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

Институт проблем криобиологии и криомедицины

1
2000

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

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины
Харьков
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of sciences
Ukraine, Kharkov

PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ
PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY

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

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

Главный редактор В. И. ГРИЩЕНКО

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 (ответственный секретарь, Харьков)
А. Роу (США)
Б. П.Сандомирский (Харьков)
А. С. Снурников (Харьков)
С. Сумида (Япония)
А. А. Цуцаева (Харьков)
С. А. Шалимов (Киев)
Э. З. Эмирбеков (Махачкала)
Т. Н. Юрченко (Харьков)

Редакционный совет

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

Editor-in-Chief V. I. GRISHCHENKO

Editorial Board

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

Editorial Council

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

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

State Registration Certificate:
KB Series № 98 of 23.09.93

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

e-mail; cryo@online.kharkov.ua

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

e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Матеріал, захищений авторським правом

1
2000

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

СОДЕРЖАНИЕ

Грищенко В. И., Сандомирский Б. П. Концепция клеточной терапии 3
Шмидт П. Дж. Базиль Дж. Люйе и начало криобиологии 7

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

Гольцев А. Н., Дубрава Т. Г., Луценко Е. Д., Останкова Л. В., Прокофьева В. А. Поиск альтернативных криоконсервированию путей модификации иммунореактивности алломиелотрансплантата. II. Возможность сотрансплантации клеток эмбриональной печени 10
Безуглый Н. Д., Кисиль А. В., Трохименко А. Г., Гордиенко Н. К., Янгс К. Р. Некоторые биофизические свойства половых и эмбриональных клеток свиньи, определяющие их криорезистентность. II. Осмотический состав ранних эмбрионов (от зиготы до поздней морулы) 22
Суббота Н. П., Пашинский П. П., Дюбко Т. С., Розанова Е. Д. Спектральные характеристики белковых фракций криоэкстрактов фетальных тканей 27
Соловьева А. С., Зинченко А. В. Сравнительное микрокалориметрическое исследование плавления гемоглобина из донорской и кордовой крови до и после низкотемпературного воздействия . . . 32
Марченко В. С., Полищук Л. В., Бабийчук В. Г. Влияние ритмического охлаждения на проницаемость гематоэнцефалического барьера для экзогенного норадреналина 36
Рамазанов В. В., Лупилова Н. А., Бондаренко Т. П. Оценка транспорта хлорида и сульфата в эритроцитах при исследовании методом *pH*-метрии 41
Смольянинова Е. И., Жегунов Г. Ф., Хроменкова О. В. Осмотическое поведение эмбрионов мыши в гипертонических растворах 1,2-пропандиола и его оксиэтилированных производных 49

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

Стрибуль Т. Ф. Обзор методов криоконсервирования культуры растительных клеток 52
Цуцаева А. А., Грищенко В. И., Кудокоцева О. В., Щеглов А. В., Тупчиенко Г. С. Криоконсервирование гемопоэтических стволовых клеток из кордовой крови человека 59
Тынынык Л. Н. Перекисное окисление липидов в фрагментах печени новорожденных и половозрелых свиней при различных условиях криоконсервирования 64

КРИОМЕДИЦИНА

Петрушко М. П. Использование криоконсервированных эмбрионов человека во вспомогательных репродуктивных технологиях 71
Питько В. А., Грищенко В. И., Суббота Н. П. Влияние криоэкстракта хориона на состояние иммунитета женщин с подострым сальпингоофоритом 76
Бызов В. В. Применение криоконсервированных фрагментов ксеноселезенки в лечении больных с гнойными процессами легких и плевры 81
Караченцев Ю. І. Деструктивно-метаболічні зміни і перебіг репаративних процесів у тканинах щитовидної залози після локального кріовпливу 86

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Кутиков А. Е., Никишкова И. Н., Гордиенко Ж. П. Действие общего охлаждения на морфофункциональные особенности надпочечников и содержание микро- и макроэлементов у животных разного возраста 90
Ломако В. В., Шуляк Л. И. Влияние гипотермического хранения на жизнеспособность фрагментов коры и гипоталамуса эмбрионов крыс 93
Зинченко В. Д. Исследование методом ^{23}Na-ЯМР накопления внутриклеточного натрия в эритроцитах человека после криоконсервирования с 1,2-пропандиолом 95

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

Матеріал, захищений авторським правом

1 2000

PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY

CONTENTS

Grischenko V. I., Sandomirsky B. P. A Concept of Cell Therapy 3
Schmidt Paul J. Basile J. Lyuet and the Beginnings of Cryobiology 7

THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

Goltsev A. N., Dubrava T. G., Lutsenko E. D., Ostankova L. V., Prokof'eva V. A. Search for the Alternative to Cryopreservation Methods of Modifying the Immune Reactivity of the Allomyelotransplant. II. Possible Co-transplantation of Embryonic Liver Cells 10
Bezugly N. D., Kisil A. V., Trokhimenko A. G., Gordienko N. A., Youngs Curtis R. Biophysical Properties of Porcine Sex and Embryonic Cells, Determining their Cryoresistance. II. Osmotic Composition of Early Embryos (from Zygote to Late Morula) 22
Subbota N. P., Pashinsky P. P., Dyubko T. S., Rozanova E. D. Spectral Characteristics of Protein Fractions of Fetal Tissue Cryoextracts 27
Solovyova A. S., Zinchenko A. V. A Comparative Microcalorimetric Study of Melting of Hemoglobin out of Donor and Cord Blood prior to and after Low Temperature Exposure 32
Marchenko V. S., Polischuk L. V., Babiychuk V. G. Action of Rhythmic Cooling on Permeability of Blood-Brain Barrier to Exogenous Norepinephrine 36
Ramazanov V. V., Lupilova N. A., Bondarenko T. P. Evaluation of Transport of Chloride and Sulfate in Red Cells When Studied with a *pH*-Metry Method 41
Smolyaninova E. I., Zhegunov G. F., Khromenkova O. B. Osmotic Behavior of Murine Embryos in Hypertonic Solutions of 1.2-Propanediol and its Oxyethylated Derivatives 49

CRYOPRESERVATION OF BIOSYSTEMS

Stribul T. F. A Review of the Methods of Cryopreservation of the Plant Cell Culture 52
Tsutsayeva A. A., Grischenko V. I., Kudokotseva O. V., Scheglov A. V., Tupchienko G. S. Cryopreservation of Hematopoietic Stem Cells out of Human Cord Blood 59
Tynynyka L. N. Lipid Peroxidation in Fragments of Liver of Newborn and Mature Pigs under Various Conditions of Cryopreservation 64

CRYOMEDICINE

Petrushko M. P. Application of Cryopreserved Human Embryos in the Assisted Reproductive Technologies 71
Pit'ko V. A., Grischenko V. I., Subbota N. P. Action of Chorion Cryoextract on the Immunity State of Females with Subacute Salpingo-oophoritis 76
Byzov V. V. Application of Cryopreserved Fragments of Xenospleen in Treatment of Patients with Suppurative Processes of Lungs and Pleura 81
Karachentsev Yu. I. Destructive-metabolic Changes and Occurrence of Reparative Processes in Thyroid Gland Tissues Following Local Cryoexposure 86

BRIEF COMMUNICATIONS

Kutikov A. E., Nikishkova I. N., Gordienko Zh. P. Action of Total Cooling on Morphofunctional Properties of Adrenal Glands and Content of Micro- and Macroelements in Animals of Various Age . . . 90
Lomako V. V., Shulyak L. I. Effect of Hypothermic Storage on the Viability of the Fragments of Rat Embryonic Cortex and Hypothalamus 93
Zinchenko V. D. A Study of Accumulation of the Intracellular Sodium in Human Red Cells after Cryopreservation with 1.2-propanediol Using a ^{23}Na-NMR Method 95

© Translated from Russian by *A. M. Mikhailov*

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

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 615.361.014.41

UDC 615.361.014.41

Концепция клеточной терапии

В. И. ГРИЩЕНКО, Б. П. САНДОМИРСКИЙ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

A Concept of Cell Therapy

V. I. GRISCHENKO, B. P. SANDOMIRSKY

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

Клеточная терапия в настоящее время является "модным" направлением медицины. Результаты лечения, обсуждаемые специалистами и дилетантами, колеблются от восхищения ею до полного отрицания возможностей такого лечения. Особенностью клеточной терапии, механизмы которой мало изучены, является поступление в организм пациента информации от живых поливалентных или специализированных клеток и их элементов. В этой связи можно считать, что чем выше жизнеспособность биоматериала, тем он более эффективен и тем более результативной будет клеточная терапия. Данное направление реализуется путем замещения и дополнения естественных функций тканей и клеток больного, восстановления нейрогуморальных систем и связей, а также иммунокоррекции. В таком контексте клеточная терапия может быть признана специалистами как в области аллопатической, так и в определенной степени гомеопатической медицины. В последнем случае дозы препаратов, проявляющих лечебное действие, иногда чрезвычайно малы или, наоборот, достаточно объемные и направлены против конкретного синдрома заболевания, что характерно для традиционной медицины.

Клеточная терапия имеет почти 70-летнюю историю, широкое освещение она получила в работах Nicolson и его последователей, которые, собственно, и ввели термин "клеточная терапия", используя в качестве лечебного фактора очищенные и высушенные экстракты тканей и органов преимущественно из плодов овец. Такие препараты были удобны тем, что могли храниться в обычных условиях, легко транспортировались в закрытых флаконах и перед употреблением разводились водой или растворами; они могут быть названы первым поколением препаратов клеточной терапии.

Филатов В. П. и его последователи применили переживающие ткани (роговица, кожа); ткани, потерявшие жизнеспособность (плацента), их экстракты и отгоны, назвав это тканевой терапией. Лечебное действие этих препаратов связывалось со стимуляцией регенераторно-восстановительных процессов, а также омолаживанием всего организма, и они могут быть названы вторым поколением препаратов клеточной терапии.

Currently cell therapy is the latest "fashionable" trend in medicine. The yield of treatment, discussed by experts and amateurs, vary from admiration to complete rejection of the abilities of this therapy. A distinguishing feature of the cell therapy, the mechanisms of which still wait to be studied thoroughly, is a supply of information into the patient's organism from living polyvalent or specialized cells and their elements. In this respect it may be concluded that the higher the viability of the biomaterial, the more effective and resultant is the cell therapy. The given trend deals with substitution and supplement of the natural functions of the patient's cells and tissues, recovery of the neurohumoral systems and links, and immune correction. In this respect the cell therapy may be recognized by the experts in the fields of allopathic and, to some extent, homeopathic medicine. In the latter case the doses of the preparations, exercising therapeutic action, are sometimes very small or, on the contrary, sufficiently high; their action is directed against particular syndromes of the disease, which is characteristic of routine medicine.

The cell therapy has as long as 70-year-old history, and it was extensively described and advertised in the works of Nicolson and his successors, who invented the term "cell therapy", while using purified and dried extracts of the tissues and organs of mainly fetal-calf origin as a therapeutic factor. The advantages of these preparations were that they could be stored under normal routine conditions, easily transported in closed flasks and diluted with water or solutions prior to their application; they may be regarded as the first generation of the preparations of the cell therapy.

Filatov V. P. and his successors applied reviving tissues (cornea, skin); tissue, which lost viability (placenta), their extracts, and called that a tissue therapy. Therapeutic effect of these preparations was related to stimulation of the regenerative-recovery processes, and rejuvenascence of the whole organism; they may be called the second generation of the preparations of the cell therapy.

The last decades of the XX century witnessed a progress in biotechnologies and transplantology, in which major role is played by hypothermia and low temperatures. Fundamental and applied research of the action of low temperatures on the cells and tissues

Матеріал, захищений авторським правом

Последние десятилетия XX века связаны с прогрессом биотехнологий и трансплантологии, в которых использование гипотермии и низких температур занимает значительное место. Фундаментальные и прикладные исследования по изучению влияния низких температур на клетки и ткани человека и животных явились основой для применения криобиологических технологий при создании препаратов для клеточной терапии.

Криобиологические технологии дают возможность сохранять жизнеспособность клеток и тканей достаточно долго. Кроме того, они позволяют минимально нарушать нативность органов и тканей, что открывает возможности получения компонентов ткани, клеток и экстрактов с более выраженными свойствами в сравнении с переживающими тканями. Отдельно следует выделить возможность гарантированного приготовления для клинических целей биообъектов, свободных от любых видов микроорганизмов и вирусов, что стало основой для создания нового, третьего поколения препаратов клеточной терапии.

С позиций сохранения преемственности клеточной терапией мы называем направление клинической медицины, базирующееся на использовании в качестве лечебных факторов живых клеток, иногда тканевых элементов. Естественно, такое определение не лишено недостатков с точки зрения биологов, четко детерминирующих понятия "клетка", "ткань".

Механизмы действия клеточной терапии (таблица) выражаются в ряде клинических эффектов. Заместительное действие мы наблюдаем при трансфузиях компонентов крови, что, без сомнения, можно отнести к клеточной терапии; при трансплантациях костного мозга у больных с лучевой болезнью или онкозаболеваниях на фоне химиолучевой терапии. Заместительное действие проявляется также после имплантации компонентов гормонопродуцирующих фрагментов тканей или клеток. Ярким примером тому является использование криоконсервированной культуры эндокринной ткани поджелудочной железы. Однако наш более чем 15-летний опыт проведения такого лечения показывает наличие при нем не только заместительного, но и стимулирующего эффекта. Так, нормализация показателей углеводного обмена и снижение или снятие сахароснижающих препаратов сохраняется существенно дольше времени жизни ксенотрансплантата. Данное обстоятельство, а также результаты экспериментов на животных позволяют утверждать, что мы наблюдаем эффект усиления гормонопродукции эндогенными бета-клетками.

Общестимулирующее влияние препаратов клеточной терапии наблюдается многими пациентами, отмечающими в качестве "побочного" эффекта усиление либидо, потенции, повышение работоспособности и жизненного тонуса. В этом контексте нельзя

of man and animals served as the basis for applying cryobiological technologies when developing preparations for the cell therapy.

Cryobiological technologies permit to maintain the viability of the cells and tissues for a sufficient period of time. Besides, they allow only a minimum disturbance in the native nature of the organs and tissues, thus opening up prospects for harvesting the components of tissues, cells and extracts with stronger pronounced properties as compared with reviving tissues. Particular attention should be paid to a possibility of a granted preparation for clinical purposes of the biological systems, which are free from any types of microorganisms and viruses, thus becoming the basis for developing the preparations of the new, third generation of the cell therapy.

From the point of view of succession by the cell therapy the authors mean a trend in clinical medicine, which is based on the application of the living cells and sometimes of the tissue elements as the therapeutic factors. Naturally, such a definition has some weak points from the point of view of biologists, who clearly determine the notions of the "cell" and "tissue".

The mechanisms of action of the cell therapy (Table) are manifested by certain clinical effects. A substituting action is observed during transfusion of the blood components, which, undoubtedly, may be related to the cell therapy; during transplantations of the bone marrow in the patients with the irradiation disease or oncological diseases, treated with the chemio-irradiation therapy. This substituting action is also manifested after implantation of the components of the hormone-producing fragments of the tissues or cells. A vivid example is application of the cryopreserved culture of the pancreatic endocrine tissue. However, a 15-year-old experience of the authors in conducting such therapy indicates the availability of not only the substituting but of the stimulating effect as well. For example, normalization of the features of the carbohydrate exchange or reduction or elimination of the sugar-containing preparations take much more time as compared with the life period of the xenotransplant. This fact and the yield of the experiments with animals allow to conclude that there is observed the effect of enhancement of hormone production by the endogenous beta-cells.

General stimulating action of the preparations of the cell therapy is evidenced in many patients, who reported a growth in libido, a rise in labor activity and life tonus as the "secondary" effects. It should also be mentioned of the positive psychotherapeutic action of the cell therapy. It becomes the stronger when the patient has more faith in the doctor or hospital, performing the treatment. Unfortunately, evaluation of the efficiency of the cell therapy with a placebo method can hardly be realized since it is normally believed to be a private treatment. Besides, an experienced doctor applies the cell therapy only when routine alternative approaches turn out to be ineffective.

Матеріал, захищений авторським правом

Направленность клеточной терапии

Механизмы действия	Формы клеточной терапии
Заместительное	Трансфузии компонентов крови, кордовая кровь, трансплантация костного мозга, клетки эмбриональной печени, имплантации компонентов гормонопродуцирующих или гормоносодержащих тканей и клеток, клетки нейрональной ткани, фрагменты и клетки паренхиматозных органов, эпителиальные клетки
Стимулирующее, в том числе иммунокорригирующее	Кордовая кровь, препараты фетоплацентарного комплекса, тимуса, экстракты из тканей
Защитное	Кремы и мази с компонентами тканей
Противовоспалительное	Иммунокорригирующие препараты, ректальные свечи и вагинальные шарики с компонентами тканей
Детоксикационное	Гемо-, лимфосорбция с клетками и фрагментами печени и селезенки, лаваж и промывание плевральной полости
Психотерапевтическое	Любые препараты для клеточной терапии

Action of the cell therapy

Mechanisms of action	Forms of cell therapy
Substituting	Transfusion of blood components, cord blood, bone marrow transplantation, embryonic liver cells, implantation of components of hormone-producing or hormone-containing tissues and cells, cells of neuronal tissue, fragments and cells of parenchymatous organs, epithelial cells
Stimulating, including immune correcting	Cord blood, preparations of fetal placental complex, thymus, tissue extracts
Protective	Creams and ointments, containing tissue components
Antiinflammatory	Immune correcting preparations, rectal suppositories and vaginal balls with tissue components
Detoxicative	Hemo-, lymphosorption with cells and fragments of liver and spleen, lavage and washing of pleural cavity
Psychotherapeutic	Any preparations for cell therapy

зя не отметить позитивное психотерапевтическое влияние клеточной терапии. При этом оно тем значительнее, чем больше доверия к врачу или клинике, проводящих лечение. К сожалению, проведение оценки результативности клеточной терапии методом плацебо мало реально по ряду соображений, так она проводится нередко на началах приватного лечения. Кроме того, опытный врач назначает клеточную терапию при безуспешности других традиционных альтернативных подходов.

Лечение может проводиться с использованием лишь одного препарата, так называемая *моновалентная* клеточная терапия, или в сочетании с другими препаратами клеточной терапии, или методами традиционной терапии, так называемая *поливалентная* клеточная терапия. Последняя — более результативная.

Препараты для клеточной терапии могут быть как аутологичного (костный мозг, компоненты крови), так и аллогенного или ксеногенного происхождения. Естественно, аутологичные препараты в большинстве случаев предпочтительнее, но возможности такого источника весьма ограничены. Приготовление аллогенных препаратов сопряжено с решением ряда морально-этических, религиозных и правовых вопросов, хотя оно возможно и доступно после большой организационной и общественной работы. Можно полагать, что по мере совершенствования общества и повышения его культурного уровня доля аллогенных препаратов в ресурсе клеточной терапии будет уменьшаться. Однако возможности использования тканей фетоплацентарного комплекса будут возрастать. Использование ксеногенных тканей для получения препаратов клеточной терапии имеет большие преимущества перед вышеназванными из-за их относительной доступности. Кроме того, перспектива получения

Treatment may either involve application of only one preparation, the so-called monovalent cell therapy, or combined with other preparations of the cell therapy or methods of routine therapy, the so-called polyvalent cell therapy. The latter is more effective.

Preparations for the cell therapy may either be of the autologous (bone marrow, blood components) or allogenic or xenogenic origin. Naturally, autologous preparations in most cases are more preferable, though the capabilities of this source are rather limited. Development of the allogenic preparations involves some moral, ethic, religious and legal aspects, though it may be realized after a large administrative and social work. It may be supposed that with further evolution of the society and improvement of its cultural level the portion of the allogenic preparations within the framework of the cell therapy will be reduced. However, the chances for applying the tissues of the fetoplacental complex will increase. The usage of the xenogenous tissues for obtaining the preparations of the cell therapy have strong advantages over the above due to their relative availability. Besides, the prospects for collecting transgenic lines of animals may bring even greater advantages to xenogenic preparations for the cell therapy. Cryobiological technologies for these purposes maintain their suitability, since they permit to easily manipulate the period of time between the stage of the harvesting of the material, its preparation and certification. Besides, such a biopreparation is available in a clinically required situation and it can be easily transported for any distance and, finally, it becomes possible to create strategic stores of the preparations for the cell therapy.

Currently more than 20 preparations for the cell therapy have been developed at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine; most of them were certified, approved for clinical application and are commercially produced. Therapeutic forms for the preparations for the cell therapy may vary greatly: cell

Матеріал, захищений авторським правом

трансгенных линий животных может дать еще большие преимущества ксеногенным препаратам для клеточной терапии. Криобиологические технологии для этих целей сохранят свою актуальность, так как позволяют легко маневрировать интервалом времени между этапом заготовки материала, его приготовления и сертификации. Более того, такой биопрепарат доступен в клинически нужной ситуации и его возможно легко транспортировать на любое расстояние, и наконец появляются возможности создания стратегических запасов препаратов клеточной терапии.

В настоящее время в институте создано более 20 препаратов клеточной терапии, большая их часть сертифицирована, разрешена к клиническому применению и выпускается. Лечебные формы для препаратов клеточной терапии могут быть весьма разнообразными: взвеси клеток, жидкие экстракты, суспензии фрагментов ткани или органов, срезы тканей или органов, кремы и мази, ректальные свечи и вагинальные шарики.

Необходимо отметить, что клеточная терапия не является панацеей, но дает весьма хорошие результаты при соблюдении показаний в особо сложных клинических ситуациях.

Детальный анализ клинических результатов при использовании различных препаратов клеточной терапии, полученных на основе криобиологических технологий, не является задачей настоящего сообщения. В то же время хотелось бы подчеркнуть, что при тщательном подходе высококвалифицированных специалистов, имеющих значительный опыт в клеточной терапии, положительные результаты достигаются у 75–80% больных. Осложнения, преимущественно местного характера, отмечаются у 10–25% пациентов. Учитывая то, что больные, получающие клеточную терапию, разочарованы в других методах лечения, названные нами результаты признаются весьма хорошими. Клеточная терапия имеет место у огромной категории пациентов как основное или дополнительное лечение. Практически нет ни одного направления клинической медицины, где бы клеточная терапия не могла быть использована.

Таким образом, поливалентная клеточная терапия в руках опытных клиницистов создает перспективы получения позитивных результатов лечения у очень многих больных. Криобиологические технологии получения и хранения материала позволяют сохранить "живое" начало в биопрепарате и возможность его применения в удобной клинической ситуации, гарантируя безопасность в плане микробной и вирусной контаминации.

Поступила 29.02.2000

suspensions, liquid extracts, suspensions of the fragments of the tissues or organs, slices of the tissues or organs, creams and ointments, rectal suppositories and vaginal balls.

It should be noted that the cell therapy is not a remedy but it produces sufficiently good results when observing the indications in particularly complicated clinical cases.

A detailed analysis of the clinical results of applying various preparations for the cell therapy, obtained with the help of cryobiological technologies, is not the aim of the given report. At the same time it should be mentioned that a thorough approach of highly qualified and trained experts in the field of the cell therapy permits to obtain positive yield in 70–80% of patients. Complications of predominantly local nature are reported in 10–25% of patients. Taking into account that the patients, undergoing cell therapy, are disappointed with other methods of treatment, the submitted results may be considered as good enough. Cell therapy may well be applied to a huge number of patients as the basic or supplementary treatment. Actually not a single trend in clinical medicine may deal without the cell therapy.

Thus, polyvalent cell therapy, when implemented by experienced and highly qualified clinical specialists, opens up prospects for gaining positive yield of treatment in many patients. Cryobiological technologies of collection and storage of the material permit to maintain the "living" status of the biopreparation and use in a suitable clinical situation, thus preventing microbial or viral contamination.

Accepted in 29.02.2000

Матеріал, захищений авторським правом

Базиль Дж. Люйе и начало криобиологии

Пауль Дж. ШМИДТ

Университет Южная Флорида, Университет Пуэрто Рико, Интернациональное общество трансфузии крови

Basile J. Lyuet and the Beginnings of Cryobiology

Paul J. SCHMIDT

University of South Florida, Catedratico ad honorem, Universidad de Puerto Rico, Historian, International Society of Blood Transfusion

В сентябре 1997 г. в Сионе, небольшом городке, находящемся в 100 милях от Женевы, праздновали 100-летие со дня рождения Базиля Люйе – римско-католического священника ордена Святого Франциска, доктора биологии, доктора физики, первого Президента Международного общества криобиологов.

В 1950 г. в журнале университета Сент Луиса (штат Миссури, США) Базиль Люйе написал: "Моя обязанность передать тем, кто станет профессором, мыслителем, доктором философии, чистую любовь к истине". И вся его общественная и научная жизнь была подчинена обязательству научить чистой любви к истине.

Базиль Люйе родился в 1897 г. в Швейцарии во франкоговорящей деревне, учился во Франции. После окончания колледжа он изъявил желание стать римско-католическим священником при ордене Святого Франциска. В 1921 г. получил посвящение в католические священники и параллельно работал в Женевском университете, где в 1925 г. получил степень доктора биологии, а в 1927 г. – степень доктора физики. После переезда в США Базиль Люйе в 1929 г. получил место пост-докторанта в Ельском университете, а в 1930 г. – место биофизика при Рокфеллеровском институте в Нью-Йорке и в 1931 г. в Иезуитском университете Сент Луиса.

В 1934 г. Базиль Люйе основал журнал "Биодинамика" (научный журнал для разработки и экспериментальной проверки рабочих гипотез о природе жизни). В первом номере этого журнала он опубликовал статью "Рабочие гипотезы о природе жизни", в которой описывает жизнь как процесс, обусловленный форменными элементами клетки. Для изучения жизни он проводил исследования, направленные на выявление различий между живыми и мертвыми клетками, основное внимание уделял сравнению физических характеристик: коэффициентов проводимости тепла, электричества, теплоемкости, проницаемости живых и мертвых клеток. Именно тогда, работая в библиотеке с литературой по данной проблеме, Б. Дж. Люйе столкнулся с работой Гаммана (1898 г.) по затвердеванию коллоидов без кристаллизации. Стеклование (витрификация) было хорошо известно физикам, но биологи это явление еще не изучали. Ученый

In September of 1997 there was a centennial celebration of the birth of Basile Luyet, Roman Catholic priest of the Order of St. Francis de Sales, Doctor of Biology, Doctor of Physics, first President of the International Society for Cryobiology, held in his native canton of Valais, Switzerland.

Basile J. Luyet said: "My duty is to communicate to those who are to become professional thinkers, the future Doctors of Philosophy, the pure love of truth". That is how he expressed his role at Saint Louis University in the United States city of St. Louis, Missouri, in 1950 in an article in the university news magazine. The founding President of the Society for Cryobiology fulfilled that duty of teaching the pure love of truth all his life.

Luyet was born in a tiny French-speaking village in the mountains of Switzerland in 1897. He left for studies in France at an early age. After secondary school and college he professed his desire to become a Roman Catholic priest in the Order of St. Francis de Sales. He returned to Switzerland to earn a Bachelor of Letters from the University of Fribourg. He was ordained as a Catholic priest in 1921 and enrolled in the University of Geneva where he earned degrees of Doctor of Science in Biology in 1925 and Doctor of Science in Physics in 1927. He remained at the University of Geneva to teach until he emigrated to the United States to become a post-doctoral fellow at Yale University in 1929. In 1930 he held a biophysics position at the Rockefeller Institute in New York and in 1931 moved to the Jesuit University of Saint Louis in the city of Saint Louis in the state of Missouri.

Luyet had already founded a journal in 1934 which he named "Biodynamica, a scientific journal for the elaboration and the experimental study of working hypotheses on the nature of life". That indeed was the title of its first paper: "Working hypotheses on the nature of life". In that paper he ascribed life as due to the formed elements in the cell. In order to study life he began a search for differences between living cells and dead cells. He stated an intent to compare the physical properties of living and dead cells: specific gravity, conductivity coefficient for heat and electricity, heat capacity, coefficient of transparency for radiation. It was when he was doing the library research on those biological properties that he found the report

Матеріал, захищений авторським правом

считал, что эта работа раскрыла ему глаза на возможность приложения физических принципов для развития биологических теорий.

С 1937 г. началась карьера Б. Дж. Люйе как криобиолога. В декабре этого года он опубликовал сообщение "Витрификация органических коллоидов и протоплазмы". Ему удалось воспроизвести Гамановское твердотельное состояние без кристаллизации льда для 50%-го желатина, яичного альбумина и живого вещества растительных клеток.

На протяжении 1937–1940 гг. Б. Дж. Люйе и его коллега П. М. Джехенио проанализировали литературу по биологии холода и составили библиографический справочник из 1 736 источников, который сейчас можно отнести к науке, называющейся криобиологией, но самыми важными были 209 страниц текста под заглавием "Жизнь и смерть при низких температурах", которые обобщили все эти работы.

После первых опытов по витрификации протоплазмы растений Б. Дж. Люйе при университете Сент Луиса организовал лабораторию "Методики регистрации и фотографирования выделения тепла, замораживания и витрификации в различных образцах биологического материала", в которой работали с таким биологическим материалом, как vinegar eels, и рыбами. Однако в образцах животного происхождения ему не удавалось достичь витрификационного состояния.

В 1948 г. Б. Дж. Люйе получил приглашение Гарвардского университета (Бостон) представить свои идеи по хранению крови. С этого времени он начинает заниматься криобиологией крови. Не имея опыта работы с кровью, ученый надеялся на финансовую поддержку идеи и студентов, которые согласились бы работать с ним. Он обратился в другой иезуитский университет – Форджамский университет в Нью-Йорке. И на его просьбу откликнулся я, Пауль Шмидт, который в то время изучал биологию. Я перебрался в Сент Луис, где начались работы по витрификации крови. Поражала работоспособность Б. Дж. Люйе. Его рабочий день начинался в 4 утра с выполнения обязанностей католического священника, затем он давал научное задание его главному научному помощнику – сестре-монахине Р. М. Джехенио, после этого мы с ним направлялись в здание, где в сосудах Эрленмейера пытались на протяжении 6 месяцев витрифицировать кровь. Мы исследовали многочисленные тонкие пленки крови, в которые погружались термопары. При погружении в жидкий азот мы регистрировали и фотографировали с помощью катодного луча осциллоскопа кривые замерзания. Пленки смотрели под микроскопом. Через 6 месяцев работы Б. Дж. Люйе пришел к выводу, что более удобной моделью для низкотемпературных исследований является не цельная кровь, а эритроциты, поскольку уровень гемолиза можно было рассматривать как меру клеточной смертности.

by Tammann (1898) on the solidification of colloids without any crystallization. That solid state, the glassy state called vitrification, was well known in physics. It had not been investigated before in biology. Luyet's eyes had now been opened by Tammann to an opportunity to apply physical principles to biological theory.

In 1937 B. J. Luyet started his career as a cryobiologist. By December of that same year, 1937, Luyet published a report with the title of "The vitrification of organic colloids and of protoplasm". He had succeeded in producing Tammann's state of vitrification without ice crystals in 50%-gelatin, in egg albumin and in the living matter of plant cells.

Between 1937 and 1940, Luyet and his collaborator P. M. Gehenio, analyzed the world's literature on the biology of cold from 1 736 and produced a 34 general bibliography in what is now called the science of cryobiology. More important was the 295 page text comprising his analysis of all we knew about "Life and death at low temperatures".

After his early success in the vitrification of plant protoplasm, Luyet developed intricate systems in his St. Louis laboratories to record and photograph the process of heat liberation, freezing and vitrification in multiple biological materials. He did work up to vinegar eels and fish, but in the animal kingdom he never achieved true vitrification.

In 1948 he received an invitation to present his ideas at a conference on blood preservation to be held in 1949 at Harvard University in Boston. He had never worked before on blood but the hope for financial support for a practical application of his knowledge was great. He needed another student to work on the project and the word was passed to another Jesuit University, Fordham University in New York where I was a graduate student in biology. I moved to Saint Louis in 1948 to begin the work on the cryobiology of blood. I was virtually impressed with the working capacities of B. J. Luyet. He arose at four each morning to perform his religious duties and to direct Sister Gehenio in her work plan. Then he drove to the University for a full day there. So the attempts began to vitrify blood in the Erlenmeyer flasks, which continued for 6 months. There were endless thin films of that blood made onto meticulously created mica squares holding thermocouples soldered under a microscope. When immersed into liquid nitrogen, the resultant blood freezing curves which appeared on the screen of a cathode ray oscilloscope were photographed and that record had to be developed. After 6 months of research B. J. Luyet came to a conclusion that red blood cells were a more convenient model for low temperature investigations as compared with the whole blood, the level of their hemolysis could be seen and quantitated as a measure of cell death. He realized that red cells were a much better study tool than the onion cells which had been his most recent target. The resultant publication on blood had Luyet as the sole

Матеріал, захищений авторським правом

Эритроциты он считал и более удобной моделью, чем клетки onion, с которыми чаще всего работал ранее. Первая работа по эритроцитам была сольной, под именем Б. Дж. Люйе, вторая вышла через год, авторами которой были я и Б. Дж. Люйе. Б. Дж. Люйе спал по 4 часа, писал по ночам и очень удивлялся, что молодые люди нуждаются в более продолжительном сне.

В 1956 году ученый переехал в Мадисон Висконсин, где начал работы по криоконсервации спермы быка с целью использования ее для селекции крупного рогатого скота. Через 10 лет аналогичная лаборатория была создана в Роквилле (Мериленд).

В 1964 году, будучи президентом Общества криобиологов, Люйе основал журнал "Cryobiology", в котором была опубликована его инагурационная статья "Human encounters with cold from early primitive reactions to modern experimental modes of approach". Он продолжал оставаться лидером и журнала "Биодинамика", в котором за год до смерти (1973 г.) была опубликована его последняя статья. К основополагающей статье Б. Дж. Люйе в области криобиологии следует отнести "Ультрабыстрое замораживание как возможный метод сохранения крови" (1949 г.).

author. We did publish together one year later. Luyet did his writing at night and slept only four hours each day, and wondered why young people would need to sleep more.

Luyet left Saint Louis in 1956, moving to Madison Wisconsin where his work was funded by a foundation which had interests in the preservation of bull sperm for cattle breeding. Ten years later he opened branch laboratories in Rockville, Maryland.

Always the philosopher, with the foundation of the journal "Cryobiology" in 1964, Luyet, as the founding president of the Society for Cryobiology, had an inaugural paper entitled "Human encounters with cold from early primitive reactions to modern experimental modes of approach". He continued to favor "Biodynamica" as his medium, publishing his last paper there in 1973, the year before his death. One the basic reports made by B. J. Luyet in the field of cryobiology was the "Ultra-rapid freezing as a possible method of blood preservation" (1949).

This One
HLOR-74B-H3L4

Матеріал, захищений авторським правом

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ
И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ
КРИОБИОЛОГИЯ

УДК 615.018.46.014.41

THEORETICAL
AND EXPERIMENTAL
CRYOBIOLOGY

UDC 615.018.46.014.41

Поиск альтернативных криоконсервированию путей модификации иммунореактивности алломиелотрансплантата.
II. Возможность сотрансплантации клеток эмбриональной печени

А. Н. ГОЛЬЦЕВ, Т. Г. ДУБРАВА, Е. Д. ЛУЦЕНКО, Л. В. ОСТАНКОВА, В. А. ПРОКОФЬЕВА
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Search for the Alternative to Cryopreservation Methods of Modifying the Immune Reactivity of the Allomyelotransplant.
II. Possible Co-transplantation of Embryonic Liver Cells

A. N. GOLTSEV, T. G. DUBRAVA, E. D. LUTSENKO, L. V. OSTANKOVA, V. A. PROKOF'EVA
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Продолжено изучение иммунологических аспектов совместного применения клеток костного мозга (КМ) и клеток эмбриональной печени (КЭП) с целью модуляции (минимизации) иммунореактивности аллогенного миелотрансплантата и повышения его защитного потенциала. Показано снижение РТПХ-активности нативного и криоконсервированного алломиелотрансплантата под влиянием КЭП.

Продовжено вивчення імунологічних аспектів сумісного застосування клітин кісткового мозку (КМ) і клітин ембріональної печінки (КЕП) з метою модуляції (мінімізації) імунореактивності алогенного мієлотрансплантата та підвищення його захисного потенціалу. Показано зниження РТПГ-активності нативного та кріоконсервованого аломієлотрансплантата під впливом КЕП.

The authors continue to investigate the immunological aspects of a combined application of the bone marrow cells (BM) and embryonic liver cells (ELC) with the aim of modulating (minimizing) the immune reactivity of the allogenic myelotransplant and increasing its protective potential. The GVH-activity of the native and cryopreserved activities of the native and cryopreserved allomyelotransplant were shown to decrease under the action ELC.

Предположение, что иммунореактивность аллогенного костного мозга может быть снижена путем изменения сбалансированного содержания в миелотрансплантате цитокин-продуцирующих акцессорно-регуляторных клеток кроветворного микроокружения, получило экспериментальное подтверждение [6]. Такого рода модификации могут наблюдаться при использовании определенных режимов криоконсервирования КМ, изменяющих его способность инициировать развитие реакции "трансплантат против хозяина" (РТПХ). Одновременно было отмечено, что, наряду со снижением иммунореактивности, криоконсервированный миелотрансплантат снижает и гемопоэтическую активность [7].

Изменения клеточного состава миелотрансплантата и его функционального потенциала можно также достичь не только элиминацией, но и дополнительным введением с ним клеток, проявляющих ту или иную регуляторную активность. К настоящему времени накоплен материал, свидетельствующий о выраженной иммуномодулирующей способности продуктов фетоплацентарного

The assumption on the immune reactivity of the allogenic bone marrow to be reduced by changing the balanced content of the cytokine-producing accessory-regulatory cells of the hematopoietic microenvironment in the myelotransplant was experimentally supported [6]. These modifications may be observed when applying particular modes of cryopreservation of BM, altering its ability for initiating development of a "graft versus host" (GVHR) reaction. It was reported that along with a reduction in the immune reactivity, a cryopreserved myelograft also reduces hematopoietic activity [7].

The changes in the cell composition of a myelograft and its functional potential may be also achieved not only by elimination but also by additional injection of the cells with it, which manifest regulatory activity. Currently the data are available which testify to a manifested immune modulatory activity of the products of the fetoplacental complex (PFPC). Of particular interest is their "tropicity" towards the cells, which realise suppressive function [12]. The embryonic liver, e.g., throughout the whole period of gesta-

Матеріал, захищений авторським правом

комплекса (ПФПК). Наибольший интерес представляет их "тропность" в отношении клеток, реализующих супрессорные функции [12]. Эмбриональная печень, например, на протяжении почти всего срока гестации продуцирует альфа-фетопротеин (α-ФП), важнейший триггерный фактор Т-супрессорной активности [1]. Этот биологический объект содержит также естественные супрессоры (ЕС) и обладает высокой гемопоэтической активностью [8]. Следовательно, можно предполагать, что эмбриональная печень может быть использована как сотрансплантат аллогенного КМ, способный повышать его защитный потенциал и минимизировать развитие иммунного конфликта. Экспериментальная оценка иммуномодулирующей активности ПФПК, в том числе и эмбриональной печени, в интактном организме показала выраженную их способность изменять состояние иммунокомпетентной сферы реципиентов с активацией супрессорного звена иммунитета. Более того, сотрансплантация ПФПК с аллогенными лимфоидными клетками снижала их способность инициировать острую форму РТПХ [7]. Цель данной работы – експериментальное обоснование возможности применения КЭП для модуляции (минимизации) иммунореактивности аллогенного КМ и повышения его защитного потенциала.

В работе использованы мыши Balb/c, СВА, 12–14-недельного возраста массой 18–20 г. Эмбриональный материал – КЭП 12–13-суточных сроков гестации – вводили в аллогенной системе; реципиентами были мыши Balb/c, донорами КМ и КЭП – мыши СВА. Для контроля реципиентам вводили клетки взрослой печени (КВП) мышей СВА в той же концентрации,что и КЭП. Клетки КМ мышей вымывали из бедренной кости и ресуспендировали в среде 199 с добавлением 3%-й эмбриональной телячьей сыворотки и 5%-го цитрата натрия. КЭП гомогенизировали в такой же среде, что и КМ. Колониеобразование в селезенке облученных животных оценивали на 8- и 12-е сутки после трансплантации гемопоэтической ткани [23]. Индекс тимуса определяли по соотношению массы органа к массе тела животного.

