbF.

Глицерин и 1,2-ПД являются неполярными растворителями и применяются для исследования конформации белков [3] методом сольвентно-пертурбационной дифференциальной спектрофотометрии, с помощью которой было показано, что глицерин не влияет на конформацию гемоглобина А [4]. Этот метод позволяет получить информацию о состоянии молекул гемоглобина и после замораживания в растворах криопротекторов.

Цель работы — изучение конформации HbA и HbF после замораживания в растворах глицерина и 1,2-ПД методом дифференциальной спектрофотометрии.

Гемоглобин А выделяли из гемолизата донорской крови [2]. Гемоглобин F получали из гемолизата кордовой крови, отделяя гемоглобин А денатурацией щелочью. Гемоглобины А и F очищали методом гель-хроматографии на сефадексе G-75. Растворы глицерина и 1,2-ПД марки "х.ч." готовили на физиологическом растворе (0,15 М NaCl). Концентрация гемоглобина в растворах была одинаковой и составляла $0,8 \cdot 10^{-5}$ М. Растворы замораживали со средней скоростью 20 °С в минуту до -196 °С, оттаивание проводили в водяной бане при 22 °С. Спектры поглощения и сольвентно-пертурбационные дифференциальные спектры (СПДС) белков в УФ области записывали на спектрофотометре "Pye Unicam SP 8000" (Великобритания). Первые производные спектров поглощения (1ПСП) рассчитывали с помощью ЭВМ.

Полученные зависимости интенсивности СПДС растворов HbA с глицерином ($\Delta E_{285}/E_{285}$) от его концентрации имеют линейный характер. Это свидетельствует о том, что наблюдаемые СПДС являются результатом изменения диэлектрической проницаемости среды и изученные концентрации глицерина не вызывают изменений конформации белка. Анализ 1ПСП HbA в растворах глицерина показал, что их структура не отличается от структуры 1ПСП белка в физиологическом растворе. Для HbF получены аналогичные результаты. После замораживания-оттаивания HbA и HbF в растворах глицерина зависимости СПДС от его концентрации не изменились.

Зависимость интенсивности СПДС HbA и HbF ($\Delta E_{285}/E_{285}$) от концентрации в растворе 1,2-ПД также имеет линейный характер (рис. 1, 2). После замораживания-оттаивания растворов HbA с 1,2-ПД эта зависимость не изменилась

Glycerol and 1,2-propanediol cryoprotectants, allowing to keep the cell integrity and penetrating through a cellular membrane, have been applied for the erythrocytes' successful cryopreservation. These cryoprotectants should provide an integrity of hemoglobin, which is the main intra-erythrocyte protein.

An intensive usage in medicine of cord blood, characterized by a high content of fetal hemoglobin (FHg), working-out of the methods for its cryopreservation stipulated an interest to the investigation of not only hemoglobin A (HgA), being in the erythrocytes composition of adult donors, but also HgB.

Glycerol and 1,2-PD are non-polar solvents and have been applied to investigate the protein conformation [2] by the method of solvent-perturbation differential spectrophotometry, which demonstrated, that glycerol did not affect the hemoglobin A conformation [4]. This method allows to obtain the information about the state of hemoglobin molecules and after freezing in the cryoprotectant solutions.

Investigation of HbA and FHb conformation after freezing in glycerol and 1,2-PD solutions by the method of differential spectroscopy is the aim of given work.

Hemoglobin A was isolated from a donors blood hemolysate [3]. Hemoglobin F was obtained from a cord blood hemolysate, by means of hemoglobin A separation by its denaturation with alkali. Hemoglobin A and F was purified by the method of gel-chromatography with G-75 sephadex. Chemically pure glycerol and 1,2-PD solutions were prepared with physiological solution (0.15 М NaCl). Hemoglobin concentration in the solutions was the same and made $0.8 \cdot 10^{-5}$ М. Solutions were frozen with an average rate of 20 °С/min down to -196 °С. Thawing was done in a water bath under 22 °С. Absorption spectra and solvent-perturbation differential ones (SPDS) of the proteins in the UV range were recorded by means of "Pye Unicam SP 8000" spectrophotometer (Great Britain). Initial derivatives of the absorption spectra (IDCS) were obtained by means of ECM.

