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

Институт проблем криобиологии и криомедицины

3
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

Тезисы докладов Всеукраинской научной конференции «Успехи и перспективы развития криобиологии и криомедицины»



Abstracts of the reports of All-Ukrainian conference «Achievements and Perspectives of Cryobiology and Cryomedicine Development»

PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY

Матеріал захищений авторським правом

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ
PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY

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

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

Главный редактор В. И. ГРИЩЕНКО

Редакционная коллегия

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

Редакционный совет

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

Editor-in-Chief V. I. GRISHCHENKO

Editorial Board

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

Editorial Council

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

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

State Registration Certificate: KB Series № 98 of 23.09.93

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

e-mail: cryo@online.kharkov.ua
Адрес ИПКиК в Интернет: www.users.itl.net.ua/ipcc

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

e-mail: cryo@online.kharkov.ua
Institute Internet Address: : www.users.itl.net.ua/ipc

Матеріал, захищений авторським правом

3
2001

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

Материалы Всеукраинской научной конференции
"Успехи и перспективы развития криобиологии и криомедицины"
27–29 ноября 2001 г.

СОДЕРЖАНИЕ

Грищенко В. И. Роль криобиологии в создании биотехнологий клеточной и тканевой трансплантации 7

Секция 1. МЕХАНИЗМЫ КРИОПОВРЕЖДЕНИЙ И КРИОЗАЩИТЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

Жегунов Г. Ф. Дифференциальная экспрессия генов при гипотермии и адаптации 9

Гордиенко Н. А. Роль некоторых биофизических характеристик в чувствительности ооцитов и эмбрионов свиньи к низким температурам 9

Нардид О. А., Розанова Е. Д., Нардид Я. О., Дюбко Т. С., Цымбал Л. В. Повышение устойчивости криоконсервированных эритроцитов с предварительным лазерным облучением 10

Осецкий А. И. К теории метода термопластического анализа замороженных биосистем и криопротекторных растворов 11

Бондаренко В. А., Румиех М. Х., Рамазанов В. В., Алмазова Е. Б. Транспорт протонов в эритроцитах, нагруженных сульфатом при температурном и осмотическом воздействии 12

Рамазанов В. В., Олейник О. А., Абу Аль-Асаль Ф. М., Бондаренко В. А. Гипертонический криогемолиз эритроцитов человека при изменении *pH* среды 12

Гордиенко Е. А., Осецкий А. И., Попивненко Л. И., Тодрин А. Ф. Исследование модуля сдвига мембран эритроцитов 13

Гулевський О. К., Рязанцев В. В., Грищенкова О. О., Реліна Л. І., Трифонова Г. В. Особливості перекисного окислення ліпідів у аклімованих і неаклімованих личинок *Tenebrio molitor* 14

Алексеевская Э. И., Крамар М. И., Чуб Н. Н., Юрченко Г. Г., Тодоров П., Чадаев В. Е., Черепанова Т. А., Кучков И. Н., Черкашина И. В. Стимулирующее действие цитохрома С и холинхлорида на активность сукцинатдегидрогеназы в спермиях человека, хранившихся в условиях гипотермии . . 14

Мазалов В. К., Овсянников С. Е., Коваленко Г. В. Влияние криопротекторов и фармакологических веществ на период восстановления организма млекопитающих после кратковременного холодового воздействия 15

Капрельянц А. С., Марченко Л. Н., Мигунова Р. К. Компьютерный морфометрический анализ ультраструктуры клеток печени при охлаждении 16

Марченко В. С., Бабійчук Г. О., Поліщук Л. В., Марченко Л. М. Від фрактальної розмірності гематоенцефалічного бар'єра охолодженого мозку до функціональної геометрії фізіологічних систем організму 16

Зинченко В. Д., Зинченко А. В., Кадникова Н. Г., Грек А. М., Ковальчук И. М., Гузий Ю. И., Калмыков С. И., Третьяк О. В., Кобзарь А. В., Гайденко А. Н. О некоторых аспектах применения озонирующих технологий в криобиологии и взаимодействии озона с биополимерами 17

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

Матеріал, захищений авторським правом

Бондаренко В. А., Коптелов В. А., Лежанин С. Н., Середа Т. П. Роль физико-химических факторов среды в устойчивости изолированных гепатоцитов крыс к гипертоническому стрессу 18

Никольченко А. Ю., Тягилева В. П. Изменение активности Ca^{2+}-АТФазы мембран эритроцитов под влиянием непроникающего криопротектора ПЭО-1500, охлаждения и замораживания . . . 19

Розанов Л. Ф., Смольянинова Е. И., Холодный В. С. Осмотическое поведение эмбрионов и клеток костного мозга мыши в растворах криопротекторов 19

Тимченко Н. Н., Розанова Е. Д., Хромушкин К. Н., Моисеев В. А. Сравнительное изучение влияния замораживания-оттаивания на гемоглобины A и F 20

Морозова Т. Ф., Розанова Е. Д., Щетинский М. И., Воротилин А. М., Моисеев В. А., Нардид О. А., Кучеренко Ю. В., Грищенко О. В., Береснева О. А., Тараненко С. И., Захаренко И. Я. Влияние тепловой стерилизации на белковый и нуклеотидный состав водно-солевых экстрактов плаценты человека 21

Ханина Л. А., Чеканова В. С., Николенко А. В., Компаниец А. М. Структура и криопротекторные свойства оксиэтилированных алифатических амидов 22

Грищенко В. И., Алексеевская Э. И., Ващенко В. И., Ващенко Т. Н., Борисова Т. К. Криообновление костного мозга и апоптоз: гипотезы и реальность 22

Соболев В. И., Панько А. А., Панфилова С. Г. Влияние тиреоидных гормонов на характер петли гистерезиса у белых крыс при глубокой гипотермии 23

Ромоданова Э. А., Гаврик В. А., Дюбко Т. С. Спектрофлуориметрическое изучение влияния замораживания на фибриноген 24

Репин Н. В., Говоруха Т. П., Юрченко Т. Н. Структурные перестройки и проницаемость для воды мембран эритроцитов зимнеспящих сусликов *Citellus undulatus* 25

Мазалов В. К. Сравнительная оценка влияния температуры среды на температурный гомеостаз млекопитающих при действии полигликолевых эфиров 26

Доманов Е. А., Горбенко Г. П., Дюбко Т. С. Влияние криопротекторов и низких температур на структурное состояние модельных фосфолипидных мембран 26

Грищенко В. И., Черкашина И. В., Кучков И. Н., Гапон А. А., Микулинский Ю. Е., Юрченко Г. Г., Алексеевская Э. И. Влияние перфторана на некоторые функциональные характеристики сперми-ев человека при гипотермии 27

Мусатова И. Б., Зинченко А. В., Чеканова В. В., Боброва Е. Н. Исследование системы вода–оксиэтилированный ПЭО-1500 методом ДСК 28

Секция 2. СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ КЛЕТОЧНОЙ И ТКАНЕВОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ

Бебешко В. Г., Мінченко Ж. М., Глухенька Г. Т., Цвєткова Н. М., Крячок І. А., Караманешт Є. Є., Білько Н. М., Хоменко В. І., Кореньков І. С., Чуйський В. Г., Калиниченко Т. А., Кучер О. В., Науменко О. Л. Проблеми трансплантації стовбурових кровотворних клітин в Україні 29

Дрожжина Г. И., Строна В. И., Гайдамака Т. Б., Осташевский В. Л. Трансплантация амниотической мембраны у больных с патологией роговицы 30

Сандомирский Б. П., Гальченко С. Е., Белочкина И. В., Мамонтова А. В., Гальченко Е. С. Криобиологические технологии получения ряда препаратов из ксеногенного сырья 30

Мелещенко И. Н., Терещенко Л. Л., Кузюбердина Т. Н., Иваницкий А. В. Опыт применения клеточно-тканевой терапии в практике аллерголого-иммунологического центра 31

Сипитый В. И., Пятикоп В. А., Кутовой И. А., Петренко А. Ю. Применение криоконсервированных нервных стволовых клеток для коррекции дисфункции дофаминергических структур у больных болезнью Паркинсона и лечения больных с другими формами экстрапирамидных гиперкинезов 32

Лобынцева Г. С., Вотякова И. А., Климова Е. М. Обоснование и практические результаты применения эмбриональных препаратов в клинической практике 33

Сукач А. Н., Семенченко А. Ю., Петренко А. Ю. Изучение биохимического состава криоконсервированных препаратов эмбриональных тканей человека 34

Матеріал, захищений авторським правом

Петренко А. Ю., Оченашко О. И., Моисеева Н. Н., Скоробогатова Н. Г. Функция криоконсервированных клеток эмбриональной печени человека в системе ***in vitro*** и при экспериментальной трансплантации 34

Моисеева Н. Н., Петренко А. Ю., Кравченко Л. П. Влияние гипотермического хранения изолированных гепатоцитов на эффективность трансплантации гепатэктомированным крысам 35

Бондаренко Т. П., Божок Г. А., Алабедалькарим Н. М., Геращенко А. В., Самченко И. И., Легач Е. И. Исследование стероидогенной активности криоконсервированной органной культуры надпочечников при ксенотрансплантации 36

Яворская В. А., Гребенюк А. В., Фломин Ю. В. Лечение цереброваскулярных и нейродегенеративных заболеваний с применением тканевой и клеточной трансплантации 37

Грищенко В. И., Демин Ю. А., Гончарук Е. И., Попов Н. Н., Петренко А. Ю., Геращенко А. В. Характеристика эмбрионального препарата "Гемонейронал" 38

Шепитько В. И., Жуликова Е. П., Юрченко Т. Н., Шенберг М. Г. Реакция структурных элементов печени на имплантацию нативной и криоконсервированной плаценты в эксперименте 39

Юрченко Т. Н., Белоножко А. П., Жуликова Е. П., Шарлай Т. М. Влияние гипотермического хранения плаценты на активность окислительно-восстановительных ферментов 39

Гольцев А. Н., Михалин М. А., Останкова Л. В., Дубрава Т. Г., Луценко Е. Д., Рассоха И. В., Горская А. Ю. Состояние лимфогемопоэтической системы организма после трансплантации продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса 40

Бондаренко Т. П., Волкова Н. А., Луговой С. В. Уровень тиреоидных гормонов в плазме крови кроликов при ксенотрансплантации криоконсервированной органной культуры щитовидной железы неонатальных поросят 41

Питько В. А. Влияние криоконсервированных экстракта и ткани хориона на активность процессов перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы больных подострым сальпингоофоритом 42

Шепітько К. В., Гаєвський С. О., Потяженко М. М., Шепітько В. І. Лікування стабільної стенокардії із застосуванням кріоконсервованої фетоплацентарної тканинної трансплантації 43

Кадникова Н. Г., Петренко Т. Ф., Марценюк В. Ф., Кощий С. В. Методы получения жизнеспособных эмбриональных клеток нейроткани и печени 43

Зозуля Ю. П., Черченко А. П., Семенова В. М., Гронская Н. Г., Нагорный Е. А., Стайно Л. П. Особенности функциональной адаптации глиальных имплантатов неокортекса и мозжечка 44

Волова Л. Т. Научно-практическая деятельность Самарского тканевого банка 45

Конюшко О. И., Миронова Л. Л. Криоконсервация — фактор трансформации клеток 46

Миронова Л. Л., Попова В. Д., Конюшко О. И., Хапчаев Ю. Х., Зыбин Д. В., Акопян А. С. Криобанк различных видов культур клеток 46

Черненков В. Г., Задорожный В. Г., Бровина Н. Н., Шатилло А. В. Опыт применения криоконсервированных эмбриональных тканей в лечении некоторых заболеваний нервной системы 47

Тарасов А. И., Джонс Д. Р. Е., Грищенко В. И., Петренко А. Ю. Фенотип и колониеобразующая активность криоконсервированных клеток эмбриональной печени человека 47

Суббота Н. П., Пашинский П. П., Черкашина Д. В. Биологическая активность криоконсервированных фетальных препаратов печени и их влияние на функциональное состояние гепатоцитов 48

Сологуб В. К., Зыбин Д. В., Котелевиц А. Г., Коромыслова И. А., Северин С. Е. Вакцинация против меланомы с помощью ксеногенных клеток 49

Зыбин Д. В., Коромыслова И. А., Сологуб В. К., Котелевиц А. Г., Северин С. Е. Использование ксенотрансплантации для лечения сахарного диабета типа I 49

Секция 3. НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЕ КОНСЕРВИРОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

Линник Т. П., Бизикина О. В. Цитотоксичность и криопротекторная активность диолов, амидов и их смесей при криоконсервировании спермы петухов 50

Морозова И. А., Горбунов Л. В., Гордиенко Н. А. Способ криоконсервирования ооцитов и эмбрионов млекопитающих при сверхвысоких скоростях теплообмена 51

Матеріал, захищений авторським правом

Горбунов Л. В., Медведовский А. В. Развитие технологий криоконсервирования половых клеток и эмбрионов млекопитающих 51

Стегний М. Ю. Проблемы сохранения вирусов и вируссодержащего материала 52

Стрибуль Т. Ф., Новиков А. Н., Олейник С. Т. Методы криоконсервирования меристем картофеля и винограда 53

Костяев А. А. Озонированные криопротекторы и криоконсерванты 53

Костяев А. А. Экономическая оценка криоконсервирования костного мозга в региональном гематологическом центре 54

Высеканцев И. П., Гурина Т. М., Шаповалова О. В., Белоконь О. Н. Сохранность жизнеспособности и биологических свойств бактерий *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* в процессе криоконсервирования 55

Петренко Т. Ф., Узленкова Н. Е., Кудокоцева Е. В., Гурина Т. М. Криоконсервирование клеток карциномы Герена 55

Тагиров М. Т., Артеменко А. Б., Кальченко Ю. В. Замораживание клеток ранних эмбрионов кур 56

Сивопляс В. В., Осташко Ф. И., Ивченко Н. Ф., Ивченко С. Н. Использование холодильных машин для хранения биоматериалов 57

Ивченко Н. Ф., Ивченко С. Н., Мельник А. В. Низкотемпературное оборудование для криобиологии 57

Сведенцов Е. П., Туманова Т. В., Хомякова С. А., Утемов С. В., Костяев А. А., Семенов А. Н. Консервирование лейкоцитов замораживанием с новым криоконсервантом по экспоненциальной программе 58

Перехрестенко П. М., Глухенька Г. Т., Калиниченко Т. О., Сівкович С. О., Губарева Г. А., Павлюк Р. П., Скачкова Н. К., Алгазінова М. К. Кріоконсервування і клінічне застосування гемопоетичних клітин пуповинної (кордової) крові 58

Підгорський В. С., Головач Т. М., Суденко В. І. Практика депонування штамів мікроорганізмів . 59

Дзюба Б. Б., Дрокин С. И., Бережная Е. А., Гамолина О. В. Изучение криоустойчивости спермиев карпа (*C. Carpio*) в связи с особенностями активации движения 60

Дахно Ф. В., Куценко Л. Ф., Гасенко Е. А. Влияние факторов криоконсервирования на ооциты человека в условиях витрификации 61

Сукач А. Н., Петренко А. Ю., Плачинта М. С. Криоконсервирование эмбриональных нервных клеток крысы с использованием ДМСО 61

Грищенко В. И., Петрушко М. П., Геродес А. Г., Пиняев В. И. Криоконсервированные биологически активные жидкости как составная часть среды культивирования гамет и эмбрионов *in vitro* . 62

Максудов Г. Ю., Ерохин А. С., Евгенов К., Хартли Э. Концентрация АТФ в криоконсервированной сперме амурского леопарда 63

Максудов Г. Ю., Ротт Н. Н. Криобанки как элемент природоохранных стратегий в России . . . 63

Максудов Г. Ю., Кабашова О. В., Нестеренко О. Н., Хмелев А. В., Эль-Регистан Г. И. Длительное хранение сперматозоидов: есть ли альтернатива криоконсервации? 64

Снурников А. С., Кадникова Н. Г., Гурина Т. М. Особенности длительного хранения биологических объектов в низкотемпературных банках 65

Хроменкова О. Б., Жегунов Г. Ф., Жерноклев Г. В. Нарушения митотического цикла в эмбрионах мыши после криоконсервирования 65

Бабийчук Л. А., Землянских Н. Г. Механизмы стабилизации эритроцитов к действию непроникающих криопротекторов и низких температур. Создание безотмывочного метода криоконсервирования 66

Полончук А. М. Оборудование для низкотемпературной консервации биологических объектов . 67

Полончук А. М., Соколов В. А., Батраков В. Н. Сублимационные установки 67

Мхеидзе Д. М., Шведова Т. В., Огородникова Е. В. Криоконсервирование аутологичного костного мозга и стволовых клеток периферической крови 68

Ананьина А. Е. Свойства промышленного штамма ***Streptomyces fradiae*** в зависимости от условий хранения 69

Матеріал, захищений авторським правом

Секция 4. ПРИМЕНЕНИЕ НИЗКИХ И ГИПОТЕРМИЧЕСКИХ ТЕМПЕРАТУР В МЕДИЦИНЕ

Гордієнко О. І., Македонська В. О., Гордієнко Ю. Є. Біофізичні властивості еритроцитів при гіпота гіпертиреозі 70

Македонская В. А. Аутотрансплантация криоконсервированной ткани щитовидной железы в профилактике и лечении постоперационного гипотиреоза у больных диффузным токсическим зобом 70

Сипитый В. И., Лесовой В. Н., Цыганков А. В., Грозный С. В., Печенов А. Ю. Эндоскопическая миниинвазивная криодеструкция аденом гипофиза и аденогипофиза 71

Прокопюк О. С., Чижевский В. В., Прокопюк В. Ю., Липина О. В. О возможности использования ткани хориона при общем остром охлаждении теплокровных организмов 72

Ивановская Е. В. Лечение острого кератоконуса с использованием действия сверхнизких температур 72

Белоус В. И. Результаты применения криотерапии в комплексном лечении непроникающих ранений роговой оболочки 73

Куцевляк В. Ф., Божко К. В., Сирота О. Н. Криовоздействие и гипотермия в терапевтической стоматологии 74

Гаврилов Р. В., Колыбаев Л. К., Муринец-Маркевич Б. Н., Носов М. Е., Березуцкая В. Е. Криогенная аппаратура и инструменты для медицины 74

Даценко Б. М., Лымарь И. Н., Грищенко В. И., Моисеев В. А., Щетинский М. И., Морозова Т. Ф., Нардид О. А., Бабийчук Г. А., Воротилин А. М., Иванов Л. В., Грищенко О. В. Использование ректальных свечей, содержащих термоклавированную свиную плаценту, в проктологической практике 75

Богатырева Т. В., Афанасьева Я. С., Валюк О. И. Применение краниоцеребральной гипотермии в реабилитации больных, перенесших мозговой инсульт 76

Анипко О. Б., Михановский А. А., Горбунов К. А. Прогнозирование глубины крионекроза биологической ткани на основе математической модели теплопроводности у больных раком тела матки 77

Анипко О. Б., Михановский А. А., Горбунов К. А. Определение времени восстановления температуры ткани путем решения задачи оттаивания у больных раком тела матки после криодеструкции опухоли 77

Милиця М. М., Мартиновський О. І., Постоленко М. Д. Застосування досягнень кріобіології та кріомедицини в лікуванні панкреонекрозу 78

Журавлев А. С. Полипозный риносинуит и его патогенетическое лечение сверхнизкими температурами 79

Сипитый В. И., Муринец-Маркевич Б. Н. Перспективы использования криогенной техники в нейрохирургии 80

Ершова О. В., Грищенко В. И., Ломакин И. И. Механизмы действия триггерной гипотермии в терапии "психосоматического бесплодия" 80

Малышева Г. В., Бабийчук Г. А., Марченко В. С. Адаптивные механизмы резонансных холодовых воздействий и перспектива применения парафрактальной гипотермии при стресс-индуцированных поражениях пародонта 81

Самохина Л. М., Бабийчук В. Г., Ломако В. В., Познахарева И. А., Марченко В. С., Мамонтов В. В., Шило А. В., Ломакин И. И. Сочетанное влияние ритмического холодового воздействия и кордовой крови на активность протеиназ и их ингибиторов у старых крыс со стимулированной гипертензией 82

Зубов А. Д. Пункционное введение фетального клеточного материала в орган-мишень как способ повышения эффективности трансплантации 83

Лагода А. Е., Молотягин Г. Е., Зыбин В. М., Павличенко С. А., Гниденко Ю. П., Петренко А. С. Опыт криолечения послеоперационных ран у больных, оперированных по поводу перфоративных язв 84

Геродес А. Г., Алипова Е. К., Луцкая Л. И. Течение беременности и родов у пациенток после лечения бесплодия с использованием криоконсервированной спермы донора 84

This One

PCRU-LGA-8PLY

Матеріал, захищений авторським правом

Василовский В. Ю., Василовская Л. Ф., Василовский В. В., Анастасиади О. И., Скрипниченко К. В. Гипотермическая оптимизация гирудотерапии при церебральной сосудистой патологии 85

Шідловський В. О., Дейкало І. М., Чепіль І. В. Застосування препаратів фетоплацентарного комплексу у хворих з гнійною хірургічною патологією 86

Семенченко О. А., Кравченко Л. П., Шанина И. В., Петренко А. Ю., Фуллер Б. Д. Эффективность сахарозосодержащего раствора для суточного гипотермического хранения печени половозрелых крыс и эмбрионов человека 86

Бызов В. В., Высеканцев И. П., Гальченко С. Е., Сандомирский Б. П. Опыт применения эндотрахеального введения экстракта криоконсервированных фрагментов ксеноселезенки в комплексном лечении больных с гнойными процессами в легких 87

Луценко Н. С., Ломака И. В., Кириченко И. Н. Опыт применения гетеротопической трансплантации криоконсервированной плаценты у женщин в перименопаузе 88

Волова Л. Т., Россинская В. В., Емельянов С. А. Некоторые этические основы деятельности тканевых банков 89

Бабийчук В. Г., Козлов А. В., Луценко Д. Г. Триггерные механизмы холодового стресса и резонансных режимов лечебной гипотермии 89

Лагода А. Е., Зыбин В. М., Павличенко С. А., Молотягин Г. Е., Гниденко Ю. П., Садовский Г. В., Петренко А. С. Эндоскопическое криовоздействие фреоном в комплексном консервативном лечении синдрома Меллори–Вейса 90

Грищенко В. И., Геродес А. Г., Алипова Е. К., Луцкая Л. И., Прокопюк О. С., Никитченко Ю. В. Трансплантация криоконсервированной плацентарной ткани при нарушениях сперматогенеза у мужчин 91

Демин Ю. А., Петренко А. Ю., Гончарук Е. И. Применение препарата "Гемонейронал" в комплексном лечении больных с диабетической ретинопатией 92

Цуцаева А. А., Кудокоцева О. В., Щеглов А. В., Тупчиенко Г. С., Лобасенко Н. П. Кордовая кровь как компонент поддерживающей терапии 93

Цуцаева А. А. Глубокий анабиоз и его роль в биологии и медицине 93

Лагода А. Е., Зыбин В. М., Хабусев В. К., Павличенко С. А., Молотягин Г. Е., Гниденко Ю. П., Петренко А. С. Применение криоконсервированных фрагментов ксенотимуса в программе комплексной терапии больных с распространенными формами перитонита 94

Хворостов Е. Д., Сандомирский Б. П., Побеленский О. Н., Белочкина И. В. Ксенотрансплантация островковых клеток поджелудочной железы при выполнении лапароскопической холецистэктомии у больных сахарным диабетом 95

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 08.11.2001. Формат 60×84 1/8. Бум. тип. № 1. Печать офсетная. Усл. печ. л. 21,86. Тираж 400 экз.
Цена договорная. Отпечатано МЧП "Райдер", г. Харьков, ул. Артема, 4.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043: 616.089.843

Роль криобиологии в создании биотехнологий клеточной и тканевой трансплантации

В. И. ГРИЩЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

В Институте проблем криобиологии и криомедицины Национальной Академии наук Украины, лидирующем учреждении в области исследований по влиянию холода на биологические объекты, в течение последних 10 лет проводятся научно-исследовательские работы и разрабатываются методы криоконсервирования тканей и клеток эмбрионального, плацентарного и фетального происхождения, что является актуальным для современной медицины и эффективно в целом ряде клинических ситуаций. Современные методы исследования позволили выявить особенности метаболизма клеток и тканей раннего срока развития, различные степени дифференцировки и анатомо-топографических свойств, а также определить реакцию этих клеток и тканей на гипотермическое хранение, влияние на них замораживания и кристаллообразования льда как под защитой криопротекторов, так и без них.

Были обнаружены особые свойства тканей эмбриофетоплацентарного происхождения. Фетальные клетки имеют слабо экспрессированные комплексы главных антигенов гистосовместимости, фетальные органы содержат, в основном, бластные и стволовые клетки, обладающие высоким пролиферативным и трансплантационным потенциалом; фетальные и эмбриональные ткани, содержащие бластные популяции мезенхимальной и соединительной тканей, имеют комплекс биологических соединений, стимулирующих репарацию и регенерацию.

До последнего времени непреодолимым препятствием для применения в медицине фетального материала и оказания помощи пациентам, страдающим тяжелыми заболеваниями иммунной, нервной, эндокринной систем, являлся короткий срок от его получения до использования, поскольку удлинить срок гипотермического хранения не представлялось возможным из-за развивающегося аутолиза. Такая ситуация не позволяла провести достаточно качественное тестирование донорских клеток и тканей для исключения бактериальной и вирусной контаминации, тем более что в общей популяции населения Украины резко увеличились случаи заболевания гепатитом, сифилисом, цитомегаловирусом, зачастую не диагностированные в доклинических учреждениях.

Для решения этой проблемы необходимо наличие соответствующих низкотемпературных тканевых банков, обеспечивающих правильность всех этапов заготовки, криоконсервирования и хранения материала, предназначенного для последующей трансплантации.

Как показали исследования ученых института, в развитии криоповреждений клетки большое значение имеют нарушение ионтранспортных систем плазматических мембран, мембран внутриклеточных органелл, разобщение ферментативного гидролиза АТФ с процессом транспорта ионов во внутрь мембранных везикул после низкотемпературного воздействия.

Работы, позволившие выявить механизмы криоповреждения, способствовали созданию новых биотехнологий на основе использования глубокого холода и криопротекторов, обеспечивающих защиту внутриклеточных структур.

Полученные теоретические данные легли в основу цикла работ по разработке методов криоконсервирования эмбриональных и фетальных тканей, экспериментальному обоснованию их клинического применения и широкомасштабному внедрению в практику лечебных учреждений Украины. Наши разработки нашли отражение в подготовленных и опубликованных монографиях, диссертациях, публикациях в научной печати и патентах.

При разработке способов долгосрочного хранения каждый биологический объект потребовал индивидуального подхода в связи со своими структурными, метаболическими и анатомическими особенностями. Были разработаны эффективные криопрограммы для ряда клеток и тканей эмбриофетоплацентарного комплекса, обеспечившие высокую жизнеспособность их компонентов, а также сохранение биологически активных веществ в высоких концентрациях и физиологических соотношениях.

Таким образом, нами были разработаны биотехнологические процессы, включающие заготовку, криоконсервирование и долгосрочное хранение следующих клеток и тканей человека эмбрио-фетоплацентарного происхождения: эмбриональные гемопоэтические и нервные клетки, ткань раннего хориона, плаценты и ее производные, фрагменты плодовых тимуса, селезенки, щитовидной железы,

Матеріал, захищений авторським правом

почек, трубчатых и плоских костей, суспензии фетальных печени, хрящевой и церебральной тканей, а также тестисы плода. Были определены биологические эффекты влияния перечисленных криотрансплантатов на органы и системы лабораторных животных различных возрастных групп, а также при моделировании различных видов патологии.

В экспериментальных исследованиях и при клинической апробации методов лечения с использованием предлагаемого трансплантационного материала эмбрионального, плацентарного и плодового происхождения нами выявлены механизмы специфического и неспецифического воздействия на организм реципиента, что заключалось в выраженном заместительном эффекте и стимуляции репаративных возможностей организма, выравнивании его гомеостаза за счет включения нервной, иммунной и эндокринной систем.

Внедрение передовых биотехнологий в практику лечебных учреждений потребовало создания структуры, ответственной за качество выдаваемого материала и безопасность реципиента при его применении, в связи с чем был создан единственный в Украине низкотемпературный Банк эмбриональных, плодовых и плацентарных клеток и тканей. В клинической трансплантологии Банк тканей можно рассматривать как первый этап, обеспечивающий достижение цели — пересадку клеток, тканей и органов.

Основным методическим подходом Украинского банка является ориентация на изготовление жизнеспособного биологического трансплантационного материала, что обеспечивается специальными криозащитными средами и разработанными режимами замораживания.

Созданный на базе ИПКиК Межведомственный центр криобиологии и криомедицины под эгидой Министерства охраны здоровья, Национальной Академии наук и Медицинской Академии наук имеет четко очерченные задачи и основные направления деятельности.

Таким образом, на базе фундаментальных исследований института было сформировано новое научное направление, имеющее спектр нерешенных задач теоретического и прикладного характера, на решении которых и сконцентрирована наша дальнейшая деятельность.

Матеріал, захищений авторським правом

Секция 1
МЕХАНИЗМЫ КРИОПОВРЕЖДЕНИЙ И КРИОЗАЩИТЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

УДК 577.218: 612.592: 575.826

Дифференциальная экспрессия генов при гипотермии и адаптации

Г. Ф. ЖЕГУНОВ

Харьковский государственный медицинский университет

Известно, что для эволюции и закрепления полезных организму признаков большое значение имеет фиксация этой полезной информации в генетическом аппарате клеток. Генетические программы реализуются через синтез специфических белков, что может менять интенсивность и направленность метаболизма клеток, а также функций органов, что сказывается на приспособляемости индивидуумов. Особи, относящиеся к различным типам и видам, имеют различные физиологические и метаболические особенности, поэтому пути их приспособления к одним и тем же условиям могут быть разные. В связи с этим представляло интерес сравнить реакцию белоксинтезирующего аппарата пойкилотермных и зимнеспящих животных при их приспособлении к различным температурам.

Цель работы — сравнительное изучение синтеза белков в различных тканях гетеротермных и пойкилотермных животных в различных температурных условиях.

Показано, что как пойкилотермные животные, так и зимнеспящие млекопитающие, приспосабливаясь к различным температурам, используют выработанные в процессе длительной эволюции генетические механизмы адаптации, реализуемые через дифференциальную экспрессию генов и синтез белков. Поэтому эти механизмы приспособления специфичны для различных животных, органов и тканей, а также зависят от температурных условий приспособления.

Известно, что интенсивность и направленность метаболизма определяются степенью активности, качественным и количественным составом ферментов в клетке, а их необходимая концентрация регулируется изменением скорости их синтеза и распада. Поэтому обнаруженные нами при адаптации явления периодического частичного обновления белкового состава у пойкилотермных и зимнеспящих животных можно рассматривать как приспособительный полифункциональный ответ клеток на необходимость изменения функциональной активности органов.

УДК 57.043: 591.462.12.3: 599.731.1: 577.3

Роль некоторых биофизических характеристик в чувствительности ооцитов и эмбрионов свиньи к низким температурам

Н. А. ГОРДИЕНКО

Харьковский государственный медицинский университет

В серии выполненных экспериментальных работ, посвященных исследованию некоторых биофизических свойств половых и эмбриональных клеток свиньи, определяющих их криорезистентность, было установлено количество осмотически активной воды, осмотически неактивных и непроникающих веществ в ооцитах, яйцеклетках и ранних эмбрионах свиньи. Кроме того, были также определены такие геометрические характеристики ооцитов, как диаметр, общий объем, абсолютный объем осмотически неактивных веществ, статистические распределения этих веществ.

Многие из этих характеристик отвечают за особенности поведения клеток при криоконсервировании, например, количество осмотически неактивных веществ (и соответствующее ему количество осмотически активной воды), удельная проницаемость цитоплазматических мембран к воде определяют скорость дегидратации клеток и вероятность внутриклеточной кристаллизации.

Осмотический состав ооцитов и ранних эмбрионов свиньи достоверно не отличается от такового для ооцитов и ранних эмбрионов многих других видов млекопитающих. Удельная проницаемость цитоплазматических мембран эмбрионов различных видов животных также находится в одинаковых пределах. Можно сделать вывод, что дегидратация эмбрионов свиньи должна происходить

Матеріал, захищений авторським правом

аналогично дегидратации в эмбрионах других видов. Однако многочисленные экспериментальные данные говорят о том, что стандартные методики не обеспечивают должную сохранность. Следовательно, особенности повышенной чувствительности эмбрионов свиньи к снижению температуры заключаются не в вышеперечисленных биофизических параметрах. Возможно причиной гибели зародышей при снижении температуры (даже в диапазоне положительных температур) является особый биохимический состав эмбрионов, о чем свидетельствуют некоторые наши данные и данные, полученные другими исследователями. Показано, что после удаления внутриклеточных липидов из ранних эмбрионов свиньи путем центрифугирования такие зародыши переносили охлаждение до 4 °С. Следовательно, можно предположить, что липиды могут быть причиной криоповреждений. В 1995 году Н. Д. Безуглый выдвинул гипотезу, что одной из возможных причин повреждений клеток могут служить фазовые переходы, когда липиды из жидкокристаллического состояния переходят в твердокристаллическое. Особо важно, при какой температуре такой переход происходит. Если этот процесс происходит после фазового перехода вода–лед, клетки выживают.

Проведены прямые исследования жирнокислотного и фосфолипидного состава в эмбрионах свиньи. По результатам этих исследований установлено, что в цитоплазме эмбрионов свиньи содержится 40% олеиновой кислоты, которая представляет собой жирную кислоту с температурой фазового перехода 15 °С. Липиды являются значительной частью содержимого клетки. Нами было показано плавное уменьшение осмотически неактивных веществ на каждой стадии развития от 30,14% для зиготы до 19,0% для компактной морулы. В результате экспериментов получен большой разброс осмотических показателей в популяциях ооцитов и эмбрионов. Кроме того, отмечено, что с увеличением возраста эмбрионов возрастает их криорезистентность. Следовательно, липиды, а также их количество и вид являются определяющими факторами повышенной криочувствительности. Таким образом, успех в криоконсервировании эмбрионов свиньи может быть достигнут при обязательном изучении всех свойств, отвечающих за их сохранность при охлаждении.

УДК 615.361.111.014.413.849.19

Повышение устойчивости криоконсервированных эритроцитов с предварительным лазерным облучением

О. А. НАРДИД, Е. Д. РОЗАНОВА, Я. О. НАРДИД, Т. С. ДЮБКО, Л. В. ЦЫМБАЛ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина

В настоящее время накоплено определенное количество экспериментальных данных, свидетельствующих о биологической эффективности низкоинтенсивного лазерного излучения (НЛИ). В ряде работ показана радиопротекторная эффективность НЛИ по отношению к некоторым водорастворимым белкам и клеткам. Цель работы — изучение влияния предварительного лазерного облучения на сохранность эритроцитов человека после их криоконсервирования.

В работе были исследованы эритроциты донорской и кордовой крови, облученные в плазме и физиологическом растворе гелий-неоновым лазером (длина волны излучения — 632,8 нм, мощность — 25 мВт, время облучения — 5 мин). Замораживание эритроцитов до температуры жидкого азота (–196 °С) и последующий отогрев производили в присутствии криоконсерванта "Пропандиосахароль" согласно методическим рекомендациям по криоконсервированию эритроцитов, разработанным в ИПКиК НАН Украины. Сохранность эритроцитов после замораживания оценивали по уровню гемолиза. Кроме этого, контролировали такие параметры, как содержание внутриэритроцитарных форм гемоглобина, конформационное состояние белков по спектрам поглощения и флуоресценции в УФ области, а также состояние липидной матрицы мембраны по связыванию зонда-катиона ДСМ и параметрам вращательной подвижности спин-меченого амида пальмитиновой кислоты. Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Pye Unicam SP-8000 (Англия), спектры флуоресценции — на спектрофлуориметре Signe 4N (Латвия), спектры ЭПР — на спектрометре Bruker ER-100D (Германия).

Результаты исследований показали, что предварительное облучение позволяет получить эритроциты с уровнем гемолиза после замораживания-оттаивания почти в 2 раза меньшим, чем у необлученных эритроцитов. Облучение эритроцитов как донорской, так и кордовой крови в физиологическом растворе дает несколько лучшие результаты (после облучения эритромассы гемолиз снижается и составляет 0,45–0,5, после облучения цельной крови — 0,6–0,65 от гемолиза необлученных клеток). Изучение состояния внутриэритроци-

Матеріал, захищений авторським правом

тарного гемоглобина показало, что независимо от предшествующего облучения во всех экспериментах наблюдается снижение или полное отсутствие метгемоглобина. Этот факт свидетельствует о том, что при замораживании в первую очередь разрушаются более старые эритроциты, содержащие повышенное количество метгемоглобина. Спектры поглощения эритроцитов в УФ области не претерпевают значительных изменений. Лазерное облучение практически не влияет на форму спектров флуоресценции белков эритроцитов, в то же время несколько изменяет их интенсивность, что, по-видимому, отражает изменение доступности растворителю поверхностных тирозиновых остатков.

Следует отметить, что после замораживания эритроцитов кордовой крови в предварительно облученных образцах содержание фетального гемоглобина после замораживания выше, чем в необлученных клетках. Это позволяет предположить, что облучение более эффективно действует на клетки, содержащие фетальный гемоглобин.

Исследование параметров вращательной подвижности ЭПР спин-метки и анализ формы спектров флуоресценции ДСМ показали, что лазерное облучение приводит к изменению структуры поверхности мембран эритроцитов. Это проявляется в усилении связывания ДСМ с мембранами и изменении характера температурной зависимости параметра микровязкости поверхности мембраны. О нарушении барьерных свойств мембраны свидетельствуют также проведенные дополнительные исследования по гемолизу эритроцитов в 2 M NaCl и 40%-м 1,2-пропандиоле.

УДК 57.043: 547.422: 536.54

К теории метода термопластического анализа замороженных биосистем и криопротекторных растворов

А. И. ОСЕЦКИЙ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Известно, что экспериментальные исследования замораживаемых биологических объектов затрудняются по мере их охлаждения, а изучение кинетических процессов в почти затвердевших биосистемах и растворах криопротекторов в интервале температур $-40 \div -110\,^{\circ}C$ — достаточно сложная задача. В то же время это интервал основных повреждений охлаждаемых биосистем, что делает поиск новых экспериментальных подходов, эффективно работающих в этом диапазоне температур, особенно актуальным для современной криобиологии. Одним из таких подходов является метод термопластического анализа. Получаемые с его помощью термопластические кривые наглядно отражают кинетику процессов, протекающих именно вблизи температур расстеклования исследуемых объектов. Однако до сих пор рассматривались лишь технические принципы реализации этого метода и полученные с его помощью экспериментальные результаты. Детальный анализ явлений, лежащих в его основе, не проводился. Такой анализ, позволяющий понять не только физическую сущность метода, но и четко трактовать получаемые с его помощью результаты, является основной целью данной работы.

Проведено моделирование состояний, через которые проходит биосистема или раствор криопротектора в процессе охлаждения. Показано, что, начиная с температур $-20 \div -40\,^{\circ}C$ и вплоть до температур жидкого азота, образующаяся в исследуемых образцах ледяная кристаллическая матрица может стать очень чувствительной к тепловым эффектам, сопровождающим любые кинетические процессы в соприкасающихся с ней жидких прослойках. Это происходит под действием программировано прикладываемых внешних напряжений, переводящих образовавшуюся матрицу в режим дислокационного пластического течения. Рассмотрены термодинамические аспекты дислокационной пластичности закристаллизованных водных фракций под действием постоянных внешних напряжений в условиях непрерывного сканирования температуры и сформулированы принципы получения наиболее информативных термопластических кривых. Выполнена оценка разрешающей способности метода при регистрации тепловых эффектов, позволяющая сделать вывод, что при исследовании фазовых переходов 1-го рода в диапазоне температур $-50 \div -150\,^{\circ}C$ данный метод во многом эффективнее традиционно используемых методов ДСК, ЯМР или ЭПР. Впервые сделан количественный анализ термопластических кривых замороженных водных растворов глицерина и ПЭО-1500.

Полученные результаты существенно меняют наши представления о кинетике кристаллизации криопротекторов в области температур $-40 \div -110\,^{\circ}C$ и в сопровождающих этот процесс механизмах повреждения биологических объектов.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043: 612.111.3: 577.352.4

Транспорт протонов в эритроцитах, нагруженных сульфатом при температурном и осмотическом воздействии

В. А. БОНДАРЕНКО, М. Х. РУМИЕХ, В. В. РАМАЗАНОВ, Е. Б. АЛМАЗОВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Внесение в изотонический раствор NaCL эритроцитов, нагруженных сульфатом, вызывает захват протонов клетками. При этом установлено, что ингибиторы анионного транспорта ДИДС (2 мкМ) и дипиридамол (100 мкМ), а также гипертоническое воздействие (0,4 М NaCl) приводят к возрастанию уровня захвата протонов.

Повышение концентрации ДИДС до 200 мкМ и дипиридамола до 400 мкМ, а также возрастание концентрации NaCl выше 0,4 М вызывают ингибирование транспорта протонов в эритроциты. Исследование температурной зависимости указанного процесса выявило, что повышение температуры выше 37 °С приводит к ингибированию транспорта протонов в клетку и снижению уровня захвата протонов, тогда как снижение температуры с 37 до 17–20 °С активирует вход протонов в клетку и возрастание уровня их захвата.

Таким образом, ингибиторы анионного канала, которые должны блокировать движение анионов, вызывают активацию входа протонов, а повышение или понижение температуры,что должно приводить к возрастанию или уменьшению скорости транспорта, в данном случае действует наоборот.

Такие результаты свидетельствуют о том, что в эритроцитах, нагруженных сульфатом и помещенных в хлоридную среду, транспорт протонов из клетки и в клетку осуществляется в одно и то же время. При этом, очевидно, транспорт протонов из клетки более чувствителен к ингибиторам, температуре и гипертоническому воздействию, а в клетку менее чувствителен к ингибиторам и поэтому блокируется значительно большими концентрациями NaCl (более 1 М).

В интактных эритроцитах, содержащих хлорид и помещенных в сульфатную среду, также происходит транспорт протонов из клетки и в клетку, который сопровождает обмен внутриклеточного хлорида на внеклеточный сульфат. В данном случае выявлено, что транспорт протонов в клетку более чувствителен к ингибиторам, температуре и гипертоническому воздействию, чем из клетки. Установлено, что энтальпия активации входа протонов в клетку (26 ккал/моль) значительно выше, чем энтальпия активации выхода протонов (4,8 ккал/моль).

Большая чувствительность к температуре выхода протонов из сульфатнагруженных эритроцитов, очевидно, определяется тем, что энтальпия активации данного процесса значительно выше, чем этот показатель для транспорта протонов в клетку. Оценка энтальпии активации дает величины: для выхода протонов 33 ккал/моль и для входа 1,2 ккал/моль.

Полученные результаты позволяют предположить, что транспорт протонов в клетку сопровождает вход хлорида по канальному механизму. При этом выход протонов сопровождает обмен внутриклеточного сульфата на внеклеточный хлорид.

УДК 612.111.32.118.221.3: 57.043

Гипертонический криогемолиз эритроцитов человека при изменении *pH* среды

В. В. РАМАЗАНОВ, О. А. ОЛЕЙНИК, Ф. М. АБУ АЛЬ-АСАЛЬ, В. А. БОНДАРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Исследовали чувствительность эритроцитов к охлаждению в растворах, содержащих 0,86 моль/л сахарозы при различных значениях *pH*. Снижение *pH* от 7 до 5 приводит к потере чувствительности клеток к повреждению. При этом процент гемолиза снижается от 30–35 до 1–3%. Значительное возрастание чувствительности к охлаждению отмечается при значениях *pH* 8–9. Степень повреждения эритроцитов достигает 60–70%.

Присутствие в экспериментальных средах хлорида натрия до 150 ммоль/л существенно снижает чувствительность клеток к повреждению в интервале *pH* 7–9. Степень гемолиза снижается до 30–40% при *pH* 9.

Присутствие в средах инкубации ингибиторов анионного канала дипиридамола (25 мкмоль/л) и диизотиоцианостильбендисульфоната (2 мкмоль/л) вызывает также подавление чувствительности эритроцитов к охлаждению в области *pH* 7–9, тогда как в интервале *pH* 5–6 происходит некоторое возрастание уровня гемолиза. При этом выраженность *pH* зависимости значительно редуцируется. Так,

Матеріал, захищений авторським правом

при *pH* 5 уровень повреждения клеток составляет 10–15 при *pH* 9 – 25–40%. Описанное влияние указанных ингибиторов можно объяснить влиянием *pH* среды на осмотический статус эритроцитов. Повышение *pH* выше нейтральных значений вызовет выход хлорида из клетки и соответствующее снижение отношения концентраций внутриклеточного хлорида к внеклеточному. Если *pH* среды будет ниже нейтральной, то перераспределение хлорида приведет к тому, что концентрация его в клетке будет выше, чем во внеклеточной среде. Если содержание хлорида во внеклеточной среде незначительно, произойдет градиентный выход данного аниона из клетки, который повлечет за собой потерю ионов калия и натрия, при этом гипертоническое воздействие значительно ускоряет выход катионов. Следовательно, движение хлорида в условиях гипертонического воздействия, а также активность анионного канала являются решающими факторами в механизме развития гипертонического криогемолиза эритроцитов.

Обработка эритроцитов иодоацетамидом (15 ммоль/л, 60 мин) и парахлормеркурийбензоатом (1 ммоль/л, 60 мин) не приводит к изменению *pH* зависимости холодового повреждения в бессолевых растворах. В присутствии 150 ммоль/л хлорида натрия отмечается некоторая редукция *pH* зависимости гипертонического криогемолиза модифицированных эритроцитов.

Полученные результаты позволяют предположить, что зависимость уровня холодового повреждения эритроцитов от *pH* значительно определяется перераспределением анионов хлорида между клеткой и средой и в меньшей степени модификацией взаимодействия белка полосы 3 с цитоскелетом.

УДК 577.352.3: 612.111.3

Исследование модуля сдвига мембран эритроцитов

Е. А. ГОРДИЕНКО, А. И. ОСЕЦКИЙ, Л. И. ПОПИВНЕНКО, А. Ф. ТОДРИН

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Реакция клетки на действие различных экстремальных факторов, как правило, сопровождается изменением деформируемости клеточной мембраны. В литературе отмечается снижение деформируемости эритроцитов как в хранящейся при температуре 4 °С, так и в криоконсервированной донорской крови. Большое влияние на деформируемость мембраны клетки оказывает и химический состав среды, в которой находится клетка. Уровень деформируемости клеток главным образом определяется модулями упругости клеточных мембран.

Наиболее распространенным методом определения модулей упругости (к которым относятся модули изгиба, сдвига и изотропного натяжения) мембран клеток является втягивание одиночных клеток в микропипетки, радиус которых меньше характерного размера клетки, под действием заданного перепада давления. Для микропипеточных методов наиболее досконально разработаны теория и способы обработки результатов экспериментов и именно с помощью этих методов получены полные и точные данные по механическим свойствам мембран различных клеток. Однако эти методы требуют дорогостоящей апппаратуры, высокой квалификации персонала и позволяют исследовать только несколько десятков клеток в данной пробе за несколько часов. Это затрудняет статистическую обработку результатов экспериментов.

Нами разработан метод, с помощью которого определяется средний модуль сдвига для всех клеток, находящихся в исследуемом объеме суспензии, за короткий промежуток времени (эксперимент длится не более 15 мин). Экспериментально измеряя время всасывания определенного объема суспензии эритроцитов с заданным гематокритом при известных перепаде давления и размерах микрокапилляра, а также время всасывания в микрокапилляр такого же объема внеклеточного раствора и используя разработанную нами физико-математическую модель процесса прохождения эритроцита человека через цилиндрический микрокапилляр, диаметр которого меньше размера клетки, рассчитывается средний модуль сдвига клеточной мембраны для всех эритроцитов, прошедших через капилляр.

По данной методике измеряли модуль сдвига мембран эритроцитов донорской крови, хранившейся при температуре 4 °С в течение четырех недель. С течением времени хранения модуль сдвига мембран эритроцитов заметно возрастал. Если в первые пять дней хранения донорской крови возрастание модуля сдвига мембран эритроцитов не превышало 3–5%, то к концу четвертой недели оно составляло 25–30%.

Была также проведена серия экспериментов по исследованию эритроцитов, суспендированных в изотоническом и гипертонических растворах. Гипертонические растворы оказывали заметное влияние на жесткость мембран эритроцитов. Так, модуль сдвига мембран эритроцитов, суспендированных в 0,4 М растворе NaCl, увеличился на 62% по сравнению с эритроцитами, суспендированными в изотоническом растворе, а для эритроцитов, суспендированных в 1,2 М NaCl, возрастание модуля сдвига достигало 93%.

Таким образом, разработанный нами метод позволяет за короткий промежуток времени оценить величину среднего модуля сдвига мембран эритроцитов, находящихся в исследуемом объеме.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 577.125.33: 591.342.5

Особливості перекисного окислення ліпідів у аклімованих і неаклімованих личинок *Tenebrio molitor*

О. К. ГУЛЕВСЬКИЙ, В. В. РЯЗАНЦЕВ, О. О. ГРИЩЕНКОВА, Л. І. РЕЛІНА, Г. В. ТРИФОНОВА

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

При несприятливих умовах навколишнього середовища комахи здебільшого знаходяться в стані фізіологічного спокою, в основі якого є ендогенні адаптивні механізми і під час якого більшість функцій організму зведені до мінімуму або відсутні довгий час. Личинка у стані холодового гіпобіозу існує за рахунок своїх внутрішніх резервів, не споживаючи при цьому їжі, води і не виділяючи продуктів травлення, отже в даному випадку процеси катаболізму переважають анаболічні. У цих умовах організм має достатній біохімічний захист від ушкодження своїми власними продуктами життєдіяльності. Ми досліджували процес спонтанного перекисного окислення ліпідів личинок *Tenebrio molitor* як в нормі, так і після холодової аклімації.

Показано, що рівень дієнових кон'югатів (ДК) у аклімованих личинок достовірно не відрізняється від контролю ($0{,}0028 \pm 0{,}0001$ і $0{,}0027 \pm 0{,}0001$ опт. од./мг сирої ваги відповідно), що може свідчити про активну дію ендогенних антиоксидантів, які перешкоджають накопиченню цього продукту в клітинах. Кількість малонового діальдегіду (МДА) вимірювалась в нМ/мг сирої ваги личинок і складає $23{,}2 \pm 0{,}37$ у аклімованих і $22{,}2 \pm 0{,}49$ у неаклімованих особин. При статистичній обробці результатів за двома вибірками різниці між ними не виявлено, як і при визначенні кількості ДК. Відсутність різниці в рівнях ДК і МДА між двома групами комах, які знаходились у різних температурних умовах, може пояснюватись низькою активністю прооксидантної системи під час аклімації особин або високим рівнем захисної антиоксидантної активності.

З метою подальшого уточнення процесів перекисного окислення ліпідів під час аклімації личинок *T. molitor*, а також виявлення активності антиоксидантної системи нами застосовувався метод хемілюмінесценції (ХЛ). Цим методом вимірювалась максимальна інтенсивність люмінесценції I_{max}, а також індуковане вільнорадикальне окислення ліпідів H_2O_2 як кінетичний параметр хемілюмінесценції.

Додавання розчину H_2O_2 викликає різке збільшення світіння в пробі, так званий швидкий спалах. Явище, що спостерігається, пов'язане з інтенсивним розпадом перекису водню під дією іонів перемінної валентності, так звана реакція Фентона. Рівень швидкого спалаху визначався кількістю активного кисню, який прореагував з люмінолом з утворенням 3-амінофталату, який випромінює в видимій області спектру. Показано, що інтенсивність максимальної ХЛ у аклімованих личинок достовірно нижча, ніж у неаклімованих ($2\,175{,}3 \pm 533{,}6$ і $7\,907{,}3 \pm 1\,766{,}8$ відн. од. відповідно), при цьому час зниження інтенсивності світіння до рівня фону складає приблизно 100 с як у аклімованих, так і у неаклімованих особин.

Зниження амплітуди максимуму ХЛ при додаванні гомогенатів аклімованих личинок може бути пов'язане з окисленням H_2O_2 в інших реакціях, наприклад, при дії каталази, глутатіон-пероксидази, при інтенсивному поглинанні активних форм кисню за участю супероксиддисмутази або таких антиоксидантів, як вітамін Є. Отже, відміни інтенсивності ХЛ у аклімованих личинок *T. molitor* можуть бути пов'язані з посиленням антиоксидантного захисту, яке спричинюється їх аклімацією.

УДК 577.15: 611.013.11: 612.592

Стимулирующее действие цитохрома С и холинхлорида на активность сукцинатдегидрогеназы в спермиях человека, хранившихся в условиях гипотермии

Э. И. АЛЕКСЕЕВСКАЯ, М. И. КРАМАР, Н. Н. ЧУБ, Г. Г. ЮРЧЕНКО, П. ТОДОРОВ, В. Е. ЧАДАЕВ, Т. А. ЧЕРЕПАНОВА, И. Н. КУЧКОВ, И. В. ЧЕРКАШИНА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Оценка активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) – признанный тест определения жизнеспособности клеток, так как она занимает центральное положение в цикле Кребса, коррелятивно связана с другими ключевыми ферментами и принадлежит к высокоактивируемым ферментам. Активаторами могут служить гипоксия, АДФ, цитохром С, изменение *pH* и другие факторы.

Матеріал, захищений авторським правом

Цель настоящего исследования – изучение характера стимулирующего действия цитохрома С и холинхлорида (ХХ) на активность СДГ спермиев человека до и после гипотермического хранения.

Всего исследовано 428 эякулятов спермы человека. В работе использован модифицированный цитохимический метод определения активности СДГ. Количественную оценку активности фермента в спермиях осуществляли путем расчета среднего цитохимического показателя (СЦП) и выражали в условных единицах. Сперму охлаждали от 22 до 8 °С и затем образцы хранили при этой температуре в течение 4 ч. Через каждый час охлаждения в опытные пробы добавляли цитохром С и ХХ. Оптимальная концентрация цитохрома С составляла $2{,}4 \cdot 10^{-3}$мкМ и ХХ – $0{,}57 \cdot 10^{-3}$ М, активность СДГ в незрелых и зрелых спермиях – $3{,}0 \pm 0{,}15$ и $1{,}96 \pm 0{,}1$ соответственно ($P < 0{,}05$). После первого часа хранения спермиев в условиях гипотермии и добавления препаратов отмечено их стимулирующее действие на активность СДГ. СЦП составлял $3{,}93 \pm 0{,}05$ и $2{,}9 \pm 0{,}09$ соответственно ($P < 0{,}05$). Аналогичная картина наблюдалась при 2-, 3- и 4-часовом хранении спермиев при 8 °С, а именно: стимуляция активности СДГ после добавления цитохрома С и ХХ и дальнейший спад ее до исходных величин как в зрелых, так и незрелых формах. В контрольных образцах наблюдали достоверное снижение активности СДГ в течение каждого часа хранения ($2{,}57 \pm 0{,}11$, $1{,}9 \pm 0{,}06$, $0{,}92 \pm 0{,}06$, $0{,}94 \pm 0{,}05$, $0{,}79 \pm 0{,}03$ – незрелые клетки, $1{,}41 \pm 0{,}03$, $2{,}1 \pm 0{,}05$, $0{,}59 \pm 0{,}03$, $0{,}6 \pm 0{,}03$ – зрелые спермии.

Таким образом, цитохром С и ХХ обладают стимулирующим действием на активность СДГ в зрелых и незрелых спермиях человека, хранившихся в условиях гипотермии. Используя совместное действие данных препаратов, удалось снизить их концентрацию, а именно: цитохрома С до $1{,}1 \cdot 10^{-3}$мкМ и ХХ – $0{,}43 \cdot 10^{-3}$ М и усилить стимулирующий эффект, который, однако, носит временный характер. Активация СДГ в спермиях человека, хранившихся в условиях гипотермии, по-видимому, обусловлена конформационными переходами и тесно связана с изменениями в области негеминового железа.

УДК 547.422: 599: 57.043

Влияние криопротекторов и фармакологических веществ на период восстановления организма млекопитающих после кратковременного холодового воздействия

В. К. МАЗАЛОВ, С. Е. ОВСЯННИКОВ, Г. В. КОВАЛЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Актуальность проблемы поиска фармакологических средств, ускоряющих процессы реабилитации, обусловлена развитием патологических реакций, снижающих резистентность организма при самосогревании после глубокой гипотермии.

Цель исследований – изучение влияния фармакологических веществ различного класса соединений на процессы восстановления после глубокой гипотермии, вызываемой острым охлаждением. При этом оценивали выживаемость и скорость саморазогревания животных, динамику биохимических и физико-химических изменений в органах и крови на протяжении 48 ч периода восстановления. Препараты вводили непосредственно после охлаждения организма (температура ядра тела 19–22 °С).

Установлено, что психостимуляторы сиднокарб и фенамин снижают выживаемость животных при самосогревании. Декстран, глюкоза в различных дозах не оказывают влияния на скорость разогревания и устойчивость животных в этот период, а при температуре 19 °С даже ускоряют их гибель. Наиболее выживаемым положительным эффектом обладают ПЭГ, которые достоверно повышают резистентность и ускоряют восстановление температурного гомеостаза после глубокой гипотермии. На фоне действия ПЭГ снижается концентрация малонового диальдегида, холестерина и билирубина, предотвращается рост активности аминотрансфераз в сыворотке крови. Нормализуются осмотичность плазмы, ионный (Na, K, Cl, Cu^{2+}) и белковый состав.

Можно полагать, что эффективность ПЭГ обусловлена их ингибирующим влиянием на процессы ПОЛ, мембраностабилизирующую и антиагрегатную активность этих соединений. Учитывая влияние ПЭГ на дезинтоксикацию, реологические характеристики крови, проницаемость Са-каналов, представляется вероятным, что изменения в организме в период восстановления после интенсивного охлаждения обусловлены нарушением теплового гомеостаза, гомеостаза ионов Ca^{2+} и опосредуемой ими патологии мембран.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 612.592.35: 57.085.1

Компьютерный морфометрический анализ ультраструктуры клеток печени при охлаждении

А. С. КАПРЕЛЬЯНЦ, Л. Н. МАРЧЕНКО, Р. К. МИГУНОВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Методами трансмиссионной электронной микроскопии и компьютерной морфометрии изучали влияние охлаждения на состояние структуры клеток печени крыс. Ультраструктурные и морфометрические характеристики гепатоцитов были изучены при действии низких температур *in vivo* и *in vitro*. Эксперименты проводили на крысах линии Вистар массой 180–250 г. Печень *in vivo* охлаждали с помощью оригинального криоаппликатора с различной температурой зондов (–10, –30, –180 °С). Ткань печени для трансмиссионной электронной микроскопии фиксировали в глютаральдегидном и осмиевом фиксаторах на какодилатном буфере. Дегидратацию осуществляли в этаноле возрастающей концентрации и абсолютном ацетоне. Образцы ткани заключали в смесь эпоксидных смол эпон–аралдит. Контрастирование ультратонких срезов проводили по методу Рейнольдса. Просмотр и фотографирование осуществляли в электронном микроскопе просвечивающего типа при ускоряющем напряжении 75 кВ. Морфометрический и стереометрический анализ проводили с помощью компьютерной системы "МОРФО-ТУЛС", разработанной в отделе криоцитологии и количественной морфологии. Локализация, внутриклеточное распределение и морфометрические характеристики кристаллов льда в замороженной ткани печени визуализировались методом замораживания-замещения, реализованным с использованием оригинального устройства в ацетон-глютаральдегид-уранилацетатной среде.

Охлаждение ткани печени до умеренно низких температур (–10 и –30 °С) вызывало изменения в структуре канальцев эндоплазматического ретикулума и отдельных митохондрий. При более глубоком охлаждении (–180 °С) после отогрева были отмечены повреждения не только органоидов цитоплазмы гепатоцитов (эндоплазматического ретикулума, митохондрий, плазматической мембраны), но и ядерного аппарата клеток. Характерным является повреждение гематогепатоцитного барьера. Стереометрический анализ гепатоцитов крыс свидетельствует о том, что объемная доля их ядер с понижением температуры уменьшается, растет объемная доля митохондрий и особенно вакуолей. Объемная доля эндоплазматического ретикулума гепатоцитов крыс достигает своего максимального значения при –30 °С. Электронно-микроскопический анализ образцов, препарированных по методу замораживания-замещения, позволил выявить места локализации кристаллов льда в клетках печени, которые на микрофотографиях имеют вид светлых полостей различной формы и размеров. Согласно данным морфометрического анализа гепатоцитов этих образцов средние значения площадей кристаллов льда составляют 134,5, 1,32 и 0,07 мкм при температурах –10, –30 и –180 °С соответственно. При замораживании ткани печени до –180 °С были обнаружены мелкие внутриядерные кристаллы. Полученные результаты ультраструктурных исследований и компьютерного морфометрического анализа свидетельствуют о различной криорезистентности внутриклеточных структур гепатоцитов и других клеточных элементов ткани печени крыс.

УДК 612.592.82: 616.15.831-002: 612

Від фрактальної розмірності гематоенцефалічного бар'єра охолодженого мозку до функціональної геометрії фізіологічних систем організму

В. С. МАРЧЕНКО, Г. О. БАБІЙЧУК, Л. В. ПОЛІЩУК, Л. М. МАРЧЕНКО

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Існуючі нейротрансмітерні концепції центральної терморегуляції досить переконливо пояснюють найінтимніші нейрофізіологічні процеси. Але в жодній моделі до останнього часу не враховувались активність та ультраструктурний стан ГЕБ, не ставилось за мету знайти причину, а не механізм дії нейромедіаторів, тобто відповісти на питання чому?, а не як?. Зокрема, чому саме норадреналін (НА) бере участь у підтримці поточних терморегуляційних процесів, тоді як ацетилхолін (АХ) переключає гомеостатичні механізми термогенезу, а не навпаки. Пропонується розглянути зазначену проблему в площині порядок–хаос, де доречно застосувати фрактальний підхід (оцінка дробової розмірності).

Матеріал, захищений авторським правом

Фрактальний аналіз експериментального масиву щодо дії охолодження на нейрофізіологічні процеси, накопиченого нами за останнє десятиріччя, показав: а) структура та динаміка НА-ергічних процесів (секреція і захват НА, ультраструктурний розподіл аденілатциклази і рівень цАМФ, кінетика НА-рецепторів, ультраструктура НА-везикул синапсів) масштабно-інваріантні, мають фрактальну розмірність ~1,3, показник Херста $H > 0,5$ (дані чинники персистентні, тому й забезпечують підтримуючі тенденції у центральних механізмах терморегуляції); б) холінергічні процеси (вивільнення АХ, обмін кальцію, цГМФ, ультраструктура АХ-везикул синапсів) масштабно-інваріантні, фрактальна розмірність ~1,7 ($H < 0,5$), тобто дані процеси антиперсистентні. Таким чином, зрозуміло, чому НА-ергічні процеси підтримують домінуючу терморегуляторну тенденцію, а АХ-ергічні сприяють зміні теплопродукції й тепловіддачі. Але чому геометрія функціонування НА та АХ фрактально протилежна?

Радіоізотопними, електрофізіологічними та електронногістохімічними методами вивчався функціональний стан ГЕБ щурів при тригерній гіпотермії. Показано, що ГЕБ має фрактальну природу, яка ініціюється процесами типу тривалої потенціації, що підтримуються "нейрональним газом" (NO, CO). Ці монооксиди обумовлюють реверберацію проникності ГЕБ, агрегацію піноцитозних везикул, гідратаційно-дегідратаційні та інші фрактальні явища в ендотеліоцитах капілярів мозку та їх нейрогліального оточення. Так, проникнення біоактивних речовин крізь ГЕБ "услід за NO і CO" у першому наближенні – це рух газу по лабіринту у пористому середовищі, який може описуватись в термінах теорії перколяції. Поріг проникності можна асоціювати з порогом протікання, його підвищення при гіпотермії характеризується відносно вузькими максимумами (2–3 хв), протягом яких системне введення вегетотропних речовин дає центральний ефект. Макрогеометрія поблизу порога перколяції має фрактальну розмірність. Безпосередньо перед різким підвищенням проникності ГЕБ також утворюється особливий (фрактальний) структурно-функціональний стан мозку. Проникність ГЕБ підвищується тоді, коли синхронізується геометрія ендотеліоцитів, синапсів, біоелектричної та нейрохімічної активності. Ці структури й процеси набувають однакової розмірності (~1,7 або ~1,3) при зниженні резистентності ГЕБ до АХ чи НА відповідно. За нашими даними взаємовідносини НА і ГЕБ забезпечує NO, а АХ – CO, тоді суттєва різниця в часі існування цих монооксидів може обумовити ступінь "спінювання" просторово-часових патернів мозку, гіпо- чи гіперактивність організму. Зокрема, застосовуючи фрактальні режими гіпотермії, можна знизити епілептиформні прояви і навіть наблизити електрогенез переживаючих зрізів мозку щурів до мозку гібернаторів (за критерієм надповільних біотоків).

Таким чином, можна припустити, що та чи інша роль біогенних амінів у центральній терморегуляції пов'язана з проникністю ГЭБ, що визначається не тільки нейротрансмітерними механізмами, але й фізичними властивостями субстрату охолодженого мозку (процесами типу перколяції з витисненням, які природно породжують фрактальні структури).

УДК 57.043: 546.214: 577.11/12

О некоторых аспектах применения озонирующих технологий в криобиологии и взаимодействии озона с биополимерами

В. Д. ЗИНЧЕНКО, А. В. ЗИНЧЕНКО, Н. Г. КАДНИКОВА, А. М. ГРЕК, И. М. КОВАЛЬЧУК, Ю. И. ГУЗИЙ, С. И. КАЛМЫКОВ, О. В. ТРЕТЬЯК, А. В. КОБЗАРЬ, А. Н. ГАЙДЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Харьковский военный университет

Развитие криобиологических технологий требует применения новых эффективных методов холодной стерилизации. Это связано с использованием в криобиологии полимерных материалов, не допускающих стерилизации путем нагрева. Нами разработан озоновый стерилизатор, работающий в замкнутом режиме с рециркуляцией газа через стерилизационную камеру, не допускающий выхода озона в атмосферу. В стерилизаторе использован генератор озона на барьерном разряде. Концентрация озона в озоновоздушной смеси близка к предельно получаемой в разрядниках подобного типа из неосушенного атмосферного воздуха. Стерилизатор допускает также использование чистого кислорода, что позволяет избежать присутствия в камере окислов азота и органических загрязнений, которые могут попасть в нее из атмосферного воздуха, Предлагаемая технология стерилизации может быть применена для обработки низкотемпературных хранилищ большого объема и сосудов Дьюара, используемых для хранения криоконсервированного материала.

С помощью разработанной установки мы исследовали возможность стерилизации пластмассовых

Матеріал, захищений авторським правом

контейнеров газообразным озоном. Эффективность стерилизации оценивали по инактивации микроорганизмов. При комнатной температуре эффективная стерилизация контейнеров достигалась при времени обработки от 40 до 80 мин.

Существующие в настоящее время представления о механизмах дезинфицирующего действия озона в отношении бактерий, вирусов и грибов во многом строятся на основании предположений о повреждении озоном жизненно важных белковых комплексов и мембран. В этой связи перспективными являются исследования взаимодействия озона с биополимерами. Подобные исследования представляют интерес и для различных озонирующих технологий, поскольку они могут служить основанием для выбора таких технологических параметров, как концентрация озона, продолжительность обработки, температура и др. Нами исследовалось действие озона на сывороточный альбумин в водном растворе. Обработанные озоном растворы белка изучали методами дифференциальной сканирующей калориметрии на приборе ДАСМ-4. Применяли также методы спектрофотометрии (прибор Specord UV Vis) и спектрофлуориметрии (прибор Hitachi). Максимум пика теплопоглощения на термограмме плавления сывороточного альбумина существенно уменьшается и становится размытым по температуре, причем обнаруживается сильная зависимость эффекта озонирования от концентрации озона. Из калориметрических исследований следует, что в процессе озонирования молекулярная структура альбумина разрушается. Характер зависимости этого эффекта от концентрации озона весьма сходен с концентрационной зависимостью эффективности инактивирующего действия озона на микроорганизмы. Анализируя спектры флуоресценции, можно сделать вывод, что деструктивные изменения белка после обработки озоном происходят с разрушением глобулы вплоть до уровня отдельных аминокислот.

Полученные результаты позволяют глубже понять механизмы действия озона при инактивации микроорганизмов и важны для выбора таких параметров технологических режимов в озонирующих технологиях, как концентрация озона и время обработки.

УДК 591.436.2.81: 599.323.4: 616.12-008.331.1

Роль физико-химических факторов среды в устойчивости изолированных гепатоцитов крыс к гипертоническому стрессу

В. А. БОНДАРЕНКО, В. А. КОПТЕЛОВ, С. Н. ЛЕЖАНИН, Т. П. СЕРЕДА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

В данной работе изучалось влияние гиперконцентраций хлорида натрия, температуры и *pH* на устойчивость изолированных гепатоцитов крыс.

Для моделирования условий замораживания-оттаивания клеток исследовалось поведение гепатоцитов в гиперосмотических концентрациях растворов хлорида натрия при температурах 0 и 37 °С и различных значениях *pH* (6,0–8,0). В экспериментах использовали растворы хлорида натрия следующих концентраций (моль/л): 0,15; 0,35; 0,55; 0,75; 0,95; 1,2; 1,8; 2,4; 3,0. Растворы готовили на 0,01 М фосфатном буфере. К 3 мл каждого раствора хлорида натрия добавляли $1{,}6 \cdot 10^6$ клеток/мл среды инкубации, инкубировали 10 мин при указанных температурах. Затем пробы центрифугировали при 1 000 об/мин в течение 2-х минут и по выходу в инкубационную среду маркерного фермента лактатдегидрогеназы оценивали жизнеспособность клеток.

В ходе экспериментов было обнаружено, что зависимость жизнеспособности клеток от концентрации хлорида натрия носит нелинейный характер. В отличие от эритроцитов, жизнеспособность которых незначительно убывает линейно во всем концентрационном диапазоне, та же зависимость для гепатоцитов имеет принципиально иной характер: выход маркерных ферментов остается практически неизменным вплоть до определенной точки (положение которой зависит от температуры и *pH*), после чего резко возрастает.

С повышением температуры точка начала интенсивного выхода маркерных ферментов смещается в область более низких концентраций. Наличие в среде кальция оказывает обратное действие. Кроме того, важное значение имеет *pH* инкубационной среды. Так, при *pH* 6,0 выход маркерных ферментов практически отсутствует во всем рассмотренном концентрационном диапазоне. С ростом *pH* точка начала интенсивного выхода маркерных ферментов смещается в область более низких концентраций NaCl. Повреждающее действие сред с высоким значением *pH* частично снимается гипотермией, однако характер зависимости цитолиза от осмотичности среды остается неизменным.

Учитывая данные результаты, можно сделать вывод о принципиально ином механизме взаимодействия гепатоцитов с гипертонической средой по сравнению с эритроцитами, для которых характерен ответ по типу "все или ничего". По-видимому, гепатоциты как более сложные ядерные клетки имеют способность к регуляторным изменениям объема, позволяющую избегать гибели клеток до определенного предела гипертонического воздействия.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 547.422: 57.043: 611-018.51

Изменение активности Ca^{2+}-АТФазы мембран эритроцитов под влиянием непроникающего криопротектора ПЭО-1500, охлаждения и замораживания

А. Ю. НИКОЛЬЧЕНКО, В. П. ТЯГИЛЕВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Известно, что в основе температурно-осмотической стабилизации эритроцитов к действию факторов низких температур лежит структурно-функциональная модификация белков цитоскелета клеток. В физиологических условиях одним из регуляторных механизмов структурного состояния белков цитоскелета является изменение концентрации внутриклеточного Ca^{2+}.

В процессе криоконсервирования эритроцитов состояние транспортных систем, в частности Ca^{2+}-АТФазы, может быть лимитирующим фактором, определяющим их стабильность в цикле замораживания-отогрева и структурно-функциональную полноценность деконсервированных клеток. Поэтому исследование роли транспортных мембранных систем в процессе стабилизации клеток к низкотемпературному воздействию является не только теоретически важной, но и прикладной задачей криобиологии.

Исследовалась активность Ca^{2+}-АТФазы мембран эритроцитов. Оценивалось влияние: ПЭО-1500 при 0 и 37 °С; замораживания-отогрева; процедуры удаления криопротектора из клеточной суспензии и собственно температуры на активность Ca^{2+}-АТФазы мембран эритроцитов. Контролем служили нативные эритроциты, активность Ca^{2+}-АТФазы которых определялась при 37 °С. Статистический анализ проводили по алгоритму пакета статистических программ Statgraphics Plus, при сравнении данных использовали *t*-критерий Стьюдента для независимых выборок.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что взаимодействие ПЭО-1500 с эритроцитами приводит к ингибированию активности Ca^{2+}-АТФазы. При этом снижение температуры обработки клеток криопротектором до 0 °С также вносит определенный вклад в торможение активности данного фермента, в результате чего концентрация ионов Ca^{2+} внутри клетки повышается, причем при 0 °С повышение выражено в большей степени. Это может являться важным механизмом в повышении устойчивости эритроцитов к криоконсервированию, так как после обработки их криопротектором ПЭО-1500 при 0 °С повышение концентрации Ca^{2+} в клетках в данных условиях может приводить к активации Ca^{2+}-зависимых регуляторных систем, модифицирующих состояние белков цитоскелета. Обнаруженное ингибирование Ca^{2+}-АТФазы мембран эритроцитов является обратимым, поскольку после удаления ПЭО-1500 активность Ca^{2+}-насоса восстанавливается. Данный факт интересный с точки зрения восстановления функциональной полноценности криоконсервированных эритроцитов после трансфузии их реципиенту вследствие значительного разведения концентрации криопротектора в русле крови.

УДК 611-018.46: 547.42: 57.085.2

Осмотическое поведение эмбрионов и клеток костного мозга мыши в растворах криопротекторов

Л. Ф. РОЗАНОВ, Е. И. СМОЛЬЯНИНОВА, В. С. ХОЛОДНЫЙ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Исследования осмотического поведения клеток различных типов и кинетики изменения клеточного объема в экспериментах, моделирующих различные криобиологические ситуации, представляют несомненный интерес как для экспериментальной биологии, так и для практики. С одной стороны, это позволяет изучить основные биофизические параметры клеток, определяющие специфические реакции клеток на факторы среды криоконсервирования, а с другой — глубже понять процессы массообмена между клеткой и окружающей средой, выяснить роль различных компартментов клетки в ее осмотическом ответе и тем самым создают основу для научного прогнозирования условий оптимизации процедуры криоконсервирования.

В данной работе проведены микроскопические исследования осмотического поведения 8-клеточных эмбрионов и клеток костного мозга мыши в таких гипертонических растворах криопротекторов, как глицерин, 1,2-пропандиол (1,2-ПД) и диметилсульфоксид (ДМСО).

Матеріал, захищений авторським правом

Путем сопоставления экспериментальных зависимостей кинетики изменения относительного объема для отдельных клеток с рассчитанными на основе уравнений термодинамики необратимых процессов (Kedem–Katchalsky) зависимостями относительного объема от времени определены величины коэффициентов проницаемости 8-клеточных эмбрионов и фракции костного мозга с размерами клеток 8–10 мкм для молекул воды и криопротекторов.

Показано, что с увеличением концентрации глицерина от 1,5 до 4,2 М коэффициент проницаемости для него при 18 °С снижается с $5{,}245 \pm 0{,}91 \cdot 10^{-8}$ до $3{,}47 \pm 0{,}43 \cdot 10^{-8}$ м/с. В отдельных случаях в 30%-х растворах глицерина бластомеры эмбрионов мыши аномально быстро увеличивали объем с последующим набуханием.

В отличие от 8-клеточных эмбрионов клетки костного мозга не выдерживали контакта даже с 1 М глицерина, набухая до размеров, превышающих исходные в 1,5 раза. Поэтому оценка коэффициентов проницаемости этих клеток для глицерина проводилась в растворах с концентрацией 0,75 М. Но даже в этом случае клетки больших чем 8–10 мкм размеров повреждались.

Коэффициенты проницаемости клеток костного мозга мыши для глицерина, 1,2-пропандиола и ДМСО при концентрациях криопротекторов 0,75, 1 и 1 М соответственно составляли: $0{,}94 \pm 0{,}13$, $11{,}83 \pm 0{,}11$ и $6{,}92 \pm 0{,}08$ (10^{-8} м/с). Полученные данные свидетельствуют, что причиной повышенной чувствительности клеток костного мозга к контакту с гипертоническими растворами криопротекторов может быть низкая проницаемость для криопротекторов их плазматических мембран.

Анализ динамики изменения внутриклеточных концентраций криопротекторов и электролитов показал, что насыщение клеток криопротекторами происходит в первые минуты экспозиции клеток в растворах. Воздействие высоких концентраций криопротектора и непроникающих внутриклеточных электролитов может быть причиной повреждения клеток как на этапе эквилибрации, так и на этапах отмывки, создавая высокие трансмембранные градиенты.

УДК 57.043: 612.111.11

Сравнительное изучение влияния замораживания-оттаивания на гемоглобины A и F

Н. Н. ТИМЧЕНКО, Е. Д. РОЗАНОВА, К. Н. ХРОМУШКИН, В. А. МОИСЕЕВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Фетальный гемоглобин, преобладающий в крови плода на последних месяцах гестации, отличается от гемоглобина А крови взрослого человека своей структурой и некоторыми физико-химическими свойствами. Успешное использование гемоглобина F в экспериментальной медицине стимулировало интерес к изучению структуры и свойств этого белка.

Цель работы — сравнительное изучение влияния замораживания-оттаивания в растворах, содержащих различные концентрации хлористого натрия, на гемоглобины А и F.

В работе использовали гемоглобин А, выделенный из донорской крови, и гемоглобин F, выделенный из плацентарной крови. Структуру белков характеризовали с помощью первых производных спектров поглощения. Для анализа агрегатного состояния белков использовали гель-хроматографию. Кроме того, исследовали содержание в растворах оксигемоглобина, дезоксигемоглобина и метгемоглобина до и после замораживания-оттаивания. Замораживание осуществляли со средней скоростью 20 °С/мин до –196 °С в 0,05 М натрий-фосфатном буфере *pH* 7,4 с различными концентрациями NaCl, оттаивание проводили в водяной бане при 22 °С.

Предварительное исследование влияния растворов NaCl на гемоглобины А и F показало, что фетальный гемоглобин менее устойчив к действию концентрированных растворов соли и диссоциирует при меньших их концентрациях, чем гемоглобин А (1,5 и 2 М соответственно). Замораживание белков в растворах солей, не вызывающих диссоциацию белков, показало, что в первых производных спектров поглощения наблюдаются однотипные изменения в области поглощения тирозиновых остатков. После замораживания белков в растворах солей, вызывающих диссоциацию, обнаружено смещение максимума спектра поглощения (ноль на первой производной) в коротковолновую область. Однако для гемоглобина F эти изменения видны при меньших концентрациях NaCl, чем для гемоглобина А.

Изучение содержания оксигемоглобина, дезоксигемоглобина и метгемоглобина после замораживания белков в растворах с различной концентрацией NaCl также выявило различия для гемоглобинов А и F.

После замораживания-оттаивания гемоглобина А в солевых растворах, не вызывающих диссоциацию белка, увеличивается содержание дезоксигемоглобина и уменьшается содержание оксигемоглобина. После замораживания-оттаивания гемоглобина А в растворах NaCl, приводящих к диссоциации, отмечается повышение содержания метгемоглобина за счет уменьшения содержания оксигемоглобина.

Замораживание-оттаивание фетального гемоглобина в растворах NaCl, начиная с концентрации 0,5 М, приводит к увеличению содержания метгемоглобина за счет уменьшения оксигемоглобина.

Таким образом, полученные результаты показали, что фетальный гемоглобин менее устойчив к действиям концентрированных растворов NaCl и замораживания-оттаивания.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 615.014.451: 611.013.85

Влияние тепловой стерилизации на белковый и нуклеотидный состав водно-солевых экстрактов плаценты человека

Т. Ф. МОРОЗОВА, Е. Д. РОЗАНОВА, М. И. ЩЕТИНСКИЙ, А. М. ВОРОТИЛИН, В. А. МОИСЕЕВ, О. А. НАРДИД, Ю. В. КУЧЕРЕНКО, О. В. ГРИЩЕНКО, О. А. БЕРЕСНЕВА, С. И. ТАРАНЕНКО, И. Я. ЗАХАРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков
Харьковская медицинская академия последипломного образования
9-я городская клиническая наркологическая больница, г. Харьков
5-й специализированный роддом, г. Харьков

Препараты плаценты человека широко применяются в медицине, в том числе и те, в процессе приготовления которых используется автоклавирование. Природа биологически активных веществ, сохраняющихся после автоклавирования, до сих пор в полной мере не выяснена.

Цель работы — изучение белкового и нуклеотидного состава экстракта из гомогената плаценты ранних сроков беременности (хориона) до и после автоклавирования экстрактов.

В работе использовали хорионы 1 и 2 соответственно 5- и 8-недельного срока беременности, а также образцы терминальной плаценты. Белковый и нуклеотидный состав оценивали фракционированием экстрактов методом гель-хроматографии. Содержание белка и нуклеотидов определяли спектрофотометрически на спектрофотометре Pye Unicam SP 8000. Согласно полученным результатам общая концентрация белков и нуклеотидов в водных экстрактах плаценты составила 10,4 мг/мл и 100 мкг/мл, в хорионе 1 — 5,9 мг/мл и 387 мкг/мл, в хорионе 2 — 18 мг/мл и 35 мкг/мл соответственно.

В изученных экстрактах плаценты и хорионов 1 и 2 были выделены три основные группы фракций белков и нуклеотидов: высокомолекулярные (100–150 кДа); среднемолекулярные (около 60 кДа), включающие гемсодержащие белки и групповые вещества крови, которые при попадании в организм могут усугублять иммуноконфликтные ситуации; низкомолекулярные.

В автоклавированных фракциях экстракта свежей терминальной плаценты сохранялись белки высокомолекулярных фракций протеинов. Автоклавирование суммарного экстракта этой плаценты позволяло сохранить и низкомолекулярные фракции белков.

В хорионе 1 белок с молекулярной массой (м.м.) около 70 кДа составляет ~78% от общего количества и спектрофотометрически может быть идентифицирован как гемоглобин. При автоклавировании количество этого белка в эксперименте уменьшалось более чем на 65%. В низкомолекулярных фракциях хориона 1 после автоклавирования концентрация растворимого белка не менялась, в то время как в высокомолекулярных фракциях его количество уменьшалось до 80%.

Нуклеотиды в хорионе 1 представлены преимущественно высокомолекулярной фракцией с м.м. от 110 до 90 кДа (~42% от общего количества нуклеотидов) и низкомолекулярной — с м.м. ~4 кДа и ниже (~25%). После автоклавирования фракций основная часть высокомолекулярных нуклеотидов агрегирует в отличие от низкомолекулярной фракции, которая сохраняется практически полностью.

По сравнению с хорионом 1 в хорионе 2 увеличивается содержание высокомолекулярных белков с м.м. от 150 до 120 кДа (до 46% от общего количества белка), гемоглобин составляет ~22%, появляется фракция белков с м.м. от 40 до 20 кДа (~25%); низкомолекулярная фракция, включающая полипептиды с м.м. менее 4 кДа и свободные аминокислоты, составляет около 2%. Автоклавирование приводит к агрегации 90% белков высокомолекулярной фракции, низкомолекулярные пептиды сохраняются полностью.

Нуклеотиды в хорионе 2 представлены тремя основными группами с м.м.: от 150 до 90 (~20%), от 30 до 15 (~16%), 6 кДа и меньше (~45%). После автоклавирования отдельных фракций в первых двух группах остается до 10–15% нуклеотидов. Низкомолекулярная фракция сохраняется полностью.

Таким образом, проведенные исследования показали, что автоклавирование экстрактов позволяет сохранить в растворе часть белков и низкомолекулярных нуклеотидов, чем, по-видимому, и может быть обусловлена биологическая активность экстракта плаценты.

Матеріал, захищений авторським правом

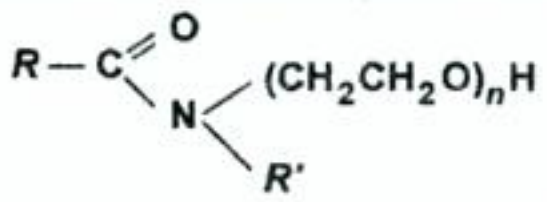
УДК 547.298.1.422/426: 57.043.085

Структура и криопротекторные свойства оксиэтилированных алифатических амидов

Л. А. ХАНИНА, В. С. ЧЕКАНОВА, А. В. НИКОЛЕНКО, А. М. КОМПАНИЕЦ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Высокая сохранность клеток костного мозга крыс при их криоконсервировании с оксиэтилированным N-ацетиламидом в качестве криопротектора, а также сохранность перевиваемых культур при замораживании с полиэтиленоксидом и оксиэтилированными (ОЭ) производными глицерина послужили основанием для изучения криопротекторной активности, цитотоксичности в систематических рядах ОЭ амидов:



С этой целью были синтезированы ОЭ амиды с различной длиной оксиэтильной цепи ($n = 3–10$) и различными алифатическими радикалами у атома азота и производные муравьиной и уксусной кислот: $R = CH_3$, H; $R' = H$, $COCH_3$, CF_3. Цитотоксические и криопротекторные свойства указанных амидов изучали на клетках костного мозга крыс, тромбоцитах и культуральных клетках почки теленка (ПТ), почки эмбриона свиньи.

Установлено, что независимо от биообъекта цитотоксичность обусловлена природой радикала, непосредственно связанного с атомом азота иминогруппы, и в меньшей мере определяется длиной оксиэтильной цепи.

Введение заместителя к атому азота как с донорными (CH_3, C_2H_5), так и акцепторными свойствами ($COCH_3$, CF_3) вызывает повышение цитотоксичности, удлинение оксиэтиленовой цепи приводит к уменьшению данного показателя.

Криопротекторная активность ОЭ амидов в значительной степени определяется молекулярно-массовым распределением.

Показано, что в ряду аддуктов амидов наибольшей криопротекторной активностью на клетках ПТ обладают ОЭ N-ацетилэтаноламин ($R = CH_3$, $R' = H$) и ОЭ N-ацетамид ($R = CH_3$, $R' = COCH_3$), сохранность клеток ПТ после размораживания соответственно составляет 95 ± 2 и $87 \pm 2\%$.

Наиболее высокие показатели сохранности тромбоцитов получены после их замораживания с растворами ОЭ N-ацетилэтаноламина в плазме. В образцах сохранялось в среднем 88% кровяных пластинок, их ретрактильная активность составила $80 \pm 2\%$, величина реакции на гипотонический шок – $35 \pm 2\%$, АДФ-агрегации – $10 \pm 1\%$. Установлено отсутствие выраженного цитотоксического действия растворов ОЭ N-ацетилэтаноламина на морфофункциональные свойства тромбоцитов до замораживания в сравнении с другими исследованными амидами.

Для клеток почек эмбрионов свиньи и костного мозга наиболее эффективным криозащитным веществом является аддукт N-ацетилэтаноламина со степенью полимеризации $n = 3–4$.

Представленные результаты свидетельствуют о перспективности исследований, направленных на применение ОЭ амидов в качестве криопротекторов при замораживании различных биологических объектов.

УДК 616.361.014.41: 611.018.46

Криообновление костного мозга и апоптоз: гипотезы и реальность

В. И. ГРИЩЕНКО, Э. И. АЛЕКСЕЕВСКАЯ, В. И. ВАЩЕНКО, Т. Н. ВАЩЕНКО, Т. К. БОРИСОВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Военно-медицинская академия, г. Санкт-Петербург

НИИ вирусных препаратов РАМН, г. Москва

Исследования фундаментальных проблем криобиологии и криомедицины последних десятилетий подтверждают важность феномена криообновления биологических объектов (В. И. Грищенко, Э. И. Обозная, Е. Я. Панков, 1989). Однако при криоконсервировании на клетки костного мозга (КМ) действуют различные повреждающие факторы, вызывая клеточную гибель по типу апоптоза. Динамическое взаимодействие этих двух процессов лежит в основе сохранности лечебной эффективности КМ человека (В. И. Грищенко с соавт., 1989; Д. А. Обухов, 1992).

Однако картина строгой иерархической последовательности взаимодействия криообновления и апоптоза нарушается при изучении состояния криоконсервированных клеток посмертного КМ.

Матеріал, захищений авторським правом

Несомненно, что посмертные изменения тканей и компонентов крови оказывают неблагоприятное воздействие на сохранность основных функций клеток КМ, на пролиферативную активность стволовых клеток, снижая их потенции к восстановлению кроветворения у пациентов (В. И. Ващенко с соавт., 1998).

Результаты экспериментов, выполненных нами при изучении активности топоизомераз в клетках посмертного КМ после размораживания, показывают, что структурная целостность ДНК нарушается и в значительной степени зависит от применяемого криопротектора (таблица). Следует остановиться на следующих фактах. Во-первых, в оттаянных клетках повышается активность топоизомеразы I как в ядре, так и в цитоплазме. Во-вторых, активность топоизомеразы II повышается достоверно только в цитоплазме. Вероятно, следует принять во внимание, что значительная часть исследователей приписывают структурную роль при формировании хромосом топоизомеразе II (R. H. Getzenberg et al., 1991; P. M. Watt, I. D. Hickson, 1994; D. B. Wigley, 1995). Вместе с тем мы знаем, что по современным представлениям для нормального функционирования топологической структуры сверхспиральной ДНК (ссДНК) необходимо поддерживать динамическое равновесие между уровнем и соотношением топоизомераз I и II. Поэтому можно предположить, что отсутствие бифазности при титровании сверхвитков в клетках размороженного посмертного КМ объясняется блокированием функций топоизомеразы II. Необходимо отметить, что отсутствие бифазности ссДНК в размороженном посмертном КМ зарегистрировано нами при применении криопротекторов ПВП и ПЭО-400, но не ДМАЦ и ДМСО. Поскольку по химической структуре изучаемые криопротекторы весьма различны, то правильным будет считать это феноменом, который требует дальнейшего детального исследования. Не исключено также, что при трансплантации размороженного посмертного КМ больным его пролиферативная активность восстанавливается как результат корректировки структурной активности топоизомеразы II, т.е. образование в переливаемом компоненте модифицированной (криобновленной) популяции стволовых клеток.

Изменение активности топоизомераз и состояния ссДНК посмертного КМ после 5 лет хранения при –196 °С ($n = 7$)

Режимы обработки объекта	Изучаемые показатели						
	Пролиферативная активность КМ, усл. ед.		ИКН ссДНК (γ_{η_0}) при 4 мкг/мл ЭБ	Активность топоизомераз, % к контролю			
				I типа		II типа	
	КОС	КлОС		в ядре	в цитоплазме	в ядре	в цитоплазме
Нативный КМ	43,0 ± 7,0	98 ± 10	1,43 ± 0,02	100	100	100	100
До криообработки	37,0 ± 3,0	77,0 ± 8,5	1,31 ± 0,02	86,5 ± 12,5	119 ± 9,5	88,3 ± 7,4	105 ± 8,4
После оттаивания	18,0 ± 3,5**	73,0 ± 7,5*	1,23 ± 0,02	127,4 ± 17,3*	136 ± 21,5*	85,7 ± 7,2	117 ± 8,8*

Примечания. * — различия значимы по отношению к показателям нативного КМ ($p < 0,05$); ** — $p < 0,01$; ИКН — индекс конформационной напряженности; КОС — показатель колониеобразующей способности клеток; КлОС — показатель кластерообразующей способности клеток.

УДК 57.043.085: 612.018.2: 530.15

Влияние тиреоидных гормонов на характер петли гистерезиса у белых крыс при глубокой гипотермии

В. И. СОБОЛЕВ, А. А. ПАНЬКО, С. Г. ПАНФИЛОВА

Донецкий национальный университет

Гомойотермия во многом определяет возможности существования человека и животных в неблагоприятных условиях, в частности при резком снижении температуры среды. Один из факторов гомойотермности связан с гормональной системой щитовидной железы. Ряд аспектов данной проблемы изучен. Однако остается недостаточно исследованным вопрос о состоянии некоторых физиологических функций во время развития гипотермии и возвращения к нормотермии, а также о влиянии тиреоидных гормонов на динамику этих процессов.

Цель работы — изучение состояния некоторых физиологических функций при различном тиреоидном статусе в динамике развития глубокой гипотермии и "выхода" организма из этого состояния.

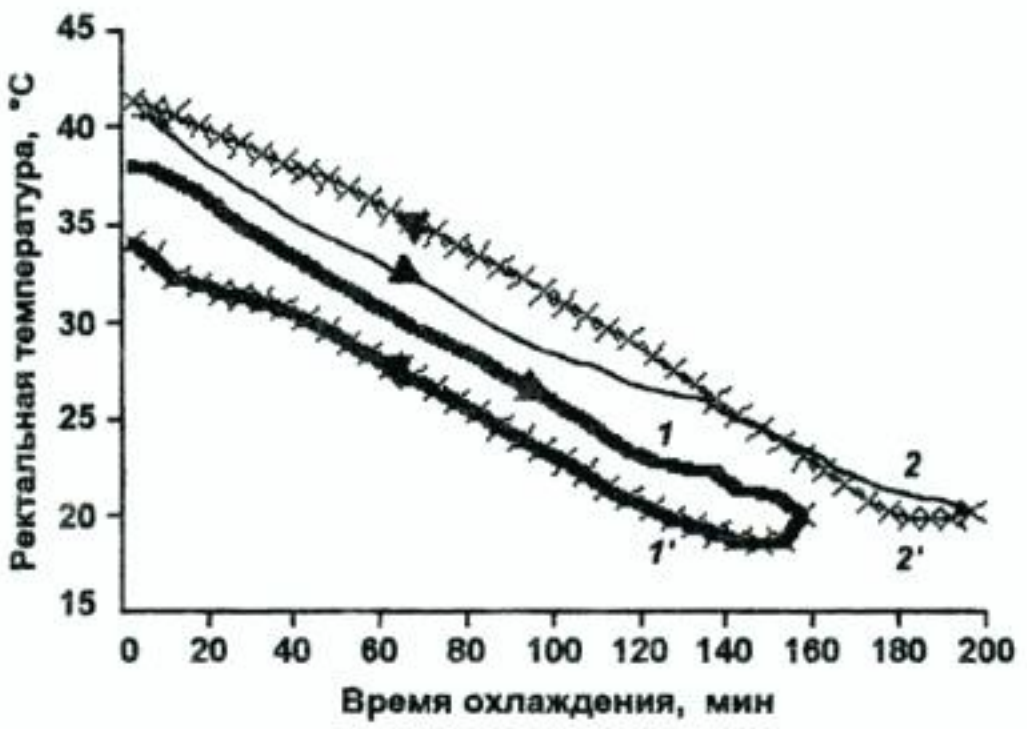
Эксперименты были выполнены на беспородных белых крысах-самцах массой 350–400 г. Животные были разделены на две группы: контрольная и экспериментальная (8 инъекций трийодтиронина в дозе 50 мкг/кг, инъекции осуществляли ежедневно, гормон вводили подкожно). Животное помещали в термонейтральную зону (28–30 °С), где регистрировалась исходная ректальная темпе-

Матеріал, захищений авторським правом

ратура: контроль – 37,8 ± 0,3 °С, гипертиреоз – 40,0 ± 0,1 °С. Затем животное переносили в холодовую камеру (–5 ÷ –6 °С). Показатели регистрировали каждые 5 мин вплоть до значения ректальной температуры 20 °С. После этого животное вновь помещали в термонейтральную зону, где оно находилось столько времени, сколько охлаждалось. Полученные результаты обрабатывали общепринятыми методами математической статистики. Анализ результатов наших исследований позволяет сделать следующие выводы.