При сравнительном изучении степени влияния КЭП на иммунореактивность аллогенного КМ летально облученным мышам Balb/c внутривенно вводили нативный (НКМ) или криоконсервированный (ККМ) костный мозг мышей линии СВА в дозе 5×10^6/мышь совместно с КЭП или без нее. Интенсивность развития РТПХ оценивали по общепринятым показателям [7]. КЭП вводили на 14–15-е сутки после трансплантации КМ в концентрации 5×10^5/мышь. Срок введения КЭП определялся временем начала формирования из предшественников КМ антиген-реактивных Т-клеток [13], иммунореактивность которых должна изменяться под действием супрессивных факторов КЭП. Полученные данные обрабатывали статистически [2].

tion produces alpha-fetoprotein (α-FP), the most important triggering factor of a T-suppressive activity [1]. This biological system also contains natural suppressors (NS) and possesses high hematopoietic activity [8]. Hence, it may be supposed that the embryonic liver may be used as a co-transplant of the allogenic BM, capable of increasing its protective potential for minimising the development of the immune conflict. Experimental evaluation of the PFPC immune modulating activity in the intact organism, including that of the embryonic liver, demonstrated their manifested ability for changing the state of the immune competent sphere of recipients with activating a suppressive link of the immunity. Moreover, co-transplantation of PFPC with allogenic lymphoid cells reduced their ability for initiating the acute form of GVHR [7]. The aim of the given research was to experimentally substantiate possible application of the ELC for modulating (minimising) the immune reactivity of the allogenic BM and increasing its protective potential.

The mice of a Balb/c and CBA lines, aged 12–14 weeks, with the body weights of 18–20 g, were used in experiments. The embryonic material – the ELC of 12–18 days of gestation – were injected within the allogenic system; mice of a Balb/c were used as recipients, mice of a CBA line – as donors of BM and the ELC. For the purposes of control the recipients were injected with the mature liver cells (MLC) of the CBA mice in the concentration similar to that of the ELC. The murine BM cells were washed out of the femur bones and were resuspended in the medium-199 with addition of a 3%-embryonic calf serum and 5%-sodium citrate. The ELC were homogenised in the same medium as that for BM. Colony-formation in the spleen of the irradiated animals was evaluated by the 8th and 12th days after transplantation of the hematopoietic tissue [23]. The index of the thymus was determined by the ratio of the weight of the organ to the body weight of the animal.

A comparative study of the extent of action of the ELC on the immune reactivity of the allogenic BM involved intravenous injection of the native (NBM) or cryopreserved (CBM) bone marrow of the CBA mice at a dose of 5×10^6/mouse jointly with or without ELC. The intensity of the GVHR development was evaluated routinely [7]. The ELC were injected by the 14–15th day after BM transplantation at a concentration of 5×10^5/mouse. The exact term of the ELC injection was determined by the time of the beginning of the formation of the antigen-reactive T-cells out of the BM progenitors [13], the immune reactivity of which should alter under the action of the ELC suppressive factors. The data obtained were statistically processed [2].

Bone marrow was frozen under protection of a PEO-400 cryoprotectant in the concentration of 7.5%. The rate of freezing was 1 °C/min down to –25 °C with subsequent immersion into liquid nitrogen. The

Матеріал, захищений авторським правом

Костный мозг замораживали под защитой криопротектора ПЭО-400 в концентрации 7,5%. Скорость замораживания составляла 1 °С/мин до –25 °С с последующим погружением в жидкий азот. Отогревали КМ на водяной бане при температуре 40 °С в течение минуты [6].

При изучении иммунологических аспектов совместного применения КМ и КЭП оценивались гемопоэтическая активность собственно КЭП определенных линий мышей и их вклад в восстановление гемопоэза летально облученных реципиентов миелотрансплантата, изменение под их влиянием гемопоэтической и иммунореактивности трансплантируемого КМ.

Как свидетельствуют данные табл. 1, независимо от выбранных сроков гестации, при введении в указанных дозах КЭП не обладают высокой колониеобразующей активностью *in vivo* на 8- и 12-е сутки. Если допустить, что для эмбриональных КОЕс фактор расселения *f* аналогичный костномозговым КОЕс, т.е. составляет примерно 18–20% [11], то их концентрация в КЭП 13-суточных сроков гестации – около 0,008%. Это приблизительно в 4–5 раз ниже, чем в КМ взрослых мышей, и в 2–3 раза, чем в селезенке. Колониеобразующая активность КЭП существенно не изменялась и в другие сроки гестации, что свидетельствует о сохранении стабильной концентрации КОЕс в органе независимо от выраженного увеличения в нем содержания ядерных клеток. Концентрация 8- и 12-суточных КОЕс, отличающихся по своему пролиферативному потенциалу, в КЭП различных сроков гестации была практически идентичной, что подтверждает результаты авторов [9], использовавших другие линии мышей.

Таблица 1

Колониеобразующая активность эмбриональной печени мышей в зависимости от возраста эмбриона

Возраст эмбрионов, сут	Вес эмбриональной печени, мг	Количество ядерных клеток на орган $\times 10^6$	КОЕс8	КОЕс12
13	13,4 ± 0,8	4,7 ± 0,3	3,3 ± 0,3	3,1 ± 0,3
15	31,6 ± 1,1	16,2 ± 0,8	1,6 ± 0,1	2,0 ± 0,2
17	82,3 ± 1,8	85,8 ± 0,8	3,0 ± 0,1	2,6 ± 0,2
20	100,4 ± 3,0	170,0 ± 1,6	1,9 ± 0,2	2,1 ± 0,4

Примечания: оценка колониеобразующей активности КЭП проведена в сингенной системе донор–реципиент при введении 2×10^5 КЭП на мышь; КОЕс8, КОЕс12 — количество формируемых колоний на 8- и 12-е сутки соответственно.

Представленные в табл. 2 результаты свидетельствуют о том, что КЭП, не обладая высокой колониеобразующей активностью, тем не менее оказывали выраженное регуляторное влияние на гемопоэтическую функцию трансплантируемого КМ. Отмечалась значительная стимуляция колониеобразующей активности миелотрансплантата, причем ее выраженность имела дозозависимый эффект. С увеличением вводимых КЭП количество формируемых в селезенке колоний увеличивалось.

BM was thawed in water bath at the temperature of 40 °C for 1 min [6].

When studying the immunological aspects of a joint application of BM and ELC the authors assessed hematopoietic activity of the ELC themselves of particular murine lines and their contribution into restoration of hematopoiesis of the lethally irradiated recipients of the myelograft, and thus induced changes in the hematopoietic and immune reactivity of the BM being transplanted.

It follows from Table 1 that independently of the terms of gestation the ELC, injected in the said doses, do not demonstrate high colony-forming activity *in vivo* at the 8th and 12th days. Providing that for embryonic CFUc the homing factor *f* is similar to that of the bone marrow CFUc, i.e. comprises approximately 18–20% [11], then their concentration in the ELC, aged 13 weeks of gestation, is about 0.008%. It is approximately by 4–5-fold lower as compared with the BM of mature mice, and by 2–3-fold lower as compared with the spleen. Colony-forming activity of the ELC did not change significantly during other terms of gestation, thus indicating the maintenance of the stable concentration of CFUc within the organ independently of a manifested rise in the content of nucleated cells in it. The concentrations of the CFUc, aged 8 and 12 days, in the ELC of various terms of gestation were nearly identical, thus supporting the results reported elsewhere [9], who used mice of the other lines.

Table 1

Colony-forming activity of the murine embryonic liver depending on the age of the embryo

Age of embryos, days	Weight of embryonic liver, mg	Amount of the nucleated cells per organ $\times 10^6$	CFUc8	CFUc12
13	13.4 ± 0.8	4.7 ± 0.3	3.3 ± 0.3	3.1 ± 0.3
15	31.6 ± 1.1	16.2 ± 0.8	1.6 ± 0.1	2.0 ± 0.2
17	82.3 ± 1.8	85.8 ± 0.8	3.0 ± 0.1	2.6 ± 0.2
20	100.4 ± 3.0	170.0 ± 1.6	1.9 ± 0.2	2.1 ± 0.4

Note: the ELC colony-forming activity was evaluated within a donor-recipient syngenic system when injecting 2×10^5 ELC per mouse; CFUc8, CFUc12 — number of the colonies being formed by the 8th and 12th days, respectively.

It follows from Table 2 that the ELC, while having low colony-forming activity, still exercised a manifested regulatory effect on the hematopoietic function of the BM being transplanted. The colony-forming activity of the myelograft was strongly stimulated, and its manifestation was of a dose-dependent nature. An increase in the amount of the injected ELC resulted in a rise in the number of colonies being formed. Here the minimum dose of the ELC did not stimulate the CFUc, aged 8 days, while the amount of the CFUc, aged 12 days, was increased significantly as compared with the BM being injected per dose. A 5-fold increase in the dose of the ELC resulted in a 2-fold rise in the BM colony-forming activity by the 8th day, and in an even greater increase by the 12th day. These results

Матеріал, захищений авторським правом

Таблица 2

Влияние совместной трансплантации КЭП на колониеобразующую активность и защитный потенциал КМ

Номер группы	Трансплантируемый материал	КОЕс8	КОЕс12	Количество ядерных клеток в КМ (бедро $\times 10^5$)	Выживаемость на 12-е сутки, %
1	КМ (1×10^5)	$8,1 \pm 0,6$	$9,3 \pm 0,7$	$3,5 \pm 0,9$	51
2	КМ + КЭП (4×10^4)	$9,9 \pm 0,8$	$14,2 \pm 1,2^{**}$	$19,0 \pm 1,3$	79
3	КМ + КЭП (2×10^5)	$16,5 \pm 1,2^{**}$	$21,7 \pm 1,4^{**}$	$12,0 \pm 1,6$	62
4	КМ + КВП (2×10^5)	$9,3 \pm 0,8$	$10,5 \pm 0,9$	$4,0 \pm 0,4$	50
5	КЭП (2×10^5)	$2,9 \pm 0,7^{**}$	$3,1 \pm 0,1^{**}$	$2,0 \pm 0,4$	25
6	КВП (2×10^5)	$0,4 \pm 0,1^{**}$	$0,9 \pm 0,2^{**}$	$1,5 \pm 0,1$	4
7	Контроль облучения	$0,3 \pm 0,1^{**}$	$0,8 \pm 0,2^{**}$	$1,0 \pm 0,1$	0

Примечания: * — реципиентам введен нативный сингенный КМ; ** — $p < 0,05$ при сравнении с 1-й группой.

При этом минимальная доза КЭП не стимулировала 8-суточные КОЕс, тогда как количество 12-суточных КОЕс достоверно увеличивалось в сравнении с вводимым КМ *per se*. Пятикратное увеличение дозы КЭП приводило к двукратному повышению колониеобразующей активности КМ на 8-е и еще в большей степени на 12-е сутки. Эти результаты свидетельствуют о влиянии продуцируемых эмбриональными клетками регуляторных факторов на функциональный статус кроветворных предшественников КМ. Степень влияния определяется как дозой вводимых КЭП, так и уровнем дифференцировки предшественников. Важно, что регуляторная активность эмбриональных медиаторов в большей степени проявлялась в отношении 12-суточных КОЕс, которые, как считалось раньше [11], меньше подвержены влиянию эндо- и экзогенных регуляторных гемопоэтических факторов. Однако в последнее время идентифицирован ряд цитокинов, действующих как на коммитированные, так и ранние кроветворные предшественники. Такие цитокины, как интерлейкин (ИЛ)-6, -7, -8, -11, относятся к гемопоэтическим ростовым факторам и как самостоятельно, так и в сочетании с другими цитокинами (например, ИЛ-3, фактором Стила-СКФ и др.) усиливают пролиферацию примитивных стволовых кроветворных клеток (СКК) [14]. Эти цитокины синтезируются макрофагами, фибробластами, стромальными клетками гемопоэтических тканей, гепатоцитами, тучными клетками, т.е. структурами, входящими в состав КЭП. Следовательно, есть все основания считать закономерным увеличение колониеобразующей активности КМ под действием КЭП. Эффект может реализоваться как за счет мобилизации и миграции СКК из КМ, так и усиления их пролиферации *in situ*. Так, ИЛ-6 и ИЛ-11 стимулируют дифференцировку полипотентных СКК с последующим образованием зрелых клеток [18]. ИЛ-8 вызывает быструю миграцию примитивных СКК из КМ [20], а ИЛ-7, обладая обоими

testify to the influence of the embryonic cells-produced regulatory factors on the functional status of the BM hematopoietic progenitors. The extent of this influence is determined both by the dose of the ELC being injected and the level of differentiation of progenitor cells. It should be mentioned that the regulatory activity of the embryonic mediators was stronger manifested towards CFUc, aged 12 days, which were previously believed [12] to be less susceptible to the action of endo- and exogenous regulatory hematopoietic factors. Recently, however, there has been identified a range of cytokines which influence both committed and early hematopoietic progenitor cells. Such cytokines as interleukin (IL) 6, -7, -8, -11 belong to hematopoietic growth factors and facilitate proliferation of primitive stem hematopoietic cells (SHC) [14] both independently and in combination with other cytokines (e.g. IL-3, Steel factor-SCF, etc.). These cytokines are synthesised by macrophages, fibroblasts, stromal cells of hematopoietic tissues, hepatocytes, mast cells, i.e. the structures, comprising the ELC. Hence, it may be supposed that the ELC increase the BM colony-forming activity. This effect may be realised both due to mobilisation and migration of SHC out of the BM and enhancement of their proliferation *in situ*. For example, IL-6 and IL-11 stimulate differentiation of the polypotent SHC with subsequent formation of mature cells [18]. IL-8 produces rapid migration of the primitive SHC out of the BM [20], while IL-7, which possesses both of these properties, brings about a 10-fold increase in CFUc in peripheral blood [15] when injected jointly with colony-stimulating factors (CSF).

When analysing the effect of the ELC action on the BM hematopoietic function, one cannot ignore the peculiarities of colony formation in the spleen and medullary hematopoiesis. The amount of the nucleated cells in BM (femur) of the irradiated recipients also changed depending on the nature of the material

Table 2

Action of the joint ELC transplantation on the colony-forming activity and protective potential of BM

Group number	Transplanted material	CFUc8	CFUc12	Amount of nucleated cells in BM (femur $\times 10^5$)	Survival by the 12th day, %
1	BM (1×10^5)	8.1 ± 0.6	9.3 ± 0.7	3.5 ± 0.9	51
2	BM + ELC (4×10^4)	9.9 ± 0.8	$14.2 \pm 1.2^{**}$	19.0 ± 1.3	79
3	BM + ELC (2×10^5)	$16.5 \pm 1.2^{**}$	$21.7 \pm 1.4^{**}$	12.0 ± 1.6	62
4	BM + MLC (2×10^5)	9.3 ± 0.8	10.5 ± 0.9	4.0 ± 0.4	50
5	ELC (2×10^5)	$2.9 \pm 0.7^{**}$	$3.1 \pm 0.1^{**}$	2.0 ± 0.4	25
6	MLC (2×10^5)	$0.4 \pm 0.1^{**}$	$0.9 \pm 0.2^{**}$	1.5 ± 0.1	4
7	Irradiation control	$0.3 \pm 0.1^{**}$	$0.8 \pm 0.2^{**}$	1.0 ± 0.1	0

Note: * — the recipients were injected with native syngenic BM; ** — $p < 0.05$ as compared with group 1.

Матеріал, захищений авторським правом

этими свойствами, при введении совместно с колониестимулирующими факторами десятикратно увеличивает КОЕс в периферической крови мышей [15].

Анализируя эффект влияния КЭП на кроветворную функцию КМ, нельзя не обратить внимания на особенности колониеобразования в селезенке и медуллярное кроветворение. Количество ядерных клеток в КМ (бедре) облученных реципиентов также изменялось в зависимости от характера трансплантируемого материала. Однако совпадения увеличения клеточности в бедре и колониеобразующей активности в селезенке при сотрансплантации определенных доз КЭП не отмечалось. Такого рода несоответствие может, видимо, свидетельствовать о дозозависимом влиянии вводимых с КЭП (или нарабатываемых после введения) цитокинов, активирующих миграцию или дифференцировку СКК. Также не исключено, что с увеличением дозы КЭП, вводится больше клеток, супрессирующих медуллярное кроветворение и играющих ведущую роль в обеспечении защиты летально облученных реципиентов. Именно с выраженностью стимулирующего эффекта медуллярного кроветворения КЭП коррелировала выживаемость мышей-реципиентов. Из этого следует, что в условиях измененного компонентного состава миелотрансплантата, в том числе и при сотрансплантации с клетками, обладающими способностью вырабатывать регуляторные гемопоэтические цитокины, колониеобразование в селезенке не коррелирует с защитным потенциалом КМ [6].

Говоря о влиянии КЭП на кроветворную функцию донорских миелокариоцитов, необходимо отметить, что при выбранных условиях эксперимента не было установлено существенных различий в характере формирования гемопоэтического плацдарма в указанные сроки при использовании сингенного или аллогенного КМ (данные не приведены). В общем наши экспериментальные результаты согласуются с клиническими данными, подтверждающими, что трансфузии КЭП больным рефрактерной анемией после аутомиелотрансплантации стимулируют восстановление КМ реципиентов [9].

В [7] сообщалось, что ПФПК, в том числе и КЭП, введенные в "интактный" организм или при сотрансплантации с аллогенными лимфоидными клетками, способствуют экспансии супрессорного звена иммунитета и снижению интенсивности развития острой РТПХ. Это вполне соответствует представлению о том, что эмбриональная печень содержит широкий спектр цитокинов с иммуно- и гематотропной активностью. Более того, в эмбриональной печени может присутствовать фактор, подобный выделенному из КМ и обладающий двойной активностью: стимулирует колониеобразование и ингибирует формирование иммунокомпетентных клеток (ИКК) [12].

Для оценки возможного влияния КЭП на состояние иммунореактивности миелотрансплантата в

being transplanted. However, the authors did not observe any coincidence of a rise in the cellular composition in the femur and colony-forming activity in the spleen during co-transplantation of particular doses of the ELC. Such a discrepancy my be, apparently, due to a dose-dependent action of the cytokines, injected jointly with the ELC (or produced after the injection), which activate migration or differentiation of SHC. It cannot be excluded that a rise in the ELC dosage increases the amount of cells, suppressing medullary hematopoiesis, which play a leading role in providing for protection of the lethally irradiated recipients. Survival of the mice-recipients correlated just with the extent of manifestation of the stimulating effect of the ELC medullary hematopoiesis. Thus, it may be concluded that when a myelograft component composition is changing, as it also occurs during co-transplantation with the cells, which are capable of producing regulatory hematopoietic cytokines, the colony formation in the spleen does not correlate with the protective potential of BM [6].

Speaking about the effect of the ELC on the hematopoietic function of the donor myelocaryocytes it should be noted that under the given conditions of the experiment the authors did not observe any significant differences in the nature of formation of the hematopoietic store at the said terms when using syngenic or allogenic BM (the data not submitted). On the whole, the results obtained by the authors nicely correlate with the clinically collected data, which support the fact that transfusion of the ELC to the patients with refractory anemia stimulates recovery of the recipient BM after automyelografting [9].

Elsewhere [7] it was reported that PFPC, ELC including, injected into the intact organism or cotransplanted jointly with the allogenic lymphoid cells, facilitate expansion of the suppressory link of the immunity and reduce the intensity of development of the acute GVHR. This correlates with the assumption that the embryonic liver contains a wide spectrum of cytokines with immune and hematotropic activities. Moreover, the embryonic liver may also incorporate a factor, similar to that isolated out of the BM and possessing dual activity: for stimulating colony formation and inhibition of formation of the immune competent cells (ICC) [12].

To evaluate possible influence of the ELC on the state of the myelograft immune reactivity in the next series of experiments the lethally irradiated recipients were injected with the allogenic BM jointly with the ELC. Here the authors evaluated not only the immune reactivity of the native BM but of the cryopreserved BM with the already altered immune reactivity as well.

Table 3 shows the results of changing the body weights of the recipients of the allogenic BM. In group 1 the index generally reflects the dynamics of the process, which is characteristic of the development of chronic GVHR [13] and which differs significantly from that during transplantation of the syngenic BM

Матеріал, захищений авторським правом

следующей серии экспериментов летально облученным реципиентам совместно трансплантировали аллогенный КМ и КЭП. При этом оценивали иммунореактивность не только нативного КМ, но и криоконсервированного с измененной иммунореактивностью.

В табл. 3 приведены результаты изменения массы тела реципиентов аллогенного КМ. В 1-й группе показатель в общем отражает динамику процесса, характерную для развития хронической РТПХ [13] и существенно отличающуюся от таковой при трансплантации сингенного КМ (группа 6). Характерным признаком развития синдрома явилось снижение массы тела после третьей посттрансплантационной недели, т.е. в период начала формирования из клеток-предшественников иммунореактивных Т-лимфоцитов.

Особенности изменения показателя снижения массы тела определялись видом трансплантируемого материала. Наиболее раннее и более выраженное снижение отмечалось в группе реципиентов с трансплантатом нативного КМ. Судя по этому показателю, криоконсервированный КМ проявлял меньшую РТПХ-активность на всех этапах посттрансплантационного периода.

На фоне дополнительно введенных КЭП начало снижения массы тела мышей с нативным и криоконсервированным аллогенным миелотрансплантатом отодвигалось во 2-й и 5-й группах на 10–15 сут и отмечалось с 40–50-х суток посттрансплантационного периода. Складывается впечатление, что иммуносупрессирующая активность КЭП в отношении РТПХ при алломиелотрансплантации сохраняется в течение 30–35 сут после их введения.

Значимость сотрансплантации КЭП как фактора, регулирующего интенсивность течения РТПХ,

(group 6). A distinguishing feature of the development of the syndrome is a reduction in the body weight after the third posttransplantation week, i.e. during the period of the start of the formation of the immunereactive T-cells out of the progenitor cells.

Peculiar features of changes in the index were determined by the type of the material being transplanted. The earliest and the most manifested reduction in the body weights was reported in the group of recipients with a transplant of the native BM. Judging by this index, cryopreserved BM demonstrated lower GVHR-activity at all the stages of the posttransplantation period.

After additional injection of the ELC a start of reduction in the body weights in the mice with the native and cryopreserved allogenic myelografts was delayed in groups 2 and 5 by 10–15 days, and started actually by the 40–50th days of the posttransplantation period. It seems that the immune suppressive activity of the ELC towards GVHR during allotransplantation is maintained for 30–35 days after their injection.

The significance of the ELC co-transplantation as a factor, which regulates the intensity of a GVHR occurrence, is supported when evaluating one of the characteristic features of the development of the syndrome — the extent of aplasia of lymphoid organs. Indeed, with the exception of the animals of the control group, a period of appearance of the donor ICC in the recipient organism was characterised by a vivid reduction in the cellular composition of the thymus (Table 4). The extent of the organ aplasia was also determined by the type of the BM grafting: independently or jointly with ELC. Judging by this feature, the inhibiting action of the ELC on the antigen-reactive donor ICC, which realise GVHR, is evident.

Таблица 3 **Table 3**

Динамика изменения массы тела летально облученных реципиентов после трансплантации КМ

Dynamics of changes in body weights of lethally irradiated recipients following BM transplantation

Номер группы Group number	Трансплантируемый материал Transplanted material	Время после трансплантации, сут Time after transplantation, days								
		0	7	15	21	30	40	50	70	100
1	НКМ NBM	22,6	17,9	21,8	22,9	20,9	17,9	16,1**	15,2**	18,4
2	НКМ + КЭП NBM + ELC	22,6	17,9	21,8	23,0	23,1	20,6	18,0	16,0**	19,1
3	НКМ + КВП NBM + MLC	22,6	17,9	22,0	21,3	20,1	18,2	18,0	16,3**	17,6
4	ККМ CBM	22,6	17,9	20,8	21,9	21,7	20,7	20,4	17,8	18,0
5	ККМ + КЭП CBM + ELC	22,6	17,9	20,8	22,6	23,1	21,5	20,9	19,0	18,9
6	Сингенный КМ (контроль) Syngenic BM (control)	22,6	18,6	21,7	23,0	22,6	20,9	21,2	22,2	21,4

Примечания: в 1–5-й группах реципиентам трансплантировали аллогенный КМ; * — средние показатели выживших к этим срокам реципиентов; доверительный интервал каждого показателя в группах не превышал 2–6%; ** — $p < 0,05$ при сравнении с 6-й группой.

Note: in groups 1–5 the recipients experienced transplantation of the allogenic BM; * — average features of the survived (by that time) recipients; a confidence interval of every feature in the groups did not exceed 2–6%; ** — $p < 0.05$ as compared with group 6.

Матеріал, захищений авторським правом

подтверждается и при оценке одного из характерных признаков развития синдрома — степени аплазии лимфоидных органов. Действительно за исключением животных контрольной группы период появления в организме реципиентов донорских ИКК характеризовался явным снижением клеточности тимуса (табл. 4). Степень аплазии органа также определялась видом трансплантации КМ: самостоятельно или с КЭП. Судя и по этому показателю, ингибирующее действие КЭП на реализующие РТПХ антигенреактивные донорские ИКК очевидно. "Критическое" состояние тимуса длительное время после миелотрансплантации соответствует представлению о том, что центральный орган иммунитета наиболее манифестно отражает степень тяжести РТПХ в ее острой или хронической форме [19]. Повышенная концентрация глюкокортикоидов в сыворотке животных с проявлениями РТПХ [19] характеризует ее как мощный стресс-индуцирующий фактор, вызывающий гибель основной массы тимоцитов с повышенной чувствительностью к глюкокортикоидам. В этом смысле РТПХ можно рассматривать как некую форму иммунологической тимэктомии [19]. Полученные данные показывают, что хроническая РТПХ развивается на фоне дисрегуляции цитокинов (так называемый цитокиновый шторм). В этих условиях преобладает продукция противовоспалительных цитокинов, ИЛ-4 и ИЛ-10, синтезируемых $CD4^+$Tx2-клетками [17]. ИЛ-10 является ингибитором ключевого воспалительного цитокина ИЛ-1, который активирует Т-клеточную пролиферацию, в частности, стимулирует рост тимоцитов [10]. Снижение концентрации ИЛ-1 может быть дополнительной причиной уменьшения клеточности тимуса в условиях хронического стресса при РТПХ. Кроме того, ИЛ-10 и ИЛ-4 ингибируют продукцию ИЛ-2 и ИЛ-7, потенциирующих друг друга и крайне необходимых для экспансии Т-клеточного клона. Нейтрализация ИЛ-7 или его рецепторов моноклональными антителами (МАТ) сопровождается критическим снижением клеточности тимуса [21]. Иными словами, развитие хронической РТПХ обеспечивает все условия для запуска аплазии тимуса. Здесь введенные КЛК и продукты их жизнедеятельности действуют как политропный фактор, корригирующий несбалансированную систему продукции цитокинов.

"Critical state of the thymus throughout a long period of time after myelotransplantation nicely correlates with the assumption that the central organ of the immunity the most vividly reflects the extent of a GVHR severity in its acute or chronic form [19]. An increased concentration of glucocorticoids in the serum of animals with the GVHR syndromes [19] indicates that it is a powerful stress-inducing factor, which results in the death of the majority of thymocytes with increased susceptibility to glucocorticoids. In this respect GVHR may be viewed upon as a form of "immunologic thymectomy" [19]. The data obtained demonstrate that chronic GVHR is developed during and after dysregulation of cytokines (the so-called cytokine storm). Under these conditions production of the anti-inflammatory cytokines, IL-4 and IL-10, synthesised by $CD4^+$ Tx2-cells [17]. IL-10 is the inhibitor of a key inflammatory cytokine IL-1, which activates a T-cell proliferation, in particular, stimulates the growth of thymocytes [10]. Lowering of the concentration of IL-1 may be an additional reason for a reduction in the cell composition of the thymus during chronic stress of the GVHR. Besides, IL-10 and IL-4 inhibit production of IL-2 and IL-7, which potentiate each other and which are extremely necessary for expansion of a T-cell clone. Neutralisation of IL-7 or its receptors by the monoclonal antibodies (MAB) is accompanied by a critical reduction in the cell composition of the thymus [21]. In other words, development of a chronic GVHR provides for all the conditions for triggering thymus aplasia. Here the injected ELC and the products of their vital activities act as a polytropic factor, which monitors a dysbalanced system of the cytokine production.

The ability of the ELC for regulating the extent of the GVHR activity is also supported by the results of the patients survival. This feature is integral when evaluating the intensity of the syndrome manifesta-

Таблица 4

Индекс тимуса облученных мышей после трансплантации КМ

Table 4

Index of the thymus in the irradiated mice after BM grafting

Номер группы Group number	Трансплантируемый материал Transplanted material	Время после трансплантации, сут Time after transplantation, days							
		15	21	30	40	50	70	80	100
1	НКМ NBM	0,48	0,78	0,85*	0,67*	0,62*	0,74*	0,84	0,94
2	НКМ + КЭП NBM + ELC	0,48	0,81	0,83*	0,74*	0,77*	0,71*	0,89	0,92
3	НКМ + КВП NBM + MLC	0,48	0,77	0,81*	0,70*	0,63*	0,72*	0,86	0,93
4	ККМ CBM	0,46	0,69	0,78*	0,87	0,76*	0,75*	0,81	0,92
5	ККМ + КЭП CBM + ELC	0,46	0,73	0,84*	0,90	0,90	0,80	0,85	0,91
6	Сингенный КМ (контроль) Syngenic BM (control)	0,53	0,86	1,10	0,98	1,16	1,08	0,97	1,04

Примечание: * — $p < 0,05$ при сравнении с 6-й группой.

Note: * — $p < 0.05$ as compared with group 6.

Матеріал, захищений авторським правом

не необходимых для экспансии клона Т-клеток. Нейтрализация ИЛ-7 или его рецепторов моноклональными антителами (МАТ) сопровождается критическим снижением клеточности тимуса [21]. Другими словами, при развитии хронической РТПХ создаются все условия для развития аплазии тимуса. При этом вводимые КЭП и продукты их деятельности выступают как плейотропный фактор, корректирующий разбалансированную систему продукции цитокинов.

Способность КЭП регулировать степень активности РТПХ подтверждают также результаты выживаемости реципиентов. Этот показатель является интегральным в оценке интенсивности проявления синдрома [13]. Известно, что выживаемость летально облученных реципиентов при трансплантации сингенного криоконсервированного КМ ниже, чем нативного. Это свидетельствует о снижении защитного потенциала миелотрансплантата после криоконсервирования [6]. При этом основная гибель реципиентов как сингенного, так и аллогенного криоконсервированного КМ отмечается на протяжении первых посттрансплантационных 15–20 дней. Очевидно, гибель мышей в этот период не обусловлена развитием какого-либо иммунного конфликта. Количество животных, доживших до 20-х суток, в каждой группе было принято за 100%. Представленные в табл. 5 данные показывают, что с 30-х по 100-е сутки выживаемость животных в группе с аллогенным ККМ (4-я группа) была выше, чем с нативным (1-я группа). Учитывая вышесказанное, очевидно, что более высокая выживаемость реципиентов аллогенного ККМ в сравнении с нативным обусловлена меньшей его РТПХ-активностью. Сотрансплантация КЭП с КМ способствовала как отсрочке начала интенсивной гибели реципиентов, так и повышению процента их выживаемости к 100-м суткам. Действие КЭП, судя по этим критериям, проявлялось в отношении обоих миелотрансплантатов, но в более выраженной форме с ККМ. Результаты табл. 6 показывают, что повышение выживаемости при сотрансплантации КЭП может быть следствием не только ограничения степени проявления РТПХ-активности алломиелотрансплантата, но и повышения его гемопоэтической активности и защитного потенциала в целом.

Таким образом, выполненные исследования позволяют сделать вывод о целесообразности применения КЭП как сотрансплантата с аллогенным КМ для снижения иммунореактивности и повышения его защитного потенциала.

Механизм реализации процесса модуляции состояния гемо- и иммунопоэза под действием КЭП может быть многогранным. Иммуносупрессорная активность КЭП в отношении алломиелотрансплантация [13]. It is known that survival of lethally irradiated recipients is lower during transplantation of cryopreserved BM as compared with native BM. This is indicative of the lowering of the protective potential of the myelograft after cryopreservation [6]. Here most recipients of both syngenic and allogenic BM die during the first 15 posttransplantation days. Apparently, death of mice at this period is not due to the development of any immune conflict. The number of animals, survived by the 20th day, was taken to be equal to 100% in every group. The data in Table 5 show that in the range of 30-100th days the survival of animals in the group with allogenic CBM (group 4) was higher as compared with that in the group with native BM (group 1). Considering the above it may be concluded that higher survival of the recipients of the allogenic BM as compared with the native BM is due to its lower GVHR activity. C-transplantation of the ELC with BM facilitated both the start of the intensive death of recipients, and a rise in their survival by the 100th day. The action of the ELC, as judged by these criteria, was manifested towards both myelografts though it was stronger pronounced in the case of CBM. The results obtained demonstrate that a rise in survival during co-transplantation in the ELC may be due not only to the limitation of the extent of manifestation of the GVHR-activity of the allomyelograft, but also due to an increase in its hematopoietic activity and protective potential as a whole.

Thus, the investigations conducted make it possible to conclude on the expediency of applying the ELC as a co-transplant with the allogenic BM for lowering the immune reactivity and increasing its protective potential.

The mechanism of realisation of the process of modulation of the state of hemato- and immunopoiesis under the action of the ELC may be diversified. The

Таблица 5 **Table 5**

Выживаемость летально облученных животных после трансплантации КМ

Survival of lethally irradiated animals after transplantation of BM

Номер группы Group number	Трансплантируемый материал Transplanted material	Время после трансплантации, сут Time after transplantation, days				
		30	40	50	70	100
1	НКМ NBM	92,8	86,1	70,4	34,2	30,7
2	НКМ + КЭП NBM + ELC	94,1	90,0	79,6	45,7	40,2
3	НКМ + КВП NBM + MLC	93,2	87,8	72,3	40,3	32,8
4	ККМ CBM	97,6	92,9	88,1*	49,4*	44,6*
5	ККМ + КЭП CBM + ELC	98,7	96,6	95,2	63,9	59,2
6	Сингенный КМ (контроль) Syngenic BM (control)	96,5	94,2	92,8	90,7	90,2

Примечание: * — $p < 0,05$ при сравнении с 1-й группой.

Note: * — $p < 0.05$ as compared with group 1.

Матеріал, захищений авторським правом

Таблица 6

Показатели, характеризующие РТПХ после трансплантации аллогенного КМ и КЭП

Номер группы	Трансплантируемый материал	Клеточность КМ на бедро $\times 10^6$ на 30-е сутки	Выживаемость на 70-е сутки, %
1	НКМ (5×10^6)	$13,8 \pm 1,5$	$34,2 \pm 3,2$
2	НКМ + КЭП (5×10^5)	$17,2 \pm 1,3^*$	$45,7 \pm 2,8^*$
3	НКМ + КВП (5×10^5)	$14,2 \pm 1,5$	$30,0 \pm 2,9$
4	ККМ (5×10^6)	$15,9 \pm 1,4$	$49,4 \pm 3,1$
5	ККМ + КЭП (5×10^5)	$20,8 \pm 1,6^{**}$	$63,9 \pm 5,2^{**}$
6	КЭП (5×10^5)	$15,2 \pm 1,1$	$36,3 \pm 4,3$

Примечания: для каждого показателя выбраны наиболее информативные сроки оценки; * — $p < 0,05$ при сравнении 1-й и 2-й групп; ** — $p < 0,05$ при сравнении 3-й и 4-й групп.

Table 6

Indices, characterising GVHR following transplantation of allogenic BM and ELC

Group number	Transplanted material	Cell composition of BM per femur $\times 10^6$, by the 30th day	Survival by the 70th day, %
1	NBM (5×10^6)	13.8 ± 1.5	34.2 ± 3.2
2	NBM + ELC (5×10^5)	$17.2 \pm 1.3^*$	$45.7 \pm 2.8^*$
3	NBM + MLC (5×10^5)	14.2 ± 1.5	30.0 ± 2.9
4	CBM (5×10^6)	15.9 ± 1.4	49.4 ± 3.1
5	CBM + ELC (5×10^5)	$20.8 \pm 1.6^{**}$	$63.9 \pm 5.2^{**}$
6	ELC (5×10^5)	15.2 ± 1.1	36.3 ± 4.3

Note: the most demonstrative terms of evaluation were selected for every index; * — $p < 0.05$ when comparing groups 1 and 2; ** — $p < 0.05$ when comparing groups 3 and 4.

та является наиболее важным ее свойством. Тот факт, что применение в качестве контрольного препарата клеток взрослой печени не вызывало такого эффекта, говорит о наличии иммунотропных факторов именно в эмбриональном материале, т.е. КЭП. Одним из них может быть АФП, продуцируемый КЭП на протяжении почти всего срока беременности и выступающий в роли пускового фактора — активатора супрессорного звена иммунитета [1], ингибирующего Т-эффекторы. Предполагается и альтернативный вариант действия АФП, реализуемый не через взаимодействие пептида с рецепторами мембран Т-супрессоров [1], а путем изменения функции Т-хелперов. Показано, что АФП ингибирует экспрессию *I*а-структур на антигенпрезентирующих клетках (АПК) [1]. *I*а-белок формирует с процессированным АПК антигеном комплекс, презентируемый Т-хелперам [3], запуская каскад специфических иммунных реакций по отношению к данному антигену. Таким образом, АФП, подавляя экспрессию *I*а-белка, препятствует развитию начальных этапов иммунного распознавания антигена и способствует накоплению непроцессированного макрофагами АПК антигена. В этой форме антиген стимулирует формирование в организме Т-супрессоров и толерантности к нему [3]. Иначе говоря, оба вектора направленности действия АФП в конечном итоге вызывают активацию Т-супрессоров.

Современная концепция межклеточных взаимодействий допускает альтернативный вариант регуляции иммунного ответа не Т-супрессорами и Т-хелперами, а двумя субпопуляциями $CD4^+$ Т-хелперов с противоположной активностью. Tx1-клетки преимущественно реализуют клеточно-опосредованный ответ, в то время как Tx2-клетки ингибируют его [17]. Соответственно оппозитные по своей активности продуцируемые ими цитокины: Tx1 синтезируют как "основные" медиаторы ИЛ-2 и ИФ-γ, а Tx2 — ИЛ-4 и ИЛ-10. Можно предположить, что в роли Т-супрессоров могут выступать Tx2-клетки.

Именно с этих позиций можно рассматривать и другой механизм иммуносупрессивной активности КЭП. Эмбриональная печень содержит достаточное количество тучных клеток и их предшествен-

immune suppressive activity of the ELC towards the allomyelograft is the most important its property. The fact that application of the cells of the mature liver as a control preparation did not bring about such an effect indicates that the immune tropic factors are available just in the embryonic material, i.e. the ELC. One of them may be the AFP, produced by the ELC throughout the whole term of pregnancy and acting as a trigger — the activator of the suppressive link of the immunity [1], which inhibits T-effectors. The alternative variant of action of the AFP is speculated about, which is realised not via the interaction of the peptide with the receptors of the T-suppressor membranes [1], but by means of changing the function of the T-helpers. The AFP was shown to inhibit expression of the *I*a-structures on the antigen-presenting cells (APC) [1]. The *I*a-protein forms a complex with the processed APC, which is presented to the T-helpers [3], triggering a cascade of specific immune responses towards the given antigen. Thus, the AFP, while inhibiting the expression of the *I*a-protein, prevents development of the initial stages of the immune recognition of the antigen and facilitates accumulation of the macrophages-nonprocessed antigen APC. In this form the antigen stimulates formation of the T-suppressors and tolerance to them in the organism [3]. In other words, both vectors of the direction of the AFP action finally produce activation of the T-suppressors.