Dependence of the SPDS intensity of HbA solutions with glycerol ($\Delta E_{285}/E_{285}$) on its concentration has a linear character. This testifies to the fact that observed SPDS are the result of the changes in a protein conformation. Analysis of IDCS of HbA in glycerol solutions demonstrated that their structure did not change due to the structure of the protein IDCS in a physiological solution. For HbF the same results were obtained. After freeze-thawing of HbA and HbF in glycerol solutions, the SPDS dependencies on its concentration did not change.

Dependence of SPDS intensity in HgA and FHb ($\Delta E_{285}/E_{285}$) on the concentration of 1,2-PD in a solution also has a linear character (Fig. 1, 2). After freeze-thawing of HbA solutions with 1,2-PD this dependence did not change (Fig. 1). For HbF solutions with 1,2-PD after freeze-thawing the slope of $\Delta E_{285}/E_{285}$ dependence on the cryoprotectant concentration decreases (Fig. 2). Obtained results testified to the availability reduction of FHb chro-

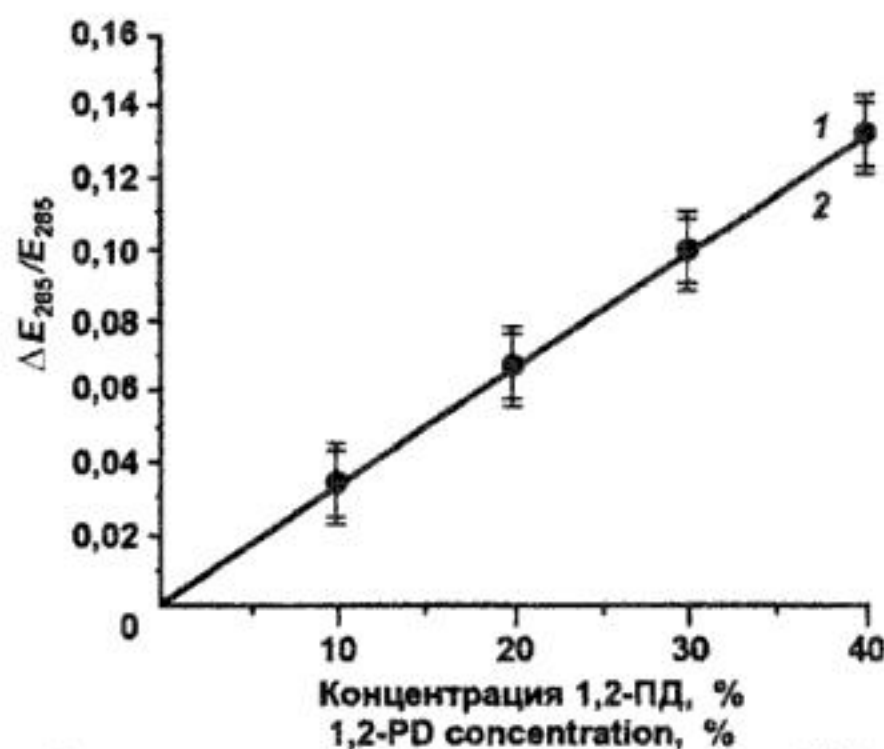


Рис. 1. Зависимость интенсивности СПДС растворов HbA с 1,2-ПД: 1, 2 — до и после замораживания-оттаивания.

Fig. 1. Dependence of SPDS intensity in HbA solutions with 1,2-PD: 1, 2 — before and after freeze-thawing.