Во-первых, характер "входа" и "выхода" организма из состояния глубокой гипотермии имеет существенные различия; это касается как экспериментальной, так и контрольной групп животных (рисунок). Так, среднее время охлаждения (и соответственно самосогревания) контрольных животных составило 139 ± 4,9 мин, а экспериментальных – 180 ± 3,8 мин. Как в первом, так и во втором случаях кривые "входа" и "выхода" в своей динамике не совпадают, что позволяет говорить о явлении гистерезиса в системе терморегуляции белых крыс.

Во-вторых, тиреоидные гормоны качественно изменяют характер петли гистерезиса системы терморегуляции. Действительно контрольным животным "отведенного" времени было недостаточно для восстановления нормальной температуры тела ($T_{\text{рект.выхода}} = 32{,}5 \pm 0{,}7$ °С); организм животных, получавших инъекции трийодтиронина, "успевал" практически полностью восстановить свою температуру ($T_{\text{рект.выхода}} = 39{,}9 \pm 0{,}4$ °С). Кроме того, на всем протяжении кривая "выхода" контрольной группы животных находится под кривой "входа", что свидетельствует о дефиците механизмов терморегуляции в процессе "выхода" из состояния глубокой гипотермии. У животных экспериментальной группы это явление наблюдается только в начальный период самосогревания. В целом же кривая "выхода" имеет более благоприятный характер, чем кривая "входа", что свидетельствует о качественном влиянии тиреоидных гормонов на характер петли гистерезиса в системе терморегуляции белых крыс при глубокой гипотермии.



Динамика ректальной температуры в ходе эксперимента: *1* – контроль, охлаждение; *1'* – контроль, самосогревание; *2* – гипертиреоз, охлаждение, *2'* – гипертиреоз, самосогревание.

УДК 535.37: 615.361.014.41: 616.153.962.4

Спектрофлуориметрическое изучение влияния замораживания на фибриноген

Э. А. РОМОДАНОВА, В. А. ГАВРИК, Т. С. ДЮБКО

Харьковский Национальный университет им. В. Н. Каразина

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

С использованием методов собственной белковой флуоресценции и флуоресцентных зондов изучено влияние различных режимов замораживания на спектральные характеристики растворов фибриногена. Установлено, что после замораживания положение спектра собственной флуоресценции фибриногена не изменяется, однако появляется дополнительная полоса в длинноволновой части спектра, характерная для белков с гидрофобным микроокружением хромофоров. Это может быть связано с изменением электростатического взаимодействия триптофанилов с соседними ионогенными группами или диэлектрических свойств окружения.

Анализ формы спектров флуоресценции, полученных при различных длинах волн возбуждения (280 и 296 нм), показал, что действие низких температур приводит к уменьшению диэлектрической постоянной микроокружения триптофанилов. При этом соотношение вкладов остатков триптофана и тирозина после замораживания не изменяется, хотя замораживание приводит к снижению интенсивности флуоресценции.

При более длинноволновом возбуждении (305 нм) проявляется длинноволновый сдвиг спектра флуоресценции фибриногена, подвергшегося замораживанию, что может быть следствием изменения состояния диссоциирующих групп или диэлектрической проницаемости микроокружения индольного кольца. В пользу второго предположения свидетельствует появление новой полосы в спектре флуоресценции после замораживания.

Дополнительную информацию о состоянии белковой молекулы предоставляет анализ спектров связанных с белком флуоресцентных зондов –

Матеріал, захищений авторським правом

ДМХ и ДСМ. После замораживания наблюдается увеличение стоксова сдвига ($\Delta\lambda_{макс}$) спектров ДМХ, связанного с фибриногеном, что характеризует увеличение времени жизни возбужденного состояния зонда в среде с низкой вязкостью. Поскольку ДМХ чувствителен к присутствию молекул воды, подобный эффект можно объяснить увеличением подвижности и количества молекул воды в ближайшем микроокружении зонда. Анализ формы спектров флуоресценции ДМХ по соотношению интенсивностей при 485 и 542 нм показал, что после замораживания наблюдается уменьшение вклада длинноволновой компоненты в суммарный спектр.

Анализ формы спектров флуоресценции ДСМ в водных растворах фибриногена свидетельствует, что основной вклад в общий спектр вносят молекулы зонда, сорбированные на поверхности белка. Кроме того, в спектре обнаруживаются еще две составляющие, значения параметров неоднородного уширения которых позволяют отнести их к зонду, расположенному в неполярных зонах белка.

Быстрое замораживание приводит к снижению интенсивности флуоресценции ДСМ в растворах фибриногена без изменения положения максимума спектра. При этом взаимодействие ДСМ с молекулами белка характеризуется кинетической зависимостью, и параметры спектров зонда становятся постоянными только через 70–90 мин после добавления зонда к белковому раствору. Ход кинетических кривых зависит также от скорости замораживания белкового раствора, которая оказывает влияние на свойства центров, связывающих зонд. Анализ формы спектров флуоресценции ДСМ в растворах белка показал, что спектральные изменения фибриногена после "быстрого" замораживания (около 200 °С/мин) менее выражены в сравнении с "медленным" (1–2 °С/мин) и в основном сводятся к некоторому перераспределению зонда между центрами сорбции.

Таким образом, суммируя полученные результаты, можно заключить, что замораживание растворов фибриногена вызывает необратимые изменения его макроструктуры, которые зависят от режима охлаждения. При этом изменяются полярность окружения белковых хромофоров и поверхностные свойства макромолекулы.

УДК 57.043.084.1: 611.018.51.591.543.42

Структурные перестройки и проницаемость для воды мембран эритроцитов зимнеспящих сусликов *Citellus undulatus*

Н. В. РЕПИН, Т. П. ГОВОРУХА, Т. Н. ЮРЧЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Известно, что во время спячки в организме животного практически сохраняется ионный баланс, продолжается утилизация продуктов жизнедеятельности — процессы, происходящие на фоне значительного снижения основного метаболизма и требующие определенного водного обмена. Мы предположили, что для быстрого включения всех систем клетки и организма в целом при переходе из спячки в активное состояние требуются не только структурные перестройки, но и бóльшая проницаемость мембран для воды, чем у гомойотермных организмов.

Исследования проводили на эритроцитах зимнеспящих сусликов *Citellus undulatus*. Время водного диффузионного обмена определяли по двухимпульсной методике Хана, используя релаксометр спинового эха ЯМР, на частоте 15,9 МГц. Ультраструктурное состояние мембран изучали с помощью электронно-микроскопического метода замораживания-скалывания.

Установлено, что при гибернации в отличие от структурных характеристик мембраны, для которых в областях температур 4–8 и 15–20 °С отмечаются выраженные изменения морфологии мембраны, текучести липидов, конформации белков, водная диффузионная проницаемость характеризуется в координатах Аррениуса практически монотонной зависимостью в интервале 6–38 °С. Среднее значение энергии активации водного обмена составляло $24{,}2 \pm 1{,}8$ кДж/моль.

Морфологическое исследование процесса обезвоживания клеток на этапе температурной остановки (–20 ÷ –30 °С) при двухступенчатом замораживании показало, что значение коэффициента проницаемости мембраны для воды, полученное на основании теоретической оценки с учетом экспериментальных значений времени растворения кристаллов внутриклеточного льда и обезвоживания клеток, достаточно хорошо согласуется с данными литературы и равно примерно $0{,}5 \cdot 10^{-13}$ м^3/Н·с для эритроцитов донора и 10^{-13} м^3/Н·с для эритроцитов зимнеспящих сусликов.

Изучение состояния ультраструктуры мембраны эритроцитов с помощью метода замораживания-скалывания позволило установить ряд отличий в морфологии эритроцитов гибернирующего животного.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043: 577.23: 599: 547.422

Сравнительная оценка влияния температуры среды на температурный гомеостаз млекопитающих при действии полигликолевых эфиров

В. К. МАЗАЛОВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Для разработки мер фармакологической защиты организма млекопитающих от переохлаждения, вызванного иммерсионным охлаждением, необходимы сведения о взаимосвязи объективных показателей теплового состояния организма в термонейтральной среде при введении изучаемого вещества и при его охлаждении.

Цель данной работы — изучение влияния этиленгликоля, диэтиленгликоля, триэтиленгликоля, ПЭО-400, 1000, 1500, 2000 на терморегуляцию крыс в термонейтральной среде и при охлаждении. Опыты проводили на крысах-самцах весом 195 ± 5 г. В ходе эксперимента регистрировали температуру в прямой кишке, мышцах, коже, головном мозге. В группе животных измеряли температуру печени, сердца, артериальной и венозной крови. Регистрировали интегральную кривую электрической активности мышц спины. Вещества вводили внутрижелудочно в 15%-й концентрации в дозе 0,2 г/кг массы тела; контрольным животным — эквивалентный объем раствора крахмала. Влияние ряда веществ на температуру крыс и терморегуляторные реакции изучали при температуре 21–22; 3; 0,5 °С.

Результаты экспериментов показали, что температурные воздействия приводят к резкой электрической активности мышц и падению ректальной температуры до 17,9 ± 0,6 °С в течение 5 мин, при этом установлено достоверное отсутствие различий в электрической активности мышц спины при воздействии температуры 3 и 0,5 °С. Введение веществ не вызывает повышения ректальной температуры тела в термонейтральной среде, но повышает ее значение по сравнению с контролем при холодовом воздействии. Так, скорость понижения температуры в течение 5 мин охлаждения от 3,7 (в контроле) замедляется до 1,6–0,08 °С/мин в зависимости от вводимого вещества.

Предпринята попытка проанализировать взаимосвязь некоторых физико-химических (молекулярная масса, число гидратации, коэффициент распределения, поверхностная активность, вязкость) характеристик соединений с состоянием температурного гомеостаза организма при его охлаждении. Результаты корреляционного анализа полученных данных показали, что скорость охлаждения не коррелирует с числом гидратации. С остальными рассмотренными свойствами веществ наблюдается достоверная (при $p < 0,05$) корреляция.

Таким образом, установлено, что эффективность веществ на фоне холодового воздействия в основном обусловлена их гидрофобностью с коэффициентом распределения в системе вода–октанол от 2 до 4 и высоким значением вязкости.

УДК 547.42: 612.592: 577.352.2

Влияние криопротекторов и низких температур на структурное состояние модельных фосфолипидных мембран

Е. А. ДОМАНОВ, Г. П. ГОРБЕНКО, Т. С. ДЮБКО

Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Несмотря на значительный прогресс в понимании механизмов действия низких температур на клеточные мембраны, до сих пор остается открытым вопрос о характере модуляции низкотемпературных мембранных эффектов веществами, обладающими криозащитными свойствами, в частности, органическими растворителями. Цель настоящей работы — исследование влияния криопротекторов 1,2-пропиленгликоля (ПГ), глицерина (Гл) и диметилсульфоксида (ДМСО) на структурную организацию модельных фосфолипидных мембран методом индуктивно-резонансного переноса энергии.

Липосомы формировали из яичного фосфатидилхолина холат-диализным методом. В качестве донора и акцептора энергии использовали флуоресцентные зонды *n*-терфенил и пирен, локализующиеся в неполярной области мембраны. Полученные экспериментальные данные были проанализированы в рамках модели, описывающей перенос энергии между донорами и акцепторами, равномерно распределенными в мембранном слое определенной толщины d_m. В данном случае относительный квантовый выход донора определяется соотношениями:

Матеріал, захищений авторським правом

$$Q_r = \frac{Q_{DA}}{Q_D} = \frac{2}{d_m} \int_0^{1/2 d_m} \int_0^{\infty} \exp(-\lambda)[I(\lambda)]^N \, d\lambda dd_c ,$$

$$I(\lambda) = \frac{1}{R_d^2 d_m - 1/12 d_m^3 - d_c^2 d_m} \times$$

$$\times \left\{ \int_0^{1/2 d_m - d_c} \exp\left[-\lambda (R_0/R)^6\right] 4R^2 dR + \int_{1/2 d_m - d_c}^{1/2 d_m + d_c} \exp\left[-\lambda (R_0/R)^6\right]\left[2R^2 + R(d_m - 2d_c)\right] dR + \int_{1/2 d_m + d_c}^{R_d} \exp\left[-\lambda (R_0/R)^6\right] 2d_m \, R dR \right\},$$

где Q_D, Q_{DA} – квантовый выход донора при отсутствии и в присутствии акцептора соответственно; $\lambda = t/\tau_D$, τ_D – время жизни флуоресценции донора при отсутствии акцептора; N – число молекул акцептора в шаровом слое, за пределами которого перенос энергии отсутствует, $N = C_A^v V'$, C_A^v – объемная концентрация акцептора; d_c – расстояние донора от центра бислоя.

Как показывает анализ представленных в таблице данных, введение ПГ, Гл и ДМСО приводит к увеличению толщины мембранного слоя, доступного неполярным молекулам *n*-терфенила и пирена. Это может быть обусловлено снижением диэлектрической проницаемости полярной области липидного бислоя вследствие замещения гидратной воды молекулами криопротекторов. Увеличение величины d_m наблюдалось также при замораживании-оттаивании липосом. Введение ДМСО и Гл сопровождалось существенным ослаблением этого эффекта, а в присутствии ПГ значение d_m уменьшалось. Полученные данные свидетельствуют о различном характере влияния исследуемых КП на полярность липидного бислоя.

Относительное изменение толщины слоя, доступного акцепторам, под влиянием криопротекторов (20%) и замораживания-оттаивания, %

Криопротекторы			Замораживание-оттаивание		
ПГ	Гл	ДМСО	ПГ	Гл	ДМСО
29	33	95	−24	48	14

УДК 615.38.013.12: 612.592

Влияние перфторана на некоторые функциональные характеристики спермиев человека при гипотермии

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

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Во вспомогательных репродуктивных технологиях все чаще используют клетки, хранившиеся при гипотермии. Особую актуальность в связи с этим приобретают способы, направленные на повышение функциональной активности отогретых клеток. Использование газотранспортных сред на основе перфторуглеродных эмульсий в биологии и медицине обусловлено, прежде всего, возможностью стимуляции процесса дыхания как основного источника энергии и интегрального показателя жизнеспособности клеток. Наиболее широко применяется в биологических и медицинских целях газотранспортный перфторуглеродный кровезаменитель "Перфторан" (ПФ).

Цель работы – изучение влияния перфторана на функциональные характеристики спермиев человека при гипотермическом хранении. Влияние этого препарата на клетки определяли по фиксированию максимальной подвижности спермиев при варьировании содержания ПФ в суспензии. В связи с полученными нами данными можно сделать вывод, что эффективной рабочей концентрацией ПФ в суспензии спермиев следует считать 40% по объему.

Наблюдение за характером и продолжительностью движения клеток после гипотермического хранения позволило установить, что через 24 ч в контроле все клетки были неподвижны. В суспензии, которая содержала ПФ в выбранной концентрации, наблюдались единичные подвижные спермии на фоне большого числа местно качающихся клеток. Для активации остановившихся клеток нами использовался пентоксифиллин, который широко применяется во вспомогательных репродуктивных технологиях на этапах подготовки спермы к искусственной инсеминации. Добавление в среду 3,5 мМ пентоксифиллина приводило к активации подвижности спермиев только в эякулятах, содержащих

Матеріал, захищений авторським правом

ПФ. Клетки в контрольной суспензии при этом же воздействии оставались неподвижными. Активированные с помощью пентоксифиллина спермии сохраняли высокую подвижность в течение 6 ч, что позволило продлить общее время инкубации до 48 ч. Замена семенной плазмы раствором Хенкса увеличивает переживаемость клеток в контроле до 48 ч. 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 перфторан суспензии клетки увеличили свою подвижность до уровня соответствующего исходной (до начала эксперимента), что позволило зафиксировать полную остановку спермиев только после 102 ч инкубации.

Рассмотренные экспериментальные данные указывают, что воздействие ПФ на подвижность спермиев человека значительно увеличивает переживаемость клеток в суспензии при гипотермии

УДК 547.422

Исследование системы вода–оксиэтилированный ПЭО-1500 методом ДСК

И. Б. МУСАТОВА, А. В. ЗИНЧЕНКО, В. В. ЧЕКАНОВА, Е. Н. БОБРОВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

В криобиологической практике для консервирования эритроцитов используется криопротектор ПЭО-1500, имеющий низкие показатели осмотической устойчивости. Для повышения эффективности криоконсервирования эритроцитов в ИПКиК синтезирован монометиловый эфир ПЭО-1500 (с химической формулой $CH_3O(CH_2CH_2O)_{35}H$), который по сравнению с ПЭО-1500 имеет более высокие показатели осмотической устойчивости. Исходным веществом для синтеза является метиловый эфир этиленгликоля – метилцеллозольв ($CH_3OCH_2CH_2OH$). Оксиэтилированный метилцеллозольв (ОЭ МЦ 1500) получают реакцией β-оксиалкилирования:

$$CH_3OCH_2CH_2OH + CH_2\text{–}CH_2 \rightarrow CH_3O(CH_2CH_2O)_nH$$
$$\qquad\qquad\qquad\quad \backslash\ /$$
$$\qquad\qquad\qquad\quad O$$

В спектре ^{1}H-ЯМР оксиэтилированного продукта имеются следующие сигналы с химическими сдвигами (в миллионных долях) относительно внешнего эталона тетраметилсилана:

1) $\delta = 1{,}83$. Этот сигнал отсутствует в спектре ^{1}H-ЯМР ПЭО-1500 и соответствует метильной группе ОЭ МЦ 1500;

2) $\delta = 3{,}89$ – сигнал гидроксильной группы;

3) $\delta = 3{,}55$ – сигнал OCH_2 ОЭ МЦ 1500.

Методом ДСК установлены закономерности образования стеклообразных форм, кристаллизации из переохлажденного состояния, плавления бинарной системы H_2O–ОЭ МЦ 1500. Режимы охлаждения выбраны такими, при которых полная кристаллизация не происходит и метастабильные состояния обнаруживаются при медленном нагреве. Средняя скорость охлаждения образца 200 °С/мин, нагрева – 0,5 °С/мин. Образцы помещали в предварительно охлажденный до –150 °С калориметрический блок и регистрировали термограммы при нагреве с указанной выше скоростью. На термограммах обнаружены следующие особенности:

1) скачок теплопоглощения соответствует переходу части вещества из переохлажденного жидкого состояния в твердофазное (стеклование при охлаждении и расстеклование при нагреве);

2) экзотермические пики соответствуют процессам неравновесной кристаллизации льда из переохлажденного состояния в области средних концентраций, а также полиморфной модификации ОЭ МЦ 1500 в области высоких концентраций;

3) широкий экзотермический пик завершения кристаллизации льда при нагреве в образцах с высоким содержанием воды;

4) эндотермический пик соответствует полному плавлению образца.

На основании термограмм построены и проанализированы диаграммы фазовых и физических состояний системы H_2O–ОЭ МЦ 1500.

Проведенные исследования свидетельствуют о том, что система H_2O–ОЭ МЦ 1500 при низких температурах более метастабильна по сравнению с системой H_2O–ПЭО-1500.

По нашему мнению, более высокая метастабильность системы H_2O–ОЭ МЦ 1500 связана с коллективными взаимодействиями в растворе, приводящими к тому, что движение одного центра затрагивает и другие центры в большей степени, чем в водных растворах ПЭО-1500.

Матеріал, захищений авторським правом

Секция 2
СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ КЛЕТОЧНОЙ И ТКАНЕВОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ

УДК 616-089.843: 612.119: 612.419(477)

Проблеми трансплантації стовбурових кровотворних клітин в Україні

В. Г. БЕБЕШКО, Ж. М. МІНЧЕНКО, Г. Т. ГЛУХЕНЬКА, Н. М. ЦВЄТКОВА, І. А. КРЯЧОК, Є. Є. КАРАМАНЕШТ, Н. М. БІЛЬКО, В. І. ХОМЕНКО, І. С. КОРЕНЬКОВА, В. Г. ЧУЙСЬКИЙ, Т. А. КАЛИНИЧЕНКО, О. В. КУЧЕР, О. Л. НАУМЕНКО

Науковий центр радіаційної медицини АМН України, м. Київ
Центр трансплантації кісткового мозку ГУОЗ, м. Київ

Кожного року в Україні на лейкемії та лімфоми захворює близько 7 500 осіб. Останні роки відмічається зростання захворюваності на онкогематологічну патологію, що зумовлює необхідність впровадження нових методів терапії, в тому числі трансплантації стовбурових гемопоетичних клітин (ТСГК). Першим в Україні закладом з сучасним спеціальним обладнанням і фахівцями, підготовленими для роботи згідно зі світовими методологічними вимогами, є Київський центр трансплантації кісткового мозку, відкритий на базі Наукового центру радіаційної медицини АМН України у квітні 2000 року.

Центр здійснює аутологічні трансплантації стовбурової клітини периферичної крові (СКПК) при мієломній хворобі, лімфогранулематозі, лімфомах, раці молочної залози та ін. Розроблено принципи підготовки до трансплантації СКПК у дорослих і дітей з хворобами кровотворних органів, обгрунтовано протоколи ведення хворих у передтрансплантаційному періоді, методи профілактики і лікування посттрансплантаційних ускладнень, а також започатковано систему імуногенетичного моніторингу донорів-реципієнтів для алогенної та аутологічної ТСГК. Впроваджено в практику протоколи лікування хворих на онкогематологічну патологію із застосуванням високодозової консолідації та послідовною трансплантацією аутологічних СГК. Щомісячно у центрі проводиться 3–4 ТСКПК хворим із зазначеною патологією.

Аутологічні СКПК отримують за допомогою аферезної системи COBE Spectra (2–3 сеанси) після стимуляції гемопоезу хворого гранулоцитарним колонієстимулюючим фактором (Г-КСФ) у дозі 5–10 мкг/кг протягом 5–7 діб. Кількість отриманих мононуклеарних клітин коливається у межах $3{,}0–10{,}3 \cdot 10^8$/кг маси хворого. Вміст CD34+ клітин вимірюється у продукті стовбурових кровотворних клітин, проводиться 1–4 аферезів до отримання загальної кількості CD34+ клітин не менш, ніж $2 \cdot 10^6$/кг маси хворого. При аутологічній ТСГК отриманий матеріал потребує подальшого тривалого зберігання. Велику перевагу у вирішенні цієї проблеми має системне програмне кріоконсервування клітин у фризері Nicool Plus (7 версія), досвід застосування якого в Україні є унікальним. Контроль біологічної повноцінності клітин і програми заморожування проводиться при розморожуванні сателітних зразків із клітинною суспензією трансплантату. Термін зберігання СГК 21–48 днів. Результати порівняльної оцінки таких показників, як життєспроможність клітин при фарбуванні 0,1%-м розчином трипанового синього (92–97%), абсолютна кількість отриманих клітин і вміст мононуклеарів ($4–10 \cdot 10^8$/кг маси), вміст CD34+ клітин у трансплантаті ($2–6 \cdot 10^6$/кг), кількість ГМ-колонієформуючих одиниць *in vitro* або *in vivo* до заморожування та після розморожування ($10–22 \cdot 10^4$/кг маси), показали, що програмне кріоконсервування під захистом 7,5–8,0%-го ДМСО забезпечує адекватне збереження якості трансплантату СГК та проліферативної активності стовбурових клітин. Клінічним підтвердженням цього факту було приживлення трансплантату у всіх хворих на 11–13-й день після аутологічної ТСГК. Таким чином, в Україні існує повноцінна матеріально-технічна база для проведення трансплантації СГК з потужністю 30–50 трансплатацій на рік. Основною проблемою залишається необхідність системного вдосконалення діагностичної та терапевтичної бази гематологічної та онкологічної служб, що підвищить ефективність лікування зазначених хворих із застосуванням методу трансплантації СГК.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 616-089.843.611-013.83: 617.713

Трансплантация амниотической мембраны у больных с патологией роговицы

Г. И. ДРОЖЖИНА, В. И. СТРОНА, Т. Б. ГАЙДАМАКА, В. Л. ОСТАШЕВСКИЙ

Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В. П. Филатова АМН Украины, г. Одесса

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Амниотическая мембрана (АМ) – тонкая эластичная ткань, которая состоит из слоя коллагеновых волокон, базальной мембраны, покрытой одним слоем эпителиальных клеток. Установлено, что базальная мембрана, входящая в состав амниона, способствует миграции клеток эпителия, их дифференцировке, усиливает их адгезию, что приводит к быстрой эпителизации роговицы. Кроме этого, стромальная часть АМ содержит супрессоры различных тканевых факторов роста, которые препятствуют васкуляризации роговицы и образованию субэпителиального фиброза и грубого рубца.

Мы применили АМ человека для покрытия роговицы у 5 больных: 2-х больных с болевой формой вторичной эндотелиально-эпителиальной дистрофией роговицы, 1-го больного для покрытия сквозного трансплантата после расплавления роговицы при ревматоидном артрите, у 2-х пациентов с рецидивирующим птеригиумом, в том числе в одном случае с частичным симблефароном. Заготовка и консервация АМ произведены в ИПКиК НАН Украины. Хранение АМ до операции осуществлялось в жидком азоте при температуре –196 °С. Перед операцией контейнер отогревали при комнатной температуре, затем извлекали АМ и промывали физиологическим раствором. У больных с буллезной кератопатией и ревматоидным артритом АМ использовали для покрытия всей поверхности роговицы, которая предварительно деэпителизировалась, и перилимбальной области. АМ фиксировали эписклерально П-образными и узловатыми швами 10/0, нейлон, монофиламент. У больных с птеригиумом АМ использовали для пластики конъюнктивы и создания барьера, предотвращающего нарастание фиброзной ткани на роговицу. У всех больных постоперационный период протекал ареактивно. У пациентов с буллезной кератопатией АМ постепенно лизировалась в сроки от 2-х недель до 2,5 месяцев. За это время поверхность роговицы полностью эпителизировалась, уменьшался отек стромы. У больной с ревматоидным артритом проявления аутоиммунного воспалительного процесса в глазу были стабилизированы и расплавление роговицы было остановлено. У больных с птеригиумом острота зрения повысилась до 0,5–0,6, поверхность роговицы эпителизировалась.

Таким образом, криоконсервированная амниотическая оболочка, использованная в качестве покрытия роговицы, дает хороший эффект, позволяет устранить болевой синдром, купировать воспаление и улучшить условия для регенерации роговой оболочки.

УДК 615.361.014.41

Криобиологические технологии получения ряда препаратов из ксеногенного сырья

Б. П. САНДОМИРСКИЙ, С. Е. ГАЛЬЧЕНКО, И. В. БЕЛОЧКИНА, А. В. МАМОНТОВА, Е. С. ГАЛЬЧЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Широкое применение в клинической практике находят методы лечения, основанные на использовании клеток и тканей ксеноорганов или полученных из них препаратов. Одним из основных требований к применяемым клеткам и тканям является их жизнеспособность в момент использования. Этого можно достичь путем криоконсервирования биологического материала.

Нами было изучено влияние различных режимов криоконсервирования на сохранность фрагментов селезенки свиней и входящих в их состав спленоцитов, а также островковой ткани поджелудочной железы новорожденных поросят. Максимальная сохранность биоматериала из селезенки наблюдается при использовании в качестве криопротекторов ПЭО-400 и ПЭО-1500 в 20%-й концентрации и замораживании материала с медленными скоростями охлаждения. Высокая сохранность островковой ткани, которая применяется в схемах лечения сахарного диабета и его осложнений, отмечена при ее криоконсервировании в присутствии 20% ПЭО-1500.

Матеріал, захищений авторським правом

Было изучено также влияние долгосрочного хранения биологического материала в низкотемпературном банке на его сохранность. Показано, что в зависимости от режима криоконсервирования сохранность материала может оставаться или неизменной, или снижаться в процессе хранения. Максимальный срок хранения — 10 лет.

Разработан метод получения препарата из криоконсервированных фрагментов селезенки свиней. Препарат содержит спектр биологически активных веществ, включающий низкомолекулярные пептиды, нуклеотиды, аминокислоты и т.д. Применение препарата способствует нормализации клеточного и гуморального иммунитета при воспалительных и инфекционных заболеваниях, оптимизации энергетических и обменных процессов в клетках, снижает интенсивность перекисных процессов в организме. В связи с этим данный препарат может найти широкое применение при лечении иммунодефицитных состояний различного генеза и воспалительных заболеваний.

Перспективным также представляется изготовление пищевой добавки из лиофилизированного молозива коров, обладающего уникальным набором пищевых и биологически активных веществ. В связи с этим нами были определены предельные сроки хранения молозива коров в нативном, замороженном и лиофилизированном виде. Показано, что лактоферрин, входящий в его состав, обладает антиоксидантным действием и хелаторными свойствами в отношении железа, эти качества сохраняются после лиофилизации молозива и на протяжении 1 года при хранении сухого молозива в бытовом холодильнике. Предполагается, что лиофилизированное молозиво может оказывать положительное влияние при состояниях, характеризующихся активацией перекисных процессов в организме.

Таким образом, криобиологические технологии создания препаратов из ксеногенного сырья являются высокоэффективными и позволяют создать запас материала для применения в клинической практике.

УДК 615.361.018.014.41

Опыт применения клеточно-тканевой терапии в практике аллерголого-иммунологического центра

И. Н. МЕЛЕЩЕНКО, Л. Л. ТЕРЕЩЕНКО, Т. Н. КУЗЮБЕРДИНА, А. В. ИВАНИЦКИЙ

Аллерголого-иммунологический центр, г. Луганск

Цель исследования — применение клеточно-тканевой терапии при лечении больных с вторичными иммунодефицитами. Обследовано 15 больных в возрасте от 5 до 47 лет. Больные разделены на 3 группы.

1. Дети 5–17 лет, больные бронхиальной астмой (4 чел.). Приступы бронхиальной астмы отмечались 5–6 раз в день, купировались внутривенно введением эуфиллина и бета-агонистами короткого действия. Традиционные схемы лечения не давали стабильной длительной ремиссии.

2. Больные (4 чел.) с диагнозом гепатит С, гепатит В с хроническим течением. Диагноз подтверждали исследованием серологических маркеров вирусов гепатита В и С с помощью методов ИФА и ПЦР.

3. Больные с хроническими трихомонадными и хламидиозными простатитами (7 чел.) находились на лечении более 10 лет и подвергались длительной терапии. Диагнозы подтверждали методом ПЦР, изучением титров хламидий IgG методом ИФА, спермограммой.

У больных всех групп исследовали показатели клеточного (Т- и В-лимфоциты, Т-хелперы, Т-супрессоры, ИРИ, NK-клетки) и гуморального (иммуноглобулины G, A, M) иммунитета.

У части больных отмечалось иммунодефицитное состояние по гиперсупрессорному типу (ИРИ 1,1); в 2-х случаях — иммунодефицит по гиперсупрессорному типу (ИРИ 2,2).

Биохимические исследования проводили общепринятыми методами. Для лечения больных этих групп использовали: экстракт криоконсервированной плаценты, гемомопоэтическую клетку, фрагмент криоконсервированной плаценты, криоконсервированную ткань тимуса.

Применение этих препаратов привело к более быстрой нормализации общего состояния больных, клиническому их выздоровлению. У детей с бронхиальной астмой отмечалось резкое уменьшение количества приступов до 2–3 раз в неделю, приступы легко купировались без бета-агонистов. У больных с гепатитами исчезли в крови RNA-HCV и DNA-HBV, снизился уровень антител, нормализовалась активность АлТ. Пациенты с хроническими простатитами отмечали исчезновение болей и дискомфорта в половых органах, повышение либидо.

При повторных исследованиях иммунограмм у всех пациентов отмечена нормализация показателей, что свидетельствует о хорошем иммуномодулирующем эффекте клеточно-тканевой терапии.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 615.361.014.41: 611.018.82: 616.858.8-009.12

Применение криоконсервированных нервных стволовых клеток для коррекции дисфункции дофаминергических структур у больных болезнью Паркинсона и лечения больных с другими формами экстрапирамидных гиперкинезов

В. И. СИПИТЫЙ, В. А. ПЯТИКОП, И. А. КУТОВОЙ, А. Ю. ПЕТРЕНКО

Харьковский государственный медицинский университет

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Дегенеративные изменения в дофаминергических структурах мозга, главным образом в черной субстанции, приводят к дефициту дофамина в организме и развитию симптомов, характерных для болезни Паркинсона (БП): скованность, дрожание конечностей, брадикинезия, нарушение речи и т.д. В тяжелых случаях заболевания дефицит дофамина в полосатом теле достигает 80–90%.

Начиная с 1982 года, в лечении БП успешно применяют нервную ткань, полученную из эмбрионов и плодов человека различных сроков гестации (Bauckland, 1982). С 1995 года в нейрохирургической клинике ХГМУ используют криоконсервированную первичную суспензию нервных клеток эмбриона человека (НКЭ), полученную из эмбрионов человека 7–12 недель гестации. В качестве криопротектора используется 5%-й раствор диметилсульфоксида, замораживание проводится по 3-этапной программе до –196 °С. Все образцы подвергаются вирусологическому и бактериологическому тестированию. Технология замораживания разработана в ИПКиК НАН Украины.

До 1998 года проводилось комбинированное лечение БП, которое включало криодеструкцию вентролатерального ядра зрительного бугра и последующую нейротрансплантацию в субталамическую область (21 больной).

Начиная с 1998 года, всем больным БП проводили изолированную нейротрансплантацию с имплантацией кварцевого моноволокна для последующего лазерного воздействия.

Цель работы – оценка ближайших и отдаленных результатов изолированной трансплантации НКЭ у больных БП и другими видами экстрапирамидных гиперкинезов (ЭГ).

Под наблюдением находились 19 больных БП в возрасте от 43 до 74 лет. Все больные наблюдались от 6 мес до 3 лет. По форме болезни распределение было следующим: ригидная – 3, дрожательная – 6, смешанная – 10. Всем больным нейротрансплантацию проводили стереотаксически под контролем компьютерного томографа CT-MAX фирмы "General E1ectric", в субталамическую область над черной субстанцией. Эффективность от нейротрансплантации оценивали следующим образом: отличный – больной не принимает дофаминсодержащие препараты после операции; хороший – доза препарата стала меньше половины предоперационной дозы; удовлетворительный – доза препарата соответствует предоперационной, но сопровождается снижением тремора или нормализацией мышечного тонуса. Кроме того, под наблюдением находились 12 больных с такими видами ЭГ: торсионная мышечная дистония – 5; хореоформные гиперкинезы – 4; атетозы, которым была произведена изолированная нейротрансплантация НКЭ в различные отделы неостриатума, – 3.

Спустя 6 мес после трансплантации в группе больных БП результаты следующие: у 4 больных (20%) – отличный, у 9 (50%) – хороший, у 6 (30%) – удовлетворительный. Через 1 год после операции эффект у 5 больных (26,3%) был отличный, у 11 (57,9%) – хороший, а у 3 (15,8%) – удовлетворительный, спустя 2 года у 3 (15,8%) – отличный, у 9 (47,4%) – хороший, у 7 (36,8%) – удовлетворительный. Через 3 года хороший результат отмечен у 7 больных (36,8%) и удовлетворительный – у 12 (63,2%).

Наиболее выраженная эффективность трансплантации отмечена у больных, страдающих дрожательной формой БП. Следует отметить, что у 8 больных со смешанной формой и у всех больных с дрожательной формой тремор полностью или частично исчез сразу после нейротрансплантации. Возможно, это связано с механическим воздействием на субталамическую область во время трансплантации. В группе больных с ЭГ, как и у больных БП, отмечается положительный клинический эффект в ближайший и отдаленный период после операции в виде нормализации тонуса мышц и отсутствия или значительного уменьшения насильственных движений головы и конечностей. Клинические данные подтверждены сравнительной оценкой электромиографии.

Таким образом, применение НКЭ у больных БП и ЭГ является высокоэффективным и может быть рекомендовано для более широкого использования в клинической практике.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 611.013: 616.047

Обоснование и практические результаты применения эмбриональных препаратов в клинической практике

Г. С. ЛОБЫНЦЕВА, И. А. ВОТЯКОВА, Е. М. КЛИМОВА

Медицинский центр клеточной и тканевой терапии "Эмбриотек", г. Киев

Институт общей и неотложной хирургии АМН, г. Харьков

Применение эмбриональных препаратов в медицинской практике имеет серьезные теоретические предпосылки, обусловленные наличием в эмбриональных тканях эмбриоспецифических ростовых факторов, цитокинов и большого количества сигнальных макромолекул, которые в эмбриогенезе выполняют роль индукторов ростовых и регенерационных процессов. В эмбриональных препаратах содержатся стадиоспецифические белки и низкомолекулярные пептиды, в том числе α-фетопротеин, изменяющие интенсивность апоптоза; антиоксиданты, адаптогены, противовоспалительные бактериостатические соединения, интерлейкины, стимулирующие иммуногенез. Этими свойствами клеток объясняется их высокая эффективность при лечении септических состояний в хирургической и гинекологической практике.

Особого внимания заслуживают мощные иммунокоррегирующий и иммуномодулирующий эффекты, которые были обнаружены при трансплантации эмбриональных кроветворных клеток (ЭКК) и препаратов фетоплацентарного комплекса, что позволяет использовать их при лечении заболеваний, связанных с нарушениями гемопоэза, в том числе с аутоиммунным компонентом и иммунодефицитом (диабет, болезнь Паркинсона, миастения и миопатия, боковой амиотрофический склероз и многие другие).

Механизм лечебного действия кроветворных клеток связан с торможением аутоиммунных процессов на основе восстановления иммунорегуляции, с активацией инсулинподобных факторов регуляции углеводного и липидного обмена, с общей стимуляцией синтеза белков, восстановлением рецепторной инициации иммунокомпетентных клеток, а также обменных процессов в организме. Введенные во взрослый организм эмбриональные кроветворные клетки ранних сроков гестации (до 12 недель) приживляются в нем, сохраняют способность к репопуляции, не обладают иммуногенными свойствами, не отторгаются и не вызывают болезни реакции "трансплантат против хозяина". Это было доказано на примере больных детей с врожденными иммунодефицитами, когда донорские клетки образуют полноценную популяцию зрелых лимфоцитов, создавая в организме "химеризм", при котором наряду с поврежденными лимфоцитами функционируют нормальные клетки и признаки иммунодефицита исчезают полностью. Срок наблюдения за такими детьми более 15 лет.

Особого внимания заслуживает группа онкологических больных, у которых после введения ЭКК на протяжении всего курса химиотерапии не утрачивается работоспособность, сохраняются хорошее самочувствие и желание продолжить лечение. Это позволяет проводить агрессивную химиотерапию при метастатическом поражении органов. Курсовую дозу 5-фторурацила удалось увеличить многократно без значительных побочных эффектов. Показатели крови (количество эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов) остаются в пределах, допускающих проведение лечения. Изучение ожидаемого выживания по методу Kaplan–Meiera показало отчетливую позитивную тенденцию. Таким образом, наряду с восстановлением гемопоэза, стимуляцией противоопухолевого иммунитета и прямым противоопухолевым действием, эмбриональные гемопоэтические клетки могут значительно снизить побочное действие химиотерапии и усилить ее эффективность.

Было установлено, что репопуляционная активность ЭКК на 2–3 порядка выше клеток взрослого костного мозга. Эти свойства особенно наглядно просматриваются при врожденной и приобретенной апластической анемии у детей, восстановление гемопоэза у которых при обычной схеме лечения и благоприятном стечении обстоятельств может произойти через 10–12 мес, при введении ЭКК – через 45 дней с длительной ремиссией (до 10 лет).

При трансфузии больным с циррозами печени эмбриональный препарат оказывает положительное действие: происходят коррекция метаболических нарушений и снижение аутоиммунной агрессии, опосредованной селезенкой. Более выраженный клинический эффект наблюдается при введении препарата внутривенно и непосредственно в поврежденный орган.

Отсутствие методов криоконсервирования органов ограничивает возможности трансплантологии, а количество больных, нуждающихся в трансплантации почки, печени, сердца, увеличивается с каждым годом. Преимущества пересадки клеток этих органов очевидны, так как создать низкотемпературные банки эмбриональных соматических клеток гораздо проще и дешевле. Кроме того, клетки в эмбриональный период лишены примесей ретикулоэндотелиальной ткани, что устранит многие проблемы иммунологического плана.

Таким образом, имеющийся у нас 15-летний опыт применения криоконсервированных эмбриональных клеток и тканей в клинической практике с глубоким анализом клинических и лабораторных данных позволяет сделать вывод, что эти препараты являются уникальным биологическим материалом, который может быть использован при очень широком спектре заболеваний.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 615.361.014.41: 611.013: 577.1

Изучение биохимического состава криоконсервированных препаратов эмбриональных тканей человека

А. Н. СУКАЧ, А. Ю. СЕМЕНЧЕНКО, А. Ю. ПЕТРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

В последнее время в клинической медицине широко используются криоконсервированные клеточные препараты, полученные из эмбриональных тканей человека. В связи с этим актуальным является изучение биохимического состава этих препаратов, который связан с эффективностью их действия.

Исследования проводились на деконсервированных препаратах клеток печени, мозга и цитозоля мягких тканей эмбрионов человека 6–12 недель гестации. В препаратах изучались гормональный состав, а также состав липидов и полипептидов.

Было обнаружено, что все фетальные препараты характеризуются наличием пептидных фракций с молекулярной массой (м.м.) в диапазоне от 5,4 до 3,1 кД. Однако количество этих фракций у разных препаратов различно. Экстракт эмбриональных тканей человека характеризуется пептидными фракциями с м.м. 3,1 и 3,9 кД, суммарное количество которых составляет 40% всех пептидных фракций. Супернатант эмбриональных гемопоэтических клеток характеризовался большим количеством пептидов с м.м. 3,1 и 6,7 кД, содержание которых составляло 9,4 и 6,2% соответственно. Эмбриональные нейроклетки отличались высоким содержанием фракций с м.м. 3,7 (4,2%) и 5,1 кД (9,5%).

Анализ белкового спектра препаратов с помощью электрофореза показал, что эмбриональные гемо- и нейроклетки характеризовались наличием 20 белковых спектров, а их супернатанты и экстракт эмбриональных тканей насчитывали 14 полос.

Экстракты липидов получали из суспензий эмбриональных нейроклеток и эмбриональных гемопоэтических клеток и затем разделяли методом тонкослойной хроматографии. По содержанию нейтральных липидов препараты мало отличались и включали следующие классы липидов: моноглицериды, холестерин, диглицериды, свободные жирные кислоты, триглицериды, эфиры холестерина. В эмбриональных гемопоэтических клетках и эмбриональных нейроклетках были обнаружены основные классы фосфолипидов, характерные для этих тканей у взрослых особей: фосфатидилхолин, лизофосфатидилхолин, фосфатидилинозитол и фосфатидилсерин. Нейроклетки содержали цереброзиды – фосфолипиды, характерные для этой ткани.

Исследования половых гормонов (пролактина, эстрадиола, прогестерона и хорионического гонадотропина) показали, что препараты эмбрионального происхождения характеризуются низким содержанием пролактина и высоким эстрадиола. Липидный состав клеток печени, мозга и цитозоля, полученных из эмбриональных тканей, практически не отличается от такового взрослых тканей. Отличительными признаками исследуемых препаратов являются их пептидный и белковый спектры, качественное и количественное исследование которых даст возможность выяснить механизмы терапевтического действия эмбриональных препаратов, а также послужит основой стандартизации препаратов фетоплацентарного комплекса.

УДК 615.361.36.013.014.413: 57.085.1

Функция криоконсервированных клеток эмбриональной печени человека в системе *in vitro* и при экспериментальной трансплантации

А. Ю. ПЕТРЕНКО, О. И. ОЧЕНАШКО, Н. Н. МОИСЕЕВА, Н. Г. СКОРОБОГАТОВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Клетки эмбриональной печени (КЭП) человека из-за высокого содержания стволовых клеток могут найти широкое применение в клинике для лечения гематологических и гепатологических заболеваний. Для оценки клинической эффективности КЭП необходимо разработать метод их криоконсервирования, создать низкотемпературный банк и определить жизнеспособность и функциональную активность деконсервированных суспензий.

Целью работы было изучение жизнеспособности, колониеобразующей активности свежевыделенных и криоконсервированных КЭП человека, а также влияние их трансплантации на показатели гемопоэза, интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) и состояние печени крыс с острой печеночной недостаточностью. КЭП выделяли из эмбрионов человека 7–12 недель гестации. Криоконсервирование проводили под защитой ДМСО с

Матеріал, захищений авторським правом

использованием трехэтапной программы замораживания и хранили в низкотемпературном банке при –196 °С не менее 1 месяца. До и после криоконсервирования определяли количество клеток в суспензии, их жизнеспособность (окрашиванием витальными красителями), колониеобразующую активность. Подсчет колониеобразующих единиц (КОЕ) и кластерообразующих единиц (КлОЕ) проводили на 10-е сутки культивирования в полутвердых средах на фидерном слое, содержащем лейкоциты взрослых доноров. Деконсервированную суспензию КЭП ($1 \cdot 10^7$ клеток) трансплантировали в пульпу селезенки крысам весом 180–200 г с острой печеночной недостаточностью, моделированную или 70%-й гепатэктомией или острым отравлением четыреххлористым углеродом. Определяли состояние крови, детоксикационную функцию печени, уровень перекисных процессов в сыворотке крови, а также скорость регенерации печени по включению ^{3}Н-тимидина в ДНК.

Свежевыделенная первичная суспензия КЭП характеризовалась высокой жизнеспособностью и пролиферативной активностью, оцененной по включению ^{3}Н-тимидина в ДНК. Криоконсервирование снижало жизнеспособность на 15–20%, но не влияло на колониеобразующую активность. Трансплантация КЭП человека экспериментальным животным приводила к стимуляции регенерации печени после частичной гепатэктомии, что сопровождалось быстрым восстановлением ее детоксикационной и синтетической функций. Трансплантация криоконсервированных КЭП крысам с патологиями печени, вызывающими или угнетение, или индукцию перекисных процессов, снижала уровень продуктов ПОЛ, что свидетельствует об антиоксидантном действии введенных клеток. Исследование содержания эритроцитов и гемоглобина показало быстрое восстановление гемопоэза после острой кровопотери.

Таким образом, криоконсервированные КЭП человека 7–12 недель гестации характеризуются высокой жизнеспособностью и колониеобразующей активностью, оказывают антиоксидантный эффект, стимулируют регенерацию печени и гемопоэз при трансплантации животным с острой печеночной недостаточностью и патологией системы кроветворения.

УДК 57.043: 611.36.018.1: 616-089.843

Влияние гипотермического хранения изолированных гепатоцитов на эффективность трансплантации гепатэктомированным крысам

Н. Н. МОИСЕЕВА, А. Ю. ПЕТРЕНКО, Л. П. КРАВЧЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Трансплантация изолированных гепатоцитов является альтернативой трансплантации при острой печеночной недостаточности. Клиническое применение гепатоцитов требует создания достаточного запаса жизнеспособных клеток. В настоящее время наиболее простой способ их хранения – гипотермический.

Цель работы – изучение детоксикационной функции и состояния системы гемопоэза у гепатэктомированных крыс после аллогенной трансплантации гепатоцитов, подвергнутых гипотермическому хранению в течение 24 и 48 ч.

Крысам с 70%-й гепатэктомией в пульпу селезенки вводили $1 \cdot 10^7$ свежевыделенных гепатоцитов или гепатоцитов после 24- и 48-часового гипотермического хранения в сахарозосодержащей среде при температуре 4 °С. Жизнеспособность гепатоцитов перед трансплантацией оценивали методом окрашивания трипановым синим. Детоксикационная функция печени оценивалась по продолжительности медикаментозного сна после введения ксенобиотика (гексенала) и уровню билирубина. О состоянии системы гемопоэза судили по количеству эритроцитов и лейкоцитов в периферической крови экспериментальных животных. Показателем белок-синтезирующей функции печени было содержание альбумина в сыворотке крови.

Жизнеспособность свежевыделенных гепатоцитов составляла 85%, после 24-часового гипотермического хранения – 80%, а после 48-часового – 60%. Проведенные исследования показали, что частичная гепатэктомия приводила к 3-кратному увеличению гексеналового сна, продолжительность которого сохранялась в течение 3-х суток. Трансплантация свежевыделенных гепатоциов и гепатоцитов после гипотермического хранения способствовала нормализации гексеналового сна уже на 1-е сутки. Гепатэктомия приводила к постепенному снижению концентрации общего билирубина в течение 3-х суток. Трансплантация свежевыделенных гепатоцитов и гепатоцитов после 24-часовой гипотермии вызывала нормализацию уровня билирубина на 2-е сутки, а после 48-часового гипотермического хранения этот показатель восстанавливался только на 3-и сутки. После гепатэктомии в крови экспериментальных животных наблюдалось увеличение количества лейкоцитов и снижение эритроцитов. Трансплантация свежевыделенных гепато-

Матеріал, захищений авторським правом

цитов и гепатоцитов после гипотермического хранения способствовала снижению концентрации лейкоцитов и не оказывала влияния на количество эритроцитов. Содержание альбумина в сыворотке крови не изменялось ни после гепатэктомии, ни после трансплантации клеток.

Проведенные исследования свидетельствуют о том, что трансплантация свежевыделенных гепатоцитов и гепатоцитов после 24- и 48-часовой гипотермии приводила к стимуляции детоксикационной функции печени крыс после частичной гепатэктомии, снижению содержания лейкоцитов и не влияла на количество эритроцитов и содержание альбумина в крови.

УДК 57.015.1.043: 615.361

Исследование стероидогенной активности криоконсервированной органной культуры надпочечников при ксенотрансплантации

Т. П. БОНДАРЕНКО, Г. А. БОЖОК, Н. М. АЛАБЕДАЛЬКАРИМ, А. В. ГЕРАЩЕНКО, И. И. САМЧЕНКО, Е. И. ЛЕГАЧ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Широкое использование в клинической практике глюкокортикоидных гормонов при лечении таких заболеваний, как бронхиальная астма, коллагенозы, неспецифические полиартриты, заболевания крови и другие, приводит к развитию у значительной части больных вторичной надпочечниковой недостаточности (гипокортицизма), формированию гормонорезистентности и гормонозависимости вследствие атрофии собственных надпочечников. Одним из перспективных способов лечения гипокортицизма является трансплантация культуры тканей и клеток надпочечников, которые функционируют в организме реципиента как гормональное депо, подчиняющееся нейроэндокринной регуляции. Таким образом, изучение факторов, влияющих на приживляемость культивированных надпочечниковых ксенотрансплантатов, позволит объяснить иммунобиологические процессы тканевой и клеточной терапии и разработать методы увеличения сроков функционирования трансплантата для улучшения терапевтических свойств препаратов эндокринных клеток при их клиническом использовании.

Пятидневная органная культура надпочечников новорожденных поросят была получена по методу Тронько (1990 г.). Криоконсервирование культуры осуществлялось под защитой 5%-го ДМСО по методу Легача Е. И., Бондаренко Т. П. (1998 г.). Перед трансплантацией криоконсервированная культура была отогрета при 37 °С, отмыта от ДМСО и инкубирована в среде 199 в течение 48 ч. Для модификации стероидогенной активности образцы органной культуры инкубировали последние 24 ч в среде 199, содержащей 10%-ю эмбриональную телячью сыворотку, различные концентрации колхицина или хлорида кадмия. Гипокортицизм моделировали на 3-месячных крысах линии Вистар путем двухсторонней адреналэктомии. Трансплантацию органной культуры проводили подкожно на 14-е сутки после удаления надпочечников. Все животные были забиты на 14-й или 30-й день после ксенотрансплантации. Уровень кортикостероидов (11-ОКС) измеряли флюориметрическим методом в плазме крови крыс, в гомогенатах культуры и ксенографтов.

Изучение влияния предобработки модифицирующими агентами показало, что колхицин в концентрации 10^{-5} М увеличивает базальную и АКТГ-стимулированную секрецию 11-ОКС органной культурой надпочечников. С повышением концентрации колхицина до 10^{-2} М наблюдается блокирование АКТГ-стимулированной секреции, в то время как базальная секреция достоверно не отличается от контроля. Хлорид кадмия концентрационно зависимым образом угнетает АКТГ-стимулированную секрецию гормонов. Ксенотрансплантация непредобработанной культуры надпочечников адреналэктомированным крысам приводила к достоверному увеличению уровня 11-ОКС в плазме. Причем на 14-й день он составлял 77,5% от контроля, а на 30-й – 99,1%. Ксенотрансплантация культуры, прединкубированной в растворе колхицина (10^{-2} М), не изменяла уровень гормонов в плазме адреналэктомированных крыс, хотя в гомогенате ксенографта, предобработанного колхицином, содержание 11-ОКС на 30-е сутки после ксенотрансплантации не отличалось от значений, характерных для непредобработанной культуры.

Полученные данные свидетельствуют, что трансплантация криоконсервированной органной культуры надпочечников поросят уже на 30-е сутки практически полностью компенсирует глюкокортикоидную недостаточность у адреналэктомированных крыс. Так как колхицин и хлорид кадмия *in vitro* модифицируют гормоносекретирующую способность криоконсервированной культуры, это может быть использовано в дальнейшем для изучения влияния стероидогенной активности культуры на ее выживаемость при ксенотрансплантации.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 616-089.843: 611.018.8: 616.8

Лечение цереброваскулярных и нейродегенеративных заболеваний с применением тканевой и клеточной трансплантации

В. А. ЯВОРСКАЯ, А. В. ГРЕБЕНЮК, Ю. В. ФЛОМИН

Харьковская медицинская академия последипломного образования

Несмотря на значительные успехи, достигнутые медициной в последние десятилетия, проблема разработки эффективной терапии многих неврологических заболеваний далека от оптимального решения. Это заставляет неврологов всего мира постоянно искать новые более совершенные методы лечения своих больных.

В связи с крайне низкой способностью центральной нервной системы к регенерации, т.е. восстановлению структуры, клеточных ансамблей и функциональных связей мозга, пострадавших вследствие травмы или заболевания, особые надежды возлагаются на новое и интенсивно развивающееся направление медицины — трансплантацию. Однако применительно к нервной системе успехи органной трансплантации на сегодняшний день крайне скромны: не существует методик пересадки участков головного или спинного мозга, слишком малодоступны и дороги методики подбора доноров и послеоперационного лечения. Поэтому все возрастающее внимание привлекает к себе альтернативное направление — клеточная и тканевая трансплантация с использованием клеток и тканей эмбриофетоплацентарного комплекса человека. Считается, что наряду с заместительным действием положительное влияние этого метода терапии опосредовано наличием в фетальных тканях разнообразных нейротрофических факторов, контролирующих развитие нервной системы в эмбриональном и раннем постнатальном периодах и участвующих в процессах регенерации в центральной и периферической нервной системе при ее повреждении.

Нами исследованы безопасность и эффективность применения суспензии церебральной ткани плода (СЦТП) при сосудистых и дегенеративных заболеваниях головного мозга. Эти две группы заболеваний объединяет комбинированный патогенетический процесс гибели нейронов по пути некроза и апоптоза, ведущий к формированию морфофункционального дефекта.

Трансплантация СЦТП включалась в комплексное лечение острого периода ишемического инсульта (ИИ), а также подкорковых синдромов (ПС) в структуре болезни Коновалова–Вильсона, дисциркуляторной атеросклеротической энцефалопатии, болезни Паркинсона. Введение 1,5 мл СЦТП производилось путем глубокой в/м инъекции в верхний наружный квадрант ягодицы после предварительной премедикации раствором тавегила 2,0 в/м. Курс лечения, как правило, состоял из 3-х трансплантаций с интервалом 2–3 дня. Кроме тщательного соматоневрологического осмотра, проводились в динамике биохимическое, иммунологическое исследования крови, оценивались ЭЭГ, РЭГ, ТКДСГ.

Наиболее выраженный клинический эффект при ИИ был отмечен у больных с незначительной общемозговой симптоматикой. Он проявлялся в более быстром регрессе неврологического дефицита по сравнению с контрольной группой, лучшем функциональном восстановлении к выписке из стационара. В случае болезни Коновалова–Вильсона у больного М. с дрожательной формой (длительность заболевания 8 лет, инвалидность I группы на протяжении 5 лет), который постоянно принимал поддерживающую дозу купренила, однако из-за выраженного дрожательного гиперкинеза не мог самостоятельно себя обслуживать в быту, было проведено 2 курса трансплантации СЦТП с годичным интервалом между ними. После первого курса уже через 3 дня наблюдалось незначительное уменьшение тремора. Максимальный эффект развился через 6 мес, когда больной смог самостоятельно писать, принимать пищу. После второго курса отмечалось дальнейшее клиническое улучшение.

При ПС сосудистой этиологии после проведенного курса лечения отмечалось уменьшение пластического гипертонуса. Результаты трансплантации во многом зависели от длительности и выраженности заболевания. Все больные указывали на улучшение общего состояния в виде повышения работоспособности, улучшения эмоционального фона.

Таким образом, трансплантация суспензии церебральной ткани плода при ИИ и ПС оказывает как раннее, так и отсроченное положительное влияние на клиническую симптоматику, общее биостимулирующее воздействие. Эффективность клеточной терапии при синдроме паркинсонизма зависит от длительности заболевания и выраженности клинической симптоматики.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 611.36.013: 611.8.013: 617.735-002

Характеристика эмбрионального препарата "Гемонейронал"

В. И. ГРИЩЕНКО, Ю. А. ДЕМИН, Е. И. ГОНЧАРУК, Н. Н. ПОПОВ, А. Ю. ПЕТРЕНКО, А. В. ГЕРАЩЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков
Харьковский национальный университет

Препарат для клеточной терапии "Гемонейронал" содержит в своем составе криоконсервированные клетки печени и нервной ткани эмбриона человека. Терапевтический эффект применения любого клеточного материала главным образом определяется клеточным составом и функциональной активностью составляющих его элементов. Особенно это верно в отношении такого сложного препарата как гемонейрональный трансплантат.

Нами были изучены основные морфофункциональные характеристики эмбрионального препарата после криоконсервирования. Жизнеспособность клеток эмбрионального препарата после криоконсервирования, оцененная методом суправитального окрашивания, составляла 60,6 ± 0,2%. Его клеточный состав существенно не отличался от нативного препарата. Вместе с тем в криоконсервированном препарате по сравнению с нативным наблюдались некоторое увеличение содержания лимфоцитов и достоверное уменьшение количества гепатоцитов и голых ядер. При этом процентное содержание в препарате нейрональных клеток не изменялось. Количественное содержание $CD34^+$-клеток после криоконсервирования также достоверно не изменялось: в нативном препарате оно составляло 1,6 ± 0,2, в криоконсервированном — 1,9 ± 0,2%.

В окрашенных мазках криоконсервированного препарата 62,1 ± 0,2% клеток имели характерную неизмененную морфологию и свойственное им окрашивание цитоплазмы и ядра. Было выявлено 14,7 ± 0,5% клеток, имевших разрывы наружной мембраны, и 13,2 ± 0,4% клеток с повреждениями ядра. Изучение ультраструктуры клеток показало, что в криоконсервированном препарате содержится 29,3% клеток, имеющих различного рода повреждения. Среди выявленных повреждений наблюдались: разрыхление и набухание цитоплазматической мембраны, набухание митохондрий, появление в цитоплазме вакуолей, изредка кариолизис.

Исследование активности ферментов энергетического обмена, интенсивности аэробного и анаэробного гликолиза, интегрально отражающих метаболизм клеток, показало, что после криоконсервирования в клетках происходит снижение активности регуляторных ферментов гликолиза, дегидрогеназ пентозофосфатного пути и цикла трикарбоновых кислот, а также митохондриальной цитохром-с-оксидазы. Помимо этого, в клетках после криоконсервирования было выявлено достоверное снижение интенсивности аэробного и анаэробного гликолиза. После инкубации клеток при 37 °С в атмосфере 5% CO_2 в течение 6 ч в культуральной среде отмечалось некоторое повышение активности всех изученных ферментов, а также процессов гликолиза. Наблюдаемое снижение метаболизма клеток после криоконсервирования является преходящим. Это позволяет предположить, что после введения клеток в организм, где они попадают в физиологические условия, возможно полное восстановление их исходной метаболической активности.

Функциональная активность эмбрионального препарата была оценена *in vitro* по способности клеток в полужидком агаре формировать колонии и кластеры. Было установлено, что криоконсервированные эмбриональные клетки комбинированного препарата формируют 47,5 ± 5,1 кластеров и 33,9 ± 3,8 колоний на 10^5 клеток. Нативные клетки комбинированного эмбрионального препарата формируют 58,1 ± 6,1 кластеров и 44,3 ± 4,7 колоний на 10^5 клеток. При этом было обнаружено, что отдельное культивирование криоконсервированных гемопоэтических клеток приводит к образованию 38,9 ± 4,1 кластеров и 27,7 ± 3,2 колоний на 10^5 клеток, нативных гемопоэтических клеток — 49,4 ± 5,2 кластеров, 36,8 ± 3,8 колоний на 10^5 клеток. После криоконсервирования происходит достоверное снижение гемопоэтической активности клеток эмбрионального препарата. Из полученных данных следует также, что комбинированный эмбриональный клеточный препарат как нативный, так и криоконсервированный обладает большей кластеро- и колониеобразующей способностью, чем соответствующий препарат, состоящий только из эмбриональных гемопоэтических клеток.

Изучение присутствия в препаратах гормона 11-ОКС выявило наличие его как в препарате "Гемонейронал", так и в нервных клетках и клетках печени. Содержание его в комбинированных препаратах составляло 0,168 ± 0,19, в препаратах печени 0,116 ± 0,08, в нейроклетках 0,235 ± 0,12 мкг/мл. Наличие в препарате остаточного количества гормона 11-ОКС, по-видимому, вносит свой вклад в его противовоспалительное действие

Таким образом, комбинированный эмбриональный гемонейрональный препарат после криоконсервирования обладает высокой метаболической и функциональной активностью, а клетки, его формирующие, сохраняют уникальные свойства эмбриональных нейрональных и гемопоэтических единиц.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 616.089.843: 611.013.85: 612.35: 57.085.1

Реакция структурных элементов печени на имплантацию нативной и криоконсервированной плаценты в эксперименте

В. И. ШЕПИТЬКО, Е. П. ЖУЛИКОВА, Т. Н. ЮРЧЕНКО, М. Г. ШЕНБЕРГ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

В последние годы расширяется область применения фетальных и плацентарных тканей при различных патологических процессах в случае неэффективности стандартных методов лечения. Как показывают предварительные экспериментальные данные, подкожная трансплантация плаценты оказывает выраженное стимулирующее воздействие на различные органы и системы, что может объясняться наличием в ее ткани большого количества фетальных белков, факторов роста, цитокинов, интерлейкинов.

Цель выполненной работы — изучение клеточной реакции печени здоровых кроликов на трансплантацию нативного и криоконсервированного фрагмента плаценты, полученной при доношенной беременности. Печень использована как орган с активно протекающим метаболическим процессом. Криоконсервирование осуществлялось по разработанной программе. Контролем служили интактные животные, а также животные, которым был произведен только кожный разрез без трансплантации.

При гистологическом исследовании печени проводилась качественная и количественная оценка состояния ее паренхимы для выявления эффекта компенсаторной пролиферации гепатоцитов как адекватного ответа на применение биологически активного материала. Представлены данные о динамике изменений количества двуядерных гепатоцитов и клеток Купфера (КК). Рассасывание трансплантата из подкожной клетчатки активно происходило в течение первых 14 сут и к концу срока наблюдения (60 сут) процесс рассасывания полностью завершался. В паренхиме печени подопытных животных нами отмечены увеличение количества "темных" клеток к 60-м суткам, малое количество митозов как в опытной группе, так и в контроле, расширение синусоидов и некоторое увеличение размеров КК. Количество КК достоверно снизилось на 2- и 7-е сутки наблюдения, к концу наблюдения различия с группой интактных животных недостоверны. Проведенная морфометрия показала, что количество двуядерных клеток в интактном контроле и у животных с разрезом кожи достоверно не различается при всех сроках наблюдения. В то же время трансплантация нативной плаценты уже через 2–7 сут сопровождается достоверным увеличением количества ДК почти вдвое. Наибольшее количество двуядерных клеток отмечено при трансплантации криоконсервированной плаценты на 7- и 14-е сутки, хотя и на 30-е сутки их количество превышало исходный уровень практически вдвое. Полученные результаты свидетельствуют, что введенный биологический материал вызывает стимуляцию функции паренхимы печени по типу физиологической регенерации, поскольку деструктурированные гепатоциты при морфологическом исследовании нами не выявлены.

УДК 612.592: 611.013.85

Влияние гипотермического хранения плаценты на активность окислительно-восстановительных ферментов

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

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Исследовались активность некоторых окислительно-восстановительных ферментов в ткани плаценты, а также изменения в процессе ее гипотермического хранения. Исследование проводилось с применением метода количественной гистохимии и фотометрического анализа.

В ткани нативной и подвергшейся гипотермическому хранению плаценты были выявлены следующие ферменты: СДГ, ЛДГ, α-ГФДГ, а также НАД·H^2 и НАДФ·H^2-диафоразы. Количественный учет активности ферментов проводился методом фотометрического анализа с использованием телевизионного микроскопа-фотометра.

Результаты гистохимического и фотометрического анализа позволяют судить о поведении окислительно-восстановительных ферментов в ткани плаценты в процессе ее гипотермического хранения. Изменения активности таких ферментов, как

Матеріал, захищений авторським правом

СДГ, α-ГФДГ и НАДФ·H^2-диафоразы, ни между контрольной группой образцов и группами, прошедшими гипотермическое хранение, ни между группами, обследованными на различных этапах гипотермии (1-е и 2-е сутки), не носят статистически достоверного характера ($P < 0,95$). Следует отметить снижение активности фермента ЛДГ ко 2-м суткам относительно уровня этого показателя в контрольной группе ($P > 0,999$) и группе, соответствующей одним суткам хранения ($P > 0,999$).

Активность НАД·H^2-диафоразы достоверно увеличивается к одним суткам гипотермического хранения плаценты ($P > 0,999$), после чего этот показатель снижается до величины, которая не отличается ни от уровня в контрольной группе ($P < 0,95$), ни от уровня в группе, соответствующей одним суткам гипотермии ($P < 0,95$).

ЛДГ – это фермент, который принимает участие в третьем этапе гликолиза, катализируя восстановление пирувата до лактата, отражает анаэробный вариант утилизации сахаров, находясь в непрочной связи с мембранами эндоплазматической сети и являясь НАД-зависимым энзимом. НАД·H^2-дегидрогеназа служит общим показателем активности энергообеспечения клетки и локализуется как внутри митохондрий, так и во внемитохондриальном пространстве.

Таким образом, можно предположить, что недолговременное гипотермическое хранение плаценты не приводит к существенному нарушению ферментативного профиля в ее клетках и имеется лишь небольшое нарушение процесса гликолиза, связанное с утилизацией сахаров и энергообменом между мембранами митохондрий и эндоплазматической сетью.

УДК 616-089.843: 611.013.85.018.5

Состояние лимфогемопоэтической системы организма после трансплантации продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса

А. Н. ГОЛЬЦЕВ, М. А. МИХАЛИН, Л. В. ОСТАНКОВА, Т. Г. ДУБРАВА, Е. Д. ЛУЦЕНКО, И. В. РАССОХА, А. Ю. ГОРСКАЯ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Харьковский государственный медицинский университет

Целью работы является оценка степени влияния гомогената плаценты человека (ГПЧ) на состояние лимфогемопоэтического комплекса (ЛГПК) реципиентов с различным исходным статусом. Так, при совместной пересадке ГПЧ и сингенного костного мозга (КМ) реципиентам с аплазией кроветворения установлено повышение гемопоэтической активности миелотрансплантата. Стимулирующее действие ГПЧ распространялось на различные плацдармы кроветворения реципиента и выражалось в различной степени. Регуляторная активность проявлялась как в отношении колониеобразующих единиц в селезенке (КОЕс), так и кроветворных клеток, расселившихся в медуллярном (костномозговом) участке гемопоэтической системы. Анализ результатов показывает также, что регуляторные цитокины ГПЧ стимулируют активность КОЕс различного уровня дифференцировки, т.е. КОЕс8 и КОЕс12. При этом прослеживался четкий дозозависимый эффект.

Для одновременной оценки гемато- и иммуномодулирующей активности ГПЧ была выбрана экспериментальная модель срыва беременности, инициируемая введением экзогенных иммунокомпетентных клеток и характеризуемая как реакция "трансплантат против хозяина" (РТПХ). Развивающийся иммунный конфликт интерпретируется как аутоиммунная патология, при которой имеет место как отмена иммунологической толерантности, так и экспансия в организме аутоантигенов. Развитие РТПХ индуцировали у беременных мышей линии СВА внутривенным введением сенсибилизированных к антигенам отцовской линии (С57Bl) лимфоидных клеток материнской линии. Интенсивность реакции оценивали по интегральному показателю – срыву беременности и состоянию клеток ЛГПК. Как свидетельствуют полученные результаты, введение клеток-эффекторов (КЭ) сопровождалось срывом беременности у большинства мышей в период с 9-х по 11-е сутки. Трансплантация нативного ГПЧ увеличивала количество мышей, у которых после введения КЭ беременность завершилась в срок, аналогичный физиологически протекающей беременности. Криоконсервированный ГПЧ оказался менее эффективен в предупреждении развития иммунного конфликта.

Оценка фенотипических характеристик иммунокомпетентных клеток показала резкое снижение в селезенке в период срыва беременности концентрации СД8 лимфоцитов и увеличение в сравнении с показателями животных с физиологически протекающей беременностью (ФПБ) содержания клеток с маркерами Т-хелперов. Такого рода изменения сопровождались существенным повышением иммунорегуляторного индекса (ИРИ), характеризующим развитие иммуноконфликтной ситуации.

Матеріал, захищений авторським правом

В этот же период значительно возрастал процент СД4-клеток в регионарных лимфоузлах, в которых при ФПБ соотношение регуляторных Т-клеток должно поддерживаться на определенном уровне. Введение ГПЧ способствовало увеличению содержания СД4 и СД8-клеток, однако динамика роста последних была выражена в значительно большей степени. К 13-м суткам ИРИ у мышей данной группы хотя и не достигал уровня ФПБ, но был значительно ниже, чем при срыве беременности. Установлено, что криоконсервированный ГПЧ обладал меньшим Т-супрессор-активирующим потенциалом в сравнении с нативным ГПЧ. В данной экспериментальной модели показано, что модулирующая активность ГПЧ не только затрагивает иммунокомпетентную сферу, но и активизирует процесс клеточной пролиферации как в селезенке, так и костном мозге. На 12–13-е сутки клеточность селезенки увеличивалась более чем в 3 раза, а костного мозга в 1,6 раза по сравнению с показателями у животных с индуцированной РТПХ.

Введение ГПЧ мышам с ФПБ также сопровождается выраженными изменениями клеточности органов ЛГПК. Сохранялся эффект стимуляции медуллярного кроветворения (в 1,6 раза в сравнении с ФПБ), однако отмечалась некоторая ингибиция процесса пролиферации в селезенке. Одновременно наблюдалось существенное снижение в сравнении с ФПБ клеточности тимуса и лимфатических узлов.Следовательно, отклонение от "физиологического" уровня плацентарных цитокинов при ФПБ после введения экзогенного ГПЧ вызывает разнонаправленные изменения состояния ЛГПК беременных мышей, а именно стимуляцию гемопоэза в КМ и снижение клеточности лимфоидных органов. Данный факт свидетельствует о том, что помимо изменения спектра регуляторных цитокинов в разные сроки беременности существует и дозозависимая регуляция ими состояния ЛГПК беременных мышей. Иммунотропный эффект криоконсервированного ГПЧ, как и при применении в модели с пересадкой сингенного КМ и в модели при предупреждении срыва беременности, был менее выраженным в сравнении с нативным ГПЧ, что может быть следствием изменения количественных (гибель) и качественных (снижение функциональной активности) параметров введенных цитокинпродуцирующих клеток плаценты после криоконсервирования.

УДК 616.361.441.014.41

Уровень тиреоидных гормонов в плазме крови кроликов при ксенотрансплантации криоконсервированной органной культуры щитовидной железы неонатальных поросят

Т. П. БОНДАРЕНКО, Н. А. ВОЛКОВА, С. В. ЛУГОВОЙ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

В настоящее время основным методом лечения гипофункций эндокринных желез остается заместительная гормонотерапия, однако наличие побочных эффектов и развитие гормонозависимых процессов значительно снижают ее эффективность. Существующие методы коррекции гормонального статуса с помощью трансплантации культивированных клеток эндокринных органов ограничиваются недостаточностью доступного трансплантационного материала. Криоконсервирование обеспечивает возможность хранения биологического материала без снижения жизнеспособности и позволяет широко внедрять этот метод лечения в практику. Цель настоящей работы – исследование функционирования криоконсервированной органной культуры щитовидной железы после трансплантации в системе поросята–кролики.

Гипотиреоз у кроликов моделировали путем тотальной тиреоидэктомии. Органную культуру щитовидной железы неонатальных поросят получали методом культивирования в среде 199, содержащей 10%-ю эмбриональную телячью сыворотку и KJ (5 мкг/100 мл среды), в течение 5 дней. Смена среды производилась каждый день. Трансплантацию экспериментальным животным (кроликам) осуществляли под местной анестезией введением органной культуры иглою Дюфо в подкожную жировую клетчатку. Уровень жизнеспособности органной культуры определяли методом суправитального окрашивания с использованием трипанового синего. Жизнеспособность криоконсервированной органной ксенокультуры (ККК) составила 64%, жизнеспособность рекультивированной органной ксенокультуры (РКК) – 72%. Для совместной трансплантации использовали рекультивированные органные ксенокультуры щитовидной железы и надпочечников с жизнеспособностью 69 и 75% соответственно.

Уровень секреции тиреоидных гормонов (Т3, Т4) определяли радиоиммунологическим методом в плазме крови на 90-е сутки после трансплантации при помощи наборов РИА-Т3,Т4-СТ. Результаты

Матеріал, захищений авторським правом

радиоиммунологического исследования показали, что тотальная тиреоидэктомия на 111-е сутки приводит к снижению уровня Т3 в 2,6, а Т4 в 4,3 раза относительно контрольного значения.

На 90-е сутки после трансплантации наблюдали компенсаторную функцию всех трансплантатов по уровню Т3 и Т4 относительно тиреоидэктомированного состояния. Функционирование ККК приводит к увеличению Т3 в 2,5, а Т4 — в 1,8 раза. Эта же тенденция присуща и РКК, в которой наблюдается увеличение Т3 в 1,6, а Т4 — в 1,9 раза. Трансплантация рекультивированной органной культуры щитовидной железы и надпочечников приводила к увеличению содержания Т3 в 3,9, а Т4 — в 1,9 раза. При этом во всех исследуемых группах эти показатели не достигали уровня нормы.

Таким образом, в процессе исследования мы наблюдали положительный эффект ксенотрансплантации органной культуры щитовидной железы у животных, подвергшихся тотальной тиреоидэктомии. Полученные результаты дают возможность предположить, что ксенотрансплантация может быть применена для коррекции уровня тиреоидных гормонов у животных с экспериментальным гипотиреозом.

УДК 615.361.014.41: 611-013.84: 577.352.335: 618.12-002

Влияние криоконсервированных экстракта и ткани хориона на активность процессов перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы больных подострым сальпингоофоритом

В. А. ПИТЬКО

Харьковский государственный медицинский университет

В последние годы во всем мире отмечена тенденция к значительному росту воспалительных заболеваний, в частности, придатков матки. Многие авторы считают, что в патогенезе воспалительных заболеваний существенная роль принадлежит нарушениям, связанным с дестабилизацией биомембран вследствие активации процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и истощения антиоксидантной системы организма (АОС). Поэтому актуальным является поиск препаратов, способных активировать антиокислительные процессы в клетках и ингибировать развитие процесов ПОЛ.

Использование фетальных препаратов, выделенных из тканей фетоплацентарного комплекса человека ранних сроков развития (10 нед. гестации) при различных патологических процессах, показало, что они обладают противовоспалительным, антиоксидантным и иммунокорригирующим действиями.

Цель данного исследования — сравнительное изучение влияния трансплантации криоконсервированной хориальной ткани (КХТ) и имплантации криоэкстракта хориона (КХ) на процессы ПОЛ и состояние АОС больных подострым сальпингоофоритом (ПСО) в процессе комплексного лечения.

Проведено клинико-биохимическое обследование 52 больных ПСО и 30 здоровых женщин.

Больных ПСО разделили на 2 группы, которые были сопоставимы по возрасту, клиническим проявлениям и длительности заболевания, проводилось комплексное противовоспалительное лечение.

Больным 1-й группы (20 женщин) в комплексе с традиционной терапией произведена трансплантация КХТ (образец 1×1 см размораживали и производили трансплантацию в верхний наружный квадрант ягодицы). Пациенты 2-й группы (32 женщины), наряду с традиционным лечением, получали инъекции биопрепарата КХ по 1,0 мл подкожно через день (5 раз).

После проведенного комплексного лечения с трансплантацией КХТ клиническое выздоровление наступило у 15 пациенток (75%), а при использовании КХ клинически здоровыми были 29 пациенток (90,06%).

Дополнение комплексной терапии применением КХТ и КХ позволило существенно улучшить внутреннюю среду организма больных ПСО. После лечения уровень малонового диальдегида снизился на 47 и 58%, а содержание диеновых конъюгат — на 42 и 48% соответственно. Уровень витамина Е увеличился на 60 и 81% соответственно.

Способ лечения больных ПСО с использованием препарата хориона в виде экстракта позволил практически полностью восстановить внутренний контроль над процессами ПОЛ, что является одним из главных составляющих выздоровления и нормального функционирования метаболических систем организма. При сопоставлении биологической эффективности препаратов (влияние на процессы ПОЛ и АОС), полученных из хориона для лечения ПСО, более активным был КХ.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 616.12-009.72-08: 615.361.013.85.014.413: 616-089.843

Лікування стабільної стенокардії із застосуванням кріоконсервованої фетоплацентарної тканинної трансплантації

К. В. ШЕПІТЬКО, С. О. ГАЄВСЬКИЙ, М. М. ПОТЯЖЕНКО, В. І. ШЕПІТЬКО

Українська медична стоматологічна академія, м. Полтава

Значний ріст захворюваності на ішемічну хворобу серця (ІХС), тяжкість перебігу цього захворювання, високий ступінь інвалідизації та частий розвиток небезпечних для життя ускладнень обумовлюють розробку нових патогенетично обгрунтованих підходів до лікування таких хворих. З цією метою вивчаються особливості патогенезу ішемії міокарда, створюються експериментальні моделі та проводиться клінічна апробація різноманітних засобів фармакологічної корекції. Але, незважаючи на значний об'єм проведених досліджень, не існує однозначної думки про роль імунної системи, процесів вільнорадикального окислення в патогенезі ішемії міокарда у хворих на ІХС. Залишається також недостатньо дослідженою можливість використання тканинної алотрансплантації в лікуванні цього захворювання.

Метою нашого дослідження стала оцінка клінічної ефективності лікування хворих на стабільну стенокардію з використанням кріоконсервованої фетоплацентарної тканинної трансплантації. Обстежено 10 хворих на стабільну стенокардію навантаження ФК II з анамнезом захворювання 3–8 років. Клінічний статус оцінювали, користуючись анкетою, в якій наведено типові скарги хворих та об'єктивні прояви хвороби. З метою напівкількісної оцінки клінічного стану хворих розраховували загальний клінічний індекс. Проводили якісний аналіз електрокардіограм.

Усі хворі отримали курс лікування, який включає трансплантацію фрагмента кріоконсервованої фетоплацентарної тканини.

У результаті проведеного лікування виявлено покращення клінічного стану хворих: клінічний індекс після лікування зменшився на 30%. При аналізі скарг хворих відмічено зменшення болей у ділянці серця у 90% випадків, покращення самопочуття, підвищення працездатності хворих у 95% випадків. У 87% випадків спостерігалася позитивна динаміка зубця Т на ЕКГ. Така динаміка може свідчити про зменшення ішемізації міокарда.

Отримані результати дослідження свідчать про виражену клінічну ефективність трансплантації кріоконсервованого екстракту алогенної плаценти у хворих на стабільну стенокардію та обгрунтовують можливість використання тканинної трансплантації у комлексному лікуванні цих хворих.

УДК 57.089.36: 591.88.436.2

Методы получения жизнеспособных эмбриональных клеток нейроткани и печени

Н. Г. КАДНИКОВА, Т. Ф. ПЕТРЕНКО, В. Ф. МАРЦЕНЮК, С. В. КОЩИЙ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Эмбриональные клетки печени и нейроткани нашли широкое применение в клеточной терапии. В процессе выделения клеток печени и нейроткани значительное внимание уделяется их жизнеспособности. При получении суспензий клеток из различных тканей используют методы вымывания, механической и ферментативной дезагрегации.

Нами были изучены жизнеспособность и криоустойчивость клеток, полученных способом механической или ферментативной дезагрегации. Опыты проводили с печенью и нейротканью 12–15-дневных эмбрионов мышей. Механическую дезагрегацию тканей осуществляли в стеклянном гомогенизаторе Поттера. Для ферментативной дезагрегации небольшие кусочки тканей погружали в растворы ферментов (версен, трипсин, химопсин и различные их комбинации). Определяли оптимальное время экспозиции ферментов на клетки. Сохранность выделенных клеток оценивали по интенсивности прижизненного окрашивания трипановым синим.

В результате проведенных экспериментов установлено, что для печени метод гомогенизации обеспечивает получение $2{,}8 \cdot 10^7$ кл/мл при жизнеспособности 53%, а метод ферментативной дезагрегации — $(2{,}5–3{,}5) \cdot 10^7$ кл/мл при жизнеспособности 88–92%. Для нейроткани жизнеспособность клеток после механической дезагрегации составляла 22%, а после

Матеріал, захищений авторським правом

ферментативной — 82–92%. Концентрация клеток зависела от вида применяемого фермента, продолжительности его воздействия и была такой же, как и в случае механической дезагрегации ткани.

Полученные оптимальные режимы дезагрегации были применены для печеночных и нейрональных тканей 7–8-недельных эмбрионов человека. Морфофункциональные свойства клеток оценивали по трипановому синему и по их способности к прикреплению к субстрату и распластыванию.

Жизнеспособность клеток печени и нейроткани, полученных путем ферментативной дезагрегации, составляла 97 и 85% соответственно, после механической дезагрегации — 45 и 12%. Следует отметить, что эти показатели существенным образом зависели от состава транспортной среды, в которой доставлялся эмбрион, температуры и длительности транспортировки.

Известно, что ферменты в процессе дезагрегации оказывают повреждающее действие на цитоплазматическую мембрану клеток, в частности, вызывают утрату поверхностных антигенов, рецепторов, ферментов. Поэтому мы включили дополнительный тест, позволяющий оценить функциональные свойства клеток, в которых участвуют рецепторы, — способность клеток к прикреплению и распластыванию. Клетки печени, дезагрегированные ферментативным методом и помещенные в культуральную среду, прикреплялись и распластывались через 2 ч. На 2–3-е сутки образовывался монослой, состоящий из эпителиальных клеток, имеющих полигональную форму, крупные ядра, гранулированную цитоплазму. Клетки после механической дезагрегации теряли способность к адгезии. На протяжении 2–3-х суток в супензии сохранялась первоначальная жизнеспособность клеток. О состоянии нейроткани можно было судить только по интенсивности прижизненного окрашивания трипановым синим, так как клетки не адгезировали при любом способе дезагрегации.

После криоконсервирования жизнеспособность клеток снижалась на 8–20% независимо от способа дезагрегации тканей. Клетки, переведенные в суспензию ферментативным способом, после криоконсервирования сохраняли способность прикрепляться и распластываться.

УДК 575.826: 57.089.61: 591.481.1

Особенности функциональной адаптации глиальных имплантатов неокортекса и мозжечка

Ю. П. ЗОЗУЛЯ, А. П. ЧЕРЧЕНКО, В. М. СЕМЕНОВА, Н. Г. ГРОНСКАЯ, Е. А. НАГОРНЫЙ, Л. П. СТАЙНО

Институт нейрохирургии АМН Украины, г. Киев

Учитывая современные представления о роли глии в морфофункциональной и метаболической пластичности ЦНС и перспективы ее использования в качестве трансплантационного материала, с целью изучения особенностей функциональной адаптации системы "глиальный имплантат–мозг реципиента" проведены исследования биоэлектрической активности мозга (ПК-ЭЭГ) экспериментальных животных (кролики, масса тела 2,5–3 кг) после имплантации глиальнообогащенных фракций неокортекса ($ГОФ_К$, $n = 44$) и мозжечка ($ГОФ_М$, $n = 51$), полученных из эксплантационных первичных культур тканей мозга новорожденных крольчат. Группы сравнения составили животные с имплантацией эмбриональных нервных тканей неокортекса ($ЭНТ_К$, $n = 15$) и мозжечка ($ЭНТ_М$, $n = 20$).

Обнаружены активационные эффекты $ГОФ_К$ в зоне имплантации по сравнению с симметричной зоной (СЗ) противоположного полушария — увеличение суммарной мощности бета-2-ритмов (1 667,9 ± ± 329,8 мкВ^2/Гц, 980,1 ± 241,4 мкВ^2/Гц, $p < 0,05$); при фотостимуляции (ФС) — значительное повышение мощности и уменьшение частоты бета-2-ритмов, увеличение частоты бета-1-ритмов и повышение мощности тета-1 и тета-2-ритмов. В группе $ЭНТ_К$ в зоне имплантации по сравнению с СЗ обнаружено повышение амплитуды бета-2-ритмов (149,6 ± 30,5 мкВ, 59,2 ± ± 9,7 мкВ, $p < 0,05$), при ФС — изменение реактивности в диапазоне альфа-ритмов, снижение мощности бета-1-ритмов, реактивность в диапазоне тета-ритмов. При сравнении характеристики ЭЭГ ритмов в зонах $ГОФ_К$ и $ЭНТ_К$ выявлены различия по частоте бета-1-ритмов (16,6 ± 0,3 Гц и 17,6 ± 0,1 Гц, $p < 0,05$); при ФС — различия по мощности бета-2-ритмов $ЭНТ_К$ (1 950,9 ± 352,9 мкВ^2/Гц) и $ГОФ_К$ (2 119 ± ± 351 мкВ^2/Гц, $p < 0,05$) и по частоте (соответственно 27,1 ± 0,09 Гц, 24,6 ± 0,9 Гц, $p < 0,05$).

В зонах имплантации $ГОФ_М$ обнаружены увеличение по сравнению с СЗ мощности дельта-ритмов (302,3 ± 51 мкВ^2/Гц, 130,8 ± 22,6 мкВ^2/Гц, $p < 0,01$), замедление тета-1 (4,96 ± 0,03 Гц, 4,99 ± 0,03 Гц, $p < 0,01$), в диапазоне бета-1 увеличение мощности (867,5 ± 104 мкВ^2/Гц, 466,7 ± 72 мкВ^2/Гц, $p < 0,01$) и частоты (16,94 ± 0,15 Гц, 16,65 ± 0,16 Гц, $p < 0,05$), в бета-2 — увеличение мощности (1 364 ± ± 138 мкВ^2/Гц, 549,7 ± 53 мкВ^2/Гц, $p < 0,01$) и снижение частоты (25,38 ± 0,41 Гц, 26,61 ± 0,28 Гц, $p < 0,05$). При ФС в зоне $ГОФ_М$ большая, чем в СЗ мощность дельта- (325,7 ± 44,3 мкВ^2/Гц, 111,1 ±

Матеріал, захищений авторським правом

$\pm 16{,}1$ мкВ^2/Гц, $p < 0{,}01$) и тета-1-ритмов ($247{,}6 \pm \pm 34{,}6$ мкВ^2/Гц, $86{,}4 \pm 16{,}3$ мкВ^2/Гц, $p < 0{,}05$), более низкая частота альфа-ритмов ($10{,}09 \pm 0{,}09$ Гц, $10{,}47 \pm 0{,}15$ Гц, $p < 0{,}05$).

При сравнении ответов на ФС в зонах $ГОФ_М$ и $ГОФ_К$ обнаружены различия в альфа-диапазоне — по направленности изменений суммарной мощности (для $ГОФ_М$ $143 \pm 23{,}4\%$, для $ГОФ_К$ $76{,}76 \pm 15{,}12\%$, $p < 0{,}05$) и частоты ($100{,}3 \pm 2{,}6\%$ и $98{,}06 \pm 2{,}2\%$, $p < 0{,}01$). При бемегрид-тесте выявлены различия $ГОФ_М$ и $ГОФ_К$ по частоте бета-2-ритмов ($26{,}33 \pm 0{,}3$ Гц и $24{,}94 \pm 0{,}18$ Гц, $p < 0{,}026$) и уровню судорожной готовности ($ГОФ_К > ГОФ_М$). Методом фармакологического анализа обнаружена дофаминергическая зависимость спонтанных и провоцированных эпилептиформных трансформаций бета-ритмов в зоне имплантации $ГОФ_К$. В тканях зоны имплантации $ГОФ_М$ выявлено повышение содержания ГАМК и ГАМК-зависимая активация альфа-ритмов. Данные свидетельствуют о структурозависимых различиях эффектов ГОФ неокортекса и мозжечка.

УДК 615.361.014.41: 57.086.13

Научно-практическая деятельность Самарского тканевого банка

Л. Т. ВОЛОВА

Самарский государственный медицинский университет, Россия

В Самаре тканевой банк организован на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории (ЦНИЛ) медицинского университета в 1983 г. В настоящее время имеются 3 научно-практических подразделения: отделение по заготовке и консервации тканей, лаборатории коллагена и культуры клеток (фибробластов).

Научно-техническая база ЦНИЛ позволила организовать высокотехнологичное промышленное производство биоимплантатов и проводить комплексные научные исследования по проблемам регуляции регенераторных процессов в опорных и покровных тканях организма за счет дифференцированного применения аллогенных тканей, культуры клеток, тканевых компонентов и немедикаментозных факторов воздействия. В рамках данной программы изучаются фундаментальные и прикладные вопросы биоимплантологии, связанные с технологией получения препаратов, их биологическим тестированием, вопросами рационального применения биогенных препаратов в клинической практике, организацией работы тканевых банков, этическими и юридическими проблемами их деятельности.

За период работы тканевого банка организовано высокотехнологичное безотходное производство лиофилизированных имплантатов торговой марки "Лиопласт", стерилизованных гамма-лучами; разработан и внедрен оригинальный алгоритм изготовления биопрепаратов, защищенный 4 патентами РФ, включающий вирусную инактивацию, специальную ультразвуковую обработку для удаления элементов костного мозга и жира из спонгиозы, стерилизации и насыщения биопрепаратов лекарственными веществами; получение аллогенного гидроксиаппатита и деминерализованного костного матрикса, в том числе из брефотканей. В нашей лаборатории изготавливается более 60 разновидностей имплантатов, практически из всех видов соединительных тканей. Получаемые биоимплантаты состоят только из компонентов человеческого организма, не содержат внесенные извне химические вещества, хранятся свыше 5 лет при комнатной температуре, легко транспортируются.

Технологии производства биоимплантатов "Лиопласт" позволяют полностью защитить реципиента от передачи ему какого-либо заболевания, сводят до минимума опасность инфицирования персонала и делают технологический процесс экологически безопасным и экономичным.

Вместе с клиницистами различных специализаций (стоматологами, оториноларингологами, офтальмологами, травматологами, ортопедами, онкологами, гнойными и пластическими хирургами, комбустиологами) разработаны новые способы малоинвазивных и малотравматичных органосохранных операций с применением аллогенных биопрепаратов и физиотерапевтических средств в комплексном лечении больных с патологией опорно-двигательной системы, зубочелюстной области, кожных покровов, зрения и слуха, для лечения остеопороза. Способы запатентованы (11 удостоверений). По этой тематике защищены 12 кандидатских и докторских диссертаций. Только в Самарской области биоимплантаты торговой марки "Лиопласт" используются для лечения больных с кистами, опухолями, деструктивными и гнойными процессами в костях, их травмами, повреждениями и разрушениями связочного аппарата, трофическими язвами, ожогами, при проведении окулопластических операций, реконструктивных вмешательствах при прогрессирующей миопии и хроническом гнойном отите, в косметологии и других областях медицины.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 615.361.014.41

Криоконсервация — фактор трансформации клеток

О. И. КОНЮШКО, Л. Л. МИРОНОВА

Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова РАМН, г. Москва

Использование криопротекторов и соблюдение режимов криоконсервирования и восстановления клетки позволяют сохранять высокую жизнеспособность при неизменных морфологических, биохимических, кариологических свойствах и чувствительности к вирусам на протяжении длительного времени (в нашей практике — свыше 20 лет). Это свойственно как для взвесей первичных клеток, так и для клеток перевиваемых линий на разных уровнях пассажей.

В то время как длительность хранения криоконсервированных клеток не приводит к каким-либо изменениям свойств, присущих культурам, частота процедуры замораживания-оттаивания может вызвать грубые повреждения хромосом и в результате трансформацию клеток. Таким образом была получена линия гетероплоидных клеток почек эмбриона овцы 4184 в результате многократных процедур криоконсервирования диплоидных клеток линии 41 с краткими промежутками пассирования (1–2 пассажа) между ними.

Линия 4184 отличается высокой пролиферативной активностью, представлена мелкими эпителиоидными клетками. Выражена контактная ингибиция. Цитохимические реакции на ДНК и РНК протекают более интенсивно. При большом количестве диплоидных клеток (87–92%) отмечены более высокий уровень полиплоидии по сравнению с линией 41, 8–40-кратное превышение гиперплоидии и маркерная хромосома у 6% клеток.