Current concept of the intercellular interactions envisages the alternative variant of regulating the immune response not by the T-helpers and T-suppressors, but by two subpopulations of $CD4^+$ T-helpers with the opposite activities. The Tx1-cells mainly realise a cell-mediated response, while Tx2-cells inhibit it [17]. Respectively, opposite in their activities cytokines Tx1, produced by them, synthesise both "basic" mediators IL-2 and IP-γ, while Tx2 — IL-4 and IL-10. It may be supposed that Tx2-cells may act as T-suppressors.

From this point of view one can analyse another mechanism of the immune-suppressive activity of the ELC. The embryonic liver contains a sufficient amount of mast cells and their progenitors [16]. It was reported on their transformation within the culture *in*

Матеріал, захищений авторським правом

ников. В [16] показана трансформация их в культуре *in vitro* из КЭП с продукцией гистамина. Известно также, что ТК в организме синтезируют значительное количество ИЛ-4 [4]. Этот цитокин, помимо ингибиции реакций клеточного иммунитета, является медиатором аутокринной регуляции Тх2-клеток [17]. Следовательно, КЭП обладают еще одной возможностью вмешиваться в процесс ингибиции РТПХ-активности формируемых из алломиелотрансплантата антиген-реактивных Т-клеток. Ингибирующую активность в отношении последних могут проявлять и присутствующие среди КЭП естественные супрессоры (ЕС). Эти клетки фенотипически относятся к нулевым и характеризуются как $CD4^-CD8^-\alpha\beta^+$ или $CD4^-CD8^-\alpha\beta^-$ [22]. При разделении КМ в градиенте перколла эти клетки концентрируются во фракции с низкой плотностью. Обогащение ими аллогенного КМ снижает его РТПХ-активность, причем супрессорная активность ЕС не рестриктирована антигенными различиями по главному комплексу гистосовместимости. Клонирование ЕС *in vitro* сопровождается выработкой ими цитокина, ингибирующего секрецию ИЛ-2 в смешанной культуре лимфоцитов и функцию АПК [4]. Можно предположить, что речь идет об ИЛ-4 или ИЛ-10, продуцируемом Тх2-клетками или им подобными. Однако тот факт, что активность ЕС, выделенных из гемопоэтических органов после индукции хронической РТПХ, усиливается в системе *in vitro* под действием ИЛ-2, ИФ-γ [8], ингибиторов функции Тх2-клеток, свидетельствует о неидентичности этих двух популяций клеток. Более того, введение реципиентам с аллогенным КМ рекомбинантного ИЛ-2 сопровождалось снижением смертности животных с минимизацией признаков РТПХ [13]. Наибольшая концентрация ЕС отмечается в тканях с высокой гемопоэтической активностью и экспансией эритроидного и миелоидного ростка кроветворения [8], т.е. с характерными признаками эмбриональной печени [9]. Тот факт, что КЭП не проявляли высокой колониеобразующей активности, не свидетельствует о ее низкой гемопоэтической активности в целом. Кроветворные элементы КЭП относятся в основном к мультипотентным недифференцированным предшественникам [9], функциональный статус которых находится под контролем уникального цитокина — стволового клеточного фактора или фактора Стила [16]. Акцептором этого лиганда на мембране является c-kit-протоонкоген-рецептор. Оказалось, что в общем пуле КЭП $c\text{-}kit^+$-клеток в 3–5 раз больше, чем в КМ [16]. Способность формировать колонии в селезенке эти клетки приобретают только после прохождения ряда дифференцировочных этапов.

Рассматривая возможные механизмы взаимодействия КЭП с алломиелотрансплантатом и организмом реципиента в целом, необходимо принять во внимание некоторые биологические характеристики эмбриональных и опухолевых тканей. Одной из них является общность взаимодействия с субстратами иммунокомпетентной сферы организма. Например, в процессе сингенной беременности у мышей развивается иммунный ответ на некоторые опухолевые антигены, а у ИКК опухоленосителей — способность реагировать на эмбриональные антигены [5]. Отмечается также характерная для беременности и опухоленосительства супрессорная

vitro out of the ELC with production of histamine. It is known that MC synthesise a considerable amount of IL-4 within the organism [4]. This cytokine, beside inhibiting the responses of the cell immunity, is the mediator of the endocrine regulation of Tx2-cells [17]. Hence, the ELC possess yet another ability to intervene into the process of the GVHR inhibition-activity if the antigen-reactive T-cells, which are formed out of the allomyelograft. The inhibiting activity towards the latter may be demonstrated by the natural suppressors (NS), which are available among the ELC. These cells phenotypically belong to the zero type and are characterised as $CD4^-CD8^-\alpha\beta^+$ or $CD4^-CD8^-\alpha\beta^-$ [22]. Separation of the BM in the Percoll density gradient results in the concentration of these cells in the fraction with low density. Enrichment of the allogenic BM with these cells reduces its GVHR activity, and the suppressive activity of the NS was not restricted with the antigenic differences in the main complex of histocompatibility. Cloning of the NS *in vitro* is accompanied by production of cytokine by them, which inhibits secretion of IL-2 in the mixed culture of lymphocytes, and the APC function [4]. It may be supposed that IL-4 and IL-10 are thus concerned, which are produced by Tx2-cells or similar to them. However, the fact that the activity of the NS, isolated out of hematopoietic organs after induction of the chronic GVHR, is enhanced within the system *in vitro* under the action of IL-2, IP-γ [8], inhibitors of the Tx2-cell function, thus indicating non-identical natures of these two cell populations. Moreover, injection of the recipients with the allogenic BM of the recombinant IL-2 was accompanied by a reduction in the lethality rate of the animals with minimisation of the GVHR syndromes [13]. The highest concentration of the NS is reported in the tissues with high hematopoietic activities and expansion of the erythroid and myeloid growths of hematopoiesis [8], i.e. with characteristic features of the embryonic liver [9]. The fact that the ELC did not demonstrate high colony-forming activity, is not indicative of its low hematopoietic activity on the whole. The hematopoietic elements of the ELC relate, mainly, to multipotent non-differentiated progenitors [9], the functional status of which is controlled by a unique cytokine — stem cell factor or Steel factor [16]. The acceptor of this ligand on the membrane is a c-kit-protooncogene-receptor. It turned out that the amount of the $c\text{-}kit^+$-cells is by 3–5-fold higher in the total pool of the ELC cells as compared with the bone marrow [16]. These cells acquire the ability to form colonies in the spleen only after passing through several stages of differentiation.

When discussing possible of the ELC interaction with the allomyelograft and the recipient organism as a whole, certain biological characteristics of embryonic and tumour tissues should be taken into account. One of them is a common interaction with substrates of the immune competent sphere of the organism. For example, during syngenic pregnancy tan immune re-

Матеріал, захищений авторським правом

активность сыворотки крови в отношении клеточного иммунитета, что свидетельствует о циркуляции в ней "стимулируемых" обоими состояниями иммуносупрессивных медиаторов [5]. При исследовании функциональных характеристик ЕС у мышей с асцитной опухолью Эрлиха обнаружены повышенная их концентрация в селезенке и сниженная способность клеток селезенки и КМ пролиферировать *in vitro*. В [7] представлены результаты, свидетельствующие о подобной ингибиции ответа на митоген клеток селезенки интактных мышей через 5–8 сут после введения КЭП. Тестирование фенотипических характеристик ИКК таких мышей продемонстрировало перераспределение субпопуляционного состава Т-клеток практически во всех органах лимфомиелоидного комплекса с явно выраженной экспансией $Lyt2^+$ в селезенке. Наряду с этим, показано [8], что инкубация клеток селезенки с супернатантами ряда опухолей, включая гепатомы, генерирует появление супрессорных клеток с фенотипом MAC^+Ia^- $Thy1^-L3T4^-Lyt2^-$, ингибирующих митогениндуцированный бластогенез спленоцитов. Данный факт, по-видимому, указывает не только на синергизм действия биологически активных субстанций, продуцируемых опухолевыми и эмбриональными клетками, но и на некоторую специфику их активности.

Обобщая эти данные, есть все основания считать, что при введении КЭП совместно с аллогенным КМ ингибиция его РТПХ-активности может реализоваться каждым из указанных механизмов, а также при их совместной реализации.

Таким образом, приведенные результаты собственных исследований в контексте с данными литературы позволяют сделать следующие выводы.

1. КЭП несут в себе мощный гемато- и иммуномодулирующий потенциал, проявляющий активность, нерестриктированную внутривидовыми межлинейными антигенными различиями.

2. КЭП, введенные в дозах, не обладающих высокой колониеобразующей активностью в селезенке, стимулируют медуллярное кроветворение и селезеночное колониеобразование реципиентов сингенного КМ. Степень повышения выживаемости облученных реципиентов КМ под действием КЭП коррелирует со степенью стимуляции медуллярного кроветворения.

3. Введение КЭП с аллогенным КМ снижает иммунореактивность миелотрансплантата и повышает выживаемость облученных мышей-реципиентов.

4. В отношении аллогенного миелотрансплантата со сниженной иммунореактивностью после криоконсервирования КЭП проявляют двунаправленное действие: еще в большей степени снижают его РТПХ-активность и повышают гемопоэтический потенциал.

5. Установленное изменение состояния миелотрансплантата может быть результатом действия продуцируемых КЭП цитокинов с гемо- и иммунотропной активностью (АФП, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-11, медиаторы ЕС и др.)

sponse to some tumour antigens is developed in mice, and in the ICC tumour carriers – the ability to respond to embryonic antigens [5]. There is also reported a suppressive activity of the blood serum to wards cell immunity, characteristic of pregnancy and tumour carrying, thus indicating of the circulation in it of the immune-suppressing mediators, stimulated by both states [5]. When studying functional characteristics of the ELC in mice with Ehrlich ascytic carcinomas the authors found their increased concentrations in the spleen, and a reduced ability of the cells of the spleen and BM for proliferation *in vitro* . Earlier [7] it was reported on the similar inhibition of the response to the mitogene in the spleen cells of intact mice in 5–8 days after injection of the ELC. Testing of phenotypic characteristics of the ICC of these mice demonstrated re-distribution of the subpopulation composition of the T-cells nearly in all the organs of the lymphomyeloid complex with a strongly pronounced expansion of $Lyt2^+$ in the spleen. There was also reported [8] that incubation of the spleen cells with the supernatants of some tumours, including hepatomas, generated appearance of the suppressor cells with a $MAC^+Ia^-Thy^-L3T4^-Lyt2^-$ phenotype, which inhibited a mitogene-induced blastogenesis of splenocytes. This fact, apparently, testifies not only to the synergism of action of biologically active substances, produced by tumour and embryonic cells, but also to a certain specifics of their action.

Summing up the above it may be assumed that when injecting the ELC jointly with the allogenic BM the inhibition of its GVHR activity may be realised via every of the said mechanisms, as well as during their combined realisation.

Thus, the submitted results permit to conclude on the following.

1. The ELC carry powerful hemato- and immune-modulating potential, which manifest its activity without any limitation from the side of the intraspecies interlinear antigenic differences.

2. The ELC, injected in the doses, which do not possess high colony-forming activity in the spleen, stimulate medullary hematopoiesis and spleen colony-formation of the recipients of the syngenic BM. The extent of a rise in survival of the irradiated recipients of BM under the action of the ELC correlates with the extent of stimulation of medullary hematopoiesis.

3. Injection of the ELC with the allogenic BM reduces the activity of the myelograft and increases survival of the irradiated mice-recipients.

4. The ELC exercise dual action towards the allogenic myelograft with reduced immune reactivity following cryopreservation: they reduce its GVHR activity even stronger and increase hematopoietic potential.

5. The observed change in the state of the myelograft may be the result of action of the ELC-produced cytokines with hemato- and immune-tropic activities (AFP, IL-4, IL-6, IL-7, L-8, IL-10, IL-11, mediators of NS, etc.).

Матеріал, захищений авторським правом

ЛИТЕРАТУРА

1. *Абелев Г. И.* Альфа-фетопротеин: биология, биохимия, молекулярная генетика // Иммунология.– 1994.– № 3.– С. 4–10.
2. *Ашмарин И. П., Воробьев А. А.* Статистические методы в микробиологических исследованиях.– Л.: Медицина, 1972.– 180 с.
3. *Брондз Б. Д.* Т-лимфоциты и их рецепторы в иммунологическом распознавании.– М.: Наука, 1987.– 471 с.
4. *Возианов А. Ф., Бутенко А. К., Зак К. П.* Цитокины. Биологические и противоопухолевые свойства.– Киев: Наук. думка, 1998.– 316 с.
5. *Говалло В. И.* Иммунология репродукции.– М.: Медицина, 1987.– 303 с.
6. *Гольцев А. Н., Останкова Л. В., Луценко Е. Д. и др.* Функциональная активность криоконсервированных кроветворных клеток (КОЕс) в зависимости от компонентного состава миелотрансплантата // Пробл. криобиологии.– 1993.– № 4.– С. 34–39.
7. *Гольцев А. Н., Дубрава Т. Г., Луценко Е. Д. и др.* Поиск альтернативных криоконсервированию путей модификации иммунореактивности алломиелотрансплантата. Часть I // Пробл. криобиологии.– 1996.– № 4.– С. 3–15.
8. *Кусмарцев С. А., Бельский Ю. П.* Естественные супрессорные клетки // Успехи совр. биологии.– 1994.– 114, № 6.– С. 705–714.
9. *Семина О. В., Семенец Т. Н., Повереный А. М.* Механизмы лимфоидной регуляции и радиочувствительности системы кроветворения // Радиобиология.– 1992.– 32, Вып. 2.– С. 225–240.
10. *Симбирцев А. С., Пигарева Н. В., Кетлинский С. А. и др.* Изучение биологической активности рекомбинантного ИЛ-1 человека. Анализ лимфоцитактивирующих свойств // Иммунология.– 1990.– № 6.– С. 39–43.
11. *Чертков И. Л., Гуревич О. А.* Стволовая клетка и ее микроокружение.– М.: Медицина, 1984.– 234 с.
12. *Ширшев С. В.* Белки фетоплацентарного комплекса в регуляции иммунных реакций // Успехи совр. биологии.– 1993.– 113, № 2.– С. 230–247.
13. *Antin J. H., Ferrara J. L. M.* Cytokine dysregulation and acute graft-versus-host disease // Blood.– 1992.– 80, № 12.– P. 2964–2968.
14. *Du X. X., Willias D. A.* Interleukin-11. A multifunctional growth factor derived from the hemopoietic microenvironment // Blood.– 1994.– 83, № 8.– P. 2023–2030.
15. *Grzegorzewski K., Komsohies K. L., Franco J. L. et al.* Quantitative and cell cycle differences in progenitor cells mobilised by recombinant human interleukin-7 and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor // Blood.– 1996.– 88, № 11.– P. 4139–4149.
16. *Irani A.–M. A., Nilsson G., Miettinen U. Et al.* Recombinant human stem cell factor stimulates differentiation of mast cells from dispersed human fetal liver cells // Blood.– 1992.– 80, № 12.– P. 3009–3021.
17. *Krenger W., Ferrara J. L. M.* Graft-versus-host disease and the Th1/Th2 paradigm // Immunol. Res.– 1996.– 15, № 2.– P. 50–73.
18. *Kishimoto T., Akira S., Narasaki M.* Interleukin-6 family of cytokines and gp130 // Blood.– 1995.– 85, № 4.– P. 1243–1254.
19. *Kornbluuth M., You-Ten E., Desbarats J.* T-cell subsets in the thymus of GVH immunosuppressed mice // Transplantation.– 1991.– 51, № 1.– P. 262–267.
20. *Laterveer I., Liindley I. J. D., Hamilton M. S. et al.* Interleukin-8 induces rapid mobilisation of hemopoietic stem cells with radioprotective capacity and long-term myelolymphoid repopulating ability // Blood.– 1995.– 85, № 8.– P. 2259–2275.
21. *Plum J., Smedt M.* IL-7 is a critical growth factor in early human T-cell development // Blood.– 1996.– 88, № 11.– P. 4239–4245.
22. *Schmidt-Wolf I. G. H., Dejbakhsh-Jones S.* T-cell subsets and suppressor cells in human bone marrow // Blood.– 1992.– 80, № 12.– P. 3242–3250.
23. *Till J. E., McCulloch E. A.* A direct measurement of radiated sensitivity of normal mouse bone marrow cells // Radiated Res.– 1961.– 14, № 2.– P. 221–222.

Поступила 09.02.99

REFERENCES

1. *Abelev G. I.* Alpha-fetoprotein: biology, biochemistry, molecular genetics // Immunologiya.– 1994.– № 3.– P. 4–10.
2. *Ashmarin I. P., Vorobyov A. A.* Statistical methods of microbiological research.– L.: Meditsina publ., 1972.– 180 p.
3. *Brondz B. D.* T-lymphocytes and their receptors in the immunologic detection.– M.: Nauka publ., 1987.– 471 p.
4. *Vozianov A. F., Butenko A. K., Zak K. P.* Cytokines. Biological and antitumour properties.– Kiev: Naukova dumka publ., 1998.– 316 p.
5. *Govallo V. I.* Reproductive immunology.– M.: Meditsina publ., 1987.– 303 p.
6. *Goltsev A. N., Ostankova L. V., Lutsenko E. D. et al.* Functional activity of cryopreserved hematopoietic cells (CFUc) depending on the component composition of a myelograft // Probl. kriobiol.– 1993.– № 4.– P. 34–39).
7. *Goltsev A. N., Dubrava T. G., Lutsenko E. D. et al.* A search for the alternative to cryopreservation methods of modifying the immune reactivity of the allomyelograft. Part I // Probl. kriobiol.– 1996.– № 4.– P. 3–15.
8. *Kusmartsev S. A., Belsky Yu. P.* Natural suppressor cells // Uspekhi sovr. biologii.– 1994.– № 6.– P. 705–714.
9. *Semina O. V., Semenets T. N., Poverenuy A. M.* Mechanisms of lymphoid regulation and radiosusceptibility of the hematopoietic system // Radiobiologiya.– 1992.– 32, Issue 2.– P. 225–240.
10. *Simbirtsev A. S., Pigareva N. V., Ketlinsky S. A. et al.* A study of biological activity of human recombinant IL-1. Analysis of lymphocyte-activating properties // Immunologiya.– 1990.– № 6.– P. 39–43.
11. *Chertkov I. L., Gurevich O. A.* Stem cell and its microenvironment.– M.: Meditsina publ., 1984.– 234 p.
12. *Shirshev S. V.* Proteins of the fetoplacental complex in regulating the immune responses // Uspekhi sovr. biologii.– 1993.– 113, № 2.– P. 230–247.
13. *Antin J. H., Ferrara J. L. M.* Cytokine dysregulation and acute graft-versus-host disease // Blood.– 1992.– 80, № 12.– P. 2964–2968.
14. *Du X. X., Willias D. A.* Interleukin-11. A multifunctional growth factor derived from the hemopoietic microenvironment // Blood.– 1994.– 83, № 8.– P. 2023–2030.
15. *Grzegorzewski K., Komsohies K. L., Franco J. L. et al.* Quantitative and cell cycle differences in progenitor cells mobilised by recombinant human interleukin-7 and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor // Blood.– 1996.– 88, № 11.– P. 4139–4149.
16. *Irani A.–M. A., Nilsson G., Miettinen U. Et al.* Recombinant human stem cell factor stimulates differentiation of mast cells from dispersed human fetal liver cells // Blood.– 1992.– 80, № 12.– P. 3009–3021.
17. *Krenger W., Ferrara J. L. M.* Graft-versus-host disease and the Th1/Th2 paradigm // Immunol. Res.– 1996.– 15, № 2.– P. 50–73.
18. *Kishimoto T., Akira S., Narasaki M.* Interleukin-6 family of cytokines and gp130 // Blood.– 1995.– 85, № 4.– P. 1243–1254.
19. *Kornbluuth M., You-Ten E., Desbarats J.* T-cell subsets in the thymus of GVH immunosuppressed mice // Transplantation.– 1991.– 51, № 1.– P. 262–267.
20. *Laterveer I., Liindley I. J. D., Hamilton M. S. et al.* Interleukin-8 induces rapid mobilisation of hemopoietic stem cells with radioprotective capacity and long-term myelolymphoid repopulating ability // Blood.– 1995.– 85, № 8.– P. 2259–2275.
21. *Plum J., Smedt M.* IL-7 is a critical growth factor in early human T-cell development // Blood.– 1996.– 88, № 11.– P. 4239–4245.
22. *Schmidt-Wolf I. G. H., Dejbakhsh-Jones S.* T-cell subsets and suppressor cells in human bone marrow // Blood.– 1992.– 80, № 12.– P. 3242–3250.
23. *Till J. E., McCulloch E. A.* A direct measurement of radiated sensitivity of normal mouse bone marrow cells // Radiated Res.– 1961.– 14, № 2.– P. 221–222.

Accepted in 09.02.99

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 636.4.082:57.08

UDC 636.4.082:57.08

Некоторые биофизические свойства половых и эмбриональных клеток свиньи, определяющие их криорезистентность. II. Осмотический состав ранних эмбрионов (от зиготы до поздней морулы)

Н. Д. БЕЗУГЛЫЙ, А. В. КИСИЛЬ, А. Г. ТРОХИМЕНКО
Харьковский биотехнологический центр, пос. Кулиничи

Н. А. ГОРДИЕНКО
Харьковский государственный медицинский университет

К. Р. ЯНГС
Университет штата Айова, США

Biophysical Properties of Porcine Sex and Embryonic Cells, Determining their Cryoresistance. II. Osmotic Composition of Early Embryos (from Zygote to Late Morula)

N. D. BEZUGLY, A. V. KISIL, A. G. TROKHIMENKO
Kharkov Biotechnological Center, Kulinichi

N. A. GORDIENKO
Kharkov State Medical University

Curtis R. YOUNGS
Iowa State University

Определен осмотический состав эмбрионов свиньи ранних стадий развития. Изучены изменения количества осмотически активной воды и осмотически неактивных веществ на протяжении эмбриогенеза. Выяснено, что по осмотическому составу ранние эмбрионы свиньи достоверно не отличаются от эмбрионов других видов млекопитающих.

Визначено осмотичний склад ембріонів свині ранніх стадій розвитку. Вивчено зміни кількості осмотично активної води і осмотично неактивних речовин протягом ембріогенезу. Було показано, що за осмотичним складом ранні ембріони свині вірогідно не відрізняються від ембріонів інших видів ссавців.

The authors elaborated osmotic composition of porcine embryos at the early stages of development. The changes in the amount of the osmotically active water and osmotically inactive substances were studied during embryogenesis. It was found that early porcine embryos did not differ in the osmotic composition from the embryos of other mammalians.

Современные биотехнологии требуют создания криобанка пластических материалов на разных технологических этапах. Разработка эффективных методов низкотемпературной консервации возможна лишь на основе всестороннего анализа процессов, происходящих при охлаждении биологических объектов. Эти процессы связаны с осмотическими явлениями, наблюдаемыми на всех этапах криоконсервации.

Цель работы — дальнейшее исследование осмотических свойств репродуктивных клеток свиньи с использованием эмбрионов ранних стадий развития, которые получали хирургическим методом при промывании рогов матки.

Для исследования осмотической реакции нами были использованы гипертонические растворы

Up-to-date biotechnologies require organization of cryobanks of plastic materials at various technological stages. Development of the effective methods of low temperature preservation is possible only on the basis of a thorough analysis of the processes, occurring during cooling of biological systems. These processes relate to osmotic events, occurring at the stages of cryopreservation.

The aim of the given research was to further investigate the osmotic properties of porcine reproductive cells, using the embryos of the early stages of development, which were surgically collected during washing of the uterine horn.

To study the osmotic response the authors used hypertonic solutions of NaCl, and phosphate-saline Dulbecco buffer was applied as the isotonic solution.

Матеріал, захищений авторським правом

NaCl, в качестве изотонического раствора – фосфатно-солевой буфер Дюльбекко. По методу волюмометрии с помощью полуавтоматической установки для изучения осмотических особенностей яйцеклеток и эмбрионов млекопитающих фиксировалось изменение размеров объекта при погружении в исследуемый раствор. По записанным в базе данных ПЭВМ изображениям рассчитывался относительный клеточный объем, кинетика которого была основой определения осмотических параметров. Необходимые параметры определяли при сопоставлении экспериментальных и расчетных данных методом вариационного анализа. Результаты обрабатывали статистически по методу Стьюдента–Фишера. Для количественного определения искомых параметров использовали модель одиночной изолированной клетки как абсолютного осмометра [5].

На рис. 1 приведены экспериментальные данные относительного клеточного объема в гипертонических растворах. Эти данные соответствуют закону Вант-Гоффа в диапазоне изучаемых концентраций. Аналогичные результаты, полученные для эмбрионов свиньи других стадий развития, представлены в табл. 1.

Таблица 1

Некоторые осмотические параметры ранних эмбрионов свиньи

Стадия развития эмбриона	Относительный объем, %		
	осмотически неактивных веществ	свободной воды	растворенных веществ
Зигота	30,14*	69,11*	0,75*
Двуклеточная	27,81*	71,42*	0,77*
Четырехклеточная	33,05*	66,21*	0,72*
Восьмиклеточная	27,89*	71,31*	0,77*
Ранняя морула	24,37**	74,82**	0,81**
Компактная морула	19,0**	80,13**	0,87**

Примечания: *, ** — значения, достоверно не отличающиеся друг от друга; * — значения, отличающиеся с достоверностью не менее 0,95.

Относительный объем осмотически неактивных веществ уменьшается, а внутриклеточной воды увеличивается в процессе развития эмбрионов (рис. 2). Значение объема осмотически неактивных веществ изменяется от 20 до 31%. Количество осмотически активной воды колеблется от 69 до 80%, что находится на уровне количества осмотически активной воды в эмбрионах других видов млекопитающих. Так, для эмбрионов мыши эта величина равна 80, а для эмбрионов коров – 75% [2]. Растворенные осмотически активные вещества занимают около 1% относительного клеточного объема. Из всех полученных данных можно предположить, что состав ранних эмбрионов свиньи с точки зрения осмоса приблизительно такой же, как и эмбрионов изученных млекопитающих (коровы, мыши, кролика) [2, 6].

Объем сухой компоненты осмотически неактивных веществ складывается из объемов мембран

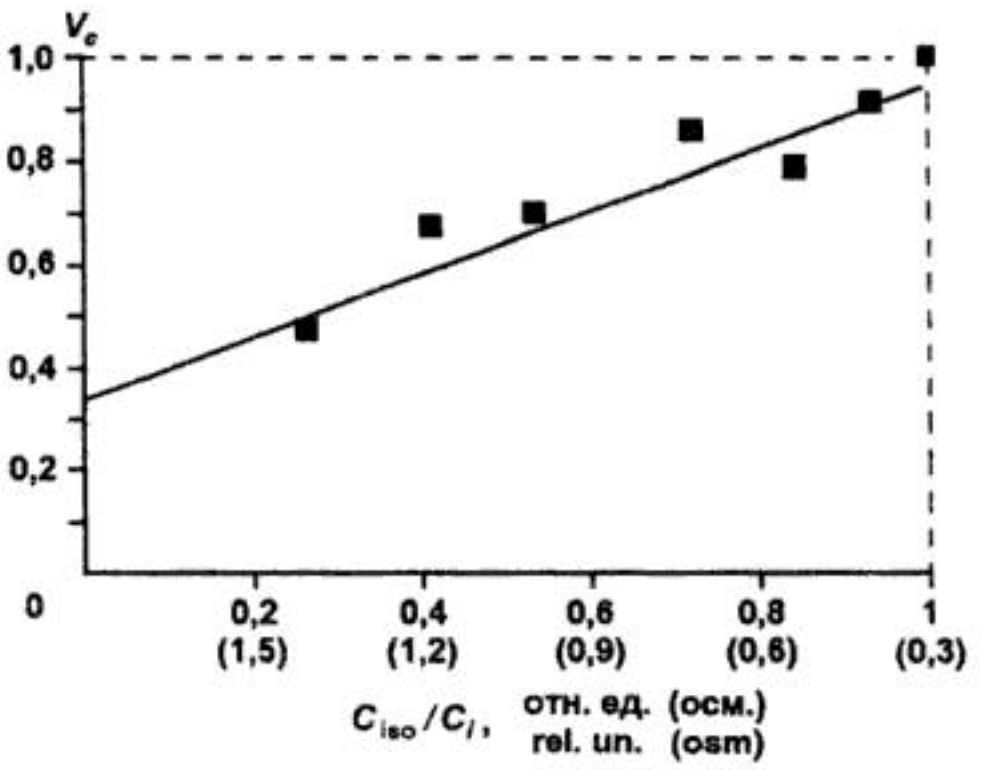


Рис. 1. Относительный объем четырехклеточных эмбрионов свиньи в различных гипертонических растворах NaCl: ■ – экспериментальные значения; —— – аппроксимация экспериментальных данных по методу наименьших квадратов.

Fig. 1. Relative volume of 4-cell porcine embryos in various NaCl hypertonic solutions; ■ – experimental values; ——— – approximation of experimental data using a method of least squares.

The changes in the dimensions of the system upon immersion into the studied solution were investigated with the method of volumetry using a semi-automatic stage for studying osmotic features of mammalian oocytes and embryos. The images, stored in the database of a personal computer, were used for calculating the relative cell volume, the kinetics of which was subsequently applied for elaboration the osmotic parameters. The required parameters were determined when conducting a comparative analysis of the experimental and rated data with a method of variation analysis. The results obtained were statistically processed with a Student–Fisher method. To quantitatively determine the required parameters a model of a single isolated cell was applied as an absolute osmometer [5].

Fig. 1 displays the experimental data on the relative cell volume in hypertonic solutions for 4-cell porcine embryos. These data correlate with a Vant-Goff law in the studied concentration range. Similar results, obtained with the porcine embryos at other stages of development, are submitted in Table 1.

Table 1

Osmotic parameters of early porcine embryos

Stage of embryo development	Relative volume of, %		
	osmotically inactive substances	free water	solutes
Zygote	30.14*	69.11*	0.75*
2-cell	27.81*	71.42*	0.77*
4-cell	33.05*	66.21*	0.72*
8-cell	27.89*	71.31*	0.77*
Early morula	24.37**	74.82**	0.81**
Compact morula	19.0**	80.13**	0.87**

Notes: * — the values do not significantly differ from each other; ** — the values differ with the significance of not less than 0.95.

Матеріал, захищений авторським правом

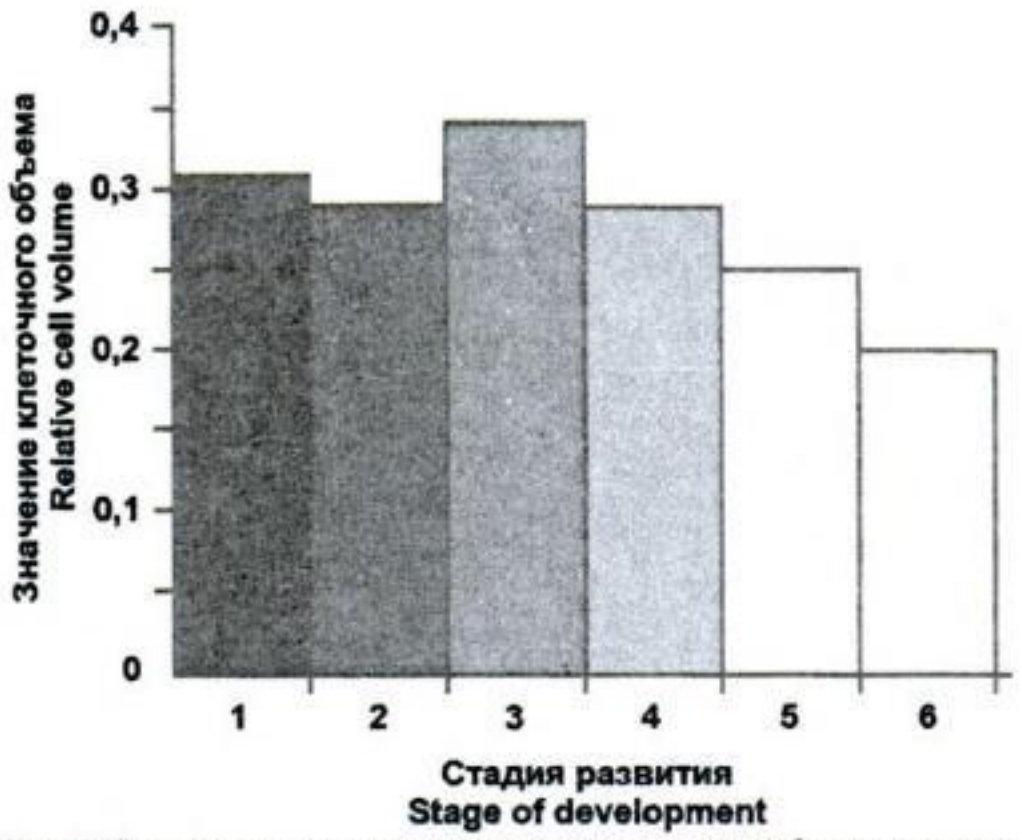


Рис. 2. Гистограмма изменения относительного объема осмотически неактивных веществ в ранних эмбрионах свиньи: 1 — зигота; 2 — двухклеточный эмбрион; 3 — четырехклеточный эмбрион; 4 — восьмиклеточный эмбрион; 5 — ранняя морула; 6 — морула.

Fig. 2. Histogram of changes in the relative volume of osmotically inactive substances in early porcine embryos: 1 — zygote; 2 — 2-cell embryo; 3 — 4-cell embryo; 4 — 8-cell embryo; 5 — early morula; 6 — morula.

внутриклеточных структур, питательных веществ, которые накоплены в яйцеклетке. Как было показано выше, относительное количество солей примерно одинаково (~0,01) на протяжении всего роста зародыша, потому что их концентрация в цитоплазме и внутриклеточной среде постоянна. Также известно, что на конечной стадии оогенеза и раннего эмбриогенеза эмбрионы развиваются за счет внутриклеточных запасов питательных пластических веществ. Гистограмма клеточных объемов (рис. 3) показывает уменьшение количества этих веществ после оплодотворения и дробления зародыша. Безусловно, уменьшение запаса питательных и пластичных материалов происходит за счет их использования для синтеза и построения структур развивающегося зародыша (цитоплазматических мембран бластомеров, внутриклеточных органелл и т.д.) и энергетического обеспечения развития эмбриона. Уменьшением количества осмотически неактивных веществ можно объяснить морфологические изменения во время эмбриогенеза: если на стадиях от одного до четырех бластомеров цитоплазма плотная, непрозрачная, то на стадии бластоцисты можно уже распознать внутреннее строение отдельных частей трофобласта. На стадии бластоцисты, когда количество внутриклеточных осмотически неактивных веществ меньше 10%, количество запасных веществ минимально и зародыш начинает использовать питательные вещества из внешней среды.

В ходе исследования было выявлено, что между клетками одной стадии развития имеются существенные отличия. Например, одни четырехклеточные эмбрионы имели 41% осмотически неактивных веществ, другие — 13 (табл. 2). Так как изучение индивидуальных особенностей эмбрионов свиньи

The relative volumes of the osmotically inactive substances are reduced, while the volumes of the intracellular water increase during embryo development (Fig. 2). The values of the volumes of the osmotically inactive substances changes from 20 to 31%. The amount of the osmotically active water is within the range of 69–80%, thus being at the level of the osmotically active water in the embryos of other species of mammals. For example, with murine embryos these values are about 80%, and for cattle embryos — 75% [2]. The osmotically active solutes occupy about 1% of the relative cell volume. The data thus obtained make it possible to assume that compositions of the early porcine embryos are osmotically similar to those of the previously studied mammals (cattle, mouse, rabbit) [2, 6].

The volume of the dry component of the osmotically substance consists of the volume of the membrane of the intracellular structures, nutritive substances, which are accumulated within the oocyte. As reported above, the relative amount of salts is nearly similar (~0.01) throughout the whole period of the embryo growth, since their concentration in the cytoplasm and intracellular medium is constant. It is known that embryos are developed during the finite stage of oogenesis and early embryo genesis due to the intracellular stores of nutritive plastic substances. The histogram of the cell volumes (Fig. 3) demonstrates a reduction in the amount of these substances following fertilization and cleavage of the embryo. Apparently, a reduction of the store of the nutritive and plastic materials occurs due to them being applied in the synthesis and assembly of structures of the developing embryo (blastomere cytoplasmic membranes, intracellular organelles, etc.) and energetic support of the embryo development. A reduction in the amount of

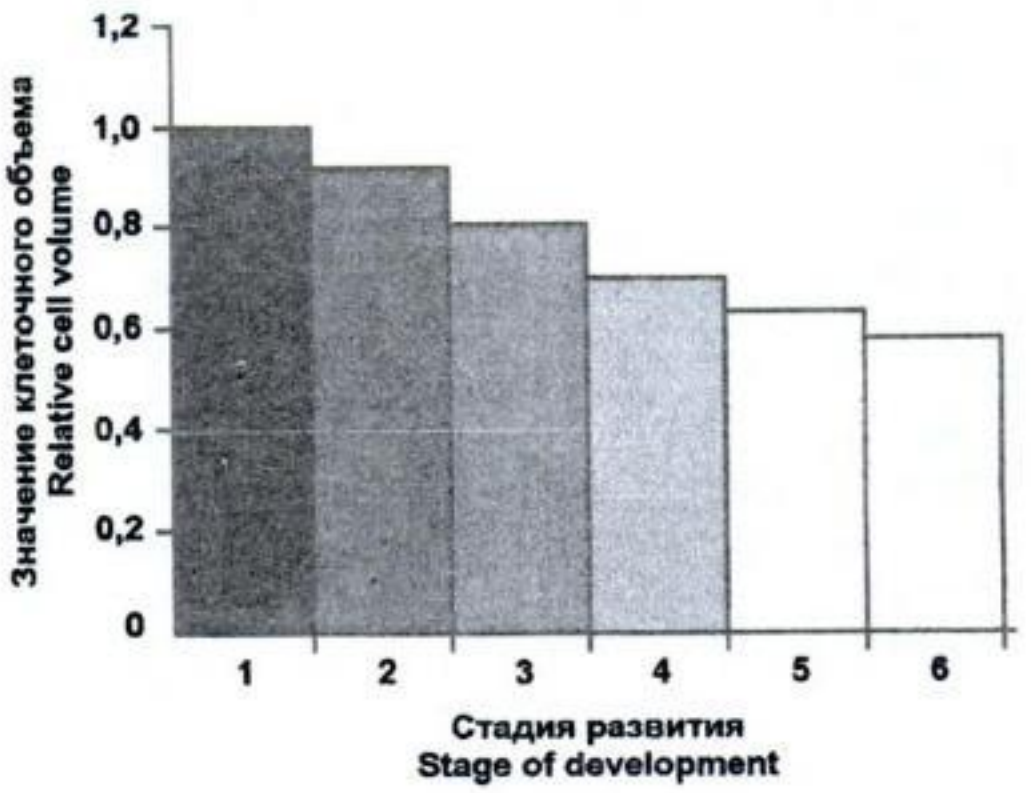


Рис. 3. Гистограмма значений клеточного объема ранних эмбрионов свиньи (по отношению к объему яйцеклеток): 1 — зигота; 2 — двухклеточный эмбрион; 3 — четырехклеточный эмбрион; 4 — восьмиклеточный эмбрион; 5 — ранняя морула; 6 — морула.

Fig. 3. Histogram of the values of the cell volumes of porcine early embryos (with respect to the oocyte volume): 1 — zygote; 2 — 2-cell embryo; 3 — 4-cell embryo; 4 — 8-cell embryo; 5 — early morula; 6 — morula.

Матеріал, захищений авторським правом

Таблица 2

Диапазон изменения объема осмотически неактивных веществ в ранних эмбрионах свиньи

Значение объема балласта	Стадия развития					
	зигота	двухклеточная	четырехклеточная	восьмиклеточная	ранняя морула	компактная морула
Минимальное	0,39	0,40	0,41	0,28	0,27	0,22
Максимальное	0,24	0,22	0,13	0,19	0,12	0,14

не было запланировано, а рассматривалась осмотическая реакция только в растворах семи концентраций (от 300 до 1200 мосм), достоверность различий между объемами осмотически неактивных веществ клеток одной стадии не была установлена. Но даже эти предварительные данные подтверждают вывод А. В. Квасницкого о разном качестве половых продуктов [4]. Так, эмбрион, объем запасных веществ которого составляет только 13% на начальной стадии развития, не может быть достаточно обеспечен необходимыми веществами для нормального роста, тогда как эмбрионы с количеством осмотически активных веществ 20–30% и выше будут иметь необходимые условия для дальнейшего развития. Возможно, это явление частично объясняет раннюю эмбриональную смертность у сельскохозяйственных животных, но этот вопрос требует дальнейшего детального изучения.