(рис.1). Для растворов HbF с 1,2-ПД после замораживания-оттаивания угол наклона зависимости $\Delta E_{285}/E_{285}$ от концентрации криопротектора уменьшился (рис. 2). Полученные результаты свидетельствуют о снижении доступности растворителю хромофоров HbF в среде с 1,2-ПД, что может быть вызвано изменением конформации белка, скорее всего компактизацией молекулы. Подобные результаты были получены на одной из фракций гемоглобина мышей [1]. Значительных изменений в 1ПСР для HbA и HbF в растворах 1,2-ПД мы не наблюдали.

Таким образом, замораживание HbA и HbF в растворах глицерина и HbA в растворах 1,2-ПД не вызывает изменения конформационных параметров белков. Замораживание HbF в растворах 1,2-ПД, по-видимому, приводит к изменению конформации белка, которое, скорее всего, заключается в компактизации молекулы. Поэтому, очевидно, в качестве криопротектора для кордовой крови следует использовать глицерин. Вопрос о том, в какой степени конформационные изменения HbF, вызванные замораживанием в растворах 1,2-ПД, могут сказаться на функции белка, требует дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Артюхов В. Г., Путинцева О. В. Влияние температуры на структуру молекулы гемоглобина и его фракций // Изв. АН Молд. ССР, сер. биол. и хим. наук.— 1981.— № 1.— С. 56–61.
2. Вязова Е. П., Иванова Г. Н. Получение очищенного препарата гемоглобина и изучение его свойств // Пробл. гематологии и переливания крови.— 1975.— 20, № 11.— С. 25–29.
3. Демченко А. П. Ультрафиолетовая спектрофотометрия и структура белков.— Киев: Наук. думка, 1981.— 208 с.
4. Herskovits T., Greenblatt J. Solvent perturbation studies of heme proteins and other colored proteins // BBA.— 1969.— 130.— P. 30–38.

Поступило 11.12.2001

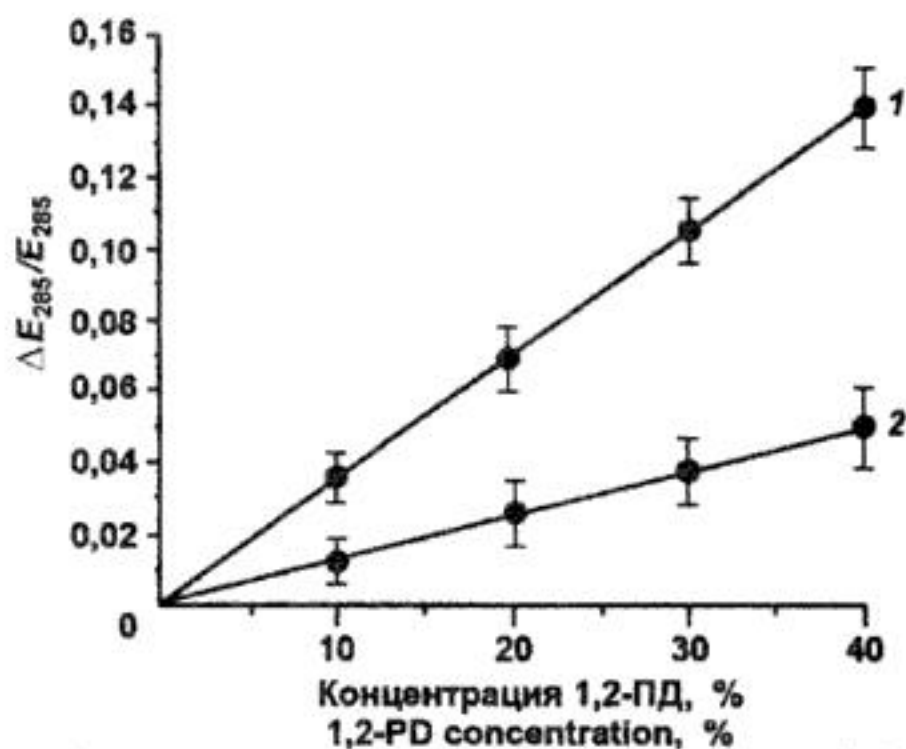


Рис. 2. Зависимость интенсивности СПДС растворов HbF с 1,2-ПД: 1 — до замораживания-оттаивания; 2 — после замораживания-оттаивания.