В культуре 4184 с высокими титрами размножаются вирусы кори, Коксаки В1–3, 5, 6, чумы плотоядных, клещевого и японского энцефалитов. Клетки линии 4184 были применены для изготовления диагностикума японского энцефалита и 12 экспериментальных серий вакцины со штаммом М-47.

Аналогичным образом была получена линия гетероплоидных клеток кожи и мышц эмбриона зеленой мартышки 4921 из клеток диплоидной линии 4921Д. Клетки линии 4921 также высокочувствительны к заражению вирусами лимфоцитарного хориоменингита, клещевого и японского энцефалитов. С последним изготовлен диагностикум.

УДК 57.086.13.8

Криобанк различных видов культур клеток

Л. Л. МИРОНОВА, В. Д. ПОПОВА, О. И. КОНЮШКО, Ю. Х. ХАПЧАЕВ, Д. В. ЗЫБИН, А. С. АКОПЯН

Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова РАМН, г. Москва

Республиканский центр репродукции человека МЗ РФ, г. Москва

Только возможность сохранения клеток в жидком азоте позволила создать коллекции биоматериалов. Начиная с 1969 года, в лаборатории культур ткани установлено более 100 линий перевиваемых клеток человека и животных. Были изучены их биологические, морфологические, кариологические, биохимические свойства, осуществлен контроль на отсутствие посторонних агентов. Цель работ — получение линий перевиваемых клеток, пригодных для производства противовирусных вакцин. В криобанк помещены наиболее перспективные клеточные системы. Апробировав несколько способов криоконсервирования клеток, мы остановились на методе, подробно описанном в Тезисах докладов II Всесоюзной конференции "Криобиология и криомедицина", 1984.– Том 1, с. 172. Таким образом, в банк помещены линии диплоидных клеток человека М-1, М-7, М-10, М-19–23, М-25–28 (кожа и мышцы эмбриона), линии 4478, 4921Д, 5003, 5018, 5020 из этих же тканей обезьян, 2688 — почки, 2683, 4664 — легкие обезьян, линии диплоидных клеток почек эмбрионов и новорожденных овец 41, 91, 374, 474, 574 и ряд других.

Линии гетероплоидных клеток получены из органов и тканей зеленых мартышек: 455 (селезенка), 4179 (сердце и язык), 4647 (почка), 4921 (кожа и мышцы); линия Таурус-1 (почка теленка), 4184 (почка овцы).

Линия гетероплоидных клеток РАМТ — дериват линии 4647, установленная путем культивирования клеток на селективной среде Игла с 8-азогуанином, 6-меркаптопурином, 6-тиогуанином. Эта линия дефектна по гену фермента гипоксантингуанин фосфорибозилтрансферазы (ГФРТ$^-$).

При пассировании клеток линии 4647 на среде с 5-бромдезоксиуридином установлен другой дериват 4647 ТК$^-$. Получены два внутрилинейных гибрида клеток линии 4647 при пассировании в системе среды НАТ клеток РАМТ и ТК$^-$ (РАМТ×4647 ТК$^-$). Большая часть упомянутых линий оказалась пригодной для проведения научных исследований, создания диагностикумов, вакцин, тест-систем для работы с вирусами и интерфероном.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 615.361.013.014.413: 616.8-00

Опыт применения криоконсервированных эмбриональных тканей в лечении некоторых заболеваний нервной системы

В. Г. ЧЕРНЕНКОВ, В. Г. ЗАДОРОЖНЫЙ, Н. Н. БРОВИНА, А. В. ШАТИЛЛО

Институт неврологии, психиатрии и наркологии АМН Украины, г. Харьков

Цель настоящего исследования — сравнительный анализ результатов применения криоконсервированных эмбриональных тканей в лечении различных заболеваний нервной системы.

Применялись сертифицированные криоконсервированные препараты биологических тканей, полученные из Украинского банка биологических объектов Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины.

При лечении заболеваний головного мозга с патогенетических позиций наиболее предпочтительна интракраниальная пересадка трансплантата нервной ткани. В случаях, когда генез заболевания связан с первичным поражением внутренних органов (например, первичный ферментативный дефект в печени при гепатоцеребральной дистрофии), целесообразно и внутривенное введение эмбриональной ткани печени. Нами разработаны и применены новые способы технической реализации трансплантации и конкретные варианты лечения ряда малокурабельных заболеваний нервной системы.

При лечении эмбриональными тканями особое внимание обращалось на безусловное соблюдение международных биомедицинских и этических норм и Закона Украины о трансплантации. В каждом случае операции трансплантации пациенты давали информированное согласие на применение данного лечебного метода.

Мы располагаем опытом лечения 197 пациентов с неврологической патологией с 1991 года по настоящее время. Изучена клиническая эффективность трансплантации эмбриональных тканей с использованием специальных количественных и полуколичественных методов при паркинсонизме, болезни Вильсона–Коновалова, генерализованных формах эпилепсии, демиелинизирующих заболеваниях нервной системы, некоторых наследственно-дегенеративных заболеваниях, а также при лечении глиальных опухолей мозга после радикального их удаления. Больные, как правило, хорошо переносили операцию трансплантации, их состояние оставалось относительно удовлетворительным или среднетяжелым. Обнаружено наличие четкого положительного клинического результата во всех наблюдениях с различными степенями стойкости и выраженности. Ухудшения клинического течения заболевания и серьезных осложнений не наблюдалось. С учетом того, что данный метод применялся у больных с резистентностью к длительно применявшимся традиционным способам лечения, результат может быть оценен как положительный и обнадеживающий.

УДК 615.361.36.013.014.413

Фенотип и колониеобразующая активность криоконсервированных клеток эмбриональной печени человека

А. И. ТАРАСОВ, Д. Р. Е. ДЖОНС, В. И. ГРИЩЕНКО, А. Ю. ПЕТРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Департамент иммунологии, Королевский Медицинский Центр, Ноттингемский Университет, Ноттингем, Великобритания.

Терапевтический эффект трансплантации клеток эмбриональной печени человека (ЭПЧ) главным образом обусловлен высоким содержанием в ней стволовых гемопоэтических клеток. Наряду со стволовыми клетками, в ЭПЧ присутствуют также гемопоэтические клетки-предшественники различной степени коммитации. Использование клеток ЭПЧ для трансплантации подразумевает их криоконсервирование. Следует иметь в виду, что криоконсервирование может оказывать существенное влияние на жизнеспособность и функциональную активность клеток. Цель данной работы — изучить иммунофенотип криоконсервированных клеток ЭПЧ до и после культивирования, а также их колониеобразующую активность.

Суспензию клеток выделяли и криоконсервировали в ИПКиК НАНУ из печени эмбрионов человека 6–12 недель гестации, полученных при искусственном прерывании беременности в клиниках г. Харькова. Криоконсервирование проводили под

Матеріал, захищений авторським правом

защитой ДМСО в бессывороточной среде. Клетки ЭПЧ малой плотности окрашивали моноклональными антителами, конъюгированными с флуоресцентными красителями (CD34-PE/FITC, CD45-FITC, AC133-PE и гликофорин A-FITC). Содержание клеток различного иммунофенотипа определяли методом проточной цитометрии на трёхлазерном клеточном сортере EPICS (Beckman Coulter).

Культивирование клеток проводили в полутвердой среде на основе метилцеллюлозы в присутствии ростовых факторов: ФСК, ГМ-КСФ, ИЛ-3 и эритропоэтина. Клетки, собранные из культуры, окрашивались тем же набором моноклональных антител. Содержание клеток специфического иммунофенотипа после 7 и 14 сут культивирования определяли методом проточной цитометрии. Было установлено, что в суспензии клеток ЭПЧ содержится 3,78 ± 0,48% CD34+ клеток, 8,99 ± 0,42% CD45+ клеток, 1,09 ± 0,07% AC133+ клеток и 80,54 ± 0,74% гликофорин A+ клеток. При этом 70% AC133+ популяции коэкспрессировало CD34, а 98% CD34+ популяции – CD45. В процессе культивирования количество CD45+ клеток значительно возрастало, а CD34+ и AC133+ клеток уменьшалось.

Клетки, выделенные из образцов 6–12 недель гестации, на 14-й день культивирования образовывали 185,75 ± 21,21 эритроидных, 220,38 ± 38,01 моногранулоцитарных и 217,50 ± 15,31 смешанных колоний. Статистический анализ позволил обнаружить положительную корреляцию между содержанием AC133+ клеток и количеством колониеобразующих единиц. Фенотипический анализ показал, что в криоконсервированной суспензии ЭПЧ содержится достаточно большое количество жизнеспособных примитивных предшественников гемопоэтических клеток. Данные по колониеобразующей активности клеток ЭПЧ свидетельствуют об их высоком пролиферативном потенциале и способности к мультинаправленной дифференцировке после криоконсервирования.

УДК 615.361.36.013.014.413:611.36.018.1: 57.085.043

Биологическая активность криоконсервированных фетальных препаратов печени и их влияние на функциональное состояние гепатоцитов

Н. П. СУББОТА, П. П. ПАШИНСКИЙ, Д. В. ЧЕРКАШИНА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Проведено комплексное сравнительное экспериментальное исследование действия низких температур на биологические свойства фетальных препаратов (печень, мозговая ткань, плод, хорион плода человека 10 и 24 недель гестации) и их влияния на функциональное состояние гепатоцитов крыс в модельных системах *in vitro* и *in vivo*. Представленные данные свидетельствуют о перспективности разработок в области новых криобиологических технологий, связанных с получением биопрепаратов с сохраненными свойствами фетальных тканей.

При гипотермическом хранении гепатоцитов в сахарозо-солевой среде криоконсервированные биологические препараты, полученные из фетальной печени плода человека, пролонгируют морфологическую сохранность, синтез белка и биоэнергетические показатели в гепатоцитах в динамике до 72 ч более эффективно, чем препараты из органов иного гистогенеза.

При введении криоконсервированных препаратов печени животным с экспериментальным гепатитом снижаются интенсивность процессов ПОЛ (уменьшение содержания МДА), показатели цитолиза (уменьшение активности ферментов АЛТ и АСТ), холестаза, (снижение активности ЩФ), накопление токсических продуктов обмена (снижение уровня билирубина), нормализуются регуляторно-гомеостатические функции (увеличение белок-, РНК- и ДНК-синтезирующих активностей); повышается супероксиддисмутазная и каталазная активность.

Гепатопротекторный эффект криоконсервированных препаратов разного уровня биологической организации, полученных из печени плодов разных сроков гестации, зависит от возрастных особенностей функционирования органа. Экстракт, выделенный из печени плода 10 недель гестации, оказывает более выраженное восстанавливающее и регулирующее действие на печень, чем препараты (гомогенат, гепатоциты, цитозольная фракция), полученные из печени плода более позднего срока гестации (24 недели), о чем свидетельствуют показатели активности СОД и содержания ТБК-активных продуктов.

Введение криоконсервированных препаратов при экспериментальном гепатите эффективнее на более ранних этапах развития патологии печени, о чем свидетельствуют показатели активности ферментов цитолиза в плазме крови, а также активности СОД и содержания ТБК-активных продуктов в печени.

Криоконсервированные в течение 2,5 лет при низких (–196 °С) температурах препараты (10 недель гестации плода), биотехнология получения которых включает циклическое замораживание-от-

Матеріал, захищений авторським правом

таивание фетальной печени, сохраняют свои гепатопротекторные свойства, ускоряя восстановительные процессы в печени реципиента при экспериментальном гепатите, что подтверждают показатели активности ферментов АЛТ, АСТ (показатели степени цитолиза), а также СОД (антиоксидантная активность).

Полученные данные позволяют считать целесообразным создание низкотемпературного банка препаратов фетальной печени клинического профиля.

УДК 615.361: 616-006.81

Вакцинация против меланомы с помощью ксеногенных клеток

В. К. СОЛОГУБ, Д. В. ЗЫБИН, А. Г. КОТЕЛЕВИЦ, И. А. КОРОМЫСЛОВА, С. Е. СЕВЕРИН

Московский научно-исследовательский институт медицинской экологии, Россия

В последнее время широкое применение в онкологии находят иммунотерапия и иммунопрофилактика. Полноценный иммунный ответ вызывают вакцинные препараты, основанные на живых клетках (модифицированных опухолевых, дендритных, гибридомных и т.д.). В то же время сильно отличающиеся клетки быстро удаляются как специфическим, так и неспецифическими иммунными механизмами организма, что существенно снижает эффективность вакцинации.

В наших экспериментах ксеногенные опухолевые клетки сохранялись в соединительно-тканной капсуле (СТК), покрывающей инертный гель, не менее 6 мес. Такой длительный контакт приводил к иммунизации против опухолевых клеток.

Поскольку известно, что клетки злокачественной меланомы человека и мыши обладают схожим спектром презентируемых и секретируемых белков, эта модель была нами выбрана для доказательства эффективности данной методики. Наши эксперименты были проведены на модели меланомы человека (SKMEL-28) и меланомы мыши (B-16) на мышах линии C57/Black.

Мышам линии C57/Black имплантировали гель и через 2 мес после формирования СТК инокулировали клетки меланомы человека SKMEL-28. Через 1,5 мес экспериментальным и контрольным мышам прививали сингенную опухоль мышиной меланомы B-16. Через 25 дней животные контрольной группы погибали. Средняя продолжительность жизни мышей, вакцинированных клетками меланомы человека, составила более 100%.

Результаты показали, что применение предложенной методики позволяет успешно использовать ксенотрансплантацию для вакцинации против онкологических заболеваний.

УДК 615.361: 616.379-008.64

Использование ксенотрансплантации для лечения сахарного диабета типа I

Д. В. ЗЫБИН, И. А. КОРОМЫСЛОВА, В. К. СОЛОГУБ, А. Г. КОТЕЛЕВИЦ, С. Е. СЕВЕРИН

Московский научно-исследовательский институт медицинской экологии, Россия

Инсулинзависимый сахарный диабет типа I связан с частичной или полной деструкцией бета-клеток поджелудочной железы — единственной популяции клеток в нашем организме, продуцирующих инсулин.

Выработанный нами метод позволяет уберечь трансплантированные бета-клетки от иммунной атаки. Данный эффект достигается за счет имплантации животному инертного геля, который через определенный период покрывается соединительно-тканной капсулой (СТК). Инъекция бета-клеток за СТК позволяет им существовать в течение нескольких месяцев без изменения функциональной активности. Мы использовали данный метод для лечения диабета у крыс.

Крысам линии Вистар имплантировали гель и через 2 мес после формирования СТК помещали за него выделенные из новорожденных крольчат бета-клетки. Эффективность функционирования бета-клеток определялась по детекции уровня кроличьего инсулина в сыворотке крыс. Оказалось, что уже через 30 дней после имплантации клеток они начинают стабильно продуцировать инсулин, причем этот эффект наблюдался более 6 мес. На втором этапе бета-клетки кролика имплантировали крысам со стрептозотопин-индуцированным диабетом (уровень глюкозы от 17 до 25 ммоль). Через 50 дней уровень глюкозы у экспериментальных животных снизился до нормы (4–5 ммоль) и стабильно держался на этом уровне более 6 мес.

Приведенные результаты показывают, что предложенная методика может быть успешно использована для лечения инсулинзависимого сахарного диабета типа I или, по крайней мере, уменьшения дозы инсулина.

Матеріал, захищений авторським правом

СЕКЦИЯ 3
НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЕ КОНСЕРВИРОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

УДК 547.422: 57.043: 591.463.1: 636.5

Цитотоксичность и криопротекторная активность диолов, амидов и их смесей при криоконсервировании спермы петухов

Т. П. ЛИННИК, О. В. БИЗИКИНА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

НИИ птицеводства УААН, г. Харьков

Изучена цитотоксичность и криопротекторная активность 16 соединений двух гомологических рядов — диолов и амидов и их смесей при криоконсервировании спермы петухов.

Показано, что амиды меньше, чем диолы, повреждают клетки до замораживания, если вещества к суспензии сперматозоидов прибавляют при температурах от 0 до 50 °С. Обнару́жено, что диолы и амиды по-разному влияют на сохранность мембран головок и целостность акросом, что позволяет сделать заключение о дифференцированном действии этих двух классов веществ на различные органеллы сперматозоидов до замораживания. На основании полученной зависимости цитотоксичности диолов и амидов от температуры высказано предположение, что повреждающее действие амидов на сперму петухов имеет химическую природу, в то время как диолов не только химическую, но и осмотическую с преимущественным вкладом последней. Обсуждается влияние структуры и физико-химических свойств амидов и диолов на механизм их цитотоксического действия.

Выявлено, что смеси криопротекторов на основе диолов и амидов оказывают достоверно меньшее повреждающее действие на спермии петухов до замораживания по сравнению с отдельными веществами. При этом наибольшее снижение цитотоксичности наблюдалось при инкубации сперматозоидов с комбинацией амидов и диолов в соотношении 1:1 и 1:2.

Установлено, 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). Учитывая морфологическую целостность сперматозоидов после оттаивания, эти вещества по степени уменьшения их криопротекторной активности распределяются в следующий ряд:

МАЦ > ДМФА > ДМАЦ > 1,2–ПД > ЭГ > 2,3–БД,

в то время как по степени восстановления оплодотворяющей способности сперматозоидов после криоконсервирования , вещества распределяются по-иному:

ДМФА > ДМАЦ > 1,2–ПД > МАЦ > ЭГ > 2,3–БД.

Поэтому предложен новый критерий оценки криопротекторной активности веществ — нормированное среднее значение суммы всех исследованных показателей сохранности сперматозоидов после замораживания-оттаивания. Рассмотрена зависимость криопротекторной активности веществ от их структуры и физико-химических свойств. Установлена достоверная однофакторная корреляция между криопротекторной активностью изученных веществ и их криоскопической константой. Предложено использовать криоскопическую константу в дополнении к другим характеристикам гидрофильности веществ в доэкспериментальном скрининге эффективных криозащитных агентов. Обсуждаются некоторые аспекты механизма криозащитного действия диолов и амидов.

Показано, что смеси веществ амид + диол, а также амид + диол + диол по криопротекторной активности превосходят отдельно взятые криопротекторы. Наиболее высокие показатели морфологической сохранности сперматозоидов после замораживания-оттаивания получены под защитой смесей: ДМФА +1,2-ПД, а также ДМФА + ЭГ + 1,2-ПД в соотношении 2:1 и 1:1:1 соответственно. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования сложных композиций криопротекторов на основе амидов и диолов, что позволяет не только снизить их цитотоксичность, но и повысить уровень как морфологической, так и функциональной сохранности сперматозоидов петухов после замораживания-оттаивания.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043: 591.465.12.3: 599

Способ криоконсервирования ооцитов и эмбрионов млекопитающих при сверхвысоких скоростях теплообмена

И. А. МОРОЗОВА, Л. В. ГОРБУНОВ, Н. А. ГОРДИЕНКО

Харьковский биотехнологический центр, пос. Кулиничи
Харьковский государственный медицинский университет

По данным зарубежной литературы применение открытых вытянутых соломинок для витрификации ооцитов и эмбрионов млекопитающих является одним из наиболее перспективных направлений (Vajta et al., 1998). Однако данный метод имеет следующие недостатки: возникновение процессов рекристаллизации за счет низких скоростей оттаивания по сравнению со скоростями замораживания; токсическое действие относительно высоких концентраций криопротектора на биообъект; несоблюдение условий содержания биоматериала в стерильности из-за применения открытых контейнеров.

Для исключения вышеупомянутых недостатков предложен способ витрификации ооцитов и эмбрионов млекопитающих при сверхвысоких скоростях теплообмена, основанный на применении закрытых вытянутых капилляров. В качестве контейнеров для биообъектов используются пластиковые капилляры с наружным диаметром 1,8; 1,0; 0,5; 0,3 мм. Концентрация эквилибрирующего (витрифицирующего) раствора криопротектора составляет 15% Gl (30% Gl + 0,73 M SA); 10% Gl (30% Gl + 0,58 M SA); 5% Gl (25% Gl + 0,58 M SA); - (25% Gl + 0,44 M SA) соответственно для каждого типа капилляров. Время экспозиции биообъектов в эквилибрирующем растворе — 10 мин, а в витрифицирующем — 1–1,5 мин при температуре 20 ± 2 °C. Замораживание осуществляется прямым погружением капилляров в жидкий азот, а оттаивание — в водяную баню, нагретую до температуры 40 °C, с применением магнитной мешалки для перемешивания теплоагента. Замораживание-оттаивание капилляров диаметром 0,5 и 0,3 мм проводится с применением термозащитных чехлов для исключения рекристаллизации при переносе контейнеров из жидкого азота в водяную баню. Скорости замораживания (оттаивания) составляют 28 (42); 104 (126); 198 (216) и 320 (380) °C/с соответственно. Криопротектор выводится в растворе сахарозы концентрацией 0,7; 0,6; 0,5; 0,3 М соответственно для каждой установленной группы в течение 10 мин при комнатной температуре. Сохранность деконсервированных эмбрионов мыши по группам составляет: 73,3 (33/45); 77,1 (37/48); 90 (45/50); 95,8% (45/46) соответственно.

Установлено, что увеличение скорости теплообмена пластикового капилляра в 10 раз относительно общепринятого способа витрификации ($B_3 \approx 30$ °C/с) позволяет уменьшить концентрацию как эквилибрирующего, так и витрифицирующего растворов криопротектора на 15% и повысить сохранность девитрифицированных эмбрионов мыши на 22,5%. Однако процесс витрификации биообъектов более технологичный для капилляров с диаметром 1 и 1,8 мм, чем 0,3 и 0,5 мм. Это обусловлено определенными сложностями, возникающими как при изготовлении капилляров малого диаметра, так и при их использовании в процессе криоконсервирования. Исходя из полученных данных рекомендуем для применения в практике витрификации ооцитов и эмбрионов млекопитающих при сверхвысоких скоростях теплообмена способ закрытых вытянутых капилляров диаметром 1 мм. Данный способ позволяет повысить уровень сохранности деконсервированных биообъектов по сравнению с общепринятыми и является наиболее технологичным из предлагаемых способов.

УДК 57.043: [576.371+591.3]: 599

Развитие технологий криоконсервирования половых клеток и эмбрионов млекопитающих

Л. В. ГОРБУНОВ, А. В. МЕДВЕДОВСКИЙ

Харьковский биотехнологический центр, пос. Кулиничи

Проблема выбора приоритета дальнейшего развития перспективных технологий криоконсервирования биологического материала требует проведения сопоставительного анализа особенностей двух альтернативных методов: первый основан на применении медленных скоростей замораживания ($B_3 \leq 100$ °C/мин), второй — высоких ($B_3 \geq 2 \cdot 10^3$ °C/мин). Достоинством первого метода относительно второго является более высокий уровень сохранности ооцитов и эмбрионов млекопитающих, а недостатком — его низкая технологичность.

Улучшить технологию криоконсервирования, основанную на применении медленных скоростей замораживания, можно, используя пассивное остывание термоблока в горловине сосуда Дьюара ($B_3 \neq$ const) (Н. Д. Безуглый, Л. В. Горбунов, 1998).

Матеріал, захищений авторським правом

Повышение уровня сохранности деконсервированных репродуктивных клеток также реализуется при использовании сверхвысоких скоростей замораживания-оттаивания ($B_3 \geq 5 \cdot 10^3$ °С/мин) (Vajta et al., 1998).

Полагаем, что дальнейшее совершенствование технологий криоконсервирования биоматериала следует проводить по трем направлениям. Первое реализуется за счет обезвоживания клеток ($B_3 \leq 100$ °С/мин, $B_3 \neq$ const). Второе базируется на стекловании вне- и внутриклеточной среды ($B_3 \geq 5 \cdot 10^3$ °С/мин). Третье основано на совместном воздействии дегидратационных и витрификационных внутриклеточных эффектов. Целью такой комбинации является объединение достоинств и устранение недостатков, присущих каждому из двух представленных выше методов.

Ускорить решение существующей проблемы можно проведением не только эмпирических, но и теоретических исследований. Для количественного описания зависимости уровня сохранности деконсервированного биообъекта от степени кристаллообразования внутриклеточной среды необходимо: разработать метод количественной оценки жизнеспособности половых клеток и эмбрионов; определить критические зоны и предельно допустимые уровни вероятности вне- и внутриклеточного кристаллообразования в соответствии с типом, составом и концентрацией применяемых криопротекторов при заданных скоростях замораживания-оттаивания.

Нами разработано устройство, предназначенное для количественной регистрации процесса кристаллообразования в широком диапазоне концентрации криопротектора (0–50%) и скорости охлаждения (0–30 °С/с) с одновременной регистрацией изменения температуры и электропроводимости исследуемого раствора и последующей их обработкой (Л. В. Горбунов, 1998). Для измерения сверхвысоких скоростей теплообмена ($B \geq 6 \cdot 10^3$ °С/мин) предложен кондуктометрический способ, позволяющий определять численные значения условий криоконсервирования с погрешностью не более 3% для контейнеров, содержащих среду с глицерином концентрацией $C \geq 30\%$ (Л. В. Горбунов, 2000). Предложен метод оценки эффективности проведения технологии криоконсервирования, основанный на учете относительной жизнеспособности биообъекта (Л. В. Горбунов, А. Д. Бугров с соавт., 2000). Использование данного метода дает возможность свести к минимуму влияние индивидуальных свойств эмбрионов млекопитающих, вносящих систематическую погрешность в результат оценки.

УДК 57.043: 578.81

Проблемы сохранения вирусов и вируссодержащего материала

М. Ю. СТЕГНИЙ

Национальная фармацевтическая академия Украины, г. Харьков

В общем спектре задач, стоящих перед криобиологией, важное место занимает проблема криоконсервирования биологических объектов в жизнеспособном состоянии без изменения их исходных биологических свойств. Учитывая неблагоприятные факторы, реализуемые в процессе консервации, а при замораживании – это температурно-осмотический шок, осмотические эффекты, механический фактор повреждения растущими кристаллами льда, резкое изменение кислотности и ионной силы растворов, очень важной задачей является изучение механизмов криоповреждения и криозащиты и разработка эффективных технологий криоконсервирования, обеспечивающих сохранение генетического аппарата биологических объектов.

Решение проблемы сохранения вируссодержащих препаратов и маточных расплодок промышленных штаммов вирусов занимает одно из ведущих мест в биотехнологии производства эффективных иммунобиологических средств для лечения, профилактики и диагностики заболеваний человека и животных.

При сравнительном изучении эффективности режимов консервирования вирусов нами установлено, что хранение в течение года вакцинного штамма (В8-78) вируса синдрома снижения яйценоскости (ССЯ-76) в условиях гипотермии (4 °С) приводит к потере его инфекционной активности. Хранение при –20 °С также сказывается неблагоприятно на инфекционной и иммуногенной активности вируса. За тот же период хранения титр инфекционной активности вируса снизился на 4–5 lg по сравнению с контролем. При температуре –40 °С в течение года активность вируса падает на 2 порядка.

Замораживание вакцинного штамма и полевого изолята (L-497) до температуры жидкого азота со скоростью 300–400 °С/мин обеспечивает сохранность их инфекционной активности на исходном уровне. В этом случае иммуногенность вакцинного штамма также не отличается от уровня исходной.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что разработанный режим криоконсервирования вирусов ССЯ является оптимальным и позволяет сохранить инфекционность обоих штаммов и иммуногенность вакцинного штамма на исходном уровне.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043: [582.951.4+582.783]: 581.817

Методы криоконсервирования меристем картофеля и винограда

Т. Ф. СТРИБУЛЬ, А. Н. НОВИКОВ, С. Т. ОЛЕЙНИК

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Проблема повышения качества продукции сельскохозяйственного производства, поддержания необходимого разнообразия исходного биологического материала с целью создания новых высокоурожайных гибридов и сортов, устойчивых к неблагоприятным факторам среды, ставит задачу сохранения генетических ресурсов растений. Решение этой задачи возможно, в частности, путем криоконсервирования репродуктивных органов, клеток и тканей растений, хранения их при низких температурах и изъятие по требованию селекционеров.

Метод криоконсервирования растительных тканей и клеток включает как необходимый этап культивирование их до замораживания. Следующим этапом криоконсервирования биологического объекта является насыщение его защитными веществами. В настоящей работе отработана методика равномерного насыщения меристем криопротектором, а также отмывания деконсервированных меристем от защитной среды.

В известных методиках криоконсервирования меристемальной ткани в качестве криопротектора используется диметилсульфоксид (ДМСО). Однако в последнее время накоплены экспериментальные данные о токсическом действии ДМСО на биообъекты, в том числе на геном, что вызывает необходимость ограничивать его применение в качестве криопротектора. Поэтому в данной работе, наряду с ДМСО, мы исследовали в качестве криопротекторов ряд веществ из других химических классов (амидов, диолов, ПЭО) и выделили несколько перспективных криопротекторов, при замораживании с которыми получены хорошие результаты жизнеспособности меристем.

Криоконсервирование меристем картофеля и винограда проводили по медленным многоэтапным, приближающимся к экспоненциальным, режимам замораживания со скоростью охлаждения на первом этапе 0,3–1 °С/мин. Изготовлена лабораторная установка для замораживания меристемальной ткани с низкими скоростями охлаждения. При этом использован наиболее эффективный способ устранения переохлаждения в контейнере при замораживании меристем.

Изготовлены также лабораторные модели для быстрых скоростей замораживания и размораживания меристем с использованием порошковых хладоносителей и ртути. Это позволило увеличить скорости охлаждения и отогрева объекта на первом этапе криоконсервирования примерно в 5 раз по сравнению с традиционно используемыми парами жидкого азота (на этапе замораживания) и водяной баней (при отогреве).

Меристему картофеля замораживали по медленным (до –40 и до –196 °С) и быстрым режимам (до –196 °С). Меристему винограда – только по медленной программе.

После отогрева меристемы культивировали в течение 2–3 недель. Оценку жизнеспособности проводили визуально по сохранению меристемальными клетками зеленой окраски и по их росту. Жизнеспособность деконсервированных меристем как после медленного, так и после быстрого замораживания в разных вариантах составила 26–70%.

УДК 542.943/547.42

Озонированные криопротекторы и криоконсерванты

А. А. КОСТЯЕВ

НИИ гематологии и переливания крови, г. Киров, Россия

Проблемы, связанные с изучением стабилизирующих и консервирующих растворов для различных биологических объектов и создания принципиально новых безопасных технологий их низкотемпературного консервирования, определяют интерес к структурным изменениям молекулы криозащитных препаратов.

Цель работы – изучение (по динамике полос поглощения функциональных химических групп в УФ/ВС и ИК-спектрах веществ) влияния стерилизующих режимов автоклавирования и озонирования на структуру молекулы криозащитных соединений. Объектом исследования служили мономеры – спирты, амиды аминокислот, оксиды, искусственные полимеры химических соединений и многокомпонентные криозащитные среды (криоконсерванты) в виде нестерилизованной формы (А), а также стерилизованной автоклавированием (В) по традиционной технологии или озонированием (С) (А. А. Костяев и соавт. Пат. № 2120211 RF). Инфракрасные спектры образцов регистрировали на спектрофотометрах "Specord 75 IR" или

Матеріал, захищений авторським правом

"Specord M-80" в диапазоне волновых чисел 4 000 – 500 см$^{-1}$.

Сравнение спектров опытных проб DMSO, Glycerolum, PVP, 1,2-propandiolum, A-378, Haemgelum и др. показывает, что все остальные спектральные характеристики изученных веществ не искажаются после воздействия стерилизации в режиме повышенного давления и высокой температуры. Исключение составили PVP и Gemodesum. В спектрах этих препаратов выявлены изменения частных характеристических частот после дозированного воздействия заданными концентрациями озона у чистого PVP (в меньшей степени) и PVP в составе Gemodesum. Получены новые научные данные о свойствах криоконсервантов. Сделан важный практический вывод: PVP и PVP-содержащие консерванты не подлежат стерилизации озоном.

При участии ведущих криобиологов Кировского НИИ гематологии и переливания крови, других центров России, ИПКиК НАН Украины впервые составлены и опубликованы в России в 2000–2001 гг. атласы инфракрасных спектров криоконсервантов для клеток животного и растительного происхождения. Для удобства и информативности все субстанции и соединения в атласах классифицированы в соответствии с их химической природой. Кроме того, указаны: описание образца, химическое название, структурная или брутто-формула, молекулярная масса, температуры плавления и кипения, а также другие физические характеристики, взятые из каталогов. Дополнительно указан источник (если он известен) происхождения реактива (предприятие-изготовитель или страна). Атласы получили положительную оценку криобиологов, физиологов, медиков, ветеринаров, ботаников и криминалистов.

УДК 615.361.018.45.014.413.003.13

Экономическая оценка криоконсервирования костного мозга в региональном гематологическом центре

А. А. КОСТЯЕВ

НИИ гематологии и переливания крови, г. Киров, Россия

В настоящее время исследованию прогностической ценности параметров качества жизни в онкогематологии уделяется все большее внимание с учетом применения дорогостоящих высокотехнологичных вмешательств и нозологических форм, имеющих длительное хроническое течение и часто необратимое развитие. Фармакоэкономический анализ позволяет изучить экономическую целесообразность методов лечения больного и сделать объективный выбор максимально эффективных программ (стандартов) лечения при минимальных затратах, что особенно важно в современных условиях.

Цель работы – дать сравнительную экономическую оценку методам консервирования костного мозга с высокой сохранностью миелокариоцитов в традиционном режиме медленных линейных программ охлаждения в жидком азоте и быстрого двухступенчатого замораживания с остановкой при промежуточной температуре холодовой адаптации клеток и хранении в электрических морозильниках (–40 ÷ –80 °C).

Использовались данные лаборатории консервирования крови и тканей Кировского НИИ гематологии и переливания крови за 2000–2001 гг. Рассчитывали (1 USD = 29 российских руб.) затраты на эксфузию костного мозга (1-й этап), сепарацию миелоэксфузата (2-й этап), подготовку и криоконсервирование костного мозга (3-й этап), размораживание костного мозга и подготовку его к одной операции ТКМ (4-й этап).

Заработная плата по традиционному и новому методам составила соответственно 7,68 и 6,99; начисление на зарплату – 2,73 и 2,48; материальные затраты – 923,11 и 927,44; затраты на лабораторную посуду и спецодежду – 212,79 и 204,22; износ оборудования стоимостью более 172,4 – 77 393,92 и 45 412,92, стоимостью до 172,4 – 2 500,97 и 2 439,75; отчисления – 8,55 и 14,5; косвенные расходы – 751,93 и 891,306. В целом затраты составили соответственно 81 054,98 и 49 012,52 USD.

Таким образом, экономический эффект от консервирования костного мозга в режиме быстрого двухступенчатого замораживания в электрических морозильниках при умеренно низких температурах по сравнению с традиционным линейным методом замораживания в жидком азоте составляет на 1 операцию 32 042,46 USD или 929 231,34 российских рублей и слагается главным образом из уменьшения расходов на выполнение 3-го этапа операции с учетом применения электрических морозильников, дешевого и нетоксичного жидкого хладагента, эластичных упаковок и упрощения технологии. Данные проведенных исследований говорят о том, что применение метода консервирования костного мозга замораживанием при умеренно низких температурах в режиме быстрого двухступенчатого замораживания в лаборатории консервирования крови и тканей КНИИГПК выгодно экономически и клинически целесообразно.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 615.361.014.41: 579.841.11.861.2

Сохранность жизнеспособности и биологических свойств бактерий *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* в процессе криоконсервирования

И. П. ВЫСЕКАНЦЕВ, Т. М. ГУРИНА, О. В. ШАПОВАЛОВА, О. Н. БЕЛОКОНЬ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Институт дерматологии и венерологии АМН Украины, г. Харьков

Цель исследования — изучение влияния режимов охлаждения и последующего хранения в жидком азоте на жизнеспособность и биологические свойства бактерий *S. aureus* АТСС 25 923 и *P. aeruginosa* АТСС 27 853.

В качестве консервирующей среды использовали мясо-пептонный бульон с добавлением 5%-й сахарозы. Суспензии бактерий замораживали в криопробирках Cryo-Tubes "Greiner-Labortechnik" (Germany) объемом 2 мл. Было установлено, что замораживание по различным программам может приводить к достоверному снижению количества жизнеспособных бактерий. При последующем хранении образцов в жидком азоте в течение года количество жизнеспособных бактерий не изменялось, а также не наблюдалось изменений или потерь ряда биологических свойств бактерий.

Изучались биологические свойства *S. aureus* АТСС 25 923: гемолиз эритроцитов, лецито-вителлазная реакция, синтез плазмокоагулазы, каталазы, ДНКазы, фосфатазы, ацетоина, способность к ферментации углеводов маннита, мальтозы, сахарозы, маннозы.

Изучались биологические свойства *P. aeruginosa* АТСС 27 853: синтез пигментов пиоцианина и пиовердина, способность к росту при 42 °С на селективной среде "Псевдомонас АПС", синтез цитохромоксидазы, нитратредуктазы, аргинингидролазы, желатиназы, чувствительность к хлориду бария, окисление маннита на среде Хью–Лейфсона, подвижность, образование сероводорода, способность к ферментации углеводов глюкозы, сахарозы, инозита, отсутствие ферментов, окисляющих сорбит, мальтозу, рамнозу.

Полученные результаты свидетельствуют о высокой эффективности хранения при стабильной температуре жидкого азота как способа консервирования бактерий *S. aureus* и *P. aeruginosa*.

УДК 615.361.014.41: 616-006.6

Криоконсервирование клеток карциномы Герена

Т. Ф. ПЕТРЕНКО, Н. Е. УЗЛЕНКОВА, Е. В. КУДОКОЦЕВА, Т. М. ГУРИНА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Институт медицинской радиологии им. С. П. Григорьева АМН Украины, г. Харьков

Опухоль Герена как модельная система используется при скрининге противоопухолевых препаратов. Чтобы избежать постоянных перевивок через 13–17 дней и для создания резерва опухолевых клеток возникла необходимость их криоконсервирования.

При выборе режима криоконсервирования использовали три программы, разработанные в ИПКиК НАН Украины для других опухолевых клеток (карциномы Эрлиха, перевиваемых клеточных линий):

охлаждение со скоростью 3–4 °С/мин до –70 °С с последующим погружением в азот (программа I);

охлаждение со скоростью 30–40 °С/мин до –28 °С, 15-минутная остановка при –28 °С, затем погружение в азот (программа II);

быстрое охлаждение до –196 °С непосредственным погружением в азот (программа III).

В первой серии экспериментов суспензию клеток карциномы Герена замораживали в физиологическом растворе по трем программам без криопротектора. Программы I и II обеспечивали всего лишь около 20% жизнеспособных клеток. Быстрое охлаждение приводило почти к полной гибели клеток. Во второй серии экспериментов клетки замораживали в физиологическом растворе с 5- и 10%-м ДМСО по трем программам. Введение в среду замораживания криопротектора повысило выживаемость клеток до 80–90%. Различий в выживаемости клеток, замороженных под защитой ДМСО в исследуемых концентрациях, а также замороженных по программам I и II, не отмечено. Использование криопротектора при замораживании непосредственным погружением проб в жидкий азот (–196 °С) сохраняло около 10% жизнеспособных клеток.

Матеріал, захищений авторським правом

Основным показателем при выборе режима криоконсервирования служила приживаемость клеток карциномы Герена лабораторным животным.Суспензию клеток размораживали при 41 °С. Размороженную суспензию вводили подкожно беспородным крысам по 0,5 мл из расчета 1 г опухолевой ткани на 5 мл физиологического раствора.

Начиная с 7-х суток, проводили наблюдение за динамикой роста нативных и криоконсервированных опухолей. Опухоли сформировались во всех случаях, кроме группы животных, которым прививали суспензию клеток, охлажденную погружением в жидкий азот без криопротектора. При таком же режиме охлаждения с использованием криопротектора опухоли развивались, но размеры их были значительно меньше контрольных и гибель животных наступала на 2 месяца позже.

При прививке суспензии клеток, замороженной по программам I и II с криопротектором, динамика роста опухолей была несколько замедлена по сравнению с контрольной группой и смертность наступала на 10 суток позже. У группы животных, которым прививали суспензию клеток, замороженную по программам I и II без криопротекторов, опухоли формировались, но динамика роста была ниже, чем в контрольной группе и в двух опытных, где суспензию замораживали под защитой криопротекторов.

Таким образом, суспензии клеток опухоли Герена возможно криоконсервировать по программам, разработанным ранее для других опухолевых клеток, используя в качестве криопротектора 5%-й ДМСО.

УДК 57.043: 591.3: 598.6

Замораживание клеток ранних эмбрионов кур

М. Т. ТАГИРОВ, А. Б. АРТЕМЕНКО, Ю. В. КАЛЬЧЕНКО

Институт птицеводства УААН, Борки, Харьковская обл.

Криоконсервирование спермы птиц и накопление в низкотемпературном банке ее запаса не позволяют быстро восстановить исчезнувший вид, породу или линию птиц. Криоконсервирование эмбрионов способствовало бы решению этой задачи в течение одного поколения. Возможность замораживания передней части эмбриона птиц до температуры жидкого азота была показана еще в 1954 году, но получить из такого эмбриона полноценную особь вряд ли можно.

В Институте птицеводства УААН проведены исследования по разработке метода криоконсервирования эмбрионов кур, выделенных из свежеснесенных яиц. Эмбрионы замораживали под защитой 1,2-пропандиола (ПД) до температуры –79 °С, при этом их сохранность составляла 24%. Охлаждение до более низких температур сопровождалось гибелью всех эмбрионов. В 1990 году появилось первое сообщение о создании химер кур инъекцией суспензии эмбриональных клеток через отверстие в скорлупе яйца соответствующей стадии развития. Это позволяет существенно расширить возможность сохранения генофонда птиц криоконсервированием суспензии эмбриональных клеток, сохранивших тотипотентные свойства. Тем более криоконсервирование суспензии клеток является более легкой задачей, чем целого эмбриона, имеющего сложную структурную организацию со слабыми межклеточными связями.

Был разработан метод криоконсервирования эмбриональных клеток. В качестве криопротектора использовался диметилсульфоксид (ДМСО) в конечной концентрации 10% с медленным ступенчатым введением его в суспензию эмбриональных клеток при 20 °С. Клетки охлаждали со скоростью 1 град/мин до –30 °С с последующим погружением в жидкий азот. При этом целостность клеток, определенная этидиум бромидом, составляла 80–90%.

При разработке метода консервирования была проверена токсичность ДМСО, глицерина (ГЛ), этиленгликоля (ЭГ) и 1,2-ПД долговременной инкубацией в среде, содержащей криопротектор. Криозащитные соединения по мере увеличения их токсичности располагались в следующем порядке: ДМСО, ГЛ, ЭГ, 1,2-ПД. Ранее было показано, что наименьшую токсичность на куриных эмбрионах проявляет 1,2-ПД. Вероятно, это объясняется тем, что эмбрионы находились в среде с 1,2-ПД всего лишь в течение часа и, возможно, он оказывает минимальное воздействие на межклеточные взаимодействия, которые определяют развитие эмбрионов.

Вместе с тем эффективное время воздействия криопротектора на клетки при их консервировании не превышает 1–2 ч. Целостность мембран клеток, определяемая по окрашиванию этидиум бромидом, не дает объективной оценки функционального состояния этих клеток. Поэтому для сравнения эффективности замораживания под защитой ДМСО и 1,2-ПД жизнеспособность клеток определялась в культуре (степень прикрепления клеток к подложке). Количество прикрепившихся клеток после инкубации в растворе соответствующего криопротектора в течение 1,5 ч составило $44{,}3 \pm 5{,}1$ и $75{,}2 \pm 2{,}3\%$ при использовании ДМСО и 1,2-ПД соответственно (при $P < 0{,}0001$). Количество прикрепившихся клеток после замораживания-оттаивания составило $37{,}0 \pm 5{,}9$ и $67{,}4 \pm 5{,}9\%$ при использовании ДМСО и 1,2-ПД соответственно (при $P < 0{,}01$).

Таким образом, при криоконсервировании суспензии эмбриональных клеток в качестве криопротектора следует использовать 1,2-ПД.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 636.2.082.453.5

Использование холодильных машин для хранения биоматериалов

В. В. СИВОПЛЯС, Ф. И. ОСТАШКО, Н. Ф. ИВЧЕНКО, С. Н. ИВЧЕНКО

ОАО "Холод", г. Киев

Харьковский биотехнологический центр, пос. Кулиничи

Современная система воспроизводства сельскохозяйственных животных базируется на длительном хранении спермопродукции в жидком азоте. В Харьковской области затраты на хранение составляют в среднем 243 грн/год на каждый сосуд Дьюара типа Х-34М без учета потерь азота при транспортировке. Новая технология основана на применении холодильного агрегата КНХ-135-5 разработки ОАО "Холод" и МНПО "Эмбрион", способного поддерживать температуру в пределах –80 ÷ –150 °С. Этот агрегат работает на многокомпонентной рабочей смеси, потребляя электрическую энергию напряжением 110–220 В. По сложности обслуживания он сравним с бытовым холодильником. Агрегат имеет рабочую камеру объемом 5 л, выполненную на основе стандартного сосуда Дьюара. На случай непредвиденного отключения электропитания машина снабжена аккумулятором холода, что дает возможность поддерживать необходимую температуру в рабочей камере до 3–5 сут. Данный агрегат в режиме хранения биоматериалов потребляет около 2 кВт·ч электроэнергии в сутки, что при нынешней стоимости электроэнергии составляет ≈ 90 грн/год на один холодильник. Снижение затрат на хранение биоматериалов будет еще более ощутимо при использовании более высоких температур. По данным Осташко Ф. И., Пушкаря Н. С., Белоуса А. М., Вишневского В. О. а также ряда зарубежных авторов, процессы рекристаллизации в хранимой текстуре биоматериала появляются, начиная с температуры –50 °С. Кроме того, процессы протекают в межклеточном пространстве, а не в протоплазме спермиев, которые остаются интактными. Исследования активности, выживаемости и оплодотворяющей способности спермы, разделенной на две группы методом разделенного эякулята и сохраняющейся длительное время в жидком азоте (первая группа) и в камере холодильного агрегата при температуре –130 °С (вторая группа), показали, что изменение температуры хранения от –196 до –130 °С не повлияло отрицательно на качество спермы. Так, при проверке оплодотворяющей способности на базе КСП "Родина" Лозовского района Харьковской области было осеменено 107 голов крупного рогатого скота спермой, замороженной в жидком азоте и длительное время сохраняющейся при температуре –130 °С в камере холодильного агрегата КНХ-135-5. В обоих случаях получен показатель оплодотворения на уровне 62%. Необходимо отметить, что модельный ряд холодильных установок, выпускаемый ОАО "Холод", постоянно пополняется новыми машинами, среди которых для нужд сельского хозяйства представляет большой интерес холодильный агрегат КНХ-135-20, разработанный специально для племпредприятий и лабораторий, работающих с долгохранящимися биоматериалами. Эта холодильная машина снабжена рабочей камерой объемом 20 л и способна поддерживать заданную температуру в пределах –80 ÷ –135 °С.

УДК 57.043.086.13

Низкотемпературное оборудование для криобиологии

Н. Ф. ИВЧЕНКО, С. Н. ИВЧЕНКО, А. В. МЕЛЬНИК

ОАО "Холод", г. Киев

Представлена информация о разработках ОАО "Холод" ряда низкотемпературных компрессионных холодильников с рабочими температурами от –40 до –150 °С и полезными объемами от 5 до 500 дм^3, предназначенных для хранения биоматериалов.

Оборудование создано на основе однокаскадного холодильного цикла с внутренней регенерацией, работающего на многокомпонентных смесях холодильных агентов. Рассмотрены основные отличия такого оборудования от двух- и трехкаскадного, основные принципы построения холодильных агрегатов на многокомпонентных смесях, особенности его работы, а также представлен системный подход к конструированию подобных низкотемпературных машин.

Особое внимание уделено вопросам конструирования малогабаритного оборудования и изложены представления о развитии оборудования под названием "Персональные криогенные банки".

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 615.361.018.53.014.413.08

Консервирование лейкоцитов замораживанием с новым криоконсервантом по экспоненциальной программе

Е. П. СВЕДЕНЦОВ, Т. В. ТУМАНОВА, С. А. ХОМЯКОВА, С. В. УТЕМОВ, А. А. КОСТЯЕВ, А. Н. СЕМЕНОВ

Институт физиологии КНЦ УрО РАН

Кировский НИИ гематологии и переливания крови

Разработан хладоограждающий раствор для замораживания лейкоцитов человека при умеренно низкой температуре на основе вещества А-378, обладающего криозащитными свойствами и имеющего малую токсичность (его $ЛД_{50}$ равна 15,5 ± 0,6 к/кг массы тела мыши), антиоксиданта, лимонной кислоты, которые участвуют в цикле Кребса и способствуют восстановлению биоэнергетики клетки после ее выхода из обратимого холодового анабиоза, и бидистиллированной воды, *pH* раствора 7,0–7,4. Суспензию лейкоцитов смешивали с криоконсервантом в соотношении 1:1. Эквилибрацию клеток в конечном растворе осуществляли 20 мин. Лейкоциты охлаждали по двухступенчатой экспоненциальной программе до –50 °С. Оттаивание клеток выполняли в водяной ванне при 38 °С в течение 45–60 с при покачивании пластикового контейнера 3–4 раза в секунду. Проведен 31 лабораторный эксперимент. После замораживания-отогрева при оптимальном составе криоконсерванта сохранилось 82 ± 10% клеток от исходного количества. Проба с витальным красителем выявила 71 ± 8% жизнеспособных лейкоцитов. Фагоцитарная активность лейкоцитов составила 76 ± 5%.

Полученные данные свидетельствуют о выраженной криопротекторной активности нового хладоограждающего раствора и возможности его эффективного применения для замораживания лейкоцитов в пластиковых контейнерах по экспоненциальной программе при умеренно низкой температуре.

УДК 615.361.013.68.014.413

Кріоконсервування і клінічне застосування гемопоетичних клітин пуповинної (кордової) крові

П. М. ПЕРЕХРЕСТЕНКО, Г. Т. ГЛУХЕНЬКА, Т. О. КАЛИНИЧЕНКО, С. О. СІВКОВИЧ, Г. А. ГУБАРЕВА, Р. П. ПАВЛЮК, Н. К. СКАЧКОВА, М. К. АЛГАЗІНОВА

Інститут гематології та трансфузіології АМН України, м. Київ

Інститут онкології АМН України, м. Київ

Розроблено способи низькотемпературного консервування гемопоетичних клітин (ГК) нефракціонованої і фракціонованої кордової крові (КК). Пріоритетність захищена патентом (Пат. України № 30014 від 15.11.2000 р.).

В основу фракціонування покладено метод осадження еритроцитів за допомогою плазмозамінного розчину, який містить 6% гідроксиетилкрохмалю ("Стабізол"). Метод забезпечує максимальний вихід ядровмісних клітин, високу їх життєздатність, мінімальну кількість кріопротектора і не потребує спеціальної підготовки розмороженої зависі до трансфузії.

Для створення довгострокових запасів ГК КК використовуються розроблені технології консервування як нефракціонованої, так і фракціонованої КК.

Показаннями до застосування гемопоетичної тканини є депресії імуногемопоезу різного ступеня виразу — основна проблема, яка виникає при хіміопроменевому лікуванні пацієнтів онкологічної клініки. Однією з таких категорій є хворі на злоякісні лімфоми, неадекватність лікування стану депресії кровотворення яких призводить до негативних наслідків: посилення прояву цитотоксичної хвороби у вигляді глибокої мієлодепресії — у разі продовження протипухлинної терапії, або суттєвого зниження ефективності радикального лікування — у випадку його переривання на невизначено тривалий час.

Кордова кров — тканина з високим вмістом ГК, якій характерна відносна імунотолерантність. Потенціал протипухлинної цитотоксичності, що визначається вмістом і зрілістю природних кілерів (ПК) та близькою до ПК активністю клітин, дає підстави сподіватися на протипухлинну ефективність цієї тканини.

Враховуючи вищезазначене, використання КК в онкологічній клініці слід вважати перспективним.

Матеріал, захищений авторським правом

Метою дослідження було вивчення ефективності виведення хворих на злоякісні лімфоми зі стану стійкої гіпоплазії кровотворення за допомогою кріоконсервованих ГК КК.

Для клінічного застосування використовували технологію кріоконсервування нефракціонованої КК з подальшим вилученням гемолізату еритроцитів із розмороженої клітинної завісі і ресуспендуванням клітин у плазмозамінному розчині.

Об'єм кріоконсервованих клітин КК для клінічного застосування у хворих на злоякісні лімфоми у середньому складав 50 мл з кількістю ядровмісних клітин не нижче за $1{,}5 \cdot 10^9$ та мононуклеарних – $(0{,}5–0{,}6) \cdot 10^9$. Цілість життєздатних клітин КК складала $89{,}00 \pm 0{,}61\%$. Перед трансфузією ГК КК необхідно було проводити дослідження групової та резус-належності крові і індивідуальної сумісності.

Ефективність трансфузій полягала у підвищенні показників периферичної крові, клітинного і гуморального імунітету, в тому числі всіх показників фагоцитарної активності нейтрофілів, що починало проявлятися на 6–7 добу. Ефект, який досягався, був стійким і не потребував подальшої корекції, що дозволяло проводити променеву і хіміотерапію не перериваючи курсу лікування. При цьому динаміка вмісту фетального гемоглобіну в периферичній крові хворих до і після трансфузії дала змогу констатувати достовірне його збільшення, що вважали показником тимчасового приживлення клітин КК.

Таким чином, механізм дії ГК КК при лікуванні хіміопроменевої депресії кровотворення у онкологічних хворих полягає у тимчасовому приживленні клітин, гуморальній стимуляції кровотворення реципієнтів, яка викликається унікальною здатністю клітин КК до аутокринної продукції гемопоетичних факторів росту. При цьому ефективність трансфузій є достовірним критерієм біологічної повноцінності кріоконсервованих ГК.

Відсутність у реципієнтів КК будь-яких посттрансфузійних реакцій є підтвердженням думки більшості зарубіжних дослідників КК про відносну толерантність її імунокомпетентних клітин.

УДК 57.086.132: 579

Практика депонування штамів мікроорганізмів

В. С. ПІДГОРСЬКИЙ, Т. М. ГОЛОВАЧ, В. І. СУДЕНКО

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, м. Київ

Депозитарій мікроорганізмів, створений при Інституті мікробіології і вірусології, є єдиною в Україні офіційно затвердженою установою, яка проводить гарантоване державне зберігання непатогенних мікроорганізмів. Протягом останніх років в інституті закладена основа колекції патентних та промислових штамів мікроорганізмів, які є об'єктами інтелектуальної власності.

Більша частина депозитів надходить без розроблених і рекомендованих методів довготривалого зберігання, тому необхідні додаткові дослідження. Для зберігання застосовуються сублімаційне висушування, заморожування при $-45 \div -60$ °С, а також методи рутинних пересівів та утримання під шаром вазелінового масла. Для консервації використовували клітини в стаціонарній фазі росту.

Установлено, що захисні суспензійні середовища (сахарозо-желатинове, знежирене молоко, лимонно-кислий натрій, гліцерин, етиленгліколь та деякі інші) проявляють виражену протекторну дію при заморожуванні і/або ліофілізації досліджених штамів. Для підсилення захисної дії до складу середовища вводили антиоксидант - аскорбінову кислоту. Присутність продуктів метаболізму, зокрема молочної чи пропіонової кислот, пагубно впливає на виживання клітин штамів.

Показано, що негативний вплив заморожування на життєздатність бактерій і дріжджів проявляється слабо. Летальні пошкодження не перевищують 6% клітин. Однак подальше зберігання культур призводить до поступової втрати життєздатних клітин внаслідок дії нелетальних пошкоджень і біохімічних реакцій.

Процес сублімації приводить до значно більшої втрати життєздатних клітин, ніж при заморожуванні. Виживання клітин залежить, нарівні з іншими факторами, від їх видової приналежності. Найбільш стійкі до холодового стресу при заморожуванні, сублімаційному висушуванні і подальшій регідратації є пропіоновокислі, оцтовокислі бактерії, бацили, лактобацили та галобактерії, титр клітин яких безпосередньо після висушування сягає 80–100% вихідного, а у випадках розриву(подрібнення) ланцюжків чи конгломератів клітин – перевищує початковий. Більш чутливі до процесу ліофілізації окремі штами псевдомонасів, бактерії роду Acinetobacter. Процент життєздатних клітин по відношенню до початкового у них суттєво варіює і знижується в залежності від штаму та умов отримання біомаси до рівня 4–10%. Втрата життєздатних дріжджових клітин при сублімації сягає 43–56%, а у окремих штамів *Pichia guilliermondii* – 80%. Загибель клітин при ліофілізації менша при вирощуванні культур на агаризованих середовищах.

Зберігання культур протягом 1–5 років у сублімовано-висушеному стані дозволило встановити, що практично для всіх груп мікроорганізмів характерні зниження титру життєздатних клітин у перші

Матеріал, захищений авторським правом

2–5 міс після ліофілізації і стабілізація цього показника при подальшому зберіганні. Очевидно, якраз у перші місяці дають себе знати скриті (нелетальні) дефекти клітин, отримані при ліофілізації. Винятком виявленої закономірності є окремі штами роду *Acinetobacter*, галобактерії, що постійно поступово втрачають життєздатність при зберіганні. Витримують ліофільне висушування та зберігають життєздатність штами грибів, що характеризуються значним утворенням спор.

Серед досліджених депозитів виявлені і такі, що не переносять ліофілізації і зберігання у замороженому стані. Це асоціативні культури грибів, окремі компоненти яких кріолабільні і швидко втрачають життєздатність.

УДК 57.043: 591.463.1: 597.554.3

Изучение криоустойчивости спермиев карпа (*C. Carpio*) в связи с особенностями активации движения

Б. Б. ДЗЮБА, С. И. ДРОКИН, Е. А. БЕРЕЖНАЯ, О. В. ГАМОЛИНА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина

Как известно, спермии карпа в семенниках находятся в неподвижном состоянии и становятся подвижными после попадания в гипотонические условия окружающей среды. Это явление называют активацией движения. После непродолжительного (как правило, до 2-х минут) периода движения спермии становятся неподвижными. Однако при создании необходимых условий – помещение спермиев после прекращения движения в изотоническую по сравнению со спермальной плазмой среду – возможна повторная активация движения (так называемая реактивация).

Учитывая особенности активации спермиев карпа и актуальность изучения связи осмотических воздействий на биологические клетки с их криобиологическими характеристиками, целью настоящей работы явилось изучение возможности криоконсервирования спермиев карпа после их активации и реактивации спермиев после замораживания-отогрева. Проведение данных исследований определяется также необходимостью поиска физиологических характеристик спермиев, позволяющих многократно использовать эякуляты ценных и редких видов карповых и предсказывать степень их криоустойчивости.

В работе были поставлены следующие задачи:

определить оптимальные условия для реактивации спермиев карпа;

изучить взаимосвязь между степенью набухания, скоростью набухания и сжатия в средах с различным осмотическим давлением и способностью к реактивации спермиев до и после криоконсервирования;

исследовать возможность криоконсервирования спермиев карпа после активации движения.

В работе использовали микроскопический метод определения подвижности спермиев, фотометрический метод регистрации изменений клеточного объема, 3-этапный метод криоконсервирования спермиев карпа.

В результате проведенных экспериментов было установлено:

1) для получения стабильно высоких результатов подвижности реактивированных спермиев (70–80% подвижных клеток) необходимо первый раз активировать движение спермиев растворами с осмотическим давлением не ниже 100 мОсмоль/кг. Оптимальное время выдерживания спермиев в изотонических условиях – 20 мин;

2) в результате разбавления криозащитной средой увеличивается скорость набухания спермиев во время активации и снижается скорость сжатия при переносе активированных спермиев в изотонические условия, увеличивается разброс показателей реактивации спермиев;

3) после активации движения спермиев и последующего замораживания-отогрева удалось создать условия, которые позволяют получить как минимум 5% подвижных клеток; способность к реактивации спермиев после замораживания-отогрева коррелирует со способностью клеток к реактивации до замораживания.

Полученные результаты позволяют предположить, что реактивация спермиев карпа связана с их способностью переносить перепады осмотического давления в период активации. Вероятно, возможность реактивации и криоустойчивость клеток являются взаимосвязанными характеристиками, так как определяются способностью мембран спермиев переносить перепады осмотического давления как в период активации, так и при замораживании-отогреве. Дальнейшее изучение этих свойств, возможно, приведет к разработке оптимальных методов криоконсервации спермы и ее использования.

Данные исследования проводились в рамках работ по Венгерско-украинскому договору № 2М/239-2000.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 615.361.013.16.014.41

Влияние факторов криоконсервирования на ооциты человека в условиях витрификации

Ф. В. ДАХНО, Л. Ф. КУЦЕНКО, Е. А. ГАСЕНКО

Институт репродуктивной медицины, г. Киев

Необходимость создания криобанка ооцитов человека очевидна. Создание витрификационных сред и использование методики микрокапли на алюминиевой фольге сделали это реальным. Негативной стороной этого метода являются непосредственный контакт биообъектов с жидким азотом и более высокая вероятность их потери. Этот вопрос требует дальнейшего изучения.

В качестве контейнера мы использовали кружочки алюминиевой фольги и витрификационную среду, в состав которой входили этиленгликоль, сахароза и фосфатно-солевой буфер. Всего криоконсервировали: незрелых ооцитов – 7, зрелых ооцитов на стадии М2 – 41, ооцитов на разной стадии дробления – 34 (из них 5 бластоцист).

На первых этапах витрификации после оттаивания по четырехступенчатой методике нам удалось получить ооциты и эмбрионы с сохраненной zona pellucida и цитоплазматической мембраной. Мы имеем следующие результаты:

зрелые ооциты М2 из 41 на ICSI взяли 28 (68,3%), оплодотворились 12 (42,9%), которые развивались максимально до стадии ранней морулы. Ни один из оплодотворенных ооцитов не развивался до бластоцисты;

все незрелые ооциты после оттаивания имели затемненную цитоплазму и из дальнейшего наблюдения были изъяты;

ооциты, взятые на витрификацию после дозревания, дали такие же результаты, как и зрелые М2;

эмбрионы после оттаивания пока не дали развития.

Таким образом, можно сделать следующие выводы:

1. Алюминиевая фольга в качестве контейнера в методике микрокапли позволяет получить скорость охлаждения 30 000 – 50 000 °С/мин.

2. Хорошая выживаемость отдельных ооцитов позволяет надеяться на улучшение их выживаемости после витрификации с последующим оплодотворением.

3. Наличие повреждений zona pellucida и затемнение цитоплазмы являются прогностически четкими критериями криоповреждения ооцитов и эмбрионов.

4. Витрификация ооцитов и эмбрионов человека является приемлемой методикой и должна получить дальнейшее развитие в методиках ВРТ.

УДК 615.361.811.013.014.413: 547.42: 57.085

Криоконсервирование эмбриональных нервных клеток крысы с использованием ДМСО

А. Н. СУКАЧ, А. Ю. ПЕТРЕНКО, М. С. ПЛАЧИНТА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

В настоящее время достаточно активно развивается новое медицинское направление – клеточная трансплантация. В частности, для лечения различных нейродегенеративных заболеваний используется трансплантация эмбриональных нервных клеток (ЭНК). Однако их широкое применение ограничивается отсутствием эффективного метода криоконсервирования вследствие высокой чувствительности ЭНК к действию низких температур. При криоконсервировании ЭНК наилучшие результаты получены с использованием криопротектора ДМСО, однако даже в этом случае жизнеспособность нервных клеток не превышает 30%. При этом зависимость сохранности ЭНК от концентрации ДМСО исследована не была. Цель работы – изучение влияния различных концентраций ДМСО на сохранность ЭНК крыс при их криоконсервировании в сахарозной и солевой средах.

Эксперименты проводили на 12 беременных самках беспородных белых крыс 12–18 дней гестации. ЭНК получали по специально разработанному методу. Все операции проводили при температуре 4 °С. Для получения клеток применяли солевую среду Хенкса и сахарозную среду. К суспензии клеток по каплям приливали раствор ДМСО в соответствующей среде до концентрации 2; 5; 10 и 15% (проценты объемные). Раствор криопротектора прибавляли таким образом, что концентрация клеток во всех образцах была одинаковой. Суспензию ЭНК (100–150 мкл) помещали в специальные контейнеры для замораживания и инкубировали в течение 30 мин на льду. Клетки замораживали с помощью быстрого экспоненциального охлаждения с остановкой при –25 °С до температуры жидкого азота (–196 °С). Количество клеток подсчитывали в камере Горяева до и после криоконсервирования.

Матеріал, захищений авторським правом

Жизнеспособность ЭНК определяли по прокрашиванию витальным красителем трипановым синим. Размораживали клетки при температуре 40 °С.

Проведенные исследования показали, что состав среды оказывает влияние на жизнеспособность ЭНК уже на этапе их выделения. Жизнеспособность ЭНК, полученных в сахарозной среде, была на 12% выше, чем в солевой. Эта зависимость жизнеспособности клеток от состава среды сохранялась и после их криоконсервирования. Так, жизнеспособность ЭНК при криоконсервировании без криопротектора в сахарозной среде составляла 23% и была почти в 2 раза выше, чем в солевой среде. Такая же зависимость сохранялась и при криоконсервировании нейроклеток с использованием ДМСО. При применении 2-х, 5-и и 10%-й концентрации криопротектора в сахарозной среде по сравнению с солевой средой жизнеспособность клеток была выше в 1,5, 1,3 и 1,4 раза соответственно. Следует отметить, что замораживание ЭНК с различными концентрациями ДМСО демонстрирует прямо пропорциональную зависимость жизнеспособности клеток от концентрации криопротектора в пределах от 0 до 10% в обеих исследуемых средах. Максимальная сохранность ЭНК наблюдалась при криоконсервировании клеток в сахарозной среде, содержащей 10%-й ДМСО. Применение для замораживания 15%-го ДМСО приводило к резкому падению жизнеспособности клеток вследствие его токсического эффекта.

Проведенные эксперименты указывают на предпочтительность использования для выделения и замораживания ЭНК сахарозосодержащей среды и ДМСО в 10%-й концентрации. Однако следует отметить необходимость проведения дальнейших работ по совершенствованию методов получения ЭНК и разработки оптимального метода их криоконсервирования.

УДК 578.083: 612.646: 615.361.014.41

Криоконсервированные биологически активные жидкости как составная часть среды культивирования гамет и эмбрионов *in vitro*

В. И. ГРИЩЕНКО, М. П. ПЕТРУШКО, А. Г. ГЕРОДЕС, В. И. ПИНЯЕВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Изучалась возможность использования криоконсервированных жидкостей на этапе культивирования гамет и эмбрионов в программе экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). В данное изучение была включена 571 супружеская пара. Индукция стимуляции была проведена фолликулостимулирующим гормоном (Метродин "Serono") на фоне десенситизации гипофиза агонистами гонадотропин рилизинг-гормона (Супрефакт "Hoechst"). Фолликулярное развитие оценивали под контролем трансвагинальной эхографии. При достижении доминантным фолликулом оптимального размера вводилась разрешающая доза – 5 000 – 10 000 IU человеческого хорионического гонадотропина (Профази "Serono"). Через 34–36 ч после его введения производилась трансвагинальная аспирация ооцитов. Выделенные ооциты были оплодотворены активноподвижной фракцией спермиев и культивированы в питательных средах. Эмбрионы переносили в матку через 48 ч после обнаружения пронуклеусов. Перед эмбриопереносом осуществляли морфологическую оценку эмбрионов.

Были исследованы четыре экспериментальные группы: в первой – стандартные условия культивирования (контроль), во второй – эмбрионы сокультивировали на монослое деконсервированных клеток кумулюса и гранулезы, третью группу составили эмбрионы, которые сокультивировали с 15%-й фолликулярной жидкостью человека, четвертую – эмбрионы, которые сокультивировали с 15%-й криоконсервированной фетальной сывороткой.

Мы не наблюдали статистически достоверных отличий в качественной оценке оплодотворения ооцитов и развитии эмбрионов до 8-клеточной стадии в контроле и исследуемых группах.

Оплодотворение было отмечено в 64% ооцитов первой группы, 63% – второй, 60% – третьей и 58% – четвертой группы; 83, 95, 98 и 89% эмбрионов соответственно достигли 8-клеточной стадии. Оценка качества эмбрионов позволила установить, что в первой группе эмбрионы с признаками фрагментации составили 62%, в остальных группах только 16, 18 и 12% соответственно.

Культивирование эмбрионов в деконсервированных клетках кумулюса и фетальной сыворотке не влияет на частоту оплодотворения, но значительно снижает число эмбрионов с признаками фрагментации.

Присутствие деконсервированных фолликулярной жидкости, сыворотки и клеток кумулюса и гранулезы в питательной среде культивирования создает тот биохимической фон, который способствует нормальному развитию и сохранению эмбрионов в процессе культивирования, что ведет к успешной имплантации и развитию беременности в результате лечения методом ЭКО.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043: 591.463.1: 599.742.7

Концентрация АТФ в криоконсервированной сперме амурского леопарда

Г. Ю. МАКСУДОВ, А. С. ЕРОХИН, К. ЕВГЕНОВ, Э. ХАРТЛИ

Московский зоопарк

ВНИИ племенного дела, Московская обл., Лесные Поляны

Institute fur Zoo-und Wildtierforschung, Berlin, Germany

Zoological Society of London, UK

Амурский леопард (АЛ) — наиболее угрожаемый подвид леопарда (IUCN (E)). Его численность в природе менее 100 экземпляров, из них до 20 особей обитает на территории России. В неволе содержится около 170 особей АЛ, т.е. около 2/3 общей численности мировой популяции. В зоопарках России на 1 января 2000 года содержались 15 самцов и 10 самок АЛ, в Московском зоопарке — 6 особей (3 самца и 3 самки).

В рамках Европейской программы сохранения редких видов репродуктивное состояние самцов АЛ Московского зоопарка оценивалось дважды (сентябрь 1999 и май 2000 гг.). Проводились обездвиживание, ветосмотр, УЗИ, электроэкуляция и криоконсервация спермы по стандартной методике для крупных кошачьих (Г. Ю. Максудов, 1996). АТФ определяли биолюминесцентным методом. Результаты экспериментов 1999 года опубликованы (A. Hartley et al., 2000). Данные 2000 года суммированы в табл. 1 и 2. Из них следует, что подвижность сперматозоидов АЛ после криоконсервации снижалась приблизительно в 5 раз. Содержание АТФ падало еще сильнее (в 9–11 раз), что, возможно, и было причиной быстрой гибели оттаянных сперматозоидов. Прямой зависимости между концентрацией АТФ и подвижностью сперматозоидов до и после криоконсервации не обнаружено. Сперма леопарда № 2 в обоих случаях имела самую низкую подвижность и самую высокую концентрацию АТФ

Возможно, стандартный протокол криоконсервации спермы кошачьих для АЛ нуждается в корректировке. Данными по содержанию АТФ в замороженно-оттаянной сперме других видов кошачьих мы не располагаем.

Таблица 1

Влияние криоконсервации на подвижность сперматозоидов амурского леопарда

Подвижность сперматозоидов, %	Леопард № 1	Леопард № 2	Леопард № 3	Среднее
Нативные	50	20	80	50
После эквилибрации	35	15	50	33,3
Сразу после оттаивания	10	4	15	9,6
Через 1 ч после оттаивания	0	0	0	0

Таблица 2

Концентрация АТФ в нативных и криоконсервированных сперматозоидах амурского леопарда

Концентрация АТФ, нмоль/10^8 клеток	Леопард № 1	Леопард № 2	Леопард № 3	Среднее
Нативные сперматозоиды	9,15	11,2	10,3	10,2
Криоконсервированные сперматозоиды	1,0	1,2	0,7	0,96

УДК 57.086.13 (470+571)

Криобанки как элемент природоохранных стратегий в России

Г. Ю. МАКСУДОВ, Н. Н. РОТТ

Московский зоопарк

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Москва

Угроза разрушения биосферы осознается уже не только специалистами и общественностью, но и определенными категориями политиков. Следствием этого стало обсуждение проблем сохранения генофонда на различных уровнях. Был принят ряд международных документов, в частности Конвенция ООН о биологическом разнообразии (КБР), Всемирная стратегия охраны животных зоопарками (ВСОЖЗ) и многие другие.

Их содержание отражает осознание возрастающей роли криобанков. Если, например, КБР отводит им вспомогательную роль, то разработанная позже ВСОЖЗ (IUDZG/CBSG, 1993) выделяет криобанки как один из трех равноправных путей сохранения редких видов животных. В программах по сохранению и разведению редких видов (SBSG, EEP) создание таких банков стало неотъемлемой частью работы (У. С. Силл, 1995).

Матеріал, захищений авторським правом

В России на национальном уровне после широкого обсуждения специалистами и общественностью приняты Проект стратегии сохранения редких видов и Проект национальной стратегии сохранения биоразнообразия. Особенно важно, что после плодотворных дискуссий криобанки получили в этих стратегиях равный с традиционными природоохранными методами статус.

Более того, к базовому природоохранному закону Российской Федерации "Об охране окружающей природной среды" разрабатывается поправка, согласно которой включение таксона в Красную книгу в категорию "находящиеся под угрозой исчезновения" станет основанием для формирования криобанка генофонда этого таксона. В перспективе предполагается расширить действие этой поправки на все краснокнижные виды.

Таким образом, идеи, высказанные Б. Н. Вепринцевым еще в 1978 году, реализуются уже в ранге государственных программ.

Зоопарки представляются перспективными центрами для проведения работ по созданию криобанков (Г. Ю. Максудов, Н. Н. Ротт, 2001). Их коллекции позволяют накопить необходимый опыт на сходных, но менее ценных видах. Коллекции основных зоопарков мира систематизированы в единой базе данных ISIS и в племенных книгах редких видов, которые могут использоваться для предотвращения инбридинга и для ведения картотеки криобанков.

УДК 616.361.014.41: 611-013.11

Длительное хранение сперматозоидов: есть ли альтернатива криоконсервации?

Г. Ю. МАКСУДОВ, О. В. КАБАШОВА, О. Н. НЕСТЕРЕНКО, А. В. ХМЕЛЕВ, Г. И. ЭЛЬ-РЕГИСТАН

Московский зоопарк

Институт пчеловодства РАСХН, г. Москва

Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, г. Москва

Институт микробиологии РАН, г. Москва

Криоконсервация – основной способ длительного сохранения сперматозоидов *in vitro*. Однако перспективна также разработка методов хранения гамет без замораживания на сроки порядка "неделя–месяц". Многие виды животных сохраняют сперму в половых путях самок и получают потомство через месяцы и годы после спаривания (Г. Ю. Максудов, 1988).

Известно, что различные микроорганизмы обладают специфической системой ауторегуляции роста и развития (А. С. Хохлов, 1988). Повышение концентрации микробных аутоиндукторов анабиоза (МАА) в культуре обусловливает обратимый переход микроорганизмов в анабиотическое состояние. Действие МАА и их химических аналогов видонеспецифично. Показано, например, что МАА оказывают обратимый дозозависимый эффект на рост культуры фибробластов мыши (О. Н. Ильинская и др., 2000).

В поисках новых подходов к сохранению генетического материала *in vitro* были проведены эксперименты по изучению действия МАА на сперму трутней и журавлей.

Трутней и маток брали из ВНИИ пчеловодства, сперму журавлей получали в питомнике ОГБЗ. Порции спермы переносили в пробирки, содержащие разбавитель и растворы МАА определенных концентраций. Для оценки подвижности сперматозоидов после хранения образцы центрифугировали (1 500 об/мин, 10 мин) и ресуспендировали порцией свежего разбавителя. Подвижность определяли по 5-балльной шкале.

Через 1,5 ч после добавления МАА подвижность сперматозоидов трутней заметно снижалась, а через 3 ч практически прекращалась. Весь период хранения они были неподвижны. Через один месяц хранения подвижность отмытых сперматозоидов трутней составляла 3 балла при концентрациях МАА 0,002 и 0,00002%. Для оценки их оплодотворяющей способности после 7 и 14 дней хранения были осеменены 10 и 6 маток соответственно. Вскрытие показало наличие сперматозоидов в сперматеке 7 маток (70%) из первой группы и 4 (66,6%) – из второй. Таким образом, МАА имеют дозозависимое обратимое влияние на сперматозоиды трутней.

Опыты со спермой журавлей ввиду крайне ограниченного объема доступной спермы в полном объеме провести не удалось. Отмечены иммобилизация гамет при добавлении МАА и частичное восстановление подвижности после отмывания от МАА. Следует продолжить исследования.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 615.361.014.41: 57.086.13

Особенности длительного хранения биологических объектов в низкотемпературных банках

А. С. СНУРНИКОВ, Н. Г. КАДНИКОВА, Т. М. ГУРИНА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Сеть низкотемпературных банков для хранения стандартизированного биологического материала создана по всему миру. Считалось, что основные преимущества низкотемпературного хранения следующие: малая вероятность контаминирования, сохранность стабильности морфофункциональных свойств биологического материала, затрата незначительного количества времени и материалов для сервисного обслуживания замороженных образцов. Однако исследования последних лет, проведенные в нашем институте, показали, что жидкий азот может быть источником вирусной и бактериальной контаминации замороженных образцов в процессе их длительного хранения в жидких хладагентах. Опыт эксплуатации контейнеров различных типов подтверждает, что при хранении и отогреве не исключены возможность их разгерметизации с последующим попаданием содержимого в жидкий азот и наоборот попадание микрофлоры из жидкого азота в негерметичные контейнеры.

Для уменьшения риска контаминации хранящегося материала нами разработан комплекс организационных и технических мероприятий. В институте на протяжении нескольких лет обследуется бактериальная обсемененность каждой партии жидкого азота, используемого для дозаправки хранилищ, а также детрита из придонного слоя азота низкотемпературных хранилищ. Создано карантинное хранилище для хранения биологического материала, подозрительного на зараженность возбудителями инфекционных заболеваний, до получения результатов бактериологического и вирусологического контроля. Периодически производятся ревизия и дезинфекция хранилищ и оборудования.

УДК 576.353.2: 57.043.085

Нарушения митотического цикла в эмбрионах мыши после криоконсервирования

О. Б. ХРОМЕНКОВА, Г. Ф. ЖЕГУНОВ, Г. В. ЖЕРНОКЛЕВ

Харьковский государственный медицинский университет

Харьковский биотехнологический центр, пос. Кулиничи

В криобиологии репродуктивных клеток, помимо исследований, направленных на получение максимальной выживаемости гамет и эмбрионов, актуальными являются исследования по изучению возможного мутагенного эффекта криовоздействия. Это важно знать для предотвращения возможных генетических нарушений у потомства, получаемого из деконсервированных эмбрионов.

Цель работы – изучение нарушения митотического цикла в эмбрионах мыши после криоконсервирования.

Объектом исследования были 8-клеточные ранние и компактизированные эмбрионы, полученные от суперовулированных самок мышей F_1(CBA×C57Bl). Эмбрионы криоконсервировали методом медленного замораживания–быстрого оттаивания с 1 М глицерина в качестве криопротектора. Помимо оценки жизнеспособности деконсервированных эмбрионов, был проведен цитологический анализ их суховоздушных препаратов.

Цитологический анализ выявил пикнотические ядра в морфологически нормальных бластомерах эмбрионов, свидетельствующие о том, что не все бластомеры переносят процедуру замораживания-оттаивания. Доля пикнотических ядер от общего числа бластомеров составила: 12,77% для ранних и 12,18% для компактизированных эмбрионов ($p > 0,05$). Однако гибель части бластомеров у 8-клеточных эмбрионов не препятствует их дальнейшему развитию: после размораживания в условиях *in vitro* дробление продолжили 81,40% ранних (в контроле – 88,89%) и 72,44% компактизированных (в контроле – 85,71%) эмбрионов.

Общее количество патологий митоза в деконсервированных компактизированных эмбрионах было достоверно выше (13,12%), чем в деконсервированных ранних эмбрионах (5,98%) и контрольной группе (5,5% в ранних и 3,9% в компактизированных эмбрионах). Патологии митоза были связаны с повреждением как веретена деления (40,0% в ранних и 44,05% в компактизированных эмбрионах), так и хромосом (60,0% в ранних и 55,9% в компактизированных эмбрионах). При этом среди аномалий, связанных с повреждением

Матеріал, захищений авторським правом

хромосом, наиболее частыми были: нарушение плоидности в ранних 8-клеточных эмбрионах, набухание и слипание хромосом в компактизированных эмбрионах. Среди аномалий, связанных с повреждением веретена деления, чаще встречались моноцентрические митозы в ранних 8-клеточных эмбрионах и комковатые метафазы — в 8-клеточных компактизированных эмбрионах.

Патологический митоз является одним из механизмов возникновения мутации, в частности соматической анеуплоидии. Однако в нашем исследовании не отмечено увеличения уровня анеуплоидии в мышиных эмбрионах после криоконсервирования (2,74% в ранних и 3,03% в компактных эмбрионах), по сравнению с нативными эмбрионами (3,0%). Это, вероятно, связано с тем, что уровень анеуплоидии оценивали в первом после экстремального воздействия митотическом цикле и патологии митоза еще не трансформировались в геномные аномалии.

УДК 615.361.018.51.014.413: 547.422

Механизмы стабилизации эритроцитов к действию непроникающих криопротекторов и низких температур. Создание безотмывочного метода криоконсервирования

Л. А. БАБИЙЧУК, Н. Г. ЗЕМЛЯНСКИХ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Существующие в настоящее время способы криоконсервирования клеточных суспензий основаны главным образом на применении проникающих криопротекторов, которые удаляются после размораживания клеток перед трансфузией. Это в значительной степени усложняет метод криоконсервирования и приводит к потере части клеток в период их отмывания. Поэтому, на наш взгляд, более перспективным является создание безотмывочных способов криоконсервирования, когда используются непроникающие криопротекторы.

Проведенные нами эксперименты показали, что снижение температуры инкубации эритроцитов с ПЭО-1500 до 0 °С и его дозированное введение в суспензию приводят к уменьшению количества связывающегося с клетками криопротектора, что коррелирует с увеличением устойчивости эритроцитов к действию факторов замораживания-отогрева. Такой режим в процессе криоконсервирования ограничивает повреждение клеток и способствует сохранению барьерных свойств плазматической мембраны, что во многом определяется модификацией белков цитоскелета, которые удерживают форму и объем клеток в данных экспериментальных условиях. Так было обнаружено, что уровень фосфорилирования β-субъединицы спектрина в эритроцитах, обработанных ПЭО-1500 при 0 °С, в 2 раза выше, чем в нативных клетках. В этих условиях сохраняется близкое к нативному пространственное расположение белков цитоскелета, о чем свидетельствуют данные о влиянии белоксшивающего реагента диамида на образование агрегатных белковых комплексов в эритроцитах, обработанных криопротектором при разных температурах. Одним из механизмов регуляции структурного состояния белков цитоскелета, обеспечивающих постоянную динамику ассоциативных связей между различными белками, фазовые переходы отдельных компонентов и всего цитоскелета в целом, является изменение концентрации внутриклеточного Ca^{2+}. Нам удалось обнаружить увеличение концентрации Ca^{2+} в клетках в 2–3 раза при добавлении ПЭО-1500 при 0 °С, что согласуется с данными других исследователей, показавших, что гиперосмотическое сжатие клетки, обусловленное потерей воды, ведет к увеличению скорости входа Ca^{2+} в эритроциты.

Таким образом, данные, полученные при изучении механизмов температурно-осмотической стабилизации эритроцитов к действию факторов низкотемпературного консервирования, свидетельствуют о том, что в основе этого явления лежит структурно-функциональная модификация мембранных белков клеток, характер и направленность которой определяется влиянием температуры на белки цитоскелета и системы, регулирующие их структурно-функциональное состояние. На основании проведенных фундаментальных исследований был разработан безотмывочный метод криоконсервирования эритроцитов с непроникающим криопротектором ПЭО-1500, который позволяет в значительной степени повысить жизнеспособность клеток после криоконсервирования и сохранить структурно-функциональные показатели эритроцитов на достаточно высоком уровне.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 57.086.13

Оборудование для низкотемпературной консервации биологических объектов

А. М. ПОЛОНЧУК

СКТБ с ОП Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

В результате многолетней работы коллективом СКТБ созданы программные замораживатели-размораживатели, предназначенные для программного охлаждения (отогрева) биоматериалов в контейнерах. Применяются для замораживания бактериальных и клеточных культур, ядросодержащих клеток крови, костного мозга, спермы, эмбрионов.

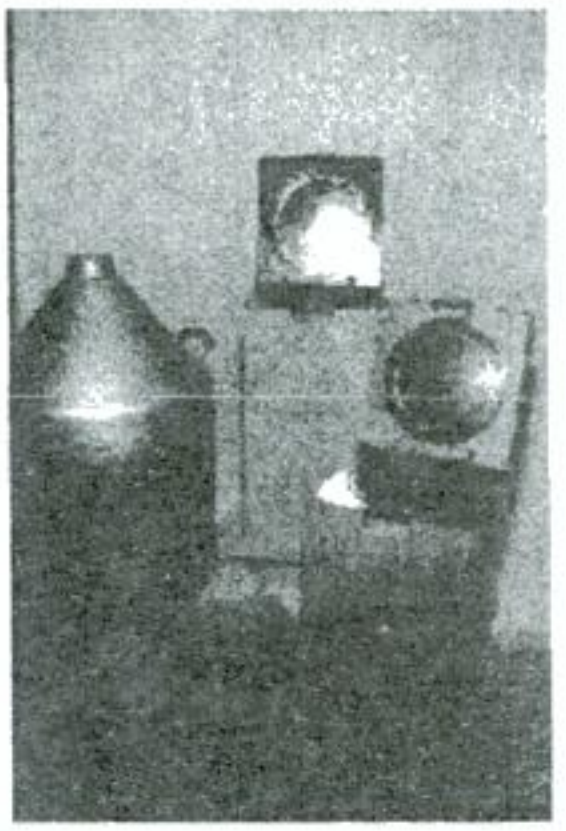
Некоторые технические характеристики замораживателей-размораживателей:

Диапазон температур, °С	–160 – +40
Диапазон скоростей охлаждения, °С/мин	0,1–30/мин
Источник холода	жидкий азот, холодильные машины
Вариант исполнения	стационарный или мобильный

Оборудование низкотемпературных банков: биохранилища низкотемпературные с системами контроля температуры и уровня хладагента; кассеты с укладками различной конструкции; контейнеры многоразовые объемом от 1 до 500 мл; системы снабжения жидким и газообразным азотом на базе сосудов Дьюара емкостью от 34 до 500 л; сосуды Дьюара переносные емкостью 6 или 10 л.

Одной из последних разработок является замораживатель программный клеточных культур ЗП5. Он состоит из камеры замораживания, системы снабжения хладагентом, блока программного управления.

Камера замораживания обеспечивает двухэтапные режимы охлаждения и стабилизацию температуры в заданной точке. В ней размещаются пластиковые ампулы (35–40 шт) типа Nunc объемом 1,8 мл, а также пластиковые или алюминиевые пакеты. Камера замораживания обеспечивает сидинг (инициацию кристаллизации) в пластиковых ампулах в автоматическом режиме.



Система снабжения жидким азотом выполнена на базе сосуда Дьюара Х-34 емкостью 34 л, обеспечивает подачу хладагента в камеру замораживания через электромагнитный клапан под давлением до 0,05 мПа, индикацию уровня хладагента, блокировку испарителя при понижении уровня хладагента, аварийный сброс хладагента.

Микропроцессорный блок программного управления обеспечивает:

задание скоростей охлаждения на 1-м этапе (диапазон температур $-20 \div -15$ °С) от 0,2 до 10 °С/мин;

задание скоростей охлаждения на 2-м этапе (диапазон температур $-15 \div -160$ °С) от 2 до 20 °С/мин;

стабилизацию температуры от 20 до –160 °С на время от 1 до 99 мин;

автоматический сидинг при заданной температуре;

отображение основных режимных параметров замораживания.

Микропроцессорный блок имеет интерфейсное устройство для вывода параметров криоконсервирования на персональный компьютер с целью ее обработки и документирования.

УДК 621.565

Сублимационные установки

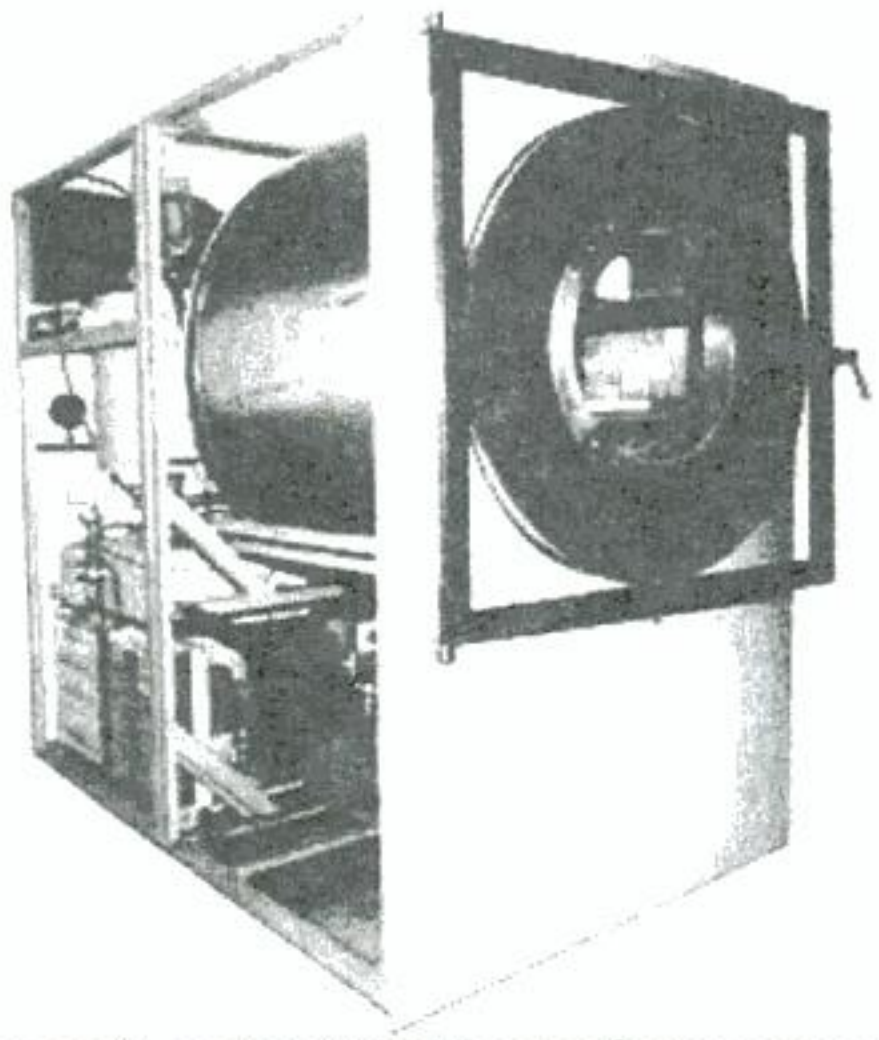
А. М. ПОЛОНЧУК, В. А. СОКОЛОВ, В. Н. БАТРАКОВ

СКТБ с ОП Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Создан спектр сублимационных (лиофильных) установок коллекторного и камерного типа производительностью от 0,1 до 25 кг льда за цикл. Температура десублиматора от –45 до –196 °С. Источники холода — жидкий азот, холодильные агрегаты, элементы Пельтье. Управляющие и контролирующие системы различной степени сложности. Установки позволяют отработать режимы и выпускать лиофильно высушенные препараты.

Одной из последних разработок является установка сублимационной сушки УСС25, которая предназначена для выпуска сублимированных биологических препаратов, белковых компонентов крови, пищевых добавок. Установка компактна, конструктивно состоит из двух стоек: вакуумной и холодильной. Загрузочный люк установки можно вмонтировать в стену стерильного бокса. Для хо-

Матеріал, захищений авторським правом



лодильной стойки УСС25 разработан оригинальный двухкаскадный холодильный агрегат с воздушным охлаждением. Установка экономична, средняя потребляемая мощность 6 кВт. Время выхода на режим – 1,5 ч. При интенсивной сушке температура десублиматора не повышается.

Блок управления позволяет стабилизировать температуру полок на любой заданной температуре из диапазона –40...+65 °С с точностью ±1 °С.

В блоке осуществляются измерение и индикация давления в камере, заданной и текущей температуры полок, температуры десублиматора, температуры объекта (3 канала). Предусмотрена запись параметров процесса на персональный компьютер.

Установка проста в управлении. На установке можно сублимировать объект в различной таре (флаконы емкостью 0,5 л, пенициллиновые флаконы, ампулы, поддоны). Предусмотрено принудительное оттаивание десублиматора. Установлена защита холодильного агрегата от перегрева и потери фазы.

Технические параметры УСС25

Объем удаленной влаги за сутки, л	не более 25
Диапазон рабочих температур полок, °С	–40...+65
Количество терморегулируемых полок, шт.	3 (4)
Расстояние между полками 3 (4) мм	не менее 200 (150)
Температура десублиматора, °С	не более –65
Предельное давление в камере, Па	не более 10
Установленная мощность, кВт	не более 6
Габариты, мм	не более 1 000 × 2 000 × 2 000
Масса, кг	не более 700
Охлаждение холодильного агрегата	воздушное

Питание установки от сети переменного тока напряжением 380 В, частотой 50 ± 0,5 Гц

Преимущества: экономичность, компактность, воздушное охлаждение, использование экологически чистых фреонов.

УДК 615.361.018.46.5.014.41

Криоконсервирование аутологичного костного мозга и стволовых клеток периферической крови

Д. М. МХЕИДЗЕ, Т. В. ШВЕДОВА, Е. В. ОГОРОДНИКОВА

Онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина, РАМН, г. Москва

Проблема быстрого и полного восстановления гемопоэза после цитостатического воздействия в больших дозах является одной из основных в лечении опухолей и разрешить ее способна пересадка стволовых клеток.

Основным условием, определяющим успех пересадки аутологичных стволовых кроветворных клеток (СКК) при необратимой миелодепрессии, является адекватное количество жизнеспособных стволовых клеток, которое может обеспечить быстрое восстановление кроветворения после пересадки.

Аутотрансплантация СКК невозможна без осуществления наиболее ответственного процесса – криоконсервирования. Существующие методы криоконсервирования связаны с электронными программными замораживателями и людьми, обслуживающими эти аппараты. Эти условия могут создать ситуацию, которую можно обозначить как "высокий фактор риска".