В данных исследованиях, в отличие от предыдущих [5], не было цели изучить геометрические характеристики эмбрионов. Но на одном, известном эмбриологам факте мы остановимся – уменьшении объема клеток на протяжении эмбриогенеза. Как показано на рис. 3, объем эмбриона уменьшается после каждого дробления. Уменьшение происходит во время деления бластомеров. Аналогичные результаты получили для эмбрионов мыши и кролика [3]. Какова причина этого явления? Теоретически можно рассмотреть несколько гипотез. Объем эмбриона является постоянным на протяжении одной и той же стадии развития. Таким образом, уменьшение объема связано с процессами дробления бластомеров. Принципиальным моментом дробления бластомеров есть процесс увеличения площади поверхности цитоплазматической мембраны. Несложные подсчеты показывают, что уменьшение клеточного объема связано с частичной потерей клеткой осмотически активной воды на протяжении дробления. Чтобы обеспечить одинаковую внутриклеточную концентрацию растворенных веществ на разных стадиях развития эмбриона, необходимо допустить, что часть растворенных внутриклеточных веществ "исчезает". Это может происходить по следующим причинам: 1) вещества выходят из клетки во время дробления; 2) используются для построения цитоплазматических и внутриклеточных мембран; 3) становятся осмотически неактивными. Каждая из этих точек зрения может быть корректной. Второе и третье предположения похожи, так как после использования растворенных веществ для постро-

the osmotically inactive substances may account for the morphological changes during embryogenesis: if at the stages of 1–4 blastomeres the cytoplasm is dense, opaque, then at the stages of the blastocyst the inner structures of separate parts of the trophoblast become evident. At the stage of the blastocyst, when the amount of the intracellular osmotically inactive substances is lower by 10%, the volume of reserved substances is minimum, and the embryo starts utilizing nutritive substances out of the environment.

The authors have found that the cells of one and the same stage of development greatly differ from each other. For example, some 4-cell embryos have 41% of the osmotically inactive substances, the other – 13% (Table 2). Since the authors did not intend to investigate the individual peculiarities of porcine embryos, while they studied the osmotic response only in the solutions of 7 concentrations (from 300 to 1200 mosm), the significance of the differences between the volumes of the osmotically inactive substances of a single stage was not elaborated. But even these preliminary data support the conclusion, made by A. V. Krasnitsky, on different quality of sex products [4]. For example, the embryo, the volume of reserve substances of which is only 13% at the initial stage of development, cannot be sufficiently provided with the substances required for its normal growth, while the embryos with the amount of the osmotically active substances of 20–30% and higher will have the necessary conditions for further development. It is likely that this event to some extent accounts for the early embryonic lethality in agricultural animals, but this problem requires further detailed investigation.

Table 2

Range of changes in the volumes of the osmotically inactive substances in the early porcine embryos

Volume of ballast	Stage of development					
	Zygote	2-cell	4-cell	8-cell	Early morula	Compact morula
Minimum	0.39	0.40	0.41	0.28	0.27	0.22
Maximum	0.24	0.22	0.13	0.19	0.12	0.14

In the given research, in contrast to the earlier conducted ones [5], the authors did not aim to investigate the geometrical characteristics of embryos. Though one fact should be stressed anyway – the embryologists know that the cell volume is reduced during embryogenesis. Fig. 3 shows that the volume of the embryo is reduces after every cleavage. This reduction occurs during cleavage of blastomeres. Similar results were obtained for rabbit and murine embryos [3]. What is the nature of this event? One may theoretically speculate on the following. The volume of the embryo is constant at one and the same stage of development. Thus, a reduction in the volume re-

Матеріал, захищений авторським правом

ения мембран они становятся осмотически неактивными. Из-за отсутствия физико-химических причин для инициирования выхода растворенных веществ из клеток наиболее реальная причина уменьшения объема — использование растворенных веществ для построения цитоплазматических мембран и внутриклеточных органелл бластомеров во время дробления. Но это утверждение можно рассматривать как гипотетическое.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Безуглий М. Д., Медведовський О. В.* Напівавтоматичний метод вивчення осмотичної реакції зародків та яйцеклітин ссавців // Тези доп. І Респ. конф. "Біотехнологічні дослідження і перспективи їх розвитку".– Львів.– 1990.– С. 6.
2. *Безуглый Н. Д.* Осмотическая реакция яйцеклеток и эмбрионов млекопитающих при криоконсервации // Автореф. дис. ... канд. биол. наук.– Харьков, 1984.– 18 с.
3. *Безуглый Н. Д.* Низкотемпературное консервирование как необходимый этап современных биотехнологий воспроизведения сельскохозяйственных животных // Зб. наук. праць Інституту тваринництва УААН. Вип. XXXVIII.– Харків, 1995.– С. 3–15.
4. *Квасницкий А. В., Мартыненко Н. А., Близнюченко А. Г.* Трансплантация эмбрионов и генетическая инженерия в животноводстве.– Киев: Урожай, 1988.– 264 с.
5. *Трохименко А. Г., Гордиенко Н. А., Безуглый Н. Д.* Некоторые биофизические свойства половых и эмбриональных клеток свиньи, определяющие их криорезистентность. I. Распределение осмотических и геометрических характеристик в популяции ооцитов и яйцеклеток // Пробл. криобиологии.– 1999.– № 4.– С. 14–20
6. *Leibo S. P.* Fundamental cryobiology of mouse ova and embryos // The freezing of mammalian embryos (Ciba Found. Symp.).– Amsterdam. Elsevier, 1977.– P. 69–94.

Поступила 03.03.99

lates to the processes of the blastomere cleavage. An important matter in the cleavage of blastomeres is the process of an increase in the surface area of the cytoplasmic membrane. Simple calculations demonstrate that a reduction in the cell volume relates to a partial loss of the osmotically active water by the cell during cleavage. To provide for the same intracellular concentration of solutes at various stages of the embryo development one should assume that some intracellular solutes "disappear". This may occur due to the following reasons: (i) the substances leave the cell during cleavage; (ii) they are utilized for assembly of the cytoplasmic and intracellular membranes; (iii) they become osmotically inactive. Each of these points of view may be correct. The second and the third assumptions are similar, since after the solutes have become involved into construction/assembly of membranes, they become inactive. Because of the absence of physical-chemical reasons for initiating the outflow of solutes out of the cell, the most probable cause for a reduction in the volume is the utilization of solutes for construction of the cytoplasmic membranes and intracellular organelles of the blastomeres during cleavage. Though this assumption may be viewed upon as purely hypothetical.

REFERENCES

1. *Bezugly M. D., Medvedovsky O. V.* Semi-automatic method of studying the osmotic response of embryos and oocytes of rats // Abstr. repts. I Rep. Conf. "Biotechnological Research and Prospects for Its development".– Lviv, 1990.– P. 6.
2. *Bezugly N. D.* Osmotic response of mammalian oocytes and embryos during cryopreservation: Abstr. Thesis Cand. Biol. Sci.– Kharkov, 1984.– 18 p.
3. *Bezugly N. D.* Low temperature preservation as a necessary stage of the up-to-date technologies of reproduction of agricultural animals // Collection Sci. Works Inst. Cattle-Breeding Ukr. Acad. Sci. Issue XXXVII.– Kharkiv, 1995.– P. 3–15.
4. *Kvasnitsky A. V., Martynenko N. A., Bliznyuchenko A. G.* Transplantation of embryos and genetic engineering in cattle breeding.– Kiev: Urozhay publ., 1988.– 264 p.
5. *Trokhimenko A. G., Gordienko N. A., Bezugly N. D.* Some biophysical properties of porcine sex and embryonic cells, which determine their cryoresistance. I. Distribution of osmotic and geometrical characteristics within the population of oocytes // Probl. kriobiol.– 1999.– № 4.– P. 14–20.
6. *Leibo S. P.* Fundamental cryobiology of mouse ova and embryos // The freezing of mammalian embryos (Ciba Found. Symp.).– Amsterdam: Elsevier, 1977.– P. 69–94.

Accepted in 03.03.99

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 577.112: 612.647: 57.043

UDC 577.112: 612.647: 57.043

Спектральные характеристики белковых фракций криоэкстрактов фетальных тканей

Н. П. СУББОТА, П. П. ПАШИНСКИЙ, Т. С. ДЮБКО, Е. Д. РОЗАНОВА
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Spectral Characteristics of Protein Fractions of Fetal Tissue Cryoextracts

N. P. SUBBOTA, P. P. PASHINSKY, T. S. DYUBKO, E. D. ROZANOVA
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Методами оптической спектроскопии (двухлучевая спектрофотометрия, метод флуоресцентных зондов с компьютерным анализом спектров), а также хроматографии определены качественный и количественный составы белков в различных фракциях криоэкстрактов, полученных из фетальных органов и тканей человека 8–12 недель гестации. Показано, что суммарное содержание белка в криоэкстрактах и его распределение во фракциях, полученных после хроматографического анализа, различно и более высокое в препарате КХ. При этом содержание высокомолекулярных белков в препаратах КП в 3 раза выше, чем в КХ. Препарат КХ имеет наибольшую белковую флуоресценцию. Исследованные образцы характеризуются преимущественно двумя составляющими, параметры неоднородного уширения которых соответствуют зонду, находящемуся в буфере, и зонду, сорбированному на белках.

Методами оптичної спектроскопії (двопроменева спектрофотометрія, метод флуоресцентних зондів з комп'ютерним аналізом спектрів), а також хроматографії визначено якісний і кількісний вміст білків у різних фракціях кріоекстрактів, одержаних із фетальних органів і тканин людини 8–12 тижнів гестації. Показано, що сумарний вміст білків у кріоекстрактах і його розподіл у фракціях, одержаних після хроматографічного аналізу, різний і більш високий у препараті КХ. При цьому вміст високомолекулярних білків у препаратах КП у 3 рази вище, ніж у КХ. Препарат КХ має найбільшу білкову флуоресценцію. Досліджені зразки характеризуються переважно двома складовими, параметри неоднорідного уширення яких відповідають зонду, що знаходиться у буфері, і зонду, сорбірованому на білках.

Using the methods of optical spectroscopy (two-beam spectrophotometry, method of fluorescent probes with a PC-aided analysis cf the spectra) and chromatography, the authors determined quantitative and qualitative compositions of proteins in various fractions of cryoextracts, harvested out of human fetal organs and tissues, aged 8–12 weeks of gestation. It was shown that summary content of the protein in cryoextracts and its distribution in the fractions, obtained after chromatographic analysis, is different, and it is higher in the CC preparation. The content of highly molecular proteins in the LC preparations is by 3-fold higher as compared with the CC. A CC preparation has the strongest protein fluorescence. The investigated samples are characterized by mainly two components, the parameters of heterogeneous widening of which correspond to the probe, staying in the buffer, and the probe, sorpted on proteins.

Получение новых эффективных лекарственных препаратов из естественного биосырья (фетальных органов и тканей) – одно из приоритетных направлений современной биотехнологии, биомедицины и фармакологии [5]. Сохранение в препаратах уникальных биологических свойств клеток и тканей ранних сроков развития предполагает их эффективность как иммунокорректоров, противоопухолевых и радиопротекторных препаратов, не оказывающих побочного действия.

Цель работы – исследовать качественный и количественный состав фетальных препаратов методами оптической спектроскопии.

В работе использовали криоэкстракты печени (КП), мозговой ткани (КМ) и хориона (КХ), полученные из фетальных органов и тканей человека в результате абортов ранних сроков гестации (8–12 недель) [4]. Для качественной оценки криоэкстрактов проводили хроматографический анализ с использованием сефадекса G-100 (колонка 30,0×2,0 см). Концентрацию белков рассчитывали по спектрам поглощения в ультрафиолетовой области [6]. Собственную флуоресценцию [1] препаратов измеряли при возбуждении светом с дли-

One of the priority trends in current biotechnology, biomedicine and pharmacology is collection of new effective medicinal preparations out of the natural raw material (fetal organs and tissues) [5]. Maintenance of unique biological properties of cells and tissues of the early stages of development in these ensures their efficiency as immune correctors, antitumor and radioprotective preparations, which do not exercise any side effects.

The aim of the given research was to investigate qualitative and quantitative compositions of fetal preparations using a method of optical spectroscopy.

Cryoextracts of the liver (LC), brain tissue (BC) and chorion (CC), collected from the human fetal organs and tissues due to early abortions (8–12 weeks of gestation) [4] were used in the research. Chromatographic analysis with a G-100 sefadex (30.0×2.0 cm column) was conducted for qualitative evaluation of cryoextracts. Protein concentrations were calculated by the absorption spectra within a ultraviolet range [6]. The intrinsic fluorescence [1] of the preparations was measured at excitation by light with wavelength of 280 and 296 nm (positions of the maximums of fluorescence of tyrosine and triptophane); the same

Матеріал, захищений авторським правом

ной волны 280 и 296 нм (положение максимумов флуоресценции тирозина и триптофана), а также регистрировали флуоресценцию потенциалзависимого зонда-катиона ДСМ: 4-(n-диметил-аминостирил)-1-метилпиридиний-N-толуолсульфонат "Zonde" (Латвия) [3]. Спектры флуоресценции ДСМ записывали на спектрофлуориметре "Signe-4M" при длине волны возбуждения 460 нм и ширине щелей возбуждения и испускания 5 нм. Конечная концентрация зонда в среде (0,9%-й NaCl) составляла 7 мкМ. Компьютерный анализ полученных спектров флуоресценции ДСМ производили на ЭВМ с помощью специально разработанной программы на языке Delphi [2]. При этом разложение спектра проводилось исходя из предположения о наличии двух типов связывания ДСМ с биологическим объектом [3].

Спектры флуоресценции ДСМ описывали уравнением:

$$S(\nu\,\{c_i,\nu_i^c,\sigma_i\}_n)=\sum_{i=1}^{n}\int_{-\infty}^{\infty}\frac{1}{\pi}\frac{\Gamma(\nu_s)}{(\nu-\nu_s)^2+\Gamma^2(\nu_s)}\times$$

$$\times\frac{\mu^2(\nu_s)k_ic}{\sqrt{2\pi\sigma}}\exp\left[-\frac{1}{2}\left(\frac{\nu_i^c-\nu_s}{\sigma_i}\right)^2\right]d\nu_s,$$

где n — число спектральных компонент, соответствующих различным формам зонда; ν_i^c и σ_i — параметры неоднородного уширения (центр и дисперсия) i-й компоненты, k_i — вклад i-й формы зонда в суммарный спектр; $\Gamma(\nu_s)$ — полуширина однородной лоренцевой линии перехода; $\mu^2(\nu_s)$ — вероятность распада возбужденного электронного состояния с излучением; c — нормировочный коэффициент; ν_s — частота перехода системы.

Статистическую обработку данных проводили по методу Фишера–Стьюдента.

Как видно из рис. 1, концентрация белка в препаратах фетальных тканей различна. Это относится как к его суммарному содержанию в криоэкстрактах, так и к содержанию в отдельных фракциях, полученных методом хроматографического анализа. Суммарное содержание белка (мг/мл) в препаратах составляло: КП — $0{,}39\pm0{,}01$; КМ — $0{,}74\pm0{,}004$; КХ — $1{,}2\pm0{,}08$. Препарат КХ содержит незначительное количество высокомолекулярных белков (около 15%). Основной максимум на хроматограмме показан для белков с молекулярной массой около 40 кД, что составляет ~40% от их общего количества. Имеется также максимум, относящийся к низкомолекулярным (4 кД и менее) белкам и пептидам (~2%).

В КП практически отсутствуют фракции белков с молекулярной массой менее 15 кД (8% от общего содержания). Для препарата характерно высокое содержание белков с молекулярной массой 150 кД и выше (~47%) и белков с молекулярной массой 50–60 кД (~38%). Таким образом, содержание высокомолекулярных белков в препарате КП в 3 раза выше, чем в КХ (47 и 15% соответственно).

Препарат КМ характеризуется высоким содержанием высокомолекулярных белков с молекулярной массой 150 кД (36%) и 100–70 кД (27%). Кроме того, имеется небольшой максимум в области молекуляр-

was done for the fluorescence of a potential-dependent DSM probe-cation: 4-(n-dimethyl-aminostyryl)-1-methyl pyridinium-N-tolyol sulfonate (Zonde, Latvia) [3]. Finite concentration of the probe in the medium (0.9%-NaCl) was 7 μM. A computer-aided analysis of the obtained DSM fluorescence spectra was done on a PC with a specially developed programme (in the Delphi language) [2]. Here the resolution of the spectrum was implemented proceeding from the assumption on the availability of two types of the DSM binding with the biological system [3].

The DSM fluorescence spectra were described by the equation:

$$S(\nu\,\{c_i,\nu_i^c,\sigma_i\}_n)=\sum_{i=1}^{n}\int_{-\infty}^{\infty}\frac{1}{\pi}\frac{\Gamma(\nu_s)}{(\nu-\nu_s)^2+\Gamma^2(\nu_s)}\times$$

$$\times\frac{\mu^2(\nu_s)k_ic}{\sqrt{2\pi\sigma}}\exp\left[-\frac{1}{2}\left(\frac{\nu_i^c-\nu_s}{\sigma_i}\right)^2\right]d\nu_s,$$

where n is a number of spectral components, corresponding to different forms of the probe; ν_i^c and σ_i are the parameters of the heterogeneous widening (center and dispersion) of the i-component; k_i is the contribution of the i-component into the summary spectrum; $\Gamma(\nu_s)$ is semiwidth of the homogeneous Lawrence transition line; $\mu^2(\nu_s)$ is the probability of the degradation of the excited emitting electronic state; c is a rated factor; ν_s is a frequency of the system transition.

The results obtained were statistically processed with a Student–Fisher method.

It follows from Fig. 1 that the concentrations of the protein in the fetal tissue preparations are different. This relates both to its summary content in the cryoextracts and to its content in separate fractions, obtained with a method of chromatographic analysis (Fig. 1). A summary content of the protein (mg/ml) in the preparations was as follows: LC — 0.39 ± 0.01; BC — 0.74 ± 0.004; CC — 1.2 ± 0.08.

A CC preparation contains an insignificant amount of the highly molecular proteins (about 15%). The major maximum in the chromatogram is shown for the proteins with the molecular masses of about 40 kD, which comprises approximately 40% of their total amount. The maximum is also available which belongs to the low molecular (4 kD and lower) proteins and peptides (about 2%).

Fractions of the proteins with molecular masses of less than 15 kD are nearly missing in the LC (8% from the total content). The preparation is characterized by a high content of the proteins with molecular masses of 150 kD and higher (about 47%) and proteins with molecular masses of 50–60 kD (about 38%). Thus, the content of the highly molecular proteins in the LC preparation is by 3-fold higher as compared with the CC (47 and 15%, respectively).

A BC preparation is characterized by a high content of highly molecular proteins with molecular masses of 150 kD (36%) and 100–700 kD. Besides, there is available a minor maximum within the range of molecular masses of 1,5 kD (4%), while proteins with lower molecular masses are practically missing.

To reveal qualitative distinguishing features of the preparations the preparations out of the fetal liver and

Матеріал, захищений авторським правом

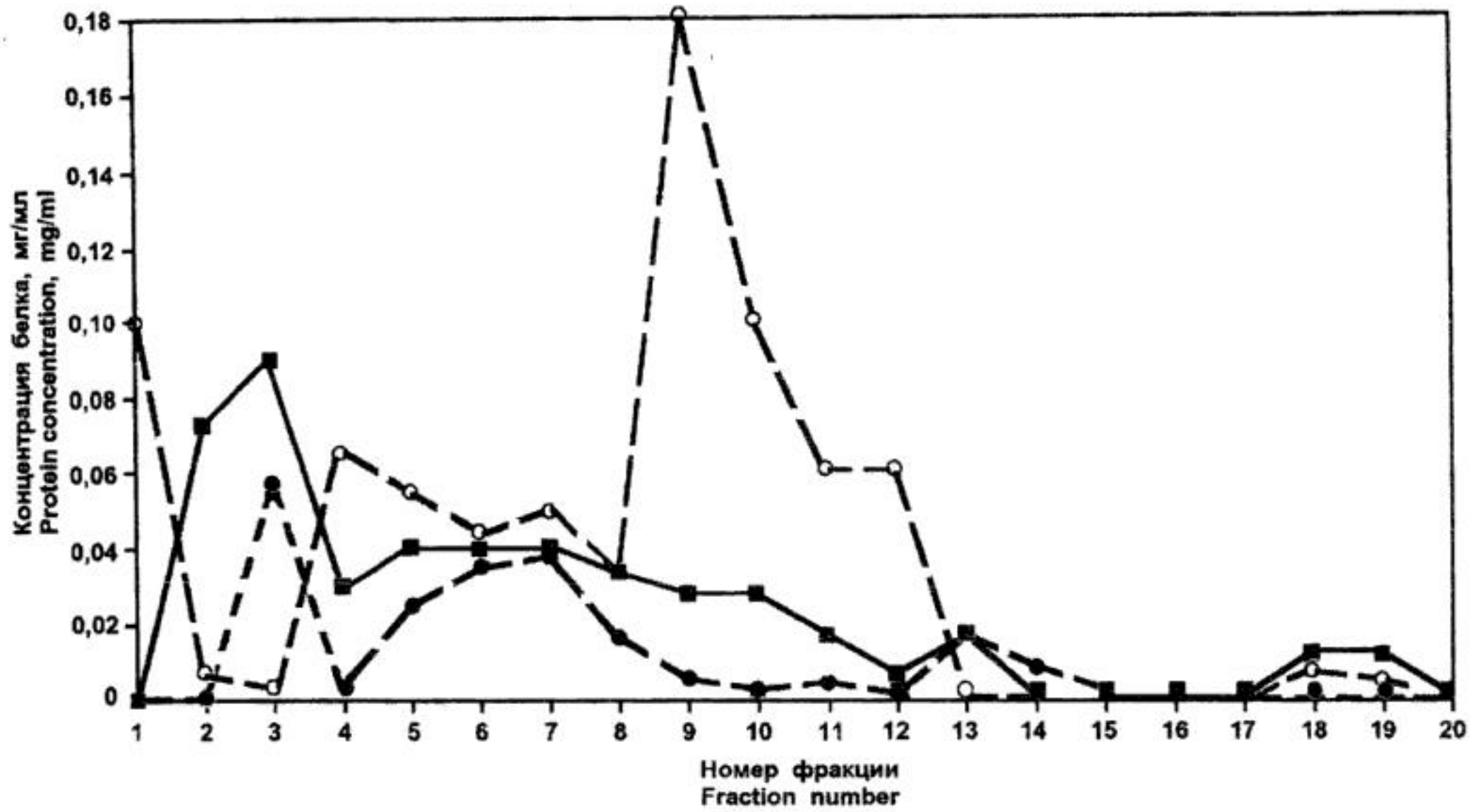


Рис. 1. Концентрация белка в различных фракциях фетальных препаратов: ■ – КМ; ● – КП; ○ – КХ.

Fig. 1. Concentrations of the protein in different fractions of fetal preparations: ■ – BC; ● – LC; ○ – CC.

ной массы 1,5 кД (4%), белки с меньшей молекулярной массой практически отсутствуют.

Для выяснения качественных особенностей препаратов в сравнительном аспекте были исследованы препараты из печени плода и хориона. При этом сравнивали белковые фракции, наиболее характерные для каждого образца.

Исследование собственной флуоресценции во фракциях криоэкстрактов показало, что их спектры в разных образцах различны. Например, при возбуждении на 280 нм в образце КХ белок возбуждается во фракциях 4, 7, 9 и 12 с максимумом в области 337 нм. Судя по спектрам собственной флуоресценции, наибольшее количество белка содержится во фракции 7 (рис. 2), а наименьшее — во фракции 9. Во фракциях 4 и 12 возбуждаются также полосы флуоресценции с максимумами в области 403 нм. Эта флуоресценция особенно выражена во фракции 4 при возбуждении светом с длиной волны 296 нм, что может быть связано с различным содержанием в исследованных препаратах продуктов перекисного окисления. В предварительных экспериментах, проведенных нами, показано, что содержание их в КХ значительно выше (приблизительно в 4 раза), чем в других препаратах.

В препарате КП белковая флуоресценция очень слабая. При возбуждении светом с длиной волны 280 нм ее удается возбудить во фракциях 3 и 5 (рис. 3). Во фракции 3 содержание белка несколько выше. Фракции 7 и 13 почти не содержат белка, однако в них возбуждается флуоресценция в области 375–450 нм, которая может иметь небелковую природу. При возбуждении светом с длиной волны 296 нм удается зарегистрировать сильную флуоресценцию только во фракции 3 с максимумом при 420 нм.

Таким образом, исследование собственной флуоресценции образцов КП и КХ показало, что наибольшей белковой флуоресценцией обладают

chorion were studied comparatively. Here the authors compared protein fractions, which are the most characteristic of every sample.

A study of the intrinsic fluorescence in the fractions of cryoextracts showed that their spectra differed in different samples. For example, with the excitation at 280 nm in a CC sample the protein is excited in the fractions of 4, 7, 9 and 12 with the maximum in the range of 337 nm. Judging by the spectra of the intrinsic fluorescence, the highest amount of the protein is found in fraction 7 (Fig. 2), and the lowest – in fraction 9. In fractions 4 and 12 the bands of fluorescence with the maximums in the range of 403 nm are also excited. This fluorescence is particularly pronounced in fraction 4

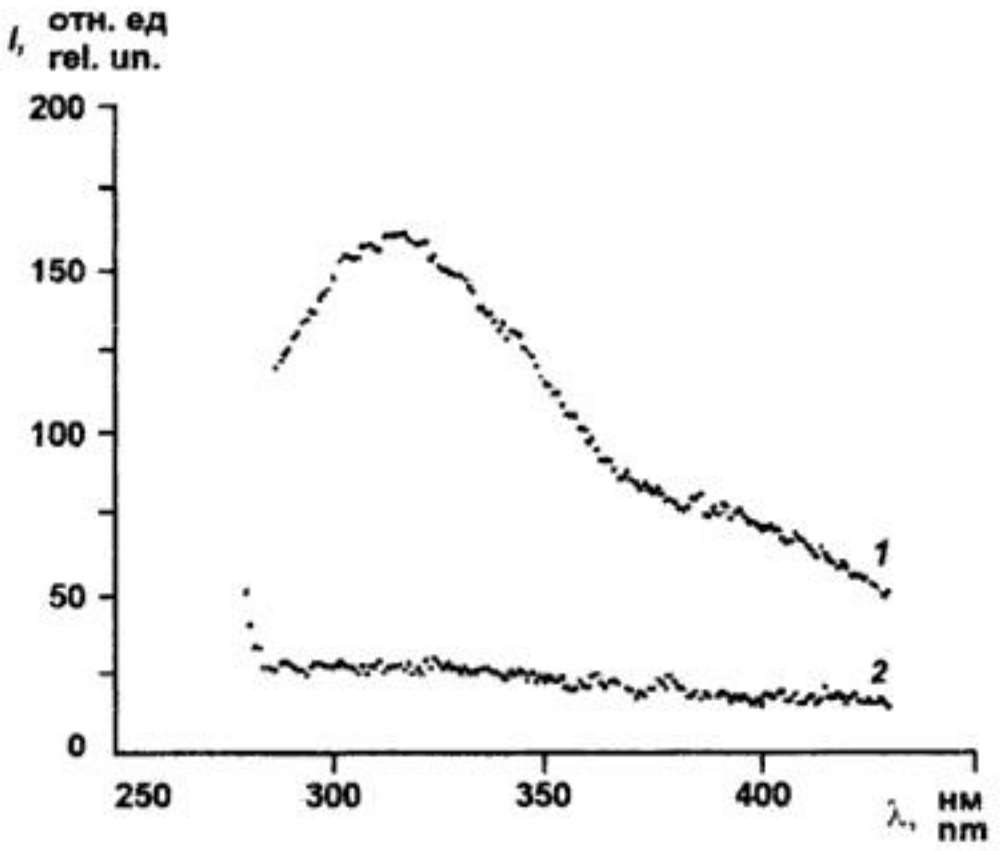


Рис. 2. Собственная флуоресценция в белковых фракциях 7 и 3 криоэкстрактов хориона (*1*) и печени (*2*) соответственно. $\lambda_{возб}$ = 280 нм.

Fig. 2. Intrinsic fluorescence in protein fractions 7 and 3 of the CC (*1*) and LC (*2*), respectively. λ_{excit} = 280 nm.

Матеріал, захищений авторським правом

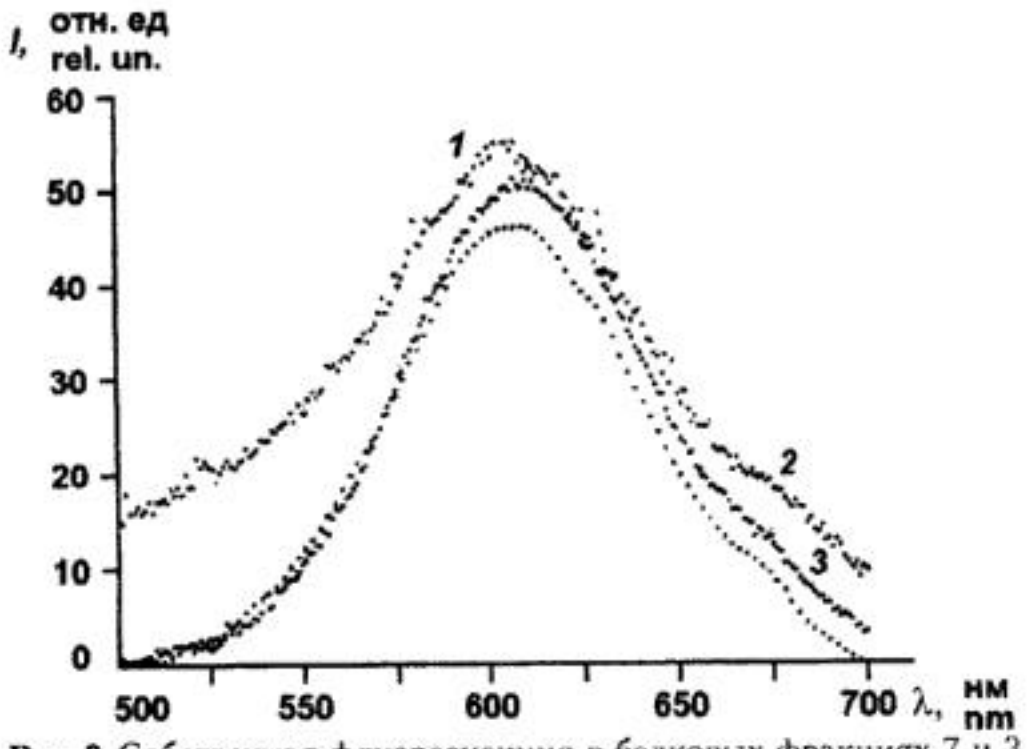


Рис. 3. Собственная флуоресценция в белковых фракциях 7 и 3 криоэкстрактов хориона (*1*), печени (*2*) и физрастворе (*3*). $\lambda_{возб}$ = 460 нм.

Fig. 3. DSM fluorescence spectra in protein fractions 7 and 3 of the CC (*1*), LC (*2*) and physiological saline (*3*). λ_{excit} = 460 nm.

образцы КХ, а наименьшей — образцы КП. Белковая флуоресценция в основном описывается полосами сходной формы с максимумами в области 333–342 нм. Кроме того, в ряде фракций дополнительно обнаруживается флуоресценция в области 403–420 нм, интенсивность которой возрастает при переходе к более длинноволновому возбуждению (296 нм). Природу этой флуоресценции предстоит выяснить.

Для получения дополнительных сведений о препаратах исследовали спектры флуоресценции потенциалзависимого зонда ДСМ, который, как известно [2, 3], при связывании с биологическими объектами может иметь, по крайней мере, два типа спектров, параметры которых (ν^c и σ) зависят от полярности и подвижности окружения вблизи мест связывания. Были исследованы суммарные препараты, а также фракции препаратов с высоким содержанием белка (табл. 1 и 2). Показано, что параметры спектров флуоресценции ДСМ в суммарных препаратах и в различных фракциях, выделенных из них, отличаются. В образцах КП $\lambda_{макс}$ спектров флуоресценции ДСМ находится в пределах 606–607,5 нм, интенсивность — в пределах 40,3–49,2 отн. ед.(табл. 1).

Для образцов КХ характерны спектры флуоресценции ДСМ, в которых $\lambda_{макс}$ находится в пределах 603–607 нм, интенсивность — в пределах 39,7–48,8 отн. ед.(табл. 2). Результаты анализа спектров флуоресценции ДСМ в растворах криоэкстрактов показали, что исследованные образцы характеризуются преимущественно двумя составляющими, параметры неоднородного уширения которых соответствуют зонду, находящемуся в буфере ($\nu^c = 16\,040$ см$^{-1}$ и $\sigma = 830$ см$^{-1}$), и зонду, сорбированному на белках ($\nu^c = 17\,450$ см$^{-1}$ и $\sigma = 860$ см$^{-1}$). Кроме того, во фракции 13 КП незначительное количество зонда (около 1%) сорбируется в более гидрофобных центрах сорбции ($\nu^c = 17\,890$ см$^{-1}$), что может отражать отличия в белковом составе фракции. Во фракции 7 КХ основная часть сорбированного на образце

during excitation with the light wavelength of 296 nm, which may be related to the varying contents of the lipid peroxidation products in the studied preparations. Preliminary experiments, conducted by the authors, showed that their content in the CC is much higher (approximately by 4-fold) as compared with other preparations.

In the LC preparation the protein fluorescence is very weak, since excitation with a light wavelength of 280 nm manages to initiate it in fractions 3 (Fig. 3) and 5. In fraction 3 the content of the protein is slightly higher. Fractions 7 and 13 do not practically contain any protein, however, fluorescence in the range of 375–450 nm is excited in them, which may be of a nonprotein origin. During excitation with a light wavelength of 296 nm the authors managed to register strong fluorescence only in fraction 3 with the maximum at 420 nm.

Thus, a study of the intrinsic fluorescence of the samples of CC and LC showed that the CC samples possessed the highest protein fluorescence, while the LC samples — the lowest. Basically, protein fluorescence is described with the bands of similar shapes with the maximums in the range of 333–342 nm. Besides, some fractions demonstrated auxiliary fluorescence in the range of 403–420 nm, the intensity of which increased upon transition to a shorter-wave excitation (296 nm). The nature of such a fluorescence still waits to be studied.

To obtain additional characteristic features of the preparations the authors studied fluorescence spectra of a DSM potential-dependent probe, which is known to possess at least two types of spectra during binding with biological systems [2, 3], the parameters of which (ν^c and σ) depend on the polarity and motility of environment of the binding sites. There were investigated summary preparations as well as fractions of the preparations with a high content of the protein (Tables 1 and 2).

The parameters of the DSM fluorescence spectra in summary preparations and in various fractions, isolated out of them, were shown to be different. In the LC samples the λ_{max} of the DSM fluorescence spectra was within the range of 606–607.5 nm, and the intensity was within the range of 40.3–49.2 relative units (Table 1).

The CC samples are characterized with such DSM fluorescence spectra, in which the λ_{max} is within the range of 603–607 nm, and the intensity — in the range of 39.7–48.8 rel. units (Table 2).

The results of analyzing the DSM fluorescence spectra in the solutions of cryoextracts showed that the studied samples are characterized, mainly, by two

Таблица 1

Параметры спектров флуоресценции ДСМ в КП ($n = 5–7$)

Table 1

Parameters of DSM fluorescence spectra in LC ($n = 5–7$)

Номер фракции Fraction number	$\lambda_{макс}$, нм λ_{max}, nm	$I_{макс}$, отн. ед. I_{max}, rel. units	ν^c, см$^{-1}$ ν^c, cm^{-1}	σ, см$^{-1}$ σ, cm^{-1}	k
3	606 ± 1,0	45,84 ± 1,38	17 450 ± 523,5	860 ± 25,5	0,04
5	607,5 ± 0,5	44,37 ± 1,33	17 450 ± 523,5	860 ± 18,1	0,05
7	606 ± 1,0	49,17 ± 1,48	17 450 ± 523,5	860 ± 19,0	0,05
13	606 ± 1,0	40,34 ± 1,21	17 450 ± 523,5	860 ± 19,0	0,05
			17 890 ± 536,7	860 ± 19,0	0,01

Матеріал, захищений авторським правом

Таблица 2

Параметры спектров флуоресценции ДСМ в КХ ($n = 5–7$)

Table 2

Parameters of DSM fluorescence spectra in CC ($n = 5–7$)

Номер фракции Fraction number	$\lambda_{макс}$, нм λ_{max}, nm	$I_{макс}$, отн. ед. I_{max}, rel. units	ν^c, $см^{-1}$ ν^c, cm^{-1}	σ, $см^{-1}$ σ, cm^{-1}	k
4	605 ± 1,0	39,73 ± 1,19	17 450 ± 520,5	860 ± 28,0	0,05
7	603 ± 1,0	47,65 ± 1,43	17 450 ± 520,5 17 890 ± 520,5	860 ± 27,2 860 ± 27,2	0,01 0,07
9	607 ± 1,0	41,18 ± 1,24	17 450 ± 520,5	860 ± 28,0	0,05
12	607 ± 1,0	48,83 ± 1,46	17 450 ± 520,5	860 ± 27,3	0,04

Примечание. Спектры перед обработкой сглаживались полиномом 50-й степени; перед определением значений максимумов интенсивности из спектров вычитался "фон".

Note: Prior to exposure the spectra were smoothed with a 50th degree polynom; prior to determining the values of the maximums of intensity from the spectra the "background" was subtracted.

зонда (7%) находится в более гидрофобном окружении. Найденные величины параметра ν^c (17 450 $см^{-1}$) близки к его значениям в водорастворимых белках [1]. В то же время существование второго типа центров сорбции, характеризующихся более гидрофобным значением параметра ν^c (17 890 $см^{-1}$), свидетельствует о существовании во фракциях 7 и 13 второго типа центров сорбции.

Таким образом, на основании проведенных исследований выявлено, что препараты, полученные из фетальных органов, отличаются как по качественному, так и по количественному составу, что необходимо принимать во внимание при оценке механизмов их биологического действия.

Примененный в работе комплексный подход, включающий хроматографический анализ, исследование собственной белковой флуоресценции и характеристику центров связывания зонда ДСМ с белками, позволил на основании полученных коррелирующих между собой результатов рекомендовать его использование при сертификации препаратов, выделенных из фетальных тканей.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е.* Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран.– М.: Наука, 1972.– 252 с.
2. *Горбенко Г. П., Нардид О. А., Дюбко Т. С.* Применение анализа неоднородного уширения спектров флуоресценции ДСМ для исследования структурных изменений модельных и природных мембран //Вісник ХДУ. Біофіз. вісник.– 1998, Вип. 1.– С. 86–95.
3. *Добрецов Г. Е., Дубур Г. Я., Морозова Г. И. и др.* Флуоресцирующий зонд 4-(n-диметил-аминостирил)-1-метилпиридиний: оптические свойства // Биофизика.– 1981.– 26, Вып. 2.– С. 377.
4. *Суббота Н. П., Грищенко В. И., Галоян А. Р. и др.* Получение, хранение и применение криоэкстрактов фетальных тканей человека // Метод. рекомендации.– Харьков, 1996.– 6 с.
5. *Суббота Н. П.* Перспективы создания нового класса лекарственных соединений на основе фетального сырья // Провизор.– 1999.– № 2.– С. 35–36.
6. *Harris D. A.* Spectrophotometric assays // Spectrophotometry and spectrofluorimetry.– Washington, IRL Press, 1987.– P. 49–90.

Поступила 25.10.99

components, the parameters of heterogeneous widening of which correspond to the probe, which stayed in the buffer ($\nu^c = 16\,040$ cm^{-1} and $\sigma = 830$ cm^{-1}), and the probe, adsorbed on the proteins ($\nu^c = 17\,450$ cm^{-1} and $\sigma = 860$ cm^{-1}).