Fig. 2. Dependence of SPDS intensity in HbF solutions with 1,2-PD: 1 — before freeze-thawing, 2 — after freeze-thawing.

моформы для растворителя в среде с 1,2-ПД, что может быть вызвано изменением конформации белка, скорее всего компактизацией молекулы. Подобные результаты были получены на одной из фракций гемоглобина мышей [1]. Значительных изменений в ИДСР для HbA и FHb в 1,2-ПД растворах не наблюдали.

Таким образом, замораживание HbA и FHb в растворах глицерина и FHb в 1,2-ПД не вызывает изменений конформационных параметров белков. Замораживание FHb в 1,2-ПД, по-видимому, приводит к изменению конформации белка, которое, скорее всего, заключается в компактизации молекулы. Поэтому, очевидно, в качестве криопротектора для кордовой крови следует использовать глицерин. Вопрос о том, в какой степени конформационные изменения FHb, вызванные замораживанием в 1,2-ПД, могут сказаться на функции белка, требует дальнейших исследований.

REFERENCES

1. Artyukhov V. G., Putintseva O. V. The temperature effect on the structure of a hemoglobin molecule and its fraction // Reports of Academy of Sciences of Moldavia SSR, Series of Biological and Chemical Sciences.— 1981.— № 1.— P. 56–61.
2. Vyazova E. P., Ivanova G. N. Obtaining of the purified hemoglobin preparation and studying of its properties // Problems of Hematology and Blood Transfusion.— 1975.— 20, № 11.— P. 25–29.
3. Demchenko A. P. Ultraviolet spectrophotometry and proteins structure.— Kiev: Nauk. dumka, 1981.— 208 p.
4. Herskovits T., Greenblatt J. Solvent perturbation studies of heme proteins and other colored proteins // BBA.— 1969.— 130.— P. 30–38.

Accepted in 11.12.2001

К сведению авторов журнала “Проблемы криобиологии”

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

Статья печатается на машинке черной лентой через 2 интервала на белой бумаге форматом 210×297 мм. Левое поле страницы — не менее 3, правое — 1, верхнее и нижнее — по 2 см. Абзацный отступ равен 5 знакам. В левом верхнем углу представляется УДК, затем название статьи, инициалы и фамилия автора (авторов), название учреждения.

Для ускорения редакционной обработки и выхода в свет авторы могут присылать статьи, кроме напечатанного на бумаге варианта, также в виде файлов на дискетах. **Текст статьи** необходимо набирать с помощью программ редактирования текста, поддерживающих альтернативную кодировку: ЛЕКСИКОН, MultiEdit, Microsoft Word (версии 1, 2, 6), и не использовать программы типа ChiWriter.

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

Таблицы печатают на отдельных страницах, помещают в рукописи вслед за страницей, содержащей первую ссылку на эту таблицу. Слово “Таблица” с указанием ее порядкового номера печатается в одну строку с ее названием. Примечания к таблице даются непосредственно под ней. Листы с таблицами включают в общую нумерацию страниц рукописи.