Разработанный и применяемый нами метод криоконсервирования абсолютно исключает вышеупомянутый "фактор риска" и позволяет сохранить стволовые клетки практически без потерь. Принципиальное отличие его от существующих методов – замораживание происходит в парах жидкого азота при температуре –120 ÷ –130 °С. Метод абсолютно надежен, экономичен, автономен, т.е. не зависит ни от источников питания, ни от электроники, ни от обслуживающего персонала. Замороженные по этому методу СКК (400 эксфузатов клеток костного мозга и 600 эксфузатов периферических стволовых клеток) восстанавливали кроветворение у больных с гемобластами и солидными опухолями после высокодозной химиотерапии и тотального облучения.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 579.873.71: 57.043.86.132

Свойства промышленного штамма *Streptomyces fradiae* в зависимости от условий хранения

А. Е. АНАНЬИНА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Работа посвящена исследованию свойств клеток споровой культуры *Streptomyces fradiae* — продуцента антибиотика тилозина — после криоконсервирования, лиофилизации и хранения.

Споровые суспензии моноизолятов с различной антибиотической активностью замораживали в металлических контейнерах емкостью 1 мл непосредственно погружением в жидкий азот с последующим хранением в нем (–196 °С). Лиофилизировали культуру в пенициллиновых флаконах на установке УЗВ-2 (СКТБ с ОП ИПКиК НАН Украины) по ранее разработанным программам. При лиофилизации использовали следующие защитные среды: 1) среда Гаузе 1; 2) регламентная среда СР-15; 3) среда СР-15 с добавлением 0,1 мг/мл кофеинбензоата (в виде агаровых подложек); 4) 5%-е обезжиренное молоко; 5) 10%-е обезжиренное молоко. Образцы лиофилизированной культуры хранили при температуре 4 °С в завальцованных металлическими колпачками пенициллиновых флаконах. После хранения замороженной споровой культуры в жидком азоте в течение 11 лет не отмечалось изменения морфологических и культуральных свойств, уровень специфической активности и жизнеспособности составлял 98–100% по сравнению с контролем. Интересным фактом являлось в некоторых случаях повышение антибиотической активности после кратковременного хранения (3–7 мес) криоконсервированных образцов споровой культуры *Streptomyces fradiae*.

Сохранность свойств лиофилизированной культуры на средах 1 и 2 обеспечивалась в течение 3–7 мес, увеличение сроков хранения приводило к снижению жизнеспособности и антибиотической активности, высокий процент сохранных клеток отмечался в течение года лишь при использовании защитных сред 3 и 4. Хранение споровой лиофилизированной культуры в среде 5 не вызывало изменения свойств и гибели клеток в течение длительного периода времени. Так, даже после 12 лет хранения выживаемость и уровень специфической активности оставались в пределах 80–90% по сравнению с контролем.

Матеріал, захищений авторським правом

Секция 4
ПРИМЕНЕНИЕ НИЗКИХ И ГИПОТЕРМИЧЕСКИХ ТЕМПЕРАТУР В МЕДИЦИНЕ

УДК 577.3: 612.111.3: 616.441.008.61

Біофізичні властивості еритроцитів при гіпо- та гіпертиреозі

О. І. ГОРДІЄНКО, В. О. МАКЕДОНСЬКА, Ю. Є. ГОРДІЄНКО

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

На тлі диференційованої метаболічної дії різних гормонів вирізняється поліморфна дія тиреоїдних гормонів, які транслюють свій вплив на численні метаболічні процеси майже на всіх структурних рівнях. Дія гормонів поширюється на структуру і функцію субклітинних утворень — ядер, мітохондрій, клітинних мембран.

Методом малокутового розсіювання проведено дослідження біофізичних характеристик мембран еритроцитів хворих на гіпо- та гіпертиреоз. Досліджували коефіцієнти проникності для електрично нейтральних речовин, а також розподіл еритроцитів за індексом сферичності. Проведено теоретичне обгрунтування способу вимірювання розподілу клітин за індексом сферичності, що спирається на побудовану нами раніше теорію гіпотонічного гемолізу. Час напівгемолізу суспензії еритроцитів кожного окремого донора залежить від функції розподілу клітин за індексом сферичності. Вимірюючи цей час експериментально та розраховуючи його теоретично з урахуванням щільності розподілу клітин за індексом сферичності для кожного окремого донора, ми отримали цілком задовільне узгодження експериментальних та теоретичних даних. Одержані результати свідчать, що розподіл еритроцитів за індексом сферичності відбиває як індивідуальні особливості еритропоезу, так і загальний стан здоров'я донорів. Таким чином, досліджені характеристики можуть бути використані з діагностичною метою.

УДК 615.361.441.014.413: 616.441-008.64

Аутотрансплантация криоконсервированной ткани щитовидной железы в профилактике и лечении постоперационного гипотиреоза у больных диффузным токсическим зобом

В. А. МАКЕДОНСКАЯ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Диффузный токсический зоб (ДТЗ) является одним из наиболее тяжелых эндокринных заболеваний, которое характеризуется хроническим прогрессирующим течением, развитием осложнений, трудностями в лечении и реабилитации. Хирургическое лечение занимает значительное место в терапии ДТЗ, так как обеспечивает наиболее быстрое выздоровление. В специализированных хирургических стационарах сведено к минимуму развитие таких осложнений субтотальной резекции щитовидной железы (ЩЗ), как кровотечение, повреждение нервов, токсический криз, постоперационный гиперпаратиреоз, а рецидивы заболевания исключаются при удалении возможно большего объема ткани. Постоперационный гипотиреоз (ПГ) является наиболее частым следствием хирургического лечения ДТЗ и развивается, по данным различных авторов, в 29,7–58% случаев (Е. И. Соколов с соавт., 1998; М. И. Балаболкин с соавт., 2000). Заместительная гормональная терапия не всегда достаточно эффективна, а в ряде случаев плохо переносится больными.

Трансплантация является физиологически адекватным методом коррекции гормональной недостаточности. Разработан метод профилактики и лечения ПГ путем аутотрансплантации криоконсервированной тиреоидной паренхимы, клиническому использованию которого предшествовало изучение функциональных особенностей криоконсервированной ткани ЩЗ, полученной во время операции у больных ДТЗ, как потенциального трансплантационного материала. При хирургическом лечении ДТЗ должен быть индивидуальный комплексный подход к больному с целью профилактики ПГ, учитываться возраст больного, тяжесть, продолжительность заболевания, длитель-

Матеріал, захищений авторським правом

ность консервативной терапии, гормональные, иммунологические показатели. Количество ткани ЩЗ должно быть оптимальным в функциональном отношении с целью обеспечения эутиреоидного состояния.

Для больных ДТЗ, у которых функциональная активность оставшейся после операции ткани ЩЗ может оказаться в силу тех или иных причин недостаточной, создается субоперационный экстраорганный резерв собственной тиреоидной паренхимы. С этой целью производится субоперационная аутотрансплантация криоконсервированной ткани ЩЗ, которая обеспечивает резерв функциональной ткани и позитивно влияет на иммунологическую ремиссию в организме. Криоконсервированный аутотрансплантат обнаруживает способность аккумулировать I^{131} на 14-е сутки после трансплантации. У данной группы больных ПГ развивается в 7,5 раз реже, чем у больных без аутотрансплантации.

У пациентов пожилого возраста с тяжелыми формами ДТЗ при отсутствии или невыраженности лимфоидной инфильтрации железы, при которых вероятность развития ПГ не так высока, а особенности течения постоперационного периода не позволяют провести профилактическую аутотрансплантацию, создается экстраорганизменный резерв ткани ЩЗ, которая подвергается низкотемпературной консервации и хранению в условиях низкотемпературного банка. В отдаленные сроки после операции по поводу ДТЗ в зависимости от времени проявления ПГ проводится аутотрансплантация криоконсервированной ткани. Во всех наблюдениях отмечен положительный эффект трансплантации, необходимости гормонотерапии не было. Аутотрансплантация криоконсервированной ЩЗ является физиологически адекватным методом профилактики и терапии ПГ при хирургическом лечении ДТЗ и обеспечивает высокие показатели медицинской реабилитации.

УДК 616.432-006.55-072.1: 615.832.9: 617

Эндоскопическая миниинвазивная криодеструкция аденом гипофиза и аденогипофиза

В. И. СИПИТЫЙ, В. Н. ЛЕСОВОЙ, А. В. ЦЫГАНКОВ, С. В. ГРОЗНЫЙ, А. Ю. ПЕЧЕНОВ

Харьковский государственный медицинский университет

Проблема хирургии гипофиза в настоящее время остается актуальной. Хирургические вмешательства производятся у больных с опухолями гипофиза и при гормонозависимом раке. Обычно опухоли гипофиза обнаруживаются у социально активных пациентов в среднем возрасте. Обращает на себя внимание проблема бесплодия. По данным различных авторов, у каждой третьей бесплодной женщины диагностируется микроаденома или аденома гипофиза, что требует хирургического вмешательства при неэффективности консервативной терапии. На клинической базе кафедры нейрохирургии разработан и внедрен метод стереотаксической эндоскопической трансназальной-транссфеноидальной селективной криодеструкции опухолей гипофиза и аденогипофиза при гормонозависимом раке.

В нейрохирургической клинике было произведено 60 криодеструкций аденом гипофиза и аденогипофиза. Из них 20 криодеструкций аденом гипофиза, 30 криодеструкций микроаденом гипофиза и 10 аденогипофиза при гормонозависимом раке простаты и молочной железы. Диагноз аденом или микроаденом гипофиза ставился на основе современного обследования больного: компьютерной и магниторезонансной томографии, определения уровня гормонов гипофиза в крови, а также производилось стандартное обследование больного в плане предоперационной подготовки.

Под рентгенконтролем при помощи усовершенствованного стереотаксического устройства, набора оригинальных инструментов, под контролем эндоскопа, разработанных и изготовленных авторами, осуществлялся трансназальный-транссфеноидальный доступ к турецкому седлу и производилась криодеструкция аденомы или микроаденомы гипофиза или аденогипофиза.

У 45 больных с аденомой или микроаденомой гипофиза наступило выздоровление. У 6 женщин, до операции страдавших бесплодием, родились здоровые дети. У 5 человек наблюдались рецидивы опухоли через год, были выполнены повторные операции криодеструкции опухоли. У 10 пациентов при раке простаты и молочной железы после криодеструкции получен аналгезирующий эффект в первые сутки. Боли не беспокоили больных через 3 мес после операции. Через полгода у 3 больных отмечался рецидив боли. У больных 4-й клинической группы при раке простаты выявлено снижение концентрации тестикулярных и надпочечниковых гормонов.

Данная методика операции позволяет малотравматично производить разрушение аденомы или микроаденомы гипофиза, что способствует восстановлению эндокринных, зрительных и репродуктивных функций. Применение криодеструкции аденогипофиза дает возможность купировать болевой синдром у больных с гормонозависимыми злокачественными новообразованиями 4-й клинической группы. Разработанный метод селективной криодеструкции опухолей гипофиза и аденогипофиза с применением эндоскопа может быть рекомендован для широкого внедрения в практику нейрохирургии.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 591.339: 57.043.089.3

О возможности использования ткани хориона при общем остром охлаждении теплокровных организмов

О. С. ПРОКОПЮК, В. В. ЧИЖЕВСКИЙ, В. Ю. ПРОКОПЮК, О. В. ЛИПИНА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Нами предпринята попытка оценить характер влияния имплантации ткани хориона (ТХ) на адаптивные процессы, имеющие место при холодовом стрессе.

Работами ряда авторов (Д. Ф. Чеботарев, К. Б. Маньковский и др.) показано, что использование препаратов плаценты положительно сказывается на общем функциональном состоянии большинства систем организма. Так, отмечается усиление подвижности основных нервных процессов, увеличивается сократительная способность миокарда, улучшаются коронарное кровообращение, биоэлектрическая активность сердца, стимулируется почечная деятельность и т.д. Таким образом, наблюдаются положительные сдвиги в тех системах организма, которые наиболее активно реагируют на стресс.

Применение препаратов фетоплацентарного комплекса в условиях напряжения регуляторных аппаратов организма позволяет подойти к пониманию механизмов действия клеточной терапии.

В ходе исследования животных, которым предварительно была проведена имплантация ТХ, помещали в водяную баню (температура воды 4 °С) и фиксировали время плавания в данных условиях. После холодового воздействия и в процессе отогрева регистрировали температуру тела животных, ЭКГ, оценивали физико-химические свойства крови, проводили морфологические исследование ряда органов.

Полученные предварительные данные свидетельствуют об отсутствии выраженного криозащитного эффекта применения ТХ для животных, которые подвергались воздействию острого общего охлаждения. На наш взгляд, это связано с передозировкой имплантируемой эмбриональной ткани, что также согласуется с результатами исследований, проводимых Институтом геронтологии НАНУ.

Требуются дальнейшие всесторонние, углубленные исследования влияния препаратов фетоплацентарного комплекса на процессы холодовой адаптации гомойотермных организмов.

УДК 617.713-007.64: 615.832.9

Лечение острого кератоконуса с использованием действия сверхнизких температур

Е. В. ИВАНОВСКАЯ

Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В. П. Филатова АМН Украины, г. Одесса

Острый кератоконус, как осложнение прогрессирующего дистрофического заболевания роговицы, проявляется в резком болезненном отеке роговицы, возникающим в результате трещин и разрывов в десцеметовой оболочке. Наблюдается кератоконус у больных чаще в подростковом и молодом возрасте. Угроза осложнений и даже перфорации роговицы требует наиболее быстрого купирования воспалительного процесса в роговой оболочке.

В лечении острого кератоконуса, как аутоиммунного процесса в роговой оболочке, важную роль играет применение кортикостероидов, что замедляет репаративные процессы в ней. Поэтому медикаментозное лечение характеризуется длительным сроком и возможной угрозой вторичной инфекции, формированием экстазированного сосудистого рубцового помутнения роговицы с истончением и низкой некорригируемой остротой зрения.

Исходя из стимулирующего действия низких температур на регенераторные процессы, дифференцированного действия на ткани глаза, нами разработан способ лечения острого кератоконуса с использованием действия сверхнизких температур в диапазоне $-150 \div -196$ °С с экспозицией 20 с (2–3 аппликации) и предварительной пункцией передней камеры (Пат. Украины № 28304 А, 2000 г.).

Предлагаемый способ лечения в сочетании с медикаментозной терапией мы применили у 20 больных (21 глаз) в возрасте от 11 до 38 лет. В 10 случаях острый воспалительный процесс в роговой оболочке сопровождался явлениями ирита, в 7 случаях — иридоциклита, в 3-х из них с гипопионом. У 7 больных были аномалии развития и сопутствующие заболевания: врожденный митральный порок сердца (1), аномалия развития почек (1), синдром Дауна (2), у 3-х больных вследствие перенесенного детского церебрального паралича и клиника острого кератоконуса у этих больных отличалась тяжестью течения.

Матеріал, захищений авторським правом

Результаты лечения оценивали по быстроте купирования воспалительного процесса в роговой оболочке, уплощению роговицы и качеству сформировавшегося рубцового помутнения, степени повышения остроты зрения, отсутствию рецидивов заболевания. Купирование острого воспалительного процесса в роговой оболочке — резорбция отека, смыкание щелей и разрывов в задних слоях роговицы, эпителизация ее поверхности, исчезновение явлений ирита и иридоциклита наблюдалось на 8,5 ± 3,5 сутки. Осложнений не отмечалось

Стабилизация восстановительного процесса наблюдалась через 1,0–1,5 месяца и выражалась в уплощении вершины конусовидной роговицы с формированием бессосудистого помутнения. Во всех случаях отмечалось повышение остроты зрения — на 8 глазах до 0,05–0,1 и на 13 глазах — до 0,12–0,35, причем на 8 глазах коррекция жесткими контактными линзами позволила повысить остроту зрения до 0,35–0,7. В сроки от 1 года до 8 лет установлено отсутствие рецидивов заболевания в 21 случае.

Таким образом, анализ результатов лечения показал: предлагаемый метод лечения технически прост, малотравматичен, безопасен, эффективен, хорошо переносится глазом, не приводит к осложнениям, что позволяет рекомендовать его как самостоятельный метод лечения острого кератоконуса в детском возрасте, у больных с сопутствующими заболеваниями и как метод, предворяющий сквозную кератопластику.

УДК 615.832.9: 617.713-001.4

Результаты применения криотерапии в комплексном лечении непроникающих ранений роговой оболочки

В. И. БЕЛОУС

Территориальное медицинское объединение № 1, г. Житомир

Изучались результаты применения криотерапии в комплексном лечении травматических кератитов у 64 больных (64 глаза). Больные обращались за помощью: в первые и вторые сутки — 12, на 3–5-й день — 15, на 6–10-й день — 19, в более поздние сроки, после безуспешного лечения — остальные 18. В начале лечения у всех больных при биомикроскопии наблюдались дефект эпителия роговой оболочки с инфильтрацией в ее средних и глубоких слоях и сопутствующие осложнения: иридоциклит (26 глаз), синехии (15 глаз), инородное тело в глубоких слоях роговицы (23 глаза).

Исследование посевов из конъюнктивальной полости у 64 больных на микрофлору выявили рост в 38 случаях (граммотрицательная палочка — у 18, гемолитический стафилококк и пневмококк — у 20 больных). Лечение проводилось медикаментозными средствами (в том числе и патогенетическими) с дополнением криотерапии. Криовоздействие осуществлялось нами с помощью офтальмологического криоаппликатора КГ-195, работающего на жидком азоте со съемными наконечниками. Криоаппликации были применены при лечении 64 больных (64 глаза). Сеансы криотерапии проводились ежедневно. Время криогенного воздействия в среднем было в пределах 10–15 с. После каждого сеанса больные отмечали субъективное улучшение, выражавшееся в уменьшении болей, светобоязни, слезотечения. Объективно наблюдались быстрая эпителизация дефектов, рассасывание инфильтров в роговице, купирование воспалительной реакции, облитерация мелких сосудов в роговой оболочке.

Заживление дефектов в среднем наступало после 4–5 сеансов (на 5–6-й день), а клиническое выздоровление — на 9–10-й день. Повторные исследования на патогенную микрофлору у тех же больных были отрицательные.

Просветление помутнений роговицы под воздействием криотерапии происходило и после клинического выздоровления больного, поэтому лечение продолжалось до получения оптимальных анатомических и функциональных результатов. В исходе из 38 глаз с поверхностными травматическими кератитами нежное помутнение осталось у 20 больных, а полное просветление наступило у 18. Из 26 глаз с более глубокими процессами просветление и нежное помутнение роговицы наступили у 11. Повышение остроты зрения у всех больных в среднем было на 0,35 (до лечения — 0,4, после лечения — 0,75). Ухудшение зрения не отмечено ни у одного больного. Отдаленные результаты лечения прослежены у 42 больных в сроки до двух лет. Отмечены дальнейшее просветление помутнений роговицы и повышение остроты зрения в 27 глазах по сравнению с непосредственными результатами лечения.

Таким образом, наши наблюдения исходов лечения в сравнительном аспекте с группой идентичных больных, в которой не была применена локальная гипотермия, позволяют отметить, что дополнение криотерапии к комплексу терапевтических средств воздействия на течение непроникающих повреждений роговой оболочки способствует ее быстрой эпителизации, рассасыванию инфильтратов, препятствует распространению признаков инфекции, сокращает сроки лечения с вполне благоприятным анатомическим и функциональным исходом.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 615.832.9: 616.31

Криовоздействие и гипотермия в терапевтической стоматологии

В. Ф. КУЦЕВЛЯК, К. В. БОЖКО, О. Н. СИРОТА

Харьковская медицинская академия последипломного образования

Для обезболивания и проведения лечения еще в древности применяли охлаждение. Однако отсутствие технических средств ограничивалось примитивным использованием низких температур.

Сотрудники кафедры терапевтической и детской стоматологии ХМАПО и Физико-технического института низких температур сконструировали криоинструменты, воспроизводящие управляемую парожидкостную струю азота.

Многочисленные исследования сотрудников кафедры ХМАПО, отделов ФТИНТ НАН Украины, ИПКиК НАН Украины показали, что парожидкостная струя азота позволяет промораживать весь объем патологической ткани с оптимальной скоростью, вызывающей деструкцию слизистой оболочки полости рта, и осуществлять визуальный контроль за зоной обморожения. Необходимо учитывать, что ротовая полость является постоянно влажной средой. При использовании криогенных инструментов контактного действия на рабочей пластине сменного наконечника намерзает лед, являющийся теплоизолятором. Избежать этого недостатка позволяет парожидкостная струя азота.

При клинико-экспериментальных исследованиях было выявлено, что местная гипотермия значительно ослабляет болевую реакцию, уменьшает отечность тканей, замедляет распад белков в зоне повреждения и снижает процессы всасывания продуктов распада тканей и микроорганизмов. При этом охлаждении клеточные элементы меньше страдают от гипоксии и ацидоза. Местная гипотермия ослабляет аллергические реакции, активизирует фагоцитарную способность лейкоцитов, стимулирует репаративный процесс.

Для проведения всех этих исследований и лечения стоматологических больных кафедрой терапевтической и детской стоматологии ХМАПО совместно с сотрудниками ФТИНТ НАН Украины разработан способ локального охлаждения биоткани в сочетании с оксигенацией, т.е. с одновременным насыщением тканей кислородом. Оксигенация в условиях локальной гипотермии при лечении некоторых стоматологических заболеваний может быть применена в комплексе с другими методами.

Изучено влияние низких температур на пульпу зуба и слизистую оболочку полости рта, разработаны методы лечения необратимых форм пульпита, предраковых и других заболеваний полости рта и приротовой области.

Положительные результаты лечения с применением криовоздействия и гипотермии подтверждены клиническими и параклиническими методами обследования, в том числе и функциональными.

УДК 615.47: 621.594

Криогенная аппаратура и инструменты для медицины

Р. В. ГАВРИЛОВ, Л. К. КОЛЫБАЕВ, Б. Н. МУРИНЕЦ-МАРКЕВИЧ, М. Е. НОСОВ, В. Е. БЕРЕЗУЦКАЯ

Специальное конструкторско-технологическое бюро по криогенной технике ФТИНТ НАН Украины, г. Харьков

Специальное конструкторско-технологическое бюро по криогенной технике (СКТБ по КТ) НАН Украины с начала 70-х годов совместно с научными, учебными и клиническими организациями занимается созданием криохирургических инструментов и аппаратов для гинекологии, стоматологии, дерматологии, оториноларингологии, нейрохирургии, офтальмологии, которые рекомендованы МЗ России и Украины к клиническому применению.

С 1970 г. криохирургический метод в гинекологии применяется для лечения больных с патологическими изменениями на шейке матки, удаления остроконечных кондилом вульвы, остановки дисфункциональных маточных кровотечений, а также при фибромах матки. Наиболее эффективное лечение тяжелых дисфункциональных маточных кровотечений обеспечивается криовоздействием при температуре охлаждаемого наконечника ниже –140 °С и осуществляется с помощью аппарата КР-4, который использует в качестве хладагента жидкий азот. Для лечения патологических изменений на шейке матки и остроконечных кондилом вульвы достаточно криовоздействия при температуре охлаждающего наконечника от –40 до –60 °С со скоростью охлаждения 1 град/с. Такое криовоздействие реализуется аппаратом АКГ-01, который

Матеріал, захищений авторським правом

использует в качестве хладагента медицинскую закись азота. Методика криогенного метода лечения в гинекологии разработана кафедрой акушерства и гинекологии ХГМУ (заведующий академик Грищенко В. И.).

Криораспылитель стоматологический КАС-01, состоящий из легко разбираемых узлов клапанно-сифонного устройства и теплоизолированного малогабаритного резервуара для жидкого азота, используется в терапевтической стоматологии.

Для лечения очагов заболеваний кожи разработан аппликатор криогенный дерматологический КД-3, заболеваний центральной нервной системы — криозонд автономный нейрохирургический КМ-16.

Для криовоздействия при прямой ларингоскопии на патологически измененные ткани полости носа и рта, глотки, гортани, уха при лечении больных, страдающих сосудистыми и кожными заболеваниями наружного слухового прохода и барабанной полости, новообразованиями мягкого неба, сосудистыми новообразованиями полости носа, вазомоторным ринитом, разработан криоаппликатор КМ-22.

Операции в области глазного яблока выполняются криогенным методом универсальной криоофтальмологической установкой УМ-14.

Применение разработанной криогенной медицинской техники показало ее высокую эффективность в лечении различных заболеваний и необходимость более широкого применения в клинической практике.

УДК 615.361.013.85.014.41: 616.351

Использование ректальных свечей, содержащих термоклавированную свиную плаценту, в проктологической практике

Б. М. ДАЦЕНКО, И. Н. ЛЫМАРЬ, В. И. ГРИЩЕНКО, В. А. МОИСЕЕВ, М. И. ЩЕТИНСКИЙ, Т. Ф. МОРОЗОВА, О. А. НАРДИД, Г. А. БАБИЙЧУК, А. М. ВОРОТИЛИН, Л. В. ИВАНОВ, О. В. ГРИЩЕНКО

Харьковская медицинская академия последипломного образования

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Государственный научный центр лекарственных средств, г. Харьков

Результаты исследований клинического применения плацентарной ткани в различных отраслях медицины свидетельствуют, что плацентарные препараты оказывают стимулирующее действие на процессы клеточного метаболизма, активизируя репаративную активность тканей и иммунный статус пациента.

Проведены клинические испытания препаратов плаценты в проктологической практике для местного лечения острых и хронических воспалительных заболеваний анального канала и прямой кишки (криптиты, папиллиты, сфинктериты), анальных трещин, а также оптимизации местного лечения больных, оперированных по поводу геморроя, анальных трещин.

Тканевый препарат в виде ректальных свечей, содержащих термоклавированную свиную плаценту, был изготовлен на двух основах — гидрофильной и липофильной. Характер основы ректальных свечей определял их сорбционную активность.

При воспалительных заболеваниях анального канала свечи на гидрофильной основе были применены для местного лечения у 26 больных, средний возраст которых составлял 39,2 ± 1,1 год, а длительность заболевания от 1-го месяца до 1,5 лет. Свечи вводили в прямую кишку два раза в день (утром и вечером), продолжительность лечения составляла от 7 до 10 дней. Положительный клинический эффект зарегистрирован у 23 больных уже на 2–3 сутки от начала лечения, у больных уменьшались или полностью прекращались болевые ощущения в прямой кишке. Объективно (данные контрольной ректоскопии) снижалась выраженность воспалительного процесса со стороны слизистой прямой кишки.

Ректальные свечи на липофильной основе были использованы для лечения воспалительных заболеваний анального канала у 16 пациентов, средний возраст которых 36,1 ± 1,3 года, а длительность заболевания от 1-го месяца до 1-го года. Свечи вводили в прямую кишку (утром и вечером), продолжительность лечения составляла от 7 до 12 дней. Клинический эффект был зарегистрирован на 3–4 сутки от начала лечения у 10 больных; визуальная (при ректоскопии) картина подавления воспалительной реакции слизистой — на 5–6-е сутки. У 4-х больных улучшения не наступило, у 2-х отмечали усиление болевого синдрома.

Свечи на гидрофильной основе применяли у 20 больных, оперированных по поводу геморроя с ушиванием ран слизистой анального канала, и у 18 больных, перенесших иссечение хронической анальной трещины. Курс лечения составлял 6–7 дней. Клинические результаты оценены положительно: случаев нагноения ран после геморрой-эктомии не отмечено, раны после иссечения аналь-

Матеріал, захищений авторським правом

ных трещин заживали на 3–4 дня раньше, чем при стандартном местном лечении.

Результаты исследований, подтвержденные лабораторными данными, показали, что препарат не влияет отрицательно на общее состояние больных, не способствует возникновению местных осложнений при лечении проктологической патологии. Полученные результаты дают основание считать перспективным дальнейшее применение препаратов плаценты как биостимуляторов местного действия при лечении острых и хронических заболеваний прямой кишки и оптимизации послеоперационного лечения для повышения его эффективности.

УДК 615.832.9: 616.831-005.1

Применение краниоцеребральной гипотермии в реабилитации больных, перенесших мозговой инсульт

Т. В. БОГАТЫРЕВА, Я. С. АФАНАСЬЕВА, О. И. ВАЛЮК

Украинский НИИ медицинской реабилитации и курортологии, г. Одесса

Острое нарушение мозгового кровообращения (мозговой инсульт – МИ) представляет собой тяжелую сосудистую катастрофу, приводящую к инвалидности и смерти. В то же время современная этапная терапия этой категории больных с основным акцентом на интенсивное медикаментозное воздействие, как свидетельствует практический опыт, является явно недостаточной. Обоснованное включение патогенетически значимых физических методов воздействия на этапе реабилитации больных, перенесших МИ, может значительно повысить эффективность их лечения.

Выбор метода краниоцеребральной гипотермии (КЦГ) определялся характером его действия, направленным на повышение устойчивости тканей, в частности мозга, к гипоксии и ишемии; улучшением церебральной гемодинамики; стимуляцией защитно-приспособительных процессов (нарушенных при МИ).

Краниоцеребральную гипотермию проводили при помощи аппарата "Гипотерм". Экстракраниальное охлаждение осуществляли постепенно, доводя парамембранную температуру до 34–35 °С (что соответствует температуре в глубинных отделах головного мозга), продолжительность процедуры 1–1,5 часа.

Лечение КЦГ получил 21 больной, перенесший МИ и поступивший на санаторно-курортный этап реабилитации. Все больные в возрасте 38–67 лет перенесли ишемический инсульт (в бассейне средней мозговой, позвоночной артерии). При поступлении на лечение основными жалобами были слабость и ограничение движений в конечностях (78%), головные боли (38%), головокружения (55%), нарушения речи (24%), снижение памяти (67%) и др.

Для комплексной оценки состояния больных МИ до лечения, а также для контроля за эффективностью проводимой КЦГ осуществлялись клиническое (по специально разработанной карте инсультных больных с оценкой симптомов в баллах), электрофизиологическое (с изучением мозговой гемодинамики по данным реоэнцефалографии, биоэлектрической активности мозга с помощью электроэнцефалографии), лабораторное (состояние липидного обмена, свертывающей и фибринолитической системы крови, показатели углеводного обмена, минерального обмена с определением содержания кальция, фосфора, щелочной фосфатазы в сыворотке крови; кальция, фосфора в моче) исследования.

Субъективная реакция больных МИ на проведение лечения с использованием КЦГ в целом была положительной. Однако чрезвычайно важны при отборе больных преморбидная личностная структура и тип реакции личности, что определяет адекватность восприятия такой необычной лечебной процедуры, как КЦГ. Анализ полученных результатов комплексного клинико-инструментального и лабораторного исследований показал возможность применения КЦГ у больных, перенесших МИ, даже в раннем реабилитационном периоде, и ее эффективность (о чем свидетельствует уменьшение клинической симптоматики и даже исчезновение некоторых субъективных проявлений болезни – головной боли, головокружений; у ряда больных – улучшение пульсового кровенаполнения и уменьшение явлений венозного застоя по данным РЭГ, урегулирование ритма на ЭЭГ). Выявлены особенности динамики коагулограммы, липидного обмена и, что чрезвычайно интересно, регулирующее влияние КЦГ на минеральный обмен (что проявлялось повышением исходно сниженного уровня кальция в сыворотке крови, позитивной динамикой щелочной фосфатазы), что, возможно, высвечивает новую грань в действии КЦГ и указывает на перспективу применения ее для профилактики остеопороза, часто встречающегося у больных, перенесших МИ.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 618.12-006.6: 612.87.1

Прогнозирование глубины крионекроза биологической ткани на основе математической модели теплопроводности у больных раком тела матки

О. Б. АНИПКО, А. А. МИХАНОВСКИЙ, К. А. ГОРБУНОВ

Институт медицинской радиологии им. С. П. Григорьева АМН Украины, г. Харьков
Национальный технический университет "Харьковский политехнический институт"

В настоящее время для прогнозирования результатов криодеструкции биологической ткани применяются различные методы, наиболее перспективным из которых является математическое моделирование.

Для прогнозирования глубины криодеструкции рака тела матки (РТМ) была рассмотрена задача в одномерной постановке. В результате ее решения были получены аналитические функции глубины начала и конца некроза опухоли в зависимости от времени криовоздействия, которые имели следующий вид:

$$\tau_{н.н} = 1{,}007L^{1{,}525};$$
$$\tau_{к.н} = 2{,}049L^{1{,}550},$$

где τ – время криовоздействия для начала и конца некроза, мин; L – глубина некроза, мм.

Однако недостатком решения этой задачи является то, что в ней не учитываются перетоки теплоты. Поэтому более точное решение может быть получено при рассмотрении двумерной задачи теплопроводности, в которой учитываются эти параметры в плоскости расчетной области.

В результате решения двумерной задачи теплопроводности нами были получены новые функции глубины начала и конца некроза в зависимости от времени криовоздействия:

$$\tau_{н.н} = 1{,}15L^{1{,}582};$$
$$\tau_{к.н} = 0{,}3L^{2{,}947}.$$

Для широкого обобщения полученных результатов решения они представлены в критериальном виде:

$$L = 0{,}01\left(\frac{\alpha_{эф}\,Nu}{Fo{\cdot}Bi}\right)^{2{,}39};$$

$$\frac{L}{Nu^{2{,}39}} = 0{,}01\left(\frac{\alpha_{эф}}{Fo{\cdot}Bi}\right)^{2{,}39},$$

что позволяет прогнозировать результаты не только криообработки РТМ, но и других опухолей с использованием различных хладагентов, а также проводить параметрические исследования.

Таким образом, на основании проведенного исследования были получены новые функции для прогнозирования глубины крионекроза опухоли в зависимости от времени криовоздействия и температуры хладагента, которые прошли апробацию и могут быть рекомендованы к применению.

УДК 618.12-006.6: 615.832.9: 617

Определение времени восстановления температуры ткани путем решения задачи оттаивания у больных раком тела матки после криодеструкции опухоли

О. Б. АНИПКО, А. А. МИХАНОВСКИЙ, К. А. ГОРБУНОВ

Институт медицинской радиологии им. С. П. Григорьева АМН Украины, г. Харьков
Национальный технический университет "Харьковский политехнический институт"

С целью повышения эффективности лечения рака тела матки (РТМ) перед началом специального лечения проводится криодеструкция опухоли. Однако, как показали гистологические исследования, при используемой методике криообработки полости матки в большинстве случаев отмечается лишь частичная криодеструкция РТМ, а через 48 ч после криовоздействия в неразрушенных участках опухоли появляется большое количество митозов, что является неблагоприятным фактором. Это связано с тем, что после окончания криовоздействия биологическая ткань начинает постепенно прогреваться. При этом теплоперенос осуществляется путем теплопроводности от внутренних источни-

Матеріал, захищений авторським правом

ков теплоты. При отогреве биологической ткани до температуры 4 °С начинается восприятие энергии клеткой и она делится быстрее. Ускоренный рост опухоли, возможно, связан еще и с тем, что количество подводимой к ткани энергии осталось неизменным, в то время как количество клеток, воспринимающих ее, резко сократилось в результате криодеструкции. Поэтому практически важно решить задачу определения времени, в течение которого ткань, подвергшаяся криовоздействию, прогреется до температуры 4 °С.

Цель настоящего исследования — определение времени восстановления температуры ткани методом решения задачи оттаивания.

Для описания процесса криодеструкции биологической ткани использовалось двумерное дифференциальное уравнение теплопроводности. При этом теплота фазового перехода учитывалась как эффективная теплоемкость. Температура ткани за пределами области криовоздействия принималась равной 37 °С.

В результате решения математической модели было получено распределение температуры биологической ткани T по глубине L с течением времени. При этом, учитывая, что зона крионекроза определялась с погрешностью 8–12%, следует принять

$$\frac{\tau_{\text{восст.}}}{\tau_{\text{нач.х.вм.}}} \approx 0{,}8 - 0{,}9 .$$

Таким образом, на основе анализа полученного решения было установлено, что время, необходимое для того чтобы замороженная ткань прогрелась до температуры 4 °С после окончания криовоздействия, составляет 2 ч 15 мин.

УДК 615.361.013.85.14.41: 616.37-002

Застосування досягнень кріобіології та кріомедицини в лікуванні панкреонекрозу

М. М. МИЛИЦЯ, О. І. МАРТИНОВСЬКИЙ, М. Д. ПОСТОЛЕНКО

Запорізький інститут удосконалення лікарів

Лікування панкреонекрозу — складна і невирішена проблема, пов'язана з частотою захворювань (15–30%), відсутністю тенденції до зниження летальності, яка становить 30% і вище, збільшенням кількості розповсюджених форм панкреонекрозу, що супроводжуються високою частотою розвитку шоку, поліорганної недостатності, гнійно-некротичними ускладненнями. В останнє десятиріччя швидко розвивається новий напрямок у медицині — клітинна і тканинна терапія. Вона характеризується ефективним впливом на патологічні процеси в організмі і актуальна в зв'язку зі збільшенням кількості захворювань, які супроводжуються імунними та ендокринними порушеннями. Імплантація тканин плаценти — джерело метаболічно активних речовин натурального походження, які проводять корекцію імунологічного статусу організму та стабілізують систему захисту антиоксидантного каскаду. Мета нашого дослідження — покращити результати способів хірургічного лікування панкронекрозу. У 20 пацієнтів з панкреонекрозом були використані технології малоінвазивних і малотравматичних хірургічних втручань у поєднанні з тканинною терапією. Біопрепарат (тканина кріоконсервованої плаценти) виготовлено в ІПКіК НАН України.

Фрагмент тканини кріоконсервованої плаценти імплантують у підшкірну клітковину черевної порожнини чи грудної клітини. Операція виконується під місцевим знеболюванням. Розтин шкіри — 1,5–2 см з формуванням тунелю в підшкірно-жировій клітковині, довжиною від 3 до 5 см, ретельний гемостаз. Фрагмент тканини кріоконсервованої плаценти вводиться в тунель якнайдалі від місця розтину. На шкіру накладається шов.

Фрагментована форма кріоконсервованої плаценти зручна для проведення її імплантації у підшкірно-жирову клітковину в місці, віддаленому від можливих оперативних втручань. Даний біопрепарат і метод його введення ефективні та безпечні, у хворих з панкреонекрозом не викликають побічних реакцій.

Після застосування зазначених заходів поліпшувалося самопочуття хворих, зменшувались явища психозу, токсичної енцефалопатії, задишка, тахікардія, збільшувався діурез, фіксувалось зниження сечовини, креатиніну, рівня молекул середньої маси і ЦІК. Про ефективність лікування панкреонекрозу свідчили: клінічні ознаки, результати рентгенофістулографії, ультрасонографії та томографії.

Спосіб лікування панкреонекрозу, що включає малоінвазивні та малотравматичні хірургічні втручання з додатковим проведенням імплантації фрагменту тканини кріоконсервованої плаценти в підшкірну клітковину черевної порожнини чи грудної клітини, при своєчасному застосуванні покращує результати лікування панкреонекрозу, запобігає виникненню прогностично несприятливих ускладнень чи зменшує їх прояви та летальність. Летальність не перевищила 9–10%.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 616-006.5: 615.832.9

Полипозный риносинуит и его патогенетическое лечение сверхнизкими температурами

А. С. ЖУРАВЛЕВ

Харьковский государственный медицинский университет

Хронические синуиты, особенно их пролиферативные формы, по-прежнему остаются частой патологией ЛОР органов, а их лечение является трудноразрешимой задачей, на что указывает довольно большой процент рецидивов заболевания (А. И. Муминов с соавт.,1990; Б. В. Шеврыгин, 1998). Как правило, чисто хирургические методы не дают удовлетворительных результатов, особенно при полипозных этмоидитах, где рецидивы практически запрограммированы и интенсивный рост полипов после операции отмечен многими авторами. Поэтому особую актуальность приобретает разработка новых высокоэффективных методов противорецидивного лечения хронических полипозных риносинуитов, которые были бы патогенетически целесообразны и отвечали всем требованиям, предъявляемым к ним практикой. В последнее время внимание практикующих врачей вновь привлекает криотерапия. Ранее холод применялся только для механической деструкции полипов и мобилизации местных и общих защитных систем организма. Исследования, проведенные Sakahura Y. et al.(1983), свидетельствуют, что для нормализации репаративных процессов в полости носа и синусов необходимо естественное функционирование отверстий, связывающих синусы с носовыми ходами и обеспечивающих физиологическую деятельность мукоцилиарной системы носа. Отсюда для получения быстрого и стойкого клинического эффекта у больных с пролиферативными синуитами, наряду с нормализацией иммунологической защиты, необходима санация среднего носового хода как главного коллектора передней группы синусов и, в частности, открытие естественного соустья пораженных пазух, так как движение мерцательного эпителия происходит именно к этим отверстиям. Нами у 48 больных с хроническими полипозными риносинуитами произведена оперативная санация полости носа с вскрытием клеток решетчатого лабиринта в сочетании с целенаправленной крионекротизацией полипозно измененной слизистой оболочки в области естественного соустья верхнечел юстных пазух, которые оказываются обтурированными. Это, по нашему мнению, является одним из основных факторов, способствующих внутрисинусовой гипертензии, поддерживающей патологический процесс.

Локальное криовоздействие осуществлялось на 2–3-й день после оперативного вмешательства с помощью созданного нами оториноларингологического криоаппликатора (А.с. № 1127581, № 1803057). Этот криоаппарат позволяет обеспечить доставку сверхнизких температур на рабочую часть криозонда диаметром 2 мм при длине 170 мм, что отличает его от других аналогов. Методика криовоздействия заключалась в подведении криозонда в теплом состоянии к фонтанели в полулунной щели, которая находится в среднем носовом ходе. Криовоздействие на полипозно измененную слизистую оболочку, обтурирующую естественное соустье верхнечелюстной пазухи с экспозицией 60 с, производится дважды. Во время лечебного процесса пациенты отмечали чувство некоторого давления у внутреннего угла глаза с соответствующей стороны, у них несколько усиливалась заложенность носа, ринорея. Однако, начиная со 2–3 дня после лечения сверхнизкими температурами, указанные нежелательные явления заметно регрессировали, средний носовой ход становился свободным, насморк прекращался. Осложнений или негативных реакций как во время лечения, так и в последующем не было. При наблюдении за больными в катамнезе в течение 2 лет отсутствие рецидива патологического процесса в полости носа и синусах отмечено у 81% обследованных.

У всех больных изучено в динамике состояние внутрисинусового давления с помощью водяного манометра. Установлено, что до начала лечения оно было повышенным и составляло в среднем $30,5 \pm 2,5$ мм водного столба. Через 2 недели после окончания комплексного лечения у всех пациентов этот показатель нормализовался.

Изучение клеточного и гуморального иммунитета до и после окончания лечения показало, что имеет место достоверное нивелирование дисбаланса лимфоидных клеток (Т-, В-, О-), а также содержания хелперов и супрессоров. Кроме того, через 2 мес после окончания лечения у всех больных наблюдалось увеличение содержания секреторного IgA до $15,4 \pm 1,4$. После окончания лечения больных с полипозом носа отмечено усиление как поглотительной, так и переваривающей способности нейтрофилов периферической крови по сравнению с исходными данными.

Таким образом, можно утверждать, что предлагаемый метод лечения больных хроническими полипозными риносинуитами с помощью целенаправленной крионекротизации естественного соустья верхнечелюстных пазух, проводимой в послеоперационном периоде, является высокоэффективным, простым и исключающим рецидивы на длительный период. Положительный результат лечения обусловлен его направленностью на элиминацию патогенетических звеньев воспалительного процесса: дисбаланс внутрипазушного давления, вторичную иммунологическую недостаточность.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 616.783.1732066-085.8329: 617

Перспективы использования криогенной техники в нейрохирургии

В. И. СИПИТЫЙ, Б. Н. МУРИНЕЦ-МАРКЕВИЧ

Харьковский государственный медицинский университет

Физико-технический институт низких температур им. Б. И. Веркина НАН Украины, г. Харьков

Отсутствие перифокальных и общемозговых реакций, а также геморрагических осложнений при минимальной травматизации после криохирургической деструкции послужило основанием для использования низких температур в нейрохирургической практике.

В СКТБ ФТИНТ совместно с кафедрой нейрохирургии ХГМУ разработаны комплекс криохирургической аппаратуры и методика криохирургического лечения различных заболеваний центральной нервной системы.

Лечение опухолей больших полушарий мозга осуществлялось с помощью криохирургической установки КМ-4, состоящей из сосуда Дьюара, пульта управления, гибкого шланга и криозонда, охлаждаемого жидким азотом и вводимого в опухолевую ткань. Для проведения криохирургических операций по разрушению медиобазальных опухолей разработан криозонд автономный нейрохирургический КМ-16, состоящий из малогабаритной ампулы с жидким азотом и сменного наконечника, имеющего длину 120 мм и диаметр 2 мм. Конструкция такого наконечника обеспечивает минимальную травматизацию окружаюших структур и деструкцию патологических очагов диаметром 3–4 см и позволяет применять его как для локального наружного замораживания, так и для криодеструкции глубинных структур стереотаксическим методом.

Применение криохирургической аппаратуры позволило провести криохирургические операции 62 больным со злокачественными опухолями больших полушарий мозга. Из 62 оперируемых больных улучшение наступило у 54, умерли 8 (12,9%). Длительные наблюдения показывают, что криохирургический метод лечения улучшает общее состояние больного и продлевает жизнь на 3–4 года.

Для лечения тяжелых форм невралгии тройничного нерва разработан криозонд КМ-34, который в качестве хладагента использует медицинскую закись азота, хранимую в баллонах под давлением 50 кГ/см^2. Рабочим участком криозонда является хирургическая игла с заглушенным герметично дистальным концом, диаметр которой 1,2 мм. Во внутреннюю полость иглы вводится капилляр диаметром 0,5 мм, на конце которого имеется сужение диаметра до 0,2 мм, что при подаче закиси азота из баллона по капилляру под давлением 40–50 атм обеспечивает холодопроизводящий эффект Джоуля–Томсона. Хирургическая игла вводится в мекелеву полость стереотаксическим методом через овальное отверстие и при подаче закиси азота под давлением по капилляру в месте контакта охлаждающего участка иглы и чувствительного корешка тройничного нерва создаются очаги криодеструкции диаметром от 3 до 4 мм.

В течение 5 лет прооперировано 56 больных в возрасте от 38 до 85 лет, страдающих тяжелой формой невралгии тройничного нерва. Проводилась крионейротомия чувствительного корешка в сочетании с крионейротомией периферических ветвей (I, II, III) тройничного нерва. Рецидивы отмечены у 6 больных, которые были повторно прооперированы криохирургическим методом. После повторных операций рецидивов не отмечено.

УДК 615.832.9: 612.663.5

Механизмы действия триггерной гипотермии в терапии "психосоматического бесплодия"

О. В. ЕРШОВА, В. И. ГРИЩЕНКО, И. И. ЛОМАКИН

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

По статистическим данным причиной 20–25% бесплодных браков является "психосоматическое бесплодие" – стерильный брак при полном отсутствии каких-либо необратимых патологических изменений, препятствующих зачатию и нормальному вынашиванию плода. Прежде всего это функциональные расстройства овуляции, вплоть до аменореи, возникающие в результате нарушения регулирующего влияния гипоталамо-гипофизарной системы, взаимоотношения ее нейрогуморальных функций и ингибирующего действия пинеальной железы. При этом необходимо учитывать возможность обратной связи, осуществляющейся активным воздействием половых гормонов на центральную нервную систему. В комплексе с сопутствующим аффективным компонентом это создает устойчи-

Матеріал, захищений авторським правом

вый патологический круг вторичной гормональной дисфункции и может способствовать нарушению развития имплантированного плодного яйца при полном отсутствии каких-либо патологических причин.

В проведенных нами экспериментальных исследованиях на белых крысах выявлены специфические механизмы действия триггерной гипотермии на систему нейроэндокринной регуляции. Базисная реакция катехоламинов заключалась в снижении содержания норадреналина в гипоталамусе на 30% (от 16,28 ± 0,74 до 10,68 ± 1,13 нг/г) по мере снижения ректальной температуры до 35–34 °С при отсутствии достоверных изменений его уровня в крови и снижении содержания в надпочечниках. Вместе с тем усиливалось поступление нейромедиаторов в структуры мозга через гематоэнцефалический барьер. Коэффициент проницаемости при триггерной гипотермии увеличивался для адреналина в 12 раз, норадреналина – в 5, ацетилхолина – в 3, ГАМК – в 8. Наряду с этим, отмечено динамическое изменение секреции серотонина на переживающих срезах эпифиза *ex vivo*. Изменения секреции серотонина в эпифизе можно рассматривать как реакцию, направленную на поддержание адекватности нейрогуморальных процессов гипоталамо-гипофизарной системы в условиях периодического расширения границ температурного гомеостаза. Формирующиеся пространственно-временные паттерны биоэлектрической активности позволяют контролировать развитие процессов в динамике. Функционально-динамическое изменение тонуса центральных адренергических структур влечет изменение вегетативной регуляции и отражается на биохимических и физиологических процессах в органах и тканях. Наблюдается умеренное повышение в крови простагландина Е, снижение содержания цАМФ в плазме крови. Активация симпатических влияний и увеличение содержания простагландина Е могут быть связаны с его аккумуляцией в тканях. Отмечается восстановление эстрального цикла у крыс, подвергшихся экспериментальному стрессовому воздействию. Обобщая результаты экспериментальных наблюдений, можно предположить, что триггерная гипотермия позволяет моделировать состояние повышенной активности нейрогуморальных систем, ускоряя физиологическую реакцию, направленную на выравнивание гомеостатических реакций адаптации.

Клиническая реализация возможностей триггерной гипотермии выявила терапевтическую эффективность метода. Отмечались редукция аффективной окраски процесса, выравнивание эмоционального тонуса. Индивидуальные особенности даже в структуре патогенетически идентичных процессов обусловливались возрастом, заинтересованностью вегетативной и эндокринной систем, длительностью течения болезненного процесса. Восстановление менструального цикла способствовало быстрой индивидуальной переоценке состояния.

Проведенные исследования являются начальным этапом использования триггерной гипотермии для коррекции циклических процессов в организме, влияющих на репродуктивную функцию.

УДК 612.592: 616.314.17-008.1

Адаптивные механизмы резонансных холодовых воздействий и перспектива применения парафрактальной гипотермии при стресс-индуцированных поражениях пародонта

Г. В. МАЛЫШЕВА, Г. А. БАБИЙЧУК, В. С. МАРЧЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Среди проблем, касающихся этиологии и патогенеза болезней пародонта, научная группа ВОЗ еще в 1980 г. признала актуальными исследования влияния психологического стресса. Отечественные ученые доказали важную роль общего адаптационного синдрома в патогенезе заболеваний пародонта (Л. М. Тарасенко с соавт., 1999), указав на особое значение перенапряжения симпатического звена. Поэтому следует ожидать, что методы воздействия, направленные на повышение устойчивости организма к эмоциональному стрессу, могут оказаться эффективными и при лечении различных патологий пародонта. К таким методам, способствующим процессам саногенеза, относятся различные варианты лечебных холодовых воздействий.

В клинических работах киевской школы стоматологов (А. П. Грохольский с соавт., 1995) показана эффективность использования прерывистых контрастных температурных воздействий. Однако эмпирический характер выбора параметров лечебной гипотермии ограничил возможности ее применения. Основные механизмы действия на организм резонансной гипотермии (РГ), в том числе и при эмоциональном стрессе, в общих чертах определены. Показан ее адаптивный эффект при экспериментальной гипертензии, остром переохлаждении, пере-

Матеріал, захищений авторським правом

греве, судорожных состояниях. В этих условиях происходят стимуляция гипоталамических центров за счет регуляции проницаемости ГЭБ для вегетотропных нейромедиаторов и нормализация симпато-парасимпатических отношений (В. Г. Бабийчук, В. С. Марченко, А. В. Шило и др., 1997–2001). Однако использованные режимы резонансной гипотермии (60–120 мин с частотой ζ-биотоков 0,05–0,5 Гц) оказались недостаточно эффективны при пародонтозоподобной патологии, вызванной хроническим эмоционально-болевым стрессом. После РГ существенно ослаблялись, но сохранялись признаки дистрофии, особенно на краевом пародонте, отмечались кровоточивость, ретракция, воспаление десен, слущивание эпителия, оголение шеек зубов. Возможно, для купирования болезней пародонта РГ не обеспечивает достаточную степень снижения возбудимости ЦНС, хотя в этих условиях порог возбудимости (время возникновения пенициллиновых судорог) существенно повышался.

Пародонт — высокочувствительная рефлексогенная зона, отличающаяся богатой инервацией и васкуляризацией, в которой широко распределены адрено- и холинорецепторы, а весь комплекс тканей находится в тесной функциональной связи с гипоталамусом. Именно на эти звенья направлен предлагаемый подход к разработке комплекса новых программ резонансной гипотермии.

Анализ результатов наших экспериментов по данной проблеме показал, что после РГ динамика релаксации проницаемости ГЭБ для катехоламинов в диапазоне величин секунда–сутки масштабно инвариантна с квазифрактальной структурой (размерность ≈1,3). Примечательно, что основные ультраструктурные компоненты ГЭБ в статистическом смысле самоаффинны и при РГ также характеризуются фрактальной размерностью ~1,3 (Л. Н. Марченко с соавт.,1999–2000). Можно говорить о формировании структурно-динамической фрактальной системы, которая к тому же является структурно-функциональной основой прямых и обратных связей регуляции общего уровня активности мозга. Поэтому представляется целесообразным использовать фрактальные режимы резонансной терапии для купирования последствий дистресса, в том числе и в практической пародонтологии.

УДК 612.014.43: 611.013.68: 616.12-008.331.1.08

Сочетанное влияние ритмического холодового воздействия и кордовой крови на активность протеиназ и их ингибиторов у старых крыс со стимулированной гипертензией

Л. М. САМОХИНА, В. Г. БАБИЙЧУК, В. В. ЛОМАКО, И. А. ПОЗНАХАРЕВА, В. С. МАРЧЕНКО, В. В. МАМОНТОВ, А. В. ШИЛО, И. И. ЛОМАКИН

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Институт терапии АМН Украины, г. Харьков

Система протеиназа–ингибитор протеиназ участвует в формировании неспецифических защитных реакций организма. Нарушение баланса в указанной системе является характеристикой стресса, патологии, возраста. В качестве модулятора неспецифических изменений в организме могут быть использованы ритмические холодовые воздействия (РХВ) и кордовая кровь (КК).

Цель исследования — выявить характер сочетанного влияния РХВ на активность протеиназ, α-1-ингибитора протеиназ (α-1-ИП), α-2-макроглобулина (α-2-МГ) в условиях стимулированной гипертензии у старых крыс.

Эксперименты проведены на белых беспородных крысах (возраст 2 года). Моделировали рефлексогенную гипертензию болевыми раздражениями путем прерывистого воздействия электрическим током до появления стабильно повышенного артериального давления. РХВ осуществляли однократно в течение 65 мин ненаркотизированным крысам при помощи охлаждающего устройства, разработанного в ИПКиК НАНУ. Кордовую кровь 17–19-дневных эмбрионов крыс и зрелую кровь (ЗК) беременной крысы получали согласно методическим рекомендациям, разработанным в ИПКиК НАНУ; вводили внутрибрюшинно по 0,5 мл (количество клеток в дозе препарата — $3{,}5 \cdot 10^7$/мл). Крыс декапитировали через 4 сут после инъекции.

Ткани легких, сердца, печени и почек гомогенизировали и затем центрифугировали на центрифуге РС-6 при 5 000 об./мин при температуре 4 °С. Активность протеиназ (общая протеолитическая активность), α-1-ИП, α-2-МГ определяли с использованием высокочувствительных (10^{-9}–10^{-10} г) ферментативных методов, разработанных в Институте терапии АМН Украины (Пат. России № 1655991, Пат. Украины № 20171).

Отмечено, что стимулирование гипертензии приводит к существенному повышению активности протеиназ в печени и в незначительной мере — в почках при отсутствии изменений уровней ингибиторов протеиназ. Влияние РХВ у интактных

Матеріал, захищений авторським правом

крыс оказывает более существенный эффект на данную систему и приводит к активации протеиназ в легких, печени, почках на фоне существенного снижения α-1-ИП в печени, что характерно для развития стрессовой реакции.

В результате РХВ у крыс с гипертензией наблюдали нормализацию активности протеиназ и снижение α-1-ИП в легких и в большей мере — в сердце и печени (ниже контрольного уровня). Влияние КК у крыс с гипертензией приводило к снижению и нормализации активности протеиназ и уменьшению уровня α-2-МГ в легких и печени. Выявлено, что данные эффекты КК не характерны для ЗК. Сочетанное влияние РХВ и КК способствует нормализации активности протеиназ без изменений уровня α-1-ИП и с существенным повышением α-2-МГ в сердце.

Снижение ингибиторного потенциала в результате воздействия отдельно РХВ и КК у крыс с гипертензией свидетельствует об ослаблении неспецифической резистентности организма. Сочетанное их применение приводит к коррекции изменений, вызванных стимулированием гипертензии, и способствует повышению защитного потенциала в сердце, нарушение функционирования которого характеризует данное патологическое состояние.

УДК 615.361.013.9.014.41: 616-089.843

Пункционное введение фетального клеточного материала в орган-мишень как способ повышения эффективности трансплантации

А. Д. ЗУБОВ

Диагностическая служба Донецкого областного клинического территориально-медицинского объединения

Фетальный клеточный материал (ФКМ) все более активно используется в практической медицине при лечении различных заболеваний. Уровень успеха фетальной клеточной трансплантации зависит от минимализации проявлений реакции отторжения, сохранения жизнеспособности и функциональной активности вводимого ФКМ. Указанные параметры находятся в непосредственной зависимости от зоны и способа введения взвеси фетальных клеток. В настоящее время используется несколько способов введения ФКМ:

1) внутривенное (например, взвесь фетальных гепатоцитов);

2) инъекция в подкожную жировую клетчатку передней брюшной стенки;

3) инъекция под влагалище прямой мышцы живота;

4) формирование хирургическим путем депо ФКМ в сальнике.

Недостатки указанных способов связаны с быстрой инактивацией в организме (1), с развитием реакции отторжения, формированием демаркационной зоны, затруднением резорбции продуктов функционирования фетальных клеток в кровеносное русло (2–3), необходимостью хирургического вмешательства (4). По нашему мнению, оптимальным является малоинвазивное пункционное введение взвеси ФКМ под контролем средств визуализации. В настоящее время наиболее распространенными из них являются УЗИ, компьютерная и магнитно-резонансная томография. В связи с большей доступностью, безвредностью, возможностью динамического наблюдения в реальном масштабе времени наибольшие преимущества имеет УЗ контроль с цветным допплеровским картированием (ЦДК). В соответствии с современными разработками можно вводить ФКМ непосредственно в тимус, субкапсулярно в селезенку, интрапортально и в другие органы-мишени.

Непрерывный УЗ контроль с ЦДК позволяет избрать безопасную траекторию доступа к органу-мишени, оценить васкуляризацию предполагаемой зоны введения и соответственно ожидаемую скорость вымывания ФКМ и диффузии продуктов их функционирования в кровеносное русло, адекватность и достаточность вводимого объема клеточной суспензии, выявить возможные осложнения (геморрагия, подтекание взвеси) и своевременно принять меры по их купированию. Применение ЦДК также позволяет улучшить визуализацию пункционной иглы.

В отделе хирургии диагностической службы нашего объединения имеется опыт пункционного введения под УЗ контролем с ЦДК (УЗ сканер Dornier AI 5200 с допплерографической приставкой с конвексным датчиком 3,5 и 5 МГц) фетальных гепатоцитов в портальную вену печени при печеночной недостаточности и фибробластов в полость крупных суставов при посттравматических артрозах. Во всех случаях введение было выполнено в заданной зоне, при пункции осложнений не было, отмечена положительная клиническая динамика.

Таким образом, введение ФКМ в орган-мишень под УЗ контролем с ЦДК является перспективным способом повышения эффективности и безопасности фетальной клеточной трансплантации.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 615.832.9: 616.342-008.8

Опыт криолечения послеоперационных ран у больных, оперированных по поводу перфоративных язв

А. Е. ЛАГОДА, Г. Е. МОЛОТЯГИН, В. М. ЗЫБИН, С. А. ПАВЛИЧЕНКО, Ю. П. ГНИДЕНКО, А. С. ПЕТРЕНКО

Харьковский государственный медицинский университет

Проведено криохирургическое лечение нагноившихся лапаротомных ран у 67 больных, оперированных по поводу перфоративных язв двенадцатиперстной кишки. После иссечения нежизнеспособных тканей криообрабатывали раневую поверхность парожидкостной струей азота при помощи криораспылителя КР-02 на расстоянии 20–30 см до побеления раны и кратковременного появления на ней инея. В дальнейшем лечение проводили по общепринятым методикам.

Контрольную группу составили 32 пациента, которым нагноившиеся лапаротомные раны лечили по общепринятым методикам без применения криовоздействия. Эффективность проводимого лечения определяли по характеру течения раневого процесса: учитывались сроки очищения раны от гноя, фибрина и некротических масс, особенности протекания второй фазы раневого процесса (сроки заполнения раны грануляционной тканью и начала эпителизации). Для объективизации данных на 1-е, 3-и и 7-е сутки после начала лечения проводили цитологическое исследование экссудатов, для чего использовали мазки-отпечатки, взятые с раневой поверхности, фиксированные смесью Никифорова и окрашенные по Романовскому–Гимзе.

При клиническом изучении протекания раневого процесса в рассматриваемых группах в первые сутки существенных различий отмечено не было: у всех больных наблюдались увеличенное количество экссудатов, выраженная перифокальная гиперемия и инфильтрация мягких тканей. На 3-и сутки отмечалась более выраженная регрессия воспалительных изменений в группе больных, которых лечили с применением криовоздействия. К 7-м суткам у пациентов основной группы кожа вокруг раны приобретала обычную окраску, практически не определялись инфильтрация и болезненность мягких тканей. У пациентов контрольной группы в этот период сохранялись гиперемия кожи вокруг раны, отечность мягких тканей, болезненность при пальпации, у всех больных отмечалось наличие гнойного отделяемого.

При исследовании бактериальной обсемененности раневой поверхности в исследуемых группах нами были получены следующие результаты: у пациентов основной группы уже к 3-м суткам стерильность ран была отмечена у 43 больных, к 7-м суткам у всех больных наблюдалась стерильность экссудатов, в то время как в контрольной группе и на 7-е сутки их стерильность отмечалась только у 25 пациентов.

Продолжительность пребывания в стационаре больных, которым было проведено лечение с применением криовоздействия, составила в среднем 24,3 дня, в контрольной группе – 27,8 дня.

Таким образом, воздействие на нагноившуюся операционную рану парожидкостной струей азота является эффективным дополнением к хирургической обработке, позволяющим значительно уменьшить микробную обсемененность раны и существенно ускорить сроки ее заживления.

УДК 618.177-089.888.11: 615.361.013.11.014.41

Течение беременности и родов у пациенток после лечения бесплодия с использованием криоконсервированной спермы донора

А. Г. ГЕРОДЕС, Е. К. АЛИПОВА, Л. И. ЛУЦКАЯ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Центр репродукции человека "Имплант", г. Харьков

Бесплодие в браке – большая медико-социальная проблема современности. Мужская репродуктивная система – одна из наиболее чувствительных у человека. На долю мужского бесплодия приходится от 15 до 50% всех бесплодных браков. К настоящему времени искусственная инсеминация стала одним из основных методов лечения бесплодия, обусловленным нарушением сперматогенеза.

Использование в современных репродуктивных технологиях спермы донора стало возможным благодаря разработке методов криоконсервирования гамет. Цель работы – оценка наступления, течения

Матеріал, захищений авторським правом

и исхода беременностей у пациенток после искусственной инсеминации криоконсервированной спермой донора (ИСД).

Было проведено лечение методом ИСД 135 женщин в возрасте 23–35 лет с первичным бесплодием. Показаниями к проведению ИСД были нарушения сперматогенеза у мужей (азооспермия, некроспермия). Инсеминацию проводили внутриматочно дважды в период овуляции, который определяли при трансвагинальной эхографии на ультразвуковом сканирующем устройстве Brüel&Kjar 1849, с использованием вагинального секторального датчика с частотой сканирования 7 МГц. Было проведено 224 цикла, из них в 123 – медикаментозная стимуляция фолликулогенеза и овуляции (по показаниям). Получено 59 беременностей (43,6% на пациента, 26,3% на цикл инсеминации), из них две двойни. Четыре беременности замерли в сроке до 10 недель (6,7%). У 8 пациенток беременности протекали с токсикозом первой половины беременности (13,5%), у 3-х – с угрозой прерывания беременности в раннем сроке (5%), у 7 пациенток наблюдались отеки (11,8%), у 2-х – нефропатия 1–2-й степени (3,4%). О родах известно у 50 пациенток, что составило 83%. В 87% случаев роды наступили в срок, 12 пациенткам было проведено родоразрешение путем операции кесарево сечение: у 4-х пациенток – в связи со слабостью родовой деятельности (8%), у двух пациенток – в связи с возрастом (35 лет) и большой заинтересованностью в рождении ребенка, одной – в связи с двойней и тазовым предлежанием первого плода. Пять беременностей прогрессируют.

Таким образом, течение беременностей и родов у пациенток ИСД в наших исследованиях практически не отличалось от течения спонтанных беременностей в общей популяции.

К настоящему времени накопилась обширная информация, свидетельствующая о том, что у детей, родившихся после искусственной инсеминации криоконсервированной спермой, пороки развития встречаются с той же частотой, что и при естественном зачатии. В наблюдаемой группе родилось 52 ребенка: 18 (34%) девочек и 34 (66%) мальчика. Состояние большинства родившихся детей удовлетворительное, которое оценено по шкале Апгар в 8–9 баллов. Четверо (8%) родились в асфикции первой степени. Вес детей при рождении составил 3 280 ± 250 г.

Таким образом, использование криоконсервированной спермы позволяет проводить лечение бесплодия, не оказывая отрицательного влияния на течение беременности и родов у пациенток, а также здоровье детей, родившихся после лечения их матерей методом ИСД.

УДК 615.832.9.811.2: 616.83

Гипотермическая оптимизация гирудотерапии при церебральной сосудистой патологии

В. Ю. ВАСИЛОВСКИЙ, Л. Ф. ВАСИЛОВСКАЯ, В. В. ВАСИЛОВСКИЙ, О. И. АНАСТАСИАДИ, К. В. СКРИПНИЧЕНКО

1-я поликлиника ТМО Ленинского р-на, г. Харьков

Современный интерес к гирудотерапии обусловлен благотворным ее влиянием на кровообращение, микроциркуляцию, свертывающую систему крови, обменные процессы в целом при различных заболеваниях, в том числе дисциркуляторной энцефалопатией. Вместе с тем локальное применение медицинских пиявок нередко сопровождается частой длительной кровоточивостью, местными аллергическими и воспалительными проявлениями, что затрудняет динамическую, стабильную коррекцию патологических сдвигов и требует разработки новых подходов к методу гирудотерапии, позволяющих избавиться от побочных эффектов.

Экспериментальными данными были подтверждены возможность активации микроциркуляторного дренажа тканей и противовоспалительное действие локальной гипотермии. Учитывая данное обстоятельство, нами было использовано сочетание местной гипотермии с гирудотерапией шейно-воротниковой зоны и проекции сосцевидных отростков у пациентов пожилого возраста с дисциркуляторной энцефалопатией.

Для оценки лечебного действия определялись общие и локальные клинические симптомы, показатели церебральной гемодинамики по данным ультразвуковой допплерографии, коагулограммы и реологических свойств крови.

В результате проведенного исследования зарегистрировано улучшение общей клинической картины заболевания с нормализацией системной и церебральной гемодинамики, коагуляционных и реологических свойств крови. Следует отметить, что применение локальной гипотермии после воздействия медицинских пиявок у больных с дисциркуляторной энцефалопатией резко уменьшало кровоточивость, отечность и инфильтрацию тканей, воспалительные и аллергические реакции в зоне повреждения кожи, что оптимизирует гирудотера-певтический эффект.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 617-002.3-085.38.398

Застосування препаратів фетоплацентарного комплексу у хворих з гнійною хірургічною патологією

В. О. ШІДЛОВСЬКИЙ, І. М. ДЕЙКАЛО, І. В. ЧЕПІЛЬ

Тернопільська медична академія ім. І. Я. Горбачевського

Відомо, що гнійні захворювання супроводжуються значною імуносупресією, яка вимагає корекції. У комплексному лікуванні нагнійних захворювань та післяопераційних гнійно-септичних ускладнень застосовують імуномодулятори (левомізол, Т-активін, тімазол). У літературі є повідомлення про виражену загальностимулюючу дію, в тому числі і імунної системи, препаратів фетоплацентарного комплексу (ФПК): кріоекстракт плаценти, плацентарна тканина, сироватка пуповинної крові, препарати ембріональних тканин та ін.

Мета роботи – вивчити ефективність застосування препаратів ФПК для імунокорекції в комплексному лікуванні хворих на гостру гнійну хірургічну патологію. Обстежено 6 хворих на гострий деструктивний панкреатит, один хворий – на обмежений апендикулярний перитоніт, одна хвора – на обширну анаеробну неклостридіальну флегмону передньобокової стінки живота, грудної клітки та поперекової ділянки. У клініці апробовано два препарати ФПК: кріоекстракт плаценти (у 2-х хворих), який вводили по 1,5 мл 5 разів з інтервалом у 3 дні, та кріокорд – препарат кордової крові (у 6 хворих), який вводили в дозі 1,0 мл 5 ін'єкцій через день.

Ефективність лікування оцінювали по показниках клітинного та гуморального імунітету (Тл-, Вл-, То-, Тх/Тс-, IgA, G, M), ЦІК, ендогенної інтоксикації (МСМ, ЕІІ) при порівнянні вихідних даних та результатів досліджень на 7-у та 14-у добу після введення препаратів.

У всіх пацієнтів мало місце значне зниження імунологічної реактивності в основному за рахунок Т-ланки. Показники клітинного імунітету у хворих до лікування знаходилися в межах: Тл – 36,1 ± 1,7; Вл – 12,3 ± 0,3, відмічалось значне напруження імунітету Тх/Тс 3,0 ± 0,2; ЦІК – 288,2 ± 11,6; підвищення IgA, G, M відповідно 4,2 ± 0,6; 10 ± 1,1; 3,7 ± 0,4; рівень То-клітин 38,2 ± 1,1; значне підвищення показників ендогенної інтоксикації МСМ М1 – 673,1 ± 40,9; М2 – 293,2 ± 21,6; ЕІІ – 52,5 ± 2,2.

На 7-й день після завершення курсу тканинної терапії у всіх хворих відмічалось підвищення рівня Тл – 49,1 ± 3,1, зменшення кількості ЦІК до 174,0 ± 12,4, значне зниження показників ендогенної інтоксикації: М1 – 377,2 ± 22,2; М2 – 163,0 ± 13,1; ЕІІ – 35,9 ± 1,8.

На 14-у добу після введення відмічалась нормалізація показників імунологічної реактивності Тл – 58,1 ± 2,3; Вл – 8,0 ± 1,1; То – 23,2 ± 1,6; Тх/Тс – 2,3 ± 0,2; IgA, G, M відповідно 1,5 ± 0,2; 7,4 ± 0,5; 1,5 ± 0,2 г/л; ЦІК – 94,8 ± 5,3, а також достовірне зниження показників ендогенної інтоксикації МСМ М1 – 295,2 ± 21,2; М2 – 134,1 ± 8,1; ЕІІ – 26,4 ± 1,7 у порівнянні з вихідними даними та даними обстежень на 7-у добу.

Клінічно відмічалось значне покращення загального стану хворих, перебігу захворювання, скорочення терміну лікування. Таким чином, проведені дослідження підтверджують доцільність застосування препаратів ФПК у комплексному лікуванні хворих із гнійною хірургічною патологією.

УДК 612.592.35.646: 57.085

Эффективность сахарозосодержащего раствора для суточного гипотермического хранения печени половозрелых крыс и эмбрионов человека

О. А. СЕМЕНЧЕНКО, Л. П. КРАВЧЕНКО, И. В. ШАНИНА, А. Ю. ПЕТРЕНКО, Б. Д. ФУЛЛЕР

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

University Department of Surgery, Royal Free & University College Medical School, London NW3 2QG, United Kingdom

В настоящее время в клинической практике широко используется консервирующий раствор Университета Висконсин (UW), с помощью которого удалось значительно продлить сроки холодового хранения печени донора до трансплантации. Высокая стоимость данной среды заставила искать новые подходы для решения проблемы эффективного консервирования целой печени при 0–4 °С. Нами установлено, что раствор, содержащий слабо проникающую в клетку сахарозу, обладает способностью сохранять объем клеток и высокий метаболический статус изолированных гепатоцитов в условиях гипотермии. Задачей настоящего исследования явилось сравнительное изучение эффек-

Матеріал, захищений авторським правом

тивности раствора UW и сахарозосодержащего раствора (ССР) при суточном хранении целой печени в условиях бытового холодильника. Изучались динамика изменения внутриклеточного содержания АТФ и уровень активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ), аланинаминотрансферазы (АлТ) и аспартатаминотрансферазы (АсТ) в перфузате после 24-часового хранения печени взрослых крыс при 4 °С и последующей 60-минутной нормотермической реперфузии.

Результаты исследований показали, что отмывка от крови и насыщение печени различными консервирующими растворами не изменяли их энергообеспечения после 60 мин хранения при 4 °С. Содержание АТФ составляло для ССР 3,4, а для среды UW – 3,5 мкмоль/г. После хранения печени в течение 24 ч отмечалось снижение содержания АТФ в ССР до 2,05 и в среде UW – до 1,75 мкмоль/г. При последующей нормотермической реперфузии органов наблюдалась тенденция к дальнейшему снижению уровня АТФ.

Активность цитоплазматических ферментов в перфузате в ходе нормотермической реперфузии печени характеризует степень повреждения гепатоцитов. Достоверных различий в солюбилизации ЛДГ, АлТ и АсТ в перфузат в контрольных образцах (60 мин хранения) обнаружено не было ни при использовании ССР, ни раствора UW. После 24 ч холодового хранения печени в указанных средах к концу реперфузии наблюдалось увеличение активности изученных ферментов в 2 и более раза по сравнению с уровнем в контрольных пробах, динамика солюбилизации ЛДГ, АлТ и АсТ была практически одинакова для обоих консервирующих растворов.

Таким образом, использование ССР для гипотермического хранения печени взрослых крыс не менее эффективно, чем среды UW. Основываясь на этих результатах, была проведена оценка целесообразности использования ССР для гипотермического хранения печени эмбрионов человека 7–12 недель гестации. В качестве контроля в этих экспериментах использовали раствор Хенкса. Показано, что жизнеспособность клеточных суспензий, выделенных из печени, которая хранилась в течение 24 ч при 4 °С, не зависела от среды хранения. Однако последующее криоконсервирование позволило выявить достоверные различия: жизнеспособность деконсервированных клеток печени, хранящейся в ССР, была выше.

Исследования, проведенные на печени эмбрионов и взрослых млекопитающих, показывают, что ССР обладает высокой эффективностью и может использоваться как консервирующая среда для гипотермического хранения органов.

УДК 617: 616.24: 615.27: 57.043

Опыт применения эндотрахеального введения экстракта криоконсервированных фрагментов ксеноселезенки в комплексном лечении больных с гнойными процессами в легких

В. В. БЫЗОВ, И. П. ВЫСЕКАНЦЕВ, С. Е. ГАЛЬЧЕНКО, Б. П. САНДОМИРСКИЙ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Комплексное лечение больных с острыми гнойными процессами в легких включает дренирование гнойника, антибактериальную, дезинтоксикационную, иммуномодулирующую терапию и бронхологическую санацию. Наряду с другими методами для дезинтоксикации используют перфузию крови больного через экстракорпорально подключенную ксеноселезенку, либо ее срезы или фрагменты, в том числе криоконсервированные, а также внутривенное введение перфузата ксеноселезенки.

В отделе экспериментальной криомедицины ИПКиК НАН Украины разработаны методы получения криоконсервированных фрагментов ксеноселезенки и их экстракта для последующего клинического использования. Была изучена клиническая эффективность эндотрахеального введения экстракта криоконсервированных фрагментов ксеноселезенки (ЭКФКС) в комплексном лечении 58 больных с абсцессами легких. ЭКФКС эндотрахеально вводили через микротрахеостому в количестве 5 мл 2 раза в сутки в течение 10–12 дней. Больным контрольной группы с аналогичными заболеваниями эндотрахеально вводили антимикробные препараты.

В процессе комплексного лечения у больных основной группы параллельно с более выраженной положительной клинической динамикой отмечалось также достоверно более быстрое восстановление показателей факторов неспецифической резистентности и специфического иммунитета. Быстрее восстанавливались активность фагоцитоза и НСТ-тест в альвеолярных макрофагах и сегментоядерных нейтрофилах бронхиального секрета. Концентрация альфа-интерферонов в мокроте больных после введения ЭКФКС была достоверно выше, чем у больных контрольной группы. Эндотрахеальное введение ЭКФКС способствовало восстановлению концентрации лизоцима в мокроте больных уже на 5–7-е

Матеріал, захищений авторським правом

сутки, тогда как у больных контрольной группы этот показатель до нормы не восстанавливался.

После эндотрахеального введения ЭКФКС у больных основной группы более выраженно ингибировались процессы перекисного окисления липидов, что сопровождалось понижением концентрации в плазме крови супероксиддисмутазы (ключевого фермента антиоксидантной защиты) и повышением концентрации α-токоферола.

На 10–12-е сутки у пациентов основной группы до значений нормы восстанавливались концентрация комплемента в крови, содержание С-реактивного белка, значительно снижалась СОЭ. Кроме того, после введения ЭКФКС у больных быстрее восстанавливались до значений нормы или имели достоверно выраженную тенденцию к восстановлению такие показатели клеточного и гуморального иммунитета периферической крови, как абсолютное число Т- и В-лимфоцитов, количество Т-активных лимфоцитов, Т-хелперов, Т-супрессоров, иммунорегуляторный индекс, содержание ЦИК, концентрация IgA, IgM, IgG, а также концентрация секреторного IgA в мокроте больных.

Никаких побочных эффектов за весь период лечения и наблюдения за больными в течение 2,5 лет после окончания курса лечения отмечено не было.

УДК 615.361.013.85.014.41: 618.173

Опыт применения гетеротопической трансплантации криоконсервированной плаценты у женщин в перименопаузе

Н. С. ЛУЦЕНКО, И. В. ЛОМАКА, И. Н. КИРИЧЕНКО

Запорожский институт усовершенствования врачей

Актуальность проблемы лечения патологического течения климактерического периода, а именно климактерического синдрома (КС), обусловлена высокой частотой патологии, колеблющейся от 43,4 до 80% (В. П. Сметник, 1997; М. А. Репина, 1997; Т. Ф. Татарчук, 2000). Известно, что у 85% женщин с КС в перименопаузе лидирующее положение занимают психоэмоциональные нарушения, приводящие к социальной дизадаптации и снижению качества жизни (А. Венига, 1996; А. С. Шаповаленко, 2000). С наступлением менопаузы одним из свидетельств психологической "перестройки" является прогрессирование эмоциональной нестабильности (нейротизма). Целью исследования стало изучение влияния гетеротопической трансплантации криоконсервированной плаценты (ГТКП) на показатели психологического статуса у женщин с КС в перименопаузе.

Всего обследовано 25 женщин. Средний возраст составил 47,9 ± 0,3 года. Продолжительность менопаузы не превышала 2-х лет. Всем женщинам после верификации диагноза, определения модифицированного менопаузального индекса (ММИ), степени выраженности нейротизма (Н. В. Киршева, Н. В. Рябчикова, 1995) и вычисления коэффициента отношения эмоциональная стабильность/эмоциональная нестабильность ($К_{эс/эн}$) была проведена ГТКП. Образцы плацентарной ткани получали в ИПКиК НАН Украины. По показателям суммарных эстрогенов (СЭ) определяли уровень эстрогенного дефицита, а степень дисфункции в симпато-адреналовой системе (САС) – по уровню экскреции адреналина (А), норадреналина (НА), дофамина (ДА) и ДОФА (Д). Клинико-лабораторный мониторинг проводился через 3 и 6 мес.

Легкая и средняя степень выраженности климактерических нарушений имела место у 64% пациенток, тяжелая – у 36%. $К_{эс/эн}$ составил 0,3 при ММИ, равном 73,7 ± 8,9 балла. обнаружена сильная положительная корреляционная связь ($r = 0,84$) между показателями нейротизма (при средней оценке 18,9 ± 0,4 балла) и выраженностью психоэмоциональных нарушений (средний показатель 24,4 ± 1,6 балла).

Определение гормонального гомеостаза показало наличие абсолютной гипоэстрогении (средний уровень СЭ составил 12,9 ± 0,9 мкг/сут) и превалирование тонуса медиаторного звена САС над гормональным (показатели соответствовали: А – 3,95 ± 0,27; НА – 24,0 ± 3,6; ДА – 145,6 ± 17,2 и Д – 62,7 ± 6,5 мкг/сут).

Через 3 мес посттрансплантационного периода показатель нейротизма составил 16,1 ± 0,5 балла, а $К_{эс/эн}$ соответствовал 0,5; средняя величина СЭ составила 35,1 ± 7,8 мкг/сут, отмечалось достоверное ($p < 0,05$) повышение экскреции НА и предшественников катехоламинов.

Через 6 мес от момента проведения ГТКП показатель нейротизма составил 14,2 ± 0,3 балла, $К_{эс/эн}$ – 0,7. Уровень СЭ превысил соответствующий до лечения практически на 100%, а изменения в экскреции катехоламинов свидетельствовали об увеличении резервных и компенсаторных возможностей САС.

Таким образом, результаты проведенного исследования показали уменьшение уровня нейротизма у женщин с КС на фоне ГТКП, что наряду с повышением уровня СЭ и уменьшением катехоламиновой дисфункции приводит к нивелированию клинической симптоматики климактерических нарушений.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 615.361.014.41: 57.086.13

Некоторые этические основы деятельности тканевых банков

Л. Т. ВОЛОВА, В. В. РОССИНСКАЯ, С. А. ЕМЕЛЬЯНОВ

Самарский государственный медицинский университет, Россия

Самарский государственный университет, Россия

История создания службы заготовки и консервации органов, тканей и тканевых компонентов (исключая службу крови) насчитывает менее 50 лет. После окончания 2-й мировой войны люди мира очень остро почувствовали, что ученый не может быть *вне* морали, а тем более *над* ней; он обязан максимально предвидеть отрицательные последствия своих научных исследований и несет моральную ответственность за них перед обществом. Понимание этого нашло отражение в "Декларации прав человека", принятой в 1948 году. Цель создания тканевых банков — улучшить качество медицинской помощи населению. Вместе с тем оно породило много новых этических проблем, количество которых с течением времени не уменьшилось. Развитие идеи самоценности человеческой личности ("Человек всегда цель, и никогда — средство") предъявляет повышенные требования к этической базе деятельности тканевых банков на всех ее этапах. В медицине вновь приобретает первостепенное значение старый принцип Гиппократа "noli nocere" ("не навреди").

Современные тканевые банки занимаются заготовкой тканей и тканевых компонентов мезенхимального происхождения с последующей их обработкой и изготовлением из них биоматериалов, пригодных для имплантации пациенту без предварительного определения гистосовместимости. Наиболее сложные этические проблемы возникают на этапе забора кадаверных органов и (или) тканей для изготовления из них биопластических материалов, так как ныне действующее законодательство не отражает все стороны данного процесса. На медицинских работников, производящих забор трупных тканей, в полной мере ложится ответственность за соблюдение уважительного и гуманного отношения к мертвому телу, мерилом же этого отношения может быть только индивидуальная этическая база.

Кроме того, обыденное сознание не делает различия между трансплантацией органов и (или) тканей и имплантацией биопластических материалов из тканей и тканевых компонентов. В этом немалая "заслуга" средств массовой информации. Это необходимо помнить и сотрудникам тканевых банков, и врачам-биоимплантологам при получении информированного согласия пациента. Ткани и тканевые компоненты в процессе длительной и сложной обработки теряют антигенность и индивидуальную специфичность, "обезличиваются" и превращаются в изделия медицинского назначения, биологические свойства и функции которых значительно отличаются от исходных тканей. Основная их роль — кондукция. Это временно существующий в организме реципиента чужеродный биологический материал, который постепенно резорбируется и на его месте формируется новая собственная органотипическая ткань. Таким образом, этические противоречия частично снимаются, однако могут возникнуть проблемы, связанные с национальными традициями или религиозными представлениями пациента.

УДК 57.043: 615.832.9

Триггерные механизмы холодового стресса и резонансных режимов лечебной гипотермии

В. Г. БАБИЙЧУК, А. В. КОЗЛОВ, Д. Г. ЛУЦЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

В последнее время получила распространение резонансная терапия, в том числе триггерная гипотермия, при которой холодовая стимуляция рецепторных полей проводится в ритме колебаний потенциалов мозга.

В работе показан ГЭБ зависимый механизм действия ритмической гипотермии (РГ) в диапазоне частот ζ-активности (0,05–0,2 Гц) сверхмедленных биотоков (0,05–0,2 РГ). В возрастном аспекте радиоизотопными, электрофизиологическими, иммунобиохимическими методами были оценены триггерные возможности нейротрансмиттерных механизмов функционирования ГЭБ в динамическом рисунке общего адаптационного синдрома при стрессах разной модальности, интенсивности, длительности, а также отмечено:

1. От уровня проницаемости ГЭБ зависят адаптивные реакции сердечно-сосудистой и централь-

Матеріал, захищений авторським правом

ной нервной систем, в то же время функциональная активность ГЭБ сама подконтрольна этим системам во взаимодействии с общей неспецифической и иммунной защитой организма.

2. При длительном эмоционально-болевом стрессе в 1,5–2 раза увеличивается проницаемость ГЭБ для норадреналина и ацетилхолина. Снижение резистентности ГЭБ для этих нейромедиаторов синфазно и достоверно не отличается в различных структурах головного мозга, происходит неспецифическое, "аварийное" повышение проницаемости.

3. При ритмической гипотермии в 3–4 раза увеличивается проницаемость ГЭБ для биогенных аминов. В этих условиях снижение резистентности ГЭБ имеет черты специфичности, следует говорить о направленном повышении функциональной активности ГЭБ. Динамические характеристики проницаемости для ацетилхолина и норадреналина находятся в противофазе и различны в разных структурах мозга.

4. Динамика проницаемости ГЭБ крыс, перенесших длительный эмоционально-болевой стресс, после 0,1 РГ стабилизируется и соответствует естественному резонансно усиленному гипотермией ритму. Во многом благодаря этому нормализуются артериальное давление гипертензивных животных, статистические и спектрально-корреляционные характеристики динамического ряда кардиоинтервалов ЭКГ и ЭЭГ.

5. 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. Центральная нервная система 24-месячных крыс менее пластична, не отслеживает верхний диапазон ζ-ритма.

6. Ритмические холодовые воздействия на старых гипертензивных животных производят более выраженную коррекцию иммунореактивности организма, чем стимуляция кордовой кровью, последняя в сочетании с РГ эффективнее для нормализации протеолиза, но снижает гипотензивные возможности активированного ГЭБ.

На основе полученных данных разработан экспериментальный способ повышения проницаемости ГЭБ для лекарственных веществ. В практической медицине при проведении лечебной гипотермии жизненно необходимо учитывать важное положение этого способа: РГ с частотой ~0,1 Гц уже в первые 10–15 мин приводит к повышению проницаемости ГЭБ, достаточному для проявления центральных (парадоксальных) эффектов системно введенных кардиотропных препаратов.

УДК 612.592: 616.33-005.1

Эндоскопическое криовоздействие фреоном в комплексном консервативном лечении синдрома Меллори–Вейса

А. Е. ЛАГОДА, В. М. ЗЫБИН, С. А. ПАВЛИЧЕНКО, Г. Е. МОЛОТЯГИН, Ю. П. ГНИДЕНКО, Г. В. САДОВСКИЙ, А. С. ПЕТРЕНКО

Харьковский государственный медицинский университет

За период с 1990 по 2001 годы в клинике общей хирургии № 1 мы наблюдали 68 случаев возникновения синдрома Меллори–Вейса, что составило 8,2% от всех наблюдаемых желудочно-кишечных кровотечений различных этиологий. По возрасту больные (мужчин было 59 (86,8%), женщин – 9 (13,2%)) распределялись следующим образом: до 30 лет – 2 (2,9%), 31–40 лет – 12 (17,6%), 41–50 лет – 14 (20,6%), 51–60 лет – 23 (33,8%) и свыше 60 лет – 17 больных (25,0%). Подавляющее количество наблюдаемых было в возрастной группе свыше 40 лет (79,5%).

Все больные поступили в клинику в ургентном порядке. В первые сутки после возникновения кровотечения поступил 31 больной (45,6%), на вторые – 22 (32,4%) и свыше 48 ч – 15 (22,0%). У 64 больных накануне кровотечения имела место многократная рвота (94,1% наблюдаемых), 4 (5,9%) больных возникновение кровотечения связывали с тяжелой физической работой . При клиническом обследовании у большинства больных выявлены сопутствующие заболевания: хронические гастриты – у 23 (33,8%), язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки – у 8 (11,8%), хронические гепатиты – у 14 (20,6%), хронический индуративный панкреатит – у 11 (16,8%), гипертоническая болезнь – у 12 (19,1%). Первая степень кровопотери по А. А. Шалимову (1987 г.) отмечалась у 31 больного (45,6%), вторая – у 27 (39,7%) и третья – у 10 (14,7%). При комплексном изучении состояния свертывающей и антисвертывающей функций крови (длительность кровотечения, время свертывания, толерантность к гепарину, время рекальцификации, содержание протромбина и фибриногена) выявлено, что у подавляющего большинства больных синдром Меллори–Вейса развился на

Матеріал, захищений авторським правом

фоне нормальных показателей коагулограммы (85,3%), у 4 больных (5,9%) имели место признаки гипокоагуляции и у 6 (8,8%) отмечена умеренная гиперкоагуляция.

Всем больным выполнена ургентная эзофагогастроскопия. У 59 больных выявлено недостаточность кардиального жома с явлениями дистального эзофагита. Разрыв слизистой у 79,4% больных находился в кардиальном отделе желудка и у 20,6% разрывы были как в кардиальном отделе, так и в теле желудка. У 8 больных диагностировано остановившееся кровотечение со стойким гемостазом, у 42 – наличие рыхлых тромбов с подтеканием крови и у 18 – продолжающееся кровотечение без признаков тромбообразования.

После установления диагноза разрывы слизистой обрабатывались фреоном, который подводился через криозонд, проведенный по биопсионному каналу эндоскопа, и устанавливался на расстоянии 1 см от источника кровотечения. В зоне воздействия через 3–5 с образовывался белый иней, что означало снижение температуры тканей до –28 °С. Экспозиция воздействия колебалась от 5 до 10 с.

После завершения криообработки патологически измененных участков слизистой в желудке оставляли постоянный зонд для контроля остановки кровотечения и внутрижелудочного введения препаратов коллоидного серебра и аминокапроновой кислоты. У 58 больных стойкий гемостаз был достигнут после однократного криовоздействия, у 6 – после двукратного, у 2-х – после троекратного криовоздействия фреоном. Только в 2 случаях (2,9%) эффект был неудовлетворительным, и больные подвергались оперативному лечению – гастротомии с прошиванием кровоточащих участков слизистой.

Таким образом, наш опыт свидетельствует о высокой эффективности криовоздействия фреоном в сочетании с внутрижелудочной гемостатической терапией при желудочно-кишечных кровотечениях, вызванных синдромом Меллори–Вейса.

УДК 616-089.843: 615.361.013.85.014.41: 616.69-008.6

Трансплантация криоконсервированной плацентарной ткани при нарушениях сперматогенеза у мужчин

В. И. ГРИЩЕНКО, А. Г. ГЕРОДЕС, Е. К. АЛИПОВА, Л. И. ЛУЦКАЯ, О. С. ПРОКОПЮК, Ю. В. НИКИТЧЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков
Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина
Центр репродукции человека "Имплант", г. Харьков

Лечение мужского бесплодия является сложной и актуальной задачей. Нарушение продукции половых гормонов, изменение прооксидантно-антиоксидантного равновесия в организме, развивающиеся после перенесенных воспалительных заболеваний половых органов, под воздействием неблагоприятных факторов окружающей среды или производства, оказывают отрицательное влияние на сперматогенез. Так, в сперме в результате активации перекисного окисления липидов наблюдаются нарушение проницаемости мембран гамет, снижение их подвижности и оплодотворяющей способности. Из известных методов стимулирующей терапии, применяемой при лечении нарушений сперматогенеза, заслуживает внимания аллотрансплантация плацентарной ткани, содержащей большое количество гормонов, простагландинов, ферментов и микроэлементов. Однако влияние трансплантации криоконсервированной плацентарной ткани (ККПТ) на сперматогенез у мужчин с олигоастенозооспермией изучено мало.

В работе исследовано влияние трансплантации ККПТ на количественные и качественные характеристики эякулята, содержание половых гормонов, гидроперекисей липидов, антиокислительную активность и активность селензависимой пероксидазы в сыворотке крови мужчин репродуктивного возраста с олигоастенозооспермией.

Применяли подкожную трансплантацию фрагмента криоконсервированной плацентарной ткани. Метод криоконсе́рвирования плацентарной ткани разработан в ИПКиК НАН Украины.

Способом трансплантации ККПТ было пролечено 18 пациентов с олигоастеноспермией и хроническим простатитом. Концентрация спермиев до лечения составляла 14,8 ± 2,6 млн/мл эякулята, подвижность 18,1 ± 3,1%, количество патологических форм 63,9 ± 7,1%. Начиная с двух недель после трансплантации ККПТ отмечалось увеличение концентрации и подвижности спермиев в эякуляте. Наиболее явный положительный эффект наблюдался через 1,5–2 мес. Концентрация спермиев составила 35,6 ± 2,3 млн/мл эякулята, подвижность – 52,6 ± 0,63%, количество патологических форм снизилось до 36,6 ± 4,3%. Кроме того, достоверно увеличилась концентрация тестостерона в сыворотке крови пациентов в 1,6 раза по сравнению с показателями до лечения. Концентрация тестостерона составила 21,2 ± 3,49 нмоль/л. В ответ на ККПТ восстанавливался прооксидантно-антиоксидантный гомеостаз в крови пациентов. Они отмечали повышение работоспособности, сексуальной

Матеріал, захищений авторським правом

активности, снижение утомляемости и заболеваемости простудными заболеваниями. После проведенного лечения получено две беременности.

Таким образом, данные о положительном влиянии трансплантации ККПТ на сперматогенез, гормональный и прооксидантно-антиоксидантный гомеостаз в крови мужчин с олигозооспермией позволяют сделать заключение о перспективности использования этого метода в комплексном лечении мужского бесплодия.