Besides, in fraction 13 of the LC an insignificant amount of the probe (about 1%) is adsorbed in more hydrophobic centers of sorption ($\nu^c = 17\,890$ cm^{-1}, which may be indicative of the differences in the protein composition of the fraction. In fraction 7 of the CC the basic part of the probe, sorpted on the sample (7%), stays in a more hydrophobic environment. The observed values of the parameter ν^c (17 450 cm^{-1}) are close to its values in water-soluble proteins [1]. At the same time existence of the centers of sorption of the second type, which are characterized by a more hydrophobic value of the parameter ν^c (17 890 cm^{-1}), testifies to the availability of the centers of sorption of the second type in fractions 7 and 13.

Thus, on the basis of the investigations conducted it may be concluded that the preparations, harvested out of the fetal organs, differ in their qualitative and quantitative composition, which should certainly be taken into account when evaluating the mechanisms of their biological action.

A complex approach, applied in the given research, which involves chromatographic analysis, study of the intrinsic protein fluorescence and characteristics of the centers of binding of the DSM probe with proteins, and which yielded correlative results, made it possible to recommend the above method for certification of the preparations, isolated out of the fetal tissues.

REFERENCES

1. *Vladimirov Yu. A., Dobretsov G. E.* Fluorescent probes in the studies of biological membranes.– M.: Nauka publ., 1972.– 252 p.
2. *Gorbenko G. P., Nardid O. A., Dyubko T. S.* Using the analysis of heterogeneous widening of the DSM fluorescence spectra for investigating structural changes in model and natural membranes // Visnik KhDY. Biophys. Visnik.– 1998.– Issue 1.– P. 86–95.
3. *Dobretsov G. E., Dubur G. Ya., Morozova G. I. et al.* Fluorescent probe 4-(n-dimethyl-aminostyryl)-1-methyl pyridinium: optical properties // Biofizika.– 26, Issue 2.– P. 377 .
4. *Subbota N. P., Grischenko V. I., Galoyan A. R. et al.* Harvesting, storage and application of cryoextracts of human fetal tissues // Method. recommend.– Kharkov, 1996.– 6 p.
5. *Subbota N. P.* Prospects for developing new class of medicinal compounds on the basis of fetal raw materials // Provizor.– 1999.– № 2.– P. 35–36.
6. *Harris D. A.* Spectrophotometric assays // Spectrophotometry and spectrofluorimetry.– Washington, IRL Press, 1987.– P. 49–90.

Accepted in 25.10.99

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 577.112: 57.043

UDC 577.112: 57.043

Сравнительное микрокалориметрическое исследование плавления гемоглобина из донорской и кордовой крови до и после низкотемпературного воздействия

А. С. СОЛОВЬЕВА, А. В. ЗИНЧЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

A Comparative Microcalorimetric Study of Melting of Hemoglobin out of Donor and Cord Blood prior to and after Low Temperature Exposure

A. S. SOLOVYOVA, A. V. ZINCHENKO

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

Методом сканирующей микрокалориметрии исследован процесс тепловой денатурации молекулы гемоглобина из донорской и кордовой крови. Обнаружено, что гемоглобин из кордовой крови является менее термостабильным и более гетерогенным по составу по сравнению с гемоглобином из донорской крови. Рассчитанные параметры термоденатурации и проведенный анализ деконволюции кривых теплопоглощения для образцов гемоглобина свидетельствуют о том, что после действия низких температур конформационное состояние гемоглобина из донорской крови существенно не изменяется, тогда как некоторая часть молекулы гемоглобина из кордовой крови в этих условиях имеет тенденцию к компактизации.

Методом скануючої мікрокалориметрії досліджено процес теплової денатурації молекули гемоглобіну з донорської і кордової крові. Виявлено, що гемоглобін з кордової крові є менш термостабільним і більш гетерогенним за складом у порівнянні з гемоглобіном із донорської крові. Розраховані параметри термоденатурації і проведений аналіз деконволюції кривих теплопоглинання для зразків гемоглобіну свідчать про те, що після дії низьких температур конформаційний стан гемоглобіну з донорської крові суттєво не змінюється, тоді як деяка частина молекули гемоглобіну з кордової крові в цих умовах має тенденцію до компактизації.

A method of scanning microcalorimetry was used for studying the process of thermal denaturation of the hemoglobin molecule out of the donor and cord blood. A cord blood hemoglobin was found to possess lower thermal stability and higher heterogeneity if its composition as compared with a donor blood hemoglobin. The calculated parameters of thermal denaturation and the conducted analysis of deconvolution of the heat consumption curves for the samples of hemoglobin indicate that low temperature exposure does not significantly affect the conformational state of the donor blood hemoglobin, while the cord blood hemoglobin demonstrates a tendency towards compactization of a part of its molecule under these conditions.

Исследованиями [1, 2] было показано, что кордовая кровь человека (кровь из пупочного канатика) может быть применена в клинической практике [3], а для этого необходимо разработать эффективные технологии ее криоконсервирования. Особый интерес в подобных исследованиях вызывает изменение конформации белков эритроцитов кордовой крови, в частности гемоглобина (Hb), после низкотемпературного воздействия.

Цель исследования — сравнительный анализ процесса тепловой денатурации гемоглобина донорской и кордовой крови до и после охлаждения-нагрева методом сканирующей микрокалориметрии. Оксигемоглобин выделяли осмотическим лизисом эритроцитов, предварительно трижды отмытых изотоническим раствором NaCl, с последующим осаждением разрушенных клеточных мембран ультрацентрифугированием при 15 000*g* в течение 15 мин [4]. Концентрация гемоглобина в растворе контролировалась на спектрофотометре PYE Unicam 8000 на длине волны 576 нм, $\varepsilon = 15{,}37$ мМ/см

Recently it was reported [1, 2] that human cord blood (blood from the umbilical cord) may be applied in clinical practice [3], though such an application requires development of effective technologies of its cryopreservation. Of particular interest in these studies are the changes in the protein conformation of the cord blood red cells, hemoglobin (Hb), in particular, following low temperature exposure.

The aim of the given research was to conduct a comparative study of thermal denaturation of the donor and cord blood hemoglobin prior to and after cooling-heating with a method of scanning microcalorimetry. Oxyhemoglobin was isolated during osmotic lysis of red cells, thrice pre-washed by a NaCl isotonic solution with subsequent precipitation of the destroyed cell membranes by centrifugation at 15,000*g* for 15 min [4]. The concentration of hemoglobin in the solution was monitored with a PYE Unicam 800 spectrophotometer at a wavelength of 576 nm, $\varepsilon = 15.37$ mM/cm [5]. The concentration of hemoglobin in the calorimetric cell was 0.05–0.07 mM.

Calorimetric experiments in the given research were done with a DASM-4 (made in Russia) scanning calorimeter; the rate of scanning was 1 degree/min

Матеріал, захищений авторським правом

[5]. Концентрация гемоглобина в калориметрической ячейке составляла 0,05–0,07 мМ.

Калориметрические эксперименты в работе были выполнены на сканирующем микрокалориметре ДАСМ-4 (Пущино, Россия) при скорости сканирования 1 град/мин и избыточном давлении 2,5 атм. Параметры процесса термоденатурации рассчитывали, как описано в [6]. Процедуру деконволюции кривых теплопоглощения проводили с использованием пакета программ Peakfit.

На рис. 1 представлен вид кривых теплопоглощения гемоглобина из крови взрослого донора и кордовой крови до и после охлаждения-нагрева. Из рисунка видно, что кривые теплопоглощения гемоглобина из крови взрослого донора и кордовой крови значительно отличаются по виду, а процесс охлаждения-нагрева существенно не влияет на форму кривой в обоих случаях. Этот вывод также подтверждается характером изменений численных параметров процесса термоденатурации (температурой, энтальпией денатурации и избыточной теплоемкостью) для всех исследованных образцов (табл. 1). Приведенные данные позволяют заключить, что гемоглобин из кордовой крови менее термостабилен по сравнению с гемоглобином из донорской крови.

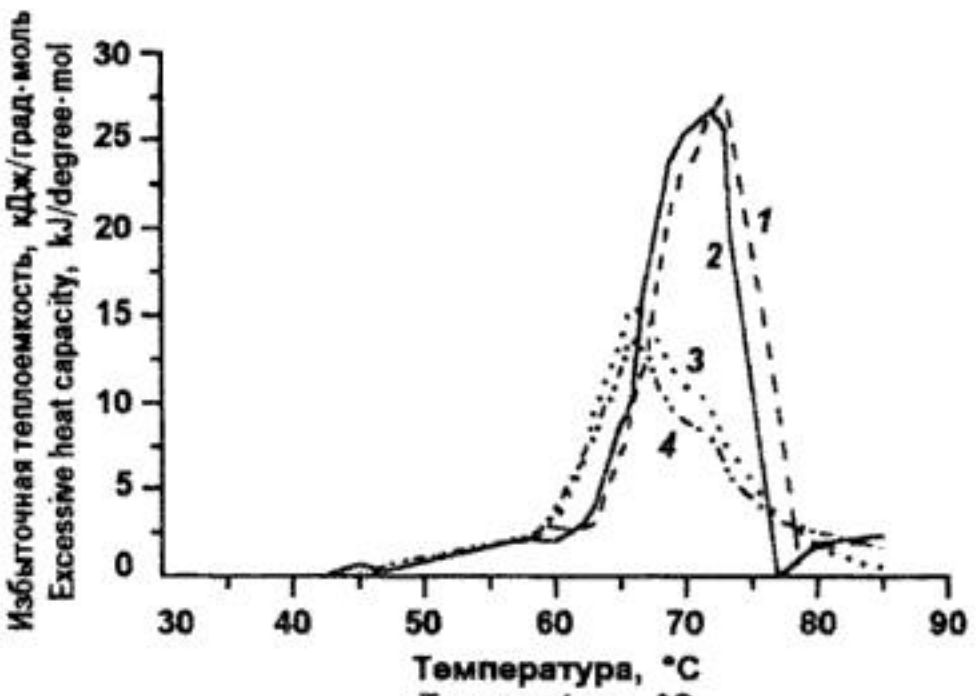


Рис. 1. Кривые теплопоглощения гемоглобина из донорской крови до (кривая *1*) и после охлаждения-нагрева (кривая *2*) и кордовой крови (кривые *3* и *4* соответственно).

Fig. 1. Curves of the heat consumption of hemoglobin out of the donor blood prior to (curve *1*) and after cooling-heating (curve *2*), and out of the cord blood (curves *3* and *4*, respectively).

Таблица 1

Параметры процесса термоденатурации гемоглобина из донорской и кордовой крови до и после охлаждения-нагрева

Образец гемоглобина		$T_{макс}$, °C	ΔH_{cal}, кДж/моль	$\Delta c_{p\,макс}$, кДж/моль·К
Донорская кровь	до охлаждения	72,7	238,0	28,5
	после охлаждения	72,2	183,4	26,7
Кордовая кровь	до охлаждения	66,7	135,5	15,33
	после охлаждения	66,4	125,9	13,58

Деконволюция кривых теплопоглощения для всех исследованных образцов гемоглобина показала следующее: процесс термоденатурации гемоглобина донорской крови в нативном состоянии может быть представлен в виде двух гауссовых составляющих с максимумами при температурах 71,3 и 74,5 °С, причем первая дает основной вклад (рис. 2).

Процесс охлаждения-нагрева до –196 °С приводит к незначительному сдвигу максимумов в сторону более низких температур, а соотношение площадей под гауссовыми кривыми между собой в целом сохраняется. Численные характеристики полученных гауссиан для исследованных в работе систем приведены в табл. 2. Низкотемпературное воздействие приводит к перераспределению численных характеристик гауссиан и, кроме того, имеется выраженная тенденция к снижению значений параметров после охлаждения.

and excessive pressure of 2.5 atm. The parameters of the process of thermal denaturation were calculated as described elsewhere [6]. A procedure of deconvolution of the heat consumption curves was implemented using a Peakfit software.

Fig. 1 shows the shapes of the heat consumption curves of the adult donor. It follows from Fig. 1 that the heat consumption curves of the adult donor and cord blood hemoglobin greatly differ in the shapes, while the process of cooling-heating does not significantly affect the shape of the curve in both cases. This conclusion is also supported by a nature of changes in the numerical parameters of the thermal denaturation process (temperature, denaturation enthalpy and heat capacity) for all the studied samples (see Table 1). The data submitted make it possible to conclude that hemoglobin out of the cord blood is less stable as compared with the donor blood hemoglobin.

Table 1

Parameters of the process of hemoglobin thermal denaturation out of donor and cord blood prior to and after cooling-heating

Hemoglobin sample		T_{max}, °C	ΔH_{cal}, kJ/mol	$\Delta c_{p\,max}$, kJ/mol·K
Donor blood	prior to cooling	72.7	238.0	28.5
	after cooling	72.2	183.4	26.7
Cord blood	prior to cooling	66.7	135.5	15.33
	after cooling	66.4	125.9	13.58

Deconvolution of the heat consumption curves for all the studies samples of hemoglobin revealed the following: the process of thermal denaturation of the donor blood hemoglobin in the native state may be represented by two Gaussian components with the maximums at the temperatures of 71.3 and 74.5 °C, while a major contribution is done by the first component (Fig. 2).

The process of cooling-heating down to –196 °C results in the insignificant shift of the maximums to-

Матеріал, захищений авторським правом

Таблица 2

Численные параметры гауссовых составляющих кривых теплопоглощения гемоглобина донорской и кордовой крови

Гауссиан	Амплитуда	Центр	Ширина	Площадь	Процент площади
Гемоглобин взрослого донора до охлаждения					
Первый	22,6	71,3	8,8	212,7	84,4
Второй	9,6	74,5	3,8	39,2	15,6
Гемоглобин взрослого донора после охлаждения до –196 °С					
Первый	18,7	69,4	6,6	131,6	72,7
Второй	14,2	73,3	3,7	49,6	27,3
Гемоглобин из кордовой крови до охлаждения					
Первый	15,1	66,5	7,9	126,1	77,7
Второй	3,6	71,8	3,4	13,2	8,1
Третий	3,8	74,8	5,7	23,1	14,2
Гемоглобин из кордовой крови после охлаждения до –196 °С					
Первый	12,2	66,2	8,4	109,1	83,6
Второй	3,5	72,8	3,7	13,8	10,6
Третий	1,4	77,0	5,1	7,6	5,8

Примечание: численные значения параметров приведены в условных единицах.

Table 2

Numeric parameters of the Gaussian components of the hemoglobin heat consumption curves of the donor and cord blood

Gaussians	Amplitude	Center	Width	Square area	Square area, portion
Adult donor hemoglobin prior to cooling					
First	22.6	71.3	8.8	212.7	84.4
Second	9.6	74.5	3.8	39.2	15.6
Adult donor hemoglobin after cooling down to –196 °C					
First	18.7	69.4	6.6	131.6	72.7
Second	14.2	73.3	3.7	49.6	27.3
Cord blood hemoglobin prior to cooling					
First	15.1	66.5	7.9	126.1	77.7
Second	3.6	71.8	3.4	13.2	8.1
Third	3.8	74.8	5.7	23.1	14.2
Cord blood hemoglobin after cooling down to –196 °C					
First	12.2	66.2	8.4	109.1	83.6
Second	3.5	72.8	3.7	13.8	10.6
Third	1.4	77.0	5.1	7.6	5.8

Note: numeric values of the parameters are given in conditional units.

Для гемоглобина из кордовой крови в нативном состоянии обнаружено три составляющих с максимумами при температурах 66,5, 71,8 и 74,8 °С. Две последних, по-видимому, соответствуют компонен-

wards lower temperatures, while the ratio of square areas under the Gaussian curves is maintained, on the whole. The numeric characteristics of the obtained Gaussians for the studied systems are submitted in

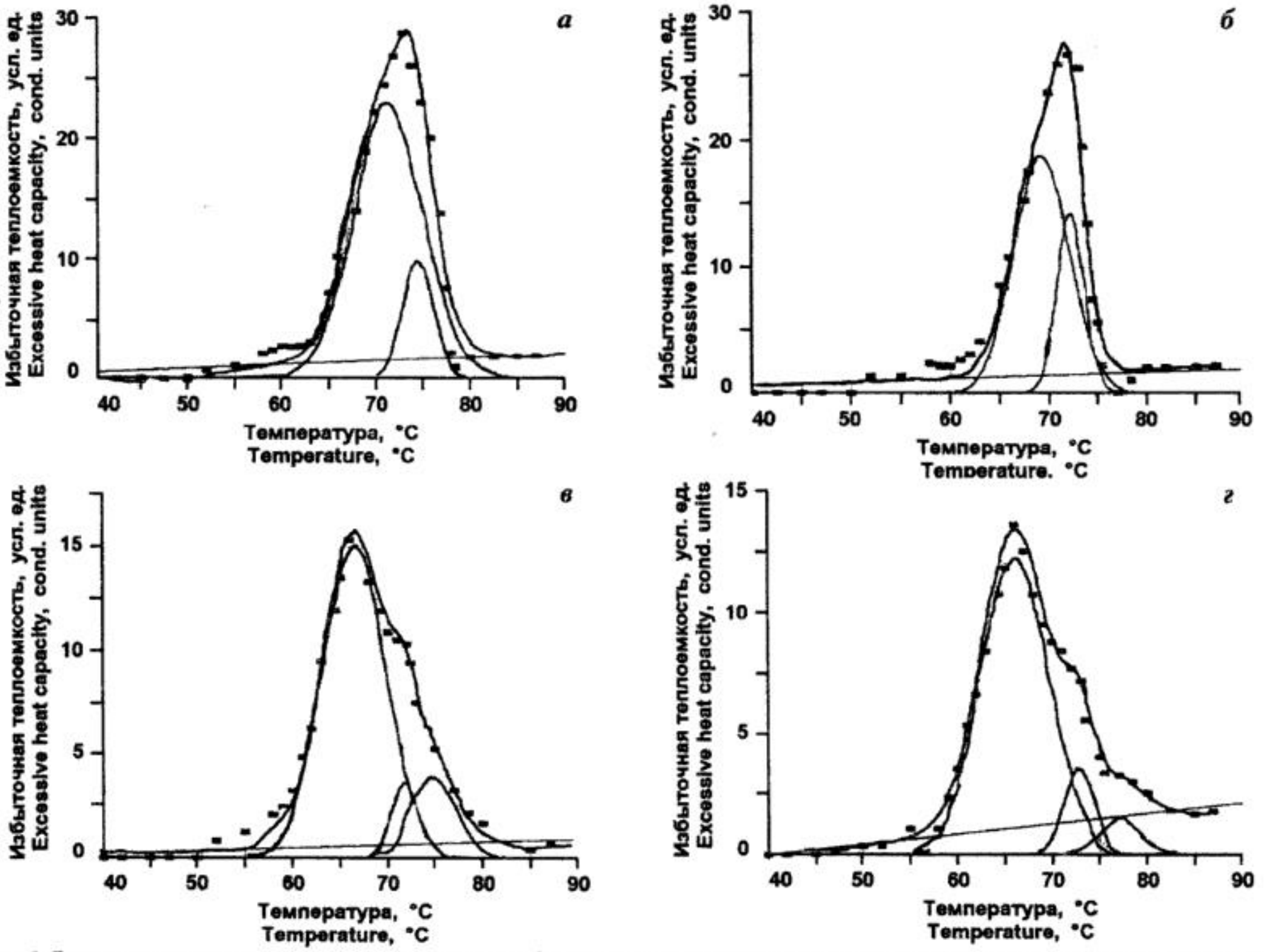


Рис. 2. Деконволюция кривых теплопоглощения гемоглобина из донорской крови до (*а*) и после (*б*) низкотемпературного воздействия и гемоглобина из кордовой крови (*в* и *г* соответственно).

Fig. 2. Deconvolution of the heat consumption curves of hemoglobin out of the donor blood prior to (*a*) and after (*б*) low temperature exposure, and of hemoglobin out of the cord blood (*в* and *г*, respectively).

Матеріал, захищений авторським правом

те, аналогичной гемоглобину из донорской крови, а наименее термостабильную часть интегральной кривой теплопоглощения составляет фетальный гемоглобин. Следует отметить, что низкотемпературное воздействие приводит к изменению характера третьей составляющей: его интенсивность резко уменьшается, а температура максимума сдвигается в сторону более высоких температур (77 °С, что может свидетельствовать о снижении энтропии в системе при данных условиях. Можно предположить, что после низкотемпературного воздействия происходит некоторая компактизация части полипептидных цепей гемоглобина. Что касается двух других, то существенных изменений после охлаждения не обнаружено. Вопрос о точной интерпретации рассчитанных составляющих окончательно не выяснен и требует дальнейшего исследования.

Таким образом, можно сделать заключение, что гемоглобин из кордовой крови обладает меньшей термостабильностью по сравнению с гемоглобином из донорской крови, о чем свидетельствуют значения параметров термоденатурации. Процесс охлаждения-нагрева приводит к снижению термостабильности молекулы гемоглобина как кордовой, так и донорской крови. Отличительной особенностью гемоглобина кордовой крови является большая гетерогенность образца.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Заводник И. Б., Пилецкая Т. П., Степуро И. И.* Аутоокисление и оксигенация гемоглобина человека // Молекулярная биология.– 1992.– 26, № 2.– С. 321–327.
2. *Broxmeyer H. E., Douglas G. W., Hangos G. et al.* Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 1989.– 86, № 10.– P. 3828–3832.
3. *Eraldo A., Mourizio B.* Hemoglobin and methemoglobin // The red blood cells.– Acad.Press, N.-Y., 1975.– V. 2.– P. 754–799.
4. *Issaragrisil S., Grilli G., Nothdurf W., Fliedner T. M.* Characterization of erythroid and granulocyte-monocyte progenitors in human cord blood // Scand. J. Haematol.– 1984.– 33, № 3.– P. 317–322.
5. *Privalov P. L., Khechinashvili N. N.* A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure. A calorimetric study // J. Mol. Biol.– 1974.– 86, № 3.– P. 665–684.
6. *Rubinstein P., Dobrila L., Rosenfield R.E. et al.* Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 1995.– 92, № 22.– P. 10119–10122.

Поступила 20.04.99

Table 2. Low temperature exposure results in the redistribution of the numeric characteristics of the Gaussians and, moreover, there persists a clear tendency towards reducing the values of the parameters after cooling.

The cord blood hemoglobin in the native state possesses three components with the maximums at the temperatures of 66.5, 71.8 and 74.8 °C. The latter two, apparently, correspond to the component, which is similar to the donor blood hemoglobin, while fetal hemoglobin comprises a part of the integral curve with lowest thermal stability. It should be noted that low temperature exposure results in the change in the nature of the third component: its intensity decreases rapidly, while the temperature of the maximum is shifted towards higher temperatures (77 °C), which may be indicative on the reduction in the entropy within the system under the given conditions. It may be supposed that low temperature exposure results in the compactization of some polypeptide chains of hemoglobin. As far as the rest two are concerned, no significant changes were observed after cooling. The problem of clear interpretation of the calculated components still waits to be solved and requires further studies.

Thus, it may be concluded that hemoglobin of the cord blood possesses lower thermal stability as compared with the donor blood hemoglobin, which is indicated by corresponding values of the parameters of thermal denaturation. The process cooling-heating reduces thermal stability of the hemoglobin molecule of both cord and donor blood. A distinguishing feature of the cord blood hemoglobin is its high heterogeneity.

REFERENCES

1. *Zavodnik I. B., Piletskaya T. P., Stepuro I. I.* Autooxidation and oxygenation of human hemoglobin // Molekulyarnaya biologiya.– 1992.– 26, № 2.– P. 321–327.
2. *Broxmeyer H. E., Douglas G. W., Hangos G. et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 1989.– 86, № 10.– P. 3828–3832.*
3. *Eraldo A., Mourizio B.* Hemoglobin and methemoglobin // The red blood cells.– Acad.Press, N.-Y., 1975.– V. 2.– P. 754–799.
4. *Issaragrisil S., Grilli G., Nothdurf W., Fliedner T. M.* Characterization of erythroid and granulocyte-monocyte progenitors in human cord blood // Scand. J. Haematol.– 1984.– 33, № 3.– P. 317–322.
5. *Privalov P. L., Khechinashvili N. N.* A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure. A calorimetric study // J. Mol. Biol.– 1974.– 86, № 3.– P. 665–684.
6. *Rubinstein P., Dobrila L., Rosenfield R.E. et al.* Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 1995.– 92, № 22.– P. 10119–10122.

Accepted in 20.04.99

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 612.592: 612.821.8: 577.175.523

UDC 612.592: 612.821.8: 577.175.523

Влияние ритмического охлаждения на проницаемость гематоэнцефалического барьера для экзогенного норадреналина

В. С. МАРЧЕНКО, Л. В. ПОЛИЩУК, В. Г. БАБИЙЧУК

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Action of Rhythmic Cooling on Permeability of Blood-Brain Barrier to Exogenous Norepinephrine

V. S. MARCHENKO, L. V. POLISCHUK, V. G. BABIYCHUK

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

Изучено влияние ритмических холодовых воздействий (РХВ) с частотой 0,1–0,2 Гц на проницаемость гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) для норадреналина (НА). Показано, что для ГЭБ как структурно-функциональной основы медленной управляющей системы мозга характерны резонансные явления в секундном диапазоне частот. Повышение проницаемости ГЭБ приводит к смене знака хронотропного эффекта НА синхронно частоте холодового воздействия.

Вивчено вплив ритмічних холодових дій (РХД) з частотою 0,1–0,2 Гц на проникність гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ) для норадреналіну (НА). Показано, що для ГЕБ як структурно-функціональної основи повільної керуючої системи мозку характерні резонансні явища в секундному діапазоні частот. Підвищення проникності ГЕБ приводить до зміни знаку хронотропного ефекту НА синхронно частоті холодового впливу.

The authors studied the action of rhythmic cold exposures (RCE) with the frequencies of 0.1-0.2 Hz on the permeability of the blood-brain barrier (BBB) to norepinephrine (NE). they found that the BBB as a structure-functional basis of the slow controlling system of the brain is characterized by resonance events in the seconds' range of frequencies. A rise in the BBB permeability results in changing the sign of the NE chronotropic effect in a manner synchronous to the frequency of the cold exposure.

В реакциях живых организмов на действие экстремальных факторов и в том числе холода большое значение имеет гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) как один из основных звеньев в центральных механизмах гомеостаза [5] и сверхмедленной управляющей системы мозга [1], роль которой состоит главным образом в наделении биологической значимостью экстремального воздействия на организм и в создании определенного функционального состояния мозга, отражающего его переход на иной уровень функционирования. Трансляция информационного содержания раздражителя в определенные системы организма приводит к адекватному реагированию на него в виде компенсаторных, регуляторных и адаптивных реакций. ГЭБ, который является пограничной структурой, ограждающей мозг от циркулирующих в крови нейроактивных и других веществ, принадлежит, вероятно, существенная роль в реализации этого процесса.

Существуют определенные закономерности в изменении резистентности ГЭБ для различных биологически активных веществ и в сдвигах пространственно-временной организации сверхмедленных колебаний ζ-потенциала мозга при некоторых способах гипотермии [2].

Цель работы — изучение действия ритмических холодовых воздействий на проницаемость ГЭБ для терморегуляторно-компетентного нейромедиатора — норадреналина. РХВ с частотой 0,1 и 0,2 Гц

In responses of living organisms to the action of extreme factors, cold exposure including, of special importance is the blood-brain barrier (BBB) as one of the basic links of the central mechanisms of homeostasis [5] and supraslow controlling system of the brain [1], the role of which is mainly to apply biological importance to extreme exposures of the organism and to create a particular functional state of the brain, which reflects its transition to another level of functioning. Translation of the information content of the stimulus into particular systems of the organism triggers adequate response to it in the form of compensatory, regulatory and adaptive reactions. The BBB, which is a boundary structure, protecting the brain from circulating neuroactive and other substances, probably plays an important role in realization of this process.

There are certain rules in the changes in the BBB resistance to various biologically active substances, and in the shifts of spatial-time course organization of supraslow oscillations of the brain ζ-potential during some hypothermic exposures [2].

The aim of the given research was to investigate the action of rhythmic cold exposures on the BBB permeability to a thermoregulatory-competent neuromediator — norepinephrine. The RCE with the frequencies of 0.1 and 0.2 Hz were applied to caudal receptors by immersing distal two-thirds of the rat tail into iced water (duration of exposure was 1–1.2 sec,

Матеріал, захищений авторським правом

наносили на каудальные терморецепторы путем погружения дистальных 2/3 хвоста крысы в ледяную воду (длительность воздействия 1–1,2 с, температура 0–4 °С) в автоматическом режиме. Установка включала электрогенератор, подключенный к планшетному потенциометру, у которого каретка с пером была заменена на охлаждающее устройство – контейнер с ледяной водой, соединенный системой сообщающихся сосудов с камерой для локальной гипотермии животных. Критерием проницаемости ГЭБ для экзогенного НА служило обнаружение его центрального отрицательного хронотропного эффекта на частоту сердечных сокращений (ЧСС). НА вводили на разных этапах с начала РХВ.

Контрольные исследования показали, что при РХВ в течение 2 ч происходит плавное снижение ЧСС (рис. 1), начиная с 30–40-й минуты, и к 120-й минуте с начала РХВ составляет приблизительно 70% от исходной. Существует также определенная зависимость от температуры холодового агента. При этом снижается и ректальная температура (ядра тела), хотя у опытных крыс иногда отмечалось повышение ее в процессе РХВ. По-видимому, это зависит от индивидуальной чувствительности животных к наркозу, который в оптимальном случае (что и было у большинства) частично подавляет реакции терморегуляции. У контрольных крыс, которые подвергались внутрибрюшинным инъекциям НА в эутермных условиях, в 100% случаев обнаруживалось увеличение ЧСС в среднем на 15% (рис. 2).

В ходе экспериментов было установлено, что при РХВ с частотой 0,1 Гц отмечается центральный эффект на ЧСС системно введенного НА на 10-, 55–65- и 110–120-й минутах с начала РХВ, т.е. в эти промежутки времени экзогенный НА не повышает, а снижает ЧСС на 25 ± 4, 30 ± 5, $29 \pm 5\%$ соответственно (рис. 2, табл. 1). Ранее проведенные эксперименты [3, 8] с использованием меченых

temperature was 0–4 °C) in the automatic mode. The device consisted of an electrical generator, supplied to a drawing-board potentiometer, in which a carriage with a pen was replaced with a cooling chamber – container with iced water, connected via a system of corresponding vessels to a chamber for local hypothermic treatment of animals. A criterion of the BBB permeability to exogenous NE was the identification of its central negative chronotropic effect on the heart rate (HR). Norepinephrine was injected at different stages from the beginning of the RCE.

Control studies showed that during a 2-hour RCE the HR is smoothly reduced (Fig. 1) starting from the 30-40th min, and by the 120th min from the start of the RCE it comprises approximately 70% from the original value. There also exists a certain dependence on the temperature of the cooling agent. Here the rectal temperature (bulk of the body) is also reduced, though the experimental animals sometimes demonstrated a rise in it in the process of the RCE. Apparently, this depends on the individual susceptibility of animals to anaesthesia, which in the optimal case (as with most animals) partially suppresses thermoregulatory responses. In control rats, who were exposed to intraperitoneal injections of NE under euthermic conditions, the HR increased by 15% in 100% of cases (Fig. 2).

In the course of experiments it was found that during the RCE with a frequency of 0.1 Hz a systemically injected NE exercises a central effect on the HR at the 10, 55, 65th and 110–120th min from the start of the RCE, i.e. during these periods of time exogenous NE does not increase but reduce the HR instead, by 25 ± 4, 30 ± 5, and $29 \pm 5\%$, respectively (Fig. 2, Table 1). The earlier conducted experiments [3, 8], using tritium-labeled neuromediators, demonstrated the availability of NE in the brain at similar stages, while histochemical studies revealed the electron-dense vesicles with NE between the luminary and lateral membranes, where their contents are released

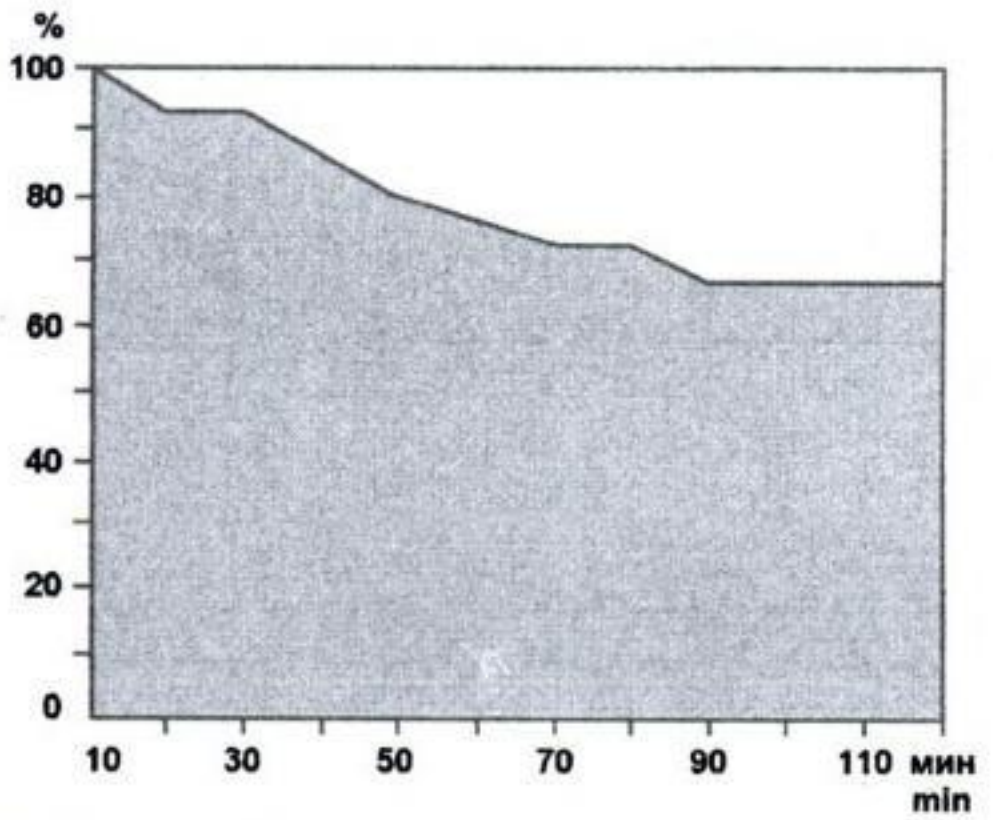


Рис. 1. Изменение ЧСС в процессе ритмических холодовых воздействий.

Fig. 1. Changes in the HR during rhythmic cold exposures.

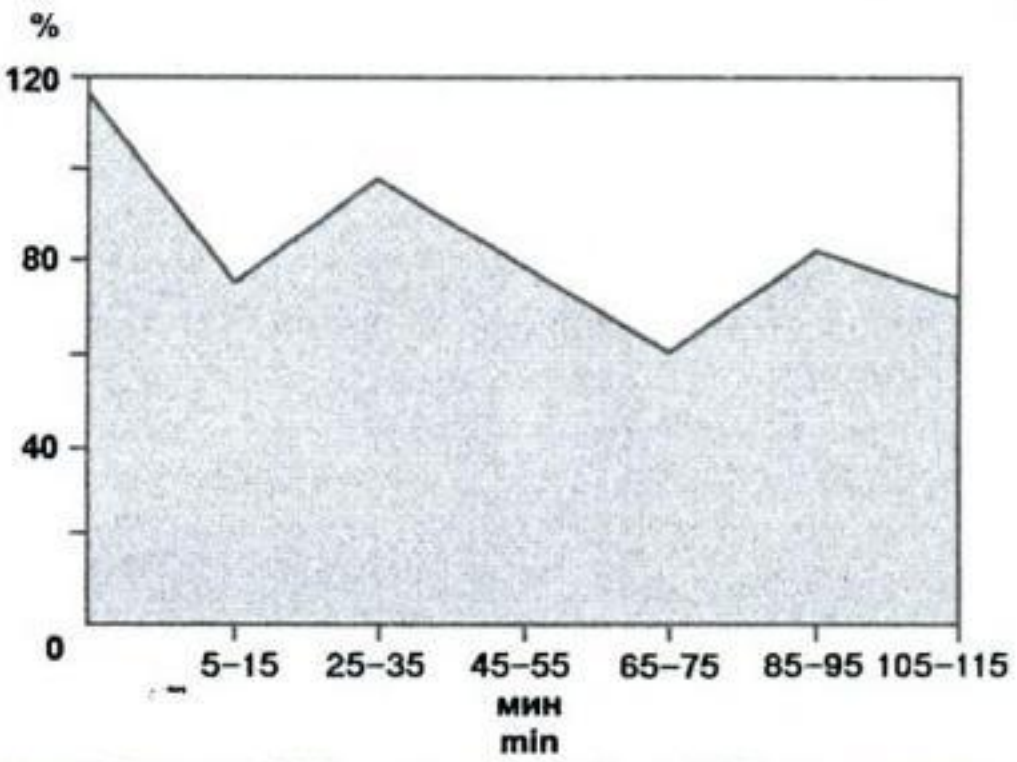


Рис. 2. Влияние РХВ с частотой 0,1 Гц на ЧСС при системном введении норадреналина.

Fig. 2. Action of the RCE with the frequency of 0.1 Hz on the HR during systemic injection of norepinephrine.

Матеріал, захищений авторським правом

по тритию нейромедиаторов показывают наличие НА в мозге на сходных этапах РХВ, а гистохимическими исследованиями были обнаружены электроннoплотные везикулы с НА между люминальной и латеральной мембраной, где происходит высвобождение их содержимого в межэндотелиальную щель, минуя плотные контакты. Было также показано, что инъекция НА в гипоталамус вызывает уменьшение ЧСС, что косвенно подтверждает связь отрицательного хронотропного эффекта с увеличением проницаемости ГЭБ для НА. Известно, что стимуляция передней и средней областей гипоталамуса вызывает парасимпатические эффекты (урежение ЧСС), а раздражение задней области — симпатические (увеличение ЧСС) [4]. Электронно-микроскопические исследования [3] показали, что при обнаружении центрального эффекта НА его проницаемость через ГЭБ в области заднего гипоталамуса увеличивается на 30–40% больше, чем переднего. Являясь тормозным центральным медиатором, НА, попадая через ГЭБ в задний гипоталамус, способствует растормаживанию переднего парасимпатического, который находится в реципрокных взаимоотношениях с задним [4]. Помимо взаимных тормозящих влияний, конкурирующее действие этих нервных центров, по-видимому, проявляется на уровне вегетативного ядра вагуса, которое испытывает угнетающее влияние заднего гипоталамуса и возбуждающее — переднего.

Представляет интерес сопоставление данных, полученных при РХВ с частотой 0,1 Гц, с данными при 0,2 Гц. В последнем случае наблюдается смещение пиков проницаемости ГЭБ (установленных по критериям ЧСС) приблизительно в 2 раза в интервалах 5–9, 25–30 и 50–65 мин соответственно (на 20 ± 10, 50 ± 11 и 20 ± 10%) (рис. 3, табл. 2).

Создается впечатление, что первый пик проницаемости ГЭБ если и смещается, то этот факт недостоверен. Повышение проницаемости ГЭБ в этом случае может объясняться включением неспецифических механизмов в ответ на стрессорное холодовое воздействие. Биологически активные вещества — медиаторы стрессорного состояния, например эндогенные катехоламины, оказывают влияние на функциональное состояние эндотелиоцитов, что может проявляться в активации везикулярного транспорта. Результаты наших исследований свидетельствуют о несколько пониженной резистентности ГЭБ на протяжении всего РХВ. Предполагается, что этот эффект может быть опосредован окисью азота [8].

РХВ, являясь сенсорными систематически действующими раздражителями, должны обусловли-

Таблица 1 **Table 1**

Влияние ритмических холодовых воздействий с частотой 0,1 Гц на ЧСС при системном введении норадреналина

Action of rhythmic cold exposures with the frequency of 0.1 Hz on the HR during systemic injection of norepinephrine

Время воздействия, мин Time of exposure, min	0	5–15	25–35	45–55	65–75	85–95	105–115
ЧСС (% от нормы) HR (% from the normal value)	115 ± 5	75 ± 4	98 ± 6	80 ± 4*	60 ± 6**	82 ± 5*	71 ± 5**

Примечания. * — различия по сравнению с контролем (0 мин) достоверны, $p < 0,05$; ** — различия по сравнению с контролем (0 мин) достоверны, $p < 0,01$.