Формулы и буквенные обозначения должны быть выполнены четко, крупно; индексы и показатели степени печатаются или вписываются ниже или выше строки и размечаются дужками: верхние индексы и показатели степени — $\cup$, нижние — $\cap$. Штрихи должны отличаться от единицы, a от α , l от e и i , h от n , I прописное от J . В формулах и обозначениях следует разметить сходные по написанию прописные и строчные буквы, подчеркнув прописную букву двумя черточками снизу, а строчную — двумя черточками сверху. Курсивные буквы подчеркиваются волнистой линией, прямые буквы, а также нуль, $\sin$, $\cos$, $\exp$ и т.д. размечаются на прямое начертание квадратной скобкой снизу. Греческие буквы подчеркиваются или обводятся красным карандашом, готические — синим. Нестандартные знаки (математические, физические, химические) выписываются на поле (один раз с указанием их значения). Нумерация формул должна быть сквозной в пределах статьи (арабскими цифрами в круглых скобках).

Рисунки в количестве не более 5 выполняются черной тушью на кальке, чертежной бумаге или в виде фотографий. Компонировка рисунков должна учитывать их размещение в пределах одной или двух колонок текста: ширина рисунка, предназначенного для одной колонки, не должна превышать 8 см, а общая высота рисунков, объединенных одной подрисуночной подписью (рис. 1, а, б, в). — 18 см. Соответственно максимальные размеры рисунка, предназначенного для размещения в двух колонках, составляют 16×18 см. Не перегружайте рисунки второстепенными деталями, наносите только необходимые условные обозначения, расшифровка которых дается в подписи к рисунку или в тексте. На обороте рисунка указываются его порядковый номер, фамилия автора, название статьи и журнала. Для сканирования без угловых искажений оси графиков на рисунках должны быть параллельны краю листа. Представленные фотоснимки должны быть четкими, контрастными, с указанием верхнего края.

При подготовке иллюстраций на компьютере используйте лазерный принтер, желательно представить в редакцию графические файлы рисунков. Допустимо применение расширений PCX, TIF, GEM, MAC, HPG, CGM, PIC; предпочтительнее использовать PCX и TIF, так как рисунки обрабатываются в графическом редакторе PhotoFinish.

Список литературы составляется в алфавитном порядке. В списке необходимо привести следующие сведения: фамилия и инициалы автора в оригинальной транскрипции, название статьи, журнала или книги и далее: для периодических изданий — год издания, том, номер, номера страниц; для монографий — место издания, название издательства, год издания, общее количество страниц. Названия периодических изданий на иностранных языках сокращаются в соответствии с правилами, принятыми в изданиях ВИНТИ.

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

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

Редакция отправляет автору одну корректуру. Допустимы лишь те исправления, которые приводят верстку в соответствие с исходным текстом статьи. Внесение существенных изменений затрудняет работу издательства и приводит к задержке публикации статьи. Корректуру с указанием даты и подписью автора(ов) следует выслать в редакцию в течение суток с момента получения.

Материалы направлять по адресу: 61015, Харьков-15, ул. Переяславская, 23, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, редакция журнала “Проблемы криобиологии”.

Научные редакторы *В. И. Луговой, Т. Н. Юрченко*
Редактор *Е. Д. Пазыч*
Компьютерный набор и верстка:
И. Г. Пятигорская

Scientific Editors *V. I. Lougovoy, T. N. Yurchenko*
Editor *E. D. Pazych*
DTP-work by *I. G. Pyatigorskaya*

Подписано в печать 25.12.2001. Формат 60×84¹/₈. Бум. тип. № 1. Печать офсетная. Усл. печ. л. 8,84. Тираж 350 экз. Цена договорная. Отпечатано МЧП "Райдер", г. Харьков, ул. Артема, 4.

**ПРОБЛЕМЫ
КРИОБИОЛОГИИ**

4

**PROBLEMS
OF CRYOBIOLOGY**

Индекс 70474

2001

Index 70474

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

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

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

Subscription orders should be addressed to

Editor-in-Chief V. I. Grishchenko

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

of the National Academy of Sciences of Ukraine

23 Pereyaslavskaya Str., 61015 Kharkov, Ukraine

Tel. (0572) 72-41-43

Fax (0572) 72-00-84

E-mail: cryo@online.kharkov.ua