УДК 611.36.013: 611.8.013: 617.735-002

Применение препарата "Гемонейронал" в комплексном лечении больных с диабетической ретинопатией

Ю. А. ДЕМИН, А. Ю. ПЕТРЕНКО, Е. И. ГОНЧАРУК

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Изучение патогенеза диабетических ретинопатий, а также разработка новых методов их лечения – актуальные проблемы современной офтальмологии. Эта сосудистая патология глазного дна является основной причиной слепоты. Исследованиями экспертов ВОЗ доказано, что диабетическая ретинопатия стала важной медико-социальной проблемой большинства стран мира. Известно, что основными звеньями патогенеза диабетических ангиопатий являются метаболические нарушения, сосудистые изменения, нарушения клеточного и гуморального иммунитета, сенсибилизация к собственным тканям глаза. Поэтому для лечения диабетических ретинопатий предпочтительно использовать препараты, оказывающие многопрофильное терапевтическое воздействие. Перспективным является клеточный эмбриональный препарат "Гемонейронал", предложенный ИПКиК. Клиническое его использование проводилось на основании регламентирующих документов МОЗ Украины и разработанных методических рекомендаций.

Цель настоящей работы – изучение клинической эффективности трансплантации криоконсервированного препарата "Гемонейронал" у больных с непролиферативной формой диабетической ретинопатии. Под нашим наблюдением находились 72 больных, которым проводилась трансплантация препарата эмбриональных клеток на фоне традиционной терапии. Контрольную группу составили 116 пациентов, которым было проведено обычное аллопатическое лечение, включающее ангиопротекторы, реокорректоры, анаболические гормоны, противосклеротические препараты, витамины.

Основными показателями эффективности лечения являлись острота зрения, а также данные окулографии, характеризующие состояние пигментного эпителия сетчатки. При помощи двухфакторного дисперсионного анализа определялась степень влияния различных методов лечения и временного фактора на функциональную реабилитацию органа зрения.

В контрольной группе больных острота зрения повышалась к одному месяцу после лечения от $0{,}31 \pm 0{,}2$ до $0{,}46 \pm 0{,}02$ и далее к сроку 1 год несколько снижалась, достигая значения $0{,}39 \pm 0{,}2$, что достоверно выше исходного значения ($p < 0{,}01$) на 25,8%. Острота зрения повышалась у 18, оставалась стабильной у 67 и ухудшалась у 15% больных. В опытной группе больных после трансплантации препарата "Гемонейронал" острота зрения после лечения от $0{,}30 \pm 0{,}03$ повышалась к 1 мес периода реабилитации до $0{,}54 \pm 0{,}02$ и к 1 году наблюдения несколько снижалась ($0{,}51 \pm 0{,}03$), что достоверно ($p < 0{,}001$) выше исходного уровня на 70,0%. Острота зрения повышалась у 42, оставалась прежней у 44 и ухудшалась у 14% пациентов. Результаты двухфакторного дисперсионного анализа указывают на то, что изменения остроты зрения у пациентов с непролиферативной формой диабетической ретинопатии на 30–31% зависят от применяемого метода лечения, на 3–5% – от времени наблюдения после проведенного лечения.

При анализе данных окулографии установлено, что в контрольной группе больных коэффициент Ардена составлял до лечения $122{,}0 \pm 7{,}1$, сразу после лечения – $136{,}1 \pm 7{,}3$ и через 6 мес – $138{,}3 \pm 7{,}1$, что на 13,3 выше исходного уровня. Эти различия нельзя считать статистически достоверными ($p < 0{,}05$). В группе больных после трансплантации препарата "Гемонейронал" коэффициент Ардена составлял до лечения $116{,}0 \pm 6{,}9$, после лечения – $146{,}2 \pm 7{,}2$ и через 6 мес – $170{,}2 \pm 7{,}0$, что достоверно выше исходного значения ($p < 0{,}001$) на 46,7%. Результаты двухфакторного дисперсионного анализа указывают на то, что изменения данных окулографии в 25–27% случаев зависят от применяемого метода лечения, в 3–4% – от времени наблюдения и в 0–2% – от сочетанного действия этих факторов.

Таким образом, лечение больных непролиферативной формой диабетической ретинопатии с применением препарата "Гемонейронал" более эффективно по сравнению с традиционным методом терапии и является перспективным в реабилитации данной категории пациентов.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 615.361.013.68

Кордовая кровь как компонент поддерживающей терапии

А. А. ЦУЦАЕВА, О. В. КУДОКОЦЕВА, А. В. ЩЕГЛОВ, Г. С. ТУПЧИЕНКО, Н. П. ЛОБАСЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

В ИПКиК НАН Украины в рамках программы по трансплантации клеток и тканей разрабатываются эффективные технологии долгосрочного хранения кроветворных клеток.

В настоящее время в клинической практике применяется оригинальный препарат "Гемокорд", представляющий собой суспензию криоконсервированных кроветворных и вспомогательных клеток кордовой (пуповинной) крови в аутологичной плазме, богатой биологически активными веществами, ростовыми факторами, иммуномодуляторами, регуляторными монокинами, интерлейкинами и др. Запатентованный нами безотмывочный метод криоконсервирования позволяет не только сохранять длительное время стволовые и коммитированные кроветворные клетки кордовой крови в жизнеспособном состоянии, но и использовать препараты непосредственно после размораживания. Благодаря способности этих клеток реализовывать в организме реципиента все присущие им свойства (пролиферация и дифференцировка), препарат может быть использован как трансплантат (долгоживущий либо короткоживущий). Цель использования короткоживущих трансплантатов — коррекция процессов гемопоэза и иммуногенеза, стимуляция факторов неспецифического иммунитета, активация работы органов и систем, обеспечивающих постоянство гомеостаза.

Препарат "Гемокорд" разрешен к клиническому применению МОЗ Украины от 16 февраля 2000 г. Трансфузия "Гемокорда" была проведена более 50 больным с различной патологией: при анемиях различного генеза, циррозе печени и хроническом гепатите, хроническом лейкозе, гнойно-септических послеоперационных осложнениях, хронической герпетической инфекции и цитомегаловирусе; онкологическим больным после химиотерапии; хирургическим больным с гнойными заболеваниями легких и плевры.

"Гемокорд", совместимый по АВО и Rh-принадлежности, вводили внутривенно капельно в количестве 50–60 мл с общим содержанием ядерных клеток не менее $3 \cdot 10^8$. В препарате после отогрева сохраняется более 90% сохранных по трипановой сини и более 80% жизнеспособных кроветворных клеток. Посттрансфузионных осложнений не наблюдалось, больные переносили трансфузию удовлетворительно. У всех пациентов отмечалось улучшение клинического состояния уже на 2-е сутки после трансфузии: уменьшались бледность, слабость, тахикардия, тахипноэ, головокружение, повышался общий тонус организма. На 3–4-е сутки после трансфузии наблюдалась достоверная положительная динамика гемограмм: при гемоцитопениях количество эритроцитов периферической крови увеличивалось в среднем на 25, тромбоцитов — на 43, лейкоцитов — на 60%. Количество гемоглобина увеличивалось на 35%, достоверно снижалась СОЭ (на 12–18 единиц); при гемоцитозах также восстанавливались все показатели красной крови. Во всех случаях нормализовались термограммы, иммунный и гематологический статус больных, ускорялись репаративные процессы (например, закрытие бронхоплевроторакального свища и очищение гнойной полости у больных с гнойными заболеваниями легких и плевры).

Опыт трансфузии "Гемокорда" показал, что применение данного препарата в комплексном лечении заболеваний различной этиологии имеет большую перспективность.

УДК 618.592.013.1

Глубокий анабиоз и его роль в биологии и медицине

А. А. ЦУЦАЕВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Глубокий холодовой анабиоз — это состояние биологических объектов, когда ведущие процессы на макроуровне полностью и обратимо ингибируются и сохраняются только на атомарном уровне. Перевод биологической системы в состояние глубокого холодового анабиоза представляет собой процесс криоконсервирования, на этапах которого, а также на этапах возврата биологического объекта в состояние нормотермии возникают нелетальные репарируемые криоповреждения, которые проявляются в обратимом изменении их морфофункциональных, биохимических и биофизических свойств.

Характер нелетальных повреждений определяет эффективность, показания и цель использования криоконсервированных биологических объектов. Так, после возврата криоконсервированных крове-

Матеріал, захищений авторським правом

творных клеток в условия нормотермии у них обратимо ингибируются процессы пролиферации, дифференцировки и образования зрелых потомков, в частности, Т-лимфоцитов. По этой причине при трансплантации криоконсервированных кроветворных клеток в более поздние сроки и менее активно развивается и протекает GVH-синдром, что позволяет обосновать предпочтительность использования в клинике криоконсервированных трансплантатов кроветворных клеток. Под влиянием криоконсервирования обратимо изменялась иммуногенность кожных трансплантатов в результате временного, обратимого, частичного изменения спектра HαA антигенов, разрушения лимфоцитов донора в трансплантате, повышения порозности трансплантатов, что приводило к активному выходу растворимых белков из криоконсервированных трансплантатов на этапах их подготовки к пересадке. Этим объясняются более поздние сроки начала отторжения криоконсервированных трансплантатов, а также их достоверно более длительное приживление при трансплантации в полуаллогенной системе. Отмеченные преимущества позволяют обосновать предпочтительность использования в клинике криоконсервированных тканевых трансплантатов перед нативными. Под влиянием криоконсервирования обратимо ингибируется синтез интерферона в перевиваемых клетках культур ткани. Ингибиция интерферонпродуцирующей функции наблюдается на протяжении 2-х пассажей и восстанавливается к 3 пассажу. Указанная особенность позволяет рекомендовать преимущественное использование криоконсервированных клеток культур ткани на этапах выделения вирусов. После криоконсервирования актиномицет-продуцентов антибиотиков было отмечено достоверное повышение антибиотикопродуцирующей функции, подтвержденное в условиях производств; установлено повышение ферментообразующей активности хлебопекарных дрожжей; после криоконсервирования мицелия высших, съедобных грибов стимулировалась их пролиферативная активность. Вышеизложенное свидетельствует о целесообразности использования перечисленных биологических объектов на этапах производств после криоконсервирования. Под влиянием криоконсервирования обратимо ингибируются пролиферативная активность клеток культур ткани и синтез антител в гибридомах, которые восстанавливаются во 2-м пассаже, что необходимо учитывать при применении этих объектов на этапах биотехнологических процессов и использовать клеточные линии и гибридомы 2-го пассажа.

Было установлено, что клетки, исходно находящиеся во взвешенном состоянии (лимфоциты периферической крови, кроветворные клетки кордовой крови и др.) обладают высокой криоустойчивостью, и их можно криоконсервировать без традиционных криопротекторов.

Для решения фундаментальных задач молекулярной биологии представляют интерес: ингибиция процесса внутриклеточного развития бактериофагов в криоконсервированных клетках *E. Coli* на этапах репарации нелетальных повреждений и синтез "стресс-белков" в этот период в криоконсервированных клетках, отличных от семейства белков теплового шока. Под влиянием криоконсервирования обратимо изменяются процессы биоэнергетики, в большей степени дыхание, в меньшей — гликолиз, который энергетически обеспечивает ранние этапы процесса репарации. Вышеизложенные факты позволяют рассматривать проблему глубокого холодового анабиоза как важную общебиологическую проблему. Учитывая, что для биологических объектов повышение температуры иногда на 2–3 °С является летальным, а снижение температуры на 20–30 °С, как правило, не вызывает их гибели, то это может быть подтверждением возможности заноса жизни из космоса.

УДК 615.361.438.014.41: 616.311-002

Применение криоконсервированных фрагментов ксенотимуса в программе комплексной терапии больных с распространенными формами перитонита

А. Е. ЛАГОДА, В. М. ЗЫБИН, В. К. ХАБУСЕВ, С. А. ПАВЛИЧЕНКО, Г. Е. МОЛОТЯГИН, Ю. П. ГНИДЕНКО, А. С. ПЕТРЕНКО

Харьковский государственный медицинский университет

Проблема лечения острого гнойного перитонита и гнойно-септических осложнений остается актуальной в современной хирургии органов брюшной полости. Наиболее частой причиной летальности при острой хирургической патологии органов желудочно-кишечного тракта продолжает оставаться острый перитонит.

За последние годы достигнуты значительные успехи в диагностике и комплексной терапии первичного и вторичного перитонита, однако явной тенденции к снижению общей летальности не наблюдалось. Прогрессирующее течение и развитие гнойно-септических осложнений обращают на себя

Матеріал, захищений авторським правом

внимание ученых не только Украины, но и стран ближнего и дальнего зарубежья.

Большое значение в патогенезе перитонита имеет синдром эндогенной интоксикации (СЭИ), который неминуемо развивается при распространенных формах перитонита и является одним из ведущих факторов, обусловливающих тяжесть заболевания.

Одним из новых и перспективных направлений развития методов борьбы с СЭИ является биосорбция или клеточная сорбционная терапия — применение фрагментированной ткани ксеноселезенки, полученной от домашних половозрелых свиней. Преимущество этих методов в том, что вместе с дезинтоксикационным эффектом они имеют иммунокоррегирущее действие.

В нашей клинике совместно с ИПКиК НАН Украины разработан способ экстракорпоральной гемоперфузии через криоконсервированные фрагменты тимуса свиньи, который позволит улучшить результаты лечения хирургических больных с вторичным иммунодефицитом привлечением в перфузат гуморальных факторов ксенотимуса.

Ксенотимус получают от домашних половозрелых свиней возрастом до одного года. Фрагменты железы после специальной обработки подвергают криоконсервации и сохраняют в биобанке в хранилищах с жидким азотом. Гемоперфузия через криоконсервированные фрагменты ксенотимуса проводится при помощи аппарата для гемосорбции через сорбционную колонку, которая содержит 40 г сорбента серии СКН I, 15 г фрагментированной ткани ксенотимуса. В системе рециркуляции колонку отмывают 400 мл физиологического раствора с 10 000 ед гепарина и 1 г карбенициллина. После предварительной гемодиллюции (введение внутривенно капельно 400 мл реополиглюкина), общей гепаринизации из расчета 300 ед гепарина на 1 кг массы больного проводится гемоперфузия через приготовленную сорбционную колонку со скоростью 80–120 мл/мин в объеме 1–2 ОЦК больного.

Мы имеем опыт применения описанного метода у 28 больных. Все поступили в клинику в ургентном порядке с картиной разлитого перитонита, источником которого были перфоративная язва (11), деструктивный аппендицит (12), деструктивный холецистит (5). Все больные оперированы в срочном порядке.

После операции у всех больных выявлены разные степени иммунодефицита, выражавшиеся в снижении фагоцитарной активности лейкоцитов, уменьшении абсолютного количества лимфоцитов, содержания иммуноглобулинов A, G, M, что указывало на выраженную интоксикацию и угнетение гуморального и клеточного иммунитета. Всем больным на 2-й день после операции проведена экстракорпоральная гемоперфузия через консервированные фрагменты ксенотимуса. Кроме явного улучшения клинических показателей (снижение тахикардии, тахипноэ, восстановление перистальтики), отмечено, что на 3-й день после операции абсолютное количество Т-лимфоцитов увеличилось приблизительно на 30% от исходного, фагоцитарная активность лейкоцитов с 45% исходных — до 89%, выросло содержание иммуноглобулинов: A — со 159 до 230, G — с 601 до 930, M — с 58 до 103 мг/%. На 5-й день после операции эти показатели достигали нормальных величин практически у всех больных.

Таким образом, применение фрагментированной ткани ксеноселезенки при синдроме эндогенной интоксикации у больных перитонитом патогенетически обосновано и дает высокий клинический эффект.

УДК 615.361: 617.019: 616.379-008.64

Ксенотрансплантация островковых клеток поджелудочной железы при выполнении лапароскопической холецистэктомии у больных сахарным диабетом

Е. Д. ХВОРОСТОВ, Б. П. САНДОМИРСКИЙ, О. Н. ПОБЕЛЕНСКИЙ, И. В. БЕЛОЧКИНА

Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Сахарный диабет (СД), по данным экспертов ВОЗ, относится к числу заболеваний, не поддающихся радикальному излечению. Необратимое развитие пролиферативной ретинопатии, нефропатии, микроангиопатии нижних конечностей, полинейропатии и других осложнений, ведущих к слепоте, терминальной стадии недостаточности, гангрене нижних конечностей, "диабетической стопе", — это неполный перечень причин ранней инвалидности и смерти больных.

Клинический опыт свидетельствует, что классическая инсулинотерапия, решив в целом проблему таких острых осложнений диабета, как кетоацидоз, не может остановить развитие хронических осложнений. В связи с этим у многих больных целесообразно сочетание консервативных и хирургических

Матеріал, захищений авторським правом

методов лечения. Доступной для широкого клинического применения является свободная алло- или ксенотрансплантация инсулинпродуцирующих островковых клеток поджелудочной железы (ОКПЖ). Операция обладает достаточно выраженным антидиабетическим эффектом, способна стабилизировать течение СД, остановить в ряде случаев прогрессирование хронических диабетических осложнений.

Лапароскопическая холецистэктомия (ЛХЭ) была выполнена нами у 152 больных сахарным диабетом в возрасте от 42 до 73 лет (женщин было 138, мужчин – 14), у 128 – с хроническим холециститом, у 24 – с острым флегмонозным холециститом. Длительность заболевания СД от нескольких месяцев до 20 лет. У 26 больных был диагностирован СД легкой формы, у 114 – средней, у 12 – тяжелой формы.

В клинике при выполнении ЛХЭ 23 пациентам, которые страдают СД, была проведена ксенотрансплантация культуры ОКПЖ: 6 больным с инсулиннезависимым СД, 17 – с СД инсулинзависимого типа. Все больные – женщины. Трансплантация ОКПЖ выполнялась под контролем лапароскопа в условиях карбоксиперитониума, материал имплантировали в круглую связку печени, большой сальник, малый сальник, корень брызжейки толстой кишки. Всем больным проводились разовая трансплантация с равномерным распределением во всех пунктах введения, а затем ЛХЭ по общепринятой методике. После оперативного вмешательства энтеральное питание пациентов начинали на вторые сутки, что облегчало послеоперационную коррекцию углеводного обмена у больных СД.

Таким образом, ЛХЭ с одновременной ксенотрансплантацией криоконсервированных культур ОКПЖ является операцией выбора у пациентов с желчекаменной болезнью на фоне СД и позволяет повысить эффективность лечения. Классическая инсулинотерапия при СД не предотвращает развитие хронических осложнений, которые проявляются в виде четырех клинических синдромов: почечно-ретинального, диабетической нейропатии, нейроглюкопенического и "диабетической стопы". Трансплантация ОКПЖ положительно влияет на диабетические осложнения (микроангиопатии и нейропатии), на протекание углеводного обмена (понижение гликемии натощак, гликемии после еды, среднесуточной гликемии, гликемического показателя) и способствует уменьшению суточной нормы инсулина. Клинический эффект сохраняется на протяжении 16 мес.

Матеріал, захищений авторським правом

3
2001

PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY

CONTENTS

PLENARY SESSION REPORTS

Valentin I. Grischenko The Role of Cryobiology in Creation of Biotechnologies for Cellular and Tissue Transplantation 103

Roberto Motterlini, Elisabeth Balogun And Colin J. Green Pharmacological Preconditioning of Kidneys Inhibit Ischaemia-reperfusion Injury during and after Hypothermic Storage 104

Barry J. Fuller Cold Preservation of Liver and Inflammatory Responses after Re-Warming: Studies on expression of cell surface adhesion molecule ICAM-1 105

W. V. Holt Novel Approaches to Sperm Cryobiology; Cryomicroscopy and Genetics 105

Section 1. MECHANISMS OF CRYODAMAGES AND CRYPROTECTION OF BIOLOGICAL OBJECTS

N. A. Gordienko Role of Some Biophysical Characteristics in Porcine Oocytes and Embryos Sensitivity to Low Temperatures 107

V. A. Bondarenko, M. H. Rumiekh, V. V. Ramazanov, E. B. Almazova Proton Transport in the Sulfate Loaded Erythrocytes under the Temperature and Osmotic Effect 107

V. V. Ramazanov, O. A. Olejnik, Abu Al Asal, V. A. Bondarenko Hypertonic Cryohemolysis of Human Erythrocytes When Changing ***pH*** Medium 108

E. A. Gordienko, A. I. Osetsky, L. I. Popivnenko, A. F. Todrin Investigation of the Shift Module in Erythrocytes Membranes 109

A. I. Osetsky To the Theory of Thermoplastic Analysis of Frozen Biosystems and Cryoprotective Solutions 109

O. A. Nardid, K. D. Rozanova, Ya. O. Nardid, T. S. Dyubko, L. V. Tsymbal Increase of the Stability in Cryopreserved Erythrocytes with Preliminary Laser Irradiation 110

T. F. Morozova, E. D. Rozanova, M. I. Schetinsky, A. M. Vorotilin, V. A. Moiseyev, G. A. Babijchuk, O. A. Nardid, Yu. V. Kucherenko, O. V. Grischenko, O. A. Beresneva, S. I. Taranenko, I. Ya. Zakharenko Effect of Heat Sterilization on Protein and Nucleotide Composition of Human Placenta Aqueous-Saline Extracts 111

N. N. Timchenko, E. D. Rozanova, K. N. Khromushkin, V. A. Moiseev Comparative Investigation of Freeze-Thawing Effect on A and F Hemoglobins 112

G. F. Zhegunov Gene Differential Expression at Hypothermia and Adaptation 112

V. I. Sobolev, A. A. Panko, S. G. Panfilova Effect of Thyroid Hormones on the Character of Hysteresis Loop in White Rats under Deep Hypothermia 113

N. V. Repin, T. P. Govorukha, T. N. Yurchenko Structural Rearrangements and Permeability for Water of Erythrocytes Membranes of Winter Hibernating Ground Squirrels ***Citellus Undulatus*** 114

A. S. Kaprelyants, L. N. Marchenko, R. K. Migunova Computer Morphometric Analysis of Liver Cell Ultrastructure under Cooling 114

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

© Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, "Problems of Cryobiology", 2001

Матеріал, захищений авторським правом

V. D. Zinchenko, A. V. Zinchenko, N. G. Kadnikova, A. M. Grek, I. M. Kovalchuk, Yu. I. Guziy, S. I. Kalmykov, O. V. Tretyak, A. V. Kobzar, A. N. Gajdenko On Some Aspects of the Application of Ozonizing Technologies in Cryobiology and Ozone Interaction with Polymers 115

V. K. Mazalov, S. E. Ovsyannikov, G. V. Kovalenko Effect of Cryoprotectants and Pharmacological Substances on the Recovery Period of Mammalian Organism after Short-Term Cold Effect 116

I. B. Musatova, A. V. Zinchenko, V. V. Chekanova, E. N. Bobrova Investigation of Water-Oxyethylated PEO-1500 System by DSC Method 116

O. K. Gulevsky, V. V. Ryazantsev, O. O. Grischenkova, L. I. Relina, A. V. Trifonova Peculiarities of Lipid Peroxidation in Acclimated and Non-Acclimated ***Tenebrio Molitor*** Larvae 117

A. Yu. Nikolchenko, V. P. Tyagileva Change in Ca^{2+}-ATPase Activity of Erythrocytes Membrane under the Effects of PEO-1500 Non-Penetrating Cryoprotectant, Cooling and Freezing 118

V. K. Mazalov Comparative Estimation of the Influence of Medium Temperature on the Mammals' Temperature Homeostasis under the Polyglycol Ether Effect 118

E. A. Romodanova, V. A. Gavrik, T. S. Dyubko Spectrofluorimetric Investigation of Freezing Effect on Fibrinogen 119

V. I. Grischenko, E. I. Alekseyevskaya, V. I. Vaschenko, T. N. Vaschenko, T. K. Borisova Cryorenewal of Bone Marrow and Apoptosis: Hypotheses and Reality 120

L. A. Khanina, V. S. Chekanova, A. V. Nikolenko, A. M. Kompaniets Structure and Cryoprotective Properties of Oxyethylated Alyphatic Amides 121

E. A. Domanov, G. P. Gorbenko, T. S. Dyubko Effect of Cryoprotectants and Low Temperatures on Structural State of Model Phosphólipid Membranes 121

V. A. Bondarenko, V. A. Koptelov, S. N. Lezhanin, T. P. Sereda Role of Physical and Chemical Factors of Medium in the Stability of Rat Isolated Hepatocytes to Hypertonic Stress 122

V. S. Marchenko, G. A. Babijchuk, L. V. Polyschuk, L. M. Marchenko From Fractal Dimensions of BBB of Cooled Brain To Functional Geometry of Physiological Systems of an Organism 123

L. F. Rozanov, Ye. I. Smolyaninova, V. S. Kholodnyy Osmotic Behaviour of Mouse Embryos and Bone Marrow Cells in Cryoprotectant Solutions 124

V. I. Grischenko, I. V. Cherkashina, I. N. Kuchkov, A. A. Gapon, Yu. E. Mikulinsky, G. G. Yurchenko, E. I. Alekseyevskaya Effect of Perfluorethane on Some Functional Properties of Human Spermatozoa under Hypothermia 124

Section 2. ACTUAL PROBLEMS OF CELLULAR AND TISSUE TRANSPLANTATION

A. N. Goltsev, M. A. Mikhalin, L. V. Ostankova, T. G. Dubrava, E. D. Lutsenko, I. V. Rassokha, A. Yu. Gorskaya State of Lymphohemopietic System in an Organism after Transplantation of the Products of Fetoplacental Complex 126

A. Yu. Petrenko, O. V. Ochenashko, N. N. Moiseeva, N. G. Skorobagatova Function of Cryopreserved Human Embryonic Liver Cells in ***In Vitro*** System and under Experimental Transplantation 127

V. G. Bebeshko, Zh. M. Minchenko, G. T. Glukhenka, N. M. Tsvetkova, I. A. Kryachok, E. E. Karamanesht, N. M. Bilko, V. I. Khomenko, I. S. Skorenkova, V. G. Chujsky, T. A. Kalinichenko, O. V. Kucher, O. L. Naumenko The Problems of Hemopoietic Cells Transplantation in the Ukraine 127

V. G. Chernenkov, V. G. Zadorozhny, N. N. Brovina, A. V. Shatillo Experience of Cryopreserved Embryonic Tissue Application When Treating Some Diseases of Nerve System 128

G. S. Lobyntseva, I. A. Votyakova, E. M. Klimova Theoretical Substantiation and Practical Results of the Application of Embryonic Preparations in Clinical Practice 129

B. P. Sandomirsky, S. E. Galchenko, I. V. Belochkina, A. V. Mamontova, E. S. Galchenko Cryobiological Technologies for Obtaining Some Preparations from Xenogenic Material 130

G. I. Drozhzhina, V. I. Strona, T. B. Gajdamaka, V. L. Ostashevsky Amniotic Membrane Transplantation in the Patients with Cornea Pathology 130

N. P. Subbota, P. P. Pashinsky, D. V. Cherkashina Biological Activity of Cryopreserved Fetal Liver Preparations and Their Effect on the Functional State of Hepatocytes 131

Матеріал, захищений авторським правом

V. I. Sipityy, V. A. Pyatikop, I. A. Kutovoy, A. Yu. Petrenko Application of Cryopreserved Nerve Stem Cells for the Correction of Dysfunction of Dofaminum-ergic Structures in Patients with Parkinson's Disease and Treatment of Patients with Other Forms of Extrapyramidal Hyperkinesias 132

V. A. Pitko Effect of Cryopreserved Chorion Extract and Tissue on the Activity of Lipid Peroxidation Processes and Antioxidative System in Patients with Subacute Salpingoophoritis 133

T. P. Bondarenko, N. A. Volkova, S. V. Lugovoy Thyroid Hormone Level in Rat's Blood Plasm at the Xenotransplantation of Cryopreserved Organ Culture of Neonatal Piglets' Thyroid Gland 133

N. N. Moiseeva, A. Yu. Petrenko, L. P. Kravchenko Effect of Hypothermic Storage of Isoalted Hepatocytes on the Efficiency of Transplantation to Hepatectomized Rats 134

I. N. Meleschenko, L. L. Tereschenko, T. N. Kozuberdina, A. V. Ivanitsky Experience in the Application of Cellular and Tissue Therapy in Practice of the Center for Allergology and Immunology 135

T. P. Bondarenko, G. A. Bozhok, N. M. Alabedalkarim, A. V. Gerashenko, I. I. Samchenko, E. I. Legach Investigation of Steroidogenic Activity of Cryopreserved Adrenal Culture under Xenotransplantation 135

V. I. Grischenko, Yu. A. Demin, E. I. Goncharuk, N. N. Popov, A. Yu. Petrenko, A. V. Geraschenko Characteristics of "Hemoneuronal" Embryonic Preparation 136

N. G. Kadnikova, T. F. Petrenko, V. F. Martsenyuk, S. V. Koschiy The Methods for Obtaining Viable Embryonic Cells of Neurotissue and Liver 137

K. V. Shepitko, S. O. Gayevsky, M. M. Potyazhenko, V. I. Shepitko Treatment of Stable Stenocardia Using Transplantation of Cryopreserved Fetoplacental Tissue 138

T. N. Yurchenko, A. P. Belonozhko, E. P. Zhulikova, T. M. Sharlaj Effect of Placenta Hypothermic Storage on the Activity of Oxidation-Reduction Enzymes 138

V. A. Yavorskaya, A. V. Grebenyuk, Yu. V. Flomin Treatment of Cerebrovascular and Neurodegenerative Diseases Using Tissue and Cellular Transplantation 139

L. L. Mironova, V. D. Popova, O. I. Konyushko, Yu. Kh. Khapchayev, D. V. Zybin, A. S. Akopyan Cryobank of Different Types of Cell Cultures 140

O. I. Konyushko, L. L. Mironova Cryopreservation is the Factor of Cell Transformation 140

A. N. Sukach, A. Yu. Semenchenko, A. Yu. Petrenko Investigation of the Biochemical Composition of Cryopreserved Preparations from Human Embryonic Tissues 141

O. P. Zozulya, A. P. Cherchenko, V. M. Semenova, N. G. Gronskaya, E. A. Nagorny, L. P. Stajno Peculiarities of Functional Adaptation of Glial Implants of Neocortex And Cerebellum 141

L. T. Volova Scientific And Practical Activity of Samara Tissue Bank 142

V. K. Sologub, D. V. Zybin, A. G. Kotelevets, I. A. Koromyslova, S. E. Severin Vaccination Against Melanoma Using Xenogenic Cells 143

D. V. Zybin, I. A. Koromyslova, V. K. Sologub, A. G. Kotelevits, S. E. Severin Usage of Xenotransplantation for Diabetes Mellitus Type I Treatment 143

V. I. Shepitko, E. P. Zhulikova, T. N. Yurchenko, M. G. Shenberg Reaction of Liver Structural Elements on the Implantation of Native and Cryopreserved Placenta Under Experiment 144

A. I. Tarasov, D. R. E. Jones, V. I. Grischenko, A. Yu. Petrenko Phenotype and Colony Forming Activity of Cryopreserved Cells of Human Embryonic Liver 144

SECTION 3. LOW TEMPERATURE PRESERVATION OF BIOLOGICAL OBJECTS

L. V. Gorbunov, N. A. Gordienko, I. A. Morozova Way for Mammalian Oocytes and Embryos Cryopreservation at Heat Exchange Ultra-rapid Rates 146

L. V. Gorbunov, A. V. Medvedovskiy Development of Mammalian Sexual Cells and Embryos Cryopreservation Technologies 146

A. A. Kostyaev Ozonized Cryoprotectants and Cryopreservatives 147

T. F. Stribul, A. N. Novikov, A. I. Grigoraschenko Cryopreservation Methods of Potatoes and Grape Meristems 148

T. P. Linnik, O. V. Bizikina Cytotoxicity and Cryoprotective Activity of Diols, Amides and Their Mixtures at the Fowl Sperm Cryopreservation 148

Матеріал, захищений авторським правом

V. I. Grischenko, M. P. Petrushko, A. G. Gerodes, V. I. Pinyaev Cryopreserved Biologically Active Fluids as a Component of Culturing Medium for Human Gametes and Embryos ***In Vitro*** 149

E. P. Svedentsov, T. V. Tumanova, S. A. Khomyakova, S. V. Utemov, A. A. Kostyaev, A. N. Semenov Leukocytes Preservation by Freezing with New Cryoprotectant According to Exponential Program . 150

M. T. Tagirov, A. B. Artemenko, Yu. V. Kalchenko Cell Freezing of Hen Early Embryos 150

P. N. Perekhrestenko, G. T. Glukhenka, T. O. Kalinichenko, S. O. Sivkovich, G. A. Gubareva, R. P. Pavlyuk, N. K. Skachkova, M. K. Algazinova Cryopreservation and Clinical Application of Umbilical Cord Blood Haemopoietic Cells 151

I. P. Vysekantsev, T. M. Gurina, O. V. Shapovalova, O. N. Belokon Keeping of Viability and Biological Properties of ***Staphylococcus Aures*** and ***Pseudomonas Aeruginosa*** Bacteria during Cryopreservation Process 152

A. E. ANanyina Properties of Streptomyces Fradie Industrial Strain Depending on Storage Conditions 152

N. F. Ivchenko, S. N. Ivchenko, A. V. Melnik Low-Temperature Equipment for Cryobiology 153

A. N. Sukach, A. Yu. Petrenko, M. S. Plachinta Cryopreservation of Rat Embryonic Neuronal Cells Using DMSO 153

A. M. Polonchuk, V. A. Sokolov, V. N. Batrakov Sublimational Sets 154

G. Yu. Maksudov, O. V. Kabashova, O. N. Nesterenko, A. V. Khmelev, G. I. El-Registan Long-Term Storage of Spermatozoa: Is There Any Alternative To Cryopreservation? 154

A. M. Polonchuk Equipment for Low Temperature Preservation of Biological Objects 155

A. A. Kostyaev Economical Evaluation of Bone Marrow Cryopreservation at Regional Haematological Centre 156

L. A. Babijchuk, N. G. Zemlyanskikh Mechanisms for Erythrocytes Stabilization to the Effect of Non-Penetrating Cryoprotectants and Low Temperatures. Elaboration of the Washing-out Method for Cryopreservation 156

T. F. Petrenko, N. E. Uzlenkova, O. V. Kudokotseva, T. M. Gurina Cryopreservation of Guerin Carcinoma Cells 157

G. Yu. Maksudov, A. S. Erokhin, K. Evgenov, E. Hartley ATP Concentration in Cryopreserved Sperm of Amur Leopard 158

A. S. Snurnikov, N. G. Kadnikova, T. M. Gurina Peculiarities of Long-Term Storage of Biological Objects in Low Temperatures Banks 158

O. B. Khromenkova, G. F. Zhegunov, G. V. Zhernoklev Disorder of Mitotic Cycle in Mice Embryos after Cryopreservation 159

V. V. Sivoplyas, F. I. Ostashko, N. F. Ivchenko, S. N. Ivchenko Using of Refrigerating Machines for Storage of Biomaterials 159

B. B. Dzuba, S. I. Drokin, E. A. Berezhnaya, O. V. Gamolina Investigation of Carp Sperm Cryoresistance in Connection with the Peculiarities in Motility Activation 160

M. Yu. Stegniy Problems of Preserving Viruses and Virus-Containing Material 161

F. V. Dakhno, L. V. Kutsenko, Ye. A. Gasenko Influence of Cryopreservation Factors on Human Oocytes in Vitrification Conditions 161

G. Yu. Maksudov, N. N. Rott Cryobanks As Element of Nature Conservation Strategies in Russia . . 162

V. S. Podgorskiy, T. M. Golovach, V. I. Sudenko Practice in Microorganism Strains Deposition 162

D. M. Mkheidze, T. V. Shvedova, N. N. Blokhina Cryopreservation of Autologous Bone Marrow and Peripheric Blood Stem Cells 163

Section 4. APPLICATION OF LOW AND HYPOTHERMAL TEMPERATURES IN MEDICINE

O. I. Gordienko, V. O. Makedonskaya, Yu. E. Gordienko Biophysical Properties of Erythrocytes at Hypo- and Hyperthyrosis 164

V. A. Makedonskaya Autotransplantation of Cryopreserved Tissue of Thyroid Gland in Prophylaxis and Treatment of Postoperational Hypothyroidism in Patients with Diffuse Toxic Goiter 164

Матеріал, захищений авторським правом

V. I. Sipityy, B. N. Murinents-Markevich Perspective of Application of Cryogenic Technique in Neurosurgery 165

O. S. Prokopyuk, V. V. Chizhevsky, V. Yu. Prokopyuk, O. V. Lipina About the Possibility of Chorial Tissue Usage under a Total Acute Cooling of Homoiothermal Organisms 166

E. V. Ivanovskaya Acute Keratoconus Treatment Using Ultra Low Temperature Effect 166

T. V. Bogatyreva, Ya. S. Afanasyeva, O. I. Valyuk Application of Craniocerebral Hypothermia When Rehabilitating Patients, Endured Cerebral Insult 167

B. F. Kutsevlyak, K. V. Bozhko, O. N. Sirota Cryoeffect and Hypothermia in Therapeutic Stomatology 168

B. M. Datsenko, I. N. Lymar, V. I. Grischenko, V. A. Moiseyev, M. I. Schetinsky, T. F. Morozova, O. A. Nardid, G. A. Babijchuk, A. M. Vorotilin, V. P. Georgievsky, L. V. Ivanov, O. V. Grischenko Usage of Rectal Suppositories, Containing Thermoclaved Porcine Placenta, in Proctologic Practice 168

V. I. Sipityy, V. N. Lesovoy, A. V. Tsygankov, S. V. Groznyy, A. Yu. Pechenov Endoscopic Miniinvasive Cryodestruction of Adenomas of Hypophysis and Adenohypophysis 169

R. V. Gavrilov, L. K. Kolybayev, B. N. Murinets-markevich, M. E. Nosov, V. E. Berezutskaya Cryogenic Apparatuses and Instruments for Medicine 170

V. I. Grischenko, A. G. Gerodes, E. K. Alipova, L. I. Lutskaya, O. S. Prokopyuk, Yu. V. Nikitchenko Transplantation of Cryopreserved Placental Tissue at Spermatogenesis Disorder in Men 170

N. S. Lutsenko, I. V. Lomaka, I. N. Kirichenko Experience of Application of Heterotopic Transplantation of Cryoprserved Placenta in Women in Perimenopause 171

A. S. Zhuravlev Polypous Rhinosinuitis and Its Pathogenetic Treatment with Ultralow Temperatures 172

O. B. Anipko, A. A. Mikhanovsky, K. A. Gorbunov Forecasting of Cryonecrosis Depth on Biological Tissue Basing on Mathematical Model of Heat Conductivity in Patients with Uterus Body Cancer 173

O. B. Anipko, A. A. Mikhanovsky, K. A. Gorbunov Determination of the Time of Tissue Temperature Recovery by Solving the Task of Thawing in Patients with Uterus Body Cancer after Tumour Cryodestruction 173

E. D. Khvorostov, B. P. Sandomirsky, O. N. Pobelensky, I. V. Belochkina Xenotransplantation of Pancreas Islet Tissues When Carrying-out Laparascopic Cholecystectomy in Patients with Diabetes Mellitus 174

M. M. Mylytsa, O. I. Martynovsky, M. D. Postolenko Application of Cryobiology and Cryomedicine Achievements when Treating Pancreanecrosis 175

A. A. TSUTSAYEVA Deep Cold Anabiosis: Its Role in Biology and Medicine 175

O. A. Semenchenko, L. P. Kravchenko, I. V. Shanina, A. Yu. Petrenko, B. J. Fuller Efficiency of Sucrose-Based Solution for 1-day Liver Hypothermic Storage of Mature Rats and Human Embryos 176

A. G. Gerodes, E. K. Alipova, L. I. Lutskaya Proceeding of Pregnancy and Labors in Patients after Infertility Treatment Using Cryopreserved Donor's Sperm 177

V. Yu. Vasilovsky, L. F. Vasilovskaya, V. V. Vasilovsky, O. I. Anastasiadi, K. V. Skripnichenko Hypothermal Optimisation of Hirudotherapy at Cerebral Vascular Pathology 178

L. M. Samokhina, V. G. Babijchuk, V. V. Lomako, I. A. Poznakhareva, V. S. Marchenko, V. V. Mamontov, A. V. Shilo, I. I. Lomakin Combined Influence of Rhythmic Cold Effect and Cord Blood on the Activity of Proteinases and their Inhibitors in Old Rats with Stimulated Hypertension 178

A. A. Tsutsayeva, O. V. Kudokotseva, A. V. Scheglov, G. S. Tupchienko, N. P. Lobasenko Cord Blood as the Component of Supporting Therapy 179

A. D. Zubov Paracentetic Injection of Foetal Cell Material into Target Organ as a Way for Transplantation Efficiency Increasing 180

A. E. Lagoda, V. M. Zybin, V. K. Khabuseyev, S. A. Pavlichenko, G. E. Molotyagin, Yu. P. Gnidenko, A. S. Petrenko Application of Xenothymus Cryopreserved Fragments in the Program of Combined Therapy of Patients with Wide Spread Forms of Peritonitis 180

V. V. Byzov, I. P. Vysekantsev, S. E. Galchenko, B. P. Sandomirsky Application Experience for Endotracheal Introduction of Extract of Xenospleen Cryopreserved Fragments in Complex Treatment of Patients with Purulent Processes in Lungs 181

Матеріал, захищений авторським правом

A. E. Lagoda, V. M. Zybin, S. A. Pavlichenko, G. E. Molotyagin, Yu. P. Gnidenko, G. V. Sadovsky, A. S. Petrenko Endoscopic Cryoeffect by Freon in Combined Conservative Treatment of Mallory-Weiss Syndrome 182

A. E. Lagoda, G. E. Molotyagin, V. M. Zybin, S. A. Pavlichenko, Yu. P. Gnidenko, A. S. Petrenko Experience of Post-Operative Wounds Cryotreatment in Patients, Operated on the Indication of Perforative Ulcers 183

Yu. A. Demin, A. Yu. Petrenko, E. I. Goncharuk Application of Preparation "Hemoneuronal" in Combined Treatment of Patients with Diabetic Retinopathy 183

V. I. Belous Results of Cryotherapy Application in Combined Treatment of Non-Penetrating Cornea Wound 184

G. V. Malysheva, G. A. Babijchuk, V. S. Marchenko Adaptive Mechanisms of Resonance Cold Effects and Application Perspectives of Parafractal Hypothermia under Stress-Induced Damages of Parodontium 185

L. T. Volova, V. V. Rosinskaya, S. A. Emelyanov Some Ethical Bases of the Activity of Tissue Banks . 186

O. V. Ershova, V. I. Grischenko, I. I. Lomakin Mechanisms of Action of Trigger Hypothermia in Therapy of "Psychosomatic Infertility" 186

V. G. Babijchuk, A. V. Kozlov, D. G. Lutsenko Trigger Mechanisms of Cold Stress and Resonance Regimens of Medical Hypothermia 187

V. O. Shidlovsky, I. M. Deikalo, I. V. Chepil Application of the Preparations of Fetoplacental Complex in Patients with Purulent Surgical Pathology 188

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 57.043: 616.089.843

The Role of Cryobiology in Creation of Biotechnologies for Cellular and Tissue Transplantation

Valentin I. GRISCHENKO

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

Within the recent decade at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine R&D works on the investigation of various aspects of cooling effect of different degree on biological objects of embryo fetoplacental origin have been carried-out. Basing on profound scientific works with attracting current investigation methods, tissue metabolism peculiarities of early gestation terms, differentiation level and anatomical and topographic characteristics were revealed, as well as the cell and tissue response to hypothermic storage, the effect of freezing and ice crystal formation on them both under protection of different classes cryoprotectants and without them, were determined.

Recently special characteristics of the tissues of embryo fetoplacental complex were revealed. Fetal cells have slightly expressed complexes of main histocompatibility antigens, fetal organs comprised, mainly, blast and stem cells, possessing a high proliferative and transplantational potential; fetal and embryonic tissues, comprising blast populations of mesenchymal and connective tissue, provide a complex of biological compounds, stimulating reparation and regeneration.

A short term between the obtaining of donor's material and its usage was an insuperable obstacle for application in medicine, as well as providing medical care to many patients, suffering from severe diseases of immune, nerve, endocrine systems, because it was impossible to prolong the term of hypothermic storage due to developed autolysis. Such a situation did not give the possibility to carry-out quite a qualitative testing of donor's cells and tissues to exclude bacterial and viral contamination, more over, the cases of hepatitis, syphilis, cytomegalovirus, which often could not be diagnosed in pre-clinical establishments, sharply increased among the Ukrainian population.

To solve this problem the presence of certain low-temperature tissue banks, providing the correctness of all the stages of preparation, cryopreservation and storage of the material, intended for further transplantation, has been necessary.

In respect of the mentioned above at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, which is a leading establishment in the field of investigations on a cold effect on biological objects, the methods for cryopreservation of tissues and cells of embryonic, placental and fetal origin, have been elaborated, that is an actual for current medicine and efficient in the series of clinical situations.

As the investigations of scientists of the Institute demonstrated, the disorder of ion-transport systems of plasmatic membranes, those of intracellular organelles, the disconnection of ATP enzymatic hydrolysis with the process of ion transport inside to membrane vesicles after low temperature effect, were very important in the development of cell cryodamages.

The works, which allowed revealing the mechanisms of cryodamage, contributed to the creation by the Institute's staff of new biotechnologies, basing on deep cold and cryoprotectant usage, providing the protection of intracellular structures.

The obtained theoretical data made the basis for the cycle of works on the development of cryopreservation methods for embryonic and fetal tissues, experimental substantiation of their clinical application and a wide-scale introduction into the practice of medical establishments of the Ukraine.

Each biological object required an individual approach when developing the ways of a long-term storage due to its structural, metabolic and anatomic peculiarities.

We developed effective cryoprogrammes in respect to some cells and tissues of embryo-fetoplacental complex, providing a high viability of their components, as well as the preservation of biologically active substances in high concentrations and physiological ratios.

Thus, we developed technological processes, including procurement, cryopreservation and long-term storage of the following human cells and tissues of embryo-fetoplacental origin. These are embryonic hemopoietic and nerve cells, tissue of early chorion, placenta and its derivatives, fragments of fetal thymus, spleen, thyroid gland, kidneys, tubular and flat bones, suspension of fetal liver, cartilaginous and cerebral tissue, as well as fetal testes.

Biological effects of the influence of the mentioned above cryotransplants on organs and systems of laboratory animals of different age groups, as well as when modelling different types of pathology, were determined in a great number of experiments.

Our developments were reflected in the prepared and published monographs, theses, publications in scientific press and patents. In the experimental investigations and under clinical approbation of the treatment methods, using the proposed by us a

Матеріал, захищений авторським правом

transplantational material of embryonic, placental and fetal origin, we revealed the mechanisms of specific and non-specific effect on a recipient's organism, that consisted in a manifested substitutive effect and stimulation of reparative of organism possibilities, levelling of its homeostasis due to inclusion of nervous, immune, endocrine systems.

We have used transplantation of cryopreserved material within some years at various clinical pathology.

Introduction of advanced biotechnologies into a practice of medical establishments required the creation of the structure, responsible for the material quality and a recipient's safety during its application, in this connection a unique in the Ukraine low temperature bank of embryonic, fetal and placental cells and tissues was established. In clinical transplantology the tissue bank can be considered as the first stage in general complex of the measures, providing achievement of the purpose, i.e. transplantation of cells, tissues and organs.

One of the methodical approaches of the Ukrainian bank is orientation on the production of viable biological transplantational material, provided by special cryoprotective media and elaborated freezing regimens.

Formation on the base of the Institute of the State Interdepartmental Center for cryobiology and cryomedicine under the aegis of the Ministry of Health Care, National Academy of Sciences and Medical Academy of Sciences allowed to achieve a qualitatively new level of activity.

Interdepartmental Center has certain tasks and main directions of the activity with direct participation and leadership of the Scientific Council of the Centre.

Thus basing on fundamental investigations of the Institute a new scientific direction with the spectrum of theoretical and applied unsolved tasks has been formed, to the realisation of which the following activity of the Centre is concentrated.

Pharmacological Preconditioning of Kidneys Inhibit Ischaemia-reperfusion Injury during and after Hypothermic Storage

Roberto MOTTERLINI, Elisabeth BALOGUN and Colin J. GREEN

Vascular Biology Unit, Department of Surgical Research, Northwick Park Institute for Medical Research, Harrow, Middlesex, HA1 3UJ, United Kingdom

Renal ischaemia-reperfusion injury is an inevitable event in tissue transplantation and involves a complex sequence of biochemical interactions. This injurious phenomenon can be alleviated by immediately preserving the organ at low temperature in specially designed solutions (hypothermic storage) prior to transplantation. However, even though these methods ameliorate the subsequent function of transplanted grafts, the consequences of reperfusion with warm blood can not be prevented in full and new strategies aimed at improving renal function after transplantation are urgently needed. The use of natural substances that possess intrinsic antioxidant properties and can trigger simultaneously and efficiently the intracellular defense network (*preconditioning*) offers a promising stratagem for therapeutic applications. We have recently discovered that curcumin, a plant-derived polyphenolic compound that possesses anti-carcinongenic and anti-inflammatory activities, is a potent inducer of the antioxidant and cytoprotective protein haem oxygenase-1 (HO-1). We, therefore, investigated whether curcumin is capable of stimulating HO-1 expression in renal epithelial proximal tubule cells (LLC-PK_1) in normothermic and/or hypothermic conditions. We found that treatment with curcumin significantly increased HO-1 protein expression and activity in a concentration-dependent manner, with maximal activity being observed at 15 μM. Similar data were obtained with caffeic acid phenethyl ester and chalcones, other plant-derived phenolic compounds whose chemical structure is very similar to curcumin. Renal tubule cells were also incubated with curcumin at different temperatures ranging from 37 to 4 °C. It was found that curcumin-mediated HO-1 activation significantly declined at 30 °C and continued to gradually decrease as the temperature was lowered. Consequently, the HO-1 pathway could not be induced by curcumin in conditions of very low temperature (4 °C). Further experiments established that cells needed to be pre-incubated for at lea st 3 hours at 37 °C in the presence of curcumin in order to observe an apparent HO-1 induction during the subsequent hypothermic storage. Using this specific stratagem, heme oxygenase activity was maintained at high levels at the end of the hypothermic period. These data may have important implications for developing new strategies that are capable of increasing the inherent cytoprotective system of kidneys prior to preservation and transplantation.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 615.361.36.013.014.413: 612.591

Cold Preservation of Liver and Inflammatory Responses after Re-Warming: Studies on expression of cell surface adhesion molecule ICAM-1

Barry J. FULLER

Royal Free & University College Medical School, London NW3 2QG, UK.

Cold storage of organs is known to activate an inflammatory response when the organs are re-warmed, and this may cause further damage after transplantation, even in the absence of an allo-immune stimulus (i.e. in an auto-graft situation). Intercellular adhesion molecule (ICAM-1) is one such adhesion molecule, which we studied in isolated rat liver preservation and in cell cultures of hepatocyte cell lines (HEPG2 cells). In the first part of the work, ICAM-1 expression was measured in frozen sections of liver tissue after cold preservation for up to 24 hours using University of Wisconsin solution, both in livers only stored and those stored and reperfused on an isolated circuit for 1 h at 37 °C, using double antibody labelling and peroxidase staining. Sections were scored in a blinded fashion by an independent pathologist (on the scale 0–no ICAM-1; 1, 2, 3 – weak, moderate and severe staining). Results showed that ICAM-1 expression increased significantly after 16 and 24 hour storage (from values of 1.50 ± 0.34 in fresh livers to 2.67 and 2.98 ± 0.20; $p < 0.001$). When freshly-made reduced glutathione was added to the UW solution used for liver storage, protection (and low ICAM-1 scoring) was seen up until 16 hours of cold storage (scores of 1.33 ± 0.21 with added GSH versus 2.67 ± 0.21 without GSH; $p < 0.03$). However, by 24 hours addition of GSH made no difference (2.98 versus 2.77). Results suggested that oxygen free radicals on re-warming were contributing to ICAM expression.

This was further investigated in cultured liver cells. Cells were cultured to confluence and then washed with cold UW solution, made hypoxic (under nitrogen gas) and held at 4 °C for 16 hours. They were then washed with fresh warm medium at 37 °C. RNA was extracted and mRNA for ICAM-1 was measured by PCR and Northern Blotting. Again, cold preservation and re-warming of the cells led to increased ICAM-1 expression ($300 \pm 35\%$). Addition of free radical scavengers (N-acetyl cysteine and (-tocopherol) partially reduced ICAM-1 expression (to 154 and 146%) but did not completely inhibit it.

Taken together, these experiments show that cold preservation of liver leads to stimulation of inflammatory tissue responses after re-warming, probably through oxygen free radical events. Free radical scavengers can partly block the ICAM-1 response, but cannot completely inhibit it. Better preservation methods still need to be established to avoid this type of damage.

Novel Approaches to Sperm Cryobiology; Cryomicroscopy and Genetics

W. V. HOLT

Institute of Zoology, Zoological Society of London, Regent's Park, London NW1 4RY, UK

Ideally, a semen cryopreservation protocol would not damage spermatozoa. Instead, the sperm would emerge alive and fertile after thawing, with cell functions unimpaired in every respect. Current cryopreservation methods do not meet these high standards, and it is clear that large proportions of spermatozoa are either killed outright or are rendered infertile through loss of one or more important cell functions. In order to achieve comparable fertility rates with fresh or frozen spermatozoa, ten times more cryopreserved than fresh bovine spermatozoa are required. As the freezing process does not cause this degree of cell mortality, the implication is that the freeze-thaw process causes detrimental changes to sperm function which, while not lethal, nevertheless cause subfertility. Attempting to identify the causes of this subtle damage, and then to overcome it, is not a problem which is readily addressed using the trial and error techniques that have characterised sperm cryobiology over the past 50 years.

In an effort to find alternative means of studying the cryobiology of spermatozoa, we have shown that cryomicroscopy presents a unique method of defining critically important steps in cooling, freezing and re-warming protocols. Combining cryomicroscopy with the use of fluorescent probes for estimating cellular integrity (e.g. carboxyfluorescein diacetate, Sybr-14 and Propidium iodide) has proved especially useful in this respect. Studies of ram and boar spermatozoa (*Holt et al.*, 1992; *Medrano et al.*, 1996), established

Матеріал, захищений авторським правом

that careful cooling and freezing in the presence of cryoprotectant caused no loss of cell membrane integrity. However, significant plasma membrane damage occurred during the rewarming phase. Surprisingly, ram or boar spermatozoa which were thawed but then held below 5 °C, did not appear to exhibit plasma membrane damage, as indicated by the fluorescent probes. Subsequent warming above 10 °C rapidly induced plasma membrane damage. The inclusion of cryoprotective compounds increased the temperature threshold for rewarming-induced damage.

These observations were later extended in a study of kangaroo and wallaby sperm cryopreservation (*Holt et al.*, 2000), where a post-thaw threshold temperature of 22 °C was observed. If spermatozoa were frozen in the presence of 20% glycerol, then thawed, plasma membrane integrity was lost as soon as the temperature exceeded 22 °C; sperm motility was also lost at the same temperature. These observations indicate that subtle rearrangements of sperm plasma membrane structure are induced during the freezing process.

Some clues to the factors governing the degree of cryoinjury sustained by spermatozoa may be gained by studying the differences between individual animals within a single species. In a semen cryopreservation study of 129 boars, 5 successive semen samples were collected from each boar and each split between 5 straws for freezing. Upon thawing and assessment, it was found that the multiple straws and ejaculates could be classified using multivariate data analysis, into three clearly defined groups (poor, medium and good freezers). There was no overlap between these groups. When a method of identifying differences in genomic DNA between the groups (amplified fragment length polymorphism; AFLP) was applied to 22 of the boars (from the "good" and "poor" groups), 10–16 bands were found to be consistently present in one group but not the other ($P < 0.001$). We are currently extending this project to identify the nature of these DNA bands. If the relevant genes can be identified and mapped, we hope to gain insight into the functional molecules that govern susceptibility to sperm cryoinjury.

Матеріал, захищений авторським правом

Section 1
MECHANISMS OF CRYODAMAGES AND CRYPROTECTION OF BIOLOGICAL OBJECTS

UDC 57.043: 591.462.12.3: 599.731.1: 577.3

Role of Some Biophysical Characteristics in Porcine Oocytes and Embryos Sensitivity to Low Temperatures

N. A. GORDIENKO

Kharkov State Medical University

We have performed the series of experimental works devoted to the investigation of some biophysical properties of porcine sexual and embryonic cells, which determine their cryo-resistance. Here we have found out the amount of osmotically active water, osmotically inactive and non-penetrating substances in porcine oocytes, ova and early embryos. Besides, we have determined such oocytes geometrical characteristics, as diameter, total volume, absolute volume of osmotically inactive substances, statistical distribution of these substances.

Major part of these characteristics are responsible for cells behaviour features during the cryopreservation, e.g. an amount of osmotically inactive substances (and an amount of osmotically active water corresponding to it), a cytoplasmatic membrane specific permeability to water determine the cells dehydration rate and intracellular crystallisation probability.

The porcine oocytes and early embryos osmotic composition does not statistically differ from this one for oocytes and early embryos of many other mammalian species. The specific permeability of embryos cytoplasmatic membranes of various animals species is also within similar limits. We can conclude, that the porcine embryos dehydration should occur similarly to that one for embryos of another species. However, numerous experimental data show that the standard techniques did not provide a proper integrity. Hence, the peculiarities of the porcine embryos increased sensitivity to the temperature decrease are not consisted in above stated biophysical parameters. Probably, the reason of embryos death at temperature decrease (even within positive temperatures range) is the peculiar biochemical composition of embryos, that was testified by some of data obtained by us and by another investigators. It is shown, that after removal of intracellular lipids from porcine early embryos by means of centrifugation, such cells have survived the cooling down to 4 °C. Hence, we can assume that lipids can be the reason of cryo-damage. N. D. Bezugly (1995) has proposed a hypothesis, that one of the probable reason of cells damage can be the phase transitions, when lipids transit from the liquid crystal state to the one of solid crystal. It is very important at which temperature this transition occurs, if it does after the water-ice phase transition, then cells survive.

We performed the direct investigations of porcine embryos fatty acid and phospholipid composition. It has established that the porcine embryos cytoplasm contains 40% of oleic acid, which is an fatty acid with phase transition temperature of 15 °C. Lipids are major part of cell content. We have showed a smooth decrease of osmotically inactive substances content at each development stages from 30.14% for zygote to 19.0% for compact morula. A significant scattering of osmotic indices in oocytes and embryos populations results from the exṕeriments. Besides it is noted that with embryos ageing their cryo-resistance increases. Hence, lipids and their amount and type are the determining factors of increased cryo-sensitivity. Thus, a success in porcine embryos cryopreservation can achieved with an obligatory study of all properties, which are responsible for their integrity at cooling.

UDC 57.043: 612.111.3: 577.352.4

Proton Transport in the Sulfate Loaded Erythrocytes under the Temperature and Osmotic Effect

V. A. BONDARENKO, M. H. RUMIEKH, V. V. RAMAZANOV, E. B. ALMAZOVA

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

Introduction of the sulfate loaded erythrocytes into NaCl isotonic solution, caused the capture of protons by cells. Thereat it was established, that DIDS inhibitors of anion transport (2 μM) and dipiridamol (100 μM), as well as hypertonic effect (0.4 M NaCl) resulted in an increase of the level of proton capture.

An increase of DIDS concentration up to 200 μM and rise of dipiridamol up to 400 μM, as well as the

Матеріал, захищений авторським правом

augmentation of NaCl concentration higher than 0.4 M caused the inhibition of proton transport into erythrocytes. Investigation of the temperature dependence of the following process revealed, that the temperature rising higher than 37 °C resulted in the inhibition of proton transport into a cell and reduction of the level of proton capture, at the same time the temperature reduction from 37 down to 17–20 °C activated an entry of protons into a cell and increase of their capture level.

Thus, inhibitors of anion channel, which must block anions movement, cause the activation of protons entry, and the temperature increase or decrease, which should provoke both rising or reduction of the transport rate in the given case acts reversibly.

Such results testify to the fact, that in the sulfate loaded erythrocytes and placed into a chloride medium, the proton transport is realized from cell to cell at the same time. Thereat, obviously, that proton transport out of a cell is more susceptible to inhibitors, temperature and hypertonic effect, and the proton transport into a cell is less susceptible to inhibitors, and, therefore is blocked by significantly higher NaCl concentrations (higher than 1 M).

In intact chloride containing erythrocytes placed into a sulfate medium, the proton transport from a cell and into it, which accompanies the exchange of intracellular chloride to extracellular sulfate, also occurs. In the given case it was revealed that the proton transport into a cell is more susceptible to inhibitors, temperature and hypertonic effect, than in the case of the proton transport out of a cell. It was established, that enthalpia of the activation of proton entry into a cell (26 kcal/M) is significantly higher, than the one of the activation of proton release (4.8 kcal/M).

A high susceptibility to the temperature of proton release out of sulfate-loaded erythrocytes obviously, is determined, by the fact, that enthalpia of the activation of given process is significantly higher, than this index for the proton transport into a cell. Estimation of the enthalpia activation makes the following values: 33 kcal/M for proton release and 1.2 kcal/M for their entry.

Obtained results allowed to suppose, that proton transport into a cell accompanies chloride entry according to a channel mechanism, thereat the proton release accompanies the exchange of intracellular sulfate to extracellular chloride.

UDC 612.111.32.118.221.3: 57.043

Hypertonic Cryohemolysis of Human Erythrocytes When Changing *pH* Medium

V. V. RAMAZANOV, O. A. OLEJNIK, ABU AL ASAL, V. A. BONDARENKO

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

Erythrocytes susceptibility to cooling in the solutions, comprising 0,86 M sucrose under various *pH* values was investigated. *pH* reduction from 7 down to 5 resulted in the loss of cell susceptibility to damage. Thereat the percentage of hemolysis decreased from 30–35 down to 1–3%. Significant increase of susceptibility to cooling is observed under *pH* 8–9. The level of erythrocytes injury achieved 60–70%.

The presence of up to 150 mM/l in experimental media significantly reduce the cell susceptibility to injury in *pH* 7–9 interval. Hemolysis degree decreased down to 30–40% under *pH* 9.

The presence in the incubation media of anion channel inhibitors dipyridamol (25 μM/l) and DIDS (2 μM/l) also caused inhibition of erythrocytes susceptibility to cooling within *pH* 7–9 range, at the same time within the *pH* 5–6 range a slight increase of hemolysis level occurred. Thereat manifestation of *pH* dependence significantly reduced. At *pH* 5 the level of cell damage made 10–15%, under *pH* 9 this index was 25–40%. Described effect of the mentioned inhibitors can be explained by the effect of *pH* medium on the osmotic status of erythrocytes. *pH* increase higher than neutral values will cause chloride release out of a cell and corresponding reduction of the concentrations ratio of intracellular chloride to extracellular one. Chloride redistribution will result in the fact, that its concentration in a cell will be higher, than in extracellular medium, in the case if *pH* medium will be lower than neutral one. Gradient release of the given anion out of a cell, causing the loss of potassium and sodium ions will occur if chloride content inextracellular medium is insignificant, thereat hypertonic effect will accelerate considerably release of cations. Chloride transport under the conditions of hypertonic effect, as well as the activity of anionic channel are the main factors in the development mechanism of hypertonic hemolysis in erythrocytes.

Erythrocytes treatment with iodoacetamide (15 μM/l, 60 min) and parachlormercurium benzoate (1 μM/l, 60 min) does not result in the *pH* dependence change of cold injury in salt-deprived solutions. In the presence of 150 μM/l sodium chloride a slight reduction in *pH*-dependence of hypertonic cryohemolysis in modified erythrocytes is observed.

Obtained results allow to suppose, that dependence of the level of cold injury of erythrocytes on *pH* is significantly determined by redistribution of chloride anions between a cell and medium and in less extent by the modification of band 3 protein with cytoskeleton.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 577.352.3: 612.111.3

Investigation of the Shift Module in Erythrocytes Membranes

E. A. GORDIENKO, A. I. OSETSKY, L. I. POPIVNENKO, A. F. TODRIN

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

Cell response to the effect of various extreme factors, as a rule, is accompanied to the change of the cell membrane deformability. A decrease of erythrocytes deformability both stored under 4 °C and cryopreserved donors' blood has been noted in the literature. Chemical composition of the medium, comprising a cell showed a significant effect on the cell membrane deformability. The level of cell deformability is determined generally by the elasticity modules in cellular membranes.

Involvement of single cells into micropipettes, radius of those is less, than normal cell size, under the effect of a certain pressure differential is the most spread method for the determination of elasticity modules of cell membranes (such as the modules of curve, shift and isotropic tension). For micropipette methods the theory and ways for the experiment results processing have been thoroughly elaborated, and complete and exact data on the mechanical properties of the membranes of different cells have been obtained by means of these methods. However these methods require the expensive devices, highly qualified personnel and allow to investigate just some dozens of cells in the given sample during some hrs. This fact makes more difficult a statistical processing of the experiments results.

We elaborated the method, allowing to determine in a short period of time (duration of experiment is not more than 15 min) an average shift module for all cells in the studied volume of suspension. An average shift module in membrane for all the erythrocytes, passed through a capillary, was calculated by experimental measuring the absorption time of a certain volume of the erythrocytes suspension with given hematocrit under known pressure differential and sizes of microcapillary, as well as the term of absorption into capillary of a distinct volume of extracellular solution and using elaborated by us physical-mathematical model of the process of human erythrocyte passing through cylindrical microcapillary, which diameter is less than the cell size.

According to the given method a shift module of the erythrocytes membrane in donors' blood, stored under 4 °C within 4 weeks was measured. With passing time a shift module of erythrocytes membrane significantly increased. To the end of the 4th week the shift module of erythrocytes membrane made 25–30%, and within first 5 days of donors' blood storage this index did not exceed 3–5%.

The series of experiments on the investigation of erythrocytes, suspended in isotonic and hypertonic solutions, has been also conducted. Hypertonic solutions showed a considerable effect on the rigidity of erythrocytes membrane. The shift module of the membrane of erythrocytes, suspended under 0.4 M NaCl solution, increased by 62% in comparison with the erythrocytes, suspended under isotonic solution, in the case of erythrocytes, suspended under 1.2 M NaCl, an increase of shift module achieved 93%.

Thus, described by us method allowed to estimate for a short time the value of an average shift module in the membrane of erythrocytes, stored under the investigated volume.

UDC 57.043: 547.422: 536.54

To the Theory of Thermoplastic Analysis of Frozen Biosystems and Cryoprotective Solutions

A. I. OSETSKY

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

It is known, that experimental investigations of frozen biological objects get difficult with their cooling, and studying of kinetic processes in almost solidified biosystems and cryoprotectant solutions within the temperature range from –40 down to –110 °C is quite a difficult task. At the same time this is the range of main damages in cooled biosystems, this fact makes the search of new experimental approaches, efficiently functioning within the given temperature range, especially actual for current cryobiology. The method for thermoplastic analysis is one of such methods. Thermoplastic curves, obtained by this method, reflect kinetics of the processes, occurring namely about devitrification temperature of the studied objects. However to this time just technical principles for this method realization and obtained due to it experimental results were investigated. Detailed analysis of the phenomena, being the base of the method, has not

Матеріал, захищений авторським правом

been conducted. Such an analysis, allowing understanding of not only physical essence of the method, but also a distinct interpreting of the obtained by means of it results, is the main aim of given work.

Modeling of the states, through which biosystem or cryoprotectant solution passes during the cooling process has been carried-out. It was shown, that starting from the temperatures of –20 ÷ –40 °C and down to the temperature of liquid nitrogen, a crystal ice matrix, formed in the studied samples can become very susceptible to heat effects, accompanying any kinetic processes in adjacent liquid layers. It occurs under the effect of programmable adding of outer tension, transmitting the formed matrix into the regimen of dislocational plastic stream. Thermodynamic aspects of dislocational plasticity in the crystallized aqueous fractions under the effect of constant outer tenzions and the conditions of interrupted temperature scanning, the principles for obtaining the most informative thermoplastic curves have been studied. We estimated the resolution ability of the method when recording the heat effects, allowing to conclude, that when studying phase transitions of the 1st type within –50 ÷ –150 °C temperature range the given method was more efficient in comparison with traditionally used DSK, NMR, EPR ones. For the first time quantitative analysis of thermoplastic curves of frozen glycerol and PEO-1500 aqueous solutions was done.

Obtained results significantly change our ideas about the kinetics of cryoprotectant crystallization in the temperature range from –40 down to –110 °C and the mechanism, accompanying this process of the impairment of biological objects.

UDC 615.361.111.014.413.849.19

Increase of the Stability in Cryopreserved Erythrocytes with Preliminary Laser Irradiation

O. A. NARDID, K. D. ROZANOVA, Ya. O. NARDID, T. S. DYUBKO, L. V. TSYMBAL

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

V. N. Karazin Kharkov National University

Nowadays a certain number of experimental data, testifying to biological efficiency of low-intensive laser irradiation (LLI), has been accumulated. In the series of the works a radioprotective activity of LLI in respect of some water-soluble proteins and cells has been shown. Investigation of the effect of preliminary laser irradiation on the integrity of human erythrocytes after their cryopreservation is the aim of the given work.

Erythrocytes of donors' and cord blood, irradiated in a plasm and physiological solution by means of helium-neon laser (wave length of irradiation – 632.8 nm, power – 25 mW, irradiation time – 5 min) were used in the work. Erythrocytes freezing down to the temperature of liquid nitrogen (–196 °C) and further thawing were carried-out in the presence of "Propandiosakharol" cryoprotectant according to methodical recommendation on the erythrocytes cryopreservation, elaborated at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine. Erythrocytes integrity after freezing was estimated at the hemolysis level. Besides, such parameters as the content of intraerythocyte hemoglobin forms, conformational proteins state on the consumption spectra and fluorescence in UV range, as well as the state of lipid matrix of membrane on the binding of DSM probe-cation and parameters of the rotation mobility in spine-labeled amide of palmitine acid, were controlled. Absorption spectra were recorded by means of Pye Unicam SP-888 (UK) spectrophotometer, fluorescence spectra were done by means of Signe 4N (Latvia), EPR spectra were measured by means of "Bruker" ER-100D (Germany) spectrometer.

Investigation results showed, that preliminary irradiation allowed to obtain erythrocytes after freeze-thawing with the level of hemolysis about by twice lower, than in non-irradiated erythrocytes. Irradiation of the erythrocytes of both donors' and cord blood in physiological solution, demonstrate some better results (after irradiation of erythromass hemolysis reduces and makes 0.45–0.5; after irradiation of the whole blood it makes 0.6–0.65 of the hemolysis of non-irradiated cells). Investigation of the state of intraerythrocytic hemoglobin demonstrated, that independently on the preliminary irradiation a decrease or complete absence of methemoglobin was observed in all experiments. This fact testifies that elder erythrocytes, comprising an increased quantity of methemoglobin, during freezing are damaged first of all. Absorption spectra of the erythrocytes in UV-range do not significantly change. Laser irradiation practically does not affect the shape of fluorescence spectra in the erythrocytes proteins, at the same time it slightly changes their intensity, that, obviously, reflects the change of accessibility to solvent of surficial thyrosin rests.

It should be noted, that after the freezing of cord blood erythrocytes in preliminarily irradiated samples the content of fetal hemoglobin after freezing is higher, than in non-irradiated cells. This fact allowed to suppose, that irradiation affected more efficiently the cells, comprising fetal hemoglobin.

Матеріал, захищений авторським правом

Investigation of the parameters of the EPR rotation mobility of spine-label and analysis of the shape of DSM fluorescence spectra showed, that laser irradiation results in the change of structure of the erythrocytes membrane surface, that manifested in amplification of DSM binding with membranes and in the change of the character of temperature dependence in the microviscosity parameter of the membrane surface. Additional investigations, carried-out on the erythrocytes hemolysis in 2 M NaCl and 40% 1,2-propanediol also testify to the disorder of the membrane barrier properties.

UDC 615.014.451: 611.013.85

Effect of Heat Sterilization on Protein and Nucleotide Composition of Human Placenta Aqueous-Saline Extracts

T. F. MOROZOVA, E. D. ROZANOVA, M. I. SCHETINSKY, A. M. VOROTILIN, V. A. MOISEYEV, G. A. BABIJCHUK, O. A. NARDID, Yu. V. KUCHERENKO, O. V. GRISCHENKO, O. A. BERESNEVA, S. I. TARANENKO, I. Ya. ZAKHARENKO

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

Medical Academy of Post Diploma Education

City Clinical Narcological Hospital № 9

Specialized Maternity Hospital № 5, Kharkov

Preparations of human placenta are widely applied in medicine, including those, which are prepared using autoclaving. The nature of biologically active substances, which are kept after autoclaving, has remained incompletely revealed till now.

The aim of this work was to study protein and nucleotide composition of the extracts from placenta homogenates of early pregnancy terms (chorions) before and after extracts autoclaving.

In the work we used the chorions 1 and 2 of the 5th and 8th week pregnancy terms, correspondingly, as well as the terminal placenta samples. Protein and nucleotide composition was estimated using the extract fractionating by means of gel-chromatography method. Protein and nucleotide content was determined spectrophotometrically, using Pye Unicam SP 8000 spectrophotometer. According to the data obtained, the protein and nucleotide total concentration in placenta aqueous extracts made 10.4 mg/ml and 100 μg/ml, in chorion 1 it made 5.9 mg/ml and 387 μg/ml, in chorion 2 it was 18 mg/ml and 35 μg/ml, correspondingly.

In the studied placenta and chorion 1 and 2 extracts we isolated three main groups of protein and nucleotide fractions: high molecular (100–150 kDa); average molecular (about 60 kDa), comprising hem-containing proteins and group substances of blood, which could aggravate the immunoconflict situations when penetrating into an organism, and low molecular ones.

In the autoclaved extract fractions of a fresh terminal placenta the proteins of high-molecular protein fractions were kept. Autoclaving of this placenta total extract allowed preserving low molecular protein fractions too.

In the chorion 1 the protein with molecular mass (m.m.) of approximately 70 kDa makes 78% of the total quantity and can be spectrophotometrically identified as hemoglobin. During autoclaving this protein number in the experiment reduced more than by 65%. In low molecular chorion 1 fractions after autoclaving the concentration of soluble protein did not change, meanwhile in high molecular fractions its number decreased down to 80%.

Nucleotides in chorion 1 are presented mainly by a high molecular fraction with m.m. from 110 to 90 kDa (~42% of total nucleotide number) and a low molecular one with m.m. 4 kDa and lower (~25%). After fraction autoclaving the main part of high molecular nucleotides aggregates in contrast to a low molecular fraction, which is practically completely kept.

In comparison with the chorion 1, in the chorion 2 there is an increase in the content of high molecular proteins with m.m. from 150 to 120 kDa (up to 46% of total protein number), hemoglobin makes ~22%, the protein fraction with m.m. from 40 to 20 kDa (~25%) appears; low molecular fraction, including polypeptides with m.m. lesser than 4 kDa and free aminoacids, makes about 2%. Autoclaving results in the aggregation of 90% of high molecular fraction proteins, low molecular peptides are completely preserved.

Nucleotides in chorion 2 are presented by three main groups with the following m.m.: from 150 to 90 (~20%), from 30 to 15 (~16%), 6 kDa and lesser (~45%). After autoclaving some fractions, up to 10–15% of nucleotides remain in the first two groups. Low molecular fraction is completely preserved.

Thus, the investigations conducted demonstrated, that the extract autoclaving permitted to preserve in the solution a part of proteins and low molecular nucleotides, by which a biological activity of placenta extracts could be apparently stipulated.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 57.043: 612.111.11

Comparative Investigation of Freeze-Thawing Effect on A and F Hemoglobins

N. N. TIMCHENKO, E. D. ROZANOVA, K. N. KHROMUSHKIN, V. A. MOISEEV

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

Fetal hemoglobin, prevailing in the fetus blood at last gestation terms, differs on hemoglobin A in the blood of adult people by its structure and some physical and chemical properties. Successful usage of hemoglobin F in experimental medicine stimulated an interest to the investigation of the structure and properties of this protein.

Comparative study of freeze-thawing effect in the solutions, comprising different sodium chloride concentrations, on A and F hemoglobin was the aim of given work.

Hemoglobin A, isolated from donors' blood, and hemoglobin F, isolated from placental blood, were used in the work. Proteins structure was characterized by means of initial derivatives of the absorption spectra. For the analysis of an aggregate state of proteins gel-chromatography was used. Besides, the contents of oxyhemoglobin, desoxyhemoglobin and methemoglobin were investigated before and after freeze-thawing. Freezing was carried-out with an average rate 20 °C/min) down to –196 °C in 0.05 M sodium-phosphate buffer, *pH* 7.4 with various NaCl concentrations, thawing was done on water bath under 22 °C.

Preliminary investigation of the effect of NaCl solutions on A and F hemoglobins demonstrated, that fetal hémoglobin was less stable to the effect of concentrated salines and dissociates under their lesser concentrations, than hemoglobin A (1.5 and 2 M, correspondingly). Proteins freezing under salines, which did not cause the proteins dissociation, showed that in initial derivatives of the absorption spectra distinct changes in the absorption region of thyrosin rests was observed. After the proteins' freezing in salines, caused dissociation, the maximum shift of the absorption spectrum is noted (0 at the 1st derivative) into a short-wave region. However for F hemoglobin these changes were observed under lesser NaCl concentrations, than for A hemoglobin.

Investigation of oxyheoglobin, desoxyhemoglobin and methemoglobin contents after the proteins freezing under solutions with different NaCl concentrations, also revealed differences for A and F hemoglobin.

After freeze-thawing of A hemoglobin under the salines, not causing the protein dissociation, the content of disoxyhemoglobin increases and oxyhemoglobin one decreased. After hemoglobin A freeze-thawing under NaCl solutions, resulting in dissociation, an increase of methemoglobin due to the reduction of oxihemoglobin, is noted.

Freeze-thawing of fetal hemoglobin under NaCl solutions starting with 0.5 M concentration, results in an increase of methemoglobin content due to the reduction of oxyhemoglobin.

Thus, the obtained results demonstrated, that fetal hemoglobin was less stable to the effect of concentrated NaCl solutions and freeze-thawing.

UDC 577.218: 612.592: 575.826

Gene Differential Expression at Hypothermia and Adaptation

G. F. ZHEGUNOV

Kharkov State Medical University

It is known that for the evolution and anchoring of the useful for an organism sign the fixation of this useful information in cell genetic apparatus is of great value. Genetic programmes are realised through the synthesis of specific proteins, that can alter the intensity and orientation of cell metabolism, as well as functions of organs and this affects the adaptability of individuals. The individuals referred to various types and species have different physiological and metabolic peculiarities, so the ways of their adaptation to the same conditions can be also different. In this connection we found it interesting to compare the reaction of protein-synthesising apparatus of poikilothermal and hibernating animals during their adaptation to various temperatures.

The aim of the work is to comparatively study the protein synthesis of proteins in various tissues of heterothermal and poikilothermal animals under various temperature conditions.

It has been shown that both poikilothermal and winter hibernating mammals, being adapted to different temperatures, use produced in the process of long-term evolution genetic mechanisms of adaptation, realised through differential expression of genes and synthesis of proteins. Therefore these mechanisms of adaptation are specific for different animals, organs

Матеріал, захищений авторським правом

and tissues and also depend on temperature conditions of adaptation.

It is known that intensity and orientation of metabolism is determined by the activity degree, qualitative and quantitative content of enzymes in a cell and their essential concentration is regulated by the change in the rate of their synthesis and decay. So the found by us during adaptation phenomena of periodic partial renewal of protein composition in poikilothermal and winter hibernating animals can be considered as adaptive polyfunctional response of cells to the necessity of the alteration in functional activity of organs.

UDC 57.043.085: 612.018.2: 530.15

Effect of Thyroid Hormones on the Character of Hysteresis Loop in White Rats under Deep Hypothermia

V. I. SOBOLEV, A. A. PANKO, S. G. PANFILOVA

Donetsk National University, Donetsk, Ukraine

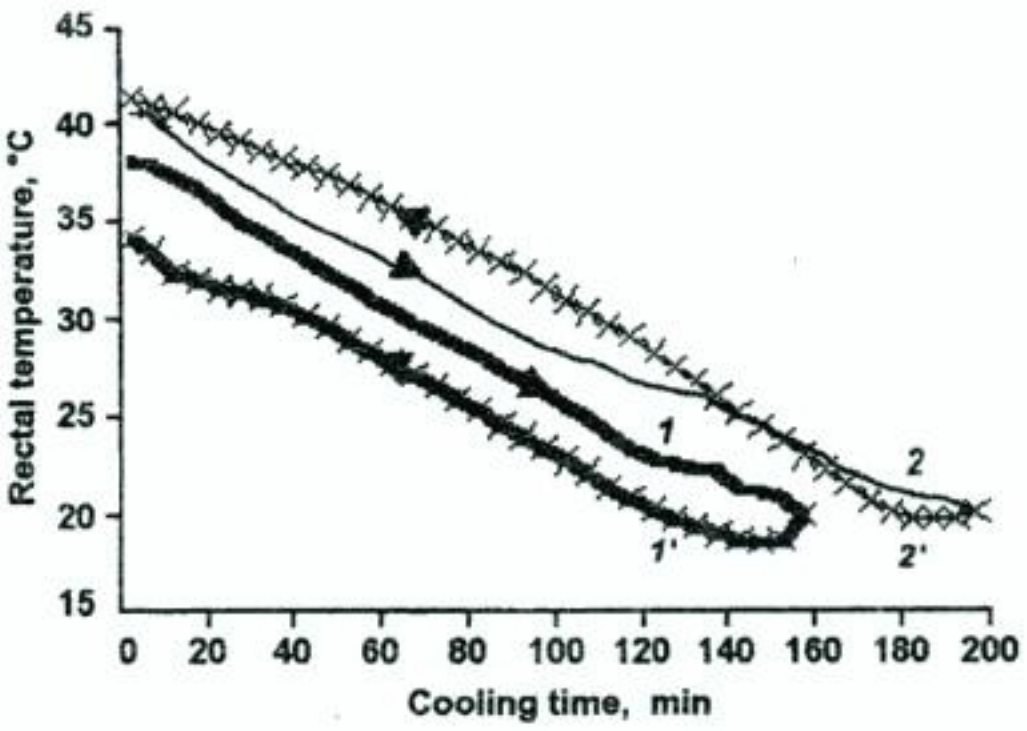
Homoithermia generally determines the possibilities of human and animal existence under unfavourable conditions, in particular under a sharp decrease of environmental temperature. One of the factors of homoiothermity is related to hormonal system of thyroid gland. Some aspects of this problem have been studied. However the question about the state of some physiological functions during the development of hypothermia and returning to normothermia as well as about the effect of thyroid hormones on the dynamics of these processes has remained as insufficiently investigated.

The aim of the work was to study the state of some physiological functions under various thyroid statuses in dynamics of the development of deep hypothermia and organism's "going-out" of this state.

Experiments were carried-out in breedless white male rats of 350–400 g mass. Animals were divided into two groups: control and experimental (8 injections of triiodinethyronine in the dose of 50 μg/kg, injections were done daily, hormone was subcutaneously injected). The animal was placed into thermoneutral zone (28–30 °C), where initial rectal temperature was recorded: the control was 37.8 ± 0.3 °C, hyperthyroidism made 40.0 ± 0.1 °C. Recording of the indices was made every 5 min up to the value of rectal temperature 20 °C. After this the animal was again placed into thermoneutral zone, where it was so much time, as it was cooled. Obtained results were processed by traditional methods of mathematical statistics.

The analysis of results of our researches permits to conclude as follows. First of all, the character of "entering" and "going-out" of an organism out of the state of deep hypothermia have significant differences; this concerns both experimental and control group of animals. So, an average time of cooling (and correspondingly self-warming-up) of the control animals made 139 ± 4.9 min and experimental ones did 180 ± 2.8 min. Both in the first and second cases the curves of "entering" and "going-out" in their dynamics do not coincide, that enables to speak on the phenomenon of hysteresis in the system of thermoregulation of white rats.

Secondly, thyroid hormones qualitatively change the character of the loop of hysteresis of thermoregulation system. Actually the set time was insufficient for the control animals to restore normal body temperature ($T_{going-out} = 32.5 \pm 0.7$ °C); the organism of triiodinethyronine injected animals practically completely recovered its temperature ($T_{going-out} = 39.9 \pm 0.4$ °C). In addition, along all the "going-out" curve if the control group of animals is under the "entering" curve, that testifies to the deficit of thermoregulation mechanisms in the process of "going-out" of the state of deep hypothermia. In animals of experimental group this phenomenon is observed only in an initial period of self-warming-up. In a whole the curve of "going-out" has more favourable character than "entering" curve, that testifies to a qualitative effect of thyroid hormones on the character of hysteresis loop in the system of thermoregulation of white rats under deep hypothermia.



Dynamics of rectal temperature in the course of experiment: *1* – control, cooling; *1'* – control, self-warming-up; *2* – hyperthyroidism, cooling; *2'* – hyperthyroidism, self-warming-up.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 57.043.084.1: 611.018.51.591.543.42

Structural Rearrangements and Permeability for Water of Erythrocytes Membranes of Winter Hibernating Ground Squirrels *Citellus Undulatus*

N. V. REPIN, T. P. GOVORUKHA, T. N. YURCHENKO

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

It is known that ionic balance is practically kept during hibernation in animal's organism, utilisation of the products of vital activity continues, i.e. the processes, occurring on the background of considerable reduction of main metabolism and demanding certain aqueous exchange. We supposed that for rapid inclusion of all systems of a cell and an organism in a whole during the transition from hibernation to an active state not only structural rearrangements were necessary, but also higher permeability of membranes for water in comparison with homoiothermal organisms.

Investigations were carried-out in erythrocytes of winter hibernating ground squirrels Citellus undulatus. The time of aqueous diffusion exchange was determined according to Hahn's two-pulse methods, using relaxometer of NMR spin echo at the frequency of 15.9 MHz. Ultrastructural state of membranes was studied using electron microscopic method of freeze-fracturing.

It has been established, that during hibernation in contrast to membrane structural characteristics, for which in the temperature areas of 4–8 and 15–20 °C the manifested changes in membrane morphology, lipid fluidity, protein conformation are found, aqueous diffusion permeability is characterised in the Arrhenius co-ordinates by practically monotonous dependency within the interval of 6–38 °C. Mean value of activation energy of aqueous exchange made 24.2 ± 1.8 kJ/mol.

Morphological investigation of the process of cell dehydration at the stage of temperature stop (–20 ÷ –30 °C) at two-stage freezing has shown, that the value of the membrane permeability coefficient for water, obtained on the base of theoretical estimation with the account of experimental values of dissolution time of intracellular ice crystals and cell dehydration, are in quite good correspondence with the literature data and equal to about $0.5 \cdot 10^{-13}$ $m^3/N \cdot s$ for donor's erythrocytes and $10 \cdot 10^{-13}$ $m^3/N \cdot s$ for the erythrocytes of winter hibernating ground squirrels.

Studying of the state of erythrocytes membrane ultrastructure using the method of freeze-fracturing permitted to reveal some differences in morphology of erythrocyte of hibernating animal.

UDC 612.592.35: 57.085.1

Computer Morphometric Analysis of Liver Cell Ultrastructure under Cooling

A. S. KAPRELYANTS, L. N. MARCHENKO, R. K. MIGUNOVA

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

Cooling effect on the state of rat liver cell structure was investigated by the methods of transmissional electron microscopy and computer morphometry. Ultrastructural and morphometric characteristics of hepatocytes were studied under the effect of low temperatures *in vivo* and *in vitro*. Experiments were carried-out in 180–250 g Wistar rats. Liver cooling was done by means of original cryoapplicator with various temperatures of probes (–10, –30, –180 °C). Liver tissue for transmissional electron microscopy was fixed in glutar aldehyde and osmium fixators on a colloid buffer. Dehydration was carried-out in ethanol with an increasing concentration in an absolute acetone. Tissue samples were put into epon-araldit mixture of epoxy resins. Contrasting of ultra-thin sections was done by means of the Reynolds' method. Viewing and photographing were carried-out in the transmission electron microscope and under 75 kV accelerating voltage. Morphometric and stereometric analyses were done by means of the "MORPHO-TOOLS" computer system, elaborated at the Department of Cryocytology and Quantitative morphology. Localization, intracellular redistribution and morphometrical characteristics of ice crystals in a frozen liver tissue was visualized in the aceton-glutaraldehyde-uranilacetate medium by the method of freezing-substitution, realized using the original device.

Cooling of liver tissue down to moderately low temperatures (–10 and –30 °C) caused the change in the tubules of endoplasmatic reticulum and some mi-

Матеріал, захищений авторським правом

tochondria. Under deeper cooling (–180 °C) after thawing the damages of both organoids in the hepatocytes cytoplasm (endoplasmatic reticulum, mitochondria, plasmatic membrane) and nuclear cell apparatus were noted. Impairment of blood-hepatocyte barrier is characteristic. Stereometric analysis of rat hepatocytes testified, that volumetric part of their nuclei decreased with the temperature reduction, volumetric part of mitochondria and especially, vacuoles, increased. Volumetric part of endoplasmatic reticulum of rat hepatocyets achieved its maximum value at 30 °C. Electron-microscopic analysis of the samples, prepared according to the freezing-substitution method, allowed to reveal the areas of ice crystals localization in liver cells, which you can see in microphotos as light cavities of various shapes and sizes. According to the data of hepatocytes morphometric analysis in these samples, average values of the squares of ice crystals made 134.5, 1.32 and 0.07 μm under the temperatures of –10, –30 and –180 °C, correspondingly. When freezing liver tissue down to -180C, small intranuclear crystals were revealed. Obtained results of ultrastructural investigations and computer morphometric analysis testified to various cryoresistance of intracellular structures of hepatocytes and other cellular elements of the rat liver tissue.

UDC 57.043: 546.214: 577.11/12

On Some Aspects of the Application of Ozonizing Technologies in Cryobiology and Ozone Interaction with Polymers

V. D. ZINCHENKO, A. V. ZINCHENKO, N. G. KADNIKOVA, A. M. GREK, I. M. KOVALCHUK, Yu. I. GUZIY, S. I. KALMYKOV, O. V. TRETYAK, A. V. KOBZAR, A. N. GAJDENKO

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

Kharkov Military University

Development of cryobiological technologies requires an application of new efficient methods for cold sterilization. This is related to the usage in cryobiology of polymer materials, do not admitting the sterilization by heating. We elaborated an ozone sterilizer, operating in a closed regimen with gas re-circulation through a sterilizational chamber, does not admitting the ozone release into atmosphere. In a sterilizer we used ozone generator on a barrier discharge. Ozone concentration in ozone-air mixture is close to maximally obtained one in the similar dischargers from not dried atmosphere air. Sterilizer also admits the usage of pure oxygen in a chamber, allowing to avoid the presence of nitrogen oxides and organic pollution, capable to get into it out of atmosphere air. Proposed technology for sterilization can be used to treat low-temperature store-houses of a big volume and Dewar vessels, used for cryobiological material storage.

By means of elaborated device we investigated the possibility of plastic containers sterilization by gas-like ozone. Sterilization efficiency was estimated on the microorganisms inactivation. Under room temperature an efficient sterilization of containers was done within 40–80 min.

The notions on the mechanisms of ozone disinfecting effect on bacteria, viruses and fungi are generally based on the suppositions about ozone destroying effect on vitally important enzymes, proteins and membranes. In this connection investigations on ozone interaction with biopolymers are quite perspective. Such investigations are also interesting for various ozonizing technologies, because they can be the bases for selection of such technological parameters as ozone concentration, treatment duration, temperature etc. We investigated ozone effect on a serum albumin in an aqueous solution. Treated with ozone protein solutions were investigated by the methods of differential scanning calorimetry by DASM-4 device. The methods of spectrophotometry (Specord UV Vis device) and spectrofluorometry (Hitachi) were also applied. The maximum of heat absorption peak on melting thermogram for serum albumin significantly decreases and get diffused on the temperature, a strong dependence of ozonizing effect on ozone concentration is revealed. According to calorimetric investigations, during ozonizing process a molecular structure of albumin is destroyed. The character of this effect dependence on ozone concentration is quite similar to concentrational dependence of the efficiency of ozone inactivating action on microorganisms. When analizing fluorescence spectra, it should be concluded, that protein destructive changes after ozone treatment occur with globula destroying up to the level of some amino acids.

Obtained results allow to deeper understand the mechanisms of ozone effect when inactivating microorganisms, these results are very important for selection of such parameters of technological regimens in ozonizing technologies as ozone concentration and treatment duration.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 547.422: 599: 57.043

Effect of Cryoprotectants and Pharmacological Substances on the Recovery Period of Mammalian Organism after Short-Term Cold Effect

V. K. MAZALOV, S. E. OVSYANNIKOV, G. V. KOVALENKO

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

The problem actuality of its search for pharmacological means accelerating the rehabilitation processes is stipulated by the development of pathological reactions, decreasing the resistance of an organism during self-warming after deep hypothermia.

The aim of investigations is to study the effect of pharmacological substances of different classes of compounds of the recovery processes after deep hypothermia caused by an acute cooling. Thereat we estimated the survival and rate of animals' self-warming, dynamics of biochemical, physical and chemical changes in organs and blood within 48 hours of recovery period. The preparations were introduced directly after an organism cooling (the temperature of body nucleus was 19–22 °C).

It has been established that such psychostimulants as sidnocarb and phenamine decrease the animals' survival at the self-warming. Dextran, glucose in various doses do not affect the rate of warming and resistance of animals in this period, but at the temperature of 19 °C even accelerate their death. The PEGs, which statistically and significantly increase the resistance and accelerate the recovery of a temperature homeostasis after deep hypothermia, have the most survived positive effect. At the background of PEG effect there is a decrease in the concentration of malone dialdehyde, cholesterol and bilirubin, the growth of aminotransferase activity in blood serum is prevented. There is the normalization of plasm osmoticity, an ion (Na, K, Cl, Cu^{2+}) and protein composition.

We can consider that the efficiency of PEG is stipulated by its inhibiting effect on LPO processes, membrane stabilizing and anti-aggregated activity of their compounds. Taking into consideration PEG effect on the detoxication, blood rheological characteristics on Ca-channel permeability, it is probable that the changes in an organism during the recovery period after an intensive cooling are stipulated by the impairment of heat homeostasis, those of Ca^{2+} ions and directed by them the membrane pathology.