Notes: * — the differences are significant as compared with control (0 min), $p < 0.05$; ** — the differences are significant as compared with control (0 min), $p < 0.01$.

into the interendothelial fissure, escaping the dense contacts. The injection of NE into the hypothalamus was also shown to reduce the HR, which indirectly supports a relation of the negative chronotropic effect to a rise in the BBB permeability to NE. Stimulation of the anterior and medium regions of the hypothalamus is known to produce parasympathetic effects (slowing down of the HR), while stimulation of the posterior region triggers sympathetic effects (a rise in the HR) [4]. Electron-microscopic investigations [3] showed that upon identification of the central effect of NE its permeability through the BBB in the region of the posterior hypothalamus increases by 30–40% higher as compared with that of the anterior hypothalamus. Being an inhibiting central mediator, NE, while getting into the posterior hypothalamus through the BBB, facilitates disinhibition of the anterior parasympathetic hypothalamus, which maintains reciprocal relations with the posterior hypothalamus [4]. Beside mutual inhibiting effects, a competing action of these nervous centers is manifested, apparently, at the level of the vagal vegetative nucleus, which experiences an inhibiting influence of the posterior hypothalamus and exciting action — of the anterior hypothalamus.

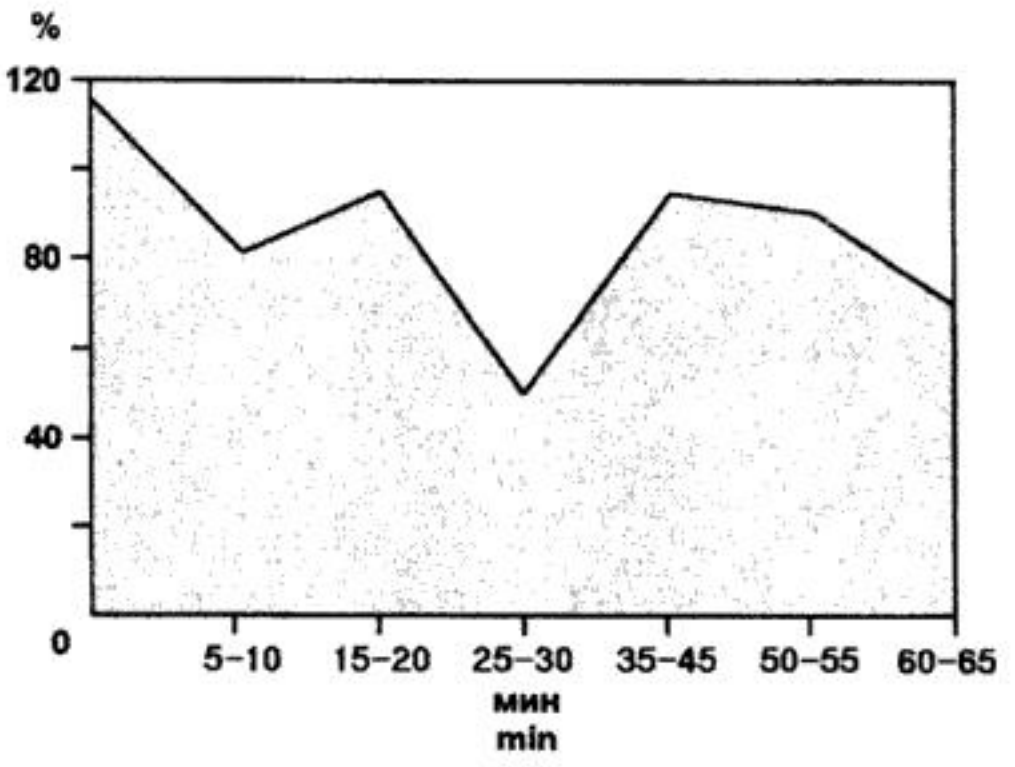


Рис. 3. Влияние РХВ с частотой 0,2 Гц на ЧСС при системном введении норадреналина.

Fig. 3. Action of the RCE with the frequency of 0.2 Hz on the HR during systemic injection of norepinephrine.

Матеріал, захищений авторським правом

Таблица 2

Влияние ритмических холодовых воздействий с частотой 0,2 Гц на ЧСС при системном введении норадреналина

Table 2

Action of rhythmic cold exposures with the frequency of 0.2 Hz on the HR during systemic injection of norepinephrine

Время воздействия, мин Time of exposure, min	0	5–10	15–20	25–30	35–45	50–55	65–70
ЧСС (% от нормы) HR (% from the normal value)	115 ± 5	81 ± 10*	92 ± 7*	50 ± 11**	92 ± 15*	88 ± 10*	70 ± 9**

Примечания. * — различия по сравнению с контролем (0 мин) достоверны, $p < 0,05$; ** — различия по сравнению с контролем (0 мин) достоверны, $p < 0,01$.

Notes: * — the differences are significant as compared with control (0 min), $p < 0.05$; ** — the differences are significant as compared with control (0 min), $p < 0.01$.

ыать определенные сдвиги в терморегуляторных системах мозга. Интересно приложение к данным результатам для их объяснения схемы О. С. Виноградовой [6]. Приходящие возбуждения постепенно охватывают все звенья в цепи лимбико-гипоталамического круга. Ответ каждой последующей структуры формируется лишь при достижении определенного все большего числа повторяющихся воздействий [6]. Можно допустить, что при прохождении серий возбуждений по элементам круга Papez формируется полисинаптическая цепь, "проторенный путь". При этом кортикальный вход на зубчатую фасцию приобретает потенцированное состояние, т.е. на постсинаптических мембранах создается определенная степень деполяризации, имеющая значение, близкое к пороговому. При этом, вероятно, образуется констелляция нервных центров, участвующая в перцепции холодовых раздражений. Системообразующим фактором в этом случае должен служить характер наносимых воздействий, а именно частота секундного ритма — эндогенного, присущего многим автоколебательным процессам, протекающим в клетках (обработка и кодирование сенсорной информации термосенситивными нейронами гипоталамуса [9], метаболизм NO [8], темпы трансэндотелиального транспорта[8]) и на макроуровне (в виде ξ-колебаний биоэлектрической активности). Поэтому в наших экспериментах РХВ имеют резонансный эффект на проницаемость ГЭБ.

Резонансное действие РХВ направлено, очевидно, на синхронизацию активности ряда функциональных систем, синергизм которых ведет к созданию определенного состояния мозга, в которое вносят вклад ГЭБ, нейромедиаторный фон и соответствующая организация нервных центров, объединенных специфическими функциональными связями. Это состояние должно отражать активацию сверхмедленной управляющей системы мозга, направленную, с одной стороны, на регуляцию терморегуляторных реакций (после РХВ с частотой 0,1 Гц повышается холодовая устойчивость организма [7]), а с другой — на создание определенной функциональной системы, существующей какое-то время после окончания РХВ, центральную роль в

Comparison of the data obtained during the RCE with the frequencies of 0.1 and 0.2 Hz is of great interest. In the latter case the peaks of the BBB permeability (estimated by the HR criteria) are shifted by approximately 2-fold within the ranges of 5–9, 25–30 and 50–65 min, respectively (by 20 ± 10, 50 ± 11 and 20 ± 10%) (Fig. 3, Table 2).

It seems that even if the first peak of the BBB permeability is shifted then it is not for certain. A rise in the permeability in this case may be accounted for by triggering of the nonspecific mechanisms in response to stress cold exposure. Biologically active substances — mediators of the stress state, e.g. endogenous catecholamines — affect the functional state of endotheliocytes, which may be manifested in the activation of vesicular transport. The results of the authors' experiments testify to a slightly reduced resistance of the BBB throughout the whole period of the RCE. It is thought that this effect may be mediated by nitroxide [8].

Rhythmic cold exposures, being sensor systemically acting stimuli, should provide for certain changes in the thermoregulatory systems of the brain. A hypothesis of O. S. Vinogradova [6] seems nicely applicable to the above. The implied excitations gradually involve all the links of a lymbical-hypothalamic circuit. The response of every successive structure is formed only after applying the ever growing number of cycles of exposures [6]. It may be supposed that when the excitation cycles proceed along the elements of a Papez circle, a polysynaptic chain is formed, the so-called "beaten track". Here the cortical input to the denticulated fascia acquires a potentiated state, i.e. a certain extent of depolarization is created on the postsynaptic membranes, which is close to the limiting value. Apparently, a constellation of the nervous centers is formed, which is involved into perception of cold stimuli. The nature of the exposures applied should serve as a system-forming factor in this case, namely: the frequency of the seconds' rhythm — the endogenous one, which is characteristic of many autooscillatory processes, occurring in the cells (processing and encoding of the sensor information by thermosensitive neurons of the hypothalamus [9], NO metabolism [8], rates of transendothelial transport [8]) and at the macrolevel (in the form of ξ-oscillations of bioelectrical activity). That is i the authors' experiments the RCE exercise a resonance effect on the BBB permeability.

Resonance action of the RCE is directed, apparently, on synchronization of activities of some functional systems, the synergy of which creates a particular state of the brain, which is also contributed to by

Матеріал, захищений авторським правом

котором занимает ГЭБ, т.е. включение терморегуляторной памяти.

Как видно из представленных результатов, периодические холодовые воздействия (0,1 и 0,2 Гц) вызывают периодические изменения функционального состояния ГЭБ, а следовательно, мозга и всего организма.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Аладжалова Н. А.* Психофизиологические аспекты сверхмедленной ритмической активности головного мозга.– М.: Наука, 1979.– 213 с.
2. *Бабийчук Г. А., Марченко В. С., Ломакин И. И., Белостоцкий А. В.* Нейрофизиологические процессы охлажденного мозга.– Киев: Наук. думка, 1992.– 207 с.
3. *Бабийчук Г. А., Марченко В. С., Шило А. В. и др.* К механизмам регуляции проницаемости гематоэнцефалического барьера охлажденного мозга. Сообщение 2. Ритмические холодовые воздействия повышают проницаемость ГЭБ для терморегуляторных нейромедиаторов // Пробл. криобиологии.– 1995.– № 2.– С. 3–9.
4. *Баклаваджян О. Г.* Физиология вегетативной нервной системы.– Л.: Наука, 1981.– 752 с.
5. *Бредбери М.* Концепция гематоэнцефалического барьера.– М.: Медицина, 1983.– 480 с.
6. *Виноградова О. С.* Гиппокамп и память.– М.: Наука, 1975.– 332 с.
7. *Марченко В. С., Бабийчук Г. А., Ломако В. В. и др.* Общий подход к проблеме повышения проницаемости гематоэнцефалического барьера и холодовой устойчивости организма // Пробл. криобиологии.– 1994.– № 4.– С. 24-32.
8. *Марченко В. С., Бабийчук Г. А., Шило А. В. и др.* К механизмам регуляции проницаемости гематоэнцефалического барьера охлажденного мозга. Сообщение 3. Оксид азота (П) — один из триггеров проницаемости гематоэнцефалического барьера в структуре сверхмедленной управляющей системы организма? // Пробл. криобиологии.– 1995.– № 3.– С. 10–19.
9. *Минут-Сорохтина О. П.* Физиология терморегуляции.– М.: Медицина, 1972.– 227 с.

Поступила 23.12.98

the BBB, neuromediator background and corresponding organization of nervous centers, united by specific functional bonds. Such a state should reflect activation of supraslow controlling system of the brain, directed, on one hand, to the regulation of thermoregulatory responses (following the RCE with the frequency of 0.1 Hz cold resistance of the organism increases [7]), and on the other — to organization of a certain functional system, existing for some time after termination of the RCE; the major part here is played by the BBB, i.e. thermoregulatory memory is activated.

It follows from the results submitted that periodical cold exposures (0.1 and 0.2 Hz) result in the periodical changes in the functional state of the BBB, hence, of the brain and the organism as a whole.

REFERENCES

1. *Aladjalova N. A.* Psychophysical aspects of supraslow rhythmic activity of the brain.– M.: Nauka publ., 1979.– 213 p.
2. *Babiychuk G. A., Marchenko V. S., Lomakin I. I., Belostotsky A. V.* Neurophysiological processes in the cooled brain.– Kiev: Naukova dumka publ., 1992.– 207 p.
3. *Babiychuk G. A., Marchenko V. S., Shilo A. V. et al.* On the mechanisms of regulating the permeability of the blood-brain barrier of the cooled brain. Report 2. Rhythmic cold exposures increase the BBB permeability to thermoregulatory neuromediators // Probl.kriobiologii.– 1995.– № 2.– P. 3–9.
4. *Baklavajan O. G.* Physiology of the vegetative nervous system.– L.: Nauka publ., 1981.– 752 p.
5. *Bradbury M.* A concept of the blood-brain barrier.– M.: Meditsina publ., 1983.– 480 p.
6. *Vinogradova O. S.* Hyppocamp and memory.– M.: Nauka publ., 1975.– 332 p.
7. *Marchenko V. S., Babiychuk G. A., Lomako V. V. et al.* General approach to the problem of increasing permeability of the blood-brain barrier and cold resistance of the organism // Probl. kriobiologii.– 1994.– № 4.– P. 24–32.
8. *Marchenko V. S., Babiychuk G. A., Shilo A. V. et al.* On the mechanisms of regulating permeability of the blood-brain barrier of the cooled brain. Report 3. Is nitroxide (II) one of the triggers of the blood-brain barrier permeability within the structure of the supraslow controlling system of the organism? // Probl. kriobiologii.– 1995.– № 3.– P. 10–19.
9. *Minut-Sorohtina O. P.* Physiology of thermal regulation.– M.: Meditsina publ., 1972.– 227 p.

Accepted in 23.12.98

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 612.111: 577.352.4

UDC 612.111: 577.352.4

Оценка транспорта хлорида и сульфата в эритроцитах при исследовании методом *pH*-метрии

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

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Evaluation of Transport of Chloride and Sulfate in Red Cells When Studied with a *pH*-Metry Method

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

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

Изменение *pH* суспензии эритроцитов в сульфатной среде представляет двухфазную кривую, которая включает фазы закисления и защелачивания. Присутствие в среде инкубации ингибиторов анионного транспорта или гипертоническое воздействие вызывает торможение транспорта протонов. Предположили существование двух способов транспорта хлорида из клетки в сульфатной среде: первый — канальный, второй — обменный механизм при обмене хлорида на внеклеточный сульфат.

Зміна *pH* суспензії еритроцитів у сульфатному середовищі являє собою двофазну криву, яка містить фази закислення та залуження. Присутність у середовищі інкубації інгібіторів аніонного транспорту або гіпертонічна дія викликає гальмування транспорту протонів. Припустили існування двох способів транспорту хлориду з клітини у сульфатному середовищі: перший — канальний, другий — обмінний механізм при обміні хлориду на позаклітинний сульфат.

A change in *pH* of the red cell suspension in a sulfate medium is a two-phase curve, which includes a phase of acidization and a phase of alkalinization. The availability of the inhibitors of the anion transport in the incubation medium or hypertonic exposure result in the slowing down of the proton transport. The authors assumed that there exist two methods of chloride transport out of the cell in a sulfate medium: the first type is of a channel-like nature, while the second type is an exchange mechanism for exchange of chloride for extracellular sulfate.

Белок полосы 3 мембран эритроцитов имеет каналоподобную структуру, необходимую для однонаправленных потоков анионов, а также для их обменного транспорта [3, 7]. В последнем случае субстрат связывается с транспортным сайтом на одной стороне мембраны, образовавшийся комплекс транслоцирует через мембрану и распадается, освобождая анион. Цикл обмена анионов завершается связыванием и переносом субстрата в противоположном направлении. При этом происходят конформационные перестройки гидрофобных фрагментов белка полосы 3 в мембране [3, 8]. Согласно [3, 15] функциональная активность переносчика зависит не только от концентрации анионов в инкубационной среде, но и от физического состояния мембраны [2], которое изменяется при гипертоническом воздействии [1]. Цель работы — исследование влияния ингибиторов анионного транспорта и гипертонического воздействия на транспорт анионов в эритроцитах человека.

В экспериментах использовали эритроциты донорской крови, отмытые раствором, содержащем 150 ммоль/л NaCl и 10 ммоль/л трис (*pH* 7,4). Отмытый осадок эритроцитов с 2%-м гематокритом вносили в термостатируемую ячейку (37 °С) с *pH* электродом. При этом среда содержала различные концентрации сульфата натрия в комбинации с сахарозой, а также 300 ммоль/л сахарозы или 260 ммоль/л сахарозы плюс 20 ммоль/л NaCl. Ди-

Band 3 protein of the red cell membrane has a canal-like structure, which is required for unidirectional flows of anions and for exchange transport as well [3, 7]. In the latter case the substrate is bound with a transport site on one side of the membrane, and the formed complex is translocated through and membrane and degrades, thus releasing the anion. The cycle of the anion exchange is completed by bonding and transfer of the substrate to the opposite direction. Here conformational re-arrangements of band 3 hydrophobic fragments occur in the membrane [3, 8]. As reported elsewhere [3, 15] functional activity of the carrier depends not only on the concentration of anions in the incubation medium but also on the physical state of the membrane [2], which is changed under hypertonic exposure [1]. The aim of the given research was to investigate the action of the inhibitors of anion transport and hypertonic exposure on the transport of anions in human red cells.

Red cells of donor blood, washed with a solution containing 150 mmol/l NaCl and 10 mol/l tris (*pH* 7.4), were used in the experiments. The washed-out pellet of red cells with a 2%-hematocrit was injected into a thermostatted cells (37 °C) with a *pH* electrode. Here the medium contained different concentrations of sodium sulfate combined with sucrose, and 300 mmol/l sucrose or 260 mmol/l sucrose plus 20 mmol/l NaCl. The dynamics of changes in *pH* was controlled with an automatic recorder. The inhibitors of the anion transport dipyridamole (SIGMA) and DIDS (4,4'-di-

Матеріал, захищений авторським правом

намику изменения *pH* контролировали самописцем. Были использованы ингибиторы анионного транспорта дипиридамол (SIGMA) и ДИДС (4,4'-диизотиоцианостильбен-2,2'-дисульфонат, SIGMA), которые добавляли непосредственно в ячейку.

Комбинирование эритроцитов со средой, содержащей 120 ммоль/л сульфата, приводит к закислению суспензии клеток, затем к сдвигу *pH* в щелочную сторону (рис. 1, *а*). При этом изменение *pH* представляет собой двухфазную кривую, которая включает фазы закисления и защелачивания. Снижение концентрации сульфата в среде инкубации способствует возрастанию степени закисления в первой фазе и к снижению степени и скорости защелачивания во второй. Выявляется определенная зависимость скорости изменения *pH* во второй фазе от концентрации сульфата в среде инкубации. Насыщение максимальной скорости защелачивания происходит при 84 ммоль/л сульфата натрия (рис. 1, *б*), что указывает на возможную связь котранспорта сульфата и протона. Величина максимального потока сульфата в эритроциты определяется при концентрации его в среде инкубации около 100 ммоль/л [15].

Анализ результатов, полученных при использовании ингибиторов анионного транспорта дипиридамола и ДИДС, показал, что увеличение их концентрации в среде инкубации приводит к большему закислению суспензии клеток в первой фазе кривой и снижению скорости защелачивания во второй фазе (рис. 2), как это происходило при снижении концентрации сульфата (рис. 1, *а*). Кроме того, возрастание концентрации дипиридамола до 200 мкмоль/л не вызывает блокирования фазы закисления, тогда как ДИДС в концентрации выше 1 мкмоль/л приводит к ингибированию указанной фазы. Полученные результаты указывают на существование тесной связи между изменением *pH* суспензии клеток и транспортом анионов в эритроцитах. Данные, полученные с ингибиторами, пред-

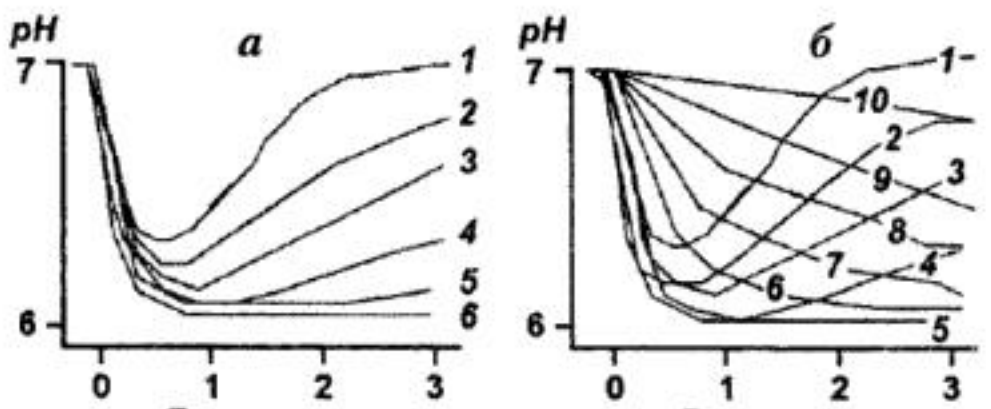


Рис. 2. Влияние ингибиторов на динамику изменения *pH* суспензии эритроцитов в среде, содержащей 120 ммоль/л сульфата натрия: *а* – дипиридамола, мкмоль/л: *1* – контроль; *2* – 10; *3* – 20; *4* – 50; *5* – 70; *6* – 100–200; *б* – ДИДС, мкмоль/л: *1* – контроль; *2* – 0,5; *3* – 0,7; *4* – 1,0; *5* – 1,2; *6* – 1,5; *7* – 2,0; *8* – 5,0; *9* – 10; *10* – 20.

Fig. 2. Action on the dynamics of changes in *pH* of red cell suspension in the medium, containing 120 mmol/l sodium sulfate, of *a* – dipyridamole, μmol/l: *1* – control; *2* – 10; *3* – 20; *4* – 50; *5* – 70; *6* – 100–200; *6* – DIDS, μmol/l: *1* – control, *2* – 0.5, *3* – 0.7, *4* – 1.0, *5* – 1.2, *6* – 1.5, *7* – 2.0, *8* – 5.0, *9* – 10, *10* – 20.

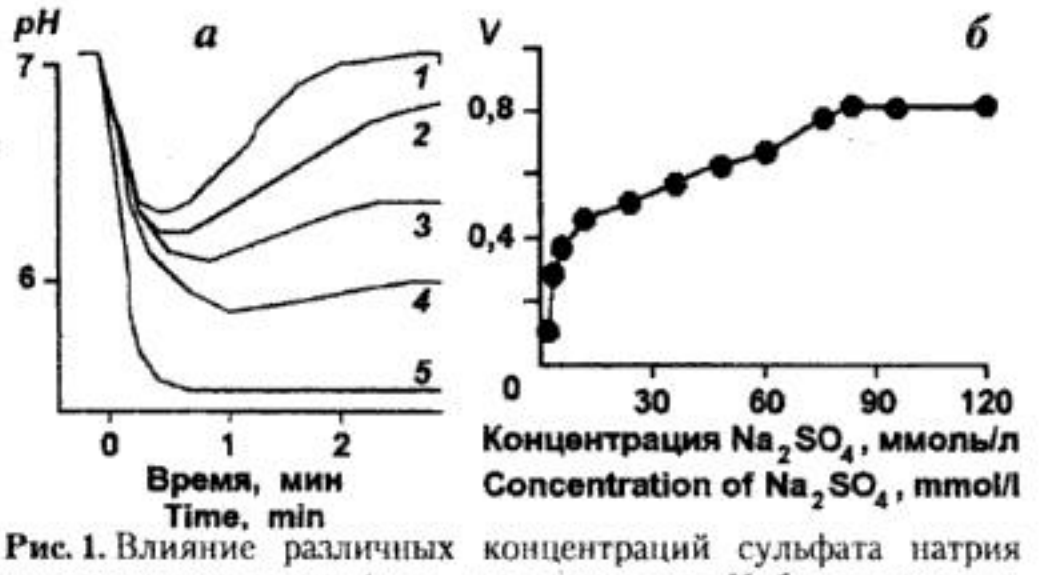


Рис. 1. Влияние различных концентраций сульфата натрия плюс сахароза, ммоль/л: *а* – на изменение *pH*; *б* – на скорость защелачивания суспензии эритроцитов: *1* – 120 + 0; *2* – 60 + 150; *3* – 30 + 225; *4* – 3 + 293.

Fig. 1. Action of different concentrations of sodium sulfate plus sucrose, nmol/l: *a* – on changes in *pH*; *б* – on the rate of alkalinization of red cell suspension; *1* – 120 + 0; *2* – 60 + 150; 3 – 30 + 225; 4 – 3 + 293.

isothiocyanostylbene-2,2'-disulphonate, SIGMA) were applied, which were injected directly into the cell.

A combined application of red cells with the medium, containing 120 mmol/l sulfate, results first in acidization of the cell suspension, and then in a *pH* shift towards alkalinity (Fig. 1, *a*). Here a change in *pH* represents a two-phase curve, which involves a phase of acidization and a phase of alkalinization. A reduction in the concentration of sulfate in the incubation medium facilitates a rise in the extent of acidization at the first phase, and a decrease in the extent and in slowing down of the rate of alkalinization – at the second. A certain dependence in the rate of changes in *pH* upon concentration of sulfate in the incubation medium occurs at the second stage. Saturation of the maximum alkalinization rate occurs at 84 mmol/l sodium sulfate (Fig. 1, *б*), which indicates a possible correlation between co-transport of sulfate and proton. The value of the maximum flow of sulfate into red cells is determined during its concentration in the incubation medium at about 100 mmol/l [15].

Analysis of the results, obtained when using the inhibitors of the anion transport dipyridamole and DIDS, showed that an increase in the concentrations in the incubation medium resulted in a stronger acidization of the cell suspension at the first stage of the curve and slowing down of the rate of alkalinization at the second phase (Fig. 2), as it occurred when reducing the concentration of sulfate (Fig. 1, *a*). Besides, a rising concentration of dipyridamole up to 200 μmol/l does not result in the blocking of the acidization phase, while DIDS in a concentration over 1 μmol/l inhibits the said phase. The results obtained testify to the existence of a close correlation between the changes in *pH* of the cell suspension and transport of anions in red cells. The data, produced by the inhibitors, were represented as Dixon's diagrams. Plotting of these diagrams when blocking the phase of alkalinization by dipyridamole under various concentrations of sulfate shows one feature, characteristic of kinetic studies of the anion transport. In this case a non-competitive type of inhibition of proton trans-

Матеріал, захищений авторським правом

ставили графиками Диксона. Построение таких графиков при блокировании дипиридамолом фазы защелачивания в различных концентрациях сульфата выявляет особенность, характерную для кинетических исследований анионного транспорта. В данном случае определяется неконкурентный тип ингибирования транспорта протонов с константой ингибирования K_i, равной 23–24 мкмоль/л (рис. 3, *а*). Согласно [11, 14] дипиридамол является неконкурентным ингибитором транспорта анионов в эритроцитах и степень ингибирования транспорта сульфата существенно зависит от содержания анионов хлора в среде инкубации. Так, величина K_i в зависимости от содержания хлорида [11] для обмена сульфата равна 1,28–1,98 мкмоль/л. Для обмена хлорида на сульфат ингибирование в присутствии 10 мкмоль/л дипиридамола составляет 42% [14].

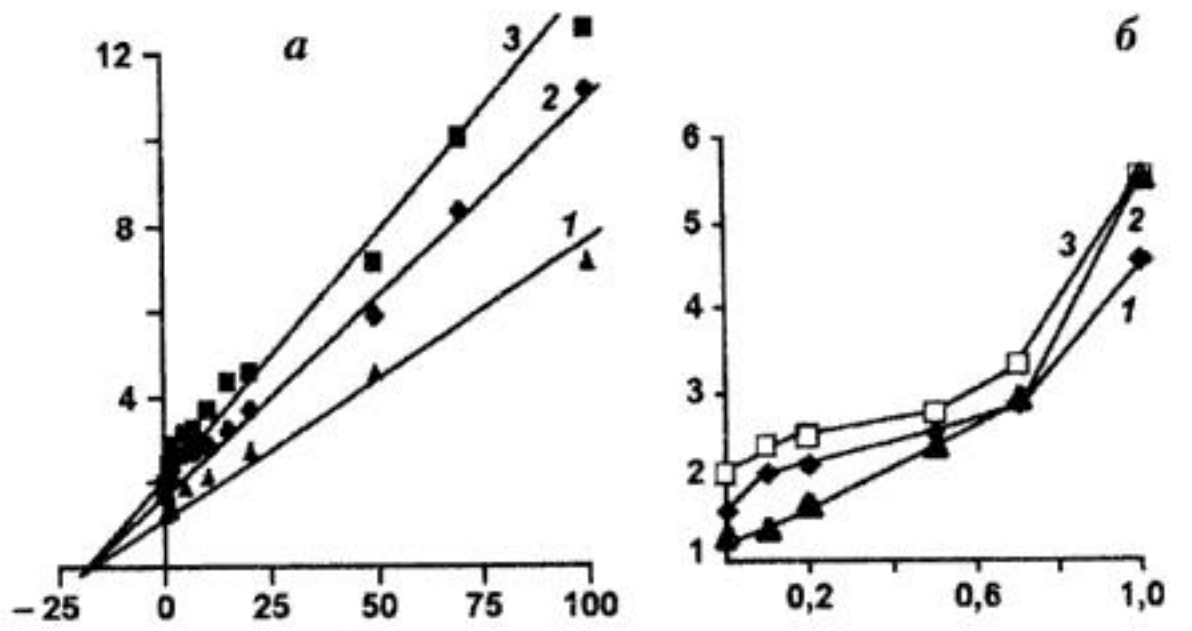


Рис. 3. Зависимость обратной величины скорости защелачивания суспензии эритроцитов от концентрации ингибиторов в среде, содержащей сульфат натрия плюс сахароза, ммоль/л: *а* – дипиридамол; *б* – ДИДС: *1* – 120 + 0; *2* – 60 + 150; *3* – 30 + 225.

Fig. 3. Dependence of the opposite value of the alkalinization rate of the red cell suspension on the concentration of inhibitors in the medium, containing sodium sulfate plus sucrose (mmol/l), *а* – dipyridamole, *б* – DIDS: *1* – 120 + 0; *2* – 60 + 150; *3* – 30 + 225.

Для необратимого ингибитора ДИДС подобные графики не выявляют прямых, характерных для дипиридамола (рис. 3, *б*). Тем не менее очевидно, что ДИДС является более сильным блокатором, так как полное блокирование транспорта протонов в фазе защелачивания происходит при его концентрации 1–1,5 мкмоль/л (рис. 2, *б*). Для дипиридамола данная концентрация равна 100 мкмоль/л (рис. 2, *а*).

Существование двух фаз разнонаправленного сдвига *pH* свидетельствует о наличии двух видов транспорта. Фаза закисления отражает выход анионов хлора, тогда как фаза защелачивания представляет собой транспорт сульфата в эритроциты [13]. Транспорт сульфата и протона происходит в обмен на внутриклеточный хлорид [10]. Следовательно, изменение концентрации сульфата или присутствие ингибиторов анионного транспорта в среде инкубации приводит к сдвигу количественного соотношения между чистым выходом анионов хлора и его выходом в обмен на внеклеточный сульфат. Это отражается в изменениях степени закисления и защелачивания (рис. 1, 2), что, очевидно, связано с количеством переносимого аниона хлора из клетки тем или иным видом транспорта. Надо отметить, что чувствительность к ингибиторам выявляемых двух способов выхода хлорида из клетки различна.

На рис. 4 представлены результаты исследования влияния ингибиторов анионного транспорта на фазу закисления в различных средах, которая стражает выход анионов хлора из клетки [13]. В сульфатной и сахарозной средах дипиридамол незначительно ингибирует транспорт протонов из клетки (10–15%), тогда как в сахарозной среде, содержащей 20 ммоль/л NaCl, указанный ингибитор вызывает 75% ингибирования при его концентрации 100 мкмоль/л, 50% ингибирования – при 50 мкмоль/л (рис. 4, *а*). Действие ДИДС не зависит от состава среды инкубации, степень ингибирования составляет 85–95% при концентрации

port with an inhibition constant K_i, equal to 23–24 μmol/l, is identified (Fig. 3, *а*). As reported elsewhere [11, 14] dipyridamole is a non-competitive inhibitor of the anion transport in red cells, and the extent of sulfate transport inhibition is greatly dependent on the content of chlorine (Cl) anions in the incubation medium. For example, the value of K_i for sulfate exchange is 1.28–1.98 μmol/l depending on the content of chlorine [11]. When exchanging 42%-chlorine to sulfate inhibition was identified in the presence of 10 μmol/l dipyridamole [14].

For the irreversible inhibitor DIDS similar plots do not demonstrate any curves, characteristic of dipyridamole (Fig. 3, *б*). It is evident though that DIDS is a stronger blocking agent, since complete blocking of proton transport at a phase of alkalinization occurs under its concentration of 1–1.5 μmol/l (Fig. 2, *б*). For dipyridamole this concentration is 100 μmol/l (Fig. 2, *а*).

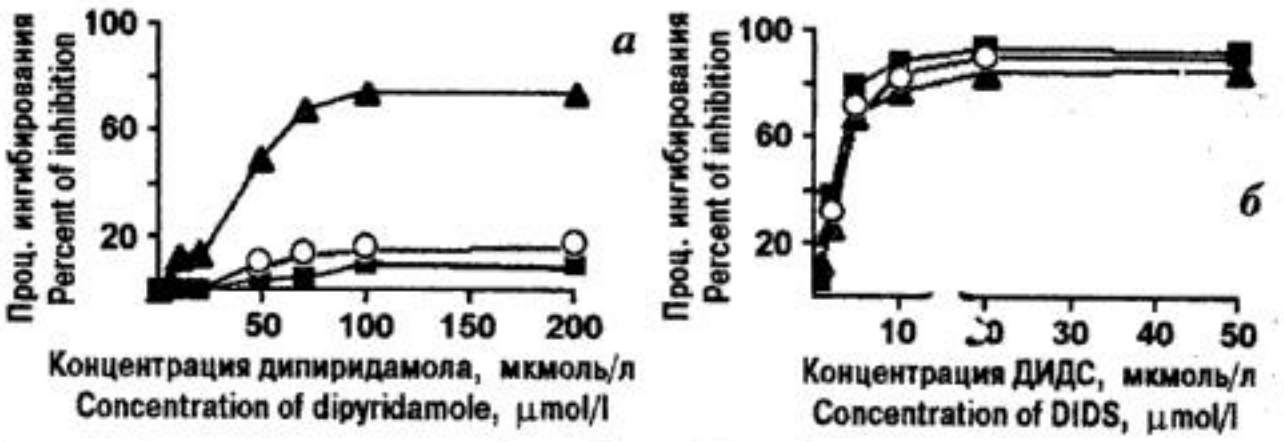
Existence of two phases of a differently directional shift in *pH* testifies to the availability of two types of transport. Phase of acidization reflects a discharge of chlorine anions, while alkalinization phase represents transport of sulfate into red cells [13]. Transport of sulfate and proton occurs in exchange to intracellular chloride [10]. Hence, a change in the concentration of sulfate or presence of the inhibitors of the anion transport in the incubation medium result in a shift of a quantitative ratio between pure discharge/outflow of chlorine anions and its discharge in response to extracellular sulfate. This is manifested by changes in the extent of acidization and alkalinization (Figs. 1, 2), which relates, apparently, to the amount of chlorine anion being carried out of the cell by one or another type of transport. It should be noted that susceptibility to the inhibitors of the two types of chlorine discharge out of the cell is different.

Figure 4 shows the results of studying the action of the anion transport inhibitors on the phase of acidization in various media, which reflects the discharge of chlorine anions out of the cell [13]. In sulfate and

Матеріал, захищений авторським правом

Рис. 4. Влияние на закисление суспензии эритроцитов в среде, содержащей (ммоль/л) *а* – дипиридамол; *б* – ДИДС: ■ – 120 сульфата натрия; ○ – 300 сахарозы; ▲ – 260 сахарозы + 20 NaCl.

Fig. 4. Action of dipyridamole (*a*) and DIDS (*b*) on acidization of red cells in the medium, containing (mmol/l): ■ – 120 sodium sulfate; ○ – 300 sucrose; ▲ – 260 sucrose + 20 NaCl.



ингибитора 20 мкмоль/л (рис. 4, *б*); 50%-е ингибирование достигается при концентрации блокатора 2,5–4,0 мкмоль/л, для дипиридамола оно составляет 43–56 мкмоль/л (рис. 4, *а*). Таким образом, ингибиторный эффект последнего блокатора на фазу закисления значительно проявляется только в среде, содержащей анионы хлора. Эти результаты согласуются с [11], где дипиридамол в концентрации 32 мкмоль/л в бесхлорной среде незначительно влиял на обменный транспорт сульфата. Указанный ингибитор вызывает блокирование фазы защелачивания (см. рис. 2, *а*), которая представляет собой вход сульфата в обмен на внутриклеточный хлор [10]. Очевидно, что действие ингибитора не требует присутствия анионов хлора в среде инкубации.

Возрастание концентрации сульфата в среде инкубации выше 500 ммоль/л вызывает значительные изменения в динамике сдвига *pH* суспензии клеток. При этом отмечается блокирование как фазы закисления, так и фазы защелачивания (рис. 5, *а*). Согласно [3, 15] симметричное увеличение концентрации анионов в эритроцитах и среде выше 150–200 ммоль/л приводит к ингибированию обменного транспорта вследствие связывания анионов с модифицирующими сайтами. Следовательно, одностороннее увеличение концентрации сульфата в среде до 500 ммоль/л не вызывает блокирования транспорта данного аниона, а эффект изменения динамики сдвига *pH* суспензии клеток при концентрации соли выше 500 ммоль/л связан с гипертоническим воздействием (рис. 5, *а*). Это предположение подтверждается результатами, полученными при использовании фиксированной концентрации сульфата натрия (120 ммоль/л) и возрастающей концентрации сахарозы. При этом также происходит блокирование обеих фаз *pH*-кривой (рис. 5, *б*). Ингибирование второй фазы практически полное при концентрациях сульфата 2 моль/л, а сахарозы 1,2 моль/л, тогда как фаза закисления блокируется частично.

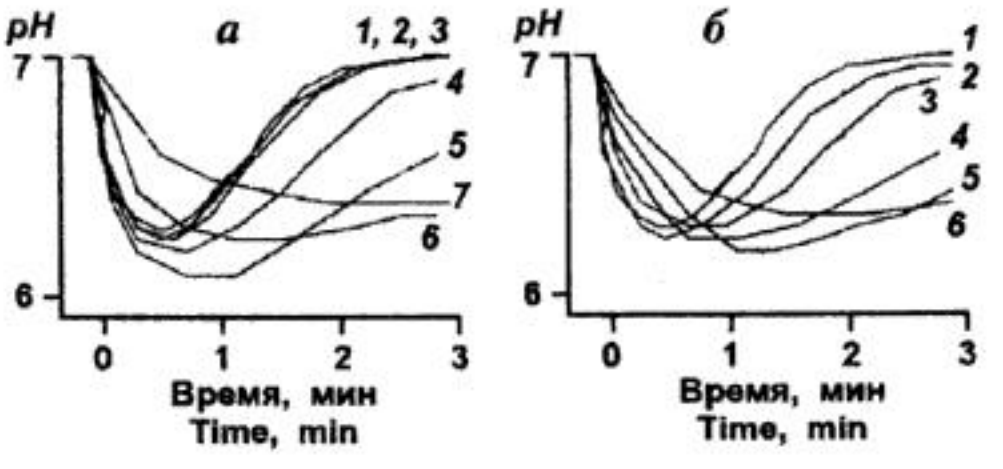
ДИДС – это представитель ингибиторов стильбенового ряда, которые связываются с транспорт-

sucrose media dipyridamole insignificantly inhibits transport of protons out of the cell (10–15%), while in the sucrose medium, containing 20 mmol/l NaCl, the said inhibitor brings about a 75%-inhibition under its concentration of 100 μmol/l, and 50%-inhibition – under its concentration of 50 μmol/l (Fig. 4, *a*). Action of DIDS does not depend on the composition of the incubation medium, and extent of inhibition comprises 85–95% under the concentration of the inhibitor of 20 μmol/l (Fig. 4, *б*); 50%-inhibition is achieved under the concentration of the blocking agent of 2.5–4.0 μmol/l, and for dipyridamole it is 43–56 μmol/l (Fig. 4, *a*). Thus, the inhibiting effect of the latter blocking agent on the phase of acidization is strongly manifested only in the medium, which contains chlorine anions. These results correlate with the earlier reported data [11] where dipyridamole in the concentration of 32 μmol/l in a chlorine-free medium insignificantly affected the exchange transport of sulfate. The said inhibitor produces blocking of the alkalinization phase (see Fig. 2, *a*), which represents the inflow of sulfate in exchange to intracellular chlorine [10]. Apparently, the action of the inhibitor does not require availability of chlorine anions in the incubation medium.

A rise in the concentration of sulfate in the incubation medium over 500 mmol/l results in significant changes in the dynamics of a *pH* shift of the cell suspension. There is reported blocking both of the phase of acidization and phase of alkalinization (Fig. 5, *a*). As reported elsewhere [3, 15] a symmetrical increase in the concentration of anions in red cells and the medium over 150–200 mmol/l brings about inhibition of the exchange transport due to binding of anions with modifying sites. Hence, a one-way increase in the sulfate concentration in the medium up to 500 mmol/l does not result in the blocking of transport of the given anion, while the effect of changes in the dynamics of a *pH* shift if the cell suspension under the concentration of salt above 500 mmol/l relates to hypertonic exposure (Fig. 5, *a*). This assumption is supported by the results, obtained upon application of a fixed concentration of sodium sulfate (120 mmol/l)

Рис. 5. Влияние гипертонических растворов на динамику изменения *pH* суспензии эритроцитов в среде, содержащей (моль/л): *а* – сульфат натрия: *1* – 0,12; *2* – 0,3; *3* – 0,5; *4* – 0,8; *5* – 1,0; *6* – 1,5; *7* – 2,0; *б* – сульфат натрия плюс сахароза: *1* – 0,12 + 0; *2* – 0,12 + 0,3; *3* – 0,12 + 0,6; *4* – 0,12 + 0,9; *5* – 0,12 + 1,0; *6* – 0,12 + 1,2.

Fig. 5. Action of hypertonic solutions on the dynamics of changes in *pH* of red cell suspension in the medium, containing: *a* – sodium sulfate, mol/l: *1* – 0.12, *2* – 0.3, *3* – 0.5, *4* – 0.8, *5* – 1.0, *6* – 1.5, *7* – 2.0; *б* – sodium sulfate plus sucrose: *1* – 0.12 + 0, *2* – 0.12 + 0.3, *3* – 0.12 + 0.6, *4* – 0.12 + 0.9, *5* – 0.12 + 1.0, *6* – 0.12 + 1.2.



Матеріал, захищений авторським правом

ным сайтом анионного канала [4, 6]. Дипиридамол по природе своей является блокатором каналов доступа анионов к транспортному сайту [5]. С другой стороны, выявлено, что дипиридамол конкурирует с дибензаминостильбендисульфонатом на стильбен-связывающем сайте и что ингибиторная способность дипиридамола зависит от присутствия анионов хлора в среде инкубации [11].

Обменный транспорт хлорида на сульфат, представленный фазой защелачивания, более чувствителен к ингибиторам, чем канальный выход хлорида в первой фазе, который не блокируется дипиридамолом (см. рис. 2, *а*). Это указывает на то, что два способа транспорта анионов имеют разные механизмы. Максимальная скорость транспорта сульфата в эритроцитах осуществляется при значении *pH*, равном 6,3 [3, 15]. Это значение соответствует началу фазы защелачивания суспензии клеток в среде, содержащей 120 ммоль/л сульфата натрия (см. рис. 1, *а*). Однако присутствие ингибиторов или снижение концентрации сульфата приводит к сдвигу значения *pH*, при котором начинается транспорт указанного аниона (см. рис. 1, 2). Поэтому взаимоотношения двух способов транспорта могут определяться не только значениями *pH* эритроцитарной суспензии.

Сульфат имеет сравнимое с хлоридом сродство для транспортного сайта и связывание его не зависит от *pH* среды инкубации [3]. Это свидетельствует о том, что связывание данного аниона не препятствует чистому выходу хлорида в первой фазе. Блокирование дипиридамолом каналов доступа сульфата к транспортному сайту также не мешает выходящему потоку хлорида. Фаза закисления становится более выраженной (см. рис. 2, *а*). Из этого следует, что выход анионов хлора из клетки по градиенту электрохимического потенциала в фазе закисления осуществляется без участия транспортного сайта, по канальному механизму. Кроме того, субстратные каналы доступа сульфата к транспортному сайту с внешней стороны мембраны не являются частью канала при канальном выходе анионов хлора из клетки. Приращение выраженности фазы закисления в присутствии дипиридамола, который закрывает доступ сульфата к транспортному сайту, может дополнительно определяться транспортом хлорида по типу переносчика. Существование одновременно канального вида транспорта и транспорта по типу переносчика было выявлено при исследовании чистых потоков анионов хлора из эритроцитов в бесхлорную среду [7].

Последовательность фаз чистого и обменного транспорта анионов хлора из клетки в данных условиях можно объяснить обменным механизмом. Согласно этому механизму обмен внутриклеточного аниона на внеклеточный происходит последовательно [3]. Внесение эритроцитов в сульфатную среду приводит к перераспределению большей части транспортных сайтов на внешнюю сторону

and increasing concentration of sucrose. There also occurs blocking of both phases of a *pH*-curve (Fig. 5, *б*). Inhibition of the second phase is nearly complete under the concentrations of sulfate of 2 mol/l, and of sucrose — 1.2 mol/l, while the acidization phase is blocked only partially.

DIDS is a representative of stylbene inhibitors, which bind with the transport site of the anion channel [4, 6]. Dipyridamole in its origin is a blocking agent of the channels of access of anions to the transport site [5]. On the other hand, it was found that dipyridamole competes with dibenzamyrostylbene disulphonate on a stylbene-binding site and that the inhibitory ability of dipyridamole depends on the availability of chlorine anions in the incubation medium [11].

The exchange transport of chloride for sulfate, represented by the alkalinization phase, is more sensitive to the inhibitors as compared with a channel discharge of chloride at the first phase, which is not blocked by dipyridamole (Fig. 2, *a*). This is indicative of the fact that two types of the anion transport possess differing mechanisms. The maximum rate of the sulfate transport in red cells is realized at the value of *pH* of 6.3 [3, 15]. This magnitude correlates to the beginning of the phase of alkalinization of the cell suspension in the medium, containing 120 mmol/l sodium sulfate (Fig. 1, *a*). However, availability of the inhibitors or reduction in the concentration of sodium sulfate bring about a shift in the *pH* value, after which the transport of the above anion starts (Figs. 1, 2). That is why the interrelation between two types of transport may be determined not only by the *pH* values of the red cell suspension.

Sulfonate has a comparable with chloride affinity for a transport site, and its binding does not depend on the *pH* of the incubation medium [3]. This testifies to the fact that binding of the given anion doe not prevent clear discharge of chloride at the first phase. Blocking of the channels of access to a transport site by dipyridamole does not also prevent the outgoing flow of chloride. The phase of acidization becomes stronger manifested (see Fig. 2, *a*). It follows from the above that discharge of chlorine anions out of the cell by the gradient of electrochemical potential at the phase of acidization is realized without involvement of the transport site, using a channel mechanism. Moreover, substrate channels of access of sulfate to the transport site from the outer side of the membrane are not a part of the channel during a channel discharge of chlorine anions out of the cell. Further growth in the manifestation of the acidization phase in the presence of dipyridamole, which closes the access of sulfate to the transport site, may be additionally determined by the transport of chloride by the type of the carrier. Simultaneous availability of the channel-type transport and transport by the type of the carrier was identified when studying clear flows of chlorine out of red cells into a chlorine-free medium [7].

Sequence of phases of clear and exchange transport of chlorine anions out of the cell under these condi-

Матеріал, захищений авторським правом

мембраны (за счет быстро транспортируемого аниона хлора), которые оккупируются медленно переносимым сульфатом. Однако транспорт последнего инициируется после сдвига *pH* суспензии в кислую сторону вследствие выхода анионов хлора (см. рис. 1, *а*). Следовательно, выход хлорида в фазе закисления может происходить при фиксированном транспортном сайте на внешней стороне мембраны. Подобный тип транспорта, как уже было отмечено, осуществляется в условиях существования градиентов электрохимического потенциала для анионов хлора [7]. Лимитирующим шагом хлоридно-сульфатного обмена является перенос сульфата, так как скорость его транспорта на 4 порядка ниже, чем у хлорида [3]. Поэтому блокирование указанного обмена должно проявляться за счет торможения шага входа сульфата. При такой ситуации обменный тип транспорта может переключаться на канальный перенос анионов хлора из клетки, что проявляется в большем закислении первой фазы *pH*-кривой в присутствии дипиридамола и низких концентраций ДИДС (см. рис. 2). ДИДС в сравнении с дипиридамолом ингибирует как фазу защелачивания, так и фазу закисления в сульфатной среде (см. рис. 2, *б*). Кроме того, он значительно блокирует закисление в сахарозной среде, не содержащей анионов хлора (рис. 4, *б*). Блокирование фазы защелачивания происходит при концентрациях ДИДС до 1–1,5 мкмоль/л, тогда как фаза закисления ингибируется при концентрации блокатора выше указанного значения. Это может свидетельствовать о том, что существует два типа мест связывания ингибитора, различающихся по сродству к ДИДС. Связывание блокатора с сайтами первого типа приводит к ингибированию входа сульфата в клетку, а ДИДС с сайтами второго типа вызывает блокирование канального выхода хлорида из клетки как в сульфатной, так и в сахарозной среде (рис. 4, *б*). Однако исследования с динитростильбендисульфонатом, обратимым ингибитором, аналогом ДИДС, выявили существование одного типа мест связывания с константой диссоциации K_d, равной 0,084 мкмоль/л [9]. Использование флюоресцентного аналога бензамидостильбендисульфоната также показало наличие одного типа сайтов связывания с K_d = 1,3 мкмоль/л [12]. Следовательно, различная чувствительность фаз закисления и защелачивания к ингибитору анионного транспорта ДИДС определяется разной чувствительностью канального и обменного типов транспорта анионов. Сродство стильбеновых ингибиторов к анионному каналу будет повышаться при перераспределении транспортного сайта на внешнюю сторону мембраны [9]. В случае канального переноса анионов хлора из клетки основное количество транспортного сайта локализуется на внешней стороне мембраны [7]. Однако в этом случае (см. рис. 2) чувствительность данного вида транспорта к ингибиторам

tions may be accounted for by the exchange mechanism. According to this mechanism the exchange of the intracellular anion for the extracellular one occurs sequentially [3]. Introduction of red cells into a sulfate medium results in re-distribution of most transport sites onto the outer side of the membrane (due to rapidly transported chlorine anion), which are occupied by slow transported sulfate. However, transport of the latter is initiated after a shift of the suspension towards the acid side due to discharge of chlorine anions (see Fig. 1, *a*). Hence, discharge of chloride at the acidization phase may occur on the fixed transport site on the outer side of the membrane. This type of transport, as reported above, is realized when the gradients of electrochemical potential for chlorine anions are available [7]. A limiting factor of a chloride-sulfate exchange is transfer of sulfate, since the rate of its transport is by 4-fold lower as compared with that of chloride [3]. That is why blocking of the said exchange should be manifested by slowing down of the sulfate step of inflow. In this situation the exchange type of transport may be switched over to a channel-type transfer of chlorine anions out of the cell, which is manifested by a stronger acidization of the first phase of a *pH*-curve in the presence of dipyridamole and low concentrations of DIDS (Fig. 2). DIDS as compared with dipyridamole inhibits both the alkalinization phase and acidization phase in a sulfate medium (Fig. 2, *б*). Besides, it strongly inhibits acidization in a sucrose medium, which does not contain chlorine anions (Fig. 4, *б*). Blocking of the alkalinization phase occurs when the DIDS concentrations are as high as 1–1.5 μmol/l, while the acidization phase is inhibited when the concentration of the blocking agent exceeds the above values. This may be indicative of the fact that there exists two types of the inhibitor binding sites, which differ in their affinity for DIDS. Binding of the blocking agent with the sites of the first type results in the inhibition of the sulfate inflow into the cell, while binding of DIDS with the sites of the second type brings about blocking of a channel-type outflow of chloride out of the cell both in sulfate and sucrose media (Fig. 4, *б*). However, the studies with dinitrostylbene disulphonate, a reversible inhibitor, which is similar to DIDS, revealed the existence of one type of the binding sites with a dissociation constant K_d, equal to 0.084 μmol/l [9]. Application of a fluorescent analogue benzamidostylbene disulphonate also demonstrated the availability of one type of the binding sites with a binding constant K_d – 1.3 μmol/l [12]. Hence, different susceptibility of the phases of acidization and alkalinization to the inhibitor of anion transport DIDS is determined by different susceptibility of the channel-type and exchange types of anion transport. The affinity of stylbene inhibitors to the anion channel will increase when re-distributing a transport site to the outer side of the membrane [9]. In case of a channel-type transfer of chlorine anions out of the cell the bulk of the transport site is localized

Матеріал, захищений авторським правом

снижается по сравнению с обменным типом. Итак, различная чувствительность к ингибиторам двух видов транспорта не объясняется распределением субстрат-связывающих сайтов. Данную ситуацию можно объяснить моделью переносчика, транспортный цикл которого сопровождается значительными конформационными флуктуациями гидрофобных сегментов белка полосы 3 [8]. При таких обстоятельствах ингибитор будет не только блокировать транспортный сайт, но и тормозить конформационную перестройку фрагментов переносчика, вследствие которой происходит транслокация комплекса анион-транспортный сайт [3]. Канальный механизм транспорта не включает конформационную переориентацию фрагментов белка полосы 3 и происходит при фиксированном транспортном сайте на внешней или внутренней стороне мембраны [7]. В данном случае связывание ингибитора не приводит к блокированию транспорта аниона. Если количество ингибитора становится выше его концентрации, необходимой для полной оккупации транспортного сайта, и блокатор заполняет канал, то уже происходит ингибирование канального механизма, что, вероятно, и выявляется при повышении концентрации ДИДС в среде инкубации выше 1–1,5 мкмоль/л (см. рис. 2, *б*). В этом отношении при канальном типе транспорта анионов ДИДС можно дополнительно охарактеризовать как блокатор анионного канала.

Результаты, полученные с дипиридамолом, также могут свидетельствовать о существовании двух типов мест связывания для данного ингибитора. Взаимодействие с сайтами первого типа приводит к блокированию фазы защелачивания в сульфатной среде (см. рис. 2, *а*). С сайтами второго типа дипиридамол взаимодействует только в присутствии анионов хлора, что и выявляется в блокировании закисления суспензии клеток в среде, содержащей сахарозу и NaCl (рис. 4, *а*). Однако согласно [11] дипиридамол и ДИДС связываются с белком полосы 3 в стехиометрии 1:1 и конкурируют на одном связывающем сайте. Причиной блокирования транспорта сульфата в эритроциты дипиридамолом может являться канальный выброс анионов хлора в первой фазе, который и инициирует связывание ингибитора с анионным каналом к началу второй фазы. Исследование такого транспорта в среде, содержащей трис-буфер, не выявляет изначального закисления и при этом отмечается только защелачивание, связанное с хлоридно-сульфатным обменом [10]. Видимо, по этой причине не отмечается блокирующее действие дипиридамола на транспорт сульфата [11]. Таким образом, разная чувствительность двух видов транспорта к дипиридамолу, как и к ДИДС, может определяться различиями в механизмах переноса анионов. Исходя из этого, можно сказать, что дипиридамол, как и ДИДС, является смешанным ингибитором.

К осмотическому воздействию обмен анионов хлора на сульфат, представленный фазой защелачивания, более чувствителен, чем канальная проводимость. Вероятно, механизм пространственной переориентации гидрофобных сегментов белка полосы 3 в транспортном цикле обмена анионов более уязвим

on the outer side of the membrane [7]. In this case, however (see Fig. 2), the susceptibility of the given type of transport to inhibitors is reduced as compared with the exchanged type. Hence, different susceptibility to the inhibitors of two types of transport cannot be accounted for by the distribution of substrate-binding sites. This situation is nicely interpreted within the frame of the model of a carrier, the transport cycle of which is accompanied by significant conformational fluctuations of hydrophobic segments of band 3 protein [8]. Under these circumstances the inhibitor will block not only the transport site but will also slow down conformational re-arrangement of the carrier fragments, due to which the anion-transport site complex is translocated [3]. A channel-type mechanism of transport does not involve conformational re-orientation of band 3 protein fragments, and it is realized when the transport site is fixed on the outer or inner side of the membrane [7]. In this case binding of the inhibitor does not result in blocking of the anion transport. If the amount of the inhibitor exceeds its concentration, which is required for complete occupation of the transport site and a blocking agent fills in the channel, then there occurs the inhibition of a channel-type mechanism, which, apparently, is manifested when rising the DIDS concentration in the incubation medium over 1–1.5 μmol/l (see Fig. 2, *б*). In this respect under a channel-type of the anion transport DIDS may be additionally characterized as a blocking agent of the anion channel.

The results with dipyridamole may also support the existence of two types of binding sites for the given inhibitor. Interaction with the sites of the first type results in blocking of the alkalinization phase in a sulfate medium (Fig. 2, *а*). With the sites of the second type dipyridamole interacts only in the presence of chlorine anions, which is manifested by blocking acidization of the cell suspension in the medium, containing sucrose and NaCl (Fig. 4, *а*). However, as reported elsewhere [11], dipyridamole and DIDS bind with band 3 protein in a 1:1 stoichiometry, and compete at one and the same binding site. The reason for blocking sulfate transport into red cells by dipyridamole may be a channel discharge of chlorine anions at the first phase, which initiates binding of the inhibitor with the anion channel by the beginning of the second phase. A study of such a transport in a medium contained a tris-buffer does not reveal any original acidization, while only alkalinization is identified, which relates to a chloride-sulfate exchange [10]. Apparently, due to this a blocking action of dipyridamole onto a sulfate transport is not reported [11]. Thus, different susceptibility of two types of transport to dipyridamole, alike DIDS, may be accounted for by the differences in the mechanisms of the anion transfer. Judging from the above it may be concluded dipyridamole, alike DIDS, is the inhibitor of the mixed type.

The exchange of chlorine anions for sulfate, represented by the alkalinization phase, is more susceptible to osmotic exposure as compared with a channel-type conductivity. Apparently, the mechanism of spatial re-orientation of hydrophobic segments of band 3 pro-

Матеріал, захищений авторським правом

при деформирующем воздействии гипертонической среды на мембрану, чем выход анионов хлора при канальном механизме, который не включает конформационных изменений переносчика.

Таким образом, анализ результатов, полученных при использовании ингибиторов, позволяет предположить, что транспорт анионов хлора из клеток в фазе закисления осуществляется по канальному механизму, тогда как транспорт сульфата в клетку в фазе защелачивания производится по обменному механизму при обмене хлорида на внеклеточный сульфат и протон. Обменный транспорт более чувствителен как к ингибиторам, так и к гипертоническому воздействию.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бондаренко В. А.* Развитие и предупреждение температурного шока эритроцитов: Автореф. дис. ... докт. биол. наук.– Харьков, 1988.– 28 с.
2. *Cabantchik Z. I., Baruch D., Keren-Zur Y. et al.* The modulatory effect of membrane Viscosity on structural and functional properties of the anion exchange protein of human erythrocytes // Memb. Biochem.– 1986.– 6, № 3.– P. 197–216.
3. *Cabantchik Z. I., Knauf P. A., Rothstein A.* The anion transport sistem of the red blood cell // Biochim. Biophys. Acta.– 1978.– 515.– P. 239–302
4. *Falke J. J., Chan S. I.* Molecular mechanisms of band 3 inhibitors. 1. Transport site inhibitors // Biochemistry.– 1986.– 25.– P. 7888–7894.
5. *Falke J. J., Chan S. I.* Molecular mechanisms of band 3 inhibitors. 2. Channel blockers // Biochemistry.– 1986.– 25.– P. 7895–7898.
6. *Frohlich O.* The external anion binding site of the human erythrocyte anion transporter: DNDS binding and competition with chloride // J. Membrane Biol.– 1982.– 65, № 1–2.– P. 111–123.
7. *Frohlich O.* Relative contributions of the slippage and tunneling mechanisms to anion net efflux from human erythrocytes // J. Gen. Physiol.– 1984.– 84.– P. 877–893.
8. *Glibowika M., Winckler B., Aranibar N. et al.* Temperature dependence of anion transport in the human red blood cell // Biochim. Biophys. Acta.– 1988.– 946.– P. 345–358.
9. *Jennings M. L.* Stoichiometry of a half-turnover of band 3, the chloride transport protein of human erythrocytes // J. Gen. Physiol.– 1982.– 79.– P. 169–185.
10. *Jennings M. L., Al-Rhaiyel S.* Modification of a carboxyl group that appears to cross the permeability barrier in the red blood cell anion transporter // J. Gen. Physiol.– 1988.– 92.– P. 161–178.
11. *Legrum B., Passow H.* Inhibition of inorganic anion transport across the human red blood cell membrane by chloride-dependent association of dipyridamole with a stilbene disulfonate binding site on the band 3 protein // Biochim. Biophys. Acta.– 1989.– 979, № 2.– P. 193–207.
12. *Macara I. G., Cantley L. C.* Mechanism of anion exchange across the red cell membrane by band 3: Interactions between stilbenedisulfonate and NAP-taurine binding sites // Biochemistry.– 1981.– 20.– P. 5695–5701.
13. *Red* cell membranes — a methodological approach / Ed. by J. C. Ellory, J. D. Young.– London: Acad. press, 1982.– 369 p.
14. *Schnell K. F.* On the mechanism of inhibition of the sulfate transfer across the human erythrocyte membrane // Biochim. Biophys. Acta.– 1972.– 282.– P. 265–276.
15. *Schnell K. F.* Anion transport across the red blood cell membrane mediated by dielectric pores // J. Membrane Biol.– 1977.– 37.– P. 99–136.

Поступила 10.06.98

tein in the transport cycle of the anion exchange is more vulnerable under the deforming exposure of the membrane to a hypertonic medium as compared with a discharge of chlorine anions by a channel-type mechanism, which does not involve conformational changes of the carrier.

Thus, analysis of the results of experiments with the inhibitors of the anion transport makes it possible to assume that transport of chlorine anions out of the cells at the acidization phase is realized by a channel-type mechanism, while transport of sulfate into the cell at the alkalinization phase occurs by the exchange-type mechanism during exchange of chloride for extracellular sulfate and proton. The exchange transport is more susceptible both to the inhibitors and hypertonic exposure.

REFERENCES

1. *Bondarenko V. A.* Development and prevention of temperature stress in red cells: Abstr. Thesis Doctor. Biol. Sci.– Kharkov, 1988.– 28 p.
2. *Cabantchik Z. I., Baruch D., Keren-Zur Y. et al.* The modulatory effect of membrane Viscosity on structural and functional properties of the anion exchange protein of human erythrocytes // Memb. Biochem.– 1986.– 6, № 3.– P. 197–216.
3. *Cabantchik Z. I., Knauf P. A., Rothstein A.* The anion transport sistem of the red blood cell // Biochim. Biophys. Acta.– 1978.– 515.– P. 239–302
4. *Falke J. J., Chan S. I.* Molecular mechanisms of band 3 inhibitors. 1. Transport site inhibitors // Biochemistry.– 1986.– 25.– P. 7888–7894.
5. *Falke J. J., Chan S. I.* Molecular mechanisms of band 3 inhibitors. 2. Channel blockers // Biochemistry.– 1986.– 25.– P. 7895–7898.
6. *Frohlich O.* The external anion binding site of the human erythrocyte anion transporter: DNDS binding and competition with chloride // J. Membrane Biol.– 1982.– 65, № 1–2.– P. 111–123.
7. *Frohlich O.* Relative contributions of the slippage and tunneling mechanisms to anion net efflux from human erythrocytes // J. Gen. Physiol.– 1984.– 84.– P. 877–893.
8. *Glibowika M., Winckler B., Aranibar N. et al.* Temperature dependence of anion transport in the human red blood cell // Biochim. Biophys. Acta.– 1988.– 946.– P. 345–358.
9. *Jennings M. L.* Stoichiometry of a half-turnover of band 3, the chloride transport protein of human erythrocytes // J. Gen. Physiol.– 1982.– 79.– P. 169–185.
10. *Jennings M. L., Al-Rhaiyel S.* Modification of a carboxyl group that appears to cross the permeability barrier in the red blood cell anion transporter // J. Gen. Physiol.– 1988.– 92.– P. 161–178.
11. *Legrum B., Passow H.* Inhibition of inorganic anion transport across the human red blood cell membrane by chloride-dependent association of dipyridamole with a stilbene disulfonate binding site on the band 3 protein // Biochim. Biophys. Acta.– 1989.– 979, № 2.– P. 193–207.
12. *Macara I. G., Cantley L. C.* Mechanism of anion exchange across the red cell membrane by band 3: Interactions between stilbenedisulfonate and NAP-taurine binding sites // Biochemistry.– 1981.– 20.– P. 5695–5701.
13. *Red* cell membranes — a methodological approach / Ed. by J. C. Ellory, J. D. Young.– London: Acad. press, 1982.– 369 p.
14. *Schnell K. F.* On the mechanism of inhibition of the sulfate transfer across the human erythrocyte membrane // Biochim. Biophys. Acta.– 1972.– 282.– P. 265–276.
15. *Schnell K. F.* Anion transport across the red blood cell membrane mediated by dielectric pores // J. Membrane Biol.– 1977.– 37.– P. 99–136.

Accepted in 10.06.98

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 591.315: 57.085.2: 547.422

UDC 591.315: 57.085.2: 547.422

Осмотическое поведение эмбрионов мыши в гипертонических растворах 1,2-пропандиола и его оксиэтилированных производных

Е. И. СМОЛЬЯНИНОВА, Г. Ф. ЖЕГУНОВ, О. В. ХРОМЕНКОВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Osmotic Behavior of Murine Embryos in Hypertonic Solutions of 1.2-Propanediol and its Oxyethylated Derivatives

E. I. SMOLYANINOVA, G. F. ZHEGUNOV, O. B. KHROMENKOVA

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

Проведено микроскопическое исследование осмотического поведения эмбрионов мыши в растворах 1,2-пропандиола и оксиэтилированных пропандиолов (ОЭПД). Показано, что растворы ОЭПД с м.м. 228 и 506 обладают, по сравнению с 1,2-пропандиолом, высокой осмотической активностью к клеткам данного типа.

Проведено мікроскопічне дослідження осмотичної поведінки ембріонів миші у розчинах 1,2-пропандіолу і оксиетильованих пропандіолів (ОЕПД). Показано, що розчини ОЕПД з м.м. 228 і 506 мають, у порівнянні з 1,2-пропандіолом, високу осмотичну активність до клітин цього типу.

The authors conducted a microscopic study of the osmotic behavior of murine embryos in the solutions of 1.2-PD and oxyethylated propanediols (OEPD). It was shown that solutions of OEPD with the molecular masses of 228 and 506 possess high osmotic activities to the cells of the given type as compared with 1.2-propanediol.

Выбор криозащитных веществ и условий эквилибрации клеток в средах криоконсервирования имеет большое значение при разработке методов замораживания и долгосрочного хранения клеточных суспензий. В связи с этим важным звеном криобиологических исследований являются модельные эксперименты, направленные на изучение осмотических процессов в системе "клетка–внеклеточный раствор", выявление корреляций между химической структурой криопротектора, его криопротекторной активностью и морфофункциональной сохранностью клетки.

Цель настоящего исследования – сравнительное изучение осмотического поведения бластомеров эмбрионов мыши в гипертонических растворах 1,2-пропандиола (1,2-ПД) и ОЭПД со средними молекулярными массами 228 и 506. В задачи исследования входило изучение кинетики изменения клеточного объема в зависимости от состава и концентрации криозащитной среды.

Объектом исследования служили двухклеточные эмбрионы мыши, полученные от самок линии СВА, подвергнутых суперовуляции. Для этого самкам внутрибрюшинно вводили 12 МЕ ГСЖК и, спустя 46–48 ч, 8 МЕ чХГ. Затем самок подсаживали к самцам той же линии для спаривания. Клетки получали путем промывания отпрепарированных яйцеводов самок (48 ч после спаривания) физиологической средой Дюльбекко при комнатной температуре [1].

В работе использовали 10- и 20%-е растворы криопротекторов 1,2-ПД и ОЭПД, синтезированных в ИПКиК НАН Украины.

Эмбрионы в малой капле среды Дюльбекко помещали в камеру микроскопа МПИ-5 (ограничивающую подсыхание образцов) и фотографировали.

Selection of cryoprotective substances and conditions of cell equilibration in cryopreservation media is of great importance when developing methods of freezing and long term storage of cell suspensions. Hence, an important link of cryobiological research are the model experiments, aimed at studying the osmotic processes with a "cell–intercellular solution" system; elaboration of correlations among chemical structure of a cryoprotectant, its cryoprotective activity and morphofunctional integrity of the cell.

The aim of the given research was to conduct a comparative study of osmotic behavior of blastomeres of murine embryos in hypertonic solutions of 1.2-propanediol (1.2-PD) and oxyethylated propanediols (OEPD) with average molecular masses of 228 and 506. The authors also intended to investigate kinetics of changes in the cell volume depending on the composition and concentration of a cryoprotective medium.

Two-cell murine embryos, harvested from female mice of a CBA line, exposed to superovulation, were used as objects of investigation. That is, female mice were intraperitoneally injected with 12 MU GSZK and, in 46–48 hours, with 8 MU CCG. Afterwards the females were joined by male mice of the same line for mating. The cells were collected by washing the prepared oviducts of the females (48 hours after mating) with a Dulbecco physiological saline at room temperature [1].

Solutions of the following cryoprotectants (in 10%- and 20%-concentrations) were used in the research: 1.2-PD and OEPD, synthesized at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine.

The embryos in small drops of a Dulbecco medium were placed into an MPI-5 microscope chamber (which limits drying of samples) and photographed. Then the solution under study was added directly into the chamber with the object, and the kinetics of os-

Матеріал, захищений авторським правом

Затем добавляли исследуемый раствор непосредственно в камеру с объектом и регистрировали кинетику осмотической реакции бластомеров, фотографируя их со скоростью 1 кадр в 3 с в течение 30 мин. Время контакта клетки с исследуемым раствором фиксировали секундомером.

Кинетику изменения клеточного объема изучали волюмометрическим методом [3]. Экспериментально определяли изменение площади сечения клетки во времени, аппроксимируя ее сферой. По динамике изменения относительной площади сечения клеток оценивали процессы массообмена между клеткой и окружающей ее средой [2].

Как видно из рисунка *б*, обезвоживание клеток во всех указанных растворах происходит уже в течение первых 30 с. При этом уровень обезвоживания в 10%-м растворе 1,2-ПД составлял 0,8 исходной площади сечения, тогда как в 10%-х растворах ОЭПД с м.м. 228 и 506 минимальная площадь обезвоживания клеток была 0,75 и 0,6 соответственно. При дальнейшей экспозиции в растворах 1,2-ПД и ОЭПД с м.м. 228 наблюдалось достаточно быстрое восстановление размеров бластомеров до первоначальных значений. В растворе 1,2-ПД время достижения исходной площади сечения составляло порядка 3 мин, а в растворе ОЭПД с м.м. 228 – 8–10 мин. В растворе ОЭПД с м.м. 506 в результате длительной экспозиции (30 мин) размеры бластомеров не восстанавливались до первоначальных и эмбрионы оставались в обезвоженном состоянии (рисунок *а*).

Следует отметить, что если в растворе 1,2-ПД превышения исходных размеров клетки не наблюдалось, то в растворе ОЭПД с м.м. 228 происходило их превышение примерно на 10%.

При увеличении концентрации указанных веществ до 20% (рисунок *б*) уровень обезвоживания и скорость обезвоживания клеток незначительно увеличивались для растворов 1,2-ПД и ОЭПД с м.м. 228 и довольно заметно – для раствора ОЭПД

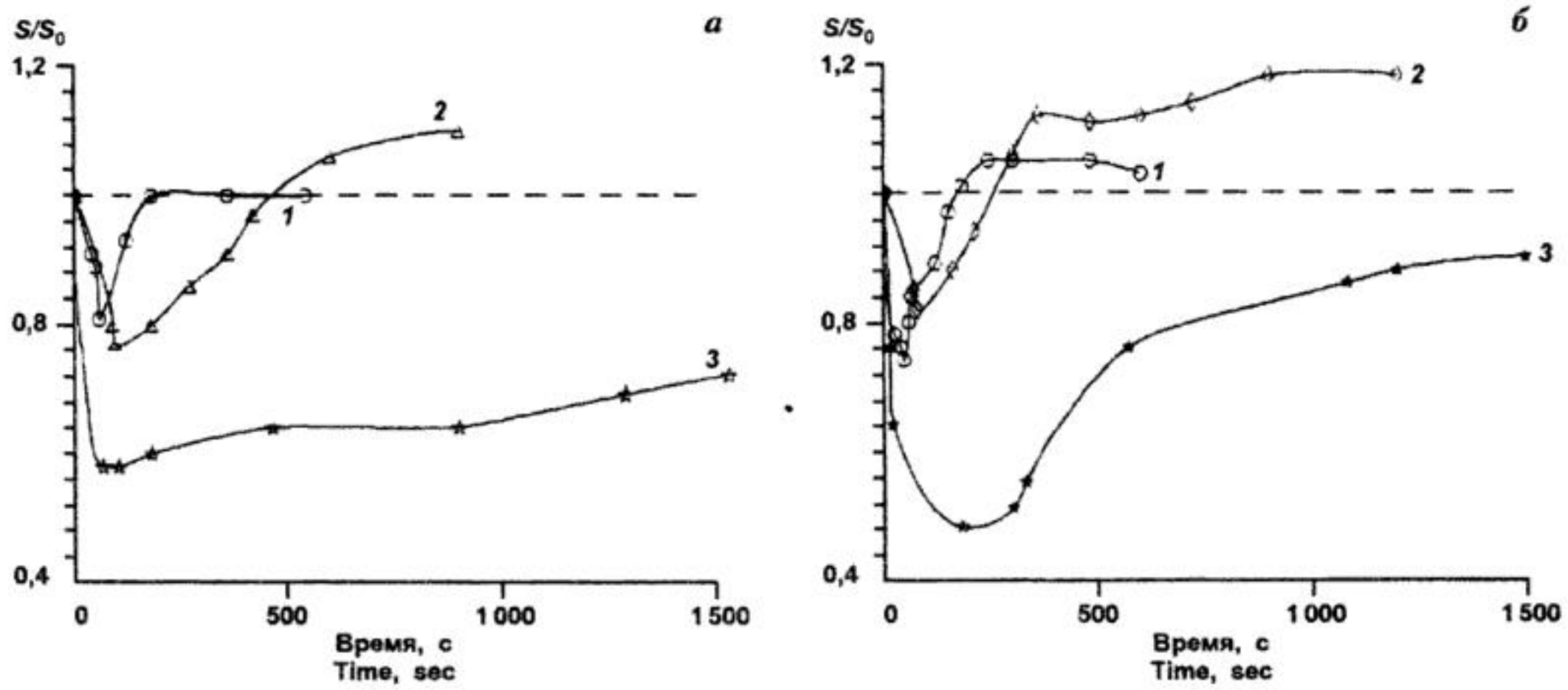
motic response of blastomeres was registered by making photos at a velocity of 1 shot per 3 sec for 30 min. Duration of the contact of the cell with the studied solution was measured with a stop-watch.

The kinetics of changes in cell volumes was studied with a volumetric method [3]. A time course change in the cell cross-section was determined experimentally, the latter being approximated as a sphere. The processes of mass transfer between the cell and environment were evaluated by the dynamics of changes in the relative cross-section of the cell [2].

As it follows from Fig. *б* dehydration of cells in all the three said solutions started already during the first 30 sec. The level of dehydration in the 10%-solution of 1.2-PD was 0.8 of the original cross-section, while in the 10%-solutions with OEPD with molecular masses of 228 and 506 the minimum square of dehydration was 0.75 and 0.6, respectively. Further exposure in the solutions of 1.2-PD and OEPD with the molecular mass of 228 resulted in a rapid enough recovery of blastomeres until the original values. In the solution of 1.2-PD a period of time, required for reaching the original cross-section, was 3 min, while in the solution of OEPD with the molecular mass of 228 – 8–10 min. In the solution of OEPD with the molecular mass of 506 due to a long term exposure (30 min) the dimensions of blastomeres were not restored until the original ones and embryos remained in the dehydrated state (Fig. *a*).

It should be noted that if in the solution of 1.2-PD the authors did not observe excessive recovery of the original dimensions of the cell, then in the solution of OEPD with the molecular mass of 228 they were exceeded by nearly 10%.

A rise in the concentrations of the said substances up to 20% (Fig. *б*) the level and rate of dehydration of cells increased insignificantly for the solutions of 1.2-PD and OEPD with the molecular mass of 228, while for the solution of OEPD with the molecular mass of 506 they increased greatly. The durations of recovery of the origi-



Характерная зависимость относительной площади изображения бластомера двухклеточного эмбриона мыши от времени экспозиции: *а* – в 10%-х, *б* – 20%-х растворах 1,2-ПД и ОЭПД (*S* – площадь сечения бластомера в текущий момент времени, S_0 – исходное значение площади сечения бластомера): *1* – 1,2-ПД; *2* – ОЭПД с м.м. 228; *3* – ОЭПД с м.м. 506.

Characteristic dependency of relative square of image of blastomere of two-cell murine embryo on the time of exposure *а* – in 10%-, *б* – in 20%-solutions of 1.2-PD and OEPD (*S* is the blasomere cross-section in the given time moment, S_0 is the start value of the blasomere cross-section): *1* – 1.2-PD; *2* – OEPD with the molecular mass of 228; *3* – OEPD with the molecular mass of 506.

Матеріал, захищений авторським правом

с м.м. 506. Времена восстановления клетками исходных размеров в 20%-х растворах 1,2-ПД и ОЭПД с м.м. 228 практически не отличались от соответствующих времен в 10%-х растворах. Дальнейшая экспозиция приводила к набуханию клеток не только в растворе ОЭПД с м.м. 228, но и в 1,2-ПД. В растворе ОЭПД с м.м. 506 в 20%-й концентрации, как и в 10%-й, происходило достаточно выраженное обезвоживание бластомеров. В дальнейшем наблюдалось увеличение относительной площади бластомеров, более значительное, чем в 10%-м растворе. Однако и в 20%-м растворе ОЭПД с м.м. 506, аналогично 10%-му, после 30-минутной экспозиции бластомеры не достигали первоначального объема.

Длительная эквилибрация эмбрионов в растворах 1,2-ПД и ОЭПД с м.м. 228 нередко сопровождалась морфологическими изменениями. После достижения исходной площади сечения или ее превышения на поверхности бластомеров появлялись мембранные пузыри, которые постепенно увеличивались в размерах как за счет роста, так и слияния мелких в более крупные.

Таким образом, установлено, что, несмотря на достаточно хорошую проницаемость, растворы 1,2-ПД и ОЭПД с м.м. 228 опасны из-за высокой осмотической активности. Превышение исходных размеров бластомерами при эквилибрации в растворах 12,2-ПД 20%-й концентрации и ОЭПД с м.м. 228 в обеих концентрациях можно объяснить потерей избирательных свойств плазматическими мембранами клеток в результате осмотического стресса и поступлением внутрь клеток внеклеточного раствора. Частичное восстановление размеров бластомеров в растворах ОЭПД с м.м. 506 свидетельствует о наличии в его составе полимергомологов с м.м. меньше 300. (В литературе отсутствуют сведения об использовании веществ с м.м. больше 300 как проникающих криопротекторов). Резкое изменение наклона кривой *3* (рисунок *б*) через 5 мин экспозиции, по-видимому, может свидетельствовать о поступлении внутрь клетки низкомолекулярных компонентов криопротектора и сопутствующего потока воды.