UDC 547.422

Investigation of Water-Oxyethylated PEO-1500 System by DSC Method

I. B. MUSATOVA, A. V. ZINCHENKO, V. V. CHEKANOVA, E. N. BOBROVA

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

PEO-1500 cryoprotectant, characterized by low indices of osmotic stability, was used for the erythrocytes preservation in cryobiological practice. PEO-1500, monomethyl ether, with the following chemical formula ($CH_3O(CH_2CH_2O)_{35}H$) with higher indices of osmotic stability in comparison with PEO-1500, was synthesized at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine to increase the efficiency of erythrocytes cryopreservation. Methyl ether of ethylene glycol $CH_3OCH_2CH_2OH$ was an initial substance for synthesis. Methyl ether of ethylene glycol (OE MC 1500) is obtained by the following β-oxyalkilation reaction:

$$CH_3OCH_2CH_2OH + CH_2\text{–}CH_2 \rightarrow CH_3O(CH_2CH_2O)_nH$$
$$\qquad\qquad\qquad\quad \backslash\ /$$
$$\qquad\qquad\qquad\quad\ O$$

In the ^{1}H-NMR of oxyethylated product there are the following signals with chemical shifts (in million portions) regarding to an outer standard of tetramethylsylane:

1) $\delta = 1{,}83$. This signal is absent in the ^{1}H-NMR of PEO-1500 and corresponds to methyl group of OE MC 1500;

2) $\delta = 3{,}89$ – signal of hydroxile group;

3) $\delta = 3{,}55$ – OCH_2 signal of OE MC 1500.

By the DSC method the regularities for the formation of glass-like forms, crystallization out of overcooled state, melting of the H_2–OE MC 1500 binary system were established. Such cooling regimens, at which a complete crystallization did not occur and metastable states were revealed under slow heating, were selected. An average rate of the sample cooling was 200 °C/min, the same index for heating made

Матеріал, захищений авторським правом

0.5 °C/min. The samples were put into a preliminarly cooled down to −150 °C calorimetric block and thermograms were recorded under heating with the mentioned above rate. The following peculiarities are revealed in thermograms.

1) Heat consumption jump corresponds to the transition of the part of substance from an overcooled liquid state into a solid-phase one (vitrification during cooling and devitrivication under heating is observed).

2) Exothermic peaks correspond to the processes of non-equilibrium ice crystallization from an overcooled state within the range of average concentrations, as well as polymorphous modification of OE MC 1500 within the range of high concentrations.

3) A wide exothermic peak of ice crystallization under heating in the samples with high water content.

4) Endothermic peak corresponds to a complete melting of the sample.

Basing on thermograms the diagrams of phase and physical states of H_2O–OE MC 1500 system were built and analyzed.

Conducted investigations testified, that under low temperatures H_2O–OE MC 1500 system was more metastable in comparison with H_2O–PEO-1500 one.

From our point of view, a higher metastability of H_2O–OE MC 1500 system is related to general interactions in a solution, resulting in the fact, that mobility of one center more considerably touches other centers, than in PEO-1500 aqueous solutions.

UDC 577.125.33: 591.342.5

Peculiarities of Lipid Peroxidation in Acclimated and Non-Acclimated *Tenebrio Molitor* Larvae

O. K. GULEVSKY, V. V. RYAZANTSEV, O. O. GRISCHENKOVA, L. I. RELINA, A. V. TRIFONOVA

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

Under unfavourable environment conditions the insects are mainly in the state of physiological rest, endogenous adaptive mechanisms are in the base of those, during this rest the majority of organism's functions are minimised or absent during a long period of time. Larvae under the state of deep cold anabiosis exist due to their internal resources without food, water without excretion of digestion products, thus, catabolism processes in the given case prevail anabolic ones. Under these conditions an organism has a sufficient biochemical protection against damage by own products of vital activity. We investigated the process of spontaneous lipid peroxidation in Tenebrio molitor larvae both in the norm and after a cold adaptation.

It was shown, that the level of diene conjugates (DC) in acclimated larvae statistically significantly differed from the control (0.0028 ± 0.0001 and 0.0027 ± 0.0001 opt.units/mg of wet weight, correspondingly), this fact could testify to an active effect of endogenous antioxidants, preventing this product accumulation in cells. The number of malone dialdehyde (MDA) was measured in pM/mg of larvae wet weight and makes 23.2 ± 0.37 in acclimated animals and 22.2 ± 0.49 in non-acclimated ones. During statistical processing of the results of two samples (vials) no statistically significant differences between them were noted, as well as when evaluating the DC quantity. The absence of the difference in DC and MDA levels between two insects groups, being under various temperature conditions, can be explained both by low activity of peroxidative system during their acclimation or a high level of protective antioxidative activity.

With the aim of further elucidation of LPO processes during acclimation of *T. molitor* larvae, as well as revealing of an antioxidative system activity we used chemiluminescence method (CL). By means of this method we measured the maximum chemiluminescence intensity (I_{max}), as well as induced lipid free-radical oxidation of H_2O_2 as a kinetic parameter of chemiluminescence.

Adding of H_2O_2 solution causes a sharp increase of luminescence in a sample, so-called rapid flash. This phenomenon is related to an intensive disintegration of oxygen peroxide under the effect of changeable valence ions, so-called Fenton's reaction. The level of a rapid flash was determined by the number of active oxygen, reacted with luminol with 3-aminophtalate formation, irradiating in a visible spectrum range. It was shown, that the intensity of maximum CL in acclimated larvae was statistically and significantly lower, than in non-acclimated ones ($2\,175.3 \pm 533.6$ and $7\,907.3 \pm 1\,766.8$ rel.units), in this case the term of the intensity decrease of luminescence intensity down to the level of background made about 100s both in acclimated and non-acclimated insects.

An amplitude decrease of the CH maximum when adding homogenates of acclimated larvae can be related to H_2O_2 oxidation in other reactions, for example, under catalase, glutatione-reductase effect, at intensive consumption of active oxygen forms with superoxide dismutase presence or with the presence of such antioxidants as vitamin E. Thus, the differences of CH intensity in acclimated *T. molitor* larvae can be related to an increase of antioxidative protection, caused by their acclimation.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 547.422: 57.043: 611-018.51

Change in Ca^{2+}-ATPase Activity of Erythrocytes Membrane under the Effects of PEO-1500 Non-Penetrating Cryoprotectant, Cooling and Freezing

A. Yu. NIKOLCHENKO, V. P. TYAGILEVA

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

It is known, that structural and functional protein modification of cellular cytoskeleton is the base of the temperature osmotic erythrocytes stabilization to the effect of low-temperature factors. Under physiological conditions the change of intracellular Ca^{2+} concentration is one of the regulatory mechanisms in the structural state of cytoskeleton proteins.

During the process of erythrocytes cryopreservation the state of transport system, in particular Ca^{2+}-ATPase, can be the limiting factor, determining their stability in their freeze-thawing cycle and structural and functional integrity of frozen-thawed cells. Therefore investigation of the role of membrane transport systems during the process of cell stabilization to low-temperature effect is an important theoretical and applied task of cryobiology.

We investigated activity of the Ca^{2+}-ATPase of erythrocytes membrane. The effect of PEO-1500 at 0 and 37 °C, as well as freeze-thawing; the influence of the procedure of cryoprotectant removal out of cellular suspension and the temperature effect on the activity of Ca^{2+}-ATPase of erythrocytes membrane, were investigated. Native erythrocytes, Ca^{2+}-ATPhase of which was determined at 37 °C, were the control. Statistical analysis was done according to the algorithm of Statgraphics Plus statistical software package, when comparing the data the Student's *t*-criterion for independent samples was used.

Obtained results testified, that PEO-1500 interaction with erythrocytes resulted in the inhibition of Ca^{2+}-ATPase activity. Thereat the temperature decrease of cell treatment with cryorpotectant down to 0 °C also certainly contributes into inhibition of given enzyme activity, due to this fact Ca^{2+} ions concentration inside a cell increases, and an increase at 0 °C is significantly manifested. This fact can be an important mechanism when increasing the erythrocytes stability to cryopreservation, because after their treatment with PEO-1500 under 0 °C an increase of Ca^{2+} concentration in cells under given conditions can result in the activation of Ca^{2+}-dependent regulatory systems, modifying the state of cytoskeleton proteins. Revealed inhibition of Ca^{2+}-ATPase of erythrocytes membrane is a reversible process, because after PEO-1500 removal the activity of Ca^{2+}-pump recovers. Given fact is quite interesting in respect of the recovery of functional integrity of cryopreserved erythrocytes after their transfusion into a recipient due to a significant dilution of the cryoprotectant concentration in blood channel.

UDC 57.043: 577.23: 599: 547.422

Comparative Estimation of the Influence of Medium Temperature on the Mammals' Temperature Homeostasis under the Polyglycol Ether Effect

V. K. MAZALOV

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

In order to develop the measures of pharmacological protection of a mammalian organism against the overcooling, caused by an immersional cooling, it is necessary to have the information on the interaction of objective indices of an organism's heat state in a thermoneutral medium when introducing the studied substance and at its cooling.

The aim of this work was to study the effect of ethylene glycol, diethylene glycol, PEO-400, 1000, 1500, 2000 on rat's thermoregulation in a thermoneutral medium and during cooling. The experiments were performed in male rats of 195 ± 5 g weight. During the experiment we recorded the temperature in rectum, muscles, skin, brain. In the group of animals we registered the temperature of liver, heart, arterial and venous blood. One registered an integral curve of electrical activity of spinal muscles. The substances were introduced intragastrically in 15% concentration in the dose of 0.2 g/kg of body mass; to the control animals we did an equivalent volume of starch solution. The effect of the studied series of substances on

Матеріал, захищений авторським правом

rat's temperature and thermoregulatory reactions were studied at the temperature of 21–22; 3; 0.5 °C.

The results of the experiments demonstrated that the temperature effects resulted in a sharp electrical activity of muscles and a decrease in rectal temperature down to 17.9 ± 0.6 °C during 5 min, thereat a statistically significant absence of differences in electrical activity of spinal muscles at the temperature effect of 3 and 0.5 °C was established. The introduction of substances does not cause the augmentation of rectal body temperature in a thermoneutral medium, but increases its value in comparison with the control under cold effect. So, the rate of temperature reduction during 5 min cooling from 3.7 (in the control) slows down to 1.6–0.08 °C/min depending on the introduced substance.

We attempted to analyze the relationship of certain physical and chemical characteristics of compounds (molecular mass, hydration number, distribution coefficient, surface activity, viscosity) with the state of an organism's temperature homeostasis at its cooling. The results of correlation analysis of the data obtained have demonstrated that the cooling rate does not correlate with the hydration number. A statistically significant (at $p < 0.05$) correlation is observed with the other considered properties of substances.

Thus, it has been established that the substance efficiency at the background of cold effect is mainly stipulated by their hydrophobity with the distribution coefficient in the water-octanol system from 2 to 4 and a high value of viscosity.

UDC 535.37: 615.361.014.41: 616.153.962.4

Spectrofluorimetric Investigation of Freezing Effect on Fibrinogen

E. A. ROMODANOVA, V. A. GAVRIK, T. S. DYUBKO

V. N. Karazin Kharkov National University

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

Using the methods of own protein fluorescence and of fluorescent probes the effect of various freezing regimens on spectral properties of fibrinogen solutions was studied.

It has been established, that after freezing the location of fibrinogen own fluorescence spectra does not change, but the additional band in a long-wave part of spectra appears, which is characteristic for proteins with hydrophobic chromophores microenvironment. This can be related to the changes in tryptophanils electrostatic interactions with neighbouring ionogenic groups or environmental dielectric properties. Analysis of fluorescence spectra shape, obtained at various excitation wave lengths (280 and 296 nm), showed that low temperature effect led to a decrease in tryptophanils microenvironment dielectric constant. In this case the ratio between tryptophane and tyrosine residues contribution after freezing does not change, although the freezing leads to fluorescence intensity decrease.

At longer wave excitation (305 nm) a long wave shift is revealed in fluorescence spectra of exposed to freezing fibrinogen, that can result from change in dissociating groups state or in dielectric permeability of indole ring microenvironment. New band appearing in fluorescence spectra after freezing testifies to the second assumption.

Additional information about the protein molecule state is obtained from spectra analysis of fluorescent probes connected with protein, dimethylaminohalkone (DMH) and 4-[N-dimethylaminostyryl]-1-methylpyridinyl-N-toluene sulphonate (DSM). After freezing an increase in Stocks' shift ($\Delta\lambda_{max}$) of connected with protein DMH spectra is observed, that characterises the increase in life time of probe exited state in medium with low viscosity. As DMH is sensitive to water molecules presence, such effect can be explained by the enhancing of motility and number of water molecules in probe closest microenvironment. The analysis of DMH fluorescence spectra shape by intensity ratio at 485 and 542 nm showed that after freezing an decrease of long wave component contribution in total spectra is observed.

Analysis of DSM fluorescence spectra shape in fibrinogen water solution testifies to main contribution of probe molecules sorbed on protein surface to total spectra. Furthermore, we have found in spectra another two components, which values of inhomogeneous broadening parameters allow to refer them to probe located in protein non-polar zones.

Rapid freezing results in an intensity decrease of DSM fluorescence in fibrinogen solutions without change in spectra maximum location. In this case the interaction of DSM with protein molecules is characterised by kinetic dependence and probe spectra parameters became stable just in 70–90 min after probe addition to protein solution. The kinetic curves course also depends on protein solution freezing rate which affects the properties of probe binding centres. Spectra shape analysis of DSM fluorescence in protein solutions showed that fibrinogen spectral changes after the rapid freezing (about 200 °C/min) were less expressed

Матеріал, захищений авторським правом

comparing with the slow one (1–3 °C/min) and were mainly referred to some redistribution of probe among the sorption centres.

Thus, when summarising the results obtained we can assume that fibrinogen solutions freezing results in irreversible change of its macrostructure, which depends on cooling regimen. Thereat the polarity of protein chromophores environment and surface properties of macromolecules changes.

UDC 616.361.014.41: 611.018.46

Cryorenewal of Bone Marrow and Apoptosis: Hypotheses and Reality

V. I. GRISCHENKO, E. I. ALEKSEYEVSKAYA, V. I. VASCHENKO, T. N. VASCHENKO, T. K. BORISOVA

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

Military Medical Academy, St. Petersburg

R&D Institute of Virus Preparations of Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

Studies of fundamental problems of cryobiology and cryobiology of recent decades (Grischenko V. I., Oboznaya E. I., Pankov E. Ya, 1989) confirm the importance of the phenomenon of cryórenewal of biological objects. However under cryopreservation different damaging factors affect bone marrow (BM) cells and by this they cause cellular death on apoptosis type. Dynamic interaction of these two processes lay in the base of the integrity of therapeutic efficiency of human BM (Grischenko V. I. et al., 1989; Obukhov D. A., 1992).

However the picture of strong hierarchical sequence of interaction of cryorenewal and apoptosis is disordered when studying the state of cryopreserved cells of BM. It is clear, that post mortem changes in tissues and blood components cause unfavourable effect on the integrity of main functions of BM cells in particular on proliferative activity of stem cells reducing their potentials to recovery of hemopoiesis in patients (Vaschenko V. I. et al., 1998).

Results of experiments carried-out by us when studying the activity of topoisomerases in the cells of post mortem BM after thawing, show that structural integrity of DNA impairs and in a significant extent depends on applied cryoprotectant. It should be highlighted the following facts. First of all, in thawed cells the activity of topoisomerases I increase both in nucleus and cytoplasm. Secondly, the activity of topoisomerases II rises statistically significant only in plasm. Probably it should be taken into account that considerable part of investigators refers structural role during the formation of chromosome to topoisomerases II (Getsenberg R. H. et al., 1991; Watt P. M., Hickson I. D., 1994; Wigley D. B., 1995). In addition, we know that according to modern notions for normal functioning of topological structure of superspiral DNA (ssDNA) the balance between the level and the ratio of topoisomerases I and II should be maintained. Therefore one can suppose that the absence of two-phases of titration of supercoils in the cells of frozen post-mortem BM is explained by blocking of the functions of topoisomerases II. It should be noted that the absence of two-phases of ssDNA in frozen-thawed post-mortem BM we have found when using PVP and PEO-400 as cryoprotectants, but not for DMAC and DMSO. Since on chemical structure the studied cryoprotectants are quite different, then it would be correct to consider this as phenomenon, requiring further detailed studying. Also one can exclude that during transplantation of frozen-thawed post-mortem BM to patients its proliferative activity is recovered as a result of correcting the structural activity of topoisomerases II, that is the formation of modified (cryorenewed) population of stem cells in transfused component.

Change in the activity of topoisomerases and state of ssDNA of post-mortem BM after 5 years' storage at −196 °C ($n = 7$)

Regimens of object treatment	Studied indices						
	Proliferative activity of BM, relative units		ICI of ssDNA (γ/γ_0 at 4 μg/ml of EB	Activity of topoisomerases, % to the control			
				1st type		2nd type	
	CFU-GM	ClFA		in nucleus	in cytoplasm	in nucleus	in cytoplasm
Native BM	43,0 ± 7,0	98 ± 10	1,43 ± 0,02	100	100	100	100
Before treatment	37,0 ± 3,0	77,0 ± 8,5	1,31 ± 0,02	86,5 ± 12,5	119 ± 9,5	88,3 ± 7,4	105 ± 8,4
After thawing	18,0 ± 3,5**	73,0 ± 7,5*	1,23 ± 0,02	127,4 ± 17,3*	136 ± 21,5*	85,7 ± 7,2	117 ± 8,8*

Notes: * — differences are statistically true in respect of the indices of native BM ($p < 0.05$); ** — $p < 0.01$; ICI — index of conformational intensity; ClFA — cells' cluster forming ability.

Матеріал, захищений авторським правом

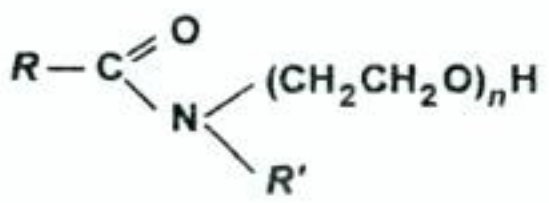
UDC 547.298.1.422/426: 57.043.085

Structure and Cryoprotective Properties of Oxyethylated Alyphatic Amides

L. A. KHANINA, V. S. CHEKANOVA, A. V. NIKOLENKO, A. M. KOMPANIETS

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

A high stability of rat brain cells under their cryopreservation with oxyethylated N-acetylamide as a cryoprotectant, as well as recultured cultures when freezing with polyethyleneoxide and oxyethylated (OE) glycerol derivatives were the ground for investigation of cryoprotective activity, cytotoxicity in systematic rows of OE amides:



With this aim OE amides with various length of the oxyethyl chain ($n = 3–10$) and different alyphatic radicals of nitrogen atom, which are the derivatives of formic acids: $R = CH_3$, H; $R' = H, COCH_3, CF_3$ were synthesized. Cytotoxic and cryoprotective properties of the mentioned amides were studied in the cells of rat's brain, platelets, and cultured cells of calf kidneys, kidney of pig embryo.

It was established, that irrespectively to the bioobject, cytotoxicity is stipulated by the nature of the radical, bounded to nitrogen atom of the immune group and in a less extent is determined by the length of oxyethyl chain.

Substitutive agent introduction into nitrogen atom both with donor's (CH_3, C_2H_5) and acceptor properties ($COCH_3$, CF_3) caused an increase of cytotoxicity, lengthening of oxyethylene chain resulted in a decrease of the following index.

Cryoprotective activity of OE amides is significantly determined by the molecular-mass distribution. It was shown that in the series of amide adducts, such as OE N-acetylethanolamine ($R = CH_3$, $R' = H$) and OEN-acetamide ($R = CH_3$, $R' = COCH_3$) possessed the highest cryoprotective activity on the calf kidney cells, the cell integrity of calf kidney after freezing made 95 ± 2 and $87 \pm 2\%$, correspondingly.

The highest indices of the platelets stability were obtained after their freezing with OE N-acetylethanolamine solutions in plasm. In average 88% of blood platelets were kept in the samples, their retractile activity made $80 \pm 2\%$, in respect of the response to hypotonic shock — $35 \pm 2\%$, ADP-aggregation was $10 \pm 1\%$. The absence of manifested cytotoxic effect of OE N-acetylethanolamine solutions on the morphofunctional properties of platelets before freezing in comparison with other investigated amides, was established. For kidney cells of pig embryos and bone marrow the adduct of N-acetylethanolamine with polymerization degree of $n = 3–4$ is the most efficient cryoprotective substance.

The presented results testified to the perspectiveness of investigations, directed to the application of OE amides as cryoprotectants when freezing different biological objects.

UDC 547.42: 612.592: 577.352.2

Effect of Cryoprotectants and Low Temperatures on Structural State of Model Phospholipid Membranes

E. A. DOMANOV, G. P. GORBENKO, T. S. DYUBKO

V. N. Karazin Kharkov National University

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

In spite of a considerable progress in the understanding of low temperature effect mechanisms on cellular membranes, the question on the character of the modulation of low temperature membrane effects by the substances with cryoprotective properties, in particular organic solvents has remained unsolved. The aim of the work was to investigate the effect of 1,2-propylene glycol (PG), glycerol (Gl) and dimethylsulfoxide (DMSO) on structural organization of modeled phospholipid membranes using the method of inductive-resonance energy transmission.

Liposomes were derived from an egg phosphatidylcholine by the cholat-dialysis method. *n*-terphenyl and pyrene fluorescent probes, being localised in nonpolar membrane area, were used as donor and acceptor of energy. The obtained experimental data were analysed within the frames of the model, describing the energy transfer between donors and acceptors, which are uniformly distributed in a membrane layer of certain thickness d_m. In this case a relative quantum release of donor is determined by the ratios:

Матеріал, захищений авторським правом

$$Q_r = \frac{Q_{DA}}{Q_D} = \frac{2}{d_m} \int_0^{1/2 d_m} \int_0^{\infty} \exp(-\lambda)[I(\lambda)]^N \, d\lambda \, dd_c,$$

$$I(\lambda) = \frac{1}{R_d^2 d_m - 1/12 d_m^3 - d_c^2 d_m} \times$$

$$\times \left\{ \int_0^{1/2 d_m - d_c} \exp\left[-\lambda (R_0/R)^6\right] 4R^2 dR + \int_{1/2 d_m - d_c}^{1/2 d_m + d_c} \exp\left[-\lambda (R_0/R)^6\right] \left[2R^2 + R(d_m - 2d_c)\right] dR + \int_{1/2 d_m + d_c}^{R_d} \exp\left[-\lambda (R_0/R)^6\right] 2 d_m R \, dR \right\},$$

where Q_D, Q_{DA} is a quantum donor release at the acceptor absence and presence, correspondingly; $\lambda = t/\tau_D$, τ_D is the life time of donor's fluorescence at the acceptor absence; N — a number of acceptor molecules in a globular layer, out of which limits there is no energy transfer; $N = C_A^v V'$, C_A^v — acceptor volume concentration, d_c — distance of a donor from the bilayer centre.

As the analysis of the data presented in the Table shows, the introduction of PG, Gl and DMSO results in an increase of thickness of membrane layer accessible to non-polar molecules of *n*-térphenyl and pyrene. It can be stipulated by a decrease in dielectric permeability of polar field of lipid bilayer due to the substitution of hydration water by cryoprotectant molecules. An increase in d_m value was also observed at liposome freeze-thawing. DMSO and Gl introduction was accompanied by a considerable weakening of this effect, and at PG presence there was the reduction of d_m value. The data obtained testify to a different character of the studied cryoprotectant effect on lipid bilayer polarity.

Relative change in thickness of the layer, accessible to acceptors, under the effect of cryoprotectants and freeze-thawing, %

Cryoprotectors			Freeze-thawing		
20% PG	20% Gl	20% DMSO	20% PG	20% Gl	20% DMSO
29	33	95	−24	48	14

UDC 591.436.2.81: 599.323.4: 616.12-008.331.1

Role of Physical and Chemical Factors of Medium in the Stability of Rat Isolated Hepatocytes to Hypertonic Stress

V. A. BONDARENKO, V. A. KOPTELOV, S. N. LEZHANIN, T. P. SEREDA

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

The effect of sodium chloride hyperconcentrations, temperature and *pH* on the stability of rat isolated hepatocytes was investigated in the given work. For the modeling of freeze-thawing conditions hepatocytes behaviour was studied under hyperosmotic concentrations of sodium chloride solutions under the temperatures of 0 and 37 °C and different *pH* values (6.0–8.0). Sodium chloride solutions of the following concentrations (Mol/l): 0.15; 0.35; 0.55; 0.75; 0.95; 1.2; 1.8; 2.4; 3.0 were used in experiments. Solutions were prepared by means of 0.01 M phosphate buffer. To 3 ml of each sodium chloride solution $1.6 \cdot 10^6$ cells/ml of the incubation medium were added, incubated within 10 min under the mentioned above temperatures. Then the samples were centrifuged under 1 000 rot/min within 2 min. Cell viability was estimated on the release of lactate dehydrogenase marker enzyme into incubation medium.

During experiments it was revealed, that dependence of cell viability on sodium chloride concentration had non-linear character. In contrast to erythrocytes, which viability insignificantly decreased linearly within the whole concentration range, the same dependence for hepatocytes had principally another character: marker enzymes release remained practically unchangeable up to a certain point (location of those depended on the temperature and *pH*), then it sharply decreased.

With the temperature increase the starting point of an intensive release of marker enzymes shifts into the range of lower concentrations. The presence of calcium in a medium manifested a side effect. Besides, *pH* value in the incubation medium has a great importance. Under *pH* value of 6.0 the release of marker enzymes is practically absent within the whole investigated concentration range. With *pH* growth the starting point of intensive release of marker enzymes shifted into the range of lower NaCl concentrations. Damaging effect of the media with a high *pH* value is partially removed by means of hypothermia, however

Матеріал, захищений авторським правом

the character of cytolysis dependence on the medium osmotic pressure remained to be unchangeable.

Considering the following results, we can conclude the prinicipally another mechanism of hepatocytes interaction with hypertonic medium in comparison with the erythrocytes, characterized by such a response as "everything or nothing". Obviously, hepatocytes as more complicated nuclear cells have the capability to regulatory changes of the volume, allowing to avoid the cell death up to a certain limit of hypertonic effect.

UDC 612.592.82: 616.15.831-002: 612

From Fractal Dimensions of BBB of Cooled Brain To Functional Geometry of Physiological Systems of an Organism

V. S. MARCHENKO, G. A. BABIJCHUK, L. V. POLYSCHUK, L. M. MARCHENKO

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

Existing neurotransmitter conceptions of central thermoregulation explain quite convincingly the most intimate neurophysiological processes. However in any model till now the activity and ultrastructural state of BBB was taken into consideration, there was no aim to find the cause, but not mechanism of neuromediator action, that is to answer the question "why?", but not "how?". Besides, why norepinephrine (NE) takes part in the support of current thermoregulation processes, meanwhile acetyl choline (ACh) triggers homeostatic mechanisms of thermogenesis, but not vice versa? It is proposed to consider this problem in the plane: order-chaos, where it would be expedient to use fractal approach (estimation of fraction dimensions).

Fractal analysis of experimental massive as for the effect of cooling on neurophysiological processes, accumulated by us during recent decade has shown, that: a) structure and dynamics of NE-ergic processes (secretion and capturing of NE, ultrastructural distribution of adenylate cyclase and the level of cAMPh, kinetics of NE-receptors, ultrastructure of NE-vesicles of synapses) are scale-invariant, have fractal measuring units ~1.3, Hirst index $H > 0.5$ (these factors are persistent, so they provide supporting tendencies in central mechanisms of thermoregulation); b) cholinergic processes (release of ACh, calcium exchange, cGMP, ultrastructure of ACh of vesicles of synapses), scale-invariant, fractal dimensions ~1.7 ($H < 0.5$), that is these processes are anti-persistent. Thus it is clear, why NE-ergic processes support dominating thermoregulatory tendency, and ACh-ergic contribute to the change in heat production and convective heat. But why the geometry of NE functioning of NE and ACh is fractally opposite?

By radioisotopic, electrophysiologic and electrone histochemical methods a functional state of BBB of rats under trigger hypothermia was studied. It has been shown BBB is of fractal origin, which is initiated by the processes of the type of long-term potentiation, that is supported by "neuronal gas" (NO, CO). These monoxides stipulate reverbation of BBB permeability, aggregation of pinocytosic vesicles, hydration-dehydration and others fractal phenomena in endotheliocytes of brain capillaries and their neuroglial environment. So, the penetration of bioactive substances through BBB (afterwards NO and CO) in the first approximation is the movement of gas along labyrinth in porous medium, which can be described in terms of precolation theory. Threshold of permeability can be associated with the one of leaking, its rising under hypothermia is characterised by relatively narrow maximums (2–3 min) during which systemic introduction of vegetotropic substances gives central effect. Macrogeometry near the threshold of percolation has fractal dimensions. Directly before a sharp increase in BBB permeability a special (fractal) structural and functional state of brain is also created. BBB permeability increase when geometry of endotheliocytes, synapses, bioelectric and neurochemical activity synchronises. These structures and processes gain similar dimensions (~1.7 or ~1.3) at the reduction of BBB down to ACh or NE, correspondingly. According to our data the relationship NE and BBB provides NO, and ACh — CO, then significant difference in the duration of existing of these monoxides can stipulate the extent of "foaming" of space-time patterns of brain, hypo- or hyperactivity of an organism. Besides, using fractal regimens of hypothermia it is possible to reduce epilepto-formic manifestations and even make closer electrogenesis of surviving slices of rats' brain to the one of hibernators (by the criterion of ultraslow biocurrents).

Thus it can be supposed that this or another role of biogenic amines in central thermoregulation is related to BBB permeability, that is determined not only by neurotransmitter mechanisms, but also physical properties of substrate of cooled brain (the processes of percolation type with displacement, which naturally generate fractal structures).

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 611-018.46: 547.42: 57.085.2

Osmotic Behaviour of Mouse Embryos and Bone Marrow Cells in Cryoprotectant Solutions

L. F. ROZANOV, Ye. I. SMOLYANINOVA, V. S. KHOLODNYY

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

Investigation of osmotic behaviour of various types of cells and cell volume changes kinetics in experiments, modelling various cryobiological situations, is of great interest both for experimental biology and practice. From one side it allows the studying of biophysical parameters, determining the cells specific responses to cryopreservation medium factors, and from another side it allows more profound understanding of processes of mass-exchange between cell and its environment, the revealing of role of various cell compartments in its osmotic response, and by this making the base for scientific forecasting of conditions of cryopreservation procedure optimisation.

In this work we have investigated microscopically the osmotic behaviour of mouse 8-cell embryos and bone marrow cells in hypertonic solutions of cryoprotectants such as glycerol, 1,2 propane diol (1,2 PD) and dimethyl sulfoxide (DMSO).

By comparing the experimental dependencies of kinetics of relative volume changes for individual cells with relative volume time dependencies obtained by means of solving the equations of irreversible processes thermodynamics (Kedem–Katchalsky) we have determined the membrane permeability coefficients for water and cryoprotectant molecules of 8-cell embryos and bone marrow cells from cell fraction with diameter of 8–10 μm.

It is shown that with increase in concentration from 1.5 up to 4.2 M its permeability coefficient at 18 °C decreases from $5.245 \pm 0.91 \cdot 10^{-8}$ down to $3.47 \pm 0.43 \cdot 10^{-8}$ m/s. In several cases in 30% glycerol solution the blastomeres recover their volume abnormally rapidly and then swell.

In contrast to 8-cell embryos the bone marrow cells did not even survive after the contact with 1 M glycerol solution, with swelling to the sizes, exceeding the initial ones in 1.5 times. That is why the estimation of membrane permeability coefficients of these cells for glycerol was carried-out in 0.75 M solutions. But even in this case the cells with diameters more than 8–10 μm were damaged.

The permeability coefficients of bone marrow cells membrane for glycerol, 1,2 PD, DMSO in concentrations of 0.75, 1 and 1 M, correspondingly, were 0.94 ± 0.13, 11.83 ± 0.11 and 6.92 ± 0.08 (10^{-8} m/s). The data obtained testify that the cause of the bone marrow cells increased sensitivity to contact with hypertonic cryoprotectant solutions can be its plasmatic membrane low permeability for cryoprotectants.

The analysis of dynamics of changes in cryoprotectant and electrolytes intracellular concentration shows, that saturation of cells with cryoprotectants occurs in the first minutes of its exposure in cryoprotectant solutions. Effect of high concentrations of cryoprotectant and non-penetrating intracellular electrolytes can be the cause of the cell damage both at stage of equilibration and at stage of thawing, by creating the high transmembrane gradients.

UDC 615.38.013.12: 612.592

Effect of Perfluorethane on Some Functional Properties of Human Spermatozoa under Hypothermia

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

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

In auxiliary reproductive technologies the cells stored under hypothermia have found more and more frequent usage. The ways, directed to an increase in functional activity of thawed cells, gain a special actuality in this connection. Usage of gas-transporting media on the base of perfluor-carbonic emulsions in biology and medicine is substantiated, first of all, by the possibility to stimulate the respiration process as a basic source of energy and integral index of cell viability. Gas-transporting perfluor-carbonic blood substitute "Perfluorethane" (PF) is the most widely applied in biological and medical aims.

The aim of this work was to study the effect of perfluorethane on functional characteristics of human spermatozoa under hypothermic storage. This preparation effect on cells was determined on fixing the maximum motility of spermatozoa under varying of PF content in suspension. In connection with ob-

Матеріал, захищений авторським правом

tained by us adata one can conclude that 40% in respect of the volume can be considered as effective working concentration of PF in suspension.

Looking for the character and duration of cell motility in the control of hypothermic storage allowed to establish that in 24 hrs in the control all cells were immotile. In the suspension, containing PF in selected concentration, single motile spermatozoa on the background of a big number of locally swinging cells were found. For the activation of stopped cells we used pentoxifylline, which is widely applied in auxiliary reproductive technologies at the stages of sperm preparing to artificial insemination.

Adding into the medium of 3.5 mM of pentoxifylline resulted in the activation of spermatozoa motility in PF-containing ejaculates. The cells in control suspension at the same effect remained immotile. Activated using pentoxifylline spermatozoa kept a high motility within 6 hrs, that permitted to prolong a total incubation time up to 48 hrs. Replacing semen plasm to Henks solution increases the survival of cells in the control up to 48 hrs. In Henks solution, containing 48% PF, spermatozoa preserved the viability within 77 hrs. Introduction of 3.5 mM pentoxifylline into the medium after 77 hrs of incubation as in previous series of experiments, did not lead to cell activation in the control. However in perfluorethane-containing suspension the cells increased their motility up to the level of corresponding initial one, that enabled to fix a complete stopping of spermatozoa only after 102 hrs' incubation.

Considered experimental data point that PF effect on the motility of human spermatozoa significantly enhance the survival of cells in suspension under hypothermia.

Матеріал, захищений авторським правом

Section 2
ACTUAL PROBLEMS OF CELLULAR AND TISSUE TRANSPLANTATION

UDC 616-089.843: 611.013.85.018.5

State of Lymphohemopietic System in an Organism after Transplantation of the Products of Fetoplacental Complex

A. N. GOLTSEV, M. A. MIKHALIN, L. V. OSTANKOVA, T. G. DUBRAVA, E. D. LUTSENKO, I. V. RASSOKHA, A. Yu. GORSKAYA

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

Estimation of the level of human placenta homogenate (HPH) effect on the state of lymphohemopoietic complex (LHPC) in the recipients with various initial statuses was the aim of the given work. Under complex transplantation of HPH and syngenic bone marrow (BM) to the recipients with hemopoiesis aplasia an increase of hemopoietic activity in a myelotransplant has been established. Stimulating effect of HPH extended to various bases in the recipient's hemopoiesis and manifested in different value. Regulatory activity was manifested both in respect of colony-forming units in spleen (CFUs) and hemopoietic cells, located in a medullary (bone marrow) region of hemopoietic system. Analysis of the results also testified that regulatory cytokines of HPH stimulated CFUs activity at various differentiation levels, i.e. CFUs8 and CFUs12. Thereat a certain dose-dependent effect is observed.

For simultaneous estimation of hemato- and immune modulating activity of HPH an experimental model of the pregnancy spontaneous abortion, initiated by the injection of exogenous immune-competent cells and characterized as graft-versus host reaction (GVHR) was selected. Developed immune conflict is interpreted as autoimmune pathology, characterized both as immunological tolerance abolition and expansion of autoantigens in an organism. GVHR development was induced in pregnant CBA mice by intravenous injection of mother's lymphoid cells sensibilized to the father's line antigens (C57B1).The reaction intensity was estimated on such an integral index as pregnancy spontaneous abortion and the state of LHPC cells. Obtained results testified, that the injection of effector-cells (EC) was accompanied with spontaneous abortion in the majority of mice within the period from the 9th to 11th day. Transplantation of native HPH increased the number of mice with the pregnancy outcome after EC injection, similar to the physiological pregnancy course. Cryopreserved HPH occurred to be less efficient when preventing an immune conflict development.

Estimation of phenotypic characteristics of immune-competent cells showed a sharp decrease of SD8 lymphocytes in spleen during pregnancy and an increase of cell content with the markers of T-helpers in comparison with the indices of animals with physiological pregnancy course (PPC). Such changes were accompanied with a significant increase of immune-regulatory index, characterizing the development of immune-conflict situation. At the same period the percentage of CD4-cells in regional lymphonodes, where during PPC the ratio of regulatory T-cells should be maintained at a certain level, significantly increased. HPH injection promoted to an increase of CD4 and CD8-cells, however the dynamics of growth in the recent ones was manifested considerably higher. In spite of the fact that to the 13th day IRI in the mice of given group did not achieve the PPC level, it was significantly lower, than under spontaneous abortion. It was established, that cryopreserved HPH possessed a lower T-suppressory-activating potential in comparison with native HPH. In the given experimental model it was shown, that HPH modulating activity affected not only immunocompetent sphere, it also activated the process of cell proliferation both in spleen and bone marrow. To the 12th–13th day the cellularity in spleen increased by more than 3 times, in bone marrow this index increased by 1.6 times in comparison with the indices in animals with induced GVHR.

HPH injection to the mice with PPC also is accompanied with manifested changes in the cellularity of LHPC organs. Stimulation effect of medullary hemopoiesis (by 1.6 times in comparison with PPC), however a slight inhibition of the proliferation process in spleen was observed. Simultaneously a significant decrease of thymus and lymphatic nodes cellularity in comparison with PPC was noted. Thus, deviation from "physiological" level of placental cytokines at PPC after the injection of exogenous HPH causes not distinct changes in the state of LGPC in pregnant mice. Immunotropic effect of cryopreserved HPH both during the application of the model with syngenous BM transplantation and one when preventing spontaneous abortion, was less manifested in comparison with native HPH, that can occur due to the change of quantitative (death) and qualitative (decrease of functional activity) parameters of being injected cytokine-producing placental cells after cryopreservation.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 615.361.36.013.014.413: 57.085.1

Function of Cryopreserved Human Embryonic Liver Cells in *In Vitro* System and under Experimental Transplantation

A. Yu. PETRENKO, O. V. OCHENASHKO, N. N. MOISEEVA, N. G. SKOROBAGATOVA

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

Human embryonic liver cells (ELC) due to a high content of stem cells can be widely applied in clinics for treating hematological and hepatic diseases. To evaluate the ELC clinical efficiency it is necessary to elaborate the method for their cryopreservation, to establish low-temperature bank and determine the viability and functional activity of frozen-thawed suspensions.

The aim of this work was the investigation of the viability, colony-forming activity of freshly-isolated and cryopreserved human ELC, as well as the effect of their transplantation on the indices of hemopoiesis, intensity of lipid peroxidation (LPO) and the state of rat liver with an acute liver insufficiency. ELC were isolated from human embryos of 7–12 gestation weeks. Cryopreservation was carried-out under DMSO protection using a three-stage freezing program and stored in low-temperature bank at –196 °C no less than 1 month. Before and after cryopreservation the number of cells in a suspension, their viability (by staining with vital dyes), colony-forming activity were determined. Calculation of colony forming units (CFU) and claster-forming units (ClFU) was done to the 10th day after culturing with semi-solid media on a feeder layer, comprising leukocytes from adult donors. Frozen-thawed suspension of ELC ($1 \cdot 10^7$ cells) was transplanted into a spleen pulp of 180-200g rats with an acute liver insufficiency, modeled with both 70% hepatectomy or acute poisoning by CCl_4. Blood state, detoxicational liver function, the level of peroxidative processes in blood serum, as well as the rate of liver regeneration on ^{3}H-thymidine inclusion into DNA were evaluated.

Freshly isolated initial suspension of ELC was characterized with a high viability and proliferative activity, evaluated on ^{3}H-thymidine inclusion into DNA. Cryopreservation decreased the cell viability by 15–20%, however it did not affect the colony forming activity. Transplantation of human ELC to experimental animals resulted in the stimulation of liver regeneration after a partial hepatectomy, accompanied with a rapid recovery of its detoxicational and synthetic functions. Transplantation of cryopreserved ELC to the rats with liver pathology, causing both suppression or induction of lipid peroxidation processes, decreased the level of LPO products, that testified to antioxidative effect of the injected cells. Investigation of the erythrocytes and hemoglobin content showed a rapid hemopoiesis recovery after an acute blood loss.

Thus, cryopreserved human ELC of 7–12 gestation weeks are characterized by a high viability and colony-forming activity, as well as manifest antioxidative effect, stimulate liver regeneration and hemopoiesis when transplanting to the animals with acute liver insufficiency and pathology of hemopoiesis system.

616-089.843: 612.119: 612.419(477)

The Problems of Hemopoietic Cells Transplantation in the Ukraine

V. G. BEBESHKO, Zh. M. MINCHENKO, G. T. GLUKHENKA, N. M. TSVETKOVA, I. A. KRYACHOK, E. E. KARAMANESHT, N. M. BILKO, V. I. KHOMENKO, I. S. SKORENKOVA, V. G. CHUJSKY, T. A. KALINICHENKO, O. V. KUCHER, O. L. NAUMENKO

Scientific Centre of Radiational Medicine of Academy of Medical Sciences of the Ukraine, Kyiv

Centre of Transplantation of bone marrow, State Administration of Health Care, Kyiv

Every year about 7 500 people in the Ukraine suffer from leukemia and lymphoma. Recently an increase of oncohematologic pathologies, stipulated the necessity to introduce new therapeutic methods, as well as hemopoietic stem cells transplantation. The Center for Bone Marrow Transplantation in Kiev, established in April 2000 at the base of Research Center of Radioactive medicine of the Academy of Medical Sciences of the Ukraine is the first establishment in the Ukraine with modern special apparatuses and experts, prepared for the work according to the world methodological requirements.

The center carries-out autologic transplantations of stem cells from peripheric blood (PBSC) at myeloma, lymphogranulomatosis, lymphomas, breast cancer etc. The principles for preparing to PBSC transplantation in adults and children with hemopoietic organs diseases have been elaborated, the protocols of patients monitoring in pretransplantational period, as well as the methods for prophylaxis and treatment

Матеріал, захищений авторським правом

of posttransplantational complications, have been substantiated, the system of immunogeneic monitoring of donors-recipients for allogeneic and autologous PBSC transplantation was worked-out. Treatment protocols of the patients with oncohematological pathology using high-dose consolidation and following transplantation of autologous hemopoietic stem cells (HSC) were introduced into practice. Each month 3–4 PBSC transplantations to the patients with the mentioned pathology are carried-out.

Autologous PBSC are obtained by means of COBE Spectra apheresis system (2–3 times) after the hemopoiesis stimulation by means of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) in 5–10 μg/kg dose within 5–7 days. The number of the obtained mononuclear cells varies within the limits of $3.0–10.3 \cdot 10^8$/kg of the patient's mass. The content of CD34+ cells is measured in the product of hemopoietic stem cells, 1–4 aphereses to obtain the total number of CD34+ cells not less than $2 \cdot 10^6$/kg the patient's mass were done.

Under HSC autologous transplantation the obtained material requires the further long-term storage. Systemic programmable cell cryopreservation by means of Nicool Plus freezer (the 7th version) has certain advantages when solving this problem, the experience of this program application is a unique in the Ukraine. The control of the cells' biological integrity and freezing program is carried-out when thawing satellite samples with the transplant cellular suspension. Storage term of HSC makes 21–48 days. The results of comparative estimation of such indices as cell viability under 0.1% trypane blue staining (92–97%), an absolute number of the obtained cells and mononuclear content ($4–10 \cdot 10^8$/kg of mass), content of CD34+ cells in a transplant ($2–6 \cdot 10^6$/kg), quantity of GM-colony-forming units *in vitro* or *in vivo* before freezing and after thawing ($10–22 \cdot 10^4$/kg of mass) demonstrated that programmable cryopreservation under 7.5–8.0% DMSO protection provided an adequate quality keeping of HSC transplant and proliferative activity of stem cells. Transplant retention in all patients to the 11th–13th day after autologous HSC transplantation was a clinical confirmation of this fact.

Thus, there is an integral material and technical center for the conducting of HSC transplantation with the number of 30–50 operations within a year. The necessity of systemic improvement of diagnostical and therapeutical base of hematological and oncological services, allowing the increase of the efficiency of such patients treatment using HSC transplantations, remains as a main problem.

Experience of Cryopreserved Embryonic Tissue Application When Treating Some Diseases of Nerve System

V. G. CHERNENKOV, V. G. ZADOROZHNY, N. N. BROVINA, A. V. SHATILLO

Institute of Neurology, Psychiatry and Narcology of the Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkov

The aim of this investigation was a comparative analysis of the results of cryopreserved embryonic tissue application when treating different diseases of nerve system.

We applied the certified cryopreserved preparations of biological tissues, obtained from the Ukrainian Bank of Biological Objects of the Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine.

When treating brain diseases from pathogenetical positions the most preferable is an intracranial grafting of nerve tissue transplant. In cases when disease genesis is related to a primary damage of internal organs (for example, primary enzyme defect in liver at hepatocerebral dystrophy) an intravenous introduction of liver embryonic cells is expedient. We have developed and applied new ways for technical realisation of transplantation and certain variants for treating some slightly curable diseases of nerve system.

When treating by embryonic tissues a special attention was paid to a strict meeting of international biomedical and ethical norms and the Law of Ukraine on Transplantaton. In each case of transplantation operation the patients gave an informed consent for applying this treating method. We have the experience of treating 197 patients with neurological pathology since 1991 till now. We studied clinical efficiency of embryonic tissue transplantation by means of special quantitative and semi-quantitative methods at parkinsonism, Wilson–Konovalov disease, generalised forms of epilepsy, nerve system demyelinising diseases, some hereditary-degenerative diseases, as well as at the treatment of brain glial tumors after their radical removal. Normally, patients endured well the transplantation operation, their state remained relatively satisfactory or of average severity. We revealed the presence of distinct positive clinical result in all observations with different extents of resistance and manifestation. No aggravations of clinical disease course and serious complications were observed. Taking into account the fact, that the given method was applied in the patients with the resistance to a long-term applied traditional ways of treatment, the result could be estimated as a positive and reassuring one.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 611.013: 616.047

Theoretical Substantiation and Practical Results of the Application of Embryonic Preparations in Clinical Practice

G. S. LOBYNTSEVA, I. A. VOTYAKOVA, E. M. KLIMOVA

"Embryotek" Medical Center for Cellular and Tissue Therapy, Kiev

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

Application of embryonic preparations in medical practice has significant theoretical preconditions, stipulated by the presence in embryonic tissues of embryo-specific growth factors, cytokines and a big number of signal macromolecules, playing in embryogenesis the role of inductors for growth and regeneration processes. Embryonic preparations comprise stage-specific proteins and low-molecular peptides, as well as α-fetoprotein, changing the apoptosis intensity; antioxidants, adaptogens, antiinflammatory bacteriostatic compounds, interleukines, stimulating immunogenesis. High efficiency of these cells is explained by these properties when treating the septic states in surgical and gynecological practice.

Strong immune-correcting and immune-modulating effects, revealed when transplanting the embryonic hemopoietic cells (EHC) and preparations of fetoplacental complex, deserve a special attention; these effects allow to use them when treating the diseases, related to hemopoiesis impairments, as well as with autoimmune component and immune-deficient states (Diabetes mellitus, Parkinson's disease, myastenia, myopathy, amyotrophic lateral sclerosis etc.).

The mechanism of hemopoietic cells therapeutic effect is related to the inhibition of autoimmune processes basing on the immune regulation recovery, activation of insulin-like factors for the regulation of carbohydrate and lipid metabolism, general stimulation of protein synthesis, recovery of the receptor initiation of immune competent cells, as well as metabolism processes in an organism. Injected into adult organism embryonic hemopoietic cells of early gestation terms (up to 12 weeks) retain in it, keep their capability to repopulation, do not possess immunogeneic properties, do not reject and do not cause GVHR diseases. It was proved in the example with children with inherent immune-deficient states, when donors' cells formed a valuable population of mature lymphocytes, creating "chimerism" in an organism, thereat together with damaged lymphocytes, normal cells functioned and immunodeficit signs completely disappeared. The observation term of such children is 15 years.

The group of oncological patients, in which after EHC injection within the whole course of chemotherapy ability to work is kept, as well as good feeling and desire to continue treatment, is of great interest. This fact allows to carry-out aggressive chemotherapy at metastatic organ damage. It was succeeded to increase a course dose of 5-fluorine-uracil by many times without considerable side effects. Blood indices (the number of erythrocytes, leukocytes and platelets) remained within the limits, admitting the treatment. Investigation of the expected viability according to Kaplan–Meiera method showed a certain positive tendency. Thus, together with hemopoiesis recovery, stimulation of anti-tumor immunity and direct antitumor effect, embryonic hemopoietic cells can significantly reduce a side effect of chemotherapy and increase its efficiency.

It was established, that re-population activity of EHC is by 2–3 times higher than in the cells of adult bone marrow. These properties are visually demonstrated at inherent and gained aplastic anemia in children, hemopoiesis recovery in such children at a simple treatment protocol and favorable circumstances can occur in 10–12 months, when injecting the EHC this result can be obtained in 45 days with long-term remission (to 10 years).

During transfusion of embryonic preparation to the patients with cirrhoses, a positive effect was shown: the correction of metabolic damages and a decrease of autoimmune aggression, mediated by spleen, occur. More manifested clinical effect is observed when the preparation was intravenously injected and directly to the damaged organ.

The absence of the methods for organ cryopreservation limits the opportunities of transplantology, and the number of patients, who need in the transplantation of kidney, liver, heart increases from year to year. Advantages of cell transplantation of these organs are obvious, because it is significantly easier and cheaper to create low-temperature banks of embryonic somatic cells. In addition, the cells during embryonic period are deprived of the additives of reticulo-endothelial tissue, avoiding many immunological problems.

Thus, our 15-years' experience of the application of cryopreserved embryonic cells and tissues in a clinical practice with profound analysis of clinical and laboratory data allows us to conclude, that these preparations are a unique biological material, which can be used when treating a wide spectrum of diseases.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 615.361.014.41

Cryobiological Technologies for Obtaining Some Preparations from Xenogenic Material

B. P. SANDOMIRSKY, S. E. GALCHENKO, I. V. BELOCHKINA, A. V. MAMONTOVA, E. S. GALCHENKO

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

The treatment methods, based on the usage of both cells and tissues from xenoorgans or obtained from them preparations, have gained a wide application. Viability of cells and tissues to the moment of their application is one of the main requirements to them. This point can be achieved by means of the cryopreservation of biological material.

We investigated the effect of different cryopreservation regimens on the integrity of spleen fragments from pigs and comprised by them splenocytes, as well as pancreas islet tissue of newborn piglets. Maximum integrity of the spleen biomaterial is observed when using PEO-400 and PEO-1500 in 20% concentration as cryoprotectants and freezing material with slow cooling rates. A high integrity of the islet tissue, applied in the treatment protocols for Diabetes mellitus and its complications, was noted under its cryopreservation with 20% PEO-1500.

The effect of long-term storage of biological material under the conditions of low-temperature bank on its integrity was also investigated. It was shown, that depending on the cryopreservation regimen the integrity of material can remain as unchangeable or decrease during the storage process. The maximum observation term made 10 years.

The method for obtaining the preparation from cryopreserved fragments of pig spleen has been elaborated. The preparation comprises the spectrum of biologically active substances, including low-molecular peptides, nucleotides, amino acids etc. Application of the preparation promotes to the normalization of cellular and humoral immunity during inflammatory and infectious diseases, optimization of energetic and metabolic processes in cells, reduction of lipid peroxidation processes in an organism. In this connection the given preparation can be widely applied when treating immune deficient states of various genesis and inflammatory diseases.

Production of food additive from the lyophilized cow colostrum, possessing a unique series of food and biologically active substances is also a perspective direction. In this connection we determined the limited terms for the storage of native, frozen and lyophilized cow colostrum. It was shown, that lactoferrin, being a part of colostrum, possessed an antioxidative effect and chelatory properties in respect of iron, and these characteristics were kept after the colostrum lyophilization and within 1 year in refrigerator in the case of lyophilized colostrum. We suppose that lyophilized colostrum can positively affect the states, characterized by the activation of peroxidative processes in an organism.

Thus, cryobiological technologies for production of the preparations from xenogenic material are highly efficient and allow to create the material stocks for the application in a clinical practice.

UDC 616-089.843.611-013.83: 617.713

Amniotic Membrane Transplantation in the Patients with Cornea Pathology

G. I. DROZHZHINA, V. I. STRONA, T. B. GAJDAMAKA, V. L. OSTASHEVSKY

Institute of Eye Diseases and Tissue Therapy named by V. P. Filatov of the National Academy of Medical Sciences, Odessa

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

Amniotic membrane (AM) is a thin elastic tissue, consisting of the layer of collagenic fibers, basal membrane, covered with one layer of epithelial cells. It has been established, that the basal membrane, comprised by amnion, promoted to the migration of epithelial cells, their differentiation, intensified their adhesion, that resulted to a rapid cornea epithelization. Besides, the stromal part of amniotic membrane comprises suppressors of various tissue growth factors, preventing cornea vascularization and formation of subepithelial fibrosis and a rough stitch.

We applied human AM for the cornea covering in 5 patients: 2 ones with a painful form of the secondary endothelial-epithelial cornea dystrophy, 1 patient for the covering through transplant after the cornea melting at rheumatoid arthritis, in 2 patients with relaps-

Матеріал, захищений авторським правом

ing pterygium, as well as in one case with symblepharon. Preparing and preservation of AM was conducted at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov. AM storage before the operation was done in liquid nitrogen under the temperature of –196 °C. Before the operation a sealed bag was thawed under room temperature, then AM was taken out of the bagand washed by means of physiological solution. In the patients with bullous keratopathy and rheumatoid arthritis AM was used as the covering of the whole cornea surface, that was preliminarily de-epithelized, and perilymbal area. AM was fixed episclerally with Π-shaped interrupted 10/0 suture, neulon, monofilament were used. In the patients with pterygium AM was used for the conjunctive plastics and making the barrier, preventing the growth of fibrous tissue on a cornea. In all patients postoperational period occurred without response. In the patients with bullous keratopathy AM gradually lysed within the terms from 2 weeks up to 2.5 months. During this period of time the cornea surface was completely epithelized, oedema in stroma decreased. In the patient with rheumatoid arthritis the manifestations of autoimmune inflammatory process in an eye were stabilized and the cornea melting was stopped. In the patients with pterygium the vision acuity increased up to 0.5–0.6, cornea surface epithelized.

Thus, cryorpeserved amniotic membrane used as a cornea covering, manifested a significant effect, allowed to remove a painful syndrome, to stop inflammation and improve conditions for the cornea membrane regeneration.

UDC 615.361.36.013.014.413: 611.36.018.1: 57.085.043

Biological Activity of Cryopreserved Fetal Liver Preparations and Their Effect on the Functional State of Hepatocytes

N. P. SUBBOTA, P. P. PASHINSKY, D. V. CHERKASHINA

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

A complex comparative experimental investigation of the effect of low temperatures on biological properties of fetal preparations (liver, cerebral tissue, fetus, chorion of human fetus of 10 and 24 gestation weeks) and their effect on the functional state of rat hepatocytes in in vivo and in vitro model systems was carried-out. Presented data testified to the perspectiveness of elaborations in the field of new cryobiological technologies, related to obtaining the preparations with the kept properties of fetal tissues.

Under hypothermic storage of hepatocytes in sucrose-saline medium, cryopreserved biological preparations, obtained from human fetal liver, prolonged morphological integrity, protein synthesis and bioenergetic indices in hepatocytes in dynamics up to 72 hrs more efficiently, than the preparations from organs of other histogenesis.

When injecting the liver cryopreserved preparations to animals with experimental hepatitis, the intensity of LPO processes (decrease of MDA content), cytolysis indices (reduction of the ALT and AST enzyme activity), cholestasis (decrease of the activity of alkaline phosphatase), accumulation of toxic metabolism products (reduction of bilirubin level) decreased, regulatory-homeostatic functions (increase of protein-, RNA- and DNA-synthesizing activities) normalized; activity of antioxidative systems (superoxidedismutase and catalase) increased.

Hepatoprotecting effect of cryopreserved preparations of various level of biological organization, obtained from human liver of different gestation terms, depended on the age peculiarities of an organ functioning. Isolated from 10 gestation weeks' fetal liver extract demonstrates significantly manifested and regulating effect on liver, than other preparations (homogenate, hepatocytes, cytosol fraction), obtained from fetal liver of later gestation term (24 weeks), SOD indices and TBA -active products testified to this fact.

Introduction of cryopreserved preparations under experimental hepatitis is more efficient at earlier stages of the development of liver pathology, the indices of enzyme activity of cytolysis in blood plasm, as well as SOD activity and content of TBA-active products in liver testified to this.

The preparations (10 gestation weeks of fetus), cryopreserved within 2.5 years under low (–196 °C) temperatures, biotechnology of the obtaining of those included cyclic freeze-thawing of fetal liver, kept their hepatoprotective properties by accelerating recovery processes in a recipient's liver under experimental hepatitis, that is confirmed by the indices of ALT, AST enzyme activity (indices of cytolysis degree), as well as SOD (antioxidative activity).

Obtained data allowed to consider as expedient the establishing of low-temperature bank for the preparations of fetal liver at clinics.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 615.361.014.41: 611.018.82: 616.858.8-009.12

Application of Cryopreserved Nerve Stem Cells for the Correction of Dysfunction of Dofaminum-ergic Structures in Patients with Parkinson's Disease and Treatment of Patients with Other Forms of Extrapyramidal Hyperkinesias

V. I. SIPITYY, V. A. PYATIKOP, I. A. KUTOVOY, A. Yu. PETRENKO

Kharkov State Medical University (KhSMU)

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

Degenerative changes in dofaminum-ergic structures of brain mainly of substantia negra lead to the deficit of dofaminum in an organism and development of symptoms, characteristics for Parkinson's disease (PD): constraint, tremor of extremities, bradykinesia trembling, speech disorder, etc. In severe cases of the diseases dofaminum deficit in striate body approaches 80-90%.

Since 1982 for treating PD the nerve tissues derived from human embryos and fetuses have been successfully applied (Bauckland, 1982). Since 1995 in neurosurgical clinic of KhSMU the cryopreserved primary suspension of human embryo nerve cells (HENC) obtained from human embryos of 7–12 weeks' gestation have been used. As cryoprotectant 5%-solution of DMSO is used, freezing was conducted according to 3-stage programme down to –196 °C. All samples are subjected to virusological and bacteriological testing. Technology of freezing has been developed at IPC&C of the Academy of Sciences of the Ukraine.

Till 1998 the combined treatment of PD was performed, which included the conducting of cryodestruction of ventrolateral nucleus of visual tuber and following neurotransplantation into subthalamic area (21 patients).

Starting from 1998 to all patients with PD the isolated neurotransplantation with the implantation of quartz monofibre for further laser effect was accomplished.

The aim of this work was to estimate nearest and distant results of isolated transplantation of HENC in patients with PD and other types of extrapyramidal hyperkinesias (EH).

Under our observation there were 19 patients with PD aged from 43 to 74 years. All patients were monitored from 6 months to 3 years. Distribution on the disease type was as follows: rigid – 3, tremor – 6, mixed – 10. Neurotransplantation was stereotaxically done to all patients under control of computer tomograph CT-MAX of "General Electric" company into subthalamic area over substantia negra. Efficiency of neurotransplantation was evaluated by the following way: excellent – patient does not take dofaminum-containing preparations after operation; good – the dose of preparation became twice less than pre-operational dose; satisfactory – dose of preparation corresponds to pre-operational one, but is accompanied by the reduction of tremor or normalisation muscular tonus. Besides, under observation there were 12 patients to whom isolated transplantation of HENC was performed into different part of neostriatum, they were with such types of EH: 5 – dystonia musculorum deformans, 4 – choreiform hyperkinesia; 3 – athetoses.

In the group of patients with PD the results in 6 months after transplantation were as follows: in 4 patients (20%) the result was excellent; in 9 (50%) – good; in 6 (30%) – satisfactory. In a year after operation the effect in 5 patients (26.3%) was excellent, in 11 (57.9%) – good and in 3 (15.5%) – satisfactory. In 2 years in 3 patients (15.8%) the result was excellent; in 9 (47.4%) – good; in 7 (36.8%) – satisfactory. In 3 years good result was noted in 7 patients (36.8%) and satisfactory in 12 (63.2%).

The most manifested efficiency of transplantation was found in patients suffering from tremor form of PD. It should be noted that in 8 patients with mixed form and in all patients with tremor form the tremor completely or partially disappeared just after neurotransplantation. Probably, this is related to mechanical effect on subthalamic area during transplantation. In the group of patients with EH as well as in patients with PD a positive clinical effect is noted and distant period after operation as the normalisation of muscle tonus and the absence or significant reduction of forced movements of head and extremities. Clinical data were confirmed by comparative estimation of electromyography.

Thus the application of HENC in patients with PD and EH is highly effective and can be recommended for wider application in clinical practice.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 615.361.014.41: 611-013.84: 577.352.335: 618.12-002

Effect of Cryopreserved Chorion Extract and Tissue on the Activity of Lipid Peroxidation Processes and Antioxidative System in Patients with Subacute Salpingoophoritis

V. A. PITKO

Kharkov State Medical University

Within the recent years the tendency to significant growth of inflammatory diseases of uterus appendages has been noted. Many authors consider, that in pathogenesis of inflammatory diseases the damages, related to biomembranes destabilization due to the activation of lipid peroxidation processes (LPO) and exhaustion of the antioxidative system (AOS) in an organism, possess a considerable role. Proceeding from this fact, the search of the preparations capable of the activation of antioxidative processes in cells and inhibition of LPO processes development, is quite actual task.

Usage of fetal preparations, isolated from the tissues of human fetoplacental complex of early gestation terms (10 weeks) under various pathological processes showed that they possess antiinflammatory, antioxidative and immune correcting effect.

A comparative study of the effect of cryorpeserved chorion tissue transplantation (CCT) and chorion cryoextract implantation (CC) on LPO processes and the AOS state in patients with subacute salpingoophoritis (SSO) in the process of complex treatment was the aim of given work.

Clinical and biochemical investigation was carried-out in 52 patients with SSO and 30 healthy women was done. Patients with SSO were divided into 2 groups, which were age compared, as well as by clinical manifestations and duration of the disease. A complex antiinflammatory treatment was carried-out to all patients. CCT transplantation was done to the patients of the 1st group (20 women) in complex with traditional therapy (1×1 cm sample was thawed and transplanted into an upper external buttock quadrant). Together with a traditional treatment patients of the 2nd group were treated with the 1.0 ml subcutaneous injection of CC biopreparation, once per 2 days, 5 injections were prescribed.

After the conducted complex treatment with CCT transplantation clinical recovery occurred in 15 patients (75%), when using CC 29 patients (90.6%) were clinically healthy.

Adding the CCT and CC to a complex therapy allowed to improve significantly an internal medium of the patient organism. After the treatment the level of malone dyaldehyde decreased by 47 and 58%, the content of diene conjugates reduced by 42 and 48%, the level of vitamin E increased by 60 and 81%, correspondingly.

The treatment method of the patients with SSO using chorion preparation as an extract allowed practically complete recovery of internal control over LPO processes, that is one of main points in the recovery and normal functioning of metabolic systems in an organism.

UDC 616.361.441.014.41

Thyroid Hormone Level in Rat's Blood Plasm at the Xenotransplantation of Cryopreserved Organ Culture of Neonatal Piglets' Thyroid Gland

T. P. BONDARENKO, N. A. VOLKOVA, S. V. LUGOVOY

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

Nowadays the main method for treating endocrine gland hypofuctions remains a substitutive hormone therapy, however the presence of side-effects and the development of hormone dependent processes considerably decrease its efficiency. The existing methods for hormonal status correction using the transplantation of endocrine organ's cultured cells are limited by insufficiency of the available transplantation material. Cryopreservation provides the possibility for storing biological material without increase in the viability and allows to widely introduce this method of treatment into a practice. The aim of this work was to investigate the functioning of thyroid gland's cryopreserved organ culture after transplantation in the piglets-rabbits system.

Hormonal insufficiency was modeled by means of rabbits' total thyroidoectomy. Organ culture of neonatal piglets' thyroid gland was obtained using the method of culturing in the medium 199, containing 10% embryonic calf serum and KJ (5 μg/100 ml of

Матеріал, захищений авторським правом

medium) during 5 days. The medium changing was carried-out every day. The transplantation to experimental animals was performed under a local anesthesia by introducing an organ culture using Dufaut needle into a subcutaneous fat. The level of organ culture viability was determined by means of the method of supravital staining using trypane blue dye.

The viability of organ cryopreserved xenoculture (CXC) made 64%, those for recultured organ xenoculture (RXC) was 72%. For combined transplantation we used recultured organ xenocultures of thyroid and adrenal glands with the viability of 69 and 75%, correspondingly.

The level of thyroid hormones secretion (T3, T4) was determined by a radioimmunological method in blood plasm to the 90th day after transplantation using RIA-T3, T4-ST. The results of radioimmunological total investigation demonstrated that the total thyroidectomy to the 111th day resulted in a decrease of T3 level in 2.6, and T4 in 4.3 times in respect to the control value.

To the 90th day after transplantation we observed a compensatory function of all transplants according to T3 and T4 level in respect to a thyroidoectomised state. CXC functioning results in T3 increase in 2.5, and T4 in 1.8 times. The same tendency is characteristic for RXC, where there is T3 increase in 1.6, and T4 in 1.9 times. The transplantation of thyroid and adrenal glands' recultured organ culture resulted in the augmentation of T3 content in 3.9, and T4 in 1.9 times. Thereat in all studied groups these indices did not reach the norm level.

Thus, during the investigation process we observed a positive effect of thyroid gland's organ culture xenotransplantation in the animals, subjected to a total thyroidectomy. The results obtained give the possibility to suppose, that the xenotransplantation can be applied for correcting the level of thyroid hormones in the animals with experimental hypothyrosis.

UDC 57.043: 611.36.018.1: 616-089.843

Effect of Hypothermic Storage of Isoalted Hepatocytes on the Efficiency of Transplantation to Hepatectomized Rats

N. N. MOISEEVA, A. Yu. PETRENKO, L. P. KRAVCHENKO

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

Transplantation of isolated hepatocytes is an alternative to the one at acute liver insufficiency. Clinical application of hepatocytes requires the establishing of a sufficient stocks of viable cells. Nowadays hypothermic method is the most available way for storage.

Investigation of the detoxicational function and the state of hemopoiesis system in hepatectomized rats after allogeneic transplantation of hepatocytes, subjected to hypothermic storage within 24–48 hrs, was the aim of given work. Freshly isolated hepatocytes or hepatocytes after 24- and 48 hrs' hypothermic storage under sucrose-based solution at the temperature of 4 °C in $1 \cdot 10^7$ quantity were injected into a spleen pulp of the rats with 70% hepatectomy. Hepatocytes viability before the transplantation was estimated by means of the method of trypane blue staining. Detoxicational liver function was estimated on the duration of the medication sleep after the injection of hexenal xenobiotic and bilirubin level. The state of hemopoiesis system was evaluated on the number of erythrocytes and leukocytes in peripheric blood of experimental animals. Albumin content in blood serum was an index of the protein-synthesizing liver function.

Viability of freshly isolated hepatocytes made 85%, after 24 hrs' hypothermic storage this index made 80%, in 48 hrs of storage the hepatocytes viability was 60%. Carried-out investigations demonstrated, that partial hepatectomy resulted in threefold increase of a hexenal sleep, which duration was kept within 3 days. Transplantation of freshly isolated hepatocytes after hypothermic storage promoted to hexenal sleep normalization even to the 1st day. Hepatectomy resulted in a gradual decrease of total bilirubin concentration within 3 days. Transplantation of freshly isolated hepatocytes and ones after 24 hrs' hypothermia caused normalization of bilirubin level to the 2nd day, after 48 hrs' hypothermic storage this index was recovered just to the 3rd day. After hepatectomy in the blood of experimental animals an increase of leukocytes content and erythrocytes decrease were observed. Transplantation of freshly isolated hepatocytes and ones after hypothermic storage promoted to the reduction of leukocytes concentration and did not affect the number of erythrocytes. Albumin content in blood serum did not change both after hepatectomy and cell transplantation.

Conducted investigations testified, that transplantation of freshly-isolated hepatocytes and ones after 24 hrs' hypothermia resulted in the stimulation of the detoxication function in rat liver after partial hepatectomy, decrease of leukocytes content and did not affect the erythrocytes quantity and albumin content in blood.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 615.361.018.014.41

Experience in the Application of Cellular and Tissue Therapy in Practice of the Center for Allergology and Immunology

I. N. MELESCHENKO, L. L. TERESCHENKO, T. N. KOZUBERDINA, A. V. IVANITSKY

Center for Allergology and Immunology, Lugansk, Ukraine

Tissue and cell therapy application when treating the patients with secondary immunodeficits was the aim of investigation. We examined 15 patients aged from 5 to 47 years. Patients were divided in to 3 groups.

1. Children aged from 5 to 17 years with bronchial asthma (4 patients). Bouts of bronchial asthma were noted 5–6 times a day, cupped intravenously by euphylline injection and short-term effect β-agonists. Traditional treatment protocols did not provide a stable long-term remission.

2. Patients (4 persons), with the diagnosis of C, B hepatitis and chronic course made the second group. Diagnosis was confirmed by the investigation of serological markers of B and C hepatitis viruses by means of immune enzymic analysis (IEA) and polymerase chain reaction (PCR).

3. Seven patients with chronic mycotic and chlamydous prostatites, being treated within 10 years and subjected to long-term therapy, made the third group. Diagnoses were confirmed by PCR method, investigation of IgG chlamydia titers by IEA method, spermogram.

In the patients of all groups the indices of cellular immunity (T and B-lymphocytes, T-helpers, T-suppressors, IRI, NK-cells) and humoral one (G, A, M immunoglobulins) were investigated. In some patients immune-deficient state was noted on hypersuppressory type (IRI 1,1). In two cases immune deficient state on hyposuppressory type was revealed (IRI 2,2).

Biochemical investigations were carried-out according to generally accepted methods. For treatment of the patients from these groups the following preparations were used: cryopreserved placenta extract; hemopoietic cells; cryopreserved placenta fragment; cryopreserved thymus tissue.

These preparations' application resulted in more rapid normalization of the patients' general state, their clinical recovery. In children with bronchial asthma a sharp decrease of the number of bouts down to 2–3 times a week was noted, bouts were easily cupped without β-agonists. In patients with hepatitis the RNA-HCV and DNA-HBV disappeared in blood, antibodies level reduced, ALT activity normalized. Patients with chronic prostatites disappearance of pain and discomfort in genital organs, libido increase.

During secondary investigation of the immunograms in all patients the normalization of the indices was observed, that testified to a high immunomodulating effect of cell and tissue therapy.

UDC 57.015.1.043: 615.361

Investigation of Steroidogenic Activity of Cryopreserved Adrenal Culture under Xenotransplantation

T. P. BONDARENKO, G. A. BOZHOK, N. M. ALABEDALKARIM, A. V. GERASHENKO, I. I. SAMCHENKO, E. I. LEGACH

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

Wide application of glucocorticoid hormones in clinical practice when treating such diseases as bronchial asthma, collagenoses, non-specific polyarthrites, blood diseases and others results in the development of secondary adrenal insufficiency, formation of hormone resistance and hormone-dependence in the majority of patients due to the atrophy of own adrenal glands. Transplantation of adrenal cells culture and tissues, functioning in a recipient's organism as a hormonal depot, subjected to neuroendocrinic regulation, is one of perspective ways for hypocorticism treatment. Thus, investigation of the factors, affecting the retention of the adrenal xenotransplants being cultured, will allow to explain immunobiological processes of tissue and cell therapy and elaborate the methods for increasing the terms of a transplant functioning with the aim of improvement of therapeutic properties of endocrinic cell preparations during their clinical usage.

Five-days' adrenal organ culture of new born piglets was obtained according to the Tronko method (1990). Culture cryopreservation was carried-out under the protection of 5% DMSO according to the method of Legach E. I., Bondarenko T. P. (1998). Before transplantation the cryorpeserved culture was thawed under 37 °C, washed from DMSO and incubated under 199 medium within 48 hrs. For the modification of steroidogenic activity the samples of organ culture were incubated within the recent 24 hrs by 199 medium, comprising 10% embryonic calf serum,

Матеріал, захищений авторським правом

various concentrations of colchicine or cadmium chloride. Hypocorticism was modeled in 3-months' Wistar rats by means of two-side adrenalectomy. Organ culture transplantation was subcutaneously done to the 14th day after the adrenals removal. All animals were decapitated to the 14th or 30th day after the transplantation. Corticosteroids level (11-oxycorticosterone (OCS) was measured by fluorimetric method in blood plasm of rats, in the culture homogenates and xenografts.

Investigation of the effect of pretreatment by means of modifying agents demonstrated, that colchicine in the 10^{-5} M concentration increased the basal and adrenocorticotropic hormone-stimulated (ACTH) 11-OCS secretion of adrenal organ culture. With increasing the colchicine concentration up to 10^{-2} M the blocking of ACTH-stimulated secretion is observed, at the same time the basal secretion statistically and significantly did not differ the control. Cadmium chloride suppresses ACTH-stimulated hormone secretion due to the concentration dependence. Xenotransplantation of the culture, pre-incubated under the colchicine solution (10^{-2} M), did not change the hormones level in the plasm of hepatectomized rats, however in the colchicine pre-treated xenograft homogenate, 11-OCS content to the 30th day after xenotransplantation did not differ the values, characteristic for culture without pre-treatment.

Obtained data testified that transplantation of cryopreserved adrenal organ tissue of piglets already to the 30th day practically completely compensated the glucocorticoid insufficiency in adrenal-ectomyzed rats. The fact, that colchicine and cadmium chloride in vitro modified hormone secreting capability of cryopreserved culture, can be used in future to investigate the effect of the steroidogenic culture activity on its viability at xenotransplantation.

UDC 611.36.013: 611.8.013: 617.735-002

Characteristics of "Hemoneuronal" Embryonic Preparation

V. I. GRISCHENKO, Yu. A. DEMIN, E. I. GONCHARUK, N. N. POPOV,
A. Yu. PETRENKO, A. V. GERASCHENKO

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

Kharkov National University named by V. N. Karazin

Preparation for cellular therapy "Hemoneuronal" contains cryopreserved cells of liver and nerve tissue of human embryo. Its cellular composition and functional activity of elements, its components, mainly determine therapeutic effect of application of any cellular material. This is especially true in respect of such complicated preparation as hemoneuronal transplant.

We have studied basic morphofunctional characteristics of embryonic preparation after cryopreservation. Viability of cells of embryonic preparation after cryopreservation, estimated by the method of supravital staining, made $60.6 \pm 0.2\%$. Its cellular composition significantly did not differ from native preparation. Along with this in cryopreserved preparation in comparison with native some increase of content of lymphocytes and statistically true reduction of the number of hepatocytes and bare nuclei is observed. In this case the percentage in preparation of neuronal cells did not change. Qualitative content of $CD34^+$-cells after cryopreservation also statistically did not change: in native preparation it made 1.6 ± 0.2 in cryopreserved did $1.9 \pm 0.2\%$.

In stained smears of cryopreserved preparation $62.1 \pm 0.2\%$ cells had characteristic unchanged morphology and peculiar to them staining of cytoplasm and nucleus. There were $14.7 \pm 0.5\%$ of cells revealed, they had ruptures of outer membrane and $13.2 \pm 0.4\%$ of cells with impaired nuclei. Studying of ultrastructure of cells has shown, that there were 29.3% of cells with various types of injuries in cryopreserved preparation. Among revealed damages there were: loosening and swelling of cytoplasmatic membrane, swelling of mitochondria, appearance in cytoplasm of vacuoles, rarely karyolysis.

Investigation of the activity of enzymes of energetic exchange, intensity of aerobic and anaerobic glycolysis, integrally reflecting cell metabolism, has demonstrated that after cryopreservation in cells there was a decrease in the activity of regulatory enzymes of glycolysis, dehydrogenases of pentosophosphate pathway and cycle of tricarbonic acids as well as mitochondrial cytochrome-c-oxidase. Besides, in cells after cryopreservation a statistically true reduction in the intensity of aerobic and anaerobic glycolysis was found.

After cell incubation at 37 °C in atmosphere 5% CO# within 6 hrs in cultural medium some increase in the activity of all studied enzymes as well as glycolysis processes is noted. Observed reduction of cell metabolism after cryopreservation is transient. This allows supposing, that after cell introduction in organism, where they get to physiological conditions, probably complete recovery of their initial metabolic activity.

Functional activity of embryonic preparation was evaluated *in vitro* on the ability of cells in semiliquid agar to form colony and clusters. It has been established that cryopreserved embryonic cells of combined

Матеріал, захищений авторським правом

preparation form 47.5 ± 5.1 clusters and 33.9 ± 3.8 colonies per 10^5 cells. Native cells of combined embryonic preparation form 58.1 ± 6.1 clusters and 44.3 ± 4.7 colonies per 10^5 cells. In this case it has been found, that separate culturing of cryopreserved hemopoietic cells results in the formation of 38.9 ± 4.1 clusters and 27.7 ± 3.2 colonies per 10^5 cells, native hemopoietic cells — 49.4 ± 5.2 clusters, 36.8 ± 3.8 colonies per 10^5 cells.

After cryopreservation a statistically reduction in hemopoietic activity of cells of embryonic preparation occurs. From the obtained data also proceeds, that combined embryonic cellular preparation both native and cryopreserved possesses higher cluster and colony-forming ability, in comparison with corresponding preparation, consisting only of embryonic hemopoietic cells.

Studying of the presence in preparation of hormone 11-OKS revealed its presence both in "Hemoneuronal" preparation and in nerve cells and liver ones. Its content in combined preparations made 0.168 ± 0.19, in liver preparations 0.116 ± 0.08, in neurocells 0.235 ± 0.12 μg/ml. The presence in preparation of residual amount of hormone 11-OKS, perhaps contributes to its anti-inflammatory effect.

Thus combined embryonic hemoneuronal preparation after cryopreservation possesses a high metabolic and functional activity and cells, forming it, preserve unique properties of embryonic neuronal and hemopoietic units.

UDC 57.089.36: 591.88.436.2

The Methods for Obtaining Viable Embryonic Cells of Neurotissue and Liver

N. G. KADNIKOVA, T. F. PETRENKO, V. F. MARTSENYUK, S. V. KOSCHIY

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

Liver and neurotissue embryonic cells found a wide application in cellular therapy. During the process of liver and neurotissue cell isolation a significant attention is paid to their viability. Such methods as washing out, mechanical and enzymatic desaggregation are used when obtaining the cell suspensions from different tissues.

We have studied the viability and cryoresistance of cells, obtained by means of mechanical or enzymatic desaggregation. The experiments were carried-out with liver and neurotissue of the 12–15 days' murine embryos. Mechanical desaggregation of tissues was performed in the Potter's glass homogenizer. For enzymatic desaggregation small pieces of tissues were immersed into enzyme solutions (versen, trypsin, chymoral and their different combinations). An optimal time of enzyme exposure to cells was determined. The integrity of isolated cells was estimated by the intensity of staining by trypane blue in their live time.

As the result of the experiments conducted it has been established that for liver the method of homogenization provides the obtaining of $2.8 \cdot 10^7$ cells/ml at the viability of 53%, but the method of enzymatic desaggregation does $(2.5–3.5) \cdot 10^7$ cells/ml at the viability of 88–92%. For neurotissue the cell viability after mechanical desaggregation made 22%, but after enzymatic one did 82–92%. The cell concentration depended on a kind of applied enzyme, duration of its effect and was the similar as in the case of mechanical tissue desaggregation.

The obtained optimal regimens of desaggregation were applied for liver and neuronal tissue of the 7–8 weeks' human embryos. Morphofunctional properties of cells were estimated by trypane blue and by their capability of adhesion to a substrate and flattening. The viability of liver and neurotissue cells obtained by means of an enzymatic desaggregation made 97 and 85%, correspondingly, and after mechanical desaggregation 45 and 12%. It should be noted that these indices in a considerable extent depended on the composition of a transport medium, where an embryo was added, temperature and duration of transportation.

It is known that the enzymes during the desaggregation process cause a damaging effect on cell cytoplasmic membrane, in particular, provoke the loss of surfacial antigenes, receptors, enzymes. Therefore we included an additional test allowing to estimate the functional properties of cells, in which the receptors take part, the capability of cells to adhere and flatten. Liver cells, desaggregated using an enzymatic method and placed into a cultural medium, adhered and flattened in 2 hours. By the 2nd–3rd day the monolayer, consisted of epithelial cells with a polygonal form, big nuclei and granulated cytoplasm, was formed. The cells after mechanical desaggregation lost the ability to the adhesion. Within the 2nd–3rd day an initial viability of cells was kept in a suspension. We could judge about the state of neurotissue only from the intensity of the in live time staining by trypane blue, since the cells did not adhere irrespectively on the desaggregation way.

After cryopreservation the cell viability decreased by 8–20% irrespectively on the way of tissue desaggregation. The cells, being transformed into a suspension using an enzymatic method after cryopreservation kept the capability to adhere and flatten.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 616.12-009.72-08: 615.361.013.85.014.413: 616-089.843

Treatment of Stable Stenocardia Using Transplantation of Cryopreserved Fetoplacental Tissue

K. V. SHEPITKO, S. O. GAYEVSKY, M. M. POTYAZHENKO, V. I. SHEPITKO

Ukrainian Medical Stomatological Academy, Poltava

Significant growth of heart ischemic diseases (IHD), severity of the disease course, high level of invalidization and frequent development of dangerous for life complications, stipulated the elaboration of new pathogenetically substantiated approaches for the treatment of such patients. With this aim the peculiarities of the myocardium ischemia pathogenesis are studied, experimental models are created and clinical approbation of various ways for pharmacological correction is carried-out. However, in spite of a significant volume of the conducted investigations there is no a distinct idea about the role of immune system, processes of free-radical oxidation in the pathogenesis of myocardium ischemia in the patients with IHD. Possibility of the application of tissue allotransplantation when treating this disease has been also insufficiently studied.

The aim of our investigation was the estimation of clinical efficiency when treating the patients with stable stenocardia using cryopreserved fetoplacental tissue transplantation. Ten patients with stable stenocardia with the disease anamnesis of 3–8 years were investigated. Clinical status was estimated using the form with typical complaints of patients and objective disease manifestations. With the aim of semi-quantitative estimation of the clinical state of patients the general clinical index was calculated. Qualitative analysis of electrocardiograms was done.

All the patients were treated with the course, including transplantation of the fragment of cryopreserved fetoplacental tissue.

In the result of conducted treatment an improvement of clinical status of the patients (clinical index after treatment reduced by 30%) was revealed. When analyzing complaints of patients a decrease of pains in the heart area was noted in 90% of cases, improvement of general state, increase of the ability to work were observed in 95.3% of cases. In 87.5% a positive dynamics of T-peak on ECG was observed. Such a dynamics may testify to the reduction of the level of myocardium ischemia in such patients.

Thus, obtained results of the investigation testified to manifested clinical efficiency of cryopreserved extract transplantation of allogenic placenta in the patients with stable stenocardia and substantiated the possibility of the tissue transplantation application in a complex treatment of these patients.

UDC 612.592: 611.013.85

Effect of Placenta Hypothermic Storage on the Activity of Oxidation-Reduction Enzymes

T. N. YURCHENKO, A. P. BELONOZHKO, E. P. ZHULIKOVA, T. M. SHARLAJ

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

The activity of some oxidation-reduction enzymes in placenta tissue, as well as the changes in the process of its hypothermic storage were studied. The investigation was carried-out using the method of quantitative histochemistry and photometrical analysis.

In the tissue of native and subjected to a hypothermic storage placenta the following enzymes were revealed: SDH, LDH, α-HPDH, as well as $NAD \cdot H^2$ and $NADP \cdot H^2$ diaphorase. A quantitative accounting of enzyme activity was performed by the method of photometrical analysis using television microscope-photometer.

The results of histochemical and photometrical analysis permit to judge on the behaviour of oxidation-reduction enzymes in placenta tissue during the process of its hypothermic storage. The activity changes in such enzymes as SDH, α-HPDH and $NADP \cdot H^2$-diaphorase neither between the control group of samples and those, subjected to hypothermic storage nor those, observed at different stages of hypothermia (the 1st and 2nd day) have statistically significant character ($P < 0.95$). One should note a statistically significant decrease in LDH enzyme activity by the 2nd day in respect to the level of this index in the control group ($P > 0.999$) and in those, corresponding to the one day of storage ($P > 0.999$).

The activity of $NADP \cdot H^2$-diaphorase statistically and significantly augments by the 1st day of placenta hypothermic storage ($P > 0.99$), after that this index reduces down to the value, differing neither from the level in the control group ($P < 0.95$), nor from those

Матеріал, захищений авторським правом

in the group, corresponding to the 1st day of hypothermia ($P < 0.95$).

LDH is the enzyme, which participates in the third glycolysis stage, by catalysing pyruvate reduction up to lactate, reflects anaerobic variant of sugar utilisation, being in a non-solid connection with membranes of endoplasmatic network and a NAD-dependent enzyme. NAD·H^2-dehydrogenase serves as a general index of the activity of cell energy supply and is localised both inside of mitochondria and in an extramitochondrial space.

Thus, one can suppose, that not prolonged hypothermic storage of placenta does not result in a significant disorder of enzyme profile in its cells and there is a slight impairment in glycolysis process, related to sugars utilisation and energy exchange between mitochondria membranes and an endoplasmatic network.

UDC 616-089.843: 611.018.8: 616.8

Treatment of Cerebrovascular and Neurodegenerative Diseases Using Tissue and Cellular Transplantation

V. A. YAVORSKAYA, A. V. GREBENYUK, Yu. V. FLOMIN

Kharkov Medical Academy of Post-Diploma Education

In spite of significant successes achieved by medicine recently, the problem of development of effective therapy of many neurological diseases is far from optimal solution. This demands from neurologists of the whole world to constantly search for new more perfect treatment methods of their patients.

Due to very low ability of central nerve system to regeneration, i.e. recovery of structure, cellular ensembles and functional bonds of brain, suffered as a result of trauma or disease, special hopes are reposed to a new and intensively developing direction of medicine, transplantation. However as for nerve system the successes of organ transplantation for this moment are quite modest: no methods for transplantation of brain or spinal cord sites exist, the methods of selection of the donors and post-operational treatment are not readily available and expensive.

Therefore alternative direction, cellular and tissue transplantation using cells and tissue of human embryo-feto-placental complex attracts more and more increasing attention. It is considered, that along with substitutive effect the positive effect of this method of therapy is mediated by the presence in fetal tissues of different neurotrophic factors, controlling the development of nerve system in embryonic and early postnatal periods and participating in regeneration processes in central and peripheric nerve system at its damage.

We have investigated the safety and efficiency of application of the suspension of fetus cerebral tissue (SFCT) under vascular and degenerative diseases of brain. Common for these two groups of diseases is combined pathogenetic process of the death of neurones on the way of necrosis and apoptosis, leading to the formation of morphofunctional defect.

SCFT transplantation was included into complex treatment of acute period of ischemic insult (II), as well as subcortex syndromes (SS) in the structure of Konovalov–Wilson's disease, discirculatory aterosclerotic encephalopathy, Parkinson's disease.

Introduction of 1.5 ml SCFT was done by means of deep intramuscular injection into upper quadrant of buttocks after preliminary premedication with tavegyl solution, 2.0 ml intramuscularly. The treatment course as a rule consisted of 3 transplantations with 2–3 days' interval. In addition to careful somatoneurological observation, biochemical, immunological test of blood were performed in dynamics, EEG, REG and TCDSG were evaluated.

The most manifested clinical effect at II was found in patients with insignificant general brain symptoms, it manifested in more rapid regress of neurological deficit in comparison with the control group, better functional recovery to the moment of leaving the inpatient clinic. In the case of Konvalov–Wilson's disease in the patient M. with tremor form (disease duration is 8 years, the 1st group invalidity during 5 years), who constantly had supporting dose of cuprenyl, but due to manifested tremor hyperkinesis he could not serve himself in private life, two sessions of SCFT transplantation with one year interval between them. After the first session even in 3 days a slight reduction of tremor was noted. Maximum effect developed in 6 months, when the patient by himself could not write and take food. After the second session the further clinical improvement was found.

At SS of vascular etiology after conducted course of treatment a decrease in plastic hypertonus was noted. Transplantation results mainly depended on the duration and manifestation degree of disease. All patients pointed to improvement of general state, manifesting in rising of work capacity, improvement of emotional background.

Thus transplantation of suspension of fetus cerebral tissue at II and SS causes both early and delayed positive effect on clinical symptoms, general biostimulating effect. Efficiency of cellular therapy at parkinsonism syndrome depends on the duration of diseases and manifestation degree of clinical symptoms.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 57.086.13.8

Cryobank of Different Types of Cell Cultures

L. L. MIRONOVA, V. D. POPOVA, O. I. KONYUSHKO, Yu. Kh. KHAPCHAYEV, D. V. ZYBIN, A. S. AKOPYAN

Institute of Poliomyelitis and Virus Encephalitis named by M. P. Chumakov of the Russian Academy of Sciences of the Ukraine, Moscow
Republic Centre of Human Reproduction of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow

Only the possibility to preserve cells in liquid nitrogen permitted to create the collections of biomaterials. Beginning from 1969 in the laboratory of tissue cultures more than 100 lines of re-cultured cells of human being and animals were established. Their biological, morphological, karyological, biochemical properties were studied, the control for the absence of side agents was accomplished. The aim of the works was the receiving of the line of re-cultured cells, suitable for the production of antiviral vaccines. In cryobank the most perspective cellular systems were placed. When testing some ways of cell cryopreservation, we have stopped at the method, described in details in the proceedings of the second cónference "Cryobiology and cryomedicine", 1984, V. 1, p. 172. Thus in the bank the lines of diploid human cells were placed: M-1, M-7, M-10, M-19-23, M-25-28 (skin and muscles of embryo), lines 4478, 4921D, 5003, 5018, 5020 derived from the same tissues of monkeys, 2688 — kidneys, 2683, 4664 — lungs of monkeys, lines of diploid cells of embryo kidneys and new born sheep 41, 91, 374, 474, 574 and some others.

Lines of heteroploid cells were derived from organs and tissues of green monkeys: 455 (spleen), 4179 (heart and tongue), 4647 (kidney), 4921 (skin and muscles), Taurus-1 line (calf kidney), 4184 (sheep kidney).

Lines of heteroploid cells PAMT, derivative of 4647 line, found by cell culturing on selective Eagle medium with 8-azoguanine, 6-mercaptopurine, 6-thyoguanine. This line is defective on the gene of enzyme hypoxanthene guanine phosphoribosyltransferase ($HPRT^-$).

During the passage of the cells of 4647 line on the medium with 5-bromdesoxyuridine another derivative 4647 TK^- was established. Two intralinear hybrids of the cells of 4647 line during the passage in the medium system of HAT cells PAMT and TK^- (PAMT×4647 TK^-) were obtained. The majority of mentioned lines occurred to be suitable for conducting the researches, creation of samples for diagnosis, vaccines, test-systems for working with viruses and interferon.

UDC 615.361.014.41

Cryopreservation is the Factor of Cell Transformation

O. I. KONYUSHKO, L. L. MIRONOVA

Institute of Poliomyelitis and Virus Encephalitis named by M. P. Chumakov of the Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Usage of cryoprotectants and meeting the regimens of cryopreservation and recovery of cell permit to preserve a high viability at unchanged morphological, biochemical, karyological properties and sensitivity to viruses within a long period of time (in our practice more than 20 years). This is characteristic both for suspensions of primary cells and for the cells of re-cultured lines at different levels of passages.

Meanwhile the storage duration of cryopreserved cells does not result in some changes of properties, inherent in cultures, the frequency of procedure of freeze-thawing can cause rough injuries of chromosomes and in the result the transformation of cells. Thus the line of heteroploid cells of sheep embryo kidneys 4184 was obtained in the result of multiple procedures of cryopreservation of diploid cells of the line 41 with short intervals of passage process (1-2 passages) between them.

The line 4184 differs by a high proliferative activity, it is presented by small epithelioid cells. Contact inhibition is manifested. Cytochemical reactions on DNA and RNA proceed more intensively. At a big number of diploid cells (87–92%) higher level of polyploidy in comparison with the line 41, 8–40 fold exceeding of hyperploidy and marker chromosome in 6% of cells were noted.

In culture 4184 with high titers the viruses of measles, Coxsakievirus, B1-3, 5, 6, plague of carnivora, woodcutter's and Japanese encephalites. The cells of line 4184 were applied for the production of the sample for diagnosis of Japanese encephalites and 12 experimental series of vaccine with M-47 strain.

The same way the line of heteroploid cells of skin and muscles of green monkey embryo has obtained 4921 derived from the cells of diploid line 4921D. The cells of the line 4921 are also highly sensitive to the contamination by viruses of lymphocytic choriomeningitis, woodcutter's and Japanese encephalites. Using the latter the sample for diagnosis was produced.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 615.361.014.41: 611.013: 577.1

Investigation of the Biochemical Composition of Cryopreserved Preparations from Human Embryonic Tissues

A. N. SUKACH, A. Yu. SEMENCHENKO, A. Yu. PETRENKO

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

Recently cryopreserved cellular preparations derived from human embryonic tissues are widely applied in clinical practice. In this connection the investigation of these preparations composition, related to the efficiency of their effect, is quite actual.

Investigations were carried-out with frozen-thawed preparations of liver cells and cytosol of soft tissues from 6–12 gestation weeks' human embryos, hormonal composition, as well as lipids' and polypeptides' ones were studied.

It was revealed, that all fetal preparations were characterized by the presence of peptide fractions with the molecular mass within the range from 5.4 down to 3.1 kD. However the number of these fractions is different in various preparations. Extract of human embryonic tissues is characterized by the peptides fractions with the m.m. of 3.1 and 3.9 kD, total number of those made 40% of all peptide fractions. Supernatant of embryonic hemopoietic cells is characterized by a big number of peptides (m.m. 3.1 and 6.7 kD), the content of those made 9.4 and 6.2%, correspondingly. Embryonic neuronal cells differed with a high content of fractions with the m.m. of 3.7 (4.2%) and 5.1 kD (9.5%).

Analysis of protein spectrum of the preparations by means of electrophoresis showed, that embryonic hemopoietic and neuronal cells were characterized by the presence of 20 protein spectra, and their supernatants and embryonic tissue extract had 14 bands.

Lipid extracts were obtained from the suspension of embryonic neuronal and hemopoietic cells, then were divided by the method of a thin-layer chromatography. The preparations slightly differed on the content of neutral lipids and comprised the following lipid classes: monoglycerides, cholesterol, diglycerides, free fatty acids, triglycerides, cholesterol ethers. In embryonic hemopoietic and neuronal cells the main classes of the phospholipids, characteristic for these tissues in adults were found: phosphatidyl choline, lysophosphatidylcholine, phosphatidylinositol and phosphatidylserine. Neurotissues comprised cerebrosides – phospholipids, characteristic for this tissue.

Investigations of sexual hormones (prolactin, estradiol, progesterone and chorionic gonadotropin) demonstrated, that preparations of embryonic origin were characterized by a low prolactin content and high content of estradiol. Lipid composition of liver, brain and cytosol cells, obtained from embryonic tissues, practically did not differ from the one of adult tissues. Peptide and protein spectra of the studied preparations are their peculiarities, qualitative and quantitative investigation of which will give the possibility to elucidate the mechanism of the therapeutic effect of embryonic preparations, as well as will be the base for the standartization of fetoplacental complex preparations.

UDC 575.826: 57.089.61: 591.481.1

Peculiarities of Functional Adaptation of Glial Implants of Neocortex And Cerebellum

O. P. ZOZULYA, A. P. CHERCHENKO, V. M. SEMENOVA, N. G. GRONSKAYA, E. A. NAGORNY, L. P. STAJNO

Institute of Neurosurgery of the Academy of Medical Sciences of the Ukraine, Kiev

Taking into account modern notions of the role of glia in morphofunctional and metabolic plasticity of CNS and perspectives of its application as transplantational material with the aim to study the peculiarities of functional adaptation of the system "glial implant–recipient's brain" the investigations of bioelectrical activity of brain (PC-EEG) of experimental animals (rabbits, body mass of 2.5–3 kg) after implantation of glially riched fractions of neocortex (GRF_{nc}, $n = 44$) and cerebellum (GFR_c, $n = 51$), obtained from explantational primary cultures of newborn rabbit brain. Groups of comparison consisted of animals with implantation of embryonic nerve tissues of neocortex (ENT_{nc}, $n = 15$) and cerebellum (ENT_c, $n = 20$).

Activation effects of GRF_{nc} were found in the implantation zone in comparison with symmetric zone (SZ) of opposite hemisphere, an increase of total power of beta-2-rhytms ($1\,667.9 \pm 329.8\ \mu V^2/Hz$, $980.1 \pm 241.4\ \mu V^2/Hz$, $p < 0.05$); at photostimulation

Матеріал, захищений авторським правом

(PhS), significant of the power and decrease in the frequency of beta-2-rhythms, enhancement of the frequency of beta-1-rhythms and a increase in power of teta-1 and teta-2-rhythms. In the group of ENT_{nc} in implantation zone in comparison with SZ there was found the rise in amplitude of beta-2-rhythms ($149.6 \pm 30.5\ \mu V$, $59.2 \pm 9.7\ \mu V$, $p < 0.05$), at PhS – the change in reactivity within the range of alpha-rhythms, reduction of power of beta-1-rhythms, reactivity within the range of teta-rhythms. When comparing the characteristics of EEG-rhythms in the zones of GRF_{nc} and GRF_c there were found the differences on the frequency of beta-1-rhythms (16.6 ± 0.3 Hz and 17.6 ± 0.1 Hz, $p < 0.05$); at PhS – on the power of beta-2-rhythms of ENT_{ng} ($1\,950.9 \pm 352.9\ \mu V^2/Hz$) and GRF_{nc} ($2\,119 \pm 351\ \mu V^2/Hz$, $p < 0.05$) and on the frequency (correspondingly, 27.1 ± 0.09 Hz, 24.6 ± 0.9 Hz, $p < 0.05$).

In implantation zones of GRF_c an increase in power of delta-rhythms comparison with SZ ($302.3 \pm 51\ \mu V^2/Hz$, $130.8 \pm 22.6\ \mu V^2/Hz$, $p < 0.01$), slowing of teta-1 (4.96 ± 0.03 Hz, 4.99 ± 0.03 Hz, $p < 0.01$), in the range of beta-1 an increase in power ($867.5 \pm 104\ \mu V^2/Hz$, $466.7 \pm 72\ \mu V^2/Hz$, $p < 0.01$) and frequency (16.94 ± 0.15 Hz, 16.65 ± 0.16 Hz, $p < 0.05$), in beta-2 – an increase of power ($1\,364 \pm 138\ \mu V^2/Hz$, $5\,497 \pm 53\ \mu V^2/Hz$, $p < 0.01$) and reduction of frequency (25.38 ± 0.41 Hz, $26.61 \pm \pm 0.28$ Hz, $p < 0.05$). At PhS in the zone of GRF_c bigger than in SZ power delta ($325.7 \pm 44.3\ \mu V^2/Hz$, $111.1 \pm 16.1\ \mu V^2/Hz$, $p < 0.01$) and teta-1-rhythms ($247.6 \pm 34.6\ \mu V^2/Hz$, $86.4 \pm 16.3\ \mu V^2/Hz$, $p < 0.05$), lower frequency of alpha rhythms (10.09 ± 0.09 Hz, 10.47 ± 0.15 Hz, $p < 0.05$).

When comparing the responses to PhS in the zones of GRF_c and GRF_{nc} the differences in alpha-range on the orientation of total power have been found (for GRF_c $143 \pm 23.4\%$, for GRF_{nc} $76.76 \pm 15.12\%$, $p < 0.05$) and frequency ($100.3 \pm 2.6\%$ and $98.06 \pm 2.2\%$, $p < 0.01$). At bemegridum-test the differences in GRF_c and GRF_{nc} were revealed on the frequency of beta-2-rhythms (26.33 ± 0.3 Hz and 24.94 ± 0.18 Hz, $p < 0.026$) and the level of spastic readiness ($GRF_{nc} > GRF_c$). By the method of pharmacological analysis dofaminum-ergic dependency of spontaneous and provoked epiletiformic transformations of beta-rhythms was found in the zone of GRF_{nc} implantation. In the tissues of GRF_{nc} implantation zone an increase in the content of GABA and GABA-dependent activation of alpha-rhythms were revealed. The data testify to structure-dependent differences in the effects of GFR of neocortex and cerebellum.

UDC 615.361.014.41: 57.086.13

Scientific And Practical Activity of Samara Tissue Bank

L. T. VOLOVA

Samara State Medical University, Russia

In Samara the tissue bank has been organised at the base of Central R&D laboratory (CRDL) of medical university in 1983. Now there are 3 scientific and practical subdivisions here: department for procurement and preservation of tissues, laboratory of collagen and cell culture (fibroblasts).

Scientific and technical base of CRDL permitted to organise highly technological industrial production of bioimplants and to conduct complex scientific investigations on the problems of regulation of regeneratory processes in bearing and covering tissues of an organism due to differentiation of application of allogeneic tissues, culture of cells, tissue components and non-medicinal factors of the effect. Within the frames of given programme fundamental and applied questions of bioimplantology, related to the technology of preparations obtaining, their biological testing, tasks of rational application of biogenic preparations in clinical practice, organisation of the work of tissue banks, ethical and juridical problems of their activity, are studied.

For the period of tissue bank work a highly technological wastrels production of lyophilised implants of "Lioplast" trade mark sterilised by γ-rays was organised; we have developed and introduced an original algorithm of the production of biopreparations, protected with 4 patents of Russian Federation, including virus inactivation, special ultrasound treatment for removal of elements of bone marrow and fat out of spongiosa, sterilisation and saturation of biopreparations with medicinal substances; obtaining of allogeneic hydroxyappatite and demineralised bone matrix, including from brephotissues. In our laboratory more than 60 different types of implants, practically from all types of connective tissue have been produced. Obtained bioimplants consist of only the components of human organism, do not contain introduced outside chemical substances, are stored more than 5 years at room temperature, easily transported.

Technologies of production for bioimplants "Lioplast" allow to completely protect a recipient against transferring to him any disease, reduces to minimum the danger of personnel infectioning and makes technological process as ecologically safe and economical.

Together with clinicians of various specialisations (stomatologists, otholaryngologists, ophthalmologists, traumatologists, orthopaedists, oncologists, purulent and plastic surgeons, combustiologists) new ways of slightly invasive and slightly traumatic organopre-

Матеріал, захищений авторським правом

serving operations with the application of allogeneic biopreparations and physiotherapeutic means in complex treatment of patients with the pathology of locomotor system, dental-maxillary region, skin covers, vision and hearing as well as for the treatment of osteoporosis have been developed. The ways were patented (11 certificates). On this topic 12 candidate and doctor theses were defended. Only in Samara region for treatment of patients with cysts, tumours, destructive and purulent processes in bones, their traumas, damages and destructions of connective apparatus, trophic ulcers, burns, when conducting oculoplastic operations, reconstructive invasions at progressing myopia and chronic purulent otitis, in cosmetology and other fields of medicine more than 4,500 thousands of bioimplants of "Lioplast" trade mark have been used.

UDC 615.361: 616-006.81

Vaccination Against Melanoma Using Xenogenic Cells

V. K. SOLOGUB, D. V. ZYBIN, A. G. KOTELEVETS, I. A. KOROMYSLOVA, S. E. SEVERIN

Moscow R&D Institute of Medical Ecology, Russia

Recently immune therapy and immune prophylactics have found a wide application in oncology. Integral immune response is caused by vaccine preparations, based on living cells (modified tumour, dendrite, hybridoma etc.). At the same time strongly differing cells are rapidly removed both specific and non-specific immune mechanisms of an organism, that significantly reduces the efficiency of vaccination.

In our experiments xenogeneic tumour cells were preserved in connective tissue capsule (CTC) covering an inert gel not less than 6 months. Such a long-term contact resulted in immunisation against tumour cells.

Since it is known that cells of malignant human and murine melanoma possess similar spectrum of presenting and secreting proteins, this model was chosen by us to prove the efficiency of these methods. Our experiments were performed in the model of human melanoma (SKMEL-28) and mice melanoma (B-16) in C57/Black line mice.

Mice of C57/Black line were implanted with gel and in two months after formation of CTC the cells of human melanoma SKMEL-28 were inoculated. In 1.5 months to experimental and control mice syngeneic tumour of murine melanoma B-16 was inoculated. In 25 days the animals of the control group died. Average life duration of mice vaccinated by human melanoma cells made more than 100%.

The results have shown, that application of proposed methods permits to successfully use xenotransplantation for vaccination against oncological diseases.

UDC 615.361: 616.379-008.64

Usage of Xenotransplantation for Diabetes Mellitus Type I Treatment

D. V. ZYBIN, I. A. KOROMYSLOVA, V. K. SOLOGUB, A. G. KOTELEVITS, S. E. SEVERIN

Moscow R&D Institute of Medical Ecology, Russia

Insulin-dependent type I Diabetes mellitus is related to a partial or complete destruction of pancreas beta-cells, which are the unique insulin producing cell population in our organism.

Developed by us method allows preventing the transplanted beta-cells against immune attack. This effect is achieved due to the implantation to an animal of inert gel, which in a certain period is covered by connective tissue capsule (CTC). Beta-cells injection behind CTC allows them to exist within some months without change in functional activity. We used this method for Diabetes mellitus treatment in rats.

Gel was implanted to Wistar line rats and in 2 months after CTC formation we placed behind it beta-cells, isolated from rabbit cubs. Efficiency of beta-cells functioning was determined according to the level detection of rabbit insulin in rat's serum. Even in 30 days after cell implantation they occurred to be beginning stable producing of insulin, moreover this effect was observed within more than 6 months. At the second stage rabbit's beta-cells were implanted to the rats with streptozotocin-induced diabetes (glucose level from 17 to 25 mMol). In 50 days the level of glucose in experimental animals reduced down to the norm (4–5 mMol) and kept as stable at this level more than 6 months.

The presented results demonstrate, that the method proposed can be successfully used for treating insulin-dependent Diabetes mellitus type I or, at least, for insulin dose reduction.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 616.089.843: 611.013.85: 612.35: 57.085.1

Reaction of Liver Structural Elements on the Implantation of Native and Cryopreserved Placenta Under Experiment

V. I. SHEPITKO, E. P. ZHULIKOVA, T. N. YURCHENKO, M. G. SHENBERG

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

Recently there is a widening of the field of fetal and placental tissue application at different pathological processes in the case of non-efficiency of standard methods of treatment. As the preliminary experimental data show, a subcutaneous placenta transplantation causes a manifested stimulating effect on different organs and systems, that can be explained by the presence in its tissue of a big number of fetal proteins, growth factors, cytokines, interleukines.

The aim of the accomplished work was to study the healthy rats' liver cellular response to the transplantation of native and cryopreserved placenta fragment, obtained at a mature pregnancy. Liver was used as the organ with an actively proceeding metabolic process. Cryopreservation was carried-out according to the developed program. Intact animals, as well as those with a skin dissection only, without transplantation, served as the control.

At the liver histological study a qualitative and quantitative estimation of its parenchyma state was performed in order to find out the effect of hepatocyte compensatory proliferation as an adequate response to the biologically active material application. The data on the dynamics of changes in binuclear hepatocyte and Kuppfer cell (KC) number are presented. Transplant resorption from subcutaneous fat actively proceeded within the first 14 days and to the end of the observation term (60 days) the process of resorption was utterly completed. In liver parenchyma of experimental animals we noted an increase in a number of "dark" cells by the 60th day, a small number of mitoses both in the experimental group and in the control, a widening of sinusoids and some augmentation of KC sizes. KC number statistically and significantly decreased to the 2nd and 7th day of observation, to the end of observation the differences with the group of intact animals were not statistically true. The performed morphometry demonstrated, that a number of binuclear cells in an intact control and in the animals with skin dissection did not statistically true differ at all observation terms. At the same time the transplantation of a native placenta even in 2–7 days is accompanied with a statistically true increase in binuclear cells almost twice. The biggest number of binuclear cells was noted at the transplantation of cryopreserved placenta to the 7th and 14th day, although their number exceeded an initial level practically twice. The results obtained testify to the fact, that an introduced biological material causes the stimulation of liver parenchyma function, having the character of physiological regeneration, since we did not reveal destructive hepatocytes at a morphometrical investigation.

UDC 615.361.36.013.014.413

Phenotype and Colony Forming Activity of Cryopreserved Cells of Human Embryonic Liver

A. I. TARASOV, D. R. E. JONES, V. I. GRISCHENKO, A. Yu. PETRENKO

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

Department of Immunology, Queen's Medical Centre, University of Nottingham, Nottingham, United Kingdom

Therapeutic effect of transplantation of human embryonic liver (HEL) cells is mainly rooted in its high content of haemopoietic stem cells. Along with stem cells the haemopoietic progenitor cells of various commitment extent are also present in HEL. Using of HEL cells for transplantation implicates their cryopreservation. It is necessary to take into account that a significant effect on cell viability and functional activity can be caused by cryopreservation. The aim of this work was to investigate the immunophenotype of cryopreserved HEL cells before and after cultivation and also their colony forming activity.

The cell suspension was obtained and cryopreserved at the IPC&C from liver of 6–12 gestation weeks' human embryos, derived after artificial interruptions of pregnancy at clinics in the city of Kharkov. Cryopreservation was performed under the protection of Me_2SO in medium without serum. HEL cells of low density were stained by monoclonal antibodies, con-

Матеріал, захищений авторським правом

jugated with the fluorescent stains (CD34-PE/FITC, CD45-FITC, AC133-PE and glycophorine A-FITC). The content of cells with various immunophenotype was determined by the method of flow cytometry with three-laser cell sorter EPICS (Beckman Coulter).

The cell culturing was conducted in methyl cellulose based semisolid medium in presence of the following growth factors: SCF, GM-CSF, IL-3 and erythropoietin. The cells taken from culture were stained with the same monoclonal antibodies. The content of cells with specific immunophenotype after 7 and 14 days was determined by flow cytometry method. It was established that HEL cells suspension contained $3.78 \pm 0.48\%$ of CD34+ cells, $8.99 \pm 0.42\%$ of CD45+ cells, $1.09 \pm 0.07\%$ of AC133+ cells and 80.54 ± 0.74 of glycophorine A+ cells. In this case 70% of AC133+ population co-expressed CD34, and 98% of CD34+ population co-expressed CD45. In the course of cultivation the CD45+ cells number significantly increased, and CD34+ and AC133+ cells number reduced.

The cells obtained from 6–12 gestation weeks samples formed to the 14th culturing day the following numbers of colonies: 185.75 ± 21.21 of the erythroid ones, 220.38 ± 38.01 of the monogranulocyte ones and 217.50 ± 15.31 of mixed ones. The statistical analysis allowed us to find out the positive correlation between AC133+ cells content and colony forming units numbers. Phenotypic analysis showed that cryopreserved HEL suspension contained quite a big number of viable primitive haemopoietic progenitor cells. The data on HEL cells colony forming activity testify to their high proliferative potential and ability to multidirectional differentiation after cryopreservation.

Матеріал, захищений авторським правом

SECTION 3
LOW TEMPERATURE PRESERVATION OF BIOLOGICAL OBJECTS

UDC 57.043: 591.465.12.3: 599

Way for Mammalian Oocytes and Embryos Cryopreservation at Heat Exchange Ultra-rapid Rates

L. V. GORBUNOV, N. A. GORDIENKO, I. A. MOROZOVA

Kharkov Biotechnological Center, Kulinichi

Kharkov State Medical University

According to the foreign literature data the using of open elongated straws for mammalian oocytes and embryos vitrification is one of the most perspective direction (Vajta et al., 1999). However, this method has the following disadvantages: re-crystallisation processes occurrence on the account of low thawing rates comparing with the freezing rates; the toxic influence of relatively high concentrations of cryoprotectant to biological object; not meeting the requirements of biological material storage in sterility due to application of open containers.

To exclude the above stated disadvantages we offer an approach for mammalian oocytes and embryos vitrification at heat exchange ultra-rapid rates, which is based on an application of closed elongated capillaries. As the containers for the biological objects we use plastic capillaries with outside diameter of 1.8, 1.0, 0.5, 0.3 mm. The concentration of equilibrating (vitrificating) cryoprotectant solution is 15% Gl (30% Gl + 0.73 M SA); 10%Gl (30%Gl + 0.58 M SA); 5% Gl (25%Gl + 0.58 M SA): - (25%Gl + 0.44 M SA) corresponding to each capillary type. The exposure time of biological object in equilibrating solution is 10 min, and that one in vitrificating solution is 1–1.5 min at the temperature of 20 ± 2 °C. Freezing was performed by direct plunging of capillaries into liquid nitrogen, and thawing was done by plunging into water bath, heated up to 40 °C, using the magnetic mixer for heat agent stirring. Freezing-thawing of capillaries with diameter of 0.5 and 0.3 is realized with application of thermo-protective cover for the exclusion of re-crystallisation at container transfer from liquid nitrogen to water bath. Freezing (thawing) rates are 28 (42); 104 (126); 198 (216) and 320 (380) °C/s, correspondingly. The cryoprotectant is removed in sucrose solution with concentration of 0.7; 0.6; 0.5; 0.3 M correspondingly for each established group during 10 min at room temperature. The integrity of frozen-thawed mouse embryos in groups is 73.3 (33/45); 77.1 (37/48); 90 (45/50); 95.8% (45/46) correspondingly.

It is established, that an increase of plastic capillary heat exchange rate in 10 times, comparing with a standard vitrification method (B##30#C/sec), allows the reducing of concentration by 15% and the increasing of integrity of de-vitrificated mouse embryos by 22.5%. However, the process of biological objects vitrification is more technological for capillaries with diameter of 1 and 1.8 mm, than for those ones of 0.3 and 0.5 mm. It is caused by distinct complications, arising both at the obtaining of the small diameter capillaries, and at using them in cryopreservation process. Basing on the data obtained we recommend the application the way with closed elongated capillaries with diameter of 1 mm in practice of mammalian oocytes and embryos vitrification at heat exchange ultra-rapid rates. This method allows the increasing of level of frozen-thawed biological objects integrity comparing with the standard ones and it is the most technological among the methods offered.

UDC 57.043: [576.371+591.3]: 599

Development of Mammalian Sexual Cells and Embryos Cryopreservation Technologies

L. V. GORBUNOV, A. V. MEDVEDOVSKIY

Kharkov Biotechnological center, Kulinichi

The problem of choosing of the priority in further development of biological material cryopreservation technologies demands to carry-out the comparative analysis of two alternative methods: the first one is based on application of slow freezing rates ($B_f \leq 100$ °C//min), the second one is done with high rates ($B_f \geq 2 \cdot 10^3$ °C/min). The advantage of the first method comparing with the second one is higher viability level of mammalian oocytes and embryos, and the disadvantage is its low technological ability.

An improvement of cryopreservation technology, based on slow freezing rates application, is probable with use of thermo-unit passive cooling in Dewar vessel neck ($B_f \neq$ const) (Bezugly N .D., Gor-

Матеріал, захищений авторським правом

bunov L. V., 1998). An increase in integrity level of frozen-thawed reproductive cells realises also when using the ultra-rapid freezing-thawing rates ($B_f \geq 5 \cdot 10^3$ °C/min) (Vajta et al, 1998).

We believe that further improvement of biological material cryopreservation technologies is necessary to carry-out by three directions. The first one is realised on account of cells dehydration ($B_f \leq 100$ °C/min, $B_f \neq$ const). The second one is based on vitrification of extra- and intracellular medium ($B_f \geq 5 \cdot 10^3$ °C/min). The third one is based on combined action of dehydration and vitrification effects. The aim of such combination is the joining of advantages and elimination of disadvantages, which are inherent to each of the two methods presented above.

An acceleration of the existing problem solution is probable when carrying-out not only empirical investigations, but also the theoretical ones. To describe quantitatively the dependencies of frozen-thawed object integrity level on intracellular medium crystal formation extent the following is necessary: to elaborate a method of quantitative estimation of sexual cells and embryos viability; to determine the critical zones and maximally permissible levels of extra- and intracellular crystal formation according to the type, composition and concentration of the cryoprotectants being applied under the determined freezing-thawing rates.

We have developed the device, designated for quantitative recording of crystal formation process within a wide concentration range of cryoprotectant (0–50%) and cooling rate (0–30 °C/s) with simultaneous registration of changes in temperature and electrical conductivity of studied solution and the following processing (Gorbunov L. V., 1998). To measure ultra high rates of heat exchange ($B \geq 6 \cdot 10^3$ °C/min) we have proposed the conductometric way, allowing to determine numeric values of cryopreservation conditions with the error not more than 3% for the containers with the medium under glycerol concentration $C > 30\%$ (Gorbunov L. V., 2000). The estimation method of the efficiency of the cryopreservation technology conducting based on consideration of relative viability of biological object was proposed (Gorbunov L. V., Bugrov A. D. et al., 2000). Application of this method contributes to the minimisation of the effect of individual properties of mammalian embryos, causing systematic error in the estimation results.

UDC 542.943/547.42

Ozonized Cryoprotectants and Cryopreservatives

A. A. KOSTYAEV

R&D Institute of Haematology and Blood Transfusion (R&DIHBT), Kirov, Russia

Problems, related to the studying of stabilising and preserving solutions for different biological objects and creation of principally new safe techniques of their low temperature preservation, determine the interest to structural changes in cryoprotective preparations molecule.

The aim of the work is to study (on the dynamics of absorption bands of functional chemical groups in UV, visible spectrum and IR spectra of substances) of the effect of sterilising regimens of autoclaving and ozonization on the structure of molecule of cryoprotective compounds. Monomers, alcohols, amides, artificial polymers of chemical compounds and multicomponent cryoprotective media (cryopreservatives) as non-sterile form ("A"), as well as sterilised by autoclaving ("B") according to traditional technology or ozonizing ("C") (A. A. Kostyaev et al. Patent № 2120211 RF). Infrared spectra of the samples were recorded with "Specord 75 IR" or "Specord M-80" spectrophotometers within the range of wave figures 4 000 – 500 cm^{-1}.

Comparison of the spectra of experimental samples of DMSO, Glycerolum, PVP, 1,2-propandiolum, A-378, Haemgelum etc. shows that all main spectral characteristics of studied substances are not distorted after the effect of sterilisation in the regimen of increased pressure and high temperature. The exclusion consisted in PVP and Gemodesum. In spectra of these preparations the changes in separate characteristics of frequencies after dosed effect with determined concentrations of ozone in pure PVP (in less extent) and PVP as a part of Gemodesum. New scientific data on the properties of cryopreservatives have been obtained. Important practical conclusions were done: PVP and PVP-containing preservatives are not subjected to sterilisation by ozone.

Together with leading cryobiologists of Kirov's R&DIHBT, other centres of Russia, Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine for the first time in Ukraine the atlases of infrared spectra of cryopreservatives for cells of animal's and plant's origin have been made. For the convenience and informability all substances and compounds in atlases were classified in accordance with their chemical origin. Besides, the description of the sample, chemical name, structural or gross-formula, molecular mass, temperature of melting and boiling, as well as other physical characteristics obtained from catalogues, were noted. In addition the source of reagent origin (if it is known) is given (the enterprise-producer or country). The atlases have received positive estimation of cryobiologists, physiologists, physicians, and experts in veterinary, botany and criminalists.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 57.043: [582.951.4+582.783]: 581.817

Cryopreservation Methods of Potatoes and Grape Meristems

T. F. STRIBUL, A. N. NOVIKOV, A. I. GRIGORASCHENKO

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

Problem of increasing of agricultural production quality, keeping of necessary diversity in initial biological material with aim of creation of new hybrids and sorts with heavy yield sets a task of plant genetic resources maintenance. Solving of this task is possible, in particular, by means of cryopreservation of reproductive organs, cells and tissues of plants, their low temperature storage and withdrawal on selectors request.

The method of plant tissues and cells cryopreservation includes its cultivation before freezing as a necessary stage. The next stage of biological object cryopreservation is its saturation with protective substances. In present work the technique of uniform saturation of meristem with cryoprotectant, as well as washing of frozen-thawed meristems out of protective medium is mastered.

In standard methods of meristem tissue cryopreservation dimethyl sulfoxide (Me_2SO) is used as a cryoprotectant. However there are the experimental data about Me_2SO toxic effect on biological objects, including genome, that makes a necessity for the limiting of its application as a cryoprotectant. That is why in this work we investigated along with Me_2SO several substances from another chemical classes (amides, diols, PEO) as cryoprotectants, and have chosen some perspective cryoprotectants, which usage at freezing presents good results in meristem viability.

The potatoes and grape meristem cryopreservation was performed with the slow multistage regimens approaching the exponential ones, with cooling rate at the first stage of 0.3–1 °C/min. We have made an laboratory set for freezing of meristems with slow cooling rates. In this case we used the most efficient way for elimination of overcooling in container by meristem freezing.

We have made also the laboratory models for high rates of meristem freezing and thawing using powder cooling carrier and mercury. It allows the increasing of object cooling and freezing rate at the first cryopreservation stage in approximately 5 times comparing with traditionally used fluid nitrogen vapours (at freezing stage) and water bath (by warming).

The potatoes meristem was frozen with the slow regimens (down to –40 and –196 °C) and with high ones (down to –196 °C). The grape meristem was frozen only with slow regimen.

After thawing the meristems were cultivated during 2–3 weeks. The viability estimation was visually carried-out on the maintenance of green coloure in meristem cells and on its growth. The viability of frozen-thawed meristems both after the slow freezing, and after the rapid one was in various cases from 26 up to 70%.

UDC 547.422: 57.043: 591.463.1: 636.5

Cytotoxicity and Cryoprotective Activity of Diols, Amides and Their Mixtures at the Fowl Sperm Cryopreservation

T. P. LINNIK, O. V. BIZIKINA

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

R&D Institute of Poultry of the Ukrainian Academy of Agricultural Sciences, Kharkov

We studied the cytotoxicity and cryoprotective activity of 16 compounds of two homologous rows: diols, amides and their mixtures at the fowl sperm cryopreservation.

It is shown that amides cause less damages in cells before freezing comparing with diols, in case when adding of them to sperm suspension is performed at the temperatures from 0 up to 5 °C. It was found, that diols and amides had affected in different ways the head membrane safety and acrosome integrity, that allowed us making a conclusion about different action of these two substance classes on various sperm organellas before freezing. Basing on obtained dependence of diols and amides cytotoxicity versus temperature we have assumed, that amides damaging action on fowl sperm is of chemical nature, and that one for amides is not only of chemical, but also of osmotic nature, with the primary contribution of the latter. The effect of structure and physical and chemical properties of amides and diols on mechanism of their cytotoxic action is under discussion.

It was discovered that cryoprotectant mixtures based on diols and amides caused significantly lesser damaging effect on fowl sperm before freezing compar-

Матеріал, захищений авторським правом

ing with certain substances. In this case the lowest cytotoxicity decrease was observed at the incubation of sperm with combination of amides and diols in 1:1 and 1:2 ratio.

It is established that in row of amides the best cryoprotectants are N,N-dimethylformamide (DMFA), N-methylacetamide (MAC) and N,N-dimethylacetamide (DMAC), in row of diols these are ethylene glycol (EG), 1,2-propane diol (1,2-PD) and 2,3-butane diol (2,3-BD). Taking into account the sperm integrity after thawing, these substances can be distributed according their cryoprotective activity decrease as follows:

MAC → DMFA → DMAC → 1,2–PD → EG → 2,3–BD,

At the same time another distribution is observed in recovery of sperm fertilizing ability:

DMFA → DMAC → 1,2–PD → MAC → EG → 2,3–BD.

That is why we offer a new criterion for estimation of cryoprotective activity of substances: this is the normalised mean value of the sum of all studied sperm safety indices after freezing-thawing. We have studied the dependence between cryoprotective activity of substances and their structure and physical and chemical properties. It was found the statistically true monofactor correlation between cryoprotective activity of the substances studied and their cryoscopic constant. We offer the using of cryoscopic constant in addition to another hydrophilic characteristics of substances in pre-experimental screening of effective cryoprotective agents. We are discussing several aspects of diols and amides cryoprotective action mechanism.

It is shown that amide+diol and amide+diol+diol mixtures surpass the separately selected cryoprotectants in their cryoprotective activity. The highest indices of sperm morphological safety after freezing-thawing were obtained using the following protective media: DMFA + 1,2-PD and DMFA + EG + 1,2-PD in 2:1 and 1:1:1 ratio, correspondingly. Obtained results testify the perspective of using the complex cryoprotectant compositions based on amides and diols, that allows both the decrease of their cytotoxicity and increase of level of morphological and functional safety of fowl sperm after freezing-thawing.

UDC 578.083: 612.646: 615.361.014.41

Cryopreserved Biologically Active Fluids as a Component of Culturing Medium for Human Gametes and Embryos *In Vitro*

V. I. GRISCHENKO, M. P. PETRUSHKO, A. G. GERODES, V. I. PINYAEV

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

The possibility of usage of cryopreserved fluids at the stage of culturing of gametes and embryos in the programme of IVF has been studied. This studying comprised 571 married couples. Induction of superovulation was carried-out by follicle stimulating hormone (Metrodin "Serono") at the background of desensitisation of hypophysis by agonists of gonadotropin releasing-hormone (Suprefact "Hoechst"). Follicular development was estimated under the control of transvaginal echography. When dominant follicle reaches an optimal size, resulting dose of 5000-10000 IU of human chorionic gonadotropin (Profasi "Serono") was introduced. In 34–46 hrs after its introduction oocytes were fertilised by actively motile fraction of spermatozoa and cultured in nutritive media. Embryos were transferred into uterus in 48 hrs after revealing of pronuclei. Before embryo transfer morphological evaluation of embryos was accomplished.

Four experimental groups were investigated: in the first group – standard conditions of culturing (control); in the second one embryos were co-cultured at monolayer of frozen-thawed cells of cumulus and granulesa. The third group made embryos, which were co-cultured with 15% cryopreserved human follicular fluid and in the fourth – the embryos, co-cultured with 15% cryopreserved fetal serum.

We observed no statistically true differences in qualitative assessment of oocyte fertilisation and development of embryos up to 8-cellular stage in the control and studied groups.

Fertilisation was noted in 64% of oocytes of the first group, 63% – in the second, 60% – in the third and 58% in the fourth; 83, 95, 98 and 89% of embryos, correspondingly reached 8-cellular stage. Assessment of the quality of embryos enabled to establish that in the control group the embryos with the signs of fragmentation made 62%, meanwhile in other groups made only 16, 18 and 12%, correspondingly.

Culturing of embryos in frozen-thawed liquid and fetal serum does not affect the frequency of fertilisation, but considerably reduces the number of embryos with the signs of fragmentation.

The presence of frozen-thawed follicular fluid, serum and cells of cumulus and granulesa in nutritive medium of culturing medium creates such favourable biological background, which stipulates normal development and preservation of embryos in culturing process, that leads to successful implantation and development of pregnancy in the result of treatment with IVF method.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 615.361.018.53.014.413.08

Leukocytes Preservation by Freezing with New Cryoprotectant According to Exponential Program

E. P. SVEDENTSOV, T. V. TUMANOVA, S. A. KHOMYAKOVA, S. V. UTEMOV, A. A. KOSTYAEV, A. N. SEMENOV

Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences

R&D Institute for Blood Transfusion, Kirov, Russia

We have elaborated a cold-protecting solution for freezing the human leukocytes under moderately low temperature is on A-378 substance, possessing cryoprotective effects and low toxicity (LD_{50} is 15.5 ± 0.6 k/kg of mouse body mass), antioxidative, citric acid characteristics, participating in the Krebs' cycle and promoting to the recovery of cell bioenergetics after its release out of a reversible cold anabiosis, and bidistilled water, *pH* 7.0–7.4 in the solution. Leukocytes suspension was mixed with cryopreservative agent in 1:1 ratio. Cell equilibration in a final solution was carried-out during 20 min. Leukocytes were cooled according to two-step exponential program down to –50 °C. Cell thawing was done in water bath under 38 °C within 45–60 s with shaking of plastic container 3–4 times/s. We have carried-out 31 laboratory experiments. After freeze-thawing 82.0 ± 10.0% of cells on an initial number were stored under an optimum cryopreservative composition. The sample with vital dye revealed 8.0% of viable leukocytes. Phagocyte activity of leukocytes made 76.0 ± 5.0%.

The obtained data testified to a manifested cryoprotective activity of new cold-protecting solution and possibility of its efficient application for leukocytes freezing in plastic containers according to exponential program under moderately low temperature.

UDC 57.043: 591.3: 598.6

Cell Freezing of Hen Early Embryos

M. T. TAGIROV, A. B. ARTEMENKO, Yu. V. KALCHENKO

Institute of Poultry Breeding of the Ukrainian Academy of Agricultural Sciences, Borki village, Kharkov region

Cryopreservation of birds sperm and the accumulation in a low temperature bank of its stock do not allow to rapidly recover the birds disappeared species, breed or line. Embryo cryopreservation would contribute for this task solving within one generation. The freezing possibility of the birds embryo an anterior part down to the temperature of liquid nitrogen was demonstrated even in 1954, but it is hardly possible to obtain valuable species from such embryo.

At the Institute of Poultry Breeding of the Ukrainian Academy of Agricultural Sciences the investigations on the method development for the cryopreservation of hens embryos, isolated from freshly posed eggs, have been carried-out. Embryos were frozen under 1,2-propanediol (PD) protection down to the temperature of –79 °C, thereat their integrity made 24%. Cooling down to lower temperatures was accompanied by a death of all embryos. The first information on the creation of hens chimeras, using the injection of embryonic cell through a hole in the egg shell of the corresponding development stage, appeared in 1990. This fact allowed to considerably widen the possibility of bird genofond preservation by means of cryopreservation of embryonic cell suspension, kept the totipotent properties. Moreover the cryopreservation of a cell suspension is the easier task, than a whole embryo with a complicated structural organization with weak intracellular links.

The method for embryonic cell cryopreservation has been developed. Dimethylsulfoxide (DMSO) under final concentration of 10% was used as cryoprotectants with its slow step-by-step introduction into the embryonic cell suspension at 20 °C. Cells were cooled with the rate of 1 degree/min down to –30 °C with the following immersion into liquid nitrogen. Thereat the cell integrity, determined by means of a luminescent dye ethidium bromide, made 80–90%.

When developing the method of cryopreservation we checked the toxicity of DMSO, glycerol (GL), ethylene glycol (EG) and 1,2-PD by means of a long-term incubation of cells in the medium, containing a cryoprotectant. Cryoprotective compounds were placed in the following order according to their toxicity augmentation: DMSO, GL, EG, 1,2-PD. It was earlier demonstrated, that 1,2-PD, manifested the least toxicity on early hens embryos. It is probably explained by the fact, that the embryos were in the medium with 1,2-PD only within 1 hour and, may be

Матеріал, захищений авторським правом

it causes a minimum effect on intercellular interactions, determining embryo development.

However, an efficient time of a cryoprotectant effect on cells during their cryopreservation does not exceed 1–2 hours. Cell membrane integrity, determined by staining with ethidium bromide, does not provide an objective estimation of these cells functional state. Therefore in order to compare the efficiency of freezing under DMSO and 1,2-PD protection, the viability of cells was determined in the culture (the degree of cell adhesion to embedding). The number of adhered cells after the incubation in the solution of a corresponding cryoprotectant within 1.5 hours made 44.3 ± 5.1 and $75.2 \pm 2.3\%$ when using DMSO and 1,2-PD, correspondingly (at $P < 0.0001$). The number of adhered cells after freeze-thawing made 37.0 ± 5.9 and $67.4 \pm 5.9\%$ when using DMSO and 1,2-PD, correspondingly (at $P < 0.01$). Thus, when cryopreserving embryonic cell suspension 1,2-PD should be used as a cryprotectant.

UDC 615.361.013.68.014.413

Cryopreservation and Clinical Application of Umbilical Cord Blood Haemopoietic Cells

P. N. PEREKHRESTENKO, G. T. GLUKHENKA, T. O. KALINICHENKO, S. O. SIVKOVICH, G. A. GUBAREVA, R. P. PAVLYUK, N. K. SKACHKOVA, M. K. ALGAZINOVA

Institute of Haematology and Transfusiology of Acad. Med. Sci. of Ukraine, Kiev

Institute of Oncology of Acad. Med. Sci. of Ukraine

The methods of low temperature preservation of separated and non-separated cord blood (CB) haemopoietic cells (HC) are developed. The priority is patented (Patent of Ukraine № 30014 of 15.11.2000).

The separation is based on erythrocyte sedimentation method using serum-replacing solution, containing 6% of hydroxyethyl starch ("Stabizol"). This method provides a maximum amount of nucleated cells, their high viability, a minimum amount of cryoprotectant and requires no special preparation of thawed suspension for transfusion.

For long-term stocking of CB HC the developed techniques of both separated and non-separated CB preservation are used. The indications for haemopoietic tissue application are the immune haemopoiesis depressions of various manifestation stages, which is the basic problem appearing at chemo- and radiotherapy of oncological patients. Some of them are patients with malignant lymphomas, where non-adequate treatment of haemopoietic depression leads to negative consequences: intensification of cytotoxic syndrome expression as dramatic myelodepression, when continuing the anti-tumour therapy, or significant decreasing of radical treatment efficiency, when interrupting it for uncertain long-term period.

Cord blood is a tissue with high HC content, which is relatively immune tolerant. Anti-tumour cytotoxicity potential, which is determined by the content and maturity of natural killers (NK) and NK-similar cells, allows us the assuming of anti-tumour efficiency of this tissue.

Taking into account the above stated arguments we should consider the CB using in oncologic clinic as the perspective one. The aim of investigation was the study of efficiency of malignant lymphoma patients putting out of haemopoiesis hypoplasia state using the cryopreservated CB HC.

For clinical application we used the technique of non-separated CB cryopreservation with following removing of erythrocytes haemolysate out of thawed cell suspension and re-suspending of cells in serum-replacing solution.

Mean cryopreserved CB cell suspension volume for clinical application in malignant lymphomas patients was 50 ml with nuclear cell amount not less than $1.5 \cdot 10^9$ and mononuclear cells of $(0{,}5–0{,}6) \cdot 10^9$. The CB cells viability was $89{,}00 \pm 0{,}61\%$. Prior to the CB HC transfusion it was necessary to determine group and Rh characteristics and individual matching of blood.

The transfusions' efficiency consisted in an increase of peripheral blood parameters, cell and humoral immunity, including all parameters of neutrophiles phagocytic activity, that was noted to the 6–7th day. The achieved effect was stable and did not require following correction, that allowed us to provide the chemo- and radiotherapy without breaking the treatment. Thereat the dynamics of foetal haemoglobin content in patients' peripheral blood before and after the transfusion allows us to state about its statistically true increase, that was considered as an index of CB cells temporary engraftment.

Thus the CB HC action mechanism at treatment of chemo- and radio-depression of oncological patients haemapoiesis is caused by cells temporary engraftment, humoral stimulation of recipients haemapoiesis, resulted from CB cells unique capability to autocrine production haemapoietic growth factors. In this case the transfusions' efficiency is the true criterion for biological integrity of cryopreserved HC.

The absence of any post-transfusional responses in patients is the confirmation of major foreign CB investigators' opinion about the CB immune competent cells tolerance.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 615.361.014.41: 579.841.11.861.2

Keeping of Viability and Biological Properties of *Staphylococcus Aures* and *Pseudomonas Aeruginosa* Bacteria during Cryopreservation Process

I. P. VYSEKANTSEV, T. M. GURINA, O. V. SHAPOVALOVA, O. N. BELOKON

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

The aim of investigation was to study the effect of cooling regimens and following storage in liquid nitrogen on viability and biological properties of *S. aureus* ATCC 25 923 and *P. aeruginosa* ATCC 27 853.

Meat-peptonic broth with 5% sucrose was used as preserving medium. Bacteria suspensions were frozen in 2 ml cryotubes "Greiner-Labortechnik" (Germany). It has been established that freezing according to different programmes can result in a statistical reduction in the number of viable bacteria. During following storage of the samples in liquid nitrogen within 1 year the number of viable bacteria did not change, as well as no changes or losses of some biological properties of bacteria.

We studied biological properties of *S. aureus* ATCC 25 923: hemolysis of erythrocytes, lecito-vitellase reaction, synthesis of plasm coagulase, catalase, DNA-ase, phosphatase, acetoin, capability to fermentation of carbohydrates of mannite, maltose, sucrose, mannose.

Biological properties of *P. aeruginosa* ATCC 27 853 were studied: synthesis of pyocianin and pyoverdin pigments, capability of the growth at 42 °C on selective medium "Pseudomonas APC", synthesis of cytochrome oxidase, nitrate reductase, arginine hydrolase, gelatinase, sensitivity to barium chloride, mannite oxidation on the medium Hew-Leyfson, motility, formation of hydrogen sulphate, capability to fermentation of carbohydrates of glucose, sucrose, inosite, absence of enzymes, oxidating sorbitol, maltose, ramnose.

The obtained results testify to a high efficiency of storage at stable temperature of liquid nitrogen as the cryopreservation way for *S. aureus* and *P. aeruginosa* bacteria.

UDC 579.873.71: 57.043.86.132

Properties of Streptomyces Fradie Industrial Strain Depending on Storage Conditions

A. E. ANANYINA

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

The work is devoted to investigation of the properties of the spore culture of Streptomyces fradie cells, that is producent of thylosin antibiotic, after cryopreservation, lyophilization and storage.

Spore suspensions of monoisolates with different antibiotic activity were frozen in 1ml metallic containers directly by immersion into liquid nitrogen with further storage in it (–196 °C). Culture was lyophilized in penicillin bottles by means of UZV-2 device (Special Construction Bureau with Experimental Unit of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine) according to elaborated earlier programs. When lyophilizing the following protective media were used: 1) Gauze medium 1; 2) CP-15 regulated medium; 3) CP-15 medium with adding of 0.1 mg/ml coffein-benzoate (like as agar embedding); 4) 5% skimmed milk; 5) 10% skimmed milk. The samples of lyophilized culture were stored under the temperature of 4 °C in the penicillin bottles rolled with metallic covers. After the storage of frozen spore culture under liquid nitrogen within 11 years no change in morphological and cultural properties were noted, the level of specific activity and viability made 98–100% in comparison with the control. An increase of the antibiotic activity after a short-term storage of the cryopreserved samples (3–7 months) of the *Streptomyces fradie* spore culture was in some cases an interesting fact.

Integrity of the lyophilized culture properties on the 1 and 2 media was provided within 3–7 months, an increase of storage terms resulted in the decrease of viability and antibiotic activity, a high percentage of viable cells was noted within a year just when using 3 and 4 protective media. Storage of the spore lyophilized culture in the medium 5 did not cause the change in properties and cell death within a long period of time. Thus, even after 12 years of storage the viability and level of specific activity have remained within the limits of 80–90% in comparison with the control.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 57.043.086.13

Low-Temperature Equipment for Cryobiology

N. F. IVCHENKO, S. N. IVCHENKO, A. V. MELNIK

"Kholod" Company, Kiev

The data on the elaboration of the series of low-temperature compression refrigerators with operating temperatures from –40 to –150 °C and efficient volumes from 5 up to 500 dm^3, intended for the biomaterials storage, produced by means of the "Kholod" company, were presented.

Equipment was made basing on monocascade cooling cycle with an internal regeneration, working with multi-component mixtures of coolants. Main differences of such an equipment in comparison with two- and three-cascade ones, major principles for the designing of cooling aggregates working with multi-component mixtures, operation peculiarities are presented, as well as systemic approach for the construction of the same low-temperature machines was shown.

A special attention was paid to the questions of small-sized machines designing, and the notions on the equipment development named as "Personal cryogenic banks" were presented.

UDC 615.361.811.013.014.413: 547.42: 57.085

Cryopreservation of Rat Embryonic Neuronal Cells Using DMSO

A. N. SUKACH, A. Yu. PETRENKO, M. S. PLACHINTA

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

Nowadays cellular transplantation, which is a new medical direction, has been actively developed. In particular, for treating various neurogenerative diseases transplantation of embryonic neuronal cells (ENC) is used. However their wide application is limited by the absence of an efficient cryopreservation method due to a high ENC susceptibility to low temperatures effect. During ENC cryopreservation the best results were obtained when using DMSO cryoprotectant, however even in this case the viability of neuronal cells did not exceed 30%. Thereat the dependence of ENC integrity on the DMSO concentration has not been investigated. The aim of the given work was investigation of the effect of various DMSO concentrations on rat ENC under their cryopreservation with sucrose and saline media.

Experiments were carried-out in 12 pregnant white mongrel female rats of 12–18 gestation days. ENC were obtained according to specially elaborated method. All the operations were done at the temperature of 4 °C. For cells obtaining the Hanks' saline and sucrose media were used. DMSO solution in the corresponding medium up to 2, 5, 10 and 15% (volumetric percentage) concentrations was by drops added to the cell suspension. Cryoprotectant solution was added by the way, when the cell concentration was the same in all samples. ENC suspension (100–150 μl) was placed into special containers for freezing and incubated within 30 min in ice. The cells were frozen by a rapid exponential cooling with the stop at –25 °C down to the temperature of liquid nitrogen (–196 °C). Cell number was calculated in Goryaev's chamber before and after cryopreservation. ENC viability was estimated by staining with trypane blue vital dye. Cells were thawed at the temperature of 40 °C.

Conducted investigations demonstrated, that the medium composition affected ENC viability almost at the stage of their isolation. Viability of ENC, obtained using sucrose medium, was by 12% higher than with saline one. This dependence of cell viability on the medium composition had remained also after their cryopreservation. ENC viability when cryopreserving without cryoprotectant with sucrose medium made 23% and was by twice higher than in saline one. Such a dependence was also kept during neurocells cryopreservation using DMSO. When applying the cryoprotectants of 2, 5 and 10% concentration in sucrose medium comparing to saline one the cell viability was by 1.5; 1.3 and 1.4 times higher, correspondingly. It should be noted, that ENC freezing with various DMSO concentrations demonstrates directly a proportional dependence of the cell viability on the cryoprotectant concentration within the limits from 0 to 10% in both studied media. The maximum integrity of ENC was observed when cryopreserving cells in a sucrose medium, containing 10% DMSO. Freezing with 15% DMSO resulted in a sharp decrease of the cell viability due to its toxic effect.

Carried-out experiments testified to the preference of the usage of sucrose-based medium and 10% DMSO for ENC isolation and freezing. However, the necessity of further works on the improvement of the methods for ENC obtaining, and elaboration of the optimum method for their cryopreservation, should be noted.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 621.565

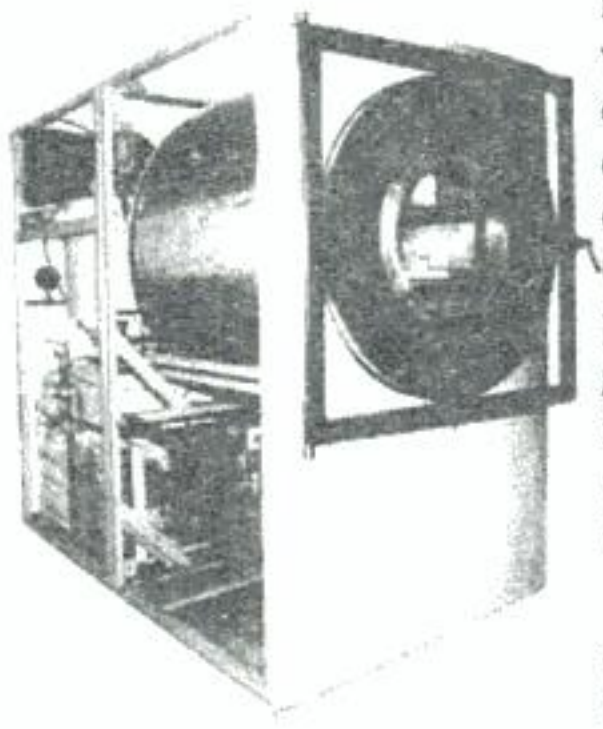
Sublimational Sets

A. M. POLONCHUK, V. A. SOKOLOV, V. N. BATRAKOV

Special Constructing & Designing Bureau with Experimental Unit of the Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

The series of sublimational (lyophilic) sets of collector and chamber type with the output from 0.1 to 25 kg of ice per cycle have been created. The temperature of desublimator is from –45 down to –196 °C. Cold sources are liquid nitrogen, refrigerating aggregates, Peltier elements. Controlling and operating systems of various levels of complexity. The sets enable to master the regimens and produce lyophilised preparations.

One of the recent developments is sublimation set USS25, which is designated for the production of sublimated biological preparations, protein blood components, food additives. The set is compact, consists of two pillars: vacuum and refrigerating. Loading hatch of the set can be mounted into the wall of sterile operating room. For refrigerating pillar of USS25 an original two-cascade refrigerating aggregate with air cooling was developed. The set is efficient, an average consumed power is 6 kW. The time of approaching to the regime is 1.5 hrs. During intensive drying the temperature of desublimator increases.



Controlling block allows to stabilise the temperature of shelves at any set temperature from the range –40 – +65 °C with the accuracy of ± 1 °C.

In the block the measuring and indication of pressure in the chamber, determined and current temperature of shelves, temperature of desublimator, object temperature (3 channels) are accomplished. Computer recording of the parameters of the process is foreseen.

The set is simple in operating. It can sublimate the object in different containers (0.5 l bottles, penicillin bottles, ampoules, and trays). Compulsory desublimator thawing is foreseen. The protection of refrigerating aggregate from overheating and phase loss is put.

Technical specifications of USS25:

Volume of removed moisture per 24 hrs	not more than 25
Range of operating temperatures of the shelves, °C	–40–65
Number of thermoregulated shelves, pieces	3 (4)
Distance between shelves 3 (4), mm	not less than 200 (150)
Desublimator temperature, °C	not more than –65
Limiting pressure in the chamber, Pa	not more than 10
Set power, kW	not more than 6
Overall dimensions	not more than 1 000 × 2 000 × 2 000
Mass, kg	not more than 700
Cooling of refrigerating aggregate	air

Power supply from mains of alternating current with the voltage of 380 V and frequency of 50 ± 0.5 Hz

Advantages: efficiency, compactness, air cooling, usage of ecologically free freons.

UDC 616.361.014.41: 611-013.11

Long-Term Storage of Spermatozoa: Is There Any Alternative To Cryopreservation?

G. Yu. MAKSUDOV, O. V. KABASHOVA, O. N. NESTERENKO, A. V. KHMELEV, G. I. EL-REGISTAN

Moscow zoo

Institute of Bee-keeping of Russian Academy of Agricultural Sciences, Moscow

Institute of General Genetics named by N. I. Vavilov, Moscow

Institute of Microbiology, Russian Academy of Sciences, Moscow

Cryopreservation is the main way of long-term storage of spermatozoa *in vitro*. However the development of the methods of gamete storage without freezing for the order "week–month" is also perspective. Many species of animals preserve sperm in genital tracts of females and receive the posterity in months and years after coupling (G. Yu. Maksudov, 1988).

It is known that different microorganisms possess specific system of autoregulation of the growth and development (A. S. Khokhlov, 1988). An increase of the concentration of microbe autoinductors of anabiosis (MAA) in culture stipulates reversible transition of microorganisms to anabiotic state. The action of MAA and their chemical analogous is not species-spe-

Матеріал, захищений авторським правом

cific. It has been shown that for example, MAA cause reversible dose-dependent effect on growth of culture of mice fibroblasts (O. N. Ilinskaya et al., 2000).

When searching for new approaches to preservation of genetic material *in vitro* there were conducted the experiments on studying the effect of MAA on sperm of drones and cranes.

Drones and queens were taken from the R&D Institute of Bee-keeping, sperm of cranes were obtained in the nursery. Sperm portions were transferred to vials. containing dissolvent and MAA solutions of certain concentrations. To estimate motility of spermatozoa after storage the samples were centrifuged (1 500 rot/min, 10 min) and re-suspended with fresh portion of dissolvent. Motility was assessed according to 5-grade scale.

In 1.5 hrs after addition of MAA thc motility of spermatozoa of drones significantly decreased and 3 hrs practically ceased. All period of storage they were immotile. In one month of storage the motility of washed-put spermatozoa of drones made 3 points under MAA concentrations 0,002 and 0,00002%. For the estimation of their fertilising ability after 7 and 14 days of storage 10 and 6 queens, correspondingly, were inseminated. The dissection showed the presence of spermatozoa in spermatheca of 7 queens (70%) among the first group and 4 among the second (66,6%). Thus MAA have dose-dependent effect on spermatozoa of drones.

We did not manage to perform completely the experiments with sperm of cranes due to extreme limit volume of available sperm. Immobilisation of gametes when adding MAA and partial recovery of motility after washing-out from MMA was noted. From our point of view these investigations should be continued.

UDC 57.086.13

Equipment for Low Temperature Preservation of Biological Objects

A. M. POLONCHUK

Special Constructing & Designing Bureau (SCDB) with Experimental Unit of the Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

For many years the SCDB staff have created the programmable freezers and equipment for thawing, designated for programmable cooling (thawing) of biomaterials in the containers. They are applied for freezing of bacterial and cellular cultures, nuclei-containing cells of blood, bone marrow, sperm and embryos.

Some technical characteristics of freezers and thawing equipment are as follows:

Temperature range	–160 – +40 °C
Range of cooling rates	0.1–30 °C/min
Cold source	liquid nitrogen
Presentation variant	stationary or mobile

Equipment for low temperature banks:

Low temperature biological storehouses with control systems;

Cassettes with packing of various construction;

Containers of multiple usage for the volume from 1ml to 500 ml

Supplying systems with liquid and gaseous nitrogen on the base of Dewar vessels from 34 to 500 l;

6 or 10 l's portable Dewar vessels

One of the most recent developments is ЗП5 – programmable freezer for cellular cultures. It consists of freezing chamber, coolant supplying system; programmable controlling block.

Freezing chamber provides two-stage cooling regimens and temperature stabilisation in the determined point. Plastic ampoules of 1.8 ml Nunc type (35–40 pieces) as well as plastic or aluminium packages are placed in it. Freezing chamber provides seeding (crystallisation initiation) in plastic ampoules under automatic regimen.



Supplying system with liquid nitrogen is accomplished on the base of 34 l's Dewar vessels X-34, provides the supplying of coolant in freezing chamber via electromagnetic valve under the pressure of 0.05 mPa, the indication of coolant level, blocking of evaporator under decrease of coolant level, coolant jettisoning.

Microprocessor block of programmable controlling provides:

the setting of cooling rates at the 1-st stage (temperature range, –20 ÷ – °C) from 0.2 to 10 °C/min;

the setting of cooling rates at the 2nd stage (temperature range –15 ÷ –160 °C) from 2 to 20 °C/min;

temperature stabilisation from 20 down to –160 °C for the period from 1 to 99 min;

automatic seeding at determined temperature;

reflection of main regimen parameters of freezing, microprocessor block has an interface device for presenting the parameters of cryopreservation on personal computer with the aim of its processing and recording.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 615.361.018.45.014.413.003.13

Economical Evaluation of Bone Marrow Cryopreservation at Regional Haematological Centre

A. A. KOSTYAEV

R&D Institute of Haematology and Blood Transfusion (RDIHBT), Kirov, Russia

Today more and more attention is paid to the investigation of prognostic value of the parameters of life quality in oncohaematology, taking into account the application of expensive highly technological interventions and nosological forms, having long-term chronic course and often irreversible development. Pharmacological and economical analysis allows to study economic expediency of the methods of patient's treating and make objective selection of maximally effective programmes (standards) of treatment under minimum expenses, that is extremely important under modern conditions.

The aim of the work is to comparatively and economically evaluate the cryopreservation methods for bone marrow with a high survival of myelokaryocytes under traditional regimen of slow linear cooling programmes in liquid nitrogen and rapid two-stage freezing with the stop at intermediate temperature of cell cold adaptation and storage in electrical freezers (–40 ÷ –80 °C).

The data of laboratory preservation of blood and tissues of Kirov R&D Institute of Haematology and Blood Transfusion for 2000–2001 years were used. We calculated (1 US$ equal to 29 Russian roubles) the expenses for the exfusion of bone marrow (the 1st stage), separation of myeloexfusate (the 2nd stage), preparation and cryopreservation of bone marrow (the third stage), thawing of bone marrow and its preparation to one operation of bone marrow transplantation (the fourth stage).

Salary on traditional and new methods made correspondingly 7.68 and 6.99; extra charges for salary did 2.73 and 2.48; material expenses did 923.11 and 927.44; expenses for laboratory accessories and special cloths did 212.79 and 204.22; equipment wearing, which costs more than 172.4 made 77 393.92 and 45 412.92; with the cost under 172.4 did 2 500.97 and 2 439.75; charges did 8.55 and 14.5; indirect expenses made 751.93 and 891.306. In a whole the expenses were, correspondingly, 81.054.98 and 49.012.52 US$.

Thus economical effect in respect of bone marrow preservation under the regimen of rapid two-stage freezing in electrical freezers under moderately low temperatures in comparison with traditional linear freezing method in liquid nitrogen makes for 1 operation 32 042.46 US$ or 929 231.34 Russian roubles and generally consists of reduction of the expenses for the performance of the 3rd stage of operation taking into account the application of electrical freezers, cheap and non-toxic liquid coolant, elastic packing materials and simplification of technology. The data of conducted studies testify to the fact that application of the method of bone marrow preservation by freezing under moderately low temperatures in the regimen of rapid two-stage of freezing in the laboratory of preservation of blood and tissues of Kirov's RDIHBT is economically profitable and clinically expedient.

UDC 615.361.018.51.014.413: 547.422

Mechanisms for Erythrocytes Stabilization to the Effect of Non-Penetrating Cryoprotectants and Low Temperatures. Elaboration of the Washing-out Method for Cryopreservation

L. A. BABIJCHUK, N. G. ZEMLYANSKIKH

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

The ways for cellular suspensions cryopreservation, existing nowadays, are based, generally, on the application of penetrating cryoprotectants, which are removed after the cells thawing before a transfusion. This fact significantly complicates the method for cryopreservation and results in the loss of the part of cells during the period of their washing. Therefore, from our point of view, elaboration of the washing-out cryopreservation methods, in which non-penetrating cryoprotectants are used, is more perspective.

Carried-out by us experiments, showed, that the temperature decrease of the erythrocytes incubation with PEO-1500 down to 0 °C and its injection by dose into the suspension resulted in a reduction of the cryoprotectant, binding with cells, that correlated with an increase of the erythrocytes stability to the effect of freeze-thawing factors. Such a regimen during the cryopreservation limits the cell damage and promotes to keeping the barrier properties in a plasmatic membrane, that mainly is determined by the modification of cytoskeletal proteins, maintaining the shape and volume of the cells under experimental conditions.

It has been revealed, that phosphorylation level of the spectrine β-subunit in the PEO treated erythro-

Матеріал, захищений авторським правом

cytes under 0 °C was by twice higher than in native cells. Under these conditions a spatial location of the cytoskeleton proteins, close to native one was kept, the data on the effect of the protein-binding diamide reagent on the formation of the aggregate protein complexes in the erythrocytes, treated with a cryoprotectant under various temperatures, testified to this fact. The change in the concentration of intracellular Ca^{2+} is one of the mechanisms of the regulation in a structural state of the cytoskeleton proteins, providing a constant dynamics of associative bonds between different proteins, phase transitions in some components and cytoskeleton in the whole. We succeeded to reveal an 2–3 times increase in Ca^{2+} concentration in cells when adding PEO-1500 and under 0 °C, that was confirmed with the data of other researches, which demonstrated that hyperosmotic compression in a cell, stipulated by water loss, resulted in an increase of the rate of Ca^{2+} entry into erythrocytes.

Thus, the data, obtained when studying the mechanisms of the temperature osmotic stabilization of erythrocytes to the effect of the factors of low temperature preservation, testified, that structural and functional modification of the membrane proteins in cells, which character and direction is determined by the temperature effect on the cytoskeleton proteins and systems, regulating their structural and functional state was in the base of this phenomenon.

Basing on the conducted fundamental studies the washing-out method for the erythrocytes cryopreservation with PEO-1500 non-penetrating cryoprotectant, that allowed to significantly increase the cell viability after cryopreservation and keep structural and functional indices in erythrocytes at quite a high level, has been elaborated.

UDC 615.361.014.41: 616-006.6

Cryopreservation of Guerin Carcinoma Cells

T. F. PETRENKO, N. E. UZLENKOVA, O. V. KUDOKOTSEVA, T. M. GURINA

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

Guerin carcinoma as a model system is used when screening antitumoral preparations. The necessity of tumoral cell cryopreservation occurred in order to avoid the constant reculturings in 13–17 days.

When selecting the cryopreservation regimen we used three programs, developed at the Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Nat. Acad. of Sci. of Ukraine for other tumoral cells (Erlich carcinoma, recultured cell lines):

— cooling with the rate of 3–4 °C/min down to –70 °C with following immersion into nitrogen (program I);
— cooling with the rate of 30–40 °C/min down to –28 °C, a 15 min stop at –28 °C, then the immersion into nitrogen (program II);
— rapid cooling down to –196 °C by a direct immersion into nitrogen (program III).

In the first series of the experiments the cell suspension of Guerin carcinoma was frozen in physiological solution according to 3 programs without cryoprotectant. The programs I and II provided only about 20% of viable cells. Rapid cooling resulted in almost complete cell death. In the second series of the experiments the cells were frozen in physiological solution with 5 and 10% DMSO according to three programs. The introduction of cryoprotectant into the medium of freezing increased the cell survival up to 80–90%. No differences in cell survival, frozen under DMSO protection in the studied concentrations, as well as frozen according to the programs I and II, were found. The usage of cryoprotectant at the freezing by means of a direct immersion of samples into a liquid nitrogen (–196 °C) preserved about 10% of viable cells.

The main index when selecting the regimen for cryopreservation was the inoculation ability of Guerin carcinoma cells to laboratory animals. Cell suspension was frozen-thawed at 41 °C. The frozen-thawed suspension was subcutaneously introduced to breedless rats by 0.5 ml in respect of 1 g of tumoral tissue per 5 ml of physiological solution.

Starting from the 7th day the dynamics of growth of native and cryopreserved tumors were observed. The tumors formed in all cases, excepting the group of animals, to whom we inoculated the cell suspension, cooled by the immersion into a liquid nitrogen without cryoprotectant. At the same cooling regimen using a cryopretectant the tumors developed, but their sizes were considerably smaller than the control ones and the death of animals occurred 2 months later.

At the inoculation of cell suspension, frozen according to the programs I and II with a cryoprotectant, the dynamics of tumor growth were slightly slowed down in comparison with the control group and the death occurred 10 days later. In the group of animals to whom the cell suspension, frozen by the programs I and II without cryoprotectant was inoculated, the tumors formed, but the growth was lower than in the control and two experimental groups, where the suspension was frozen under cryoprotectant usage.

Thus, Guerin tumor's cell suspensions can be cryopreserved according to the programs developed earlier for other tumor cells using 5% DMSO as a cryoprotectant.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 57.043: 591.463.1: 599.742.7

ATP Concentration in Cryopreserved Sperm of Amur Leopard

G. Yu. MAKSUDOV, A. S. EROKHIN, K. EVGENOV, E. HARTLEY

Moscow Zoo
R&D Institute of Pedigree Breeding, Moscow region, Lesnyye Polyany
Institute fur Zoo- und Wildtierforschung, Berlin, Germany
Zoological Society of London, UK

Amur leopard (AL) is the most endangered species of leopard (IUCN (E)). Its number in nature is less than 100 individuals and up to 20 of them inhabit at the territory of Russia. In captivity about 170 ALs are kept, that is 2/3 of general number of the world population. In Russia zoos to January 1st, 2000, 15 males and 10 females of AL have been kept, in Moscow zoo there are 6 individuals (3 males and 3 females).

Within the frames of European programme of preserving rare species twice (September 1999 and May 2000) reproductive state of males of AL of Moscow was estimated. Immobilisation, veterinary observation, ultrasound investigation, electroejaculation and cryopreservation were performed according to standard methods for large feline spécies (G. Yu. Maksudov, 1996). ATP was determined by bioluminescent method. The results of experiments of the year 1999 were published earlier (A. Hartley et al., 2001). The data of the year 2000 were summarised in Tables 1 and 2. From them proceeds that the motility of AL spermatozoa after cryopreservation reduced approximately in 5 times. Direct dependency was not found between ATP concentration and motility of spermatozoa before and after cryopreservation. Sperm of leopard № 2 in both cases had the lowest motility and the highest ATP concentration.

Probably, standard protocol of feline's sperm cryopreservation for AL should be corrected. Data on ATP content in frozen-thawed sperm of other feline species are not available for us.

Table 1

Effect of cryopreservation on the motility of spermatozoa of amur leopard

Motility of spermatozoa, %	Leopard № 1	Leopard № 2	Leopard № 3	Average
Native	50	20	80	50
After equilibration	35	15	50	33,3
Just after thawing	10	4	15	9,6
1 hr after thawing	0	0	0	0

Table 2

ATP concentration in native and cryopreserved spermatozoa of amur leopard

ATP concentration, $nM/10^8$ cells	Leopard № 1	Leopard № 2	Leopard № 3	Average
Native spermatozoa	9,15	11,2	10,3	10,2
Cryopreserved spermatozoa	1,0	1,2	0,7	0,96

UDC 615.361.014.41: 57.086.13

Peculiarities of Long-Term Storage of Biological Objects in Low Temperatures Banks

A. S. SNURNIKOV, N. G. KADNIKOVA, T. M. GURINA

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

The network of low temperature banks for storing a standardized biological material has been created all over the world. One considered, that the main advantages of low temperature storage were as follows: low probability of contamination, stability preservation of morphofunctional properties of biological material, expenditure of insignificant time period and materials for service treatment of frozen samples. However the recent investigations performed at our Institute demonstrated that a liquid nitrogen could be a source of viral and bacterial contamination of frozen samples during the process of long-term storage in liquid coolants. The exploitation experience of different kinds of containers confirms the fact that during the storage and thawing the possibility of their seal failure with the following content penetration into a liquid nitrogen and vise verse the penetration of microflora from a liquid nitrogen into unsealed containers are not excluded.

In order to decrease the danger of the stored material contamination we have developed the complex of organizational and technical measures. At the Institute within several years we have investigated bacterial contamination of each batch of liquid nitrogen used for refilling the storehouses, as well as the detritus from a nitrogen layer closed to the bottom of low temperature storehouses. We have created a quarantine storehouse for storing the biological material, suspected to be contaminated by viruses of infection diseases until obtaining the results of bacteriological and virologic control. The revision and disinfection of storehouses and equipment are carried-out from time to time.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 576.353.2: 57.043.085

Disorder of Mitotic Cycle in Mice Embryos after Cryopreservation

O. B. KHROMENKOVA, G. F. ZHEGUNOV, G. V. ZHERNOKLEV

Kharkov State Medical University

Kharkov Biotechnological Center, Kulinichi

In the cryobiology of reproductive cells besides the investigations, directed to the maximum viability of gametes and embryos, the questions on the studying of possible mutagenous influence of cryoeffect are quite actual. It is very important to know this for the prevention of possible genetic disorders in the progeny, obtained from frozen-thawed embryos.

Investigation of the mytotic cycle violation in mice embryos after cryopreservation was the aim of given work.

Objects under study were 8-cell early and compactisized embryos, obtained from superovulated F_1(CBA×C57Bl) females mice. Embryos were cryopreserved by the method of slow freezing: rapid thawing with 1 M glycerol as a cryoprotectant. Besides the viability estimation of frozen-thawed mice, cytological analysis of the air-dried embryos preparations has been carried-out.

Cytological analysis revealed pyknotic nuclei in the morphologically normal blastomeres of embryos, that testified to the fact, that not all blastomeres survive after the freeze-thawing procedure. The fate of pyknotic nuclei from the general blastomeres number made 12.77% for early ones and 12.18% for compactisized embryos ($p > 0.05$). However the death of the part of blastomeres in the 8-cellular embryos does not prevent their further development: after thawing under *in vitro* conditions 81.40% of early ones continue their cleavage, in the control this index made 88.89%) and 72.44% of compactisized embryos (in the control it made 85.71%).

Total number of mytosis pathologies in the frozen-thawed compactisized embryos was statistically and significantly higher (13.12%), than in the frozen-thawed early embryos (5,98%) and in the control group (5.5% in early and 3.9% in compactisized embryos). Mitosis pathologies were connected both to the injury of cleavage spindle (40.0% in early and 44.05% in compactisized embryos) and chromosomes (60.0% in early and 55.9% in compactisized embryos). Thereat among the abnormalities, connected to the damage of chromosomes, the most frequent were: impairment of ploidy in early 8-cellular embryos, swelling and adhesion of chromosomes in compactisized embryos. Among the abnormalities, connected to the damage of cleavage spindle, monocentrical mytoses in 8-cellular embryos and clot-like metaphases were observed in 8-cellular compacticised embryos.

Pathological mitosis is one of the mechanism of the mutations appearance, in particular of somatic uneuploidy. However in our investigation no increase of the level of uneuploidy in the mice embryos after cryorpeservation (2.74% in early and 3.03% in compact embryos) in comparison with native embryos (3.0%) was noted. This is, probably, connected to the fact, that the level of uneuploidy was estimated in the first mitotic cycle after an extreme effect, and mitosis pathologies have not yet transformed into genome abnormalities.

UDC 636.2.082.453.5

Using of Refrigerating Machines for Storage of Biomaterials

V. V. SIVOPLYAS, F. I. OSTASHKO, N. F. IVCHENKO, S. N. IVCHENKO

JSC "Kholod", Kiev

Kharkov Biotechnological Center, Kulinichi

Present system of agricultural animals reproduction is based on long-term storage of sperm in liquid nitrogen. In Kharkov region the storage expenses make in average 243 hryvnyas per year for each X-34M Dewar vessel without accounting nitrogen loss during its transportation. Novel technology, elaborated by JSC "Kholod" and SSPU "Embrion", is based on application of refrigerating aggregate KHX-135-5, which is able to maintain the temperature within the limits of $-80 \div -150$ °C. This aggregate works with multicomponent functional mixture, using an electric energy of 110–220 V. Its service complexity is comparable with domestic freezer. The aggregate has an operating chamber of 5 l volume, developed on base of standard Dewar vessel. For cases of emergent electricity breakdown the machine has a freeze accumulator, that allows the maintenance of necessary temperature in operating chamber up to 3–5 days. In biomaterials storage regimen this aggregate uses about 2 kW·h of electrical energy per day, that makes according to current electricity tariff about 90 hrv per year for one freezer. Reducing of expenses for biomatherials storage will be much appreciable when using higher temperatures. According to the data of

Матеріал, захищений авторським правом

Ostashko F. I., Pushkar N. S., Belous A. M., Vishnevskiy V. O. and number of foreign authors the recrystallisation processes appear from temperature of –50 °C in stored biomaterial texture. Besides, these processes occur in intercellular area, and not in sperm protoplasm, which remains intact. Studies of activity, viability and fertilizing ability of sperm, divided into two groups with separate ejaculate method and stored for a long term in liquid nitrogen (the first group) and freezing aggregate chamber at temperature of –130 °C (the second group) show that changing of storage temperature from –196 to –130 °C did not affect negatively the sperm quality. So, when studying the fertilising ability on base of collective agricultural farm "Rodina" in Kharkov region 107 head of cattle were inseminated with sperm, frozen in liquid nitrogen and stored for a long term at temperature of –130 °C in chamber of KHX-135-5 refrigerating aggregate. In both cases we obtained the fertilisation index of 62%. It is necessary to note, that the model series of refrigerating sets, produced by JSC "Kholod", is constantly replenished with new machines, among them for agricultural needs the KHX-135-20 refrigerating aggregate is of great interest. It is developed especially for pedigree enterprises and laboratories, dealing with long term stored biomaterials. This refrigerating machine has 20 l's operating chamber and is able to maintain given temperature within the limits of –80 ÷ –135 °C.

UDC 57.043: 591.463.1: 597.554.3

Investigation of Carp Sperm Cryoresistance in Connection with the Peculiarities in Motility Activation

B. B. DZUBA, S. I. DROKIN, E. A. BEREZHNAYA, O. V. GAMOLINA

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov
V. N. Karazin Kharkov National University

It is known that carp (*Cyprinus carpio L.*) spermatozoa, being in immotile state in milts, become motile after getting into environmental hypotonic conditions. This phenomenon is called as motility activation. After short period (as a rule up to 2 minutes) of motility these spermatozoa become immotile. However, when creating the necessary conditions: placing of sperm after ceasing of motility into isotonic in comparison with semen plasm medium the repeated activation of motility (so-called reactivation) is possible.

Taking into account the peculiarities in carp sperm activation and actuality of investigating the relationship of osmotic effect on biological objects with their cryobiological properties, the aim of this work was the study of possibility of carp sperm cryopreservation after their activation, as well as sperm reactivation after freezing-thawing. Conducting of these studies is also determined by the search of sperm physiological properties, allowing the multiple usage of ejaculates from valuable and rare carp species, and the predicting of their cryoresistance extent.

The following tasks were set in this work: to determine the optimal conditions for carp sperm reactivation; to study the relationship between the swelling extent, swelling and shrinkage rate in media with various osmotic pressure and sperm reactivation ability before and after cryopreservation; to investigate the possibility of carp sperm cryopreservation after motility activation.

In this work we used the microscopic method of sperm motility estimation, photometric method of cell volume change recording, three-stage method of carp sperm cryopreservation.

In the conducted experiments we established the following results:

1) For the obtaining of stable high results of reactivated sperm motility (70–80% of motile cells) it is necessary to activate the motility for the first time by the solutions with osmotic pressure not less than 100 mOsmol/kg. The optimal term of sperm maintenance under isotonic conditions is 20 min.

2) The dilution with cryoprotective medium results into the increase of sperm swelling rate at activation time and in decrease of shrinkage rate when transferring the activated sperm to isotonic conditions. The spreading of sperm reactivation indices extends.

3) After activation of sperm motility and further freezing-thawing we succeeded in creating the conditions, allowing the obtaining at least 5% of motile cells. Sperm reactivation ability after freezing-thawing correlates with the cell reactivation ability before freezing.

The obtained results allow us to suppose that carp sperm reactivation is related to their ability to survive the osmotic pressure differentials in activation period. Probably, the possibility of reactivation and cells cryoresistance are the interrelated characteristics, as they are determined by sperm membrane ability to survive the osmotic pressure differentials both in activation period and at freezing-thawing. The further investigation of these properties will probably result in development of optimal methods of sperm cryopreservation and application.

This work was performed within the frames of Hungarian-Ukrainian contract № 2M/239-2000.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 57.043: 578.81

Problems of Preserving Viruses and Virus-Containing Material

M. Yu. STEGNIY

National Pharmaceutical Academy of the Ukraine, Kharkov

Within a general spectrum of tasks dealing with cryobiology an important place is taken by the problem of cryopreservation of biological objects in viable state without changing their initial biological properties. Taking into account unfavourable factors, realised in preservation process, and during freezing this is temperature osmotic shock, osmotic effects, mechanical factor of damage by growing ice crystals, sharp change in the acidity and ionic strength of solutions, very important task is to study the mechanisms of cryodamage and cryoprotection, as well as development of efficient technologies of cryopreservation, providing the preservation of genetic apparatus of biological objects.

Solving of the problem of preserving virus-containing preparations and mother breeding of industrial strains of viruses is taken one of leading places in biotechnology of effective immune biological means for treatment, prophylaxis and diagnostics of human and animal diseases.

Under comparative studying of the efficiency of cryopreservation regimens of viruses we have established that storage within a year of vaccine strain (B8-78) of the virus of reduction of oviparity syndrome (ROS) under hypothermia conditions (4 °C) results in the loss of its infectious activity. Storage at –20 °C also affects unfavourably infectious and immunogeneic activity of the virus. For the same period of storage the titer of infectious activity of virus reduced by 4–5 lg in comparison with the control. At the temperature of –40 °C during a year the activity of virus decreased by two orders.

Freezing of vaccine strain and field isolate (L-497) down to the temperature of liquid nitrogen with the rate of 300–400 °C/min provides the integrity of their infectious activity at initial level. In this case immunogeneity of vaccine strain also does not differ from the level of initial.

Obtained results testify to the fact that developed cryopreservation regimen of ROS viruses is optimal and permits to preserve infectiousness of both strains and immunogeneity of vaccine strain at initial level.

UDC 615.361.013.16.014.41

Influence of Cryopreservation Factors on Human Oocytes in Vitrification Conditions

F. V. DAKHNO, L. V. KUTSENKO, Ye. A. GASENKO

Institute of Reproductive Medicine, Kiev

The necessity of oocytes crybank establishment is obvious. The creating of vitrificational media and using of technique of microdrop on the aluminium foil make it realisable. A negative side of this technique is an immediate contact of bioobjects with liquid nitrogen and a higher probability of their loss. This problem requires a further study.

As a container we used aluminium foil circles and vitrificational medium, containing ethylene glycol, sucrose and phosphate-saline buffer. We have preserved 7 immature oocytes, 41 mature oocytes at stage M2, 11 oocytes after maturation to M2 stage (24 hrs of incubation in IVF-20 medium), 34 embryos at various cleavage stages (including 5 blastocysts).

At first stages of vitrification after thawing according to four-stage technique we obtained successfully the oocytes and embryos with intact zona pellucida and cytoplasmatic membrane. We have the following results: from 41 M2 mature oocytes 28 (68.3%) were taken for ICSI, 12 (49.9%) were fertilized, they developed up to early morula stage maximally. No one fertilized oocyte has developed to blastocyst; all the immature oocytes after thawing had darkened cytoplasm, and were withdrawn from further observation; oocytes, taken for vitrification after maturation, gave the same results, as the M2 mature ones; embryos after thawing have not developed yet.

Thus, we can make the following conclusions:

1. The aluminium foil as a container in microdrop technique allows the obtaining of cooling rate of 30 000 – 50 000 °C/min.

2. Good survival of several oocytes allows the hoping for improvement of their viability after vitrification with following fertilization.

3. Presence of zona pellucida damages and cytoplasm darkening is an efficient criterion for forecasting the oocytes and embryos cryoinjury.

4. Vitrification of human oocytes and embryos is an acceptable technique and it should have a further development in auxiliary reproductive technologies methods.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 57.086.13 (470+571)

Cryobanks As Element of Nature Conservation Strategies in Russia

G. Yu. MAKSUDOV, N. N. ROTT

Moscow Zoo

Institute of theoretical and experimental biophysics, Russian Academy of Sciences, Moscow

Threat of destroying of biosphere is already realised by not only the experts and publicity, but also by certain categories of politicians. The discussion of the problems of preserving gene fond at different levels. Some international documents have been adopted, in particular the Convention of United Nations Organization on biological diversity (CBD), World strategy of animals protection by zoos (WSAPZ) and many others.

Their content reflects the consciousness of increasing role of cryobanks. If for example, CBD assign them an additional role, then developed later WSAPZ (IUDZG/CBSG, 1993) underlines that cryobanks is one of three equal ways of preserving rare species of animals. In the programme of preservation and breeding of rare species (SBSG, EEP) the establishment of such cryobanks became integral part of the work (U. S. Sill, 1995).

In Russia at national level after wide discussion by specialists and publicity the Project of Strategy of preserving rare species and Project of National Strategy of preserving biodiversity were adopted. It is extremely important that in these strategies after fruitful discussions, cryobanks received equal status in comparison with traditional nature conservation methods.

Moreover, to basic law of Russian Federation about nature conservation "About the protection of environmental nature" the amendment, according to which the introduction of taxon into the Red Book, to the category "being under extinction threat" will be the for the formation of cryobank of this taxon gene fond, has been developed. In perspective one supposes to extend the action of this amendment to all red book species.

Thus the idea of B. N. Veprentsev even in 1978 is realised now in the scale of state programme.

Zoos seem to be perspective centres for conducting the works on the establishment of cryobanks (G. Yu. Maksudov, N. N. Rott, 2001). Their collections allow to accumulate essential experience on close, but less valuable species. Collection of main zoos of the world are collected to the system in ISIS data base and in pedigree books of rare species, which can be used for the preventing of inbreeding and for maintaining the card index of cryobanks.

UDC 57.086.132:579

Practice in Microorganism Strains Deposition

V. S. PODGORSKIY, T. M. GOLOVACH, V. I. SUDENKO

D. K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

Microorganism Depositary created at the Institute of Microbiology and Virology is the only one officially aproved establishment in Ukraine, which performs the storage of non-pathogenic microorganisms. During the last years at the Institute the base of collection of patented and industrial microorganism strains being the objects of intellectual property has been founded.

The major part of deposits is received without developed and recommended methods of long term storage, that results in necessity of the additional studies. For storage we use the sublimation drying, freezing down to $-45 \div -60$ °C, as well as the methods of routine re-seeding and keeping under the vaseline oil layer. For preservation the cells of stationary growth phase are used.

It is established that protective suspension media (sucrose-gelatin medium, skimmed milk, sodium citrate, glycerol, ethylene glycol and some others) showed the expressed protective action at freezing and/or at lyophilisation of the strains studied. For the intensifying of protective action we added an antioxidant, ascorbic acid. The presence of metabolism products, e.g. of lactate or propionate, drastically influences the survival of strain cells.

It is shown that negative influence of freezing on bacteria and yeast viability is poorly expressed. Lethal injuries do not exceed 6% of cells. However further storage of cultures results in gradual loss of viable cells because of action of non-lethal injuries and biochemical reactions. Process of sublimation results in a greater loss of viable cells comparing with freezing. Cell survival depends on their species belonging together with another factors. The most resistant to cold stress at freezing, sublimation drying and further rehydration are propionic-acid, acetic-acid bacteria, bacilla, lactobacilla and halobacteria, the cell titer of

Матеріал, захищений авторським правом

which immediately after drying exceeds the 80–100% of initial one, and in case of rupture (splitting) of cells' chains or conglomerates it exceeds the initial one. Much sensitive to lyophilisation process are several pseudomonas strains, the bacteria of Acinetobacter genus. Their viable cells rate varies significantly and decreases down to 4–10% depending on strain and conditions of biomass obtaining. Loss of viable cells at sublimation reaches 43–56%, and in certain Pichia guilliermondii strains it does 80%. Cell death at lyophilisation is low when culture grows on agar media.

Storage of cultures during 1–5 years in sublimation dried state allowed to establish that practically for all microorganism groups the decrease of viable cells titer is characteristic during the first 2–5 months after lyophilisation and stabilisation of this index at further storage. Apparently, the latent (non-lethal) cells injuries, resulted at lyophylisation manifest themselves exactly in the first months. An exception of the revealed principle are several strains of Acinetobacter genus: halobacteria which constantly and gradually loose their viability at storage. Surviving the lyophilic drying and viability maintenance is observed by funguses strains, which are characterised by substantial spores formation.

Among the studied deposits we found such ones, which do not survive the lyophilisation and storage in frozen state. These are associative cultures of funguses, some components of which are cryolabile and quickly loose their viability.

UDC 615.361.018.46.5.014.41

Cryopreservation of Autologous Bone Marrow and Peripheric Blood Stem Cells

D. M. MKHEIDZE, T. V. SHVEDOVA, N. N. BLOKHINA

Oncological Science Center named by N. N. Blokhin, Russian Academy of Medical Science, Moscow

The problem of rapid and total haemopoiesis recovery after high dose cytostatic treatment is the major one in treatment of tumours and its solving is possible via stem cells transplantation.

The main condition, determining the success of autologous haemopoietic stem cells (HSC) transplantation at irreversible myelodepression, is an adequate amount of viable stem cells, which can provide a rapid haemopoiesis recovery after transplantation.

HSC autotransplantation is impossible without realising the most primary process: the cryopreservation. Existing cryopreservation methods are connected to electronic programmable freezers and service staff. These conditions can lead to the situation, which can be described as "a high risk factor".

The cryopreservation method elaborated and used by us totally excludes the mentioned above "risk factor" and allows to preserve stem cells practically without losses. Its principle difference from existed methods consists in the following: freezing is performed in liquid nitrogen vapours at the temperature of $-120 \div -130$ °C. The method is absolutely reliable, economic, autonomous, i.e. it does not depend on power supply, electronics and service staff. HSC frozen according to this method (400 bone marrow cells exfusates and 600 peripheric stem cells exfusates) recovered the haemopoiesis by patients with haemoblastoses and solid tumours after high dose chemotherapy and total irradiation.

Матеріал, захищений авторським правом

Section 4
APPLICATION OF LOW AND HYPOTHERMAL TEMPERATURES IN MEDICINE

UDC 577.3: 612.111.3: 616.441.008.61

Biophysical Properties of Erythrocytes at Hypo- and Hyperthyrosis

O. I. GORDIENKO, V. O. MAKEDONSKAYA, Yu. E. GORDIENKO

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

On the background of differentiated metabolic effect of various hormones a polymorphous effect of thyroid hormones, transmitting their effect on many metabolic processes, manifested practically at all structural levels. Hormone effect is spread on the structure and function of subcellular structures: nuclei, mitochondria, and cellular membranes.

Investigation of biophysical characteristics of the erythrocyte membranes in the patients with hypo- and hyperthyrosis has been carried-out by means of the method of small-angle scattering. Permeability coefficients for electrically neutral substances, as well as the erythrocytes distribution on the sphericity index, were investigated. Theoretical substantiation of the measuring method for cell distribution on the sphericity index, based on the theory of hypotonic hemolysis, elaborated by us earlier, was carried-out. Term of semi-hemolysis of erythrocytes suspension in each donor depends on the function of cell distribution on the sphericity index. Measuring this term experimentally and calculating it theoretically, considering the density of cell distribution on the sphericity index for each donor, we obtained quite satisfacted concordance of experimental and theoretical data. Obtained results testified, that erythrocytes distribution on the sphericity index reflected both individual peculiarities of erythropoesis and general state of the donors' health. Thus, investigated characteristics can be used with the aim of diagnostics.

UDC 615.361.441.014.413: 616.441-008.64

Autotransplantation of Cryopreserved Tissue of Thyroid Gland in Prophylaxis and Treatment of Postoperational Hypothyroidism in Patients with Diffuse Toxic Goiter

V. A. MAKEDONSKAYA

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

Diffuse toxic goiter (DTG) is one of the most severe endocrinic diseases, which is characterised by chronic progressive course, development of complications, difficulties in treatment and rehabilitation. Surgical treatment takes a considerable place in therapy of DTG, because provides the most rapid recovery. In specialised surgical in-patient clinics the development of such complications of subtotal resection of thyroid gland (TG) as bleeding, impairments of nerves, toxic crisis, post-operational hyperparathyroidism are minimised and relapses of the diseases are excluded when removing of the tissue volume as much as possible. Post-operational hypothyroidism (PH) is the most frequent consequence of surgical treatment of DTG and develops according to the data of different authors in 29.7–58% cases (Sokolov E. I. et al., 1998; Balabolkin M. I. et al., 2000). Substitutive hormonal therapy is not always quite efficient in some cases the patients survive it badly.

Transplantation is physiologically adequate method for the correction of hormonal insufficiency. The preventive measures as well as treatment ones for PH by autotransplatation of cryopreserved thyreoid parenchyma, clinical usage of which was preceded by the studying of functional peculiarities of cryopreserved tissue TG derived during operation in patients with DTG as potential transplantational material. Under surgical treatment of DTG one should use the individual complex approach to a patient with the aim of PH prophylaxis, take into account a patent's age, severity, duration of the disease, duration of conservative therapy, hormonal, immunological indices.

Матеріал, захищений авторським правом

Amount of TG tissue should be optimal in functional respect with the aim of providing euthyreoid state.

For the patients with DTG, for which functional activity of remained after operation TG tissue can occur due to some causes as insufficient, suboperational extraorgan stocks of own thyreoid parenchyma is created. With this aim suboperational autotransplantation of cryopreserved TG tissue, providing the stocks of functional tissue and positively affecting immunological remission in an organism, is performed. Cryopreserved autotransplant reveals the capability to accumulate I^{131} to the 14th day after transplantation. In given group of patients the PH develops in 7.5 times less than in those without autotransplantation.

In elderly patients with severe forms of DTG under the absence or vagueness of lymphoid infiltration of gland, under which the probability of PH development is not so high and the peculiarities of the course of post-operational period do not permit to carry-out prophylactic autotransplantation, extraorganism stocks of TG tissue is established, which is subjected to low temperature preservation and storage under low temperature bank conditions. In distant terms after operation of patients with DTG depending on time of PH manifestation the autotransplantation of cryopreserved tissue is performed. In all observations a positive effect of transplantation was noted, no necessity of hormone-therapy was found. Autotransplantation of cryopreserved TG is physiologically adequate method of prophylaxis and therapy of PH under surgical treatment of DTG and provides high indices of medical rehabilitation.

UDC 616.783.1732066-085.8329: 617

Perspective of Application of Cryogenic Technique in Neurosurgery

V. I. SIPITYY, B. N. MURINENTS-MARKEVICH

Kharkov State Medical University

B. I. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

The absence of perifocal and general brain reactions as well as hemorrhagic complications under minimum trauma after surgical destruction served as the base for the usage of low temperatures in neurosurgical practice.

In Special Designing and Technical Bureau of the ILTPE jointly with the Chair of Neurosurgery of KSMI the complex of cryosurgical apparatuses, permitting to develop the methods of cryosurgical treatment of various diseases of CNS, has been created.

Treatment of tumours of large cerebral hemispheres was accomplished using cryosurgical device KM-4, consisting of Dewar vessel, control panel, flexible hose and cryoprobe, being cooled with liquid nitrogen and introduced into tumour tissue.

To conduct cryosurgical operations for the destruction of mediobasal tumours the autonomous neurosurgical cryoprobe KM-16, consisting of small-sized ampoule with liquid nitrogen and changeable tip with 120 mm in length and 2 mm diameter, was developed. Construction of such a tip provides minimum traumatisation of environmental structures and destruction of pathological foci of 3–4 cm diameter and permits to apply it both for local external freezing and for cryodestruction of deep structures by stereotaxic method.

Application of cryosurgical apparatuses permitted to carry-out cryosurgical operations to 62 patients with malignant tumours of large cerebral hemispheres. Among 62 patients under operations the improvement was found in 54, 8 patients died (12.9%). Long-term observations show that cryosurgical method of treatment improves a patient's general state and prolongs life up to 3–4 years.

To treat severe forms of neurology of trigeminal nerve the cryoprobe KM-34, which uses medical nitrogen oxide as coolant, stored in cylinders under pressure of 50 kG/cm^2, was developed. Operating site of cryoprobe is surgical needle with hermetically sealed distal end with 1.2 mm diameter at the end of which there is diameter narrowing to 0.2 mm, that during supplying of nitrogen oxide from cylinder along capillary under pressure of 40–50 atm provides a cold-producing effect of Joule–Thompson. Surgical needle is introduced into cavum Meckeli of stereotaxic method via oval hole and when supplying nitrogen oxide under pressure in the contact site of cooling needle site and sensitive motor root of trigeminal nerve the foci of cryodestruction with the diameter from 3 to 4 mm have been created.

Within 5 years 56 patients, suffered from a severe from of neuralgia of trigeminal nerve, aged from 38 to 85 years old, have been operated. Cryoneurotomia of sensitive motor root in combination with cryoneurotmoia of peripheric branches (I, II, III) of trigeminal nerve was accomplished. Relapses were observed in 6 patients who were repeatedly operated by surgical method. No relapses were found after repeated operations.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 591.339: 57.043.089.3

About the Possibility of Chorial Tissue Usage under a Total Acute Cooling of Homoiothermal Organisms

O. S. PROKOPYUK, V. V. CHIZHEVSKY, V. Yu. PROKOPYUK, O. V. LIPINA

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

An attempt to estimate the character of the effect of chorial tissue implantation (CT) on the adaptive processes, occurring during a cold stress has been undertaken. The papers of some authors (Chebotarev D. F., Man'kovsky K. B. et al.) demonstrated, that the usage of placenta preparations positively affected the general functional state in the majority of systems in an organism. Mobility acceleration of main nerve processes is observed, contractile ability of myocardium increased, coronal blood flow improved and bioelectrical activity of heart, kidney functioning is stimulated etc. Thus, positive shifts in the systems of an organism, actively responding to a stress, are observed.

Application of the preparations from fetoplacental complex under the stress conditions in the regulatory apparatuses of an organism allowed to understand the action mechanisms of cellular therapy.

During the investigation the animals, to which preliminary CT transplantation was done, were put into water bath (4 °C) and the duration of staying under these conditions was fixed. After a cold effect and during thawing the body temperature, ECG were recorded, physical and chemical blood properties were estimated, morphological investigation of the series of organs were carried-out.

Preliminary results, obtained by us, testified to the absence of manifested cryoprotective effect of CT application to the animals, subjected to the effect of an acute total cooling. From our point of view, this fact is connected to the overdosage of being implanted embryonic tissue, that is also coincided with the results of investigations, conducted at the Institute for gerontology.

Further thorough, profound investigations of the effect of fetoplacental complex preparations on the processes of cold adaptation in homoiothermal animals are required.

UDC 617.713-007.64: 615.832.9

Acute Keratoconus Treatment Using Ultra Low Temperature Effect

E. V. IVANOVSKAYA

Institute of Ophthalmic Diseases and Tissue Therapy named by V.P. Filatov of the Academy of Medical Sciences of Ukraine, Odessa

An acute keratoconus, as the complication of progressing dystrophic cornea disease, is manifested in a sharp painful cornea edema, appearing as a result of chappings and breaks in a descemet cover. Keratoconus is often observed in the patients of juvenile and young age. The threat of complications and even cornea perforation requires the most rapid cupping of inflammatory disease in cornea.

When treating keratoconus as an autoimmune process in the cornea, the application of corticosteroids plays an important role that slows down the reparative processes in it. Therefore a medicamentous treatment is characterised by a long term and a possible danger of secondary infection, formation of ectatic vascular cicatricial cornea opacity with the thinning and a low non-corrected acuity of vision.

Proceeding from a stimulating effect of low temperatures on regenerative processes, differentiated effect on eye tissues, we have developed the way for treating acute keratoconus by means of ultralow temperature effect within the range of $-150 \div -196$ °C with the exposure of 20 s (2–3 applications) and a preliminary puncture of an interior chamber (Patent of Ukraine № 28304 A, 2000).

The proposed method of treatment, combined with the medicamentous therapy was applied in 20 patients (21 eyes), aged from 11 to 38 years. In 10 cases an acute inflammatory process in cornea is accompanied by iritis symptoms, in 7 cases by iridocyclitis, in 3 of them with hypopyon. In 7 patients there were such abnormalities of development and accompanying diseases as congenital mitral valvular disease (1), abnormality of kidney development (1), mongolism (2), in 3 patients the consequences of endured infantile cerebral paralysis and the clinical picture of an acute keratoconus in these patients differed by the severity of the course.

The results of treatment were estimated by the rate of inflammatory process cupping in the cornea, cornea flattening and the quality of a formed cicatricial opa-

Матеріал, захищений авторським правом

city, a degree of increase in visual acuity, the absence of disease relapses. The cupping of an acute inflammatory process in cornea: the oedema resorption, closing of slits and breaks in posterior layers of cornea, its surface epithelisation, the disappearance of iritis and iridocyclitis symptoms was observed to the 8.5 ± 3.5 days. No complications were noted.

Stabilisation of a recovery process was observed in 1.0–1.5 months and was manifested in the flattening of the top of a cone-shaped cornea with forming a vascular-free opacity. In all cases we observed an increase in visual acuity in 8 eyes up to 0.05–0.1 and in 13 ones up to 0.12–0.35, moreover in 8 eyes the correction by hard contact lens allowed to augment the acuity of vision up to 0.35–0.7. The absence of disease relapses was established in 21 cases in the terms from 1 to 8 years.

Thus, the analysis of treatment results demonstrated, that the proposed method of treatment was technically simple, slightly traumatical, safe, efficient, well endured by an eye, did not result in the complications, that permitted to recommend it as an independent method for treating an acute keratoconus in an infantile age, in patients with accompanying diseases and as the method, anticipating a penetrating keratoplasty.

UDC 615.832.9: 616.831-005.1

Application of Craniocerebral Hypothermia When Rehabilitating Patients, Endured Cerebral Insult

T. V. BOGATYREVA, YA. S. AFANASYEVA, O. I. VALYUK

Ukrainian Scientific and Research Institute of Medical Rehabilitation and Health Resort, Odessa

An acute disorder of cerebral circulation (cerebral insult – CI) is a severe vascular catastrophe, resulting in the invalidism and death. Meanwhile the current stage therapy of this category of patients with the main accent on an intensive medicamental effect, as the practical experience testifies, is obviously insufficient. Substantiated inclusion of pathogenetically significant physical methods of the effect at the rehabilitation stage of patients, endured CI, can significantly increase the efficiency of their treatment.

The choice of craniocerebral hypothermia (CCH) method was determined by the character of its effect, directed to an increase in tissue resistance, in particular brain to the hypoxia and ischemia, improvement of cerebral hemodynamics, stimulation of protective - adaptive processes (impaired at CI).

Craniocerebral hypothermia was carried-out using the "Hypoterm" apparatus. Extracranial cooling was gradually performed, by approaching a paramembrane temperature to 34–35 °C (that corresponded to the temperature in deep sections of brain), the procedure duration was 1–1.5 hrs.

CCH treatment was done to 21 patients, endured CI and being in a sanatoria and health resort stage of rehabilitation. All patients of 38–67 years old endured ischemic insult (in the field of middle cerebral, vertebral artery). When entering the treatment the main complaints were weakness and movement restriction in the extremities (78%), headaches (38%), vertigo (55%), speech disorders (24%), memory decrease (67%) etc.

For a complex estimation of patients' state with CI before treatment, as well as for controlling the efficiency of the performed CCH we realized the following investigations: clinical (according to a specially developed card of the insult patients with the symptom estimation in the points), electrophysiological (with studying cerebral hemodynamics by the data of rheoencephalography) and laboratory one (state of lipid metabolism, coagulant and fibrinolytic blood system, indices of carbohydrate metabolism, mineral metabolism with the determination of calcium, phosphorus, alkaline phosphatase content in blood plasm; calcium, phosphorus in urine).

Subjective reaction of CI patients on the treatment performance using CCH on the whole was positive. However a premorbid personal structure and reaction type of a person are utterly important when selecting the patients, that determines the perception adequacy of such unusual therapeutic procedure as CCH. The analysis of the results obtained of the complex clinical, instrumental and laboratory studies demonstrated the possibility of CCH application in the patients, endured CI even in the early rehabilitation period and its efficiency (that was confirmed by a decrease in clinical symptomatology and even the disappearance of such subjective disease manifestations as headache, vertigo; in some patients there were the improvement of a pulse blood-filling up and the reduction of venous congestion phenomena by the REG data, rhythm regulation in EEG). We revealed the dynamics peculiarities of a coagulogram, lipid metabolism and, that is very interesting, CCH regulating effect on mineral metabolism (that was manifested by an increase in an initially reduced calcium level in blood serum, positive dynamics of alkaline phosphatase), that probably cleared up a new side in CCH effect and pointed to the perspective of its application for osteoporosis prevention, which was often met in the patients, endured CI.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 615.832.9: 616.31

Cryoeffect and Hypothermia in Therapeutic Stomatology

B. F. KUTSEVLYAK, K. V. BOZHKO, O. N. SIROTA

Kharkov Medical Academy of Post-Diploma Education

For anesthesia and treatment performance the cooling was used even in ancient times.

Collaborators of the Chair of Therapeutic and Child Stomatology of Kharkov Medical Academy of Post Diploma Education (KMAPE) and Institute of Low Temperature Physics and Engineering (ILTPE) designed the cryoinstruments, reproducing a controlled vapor-fluid nitrogen jet.

Numerous investigations of KMAPE Chair collaborators, departments of ILTPE of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine demonstrated, that a vapor-fluid nitrogen jet allowed to freeze all volume of pathological tissue with an optimal rate, causing the destruction of oral cavity mucous membrane and to realize a visual control of frost-bitten zone. It is necessary to take into consideration the fact, that an oral cavity is a constantly humid medium. When using cryogenic instruments of a contact effect, the ice, being a heat insulator, freezes on a work plate of a changeable tip. Vapor-fluid nitrogen jet allows avoiding this shortcoming.

Under clinical and experimental investigations it was revealed, that a local hypothermia considerably reduced a pain reaction, decreased the tissue edema, slowed down protein decay in the zone of damage and decreased the absorption processes of microorganism and tissue decay products. At this cooling the cellular elements suffer in a lesser extent from hypoxia and acidosis. Local hypothermia weakens allergic reactions, activates phagocytic ability of leukocytes, stimulates reparative process.

In order to perform all these investigations and stomatologic patients treatment the Chair of Therapeutic and Child Stomatology of KMAPE together with collaborators of ILTPE of the National Academy of Sciences of Ukraine developed the way of biotissue local cooling in combination with oxygenation, i.e. with a simultaneous tissue saturation with oxygen. Oxygenation under conditions of local hypothermia when treating some stomatologic diseases can be applied in the complex with other methods.

One studied the low temperature effect on dental pulp and oral cavity mucous membrane, developed the methods for treating irreversible pulpitis forms, precancerous and other diseases of oral cavity and near oral area.

Positive results of treatment with cryoeffect and hypothermia application were confirmed by clinical and paraclinical methods of observation, including functional one.

UDC 615.361.013.85.014.41: 616.351

Usage of Rectal Suppositories, Containing Thermoclaved Porcine Placenta, in Proctologic Practice

B. M. DATSENKO, I. N. LYMAR, V. I. GRISCHENKO, V. A. MOISEYEV, M. I. SCHETINSKY, T. F. MOROZOVA, O. A. NARDID, G. A. BABIJCHUK, A. M. VOROTILIN, V. P. GEORGIEVSKY, L. V. IVANOV, O. V. GRISCHENKO

Kharkov Medical Academy of Post Diploma Education

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

Kharkov State Scientific Centre of Medicaments, Kharkov

The investigation results of placental tissue clinical application in various branches of medicine testify to the fact, that placental preparations cause a stimulating effect on cellular metabolism processes, by activating the tissue reparative activity and a patients' immune status. We carried-out the clinical trials of placenta preparations in a proctologic practice for a local treatment of acute and chronic inflammatory diseases of anal canal and rectum (cryptites, papillites, sphincterites), anal fissures, as well as the optimisation of local treatment of patients, operated on the indication of hemorrhoids, anal fissures.

Tissue preparation as the rectal suppositories, containing thermoclaved porcine placenta, was produced on two bases: hydrophilic and lipophilic ones. The character of rectal suppository base determined their sorption activity.

At the anal canal inflammatory diseases we applied the suppositories on a hydrophilic base for the local treatment of 26 patients, whose average age made 39.2 ± 1.1 years and the disease duration was from 1 month to 1.5 years. Suppositories were introduced into the rectum twice a day (in the morning and evening), the treatment duration made from 7 to

Матеріал, захищений авторським правом

10 days. A positive clinical effect was recorded in 23 patients even to the 2nd–3rd day from the beginning of the treatment, the painful sensations in rectum were reduced or completely ceased in the patients. There was an objective (the data of the control rectoscopy) decrease in the manifestation of inflammatory process on the side of rectum mucous membrane.

Rectal suppositories on a lipophilic base were used for treating anal canal inflammatory diseases in 16 patients, whose average age was 36.1 ± 1.3 years, the disease duration was from 1 month to 1 year. Suppositories were introduced into the rectum (in the morning and evening), treatment duration made from 7 to 12 days. Clinical effect was recorded to the 3rd–4th day from the beginning of treatment in 10 patients; a visual (at the rectoscopy) picture of the inflammatory reaction suppression of mucous membrane was noted to the 5th–6th day. In 4 patients there was no improvement, one noted the strengthening of the pain syndrome in 2 ones.

Suppositories on hydrophilic base were applied to 20 patients, operated on the indication of hemorrhoids with stitching of wounds of anal canal mucous membrane, and to 18 ones with the dissection of chronic anal fissure. Treating course made 6–7 days. Clinical results were estimated as the positive ones: no cases of wound suppuration after hemorrhoidectomy were observed, the wounds after anal fissure dissection were healed by 3–4 days earlier, than at a standard local treatment.

The investigation results, confirmed by the laboratory data, demonstrated, that the preparation did not negatively affect general state of patients, did not contribute to the appearance of local complications when treating proctologic pathology. The results obtained give the reason to consider the further application of placenta preparations as the biostimulators of local effect as the perspective one when treating acute and chronic rectum diseases and the optimisation of post-operative treatment for improving its efficiency.

UDC 616.432-006.55-072.1: 615.832.9: 617

Endoscopic Miniinvasive Cryodestruction of Adenomas of Hypophysis and Adenohypophysis

V. I. SIPITYY, V. N. LESOVOY, A. V. TSYGANKOV, S. V. GROZNYY, A. Yu. PECHENOV

Kharkov State Medical University

Problem of hypophysis surgery today remains an actual. Surgical interventions were performed in patients with hypophysis and hormone-dependent cancer. Usually tumours of hypophysis are found in socially active patients in an average age. The problem of infertility attracts the attention. According to the data of different authors to every third infertile woman the diagnosis of microadenoma or adenoma of hypophysis is set, that requires surgical invasion at ineffective conservative therapy. On a clinical base of the chair of neurosurgery the method of stereotaxic endoscopic transnasal and transsphenoidal selective cryodestruction of hypophysis tumours and adenohypophysis at hormone-dependent cancer has been developed and introduced into the practice.

In neurosurgical clinic 60 cryodestructions of hypophysis adenoma and adenohypophysis have been accomplished. Among them there were 20 cryodestructions of hypophysis adenomas, 30 cryodestructions of hypophysis microadenomas and 10 adenohypophysis at hormone-dependent cancer of prostate and mammary gland. Diagnosis of adenomas or microadenomas of hypophysis was set on the base of modern monitoring of patient: computer and magnetoresonance tomography, determination of the level of hormones of hypophysis in blood, as well as a standard monitoring of patient was carried-out for preoperational preparing.

Under X-ray control using advanced stereotaxic device, set of original instruments, under endoscope control, developed and produced by the authors the transnasal-transsphenoidal approach to Turkish saddle and cryodestruction of adenoma or microadenoma of hypophysis or adenohypophysis was done.

The recovery was found in 45 patients with adenoma or microadenoma of hypophysis. Six women, before operation suffered from infertility, gave the birth to healthy babies. In a year the relapses of tumours were found in 5 persons, the repeated operations of tumour cryodestruction were done. In 10 patients at prostate and mammary gland cancer after cryodestruction during the first 24 hrs analgetic effect was obtained. Patients did not complain for pains in 3 months after operation. In 6 months in 3 patients the pain relapse was noted. In the patients of the 4th clinical group at the prostate cancer a reduction of concentration of testicular and adrenal hormones was revealed.

These methods of operation allow to slightly traumatically destroy adenoma or microadenoma of hypophysis, that contributes to the recovery of endocrinic, visual and reproductive functions.

Application of cryodestruction of adenohypophysis gives the possibility to cup pain syndrome in patients with hormone-dependent malignant neoplasms of the 4th clinical group.

Developed method of selective cryodestruction of tumours of hypophysis and adenohypophysis using endoscope can be recommended for a wide introduction into the practice of neurosurgery.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 615.47: 621.594

Cryogenic Apparatuses and Instruments for Medicine

R. V. GAVRILOV, L. K. KOLYBAYEV, B. N. MURINETS-MARKEVICH, M. E. NOSOV, V. E. BEREZUTSKAYA

Special Designing and Technological Bureau on Cryogenic Technique of B. I. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

Special Designing and Technological Bureau on Cryogenic Technique (SDTB on CT) of the National Academy of Sciences of the Ukraine since the beginning of the 70-s together with scientific and clinical organisations deals with the creation of cryosurgical instruments and apparatuses for gynaecology, stomatology, dermatology, otorhinolaryngology, neurosurgery, ophthalmology, which are recommended by the Ministries of Health Care of Russia and Ukraine for clinical application.

Since 1970 cryosurgical method in gynaecology is applied for treatment of patients with pathological changes in cervix uteri to remove pointed condyloma of vulva for stopping dysfunctional uterine bleedings as well as at uterus fibromas. The most effective treatment of severe dysfunctional uterine bleedings is provided by cryoeffect at the temperature of cooled tip lower than –140 °C and is done with the apparatus KP-4, which uses liquid nitrogen as coolant. To treat pathological states in cervix uteri and pointed condyloma of vulva the cryoeffect is sufficient at the temperature of cooling tip from –40 down to –60 °C with the cooling rate of 1 degrees/s. Such cryoeffect is realised with the apparatus AKG-01, which uses medical nitrous oxide as coolant. Cryogenic methods of treatment in gynaecology has been developed by the Chair of Obstetrics and Gynaecology of KhSMU (head of the Chair is academician V. I. Grischenko).

Nitrogen stomatological cryosprayer of therapeutic stomatology KAS-01, consisting of easily disassembling units of valve-siphon device and heat-insulating small-sized reservoir for liquid nitrogen.

To treat the foci of skin diseases the cryogenic dermatological applicator, KD-3 was developed.

For cryoeffect at a direct laryngoscopy at pathological changed tissues of cavity of nose, mouth, throat, larynx, ear when treating patients suffering from vascular and skin diseases of external acoustic meatus and tympanic cavity, neoplasms of soft palate, vascular neoplasms of nose, vasomotoric rhinitis the cryoapplicator KM-22.

Operations in the region of eyeball are made with universal cryoophthalmological set UM-14.

Application of developed cryogenic medical technique has shown its high efficiency in treatment of diseases and necessity of wider application in clinical practice.

UDC 616-089.843: 615.361.013.85.014.41: 616.69-008.6

Transplantation of Cryopreserved Placental Tissue at Spermatogenesis Disorder in Men

V. I. GRISCHENKO, A. G. GERODES, E. K. ALIPOVA, L. I. LUTSKAYA, O. S. PROKOPYUK, Yu. V. NIKITCHENKO

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

Kharkov Scientific & Research Institute of Biology

Kharkov National University named by V. N. Karazin

Centre of Human Reproduction "Implant", Kharkov

Male infertility treatment is a difficult and actual task. The impairment of sexual hormone production, the change in prooxidant-antioxidant balance in an organism, which develops after endured inflammatory diseases of genital organs under the effect of unfavourable factors of environment or production, cause the disorder in spermatozoid production. Thus, in the sperm as a result of activation of lipid peroxidation the impairment of gamete membrane permeability, a decrease in their motility and fertilising ability are observed. Among the known methods of stimulating therapy, applied when treating spermatogenesis disorders, the allotransplantation of placental tissue, which contains a big number of hormones, prostaglandins, enzymes and microelements, deserves a special attention. However the effect of cryopreserved placental tissue (CPPT) transplantation on spermatogenesis in men with oligoasthenospermia is insufficiently studied.

Матеріал, захищений авторським правом

In this work we investigated the effect of CPPT transplantation on spermatogenesis indices (ejaculate study), the content of sexual hormones, lipid hydroperoxide, antioxidant activity and selenium-dependent peroxidase activity in blood serum of men of a reproductive age with oligoasthenozoospermia.

Subcutaneous transplantation of cryopreserved placental tissue fragment was applied. The method for placental tissue cryopreservation was developed at the Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine.

Using the way of CPPT transplantation, 18 patients with oligoasthenospermia and chronic prostatitis were treated. Spermatozoa concentration before treatment made 14.8 ± 2.6 mln/ml of ejaculate, motility was $18.1 \pm 3.1\%$, a number of pathological forms was $63.9 \pm 7.1\%$. Besides there was a statistically true increase in testosterone concentration in patients' blood serum in 1.6 times in comparison with the indices before treatment. Testosterone concentration made 21.2 ± 3.49 nMol/l. In response to CPPT there was the recovery of prooxidant-antioxidant homeostasis in patients' blood. They noted an increase in the working capacity, sexual activity, decrease in fatigability and catarrhal diseases. After the treatment performed there were two pregnancies.

Thus, the data on a positive effect of CPPT transplantation on spermatogenesis, hormonal and prooxidant-antioxidant homeostasis in the blood of men with oligozoospermia allow to conclude about the perspective of this method usage when treating male infertility.

UDC 615.361.013.85.014.41: 618.173

Experience of Application of Heterotopic Transplantation of Cryoprserved Placenta in Women in Perimenopause

N. S. LUTSENKO, I. V. LOMAKA, I. N. KIRICHENKO

Zaporozhsky Institute of Advanced Training of Physicians, Zaporozhie

The actuality of problem of climacteric period pathological proceeding treatment, namely of climacteric syndrome (CS), has been stipulated by a high pathology occurrence, varying from 43.4 to 80% (V. P. Smetnik, 1997; M. A. Repina, 1997; T. F. Tatarchuk, 2000). It is known that psycho-emotional disorders, resulting in social disadaptation and reduction of life quality, takes a leading place in 85% of women with CS in perimenopause (A. Veninga, 1996; A. S. Shapovalenko, 2000). When menopause starts one of the evidence of psychological "rearrangement" is progressive course of emotional instability (neurotism). The aim of the study was the investigation of the effect of heterotopic transplantation of cryopreserved placenta (HTCP) on the indices of psychological status in women with CS in perimenopause.

All together 25 women were examined. An average age made 47.9 ± 0.3 years. Duration of menopause did not exceed 2 years. All women after verification of diagnosis, determination of modified menopausal index (MMI), extent of neurotism manifestation extent (N. V. Kirsheva, N. V. Ryabchikova, 1995) and calculation of the coefficient of the ratio of emotional stability/emotional instability (Ces/ei) the HTCP was conducted. The samples of placenta tissue were obtained at the IPC&C of the Ukraine. On the indices of total estrogens (TE) the level of estrogenous deficit was determined and the extent of dysfunction in sympato-adrenal system (SAS) was found at the level of excretion of adrenaline (A), norepinephrine (NE), dofaminum (DA) and DOFA (D). Clinical and laboratory monitoring was carried-out in 3 and 6 months.

Slight and average extent of manifestation of climacteric disorders had a place in 64% of patients, severe in 36%. Ces/ei made 0.3 at MMI equal to 73.7 ± 8.9 points. Strong positive correlation was found (at an average index made 24.4 ± 1.6 points). Determination of hormonal homeostasis showed the presence of absolute hypoestrogenia (an average level of SE made 12.9 ± 0.9 μg/days) and prevailing of the tonus of mediator link of SAS over hormonal (indices corresponded: A – 3.95 ± 0.27; NA – 24.0 ± 3.6; DA – 145.6 ± 17.2 and D – 62.7 ± 6.5 μg/days).

In 3 months of posttransplantational period the index of neurotism made 16.1 ± 0.5 points and Ces/ei corresponded to 0.5; an average value of SE made 35.1 ± 7.8 μg/days, a statistically true ($p < 0.05$) increase of excretion of NA and cathecholamine precursors was noted.

In 6 months from the moment of conducting HTCP the index of neurotism made 14.2 ± 0.3 points and Ces/ei was 0.7. The level of SE exceeded corresponding before treatment practically by 100% and the changes in excretion of cathecholamines testified to an increase of reserve and compensatory possibilities of SAS.

Thus the results of carried-out investigation demonstrated the reduction of neurotism level in women with CS at the background of HTCP, that along with an increase of SE and decrease of cathecholamine dysfunction leads to leveling of clinical symptomatics of climacteric disorders.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 616-006.5: 615.832.9

Polypous Rhinosinuitis and Its Pathogenetic Treatment with Ultralow Temperatures

A. S. ZHURAVLEV

Kharkov State Medical University

Chronic sinuites, especially their proliferative forms, have still remained frequent pathology of otorhinolaryngological (ORL) organs, and their treatment is difficult for solving task, that is confirmed quite a big number of relapses (A. I. Muminov et al., 1990, B. V. Shevrygin, 1998). As a rule just surgical methods do not give positive results, especially at polypous ethmoidites, where relapses are practically programmed and intensive growth of polyps after operation is noted by many authors. Therefore the development of new highly efficient methods of anti-relapse treatment of chronic polypous rhinosinuites, which would be pathogenetically expedient and meet all the requirements, made by practice, gains a special actuality. Recently the attention of practising physicians is again attracted by cryotherapy. Earlier cold was applied for mechanical destruction of polyps and mobilisation of local and general protective systems of an organism. Investigations, performed by Sakahura Y. et al. (1983) testify to the fact that for normalisation of reparative processes in nose cavities and sinuses a natural functioning of holes, connecting sinuses with nasal passage and providing physiological activity of mucocilliar system of nose, is necessary. Consequently for obtaining rapid and stable clinical effect in patients with proliferative sinuites along with normalisation of immunological protection, sanation of median nasal passage is necessary as a main collector of anterior group of sinuses and in particular the opening of natural anastomosis of affected sinuses, since the movement of ciliated epithelium occurs namely to these holes. For 48 patients with chronic polypous rhinosinuites we have performed operative sanation of nasal cavity with opening cells of ethmoidal labyrinth in combination with intentional cryonecrotisation of polypously changed mucous membrane in the region of natural anastomosis of maxillary sinuses, which occurred to be obturated. This on our opinion is one of the main factors, contributing to intrasinusis hypertensia, supporting pathological process.

Local cryoeffect was made to the 2nd–3rd day after operative invasion with created by us otolaryngological cryoapplicator (Author certificates № 1127581, № 1803057). This cryoapparatus allows to provide the supplying of low temperature to operating part of cryoprobe with 2 mm diameter at the length of 170 mm, that makes it different from other analogues. Cryoeffect methods consisted in approaching cryoprobe in a warm state to fontanelle in semilunar fissure, which is in median nasal passage. Cryoeffect on polypously changed mucous membrane, obturating natural anastomosis of maxillary sinus with 60 seconds' exposure is twice performed. During treatment process the patients noted the sense of some pressure near inner eye angle from a corresponding side, nose stuffness, rhinorrhea slightly increased in them. However starting from 2–3 days after finishing of treatment with ultralow temperatures, mentioned unfavourable phenomena were considerably regressed, average nose passage became free, rhinitis stopped. There were no any complications or negative reactions both during treatment and later. When observing the patients in catamnesis within 2 years the absence of relapses of pathological process in nose cavity and sinuses was found in 81% of examined persons.

In all patients the state of intrasinusoid pressure in dynamics suing water manometer was studied. It has been established that before beginning of treatment it was increased and made in average 30.5 ± 2.5 mm of water column. In 2 weeks after finishing of complex treatment in all patients this index was normalised.

Studying of cellular and humoral immunity before and after finishing of treatment has shown that statistically levelling of dysbalance of lymphoid cells (T-, B-, O-) as well as content of helpers and suppressors takes place. Besides, in 2 months after finishing of treatment in all patients an increase of content of secretory IgA up to 15.4 ± 1.4 was observed. After finishing of treatment of patients with nose polyposis the strengthening of both absorptional and digesting ability of neutropils of peripheric blood in comparison with initial data was noted.

Thus we can state that proposed method of treatment for patients with chronic polypous rhinosinuites using intentional cryonecrotisation of natural anastomosis of maxillary sinuses, conducted within post-operational period is highly efficient, simple and excluding relapses for a long period. Positive result of treatment is stipulated to its orientation for elimination of pathogenetic links of inflammatory process: dysbalance of intrasinusoid pressure, secondary immunological insufficiency.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 618.12-006.6: 612.87.1

Forecasting of Cryonecrosis Depth on Biological Tissue Basing on Mathematical Model of Heat Conductivity in Patients with Uterus Body Cancer

O. B. ANIPKO, A. A. MIKHANOVSKY, K. A. GORBUNOV

Institute of Medical Radiology of the Academy of Medical Sciences of the Ukraine, named by S. P. Grigoriev

Kharkov National Technical University "Kharkov Polytechnical Institute"

Today for the forecasting of the results of cryodestruction of biological tissue different methods are applied, the most perspective among them is mathematical modelling.

To forecast the depth of cryodestruction of uterus body cancer (UBC) the task in one-dimensional formulation was considered. In the result of its solving analytical functions of the depth of starting and stopping of tumour necrosis which were as follows:

$$\tau_{b.n} = 1.007L^{1.525}$$

$$\tau_{e.n} = 2.049L^{1.550},$$

where τ – time of cryoeffect for the starting and stopping of necrosis, min; L – necrosis depth, mm

However the short-coming of this task solving is that it takes into account only heat transfers. Therefore more distinct solving can be received when considering two-dimensional task of heat conductivity, where these parameters are taken into account in the plane of calculated field.

In the result of solving two-dimensional task of heat conductivity we have received new functions of the depth of starting and end of the necrosis depending on cryoeffect time:

$$\tau_{b.n} = 1.15L^{1.582}$$

$$\tau_{e.n} = 0.3L^{2.947}.$$

For a wide summarising of obtained results of solving they are presented in criterial view:

$$L = 0.01\left(\frac{\alpha_{ef} Nu}{Fo \cdot Bi}\right)^{2.39};$$

$$\frac{L}{Nu^{2.39}} = 0.01\left(\frac{\alpha_{эф}}{Fo \cdot Bi}\right)^{2.39},$$

that enables to forecast the results not only of cryotreatment of UBC but also other tumours using various coolants as well as to carry-out parametric investigations.

Thus basing on conducted investigation new functions for forecasting of the depth of cryonecrosis of tumour depending on the time of cryoeffect and coolant temperature, which were approbated and can be recommended to application, have been obtained.

UDC 618.12-006.6: 615.832.9: 617

Determination of the Time of Tissue Temperature Recovery by Solving the Task of Thawing in Patients with Uterus Body Cancer after Tumour Cryodestruction

O. B. ANIPKO, A. A. MIKHANOVSKY, K. A. GORBUNOV

Institute of Medical Radiology of the Academy of Medical Sciences of the Ukraine, named by S. P. Grigoriev

Kharkov National Technical University "Kharkov Polytechnical Institute"

In order to increase the efficiency of treatment of uterus body cancer (UBC) before starting special treatment the tumour cryodestruction is conducted. However as histological studies demonstrated at used methods of cryotreatment of uterus cavity in the majority of cases just partial cryodestruction of UBC was found and in 48 hrs after cryoeffect in not destroyed sites of tumour a big number of mitoses appeared, that was unfavourable fact. This is related to the fact that after finishing of cryoeffect biological starts getting heated. In this case heat transfer is accomplished by heat conductivity from internal heat sources. Under thawing of biological tissue up to the temperature of 4 °C the perception of energy by a cell begins and it starts cleavage more rapidly. Accelerated growth of tumour probably is related also to the fact that the amount of the energy being supplied to tissue remained unchanged, meanwhile the number of cells, perceiving it sharply reduced as in the result of cryodestruction. So, it is very important from a practical

Матеріал, захищений авторським правом

side to solve the task of determining the time during which the tissue subjected to cryoeffect will get heated up to the temperature of 4 °C.

The aim of given investigation was to determine the time of recovery of tissue temperature by the method of solving the task of thawing.

To describe the cryodestruction process for biological tissue we used two-dimensional differential equation of heat conductivity. In this case heat of phase transition was taken into account as efficient heat capacity. Tissue temperature beyond the limits of cryoeffect region was assumed as equal to 37 °C.

In the result of solving mathematical model the distribution of the biological tissue temperature T on the L depth with the time course was obtained. In this case, taking into consideration that cryonecrosis zone was determined with the error of 8–12% it should be assumed, that

$$\frac{\tau_{\text{recov.}}}{\tau_{\text{prim.}}} \approx 0.8 - 0.9 .$$

Thus on the base of the analysis of obtained solution it has been established that the time, necessary for heating of frozen tissue up to the temperature of 4 °C after ceasing of cryoeffect, makes 2 hr 15 min.

UDC 615.361: 617.019: 616.379-008.64

Xenotransplantation of Pancreas Islet Tissues When Carrying-out Laparascopic Cholecystectomy in Patients with Diabetes Mellitus

E. D. KHVOROSTOV, B. P. SANDOMIRSKY, O. N. POBELENSKY, I. V. BELOCHKINA

Kharkov National University named by V. N. Karazin

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

Diabetes mellitus (DM), according to the WHO data, is related to the number of diseases, which are not resistant to a radical treatment. Irreversible effect of proliferative retinopathy, nefropathy, microangiopathy of inferior limbs, polyneuropathy and other complications, causing blidness, terminal stage of insufficiency, gangrene in inferior limbs, "diabetic foot": this list of the causes of early invalidization and patients death has not been completed yet.

Clinical effect testifies that classical insulinotherapy, which generally solved the problem of such acute complications of diabetes as ketoacidosis, can not stop the development of chronic complications. In this connection the combination of conservative and surgical treatment methods is expedient for many patients. Allo- and xenotransplantation of insulin-producing islet cells of fetal pancreas is available for a wide clinical application. Operation hasquite a manifested anti-diabetic effect and capable to stabilize the DM course, to stop in many cases the progressing of chronic diabetic complications.

Laparascopic cholecystectomy (LCE) was carried-out by us in 1 095 patients, 152 patients among them with DM, aged from 42 to 73 years (138 women and 14 men). LCE was done to 128 patients with chronic cholecystitis, 24 of them had an acute flegmonous cholecystitis. Diabetes duration was from some months to 20 years. In 26 patients the DM diagnosis in a slight form was found, in 114 we observed an average severity, 12 patients had a severe disease form.

Xenotransplantation of insulin-producing islet cells of fetal pancreas was done in clinics when conducting LCE to 23 patients, suffered from DM (6 patients have insulin-independent DM, 17 ones were the patients with insulin-depending type of DM). All the patients were women.

Transplantation of insulin-producing islet cells of fetal pancreas was carried-out by means of laparascope control under the conditions of carboxyperitoneum, material was implanted into round ligament of the liver, greater omentum, lesser omentum, radix mesenterii. Single transplantation with uniform distribution in all injection points was done, then LCE was carried-out according to generally accepted method. After operational treatment an enteral feeding of the patients was started to the 2nd day, facilitating postoperational correction of carbohydrate metabolism in patients.

Thus, LCE combined with xenotransplantation of cryopreserved cultures of insulin-producing islet cells of fetal pancreas is the operation of selection in the patients with cholelithiasis on the background of DM and allows to increase the treatment efficiency. Classical insulinotherapy at DM does not prevent development of chronic complications, manifested in 4 clinical syndromes: kidney-retinal one, diabetic neuropathy, neuroglycopeny and "diabetic foot". Transplantation of insulin-producing islet cells of fetal pancreas positively affects the diabetic complications (microangiopathies and neuropathies) and the course of carbohydrate metabolism (glycemia decrease on an empty stomach, glycemia after food, average daily glycemia, glycemia index). Clinical effect is kept within 16 months.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 615.361.013.85.14.41: 616.37-002

Application of Cryobiology and Cryomedicine Achievements when Treating Pancreanecrosis

M. M. MYLYTSA, O. I. MARTYNOVSKY, M. D. POSTOLENKO

Zaporozhie Institute of Advanced Training of Physicians

Pancreanecrosis treatment is a difficult and unsolved problem, related to the frequency of disease (15–30%), absence of the tendency to lethality reduction, which makes 30% and higher, an increase of the number of spread forms of pancreanecrosis, accompanied with a high rate of shock development, polyorganic insufficiency, pyo-necrotic complications. Within the recent decade cellular and tissue therapy, which is new direction in medicine, has been rapidly developed. This therapy is characterised by the efficient influence into pathological processes in an organism and is quite actual due to an increase of the disease cases, accompanying by immune and endocrinic impairments. Placenta tissue implantation is a source of metabolically-active substances of natural origin, which correct immunological status in an organism and stabilise the system of antioxidative complex protection. Investigation of the results improvements of the methods for surgical pancreanecrosis treatment was the aim of given work. The technologies for slightly invasive and slightly-traumatic surgical operations combining with tissue therapy, were applied in 20 patients. Biopreparation of cryopreserved placenta tissue was produced at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine.

The fragment of cryopreserved placenta tissue is implanted into subcutaneous fat of peritoneal cavity or thorax. Operation is done under a local anaesthesia. Skin dissection made 1.5–2 cm with tunnel formation in subcutaneous fat, the length from 3 to 5 cm, a complete homeostasis. Cryopreserved fragment of placenta tissue is injected into tunnel distantly from a cut place. Suture is put on a skin.

Fragment from of cryopreserved placenta is convenient for the implantation into subcutaneous fat at the place, in a distance from probable operations. The given biopreparation and method of its injection is efficient and safe, does not cause side effects in the patients with pancreanecrosis.

After this treatment the general state of patients improved, psychosis phenomena, toxic encephalopathy, lack of breath, tachycardia decreased, diuresis increased, an urea, creatinine, the level of the molecules with an average mass and CIC reduction was noted. Clinical results (infiltrate decrease, roentgenofistulography, ultrasonography and tomography) testified to the efficiency of pancreanecrosis treatment.

The way for pancreanecrosis treatment, including slightly invasive and slightly traumatic surgical operations with additional implantation of the fragment of cryopreserved placenta tissue into subcutaneous fat into peritoneal cavity or thorax at timely application improves the results of pancreanecrosis treatment, prevents the appearance of unfavourable complications or reduces their manifestations and lethality. Lethality did not exceed 9–10%.

UDC 618.592.013.1

Deep Cold Anabiosis: Its Role in Biology and Medicine

A. A. TSUTSAYEVA

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

Deep cold anabiosis is the state of biological objects when leading processes at macrolevel are completely and reversibly inhibited, they are preserved only at the level of atoms. Transfer of biological system to the state of deep cold anabiosis is the process of cryopreservation, at the stages of which as well as at the stages of returning back of biological object to the state of normothermia non-lethal reparable cryoinjuries appear, they are manifested by reversible change in their morphological, biochemical and biophysical properties.

The character of non-lethal injuries determines the efficiency, indications and the aim of usage of cryopreserved biological objects. After getting back cryopreserved haemopoietic cells to the conditions of normothermia the process of proliferation, differentiation and formation of mature progeny, in particular T-lymphocytes are reversibly inhibited in them. Due to this cause at the transplantation of cryopreserved haemopoietic cells in later terms and less actively develops and proceeds the GVH-syndrome, that enables to stipulate the preference of the usage in clinic of cryopreserved transplants of haemopoietic cells. Under the effect of cryopreservation the immunogeneity of skin transplants reversibly changed in the result of temporary, reversible, partial change in HLA

Матеріал, захищений авторським правом

antigens spectra, destroying of donor's lymphocytes in transplant, an increase of permeability of transplants, that resulted in an active release of soluble proteins out of cryopreserved transplants at the stages of their preparing to transplantation. This explains later terms of the beginning of rejection of cryopreserved transplants as well as their statistically true longer engraftment at the transplantation in semiallogenic system. Mentioned advantages permit to substantiate the preference of usage in clinic of cryopreserved tissue transplants when comparing them with native. Under the effect of cryopreservation the synthesis of interferon in recultured cells of tissue culture is reversibly inhibited. Inhibition of interferon-producing function is observed during 2 passages and recovers to the 3rd one. Mentioned peculiarity allows to recommend primary usage of cryopreserved cells of tissue culture at the stages of viruses isolation. After cryopreservation of actinomyces-producents of antibiotics it has been noted that statistically true rise in antibiotic-producing function, confirmed under conditions during the production, the increase of enzyme-producing activity of bakery yeasts was found. After cryopreservation of mycelium of higheredible fungi their proliferative activity was stimulated.

Mentioned above testifies to the expediency of usage of listed biological objects after cryopreservation at the stages of production. Under cryopreservation effect proliferative activity of tissue culture cells and synthesis of antibodies in hybridomas, which are recovered at the second passage, that is necessary to be taken into account during application of these objects at the stages of biotechnological processes and use cellular lines and hybridomas of the 2nd passage, are reversibly inhibited.

It has been established that the cells initially being in suspended state, lymphocytes of peripheric blood, haemopoietic cells of cord blood etc. possess a high cryoresistance and they can be successfully cryopreserved without usage of traditional cryoprotectants.

To solve fundamental tasks of molecular biology of some interest are the following results: inhibition of the process of intracellular development of bacteriophages in cryopreserved cells *E. coli* at the stages of reparation of non-lethal injuries and the synthesis of "stress-proteins" within this period in cryopreserved cells different from the family of proteins of heat shock. Under the effect of cryopreservation the processes of bioenergetics, respiration in greater extent and glycolysis, which energetically provides early stages of reparation process in lesser one, are reversibly inhibited.

Mentioned above facts enable to consider the problem of deep cold anabiosis as an important general biological problem. Taking into account that for biological objects the rise in temperature sometimes by 2–3 °C is lethal and the reduction of temperature by 20–30 °C as a rule does not cause their death, that can confirm the possibility of bringing the life from an outer space.

UDC 612.592.35.646: 57.085

Efficiency of Sucrose-Based Solution for 1-day Liver Hypothermic Storage of Mature Rats and Human Embryos

O. A. SEMENCHENKO, L. P. KRAVCHENKO, I. V. SHANINA, A. Yu. PETRENKO, B. J. FULLER

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

University Department of Surgery, Royal Free & University College Medical School, London NW3 2QG, United Kingdom

Nowadays the preserving solution of the University of Wisconsin (UW), due to which it was succeeded to significantly prolong the terms of liver cold storage before transplantation, is widely applied in clinical practice. A high cost of the given medium caused the search of new approaches for solving the problem of an efficient preservation of the whole liver under 0–4 °C. We established, that the solution, comprising slightly penetrating into a cell sucrose, was capable to keep the cell volume and high metabolic status of isolated hepatocytes under hypothermia conditions.

Comparative investigation of the efficiency of UW solution and sucrose-based solution (SBS) under 1-day storage of a whole liver under the conditions of refrigerator was the aim of the given work. The dynamics of the change in intracellular ATP content and the level of lactate dehydrogenase activity, alaninamnotransferase (ALaT) and aspartate aminotransferase (ASaT) in a perfusate after 24-hrs liver storage of adult rats under 4 °C and further 60-min normothermic re-perfusion was studied.

Investigation results demonstrated, that washing out of blood and liver saturation with various preserving solutions did not change their energy supply after 60-min' storage at 4 °C. ATP content made 3.4 μM/g for SBS, and for UW this index was 3.5 μM/g. After the liver storage within 24 hrs a decrease in ATP content down to 2.05 μM/g was observed in SBS, and for UW medium this index reduced down to 1.75 μM/g . Under further normothermic organ re-perfusion the tendency to further decrease of the ATP level was observed.

Activity of cytoplasmatic enzymes in perfusate during liver normothermic re-perfusion characterized

Матеріал, захищений авторським правом

the level of hepatocytes injury. No statistically significant differences in the solubilization of LDG, ALaT and ACaT indices into perfusate in the control samples (60 min' storage) were revealed both when using SBS and UW. After 24hrs of liver storage under the mentioned media to the finishing of re-perfusion an increase of the studied enzymes twice or more times was observed in comparison with the level in control samples, however the dynamics of LDG, ALT and ACT solubilization was practically the same for both preserving solutions.

Thus, the usage of SBS for liver hypothermic storage of adult rats is not less efficient, than UW medium. Basing on these results, the estimation of the expediency of SBS usage for liver hypothermic storage of 7–12 gestation weeks' human embryos, was carried-out. Hanks' solution was used as the control in these experiments. It was shown, that viability of cellular suspensions, isolated from liver, stored within 24 hrs under 4 °C did not depend on the storage medium. However the further cryopreservation allowed to reveal the statistical differences: viability of the frozen-thawed liver cells, stored in SBS, was higher. Investigations, carried-out in a liver of human embryos and adult mammalians, testified that SBS possessed a high efficiency and could be used as the preserving medium for an organ hypothermic storage.

UDC 618.177-089.888.11: 615.361.013.11.014.41

Proceeding of Pregnancy and Labors in Patients after Infertility Treatment Using Cryopreserved Donor's Sperm

A. G. GERODES, E. K. ALIPOVA, L. I. LUTSKAYA

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

Centre of Human Reproduction, "Implant", Kharkov

Infertility in marriage is big medical and social problem of the present. Male reproductive system is one of the most sensitive in human being. Male infertility is the cause of 15–50% of all infertile marriages. To the present time artificial insemination became one of the main methods of treatment of infertility stipulated by the disorder in spermatogenesis.

Usage of donor' sperm in modern reproductive technologies became possible due to the development of cryopreservation methods for gametes. The aim of this work was the estimation of onset, proceeding and outcome of pregnancy in patients after artificial insemination with cryopreserved donor's sperm (CDS).

The treatment by the method of artificial CDS was performed for 135 women aged from 25 to 35 years with primary infertility. Indications to performance of CDS were disorders of spermatogenesis in husbands (azoospermia, necrospermia). Insemination was intrauterinely carried-out twice within the period of ovulation, which was determined at transvaginal echography with ultrasound scanning device Bruel&Kjaer 1849 using vaginal sectoral gauge with scanning frequency of 7 MHz. We have conducted 224 cycles 123 of them were done with medicinal stimulation of folliculogenesis and ovulation (on indications). We have received 59 pregnancies (43.6% per patient, 26.3% per cycle of insemination), among them there were two twins. Four pregnancies stopped in the term up to 10 weeks (6.7%). In 8 patients the pregnancies proceeded with toxicosis of the first half of pregnancy (13.5%) in 3 with the threat of pregnancy interruption at early term (5%) in 7 patients the edemas were observed (11.8%) in 2 patients there was nephropathy of the 1st–2nd grades (3.4%). There is information about labors in 50 patients, that made 83%. In 87% of cases the labors were in time, to 12 patients Cesarean section was done: for 4 patients because of the weak labor activity (8%), for two patients because of the age (35 years) and great desire to have a baby, for one patient due to the twins and first fetus pelvic presentation. Nine pregnancies are in progress.

Thus the course of pregnancies and labors in patients after insemination with CDS in our investigations did practically differ from the course of spontaneous pregnancies in general population.

Till now there are a lot of information have been accumulated about the fact that in children born in the result of artificial insemination by cryopreserved sperm, developmental defects are found with the same frequency as at natural conception. In the observed group 52 children were born: 18 girls (34%) and 34 boys (66%). The state of the majority of born children is satisfactory, that was estimated by Apgar's scale in 8–9 points. Four were born in asphyxia of the first grade. Children's weight at the moment of birth made $3\,280 \pm 250$ g.

Thus usage of cryopreserved sperm permits to conduct treatment of infertility not negatively affecting the course of pregnancy and labours in the patients as well as health of children, born after treatment of their mothers by CDS method.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 615.832.9.811.2: 616.83

Hypothermal Optimisation of Hirudotherapy at Cerebral Vascular Pathology

V. Yu. VASILOVSKY, L. F. VASILOVSKAYA, V. V. VASILOVSKY,
O. I. ANASTASIADI, K. V. SKRIPNICHENKO

Polyclinic № 1 of Territorial Medical Union of Lenin's district, Kharkov

Actual interest in hirudotherapy is stipulated by its favourable effect on blood circulation, microcirculation, coagulanting blood system, metabolic processes in the whole at different diseases, including discirculatory encephalopathy. At the same time the local application of medicinal leeches is often accompanied by a long bleeding sickness, local allergic and inflammatory manifestations, that complicates dynamical, stable correction of pathological shifts and requires the development of new approaches to the method of hirudotherapy, permitting to avoid side-effects.

The possibility for activating the tissue microcirculatory drainage and a contra-inflammatory effect of local hypothermia were established by preliminary experimental data. Taking into consideration this fact, we used the combination of local hypothermia with hirudotherapy of cervico-collar zone and the projection mastoid processes projection in aged patients with a discirculatory encephalopathy.

In order to estimate the therapeutic effect we determined general and local clinical symptoms, indices of cerebral hemodynamics by the data of ultrasound dopplerography, coagulogram and blood rheological properties.

As the result of the investigations performed an increase in general clinical picture of a disease with the normalisation of systemic and cerebral hemodynamics, coagulation and blood rheological properties was registered. It should be noted that the application of local hypothermia after the effect of medicinal leeches in the patients with discirculatory encephalopathy sharply decreased the bleeding sickness, edema extent and tissue infiltration, inflammatory and allergic reactions in the zone of skin damage, that optimised hirudotherapeutic effect.

UDC 612.014.43: 611.013.68: 616.12-008.331.1.08

Combined Influence of Rhythmic Cold Effect and Cord Blood on the Activity of Proteinases and their Inhibitors in Old Rats with Stimulated Hypertension

L. M. SAMOKHINA, V. G. BABIJCHUK, V. V. LOMAKO, I. A. POZNAKHAREVA,
V. S. MARCHENKO, V. V. MAMONTOV, A. V. SHILO, I. I. LOMAKIN

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

Institute of Therapy of the Academy of Medical Sciences of the Ukraine, Kharkov

The proteinase-proteinases inhibitor system participates in the formation of non-specific organism protective responses, balance impairment in the mentioned system is the characteristic for a stress, pathology and age. As the modulator of non-specific organism responses the rhythmic cold effects (RCE) and cord blood (CB) can be used.

The aim of investigation was to reveal the character of combined influence of RCE on the activity of proteinases, α-1-proteinase inhibitor (α-1-PI), α-2-macroglobulin (α-2-MG) under the conditions of stimulated hypertension in old rats.

Experiments were carried-out in 2-years' white mongrel rats. Reflexogenic hypertension was modeled by painful irritations by means of interrupted electric current effect up to the appearance of stable increased arterial pressure. RCE was done by means of cooling device, elaborated at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine once within 65 min to non-narcotized rats. Cord blood of 17–19-days' rat embryos and mature blood (MB) of a pregnant rat was obtained according to the methodical recommendations, elaborated at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine; blood was intraperitoneally injected by 0.5 ml (cell number in the preparation dose is $3.5 \cdot 10^7$/ml). Rats were decapitated in 4 days after the injection.

Lung, heart, liver and kidneys tissues were homogenized and then centrifuged by means of PC-6 centrifuge with 5 000 rot/min under the temperature of 4 °C.

Proteinase activity (general proteolytic activity), α-1-PI, α-2-MG were determined using highly sensitive enzymic methods (10^{-9}–10^{-10} g), elaborated at the Institute of Therapy of the Academy of Medical

Матеріал, захищений авторським правом

Sciences of the Ukraine (Patent of Russia № 1655991, Patent of Ukraine № 20171).

It was noted, that hypertension stimulation caused a significant increase of proteinase activity in liver and a slight extent in kidneys with the absence of changes in the levels proteinase activation. RCE influence in intact rats manifests more significant effect on the given system and results in the proteinase activation in lungs, liver, kidneys at the background of considerable decrease of α-1-PI in liver, that is characteristic for the development of stress response.

In the result of RCE in rats with hypertension the normalization of proteinase activity and α-1-PI decrease in lungs and in a significant extent in heart and liver (lower than the control level) was observed. CC effect in rats with hypertension caused a reduction and normalization of proteinase activity, as well as a decrease of the α-2-MG level in lungs and liver. It has been revealed, that these CC effects are not characteristic for MB. Combined influence of RCE and CC promotes to the normalization of proteinase activity without the changes in the α-1-PI level and considerable rise of α-2-MG in heart.

A decrease of inhibitory potential due to a separate action of RCE and CC in rats with hypertension testified to the weakening of non-specific organism resistance. Their combined application resulted to the correction of the changes, caused by the hypertension stimulation and promoted to the increase of protective potential in a heart, disorder of the functioning of which characterized this pathological state.

UDC 615.361.013.68

Cord Blood as the Component of Supporting Therapy

A. A. TSUTSAYEVA, O. V. KUDOKOTSEVA, A. V. SCHEGLOV, G. S. TUPCHIENKO, N. P. LOBASENKO

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

At the Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Nat. Acad. Sci. of Ukraine within the frames of the program on cell and tissue transplantology the efficient technologies of hemopoietic cell long-term storage have been developed.

Nowadays one applies into a clinical practice an original preparation "Hemocord", being a suspension of cryopreserved hemopoietic and auxiliary cells of cord (umbilical cord) blood in autologic plasm, rich with biologically active substances, growth factors, immunomodulators, regulatory monokines, interleukines etc. The washing-out cryopreservation method, patented by us, allows not only preserving for a long time the stem and committed hemopoietic cord blood cells, but using the preparation just after freeze-thawing. Due to the capability of these cells to realise into a recipient's organism all their intrinsic properties (proliferation and differentiation), the preparation can be used as a long-, or short-living transplant. The aim for using short-living transplants is to correct the processes of hemopoiesis and immunogenesis, stimulation of non-specific immunity factors, the activation of the organ and system functioning, providing the homeostasis stability.

"Hemocord" preparation is authorised for clinical application by the Ministry of Health Care of Ukraine of 16 February 2000. "Hemocord" transfusion was performed for more than 50 patients with different pathology: at anemia of different genesis, liver cirrhosis and chronic hepatitis, chronic leukosis, purulent-septic post-operative complications, chronic herpetic infection and cytomegalovirus; oncologic patients after chemotherapy; surgical patients with lung and pleura purulent diseases.

"Hemocord", compatible according to ABO and Rh-matching, was intravenously introduced by drops in the amount of 50–60 ml with the total nucleic cell content not lesser than $3.0 \cdot 10^8$. In the preparation after thawing more than 90% of preserved hemopoietic cells, according to trypane blue, and more, than 89% of viable ones, are preserved. No post-transfusion complications were observed, patients well endured the transfusion. In all patients the improvement of clinical state even by 2nd day after transfusion was observed: there was a decrease in pallor, weakness, tachycardia, tachypnea, virtigo, increase in an organism's general tonus. To the 3rd–4th day after transfusion a statistically true positive dynamics of hemograms was noted: at hemocytopenia the erythrocyte number in peripheric blood increased in average by 25, thrombocyte by 43, leukocyte by 60%. Hemoglobin number augmented by 35%, ESR statistically true reduced (by 12–18 units). There was the recovery of red blood indices at hemocytoses. In all cases the thermograms, immune and hematologic status of patients was normalised, there was an acceleration of reparative processes (for example the closure of bronchial pleural thoracic fistula and purulent area purification in the patients with lung and pleura purulent diseases).

The experience of "Hemocord" transfusion has demonstrated, that this preparation application has a big perspective for a combined treatment of diseases with different etiology.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 615.361.013.9.014.41: 616-089.843

Paracentetic Injection of Foetal Cell Material into Target Organ as a Way for Transplantation Efficiency Increasing

A. D. ZUBOV

Diagnostic service of Donetsk regional clinical local medical association

Foetal cell material (FCM) is used much more actively in a practical medicine for treatment of various disorders. The success level of foetal cells transplantation depends on the minimization of rejection response expression, keeping of viability and functional activity of the FCM injected. Stated parameters depend directly on the zone and the way of injection of foetal cells suspension. In present the following ways of FCM injection are used:

1) intravenous injection (e.g. foetal hepatocytes suspension);

2) an injection in subcutaneous fatty tissue of anterior abdominal wall;

3) an injection under the sheath of the rectus abdominis;

4) surgical formation of the FCM depot in the omentum.

The disadvantages of stated ways are stipulated by fast inactivation in organism (1), with rejection response development, the demarcation zone formation, an impediment of foetal cells functioning products resorption in blood channel (2, 3), with a necessity of a surgical intervention (4). We believe that the optimal way is a low-invasive paracentetic injection of FCM suspension under the control by means of visualization. Now the most wide-spread of them are the ultra sound (US) investigation, computer and magnetic resonance tomography. In connection with greater availability, harmlessness, availability of dynamic observation in the real time scale the greatest advantages has the US-control with colour Doppler mapping (CDM). According to modern developments one can inject the FCM immediately into thymus, subcapsularly into spleen, intraportally and into other target organs.

Continuous US-control with CDM allows the choosing of safe access trajectory to target organ, an estimation of vascularisation of assumed injection zone and, correspondingly, the expected rate of FCM washing-out and diffusion of their functioning products into blood channel, the adequacy and sufficiency of the cell suspension volume injected, revealing of possible complications (hemorrhage, suspension leaking-down) and arrange their cupping in time. Application of CDM also allows the improvement of paracentetic needle visualisation.

At the Department of Surgery of Diagnostic service of our association we have the experience of paracentetic injection of foetal hepatocytes in liver portal vein at hepatic insufficiency and fibroblasts in cavity of large joints at post-traumatic arthrosis. It was made under US control with CDM (US scanner Dornier AI 5200 with Doppler graphic attachment with the gauge 3.5 and 5 MHz). In all cases the injection was made in the given zone, there were no complication at punction, a positive clinical dynamics was noted.

Thus the FCM injection in target organ under ultra sound control with CDM is the prospective way of efficiency increase and foetal cells transplantation safety.

UDC 615.361.438.014.41: 616.311-002

Application of Xenothymus Cryopreserved Fragments in the Program of Combined Therapy of Patients with Wide Spread Forms of Peritonitis

A. E. LAGODA, V. M. ZYBIN, V. K. KHABUSEYEV, S. A. PAVLICHENKO, G. E. MOLOTYAGIN, Yu. P. GNIDENKO, A. S. PETRENKO

Kharkov State Madical University

The problem of treatment of purulent peritonitis and pyo-septic complications is actual in the current surgery of abdominal cavity organs. An acute peritonitis remains the most frequent cause of death rate at an acute surgical pathology of gastroentric tract organs.

Within recent years the considerable successes were achieved in the diagnostics and a combined treatment of primary and secondary peritonitis, however an evident tendency to a decrease in total lethally was not observed. A progressing proceeding of pyo-septic complications attracts the attention not only of Ukrainian scientists, but also foreign ones.

The syndrome of endogenous intoxication (SEI), which inevitably develops at wide spread forms of peritonitis, is of great importance in peritonitis pathogenesis and is one of the leading factors, stipulating the disease severity. One of new and perspective di-

Матеріал, захищений авторським правом

rections of the development of methods for overcoming the SEI is biosorption or cellular sorption therapy: application of a fragmented xenospleen tissue, procured from domestic mature pigs. These methods advantage consists in the fact, that together with a desintoxicational effect they have an immune-correcting effect.

The way of an extracorporal hemoperfusion through cryopreserved fragments of pig's thymus, which will allow to improve the treatment results of surgical patients with a secondary immune deficit by means of involving into a perfusate of xenothymus humoral factors, was developed at our clinic together with the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine.

Xenothymus is procured from domestic mature pigs, aged up to 1 year. Gland fragments after a special treatment are subjected to cryopreservation and preserved in the biobank in tanks with liquid nitrogen.

Hemoperfusion through the xenothymus cryopreserved fragments is performed by means of the apparatus for hemosorption through a sorption column, which contains 40 g of sorbent of the CKH I series, 15 g of xenothymus fragmented tissue. In recirculation system the column is washed-out with 40 ml of physiologic solution with 10 000 Units of heparin and 1 g of carbenicillin. After a preliminary hemodillution (an intravenous introduction by drops of 400 ml of rheopolyglucinum), general heparinization in respect of 300 Units of heparin per 1 kg of a patient's weight, the hemoperfusion through the prepared sorption column with the rate of 80–120 ml/min in the volume of 1–2 of a patient's circulating blood volume (CBV), is carried-out.

We have the experience of the described method application in 28 patients. All of them entered the clinic in an urgent way with a picture of general peritonitis, resulted from a perforative ulcer (11), destructive appendicitis (12), destructive cholecystitis (5). All patients were urgently operated.

After operation in all patients we revealed different extents degrees of immune deficit, manifesting in a decrease in leukocyte phagocytic activity, reduction of lymphocyte absolute number, content of A, G, M immunoglobulins, that pointed to a manifested intoxication and the suppression of humoral and cellular immunity. To the 2nd day after operation an extracorporal hemoperfusion was carried-out to all patients through the xenothymus cryopreserved fragments. Besides an evident improvement of clinical indices (a decrease in tachycardia, tachypnea, peristalsis recovery) we noted, that to the 3rd day after operation an absolute number of T-lymphocytes increased approximately by 30% of initial one, leukocyte phagocytic activity from 45% of initial one augmented up to 89%, there was an increase in immunoglobulin content: A from 159 to 230 mg/%, G from 601 to 930 mg/%, M from 58 to 103 mg/%. To the 5th day after operation these indices reached the normal values practically in all patients.

Thus, the application of xenospleen fragmented tissue at the syndrome of endogenous intoxication in the patients with peritonitis gives pathogenetically substantiated high clinical effect.

UDC 617: 616.24: 615.27: 57.043

Application Experience for Endotracheal Introduction of Extract of Xenospleen Cryopreserved Fragments in Complex Treatment of Patients with Purulent Processes in Lungs

V. V. BYZOV, I. P. VYSEKANTSEV, S. E. GALCHENKO, B. P. SANDOMIRSKY

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

Complex treatment of patients with acute purulent processes in lungs comprises the drainage of abscess, antibacterial, disintoxicational, immune modulating therapy and bronchial sanation. Along with other methods for disintoxication a patient's blood perfusion through extracorporally connected xenospleen or its slices or fragments, including cryopreserved ones, as well as intravenous injection of xenospleen perfusate.

At the Department of Experimental Medicine at the IPC&C the methods of obtaining the cryopreserved fragments of xenospleen and their extract for following clinical application were developed. We have studied clinical efficiency of endotracheal introduction of the extract of xenospleen cryopreserved fragments (EXCF) in complex treatment of 58 patients with lungs abscesses. The EXCF was endotracheally introduced through microtracheostoma in the volume of 5ml twice a day within 10–12 days. Antimicrobic preparations were endotracheally introduced to the patients of the control group with similar diseases.

In the process of complex treatment in patients of main group in parallel with more manifested positive clinical dynamics also we noticed statistically significant more rapid recovery of the indices of the factors of non-specific resistance and specific immunity. The activity of phagocytosis and HCT-test in alveolar macrophages and segment-nuclear neutrophiles of bronchial secretion recovered more rapidly. Endotra-

Матеріал, захищений авторським правом

cheal introduction of EXCF contributed to the recovery of the concentration of lysozyme in sputum of patients even to the 5–7 days, while in patients of the control group this index did not approach to the norm.

After endotracheal introduction of EXCF in patients of the main group the processes of lipid peroxidation were more manifested, that was accompanied by the reduction in the concentration of superoxide dismutase (key enzyme of antioxidant protection) in blood plasm and increase in the concentration of alpha-tocopherol.

To the 10–12 days in patients of the main group the concentration of complement in blood, content of C-reactive protein recovered to the norm values and ESR considerably reduced. In addition, after the introduction of EXCF in patients such indices of cellular and humoral immunity of peripheric blood as absolute number of T- and B-lymphocytes, number of T-active lymphocytes, T-helpers, T-suppressors, immune regulatory index, content of circulating immune complex, IgA, IgM, IgG concentration, as well as concentration of secretory IgA in patients' sputum were recovered more rapidly to the norm values or had a statistically true tendency to the recovery.

No side effects were found during the whole period of treatment and observation within 2.5 years after finishing the course of treatment.

UDC 612.592: 616.33-005.1

Endoscopic Cryoeffect by Freon in Combined Conservative Treatment of Mallory-Weiss Syndrome

A. E. LAGODA, V. M. ZYBIN, S. A. PAVLICHENKO, G. E. MOLOTYAGIN, Yu. P. GNIDENKO, G. V. SADOVSKY, A. S. PETRENKO

Kharkov State Madical University

Within the period from 1990–2001 in the Clinic of General Surgery N1 we observed 68 cases of Mallory–Weiss syndrome occurrence, that made 8.2% of all observed gastrointestinal bleedings of different etiologies. According to the age (59 men (86.8%), 9 women (13.2%)) the patients were distributed in the following way: up to 30 years – 2 (2.9%), 31–40 years – 12 (17.6%), 41–50 years – 14 (20.6%), 51–60 years – 23 (33.8%) and more than 60 years – 17 patients (25.0%). The majority of the patients observed were within the age range more than 40 years (79.5%).

All patients entered the clinic in an urgent way. To the first day after bleeding appearance 31 patients (45.6%) were accepted, to the second one – 22 (32.4%) and more than 48 hours – 15 ones (22.0%). In 64 patients the day before bleeding a recurrent vomiting took place (94.1% of patients), in 4 ones the bleeding appearance was related to a hard work (5.9%). Under clinical observation in the majority of patients we revealed the following accompanying diseases: chronic gastrites – 23 (38.8%), duodenal peptic ulcer – 8 (11.8%), chronic hepatites – 14 (20.6%), chronic indurative pancreatites – 11 (16.8), hypertensive disease – 12 (19.1%). The first degree of the loss of blood by A. A. Shalimov (1987) was noted in 31 patients (45.6%), the second in 27 (39.7%) and the third one in 10 ones (14.7%). During a combined study of the state of coagulative and anticoagulative blood functions (bleeding duration, coagulation time, tolerance to heparin, racalcification time, prothrombin and fibrinogen content) it was revealed, that in the majority of patients the Mallory-Weiss syndrome was developed at the background of the normal indices of coagulogram (85.3%), in 4 patients (5.9%) the signs of hypocoagulation occurred and in 6 ones (8.8%) a moderate hypercoagulation was noted.

An urgent esophagogastroscopy was carried-out to all patients. The insufficiency of cardial constrictor with the signs of distal esophagitis was revealed in 59 patients. The rupture of mucous membrane in 79.4% was in cardial stomach part and in 20,6% the ruptures were both in a cardial part and stomach body. In 8 patients we diagnosed a ceased bleeding with a stable homeostasis, in 42 the presence of porous thrombuses with blood leaking down and in 18 ones a continuing bleeding without signs of thrombogenesis.

After setting the diagnosis, the mucous membrane ruptures were treated by freon, which was supplied through a cryoprobe, conducted via a biopsy channel of endoscope at the distance of 1 cm from bleeding source. In the effect zone a white hoar-frost was formed in 3-5 sec, that meant a decrease in tissue temperature down to -28C. The effect exposure varied from 5 to 10 sec.

After finishing of cryotreatment of pathologically changed sites of mucous membrane, a constant probe was left in stomach for controlling bleeding ceasing and intragastric introduction of preparations of colloid silver and aminocaproic acid. In 58 patients a stable homeostasis was achieved after one-fold cryoefffect, in 6 after the two-fold, in 2 ones after the thresh-fold one. Only in 2 cases (2.9%) the effect was insufficient and the patients were subjected to an operative treatment: gastrotomy with the stitching of mucous membrane bleeding sites.

Thus, our experience testifies to a high efficiency of cryoeffect by freon, combined with an intragastric hemostatic therapy at gastrointestinal bleedings, caused by Mallory–Weiss syndrome.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 615.832.9: 616.342-008.8

Experience of Post-Operative Wounds Cryotreatment in Patients, Operated on the Indication of Perforative Ulcers

A. E. LAGODA, G. E. MOLOTYAGIN, V. M. ZYBIN, S. A. PAVLICHENKO, Yu. P. GNIDENKO, A. S. PETRENKO

Kharkov State Medical University

Cryosurgical treatment of suppurated laparotomic wounds was carried-out in 67 patients, operated on the indication of perforative duodenal ulcer. After dissection of non-viable tissues a wound surface was cryotreated by a vapour-fluid nitrogen jet using the cryosprayer CS-02 at the distance of 20–30 cm up to the wound getting white and a short-term hoar-frost appearance on it. Further the treatment was performed by a commonly used methods.

The control group consisted of 32 patients, whose suppurated laporatomic wounds were treated by a commonly used methods without cryoeffect application. The efficiency of the performed treatment was determined by the character of wound process course: we took into account the terms of wound purifying from pus, fibrin and necrotic mass, peculiarities of proceeding of the second phase of wound process (terms of wound filling in by granular tissue and epithelisation beginning). For making the data objective a cytological study of exudates was performed to the 1st, 3rd and 7th day after the treatment beginning, for this purpose one used the smears-prints, taken from a wound surface, fixed by Nikiforov mixture and stained by Romanovsky–Gimza.

During the clinical study of wound process course in the considered groups we did not observe any considerable differences in the first days: in all patients an increase in exudate amount, a manifested perifocal hyperimia and soft tissue infiltration were observed.

To the 3rd day a more manifested regression of inflammatory changes in the group of patients, which were treated using the cryoeffect, was noted.

To the 7th day in the patients of main group the skin around the wound got its usual colour, the infiltration and painfulness of soft tissues were not practically found out. In the patients of the control group in this period there were a skin hyperemia around the wound, oedema of soft tissues, painfulness at the palpation, the presence of a purulent discharge was noted in all patients.

When studying bacterial contamination of a wound surface in the investigated groups we obtained the following results: in the patients of the main group even to the 3rd day the wound sterility was observed in 43 patients, to the 7th day in all patients there was the exudate sterility, meanwhile in the control group even by the 7th day their sterility was noted only in 25 patients.

The duration of patients' staying, who were treated by croeffect application, at the hospital made 24.3 days in average, in the control group it made 27.8 days.

Thus, the effect on a suppurated operative wound by a vapour-fluid nitrogen jet is the efficient addition to surgical treatment, allowing to considerably decrease the wound microbial contamination and significantly accelerate the terms of its healing.

UDC 611.36.013: 611.8.013: 617.735-002

Application of Preparation "Hemoneuronal" in Combined Treatment of Patients with Diabetic Retinopathy

Yu. A. DEMIN, A. Yu. PETRENKO, E. I. GONCHARUK

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

Pathogenesis study of diabetic retinopathies, as well as the development of new methods for their treatment are actual problems of modern ophthalmology. This vascular pathology of eye fundus is the main cause of blindness. The investigations of the WHO experts proved that diabetic retinopathy became an important medical and social problem for the majority of world countries. It is known that the main links of diabetic retinopathy pathogenesis are metabolic disorders, vascular changes, impairment of cellular and humoral immunity, sensibility to own tissue of an eye. Therefore when treating diabetic retinopathies it is preferable to use the preparations with a multiple therapeutic effect. Cellular embryonic preparation "Hemoneuronal", proposed by the Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the national Academy of Sciences of the Ukraine is a perspective one. Its clinical usage was realized on the base of regulating documents of the Ministry of Health Care of Ukraine and developed methodical recommendations.

Матеріал, захищений авторським правом

The aim of this work was to study the clinical efficiency of cryopreserved preparation "Hemoneuronal" transplantation in the patients with a non-proliferative form of diabetic retinopathy. We observed 72 patients, to whom the transplantation of embryonic cell preparation at the background of traditional therapy was carried-out. The control group comprised 116 patients, with an ordinary allopathic treatment, including angioprotectants, rheocorrectants, anabolic hormones, antisclerous preparations, vitamins.

The main indices of the treatment efficiency were the acuity of vision, as well as the data of oculography, characterising the state of retina pigment epithelium. By means of double-factor dispersion analysis we determined the effect degree of different methods of treatment and a temporal factor on functional rehabilitation of the organ of vision.

In the control group of patients the acuity of vision increased to one month after treatment from $0.31 \pm 0{,}2$ to 0.46 ± 0.02 and then to the term of 1 year slightly decreased, achieving the value of 0.30 ± 0.2, that was statistically true higher than an initial value ($p < 0.01$) by 25.8%. The visual acuity increased in 18% of patients, remained stable in 67% and aggravated in 15%. In the experimental group of patients after the transplantation of "Hemoneuronal" preparation the acuity of vision after the treatment increased to 1 month of rehabilitation period from 0.30 ± 0.03 to 0.54 ± 0.02 and to 1 year of observation slightly reduced (0.51 ± 0.03), that was statistically and significantly ($p < 0.001$) higher than an initial level by 70.0%. The acuity of vision augmented in 42% of patients, remained previous in 44% and aggravated in 14%. The results of double-factor dispersion analysis point to the fact, that the changes in visual acuity in the patients with a non-proliferative form of diabetic retinopathy depend by 30–31% on the applied method of treatment, by 3–5% on the observation time after conducted treatment.

When analysing the data of oculography it was established, that in the control group of patients the Arden's coefficient made 120.0 ± 7.1 before treatment, just after treatment 136.1 ± 7.3 and in 6 months 138.3 ± 7.1, that was higher than initial level by 13.3. These differences can not be considered as statistically true ones ($p < 0.05$). In the group of patients after transplantation of preparation "Hemoneuronal" the Arden's coefficient made $1\,160.0 \pm 6.9$ before treatment, 146.2 ± 7.2 after one and 170.2 ± 7.0 in 6 months, that was statistically and significantly higher than an initial value ($p < 0.001$) by 46.7%. The results of double-factor dispersion analysis point to the fact, that the changes in the data of oculography in 25–27% cases depend on the applied method of treatment, in 3–4% on the observation time and in 0–2% on a combined effect of these factors.

Thus the treatment of patients with a non-proliferative form of diabetic retinopathy with the application of preparation "Hemoneuronal" is more efficient in comparison with the traditional method of therapy and is a perspective one for rehabilitation of this category of patients.

UDC 615.832.9: 617.713-001.4

Results of Cryotherapy Application in Combined Treatment of Non-Penetrating Cornea Wound

V. I. BELOUS

Territorial Medical Union № 1, Zhitomir

The results of cryotherapy application in combined treatment of traumatic keratites in 64 patients (64 eyes) were studied.

For the assistance 12 patients applied in the 1st and 2nd day, to the 3rd–5th day – 15, to the 6th–10th – 19, in later terms, after unsuccessful treatment the rest 18 ones. At the beginning of treatment in all patients under biomicroscopy we observed a defect of cornea epithelium with the infiltration in its medium and deep layers and accompanying complications: iridocyclitis (26 eyes), synekhia (15 eyes), foreign body in deep cornea layer (23 eyes).

The studies of inoculations from a conjunctival cavity in 64 patients for a microflora revealed the growth in 38 cases (Gram-negative bacillus in 18 patients, hemolytic staphylococcus and pneumococcus in 20 ones). Treatment was carried-out by medicamentous means (including pathogenic ones) with adding cryotherapy. The cryoeffect was carried-out using an ophthalmologic cryoapplicator KG-195, working in a liquid nitrogen with a changeable tips. Cryoapplications were applied when treating 64 patients (64 eyes). Cryotherapy sessions were accomplished every day. The time of cryogenic effect was within 10–15 s in average. After each sessions the patients noted a subjective improvement, manifested in a reduction of pains, photophobia, lacrimation. A rapid epithelisation of defects, resorption of infiltrates incornea, cupping of inflammatory reaction, obliteration of small vessels in cornea were objectively observed.

Defects healing occurred in average after 4–5 sessions (to the 5th–6th day), and clinical recovery to the 9th–10th one. The repeated studies for pathogenic microflora in the same patients were negative. The enlightenment of cornea opacities under cryotherapy effect occurred also after clinical recovery of a patient,

Матеріал, захищений авторським правом

this is way the treatment was continued upto obtaining the optimal anatomic and functional results. As a result from 38 eyes with surfacial traumatic keratites a slight opacity remained in 20 patients, and a complete enlightenment in 18 ones. From 26 eyes with deeper processes the cornea enlightenment and a slight opacity occurred in 11 ones. An increase in the acuity of vision in all patients in average was by 0.35 (0.4 before the treatment, 0.75 after one). The vision aggravation was not observed in any patients. The distant results of the treatment were traced in 42 patients in the terms up to two years. The further enlightenment of cornea opacities and an increase in visual acuity in 27 eyes in comparison with the direct results of the treatment were noted.

Thus, our observation of the treatment results in a comparative aspect with the group of identical patients, where we did not apply a local hypothermia, allow to note, that the addition of cryotherapy to a complex of therapeutic means of the influence on the course of cornea non-penetrating damages contributes to its rapid epithelisation, infiltrate absorption, prevents from infection sign spreading, reduces the treatment terms with a quite favourable anatomic and functional outcome.

UDC 612.592: 616.314.17-008.1

Adaptive Mechanisms of Resonance Cold Effects and Application Perspectives of Parafractal Hypothermia under Stress-Induced Damages of Parodontium

G. V. MALYSHEVA, G. A. BABIJCHUK, V. S. MARCHENKO

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

Among the problems, related to etiology and pathogenesis of parodontium diseases, the scientific group of the WHO even in 1980 recognized as actual the investigations of psychological stress effect. National scientists proved an important role of general adaptive syndrome in pathogenesis of parodontium diseases (L. M. Tarasenko et al., 1999), pointed to a special importance of sympathetic link overtension. Therefore it should be expected, that the methods of effect, directed to an increase in an organism's resistance to emotional stress, could be efficient also when treating different pathologies of parodontium. Different variants of therapeutic cold effects are related to such methods, contributing to sanogenesis processes.

Usage efficiency of interrupted contrast temperature effects was demonstrated in clinical works of Kiev school of stomatologists (A. P. Grokholsky et al., 1995). However an empiric character of parameter selection of therapeutic hypothermia limited the possibilities of its application. The main action mechanisms of resonance hypothermia (RH) on an organism, as well as at emotional stress, are generally determined. Its adaptive effect under experimental hypertension, acute overcooling, overheating, spastic states, was demonstrated. Under these conditions the stimulation of hypothalamic centers due to BBB permeability regulation and the normalisation of sympathoparasympathetic relations (V. G. Babijchuk, V. S. Marchenko, A. V. Shilo et al., 1997–2001) occur. However the used regimens of resonance hypothermia (60–120 min with frequency of ζ-biocurrents of 0.05–0.5 Hz) occurred to be insufficiently effective at a parodontosis-like pathology, caused by chronic emotional and painful stress. After RH the signs of dystrophy considerably weakened, but still remained, especially in marginal parodontium, a bleeding sickness, retraction, gingiva inflammation, epithelium exfoliation, dental neck denudation were noted. Probably, RH does not provide a sufficient extent of decrease in CNS excitation for cupping parodontium diseases, although under these conditions the excitation threshold (time of penicillin convulsion appearance) significantly augmented.

Parodontium is a highly sensitive reflexogenic zone, differing by a rich innervation and vascularisation, where adreno-, and cholinoreceptors are widely distributed, and all complex of tissues is in a thorough functional relation with hypothalamus. Proposed approach to the development of the complex of resonance hypothermia new programs is directed namely to these links.

Analysis of our experiment results on the given problem demonstrated, that after RH the relaxation dynamics of BBB permeability for catecholamines in the value range of the second-day is scale-invariant (Figure with a quasifractal structure (measuring units ≈1.3). It is remarkable, that the main ultrastructural BBB components in a statistical meaning are self-affinic and under RH are also characterized by fractal measuring units ~1.3 (L. N. Marchenko et al., 1999–2000). We can speak about the formation of structural and dynamical fractal system, which is also structural and functional base of direct and reverse regulation bounds of brain activity general level. Therefore it seems expedient to use fractal regimens of resonance therapy for cupping the consequences of distress, including in practical paradontology.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 615.361.014.41: 57.086.13

Some Ethical Bases of the Activity of Tissue Banks

L. T. VOLOVA, V. V. ROSINSKAYA, S. A. EMELYANOV

Samara State Medical University, Russia

Samara State University, Russia

The history of establishment of the service for procurement and preservation of organs, tissues and tissue components (excluding blood service) has made less than 50 years. After finishing the second world war the people of the world felt very strongly that scientist can not be beyond the moral and moreover above it; he is obliged to maximally foresee negative consequences of his scientific investigations and is morally responsible for them in front of the community. This understanding found its reflection in the "Declaration of human rights" adopted in 1948. The aim of the creation of tissue banks is to improve the quality of medical aid to population. Along with this it resulted in many new ethical problems, the number of which with the course of time did not reduce. Vice versa, the development of the idea of self-value of human personality (human being is always the aim and never is the mean) makes increased demands to ethical base of the activity of tissue banks at all its stages. In medicine an old principle of Hippocrates "noli nocere" ("don't harm") gains primary value again.

Modern tissue banks is engaged in the procurement of tissues and tissue components of mesenchyma origin with following their treatment and production derived from them biomaterials, available for implantation to a patient without preliminary determination of histocompatibility. The most complicated ethical problems appear at the stage of procurement of cadaveric organs and (or) tissues for production of bioplastic material from them, because now acting legislation does not reflect all sides of given process. The responsibility for meeting a respectful and human attitude to a dead body is laid to medical personnel, making the procurement of cadaveric tissues, only individual ethical base can be the standard of this attitude .

Besides, ordinary consciousness does not make the difference between transplantation of organs and (or) tissues and implantation of bioplastic materials from tissues and tissue components. In this case a considerable "merit" belongs to mass media. This should be remembered by the collaborators of tissue banks and physicians-bioimplantologists when obtaining informed consent of a patient. Tissues and tissue components in the process of long-term and complicated treatment loose antigeneity and individual specificity, "deprive of the individuality" and transfer into the products of medical purpose, biological properties and function of which considerably differ from initial tissues. This is temporarily existing in an organism of recipient alien biological material, which is gradually resorbed and on its place new own organotypical tissue forms. Thus ethical contradictions are partially taken-off, but the problems related to national traditions or religious notions of a patients, can appear.

UDC 615.832.9: 612.663.5

Mechanisms of Action of Trigger Hypothermia in Therapy of "Psychosomatic Infertility"

O. V. ERSHOVA, V. I. GRISCHENKO, I. I. LOMAKIN

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

According to statistical data the cause of 20–25% of infertile marriages is "psychosomatic infertility": a sterile marriage at a complete absence of any irreversible pathological changes, preventing the conception and normal fetus maturation. First of all, these are functional disorders of ovulation, up to amenorrhea, appearing as a result of disorder of a regulating effect of hypothalamohypophysial system, interaction of its neurohumoral functions and an inhibiting effect of pineal gland. Thereat it is necessary to take into consideration the possibility of a reverse bond, realising by an active effect of sexual hormones on central nerve system. In the complex with accompanying affective component it creates a resistant pathological circle of secondary hormonal dysfunction and can contribute to the development disorder of implanted fetal ovum at a complete absence of some pathological reasons.

In the experimental investigations conducted by us in white rats we revealed specific mechanisms of trigger hypothermia effect on the system of neuroendocrine regulation. Basic reaction of catecholamines consisted in a decrease in norepinephrine content in hypothalamus by 30% (from 16.28 ± 0.74 to

Матеріал, захищений авторським правом

10.68 ± 1.13 ng/g) with a decrease in rectal temperature down to 35–34 °C at the absence of statistically true changes of its level in blood and a reduction of its content in adrenal glands. At the same time the entering of neuromediators into brain structures through blood brain barrier was strengthened. Permeability coefficient under trigger hypothermia increased in 12 times for epinephrine, in 5 times for norepinephrine, in 3 times for acetylcholine, in 8 times for GABA. Along with this, a dynamical change in serotonin secretion in surviving epiphysis sections *ex vivo* was noted. Changes in serotonin secretion in epiphysis can be considered as the reaction, directed to maintain the adequacy of neurohumoral processes of hypothalamo-hypophysial system under conditions of a periodical widening of temperature homeostasis ranges. Forming space-time patterns of bioelectrical activity allow to control the process development in dynamics. Functional and dynamical change in tonus of central adrenergic structures involves the change in vegetative regulation and is reflected on biochemical and physiological processes in organ and tissues. Moderate augmentation of prostaglandin E in blood, a decrease in cAMP content in blood plasm were observed. The activation of sympathetic effects and the augmentation of prostaglandin E content can be related to its accumulation in tissues. The recovery of estrous cycle in rats, subjected to experimental stress effect, was noted. By summarising the results of experimental observations we can suppose, that trigger hypothermia allows to model the state of an increased activity in neurohumoral systems, by accelerating physiological reaction, directed to the levelling of homeostatic reactions of adaptat ion.

Clinical realisation of trigger hypothermia possibilities revealed a therapeutic efficiency of this method. The reduction of an affective picture of the process, levelling of emotional tonus were noted. Individual peculiarities even in the structure of pathogenetically identical processes were stipulated by age, interest of vegetative and endocrine systems, duration of diseased process course. Recovery of menstrual cycle contributed to a rapid individual re-estimation of the state.

The investigations performed are initial stage for using trigger hypothermia to correct cyclic processes in an organism, affecting reproductive function.

UDC 57.043: 615.832.9

Trigger Mechanisms of Cold Stress and Resonance Regimens of Medical Hypothermia

V. G. BABIJCHUK, A. V. KOZLOV, D. G. LUTSENKO

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

Recently the resonance therapy, including trigger hypothermia, when a cold stimulation of receptor fields is carried-out in the rhythm of brain potential oscillations, has been widely spread.

In the work the BBB-dependent mechanism of rhythmical hypothermia (RH) effect in the frequency range of ζ-activity (0.05 ± 0.2 Hz) of ultraslow biocurrents (0.05 ± 0.2 RH) has been demonstrated. Trigger possibilities of neurotransmitter mechanisms of BBB functioning in a dynamical picture of a general adaptation syndrome under the stresses of various modality, intensity and duration were evaluated in an age aspect, by using the radioisotopic, electrophysiological, immunobiochemical methods, as well as it was noted the following:

1. Adaptive reactions of cardiovascular and central nerve systems depend on the level of BBB permeability, meanwhile BBB functional activity is itself under the control of these systems in the interaction with a general non-specific and immune protection of an organism.

2. Under a long-term emotional and painful stress the BBB permeability for norepinephrine and acetylcholine increases in 1.5 ± 2 times. A decrease in BBB resistance for these neuromediators does not differ by synphase and is not statistically true in brain different structures, a non-specific "accident" augmentation in permeability occurs.

3. BBB permeability increases in 3–4 times for biogenic amines at a rhythmical hypothermia. Under these conditions a decrease in BBB resistance has the signs of specificity, it should be spoken about a directed increase in BBB functional activity. Dynamical characteristics of permeability for acetylcholine and norepinephrine are in a counter-phase and different in brain various structures.

4. Dynamics of rat's BBB permeability, endured a long-term emotional and painful stress, stabilises after 0.1 RH and corresponds to a natural rhythm, being strengthened by resonance and hypothermia. Mainly due to this fact there is the normalisation of arterial pressure of hypertensive animals, statistical and spectral-correlational characteristics of dynamical series of ECG and EEG cardiointervals.

5. Hypothermic loading application reveals the range of BBB adaptational possibilities of old animals. In 12-months rats 0.05 ± 0.2 RH increases BBB permeability by an equally efficient way, causing a typical

Матеріал, захищений авторським правом

pattern of brain bioelectrical activity with the domination in the frequency range of 0.1 ± 0.4 Hz (phenomenon of rhythm doubling). In 24 months animals for decreasing both the resistance of BBB permeability and hypertension, the most efficient RH is with 0.05 ± 0.1 Hz frequency. Central nerve system of 24-months rats is less plastic, it does not trace an upper range of ζ-rhythm.

6. Rhythmical cold effects on old hypertensive animals cause a more manifested correction of an organism's immune reactivity, than the stimulation by cord blood, the latter, combined with RH is more efficient for proteolysis normalisation, that reduces hypotensive possibilities of activated BBB.

Basing on the data obtained, an experimental way of BBB permeability increase for medicamentous substances has been developed. In practical medicine when conducting medical hypothermia, it is vitally necessary to take into account an important position of this way: RH with ~0.1 Hz frequency even in the first 10–15 min results in an increase in BBB permeability, sufficient for manifesting central (paradoxical) effects of introduced by a system cardiotropic preparations.

UDC 617-002.3-085.38.398

Application of the Preparations of Fetoplacental Complex in Patients with Purulent Surgical Pathology

V. O. SHIDLOVSKY, I. M. DEIKALO, I. V. CHEPIL

Ternopol Medical Academy named by I. Ya. Gorbachevsky

It is known that purulent diseases are accompanied by a significant immune suppression, which requires a correction. In a complex treatment of suppurative diseases as well as post-operational pyo-septic complications immunomodulators (levomisol, T-activine, thymasol) are used. There are literature data about a manifested generally-stimulating effect on immune system of the preparations from fetoplacental complex (FPC), such as placenta cryoextract, placental tissue, cord blood serum, embryonic tissues preparations etc.

The aim of given work was to investigate the efficiency of the application of FPC preparations for immune correction in a complex treatment of patients with an acute purulent surgical pathology. Six patients with an acute destructive pancreatitis, 1 patient with appendicular peritonitis, 1 woman with generalized anaerobic non-clostridial phlegmon of anterolateral abdominal wall, thorax and cross region were investigated. Two FPC preparations, such as placenta cryoextract (in 2 patients), injected by 1.5 ml 5 times with 3 days' interval and "Cryocord" cord blood preparation (in 6 patients), injected in 1.0 ml dose, 5 times, one injection per 2 days, were tested in clinics.

Efficiency of the treatment was estimated on the indices of cellular and humoral immunity (Tl-, Bl-, To-, Tx/Tc-, IgA, G, M) CIC, endogenous intoxication (MCM, EII) when comparing initial data and the investigation results to the 7th and 14th days after the preparations injection.

A significant reduction of immune reactivity occurred in all patients, generally due to T-link. Indices of cellular immunity in patients before treatment were within the following limits: Tl – 36 ± 1.7; Bl – 12.3 ± 0.3, a significant immunity tension Th/Ts 3.0 ± 0.2 was noted; CIC made 28.8 ± 11.6; increase of IgA, G, M, correspondingly: 4.2 ± 1.1; 3.7 ± 0.44. The level of To-cells made 38.2 ± 1.08. A considerable augmentation of the indices of endogenous intoxication (MCM M1 – 673 ± 40.9; M2 – 293 ± 21.6; EII made 52.5 ± 2.2) occurred.

To the 7th day after finishing the course of tissue therapy an increase of the level of Tl 49 ± 3.1 was observed in all patients, the following reduction of CIC quantity was noted: MCM was 377 ± 22.2; M2 – 163 ± 13.1; EII made 35.9 ± 1.8.

To the 14th day after the injection the normalization of the indices of immune reactivity was noted (Tl 58 ± 2.3; Bl 8 ± 1.1; To 23.25 ± 1.6; Th/Ts 2.3 ± 0.2; IgA, G, M, correspondingly 1.5 ± 0.2; 7.4 ± 0.5; 1.5 ± 0.16; CIC was 94.8 ± 5.3), as well as statistically significant decrease of the indices of endogenous intoxication MCM: M1 295 ± 21.2; M2 134 ± 8.1; EII 26.4 ± 1.7 in comparison with initial data and ones of investigation to the 7th day.

A significant improvement of the general status of patients, disease course, reduction of the treatment duration was clinically noted. Thus, investigations, carried-out by us, confirmed the expediency of the application of FPC preparations in a complex treatment of the patients with purulent surgical pathology.

Матеріал, захищений авторським правом

КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫЕ КЛЕТКИ И ТКАНИ

Биологически активные препараты эмбрионального, фетального и плацентарного происхождения для минитрансплантаций и лечения патологических состояний

На основе многолетних теоретических разработок созданы методы низкотемпературного - 196° С холодового хранения биологического материала.

Использованные передовые биотехнологии позволяют сохранить в криоконсервированном материале клетки с высокими показателями жизнеспособности и биологически активные вещества: ферменты, гормоны, ростовые факторы, нейропептиды, цитокины, которые находятся в сбалансированном состоянии и обеспечивают клинический эффект при различной патологии. Механизм действия клеточных и тканевых препаратов заключается в специфическом и неспецифическом влиянии трансплантатов, которые наряду с выполнением заместительной функции обладают полифармакологическим действием, стимулируют репаративные процессы, нормализуют гомеостаз организма.

Работы выполняются в соответствии с Законом Украины о трансплантации.

Низкотемпературный Банк биологических объектов является структурой Координационного Центра трансплантации органов, тканей и клеток Министерства охраны здоровья Украины.

Чистота материала, предназначенного для использования, обеспечивается проведением следующих исследований:

бактериологическое исследование на аэробную и анаэробную инфекцию;

вирусологические исследования по выявлению инфицированности:

сифилисом;

гепатитом В и С;

ВИЧ 1/2;

Герпесом;

Краснухой;

Цитомегаловирусом;

Токсоплазмозом;

Тестирование донорского материала выполняется иммуноферментными методами и методом полимеразной цепной реакции.

На базе клиник Украины и г. Харькова произведено несколько тысяч минитрансплантаций.

Показания для применения:

Лечение анемий различного генеза.

Акушерско-гинекологическая патология (невынашивание беременности, гипотрофия плода, бесплодие, женский климакс (и мужской), иммунологический конфликт).

Эндокринология (сахарный диабет и его осложнения, гипотиреоз, надпочечниковая недостаточность)

Иммунологические нарушения (аллергизация организма, заболевания, протекающие с выраженным нарушением иммунного статуса пациента, иммунодефициты).

Неврология (нейродегенеративные заболевания, периферические невриты).

Ортопедия и травматология (криоконсервированный материал для восстановительной и реконструктивной хирургии, комплекс лечения патологии суставов).

Геронтология (преждевременное старение, нарушения процессов запоминания и воспроизводства информации).

Широкое применение при лечении больных с вялотекущими воспалительными процессами, при септических состояниях.

Офтальмологическая патология (заболевания переднего и заднего отделов глазного яблока).

Стоматология (лечение парадонтитов и парадонтоза).

Перечень криоконсервированных препаратов производства Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

1. Гемоклетки - гемопоэтические клетки печени эмбрионов человека.
2. Гемоклетки - М - гемопоэтические клетки печени эбрионов человека (малая доза).
3. Нейроклетки - нервные клетки эмбрионов человека.
4. Нейроклетки - М - нервные клетки эмбрионов человека (малая доза).
5. "Гемонейронал" - смесь гемоклеток и нейроклеток.
6. "Криоплацента" - фрагмент плаценты (1,5 см х 1,5 см).
7. Гомогенат криоплаценты - измельченная ткань плаценты (14 г).
8. "Плацентек" - цитозоль плаценты (2 мл).
9. Экстракт плаценты (1,8 мл, на физиологическом р-ре)
10. Тестисы плода.
11. Овариальная аллоткань - фрагмент яичника (объем 0,8-1 см).
12. Овариальная аутоткань - фрагмент яичника (объем 0,8-1 см).
13. "Криотимус" - фрагмент тимуса плода (объем 0,5 см)
14. Криоспленум (селезенка плода, объем 0,5-0,7 см).
15. Поджелудочная железа плода (объем 0,3-0,5 см).
16. Щитовидная железа плода (объем до 0,5 см).
17. Ткань аллогенной щитовидной железы (объем до 1 см).
18. Культура клеток ксенонадпочечников.
19. Суспензия церебральной ткани (на физиологическом р-ре).
20. Суспензия плодовой печени (на физиологическом р-ре).
21. Суспензия фетальных тканей.
22. Костно-хрящевая крошка (1,5 мл).
23. Брефокость (различные кости плода).
24. "Фетотек" - цитозоль тканей эмбрионов человека (1 мл х 4 дозы).
25. Ксеногепатоциты (10 мл) - гепатоциты новорожденных поросят.
26. "Гемокорд" - кроветворные клетки кордовой (плацентарной) крови человека.
27. "Криокорд" (1 доза = 1,0 мл х 5 амп.).
28. Роговица человека.
29. Склера человека.
30. Криоамнион (амниотическая оболочка, 10 см х 8 см; 5 см х 4 см).
31. Криоамнион - М.
32. Криохор - криоэкстракт хориона (5 доз).
33. Хориальная оболочка (8 см х 10 см).
34. "Платекс" - глазные капли (1,5 мл).

Мы открыты для контактов с государственными, частными организациями и отдельными лицами.

Контактные телефоны:
(0572) 721-034 - проф. Т. Н. Юрченко,
(0572) 721-039 - проф. А. С. Снурников.

Руководитель работ
директор Института проблем криобиологии
и криомедицины НАН Украины
академик НАН Украины
В. И. ГРИЩЕНКО

Матеріал, захищений авторським правом

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

3

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 tussue, as well as to clinicians who are undertaking trials of hypothermia. Particular emphasis is laid upon ongoing research on topics which are utmost importance with regard to preservation of plants, mechanisms of cold survival in animals and microorganisms. The journal draws from diverse related disciplines such as morphology, physiology, genetic molecular biology, pathology, biochemistry, immunology, pharmacology

Subscription orders should be addressed to
Editor-in-Chief V. I. Grishchenko
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine
23 Pereyaslavskaya Str., 61015 Kharkov, Ukraine
Tel. (0572) 72-41-43
Fax (0572) 72-00-84
E-mail: cryo@online.kharkov.ua

Матеріал, захищений авторським правом