Анализ полученных данных показывает, что применение 20%-го 1,2-ПД требует дозированного добавления к эмбрионам на этапе эквилибрации, чтобы избежать осмотического стресса; использование ОЭПД с м.м. 228 и 506 в качестве криопротекторов для эмбрионов, по-видимому, не перспективно.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Биология* развития млекопитающих. Методы / Под ред. М. Манк.– М.: Мир, 1990.– 406 с.
2. *Гордиенко Е. А., Пушкарь Н. С.* Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий.– Киев: Наук. думка, 1994.– 142 с.
3. *Кулешова Л. Г.* Кинетика льдообразования в живых клетках и модельных системах: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.– Харьков, 1983.– 24 с.

Поступила 16.03.99

nal dimensions by the cells in the 20%-solutions of 1.2-PD and OEPD with the molecular mass of 228 did not practically differ from the corresponding figures in the 10%-solutions. Further exposure resulted in swelling of cells not only in the solution of OEPD with the molecular mass of 228 but also in the solution of 1.2-PD. In the solution of OEPD with the molecular mass of 506 both in the 20%- and 10%-concentrations there occurred a significantly manifested dehydration of blastomeres. Subsequently the authors identified an increase in the relative square of blastomeres, which was more significant as compared with that in the 10%-solution. However, in the 20%-solution of OEPD with the molecular mass of 506, alike 10%-solution, following 30-min exposure blastomeres did not reach their original volumes.

Long term equilibration of embryos in the solutions of 1.2-PD and OEPD with the molecular mass of 228 was not infrequently accompanied by morphological alterations. Upon reaching the original cross-section or exceeding it the membrane bubbles were evidenced on the surface of blastomeres, which gradually grew up in size both due to growth and agglomeration of smaller bubbles into larger ones.

Thus, it was found that despite high enough permeabilities the solutions of 1.2-PD and OEPD with the molecular mass of 228 are dangerous due to their high osmotic activities. Excessing of the original dimensions by blastomeres during equilibration in the 20%-solutions of 1.2-PD and OEPD with the molecular mass of 228 in both concentrations may be accounted for by the loss of selective properties by the cell plasma membranes due to osmotic stress and entry of the intercellular solution inside the cell. Partial recovery of the blastomere dimensions in the solutions of OEPD with the molecular mass of 506 indicates the availability of polymerehomologues with molecular masses below 300 within its composition (the authors failed to find any reports on using the substances with molecular masses over 300 as penetrating cryoprotectants). Abrupt change in the inclination angle of curve *3* (Fig. *б*) in 5 min of exposure may indicate, apparently, on the entry of the low molecular components of the cryoprotectant and accompanying water inflow inside the cell.

Analysis of the data obtained demonstrates that application of 20%-1.2-PD requires its dosed addition to embryos at the stage of equilibration to avoid the accompanying osmotic stress; application of OEPD with the molecular masses of 228 and 506 as cryoprotectants for embryos, apparently, has no prospects.

REFERENCES

1. *Biology* of mammalian development. Methods / Ed. by M.Mank.– M.: Mir publ., 1990.– 406 p.
2. *Gordienko E. A., Pushkar N. S.* Physical grounds of low temperature preservation of cell suspensions.– Kiev: Naukova dumka publ., 1994.– 142 p.
3. *Kuleshova L. G.* Kinetics of nucleation in living cells and model systems: Abstr. Thesis Cand. Biol. Sci.– Kharkov, 1983.– 24 p.

Accepted in 16.03.99

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.086.83: 57.043

UDC 57.086.83: 57.043

Обзор методов криоконсервирования культуры растительных клеток

Т. Ф. СТРИБУЛЬ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

A Review of the Methods of Cryopreservation of the Plant Cell Culture

T. F. STRIBUL

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

Представлены данные об исследованиях в области низкотемпературного консервирования культуры клеток и тканей, проводившихся последние 15 лет. Результат криоконсервирования зависит от соблюдения на каждом этапе условий замораживания, которые направлены на обеспечение минимума повреждений клеточных структур. Показана возможность широкого практического использования техники культуры ткани *in vitro* как способа интенсификации селекционного процесса и оздоровления растений. Приведены обоснования необходимости криоконсервирования культивируемых растительных клеток и тканей как единственной возможности неограниченно долгого хранения генофонда растений.

Представлено дані про дослідження в галузі низькотемпературного консервування культури клітин і тканин, які виконувалися останні 15 років. Результат кріоконсервування залежить від дотримання на кожному етапі необхідних умов заморожування, які спрямовані на забезпечення мінімуму пошкоджень клітинних структур. Показана можливість широкого практичного використання техніки культури тканини *in vitro* як способу інтенсифікації селекційного процесу та оздоровлення рослин. Приведено обгрунтування необхідності кріоконсервування рослинних клітин і тканин, які культивуються, як єдину можливість необмежено тривалого зберігання генофонду рослин.

There are submitted the data on the research in the field of low temperature preservation of the cultures of cells and tissues, conducted over the recent 15 years. The outcome of cryopreservation depends on observing the conditions of freezing at every stage, which are directed at providing for the minimum injuries to the cell structures. A possibility of wide practical application of the technique of the cell culture *in vitro* as a means for intensifying the process of selection and improvement of plants is verified. The grounds are given for the necessity to cryopreserve the plant cells and tissues being cultured which is considered to be the only possible unlimited long-term storage of the plant gene pool.

История метода культуры изолированных тканей растений насчитывает около 70 лет. Основа этого метода была заложена Gautheret [26] в 1934 г. Окончательно метод разработали в 1939 г. независимо друг от друга Gautheret, Nobecourt и Whitl. В настоящее время при размножении растений в системе *in vitro* используют культуру отдельных органов, культуры тканей и клеточных суспензий.

Культура клеток и тканей растений имеет широкое практическое применение в сельскохозяйственном производстве и биотехнологической промышленности. Известный факт отсутствия заражения вирусами меристематической ткани используется для оздоровления растений от вирусов и патогенных микроорганизмов с помощью культуры ткани *in vitro* [1, 31]. Метод культуры клеток и тканей незаменим при размножении элитных, редких и медленно размножающихся форм растений.

Клеточные технологии используются для получения биологически активных веществ растительного происхождения и экономически важных продуктов [2, 6, 34].

The history of the method of the isolated plant tissues dates back some as far as some 70 years. This method was first developed by Gautheret [26] in 1934, and in 1939 it was improved by Gautheret, Nobecourt and Whitl independently of each other. Currently reproduction of plants in the *in vitro* system involves the cultures of separate organs, cultures of tissues and cell suspensions.

The cultures of plant cells and tissues have wide practical application in agriculture and biotechnological industry. A well-established fact of the missing viral infection of the meristemic tissue is used for improvement of plants and protecting them against viruses and pathogenic microorganisms with the help of the tissue culture *in vitro* [1, 31]. A method of the tissues of cells and tissues is indispensable for reproduction of elite, rare and slowly reproducible forms of plants.

Cell technologies are applied for harvesting of biologically active substances of plant origin and economically important products [2, 6, 34].

The advantages of microreproduction via the tissue culture consists in collecting a large number of plants

Матеріал, захищений авторським правом

Преимущества микроразмножения через культуру ткани заключаются в получении большого количества растений за короткий промежуток времени на относительно небольшой площади. Так, из одной инициали виноградного растения в результате клонирования можно получить 300 000 растений в год [3, 5].

Культивирование изолированных протопластов открывает широкие перспективы клеточной и генной инженерии по выведению новых сортов и гибридов сельскохозяйственных растений [11, 36, 37]. Методом культуры ткани можно получать растения, не размножающиеся вегетативно. Большое преимущество использования культур клеток и тканей также заключается в том, что работу по размножению растений можно вести круглый год.

Метод культивирования растительных эксплантатов предполагает выбор условий культивирования, от чего и зависит дифференциация выращиваемых клеток. Так, в культуре каллусных клеток можно осуществить меристематизацию, а это может привести к возникновению эмбриоидов и созданию нового растительного организма.

Из всего разнообразия систем культур *in vitro* остановимся на системе культуры ткани (меристемы). И хотя микроразмножение каждого вида растения имеет свои особенности, но можно отметить общие закономерности. Основу составляют питательные среды (преимущественно Murashige, Skoog, но возможны и некоторые другие среды в различных модификациях) из минеральных компонентов [35, 40]. Затем в зависимости от вида растения и поставленной задачи основную среду дополняют другими составляющими. Например, для образования и роста побегов из меристемы картофеля следует добавлять витамины группы В, а для побегообразования из меристемы винограда эти витамины не обязательны [4, 10, 18, 35].

В качестве углеводного питания обязательно присутствие сахаров (сахарозы, глюкозы и др.), причем на разных этапах формирования растения разное их количество. Так, для роста побегов картофеля, культивируемых из апикальных меристем, используют сахарозу в концентрации до 3% [16, 18, 24], для корнеобразования содержание сахаров несколько снижают (до 1–2%), а для образования клубней повышают до 8–10% [7]. При культивировании меристем винограда берут несколько меньшее содержание сахаров в среде (1–3%) [2, 25, 35, 47].

Важную роль в дифференциации и морфогенезе в культуре растительных тканей *in vitro* играют такие гормоны, как ауксины и цитокинины. Первые из них стимулируют корнеобразование, вторые – почкообразование [10, 15, 18, 30]. Так, для пролиферации побегов и почек при культивировании меристематической ткани винограда и картофеля используют кинетин и бензиламинопурин в количестве 1–2 мг/л [4, 10]. Введение в культуральную среду β-индолилуксусной или аминоук-

during a short period of time at a relatively small area. For example, one initial of the grape plant may produce some 300,000 plants a year by cloning [3, 5].

Culturing of the isolated protoplasts opens up wide prospects for the cell and gene engineering in growing of new species and hybrids of agricultural plants [11, 36, 37]. A method of the tissue culture allows to grow plants which are incapable of the vegetative reproduction. Another great advantage of applying the cultures of cells and tissues consists in the fact that reproduction of plants may proceed all the year round.

A method of culturing of the plant explants involves choosing of the conditions of culturing, on which differentiation of the cells being grown is dependent. For example, in the culture of the callous cells meristemization is possible, which may result in the development of embryoids and creation of the new plant organism.

Taking into account a diversity of the culture systems *in vitro* the author would like to draw particular attention to the system of the tissue culture (meristem). Though microreproduction of every species of plants has its own particular features, some common rules still may be identified. The major role is played by the nutrient media (mainly Murashige's and Skoog's, though some other media are sometimes applied in various modifications), which consist of the mineral components [35, 40]. Then, depending on the species of the plant and the task assigned, the basic medium is supplemented with the other components. For example, formation and growth of sprouts out of the potato meristem require addition of the vitamins of a B group, while for the formation of sprouts out of the grape meristem these vitamins are not necessary [4, 10, 18, 35].

The availability of sugars (sucrose, glucose, etc.) is strongly required as a carbohydrative nutrition. And at different stages their amounts differ. For example, for the growth of the potato sprouts, cultured out of the apical meristems, sucrose is applied in the concentration of up to 3% [16, 18, 24], formation of roots requires a somewhat lower amount of sugars (down to 1–2%), and for the formation of tubers the concentrations are increased up to 8–10% [7]. Culturing of the grape meristems involves a slightly lower content of sugars in the medium (1–3%) [2, 25, 35, 47].

An important role in differentiation and morphogenesis of the culture of plant tissues *in vitro* is played by such hormones as auxins and cytokinins. The former stimulate root formation, and the latter – bud formation [10, 15, 18, 30]. For example, kinetin and bezilaminopyrin in the amounts of 1–2 mg/l are applied for proliferation of sprouts and buds [4, 10]. Injection of the β-indoleacetic or aminoacetic acids in small amounts (up to 1 mg/l) facilitates successful root growth of the sprouts [4, 10].

Physical factors of growing – temperature, illumination, photoperiod – also affect the yield of culturing.

Матеріал, захищений авторським правом

сусной кислоты в небольших количествах (до 1 мг/л) способствует успешному укоренению побегов [4, 10].

Влияют на результат культивирования и физические факторы выращивания: температура, освещенность, фотопериод.

Полученные через культуру тканей растения необходимо сохранять определенное время, а ценные генотипы консервировать на довольно продолжительное время. Кроме того, известно, что культурам клеток *in vitro* присуща генетическая нестабильность: при длительном культивировании накапливаются изменения на генном, хромосомном и геномном уровнях [9].

Наиболее перспективными и надежными методами консервирования культивируемого материала являются криогенные методы. В состоянии глубокого охлаждения полностью прекращается обмен веществ и отсутствуют значительные физико-химические изменения в молекулах во время хранения. Суть метода криоконсервирования растительных клеток заключается в том, чтобы практически исключить кристаллизацию воды в клетке. Это можно достичь с помощью медленного замораживания, в результате которого клетка успевает потерять часть свободной воды. Вышедшая из клетки вода замерзает во внеклеточной среде, и происходят дегидратация и сжатие протопласта, чего можно избежать, используя сверхбыстрое замораживание. Однако при этом возможно появление очень мелких кристаллов льда в цитоплазме. Чтобы они не выросли до повреждающих размеров при рекристаллизации, необходимо быстрое размораживание [9]. Кроме того, успешному замораживанию растительных объектов способствует использование знаний о естественной закалке растений [14]. Перед замораживанием апексы или суспензии клеток растений подвергаются прекультивированию, которое заключается в выращивании их на питательной среде с сахарами (сахарозой, мальтозой, глюкозой и др.), аминокислотами и/или маннитом в концентрации 0,5–0,75 М [17, 34, 40] при пониженной температуре (0, 4, 5 °С) в течение от 1–2 ч [19, 23, 40, 43], 1 сут, 7 сут [17, 28, 29, 44] и до нескольких недель [33, 39].

Следующим этапом криоконсервирования является насыщение культивируемых клеток криопротектором. В качестве криопротекторов в большинстве случаев используются глицерин, диметилсульфоксид (ДМСО), полиэтиленгликоли (ПЭГ) плюс сахароза. Конечная концентрация ДМСО или глицерина варьирует от 3 до 15%, сахарозы – от 0,15 до 0,75 М [13, 17, 19, 22, 23, 27, 40, 41]. В последнее время для снижения осмотического действия солей в клетке чаще используют смеси криопротекторов. Например, 0,5 М ДМСО + 0,5 М глицерина + 1 М сахарозы для клеточной культуры наперстянки [34], 46 г/л глицерина + 39 г/л ДМСО + 342 г/л сахаро-

The plants, grown via the tissue culture, should be maintained for a certain period of time, while valuable gene pools are to be cryopreserved for a prolonged time. Besides, the culture cells *in vitro* are known to possess genetic instability: during long-term culturing the changes at the gene, chromosome and genome levels are accumulated [9].

The most promising and reliable methods of preservation of the material being cultured are cryogenic methods. In the state of profound cooling the exchange of substances is stopped completely and significant physical-chemical changes in the molecules are missing during storage. A method of cryopreservation of plant cells consists in the idea to completely eliminate water crystallization in the cell. This may be achieved by means of slow freezing, due to which the cell looses some free water. The water, which has outflown of the cell, freezes in the extracellular water. Though this is accompanied by dehydration and shrinking of the protoplast, which may be avoided by applying snap freezing; however, there may appear very small ice crystals in the cytoplasm. For them not to grow up to the damaging dimensions during recrystallization, rapid thawing is required [9]. Besides, successful freezing of plant systems is facilitated by applying the knowledge on the natural acclimation of plants [14]. Prior to freezing the apexes or suspensions of plant cells are exposed to pre-culturing, which consists in their growing on the nutrient media with sugars (sucrose, maltose, glucose, etc.), amino acids and/or mannit in the concentration of 0.5–0.75 M [17, 34, 40] at lowered temperature (0, 4, 5 °C) for 1–2 hours [19, 23, 40, 43], 1 day, 7 days [17, 28, 29, 44] and up to several weeks [33, 39].

The next stage of cryopreservation is saturation of the cells being cultured with a cryoprotectant. In most cases glycerol, dimethyl sulfoxide (DMSO), polyethylene glycols plus sucrose are used as cryoprotectants. Finite concentrations of DMSO or glycerol vary from 3 to 15%, sucrose – from 0.15 to 0.75 M [13, 17, 19, 22, 23, 27, 40, 41]. Lately the mixtures of cryoprotectants are often applied for reducing the osmotic action of salts in the cell. For example, 0.5 M DMSO + 0.5 M glycerol + 1 M sucrose are used for the cell culture of the digitalis [34], and 46 g/l glycerol + 39 g/l DMSO + 342 g/l sucrose + 10 g/l proline – for cryopreservation of the suspension of the artichoke cells [40], etc.

A technique of encapsulation–dehydration is applied in the current methods of cryopreservation of the cultures of plant cells and tissues [22, 35, 39, 45], which consists in the formation of drops of the system being preserved in the nutrient medium and other required additives, and placing them into an alginate coat. The encapsulated samples are then pre-cultured for some (2, 7 or 10) days successively in the media with increasing content of sucrose (from 0.3 to 1 M). A cryoprotectant is added in 1, 24 or 48 hours prior to the end of pre-culturing. Here the following solu-

Матеріал, захищений авторським правом

зы + 10 г/л пролина для криоконсервирования суспензии клеток артишока [40] и т.д.

В современных методах криоконсервирования культуры растительных клеток и тканей применяют технику капсулирования–дегидратации [22, 35, 39, 45], заключающуюся в образовании капель консервируемого объекта в питательной среде с криопротекторами и другими необходимыми добавками и помещении их в альгинатную оболочку. Капсулированные образцы затем прекультивируют несколько (2, 7 или 10) дней последовательно в средах с увеличивающимся содержанием сахарозы (от 0,3 до 1 М). Криопротектор добавляют за 1, 24 или 48 ч до конца прекультивации. При этом в качестве криопротектора часто используют составы: 30% глицерина + 15% этиленгликоля + 15% ДМСО или 50% глицерина + 50% этиленгликоля [29, 32, 35, 39].

Наиболее оптимальными режимами криоконсервирования растительных клеток являются программное замораживание в один или несколько этапов со строго определенными для каждого этапа скоростями и быстрый отогрев. Оптимальность скорости замораживания определяется достижением сбалансированности повреждающих факторов, действующих на клетку (образованием льда и осмотическим стрессом).

В работах по криоконсервированию культуры растительных клеток и тканей [19, 23, 29, 38, 40, 43] замораживание по 2-ступенчатой программе предполагает на 1-м этапе охлаждение со скоростями 0,5–1 °С/мин до –35, –40 °С, выдержку при этой температуре в течение 30–60 мин и на 2-м этапе помещение их в жидкий азот. Возможно на 1-м этапе использование более медленных или быстрых скоростей охлаждения (0,1–0,2 или 10–20 °С/мин) и другой конечной температуры этапа (–10, –20, –30, –80, –100 °С) [34, 35, 44, 45].

В отдельных случаях применяют 3-х и более ступенчатое замораживание. Например, клеточную суспензию цитрусовых замораживали сначала до –40 °С с выдержкой при этой температуре 65 мин, затем до –80 °С и после этого помещали в жидкий азот [23]. Апексы яблони консервировали по следующей программе: от 0 до –10 °С с остановкой при –10 °С на 15 мин, затем до –40 °С и, наконец, до –196 °С [44]. Верхушечную меристему сахарного тростника на 1-м этапе охлаждали до –40 °С со скоростью 0,5 °С/мин, на 2-м — до –80 °С со скоростью 0,1 °С/мин, затем погружали в жидкий азот [20]. В нашей работе по криоконсервированию меристемы картофеля ткань охлаждали до –40 °С по многоэтапному режиму, приближающемуся к экспоненциальной зависимости [8, 12, 13].

И все-таки большинство исследователей, занимающихся криоконсервированием культуры растительных тканей, предпочитают замораживать объект путем непосредственного погружения его в

tions are often used as cryopreservatives: 30%-glycerol + 15%-ethylene glycol + 15%-DMSO or 50%-glycerol + 50%-ethylene glycol [29, 32, 35, 39].

The most optimum modes of cryopreservation of plant cells are programmable freezing with one or several stages with strictly determined rates, and rapid thawing. The optimum value of the rate of freezing is determined by achieving a balance between the damaging factors, affecting the cell (nucleation and osmotic stress).

Normally cryopreservation of the cultures of plant cells and tissues involves freezing at the first stage with the rates of 0.5–1 °C/min down to –35, –40 °C [19, 23, 29, 38, 40, 43], exposure at these temperatures for 30–60 min, and placing into liquid nitrogen at the second stage. It is possible to apply slower or higher rates of cooling at this stage (0.1–0.2 or 10–20 °C/min) and another finite temperature of the stage (–10, –20, –30, –80, –100 °C) [34, 35, 44, 45].

In some cases 3- or more stage freezing is used. For example, the cell suspension of the citrus plants was first frozen down to –40 °C with a 65-min exposure at this temperature, then down to –80 °C, and immersed into liquid nitrogen finally [23]. The apexes of the apple-tree were preserved by the following program: from 0 to –10 °C with a 15-min stop at –10 °C, then down to –40 °C and, finally, down to –196 °C [44]. The top meristem of the sugar-cane at the first stage was cooled down to –40 °C with the rate of 0.5 °C/min, at the second stage – down to –80 °C with the rate of 0.1 °C/min, and then immersed into liquid nitrogen [20]. The author cryopreserved the potato meristem down to –40 °C with a multi-stage mode, approaching to the exponential dependence [8, 12, 13].

Nevertheless, most researchers dealing with cryopreservation of plant tissue cultures, prefer to freeze the system by its direct immersion into liquid nitrogen (method of vitrification) [16, 21, 22, 27, 29, 35, 42].

A comparison of the methods of freezing (slow and rapid) does not allow to come to direct conclusions. For example, survival of the meristemic cells of the onion, which were frozen by a 2-stage program, was much lower as compared with its survival after a one-stage cryopreservation down to –196 °C [29]. The sugar cane apexes also demonstrate a much higher survival following their freezing in liquid nitrogen as compared with a 3-stage cryopreservation [20]. Meristemic grape cells have a stronger survival after a 2-stage freezing [35]. One and the same researchers, while freezing the apple-tree apical meristems, in one case got nearly similar results as to the survival of the culture both during (direct immersion into liquid nitrogen) and slow (2-stage) cooling [45]; while in another case [42] they preferred to apply a method of vitrification (about 80% of survival) as compared with programmable freezing (60% of survival).

The modes of thawing of the material being preserved are not so diverse as the modes of freezing.

Матеріал, захищений авторським правом

жидкий азот (метод витрификации) [16, 21, 22, 27, 29, 35, 42].

Сравнение методов замораживания (быстрых и медленных) не приводит к однозначным выводам. Так, жизнеспособность меристематических клеток лука, замороженных по 2-ступенчатой программе, намного ниже жизнеспособности их после консервирования одноэтапно до –196 °С [29]. Апексы сахарного тростника также лучше выживают после замораживания их в жидком азоте по сравнению с 3-этапным криоконсервированием [20]. Меристематические клетки винограда имеют более высокую жизнеспособность после 2-ступенчатого замораживания [35]. Одни и те же исследователи, замораживая апикальные меристемы яблони, в одном случае получали одинаковые результаты жизнеспособности культуры как при быстром (прямом погружении в жидкий азот), так и медленном (2-этапном) охлаждении [45], в другом [44] они отдают предпочтение методу витрификации (около 80% выживаемости) по сравнению с программным замораживанием (60% выживаемости).

Режимы размораживания консервируемого материала не отличаются таким разнообразием, как режимы замораживания. Материал отогревают в водяной бане при температуре 25 °С от 2–3 мин [20, 33, 44, 45] и до 20 мин [35] или при 40 °С 1–2 мин [22, 23, 27, 29, 41]. В ряде случаев используют и более высокие температуры отогрева: 45 °С [19, 40] и даже 60 °С [43].

Хранение образцов в жидком азоте продолжается от часа до нескольких лет. Время пребывания консервируемого материала при температуре –196 °С практически не влияло на его выживаемость [13, 16, 17, 20, 21, 35, 40]. Так, после 2-х лет хранения меристемы в жидком азоте получали 80% жизнеспособных клеток. В результате дальнейшего культивирования из них вырастали полноценные растения [16, 21].

Таким образом, настоящий обзор свидетельствует о необходимости низкотемпературного замораживания культуры клеток и тканей растений с целью создания банка растительных ресурсов для нужд сельского хозяйства, а также длительного хранения уникального генетического материала для биотехнологической промышленности и научных исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Борисенок В. Г., Адамова А. И.* Применение метода культуры меристемы для получения безвирусного материала картофеля // Картофелеводство.– 1985.– № 6.– С. 66–70.
2. *Бутенко Р. Г.* Перспективы использования культивируемых клеток растений в биотехнологии // Биотехнология.– М., 1984.– С. 239–247.
3. *Бургутин А. Б., Бутенко Р. Г., Катаева Н. В., Голодрига П. Я.* Быстрое клональное размножение виноградного растения // С.-х. биол.– 1983.– № 7.– С. 48–50.
4. *Голодрига П. Я., Зленко В. Р. и др.* Технология ускоренного размножения сортов винограда с применением

Mainly the material is thawed at 25 °C for 2–3 min [20, 33, 44, 45], or at 40 °C for 1–2 min [22, 23, 27, 29, 41]. Sometimes higher temperatures of thawing – 45 °C [19, 40] and even 60 °C [43] are applied.

The samples are stored in liquid nitrogen for a period from 1 hour to several years. The duration of staying in liquid nitrogen did not practically affect survival of the material being preserved [13, 16, 17, 20, 21, 35, 40]. For example, following a 2-year storage of the meristem in liquid nitrogen in its was about 80%. Subsequent growing produced normal healthy plants out of them [16, 21].

Thus, given review produces sound bases for a necessity to low temperature freezing of culture cells and plant cells with the aim of organizing a bank of the plant resources for agricultural industry, as well as for the long-term storage of the unique genetic material for biotechnological industries and scientific research.

REFERENCES

1. *Borisenok V. G., Adamova A. I.* Application of the method of the culture meristem for harvesting viral-free potato materials // Kartofeleveodstvo.– 1985.– 6.– P. 66–70.
2. *Butenko R. G.* Prospects for applying plant cells being cultured in biotechnology // Biotechnology.– M., 1984.– P. 239–247.
3. *Burgutin A. B., Butenko R. G., Katayeva N. V., Golodriga P. Ya.* Rapid cloning of the grape plant // S.-kh. biol.– 1983.– № 7.– P. 48–50.
4. *Golodriga P. Ya., Zlenko V. R. et al.* A technology of an accelerated cloning of the grape series using a culture of the isolated tissue // Ibid.– 1985.– 3.– P. 62–66.
5. *Gorkovtseva E. A., Yuldashev O. Kh. et al.* 2nd Congress of the All-Union Soc. for Plant Physiology, Minsk 24–29 September, 1990: Abstr. repts. Part 2.– M., 1992.– P. 57.
6. *Korzhenevskaya T. G., Butenko R. G., Gusev M. V.* Prospects of applying the associable cultures of plant cells and tissues in biotechnology // Sci. reports high. school. biol. sci.– 1985.– № 12.– P. 46–49.
7. *Kyuldybayev M. M., Amerkhanova M. B., Sadyukova D. D.* Effect of carbohydrates on formation of roots in the tissue culture of a Nevskiy potato // Mater. All-Union Sci. conf. on agricul. biotekhnol., Tselinograd. June 25–28, 1991: Abstr. repts.– Tselinograd, 1991.– P. 121–122.
8. *Novikov A. N., Tkachenko S. I., Stribyl T. F., Ryndin V. F.* On the possible applications of the exponential modes for cryopreservation of biological systems // Biofizika.– 1985.– XXX, Issue 6.– P. 1042–1045.
9. *Popov A. S.* Certain mechanisms of cryoinjury to plant cells i vitro and distinguishing features of the preservation // Fiziol. rast.– 1993.– 40, № 43.– P. 485–496.
10. *Rasulova D. A., Azizbekova Z. S., Zeinialova E. M.* Accelerated growing of the grape vine using a method of tissues culture, developed at Institute of Botany of Azerbajan Acad. Sci.– Baku, 1984.– 7 p.
11. *Sidorov V. A., Lysenko E. G., Kuchko A. A.* A culture of the isolated protoplasts for harvesting new potato species // Research on cell selection of the potato.– M., 1984.– P. 108–114.
12. *Stribyl T. F.* Application of the exponential modes of cooling during cryopreservation of biosystems // Kriobiologiya.– 1986, № 3.– P. 48–49.
13. *Stribyl T. F., Oleynik S. T., Novikov A. N. et al.* Optimization of the method of the potato meristem cryopreservation // Probl. kriobiol.– 1999.– № 1.– P. 57–60.
14. *Tumanov I. I.* Physiology of cold hardening and frost resistance of plants.– M.: Nauka publ., 1979.– 350 p.

Матеріал, захищений авторським правом

культуры изолированной ткани // С.-х. биол.– 1985.– № 3.– С. 62–66.
5. *Горьковцева Е. А., Юлдашев О. Х. и др.* // 2 съезд Всес. об-ва физиологов раст. Минск 24–29 сентября, 1990: Тез. докл. Ч. 2.– М., 1992.– С. 57.
6. *Корженевская Т. Г., Бутенко Р. Г., Гусев М. В.* Перспективы применения ассоциативных культур клеток и тканей растений в биотехнологии // Науч. докл. высш. шк. биол. наук.– 1985.– № 12.– С. 46-49.
7. *Кулдыбаев М. М., Амерханова М. Б., Садыкова Д. Д.* Влияние углеводов на индукцию клубнеобразования в культуре тканей картофеля сорта Невский // Матер. Всес. науч. конф. по с.-х. биотехнол., Целиноград, 25–28 июня, 1991: Тез. докл.– Целиноград, 1991.– С. 121–122.
8. *Новиков А. Н., Ткаченко С. И., Стрибуль Т. Ф., Рындин В. Ф.* О возможности использования при криоконсервировании биологических объектов экспоненциальных режимов охлаждения // Биофизика.– 1985.– XXX, Вып. 6.– С. 1042–1045.
9. *Попов А. С.* Некоторые механизмы криоповреждений клеток растений *in vitro* и особенности их криосохранения // Физиол. раст.– 1993.– 40, № 3.– С. 485–496.
10. *Расулова Д. А., Азизбекова З. С., Зейналова Э. М.* Ускоренное размножение виноградной лозы с помощью метода культуры тканей.– Баку: Ин-т ботан. АН АзССР, 1984.– 7 с.
11. *Сидоров В. А., Лысенко Е. Г., Кучко А. А.* Культура изолированных протопластов для получения новых форм картофеля // Исслед. по клеточной селекции картофеля.– М., 1984.– С. 108–114.
12. *Стрибуль Т. Ф.* Применение экспоненциальных режимов охлаждения при криоконсервировании биообъектов // Криобиология.– 1986.– № 3.– С. 48–49.
13. *Стрибуль Т. Ф., Олейник С. Т., Новиков А. Н. и др.* Оптимизация метода криоконсервирования меристемы картофеля //Пробл. криобиологии.– 1999.–№ 1.– С. 57–60.
14. *Туманов И. И.* Физиология закаливания и морозоустойчивости растений.– М.: Наука, 1979.– 350 с.
15. *Asokan M. P., O'Hair S. K., Litz R. E. In vitro* plant regeneration from leaf disks of hausa potato (*Coleus parviflorus*) // Hort Science.– 1984.– 19, № 1.– P. 75–76.
16. *Bajaj Y. P. S.* Regeneration of plants from potato meristems freeze-preserved for 24 months // Euphytica.– 1981.– 30, № 1.– P. 141–145.
17. *Butenko R. G., Popov A. S., Volkova L. A.* Recovery of cell cultures and their biosynthetic capacity after storage of Dioscorea deltoidea and Panax ginseng cells in liquid nitrogen // Plant. Sci. Lett.– 1984.– 33, № 3.– P. 285–292.
18. *Chandra R., Upadhya M. D., Jha K. K.* Regeneration of plantlets from potato callus // J. Indian Potato Assoc.– 1983.– 10, № 1–2.– P. 29–33.
19. *Chang Y., Reed B. M.* Extended cold acclimation and recovery medium alteration improve regrowth of Rubus shoot tips following cryopreservation // Cryo-Lett.– 1999.– 20, № 6.– P. 371–376.
20. *Conzales Arnao M. T., Engelmann F., Huet C., Urra C.* Cryopreservation of encapsulated apices of sugarcane: effect of freezing procedure and histology // Cryo-Lett.– 1993.– 14, № 5.– P. 303–308.
21. *Conzales Arnao M. T., Urra C. et al.* Cryopreservation of encapsulated sugarcane apices: effect of storage temperature and storage duration // Cryo-Lett.– 1999.– 20, № 6.– P. 347–352.
22. *Decruse S. W., Seeni S., Pushpangadan P.* Cryopreservation of alginate coated shoot tips of *in vitro* grown Holostemma annulare (Roxb.) K. Schum, an endangered medicinal plant: Influence of preculture and DMSO treatment on survival and regeneration // Cryo-Lett.– 1999.– 20, № 4.– P. 243–250.
23. *Engelmann F., Dambier D., Ollitrault P.* Cryopreservation of cell suspensions and embryogenic calluses of citrus using a simplified freezing process // Cryo-Lett.– 1994.– 15, № 1.– P. 53–58.
15. *Asokan M. P., O'Hair S. K., Litz R. E. In vitro* plant regeneration from leaf disks of hausa potato (*Coleus parviflorus*) // Hort Science.– 1984.– 19, № 1.– P. 75–76.
16. *Bajaj Y. P. S.* Regeneration of plants from potato meristems freeze-preserved for 24 months // Euphytica.– 1981.– 30, № 1.– P. 141–145.
17. *Butenko R. G., Popov A. S., Volkova L. A.* Recovery of cell cultures and their biosynthetic capacity after storage of Dioscorea deltoidea and Panax ginseng cells in liquid nitrogen // Plant. Sci. Lett.– 1984.– 33, № 3.– P. 285–292.
18. *Chandra R., Upadhya M. D., Jha K. K.* Regeneration of plantlets from potato callus // J. Indian Potato Assoc.– 1983.– 10, № 1–2.– P. 29–33.
19. *Chang Y., Reed B. M.* Extended cold acclimation and recovery medium alteration improve regrowth of Rubus shoot tips following cryopreservation // Cryo-Lett.– 1999.– 20, № 6.– P. 371–376.
20. *Conzales Arnao M. T., Engelmann F., Huet C., Urra C.* Cryopreservation of encapsulated apices of sugarcane: effect of freezing procedure and histology // Cryo-Lett.– 1993.– 14, № 5.– P. 303–308.
21. *Conzales Arnao M. T., Urra C. et al.* Cryopreservation of encapsulated sugarcane apices: effect of storage temperature and storage duration // Cryo-Lett.– 1999.– 20, № 6.– P. 347–352.
22. *Decruse S. W., Seeni S., Pushpangadan P.* Cryopreservation of alginate coated shoot tips of *in vitro* grown Holostemma annulare (Roxb.) K. Schum, an endangered medicinal plant: Influence of preculture and DMSO treatment on survival and regeneration // Cryo-Lett.– 1999.– 20, № 4.– P. 243–250.
23. *Engelmann F., Dambier D., Ollitrault P.* Cryopreservation of cell suspensions and embryogenic calluses of citrus using a simplified freezing process // Cryo-Lett.– 1994.– 15, № 1.– P. 53–58.
24. *Espinoza N. O., Dodds J. H.* Adventitious shoot formation on cultured potato roots // Plant Sci.– 1985.– 41, № 2.– P. 121–124.
25. *Galzy R., Compan D.* Remarks on mixotrophic and autotrophic carbon nutrition of Vitis plantlets cultured *in vitro* // Plant Cell., Tissue and Organ Cult.– 1992.– 31, № 3.– P. 239–244.
26. *Gautheret R. J.* Plant tissue culture. A history // Bot. Mag. Tokyo.– 1983.– 96, № 1044.– P. 393–410.
27. *Hitmi A., Barthomeuf C., Sallanon H.* Cryopreservation of Chrysanthemum cinerariaefolium shoot tips. Effect of pretreatment, conditions and retention of biosynthetic capacity // Cryo-Lett.– 1999.– 20, № 2.– P. 113–120.
28. *Imanishi H., Kawaguchi T., Suzuki T. et al.* Accumulation of raffinose during cold acclimation in Lomicera caerulea L. plantlets cultured *in vitro* // Cryo-Lett.– 1999.– 20, № 4.– P. 235–242.
29. *Kohmura H., Ikeda Y.,Sakai A.* Cryopreservation of apical meristems of Japanese shallot (Allium wakegi A.) by vitrification and subsequent high plant regeneration // Cryo-Lett.– 1994.– 15, № 5.– P. 289–298.
30. *Li Jia-Rui, Eaton G. W.* Growth and rooting of grape shoot apices *in vitro* // Hort Science.– 1984.– 19, № 1.– P. 64–66.
31. *Lozoya-Saldana H., Madrigal-Vargas A.* Kinetin, thermotherapy and tissue culture to eliminate potato virus (PVX) in potato // Amer. Potato J.– 1985.– 62, № 7.– P. 339–345.
32. *Makowska Z., Keller J., Engelmann F.* Cryopreservation of apices isolated from garlic (Allium sativum L.) bulbils and cloves // Cryo-Lett.– 1999.– 20, № 3.– P. 175–182.
33. *Martinez D., Arroyo-Garcia R., Revilla M. A.* Cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of Olea europaea L. var. Arbequina // Cryo-Lett.– 1999.– 20, № 1.– P. 29–36.
34. *Moran M., Cacho M.* A protocol for the cryopreservation of Digitalis thapsi L. cell cultures // Cryo-Lett.– 1999.– 20, № 3.– P. 193–198.
35. *Plessis P., Leddet C., Collas A. et al.* Cryopreservation of Vitis vinifera L. cv Chardonnay shoot tips by encapsulation-dehydration: effects of pretreatment, cooling and postculture conditions // Cryo-Lett.– 1993.– 14, № 5.– P. 309–320.
36. *Powell W.* Tissue culture // Annu rept, 1989.– Perth: Scotl. Crop Res. Inst., 1990.– P. 50–56.

Матеріал, захищений авторським правом

24. *Espinoza N. O., Dodds J. H.* Adventitious shoot formation on cultured potato roots // Plant Sci.– 1985.– 41, № 2.– P. 121–124.
25. *Galzy R., Compan D.* Remarks on mixotrophic and autotrophic carbon nutrition of Vitis plantlets cultured *in vitro* // Plant Cell., Tissue and Organ Cult.– 1992.– 31, № 3.– P. 239–244.
26. *Gautheret R. J.* Plant tissue culture. A history // Bot. Mag. Tokyo.– 1983.– 96, № 1044.– P. 393–410.
27. *Hitmi A., Barthomeuf C., Sallanon H.* Cryopreservation of Chrysanthemum cinerariaefolium shoot tips. Effect of pretreatment, conditions and retention of biosynthetic capacity // Cryo-Lett.– 1999.– 20, № 2.– P. 113–120.
28. *Imanishi H., Kawaguchi T., Suzuki T. et al.* Accumulation of raffinose during cold acclimation in Lomicera caerulea L. plantlets cultured *in vitro* // Cryo-Lett.– 1999.– 20, № 4.– P. 235–242.
29. *Kohmura H., Ikeda Y.,Sakai A.* Cryopreservation of apical meristems of Japanese shallot (Allium wakegi A.) by vitrification and subsequent high plant regeneration // Cryo-Lett.– 1994.– 15, № 5.– P. 289–298.
30. *Li Jia-Rui, Eaton G. W.* Growth and rooting of grape shoot apices *in vitro* // Hort Science.– 1984.– 19, № 1.– P. 64–66.
31. *Lozoya-Saldana H., Madrigal-Vargas A.* Kinetin, thermotherapy and tissue culture to eliminate potato virus (PVX) in potato // Amer. Potato J.– 1985.– 62, № 7.– P. 339–345.
32. *Makowska Z., Keller J., Engelmann F.* Cryopreservation of apices isolated from garlic (Allium sativum L.) bulbils and cloves // Cryo-Lett.– 1999.– 20, № 3.– P. 175–182.
33. *Martinez D., Arroyo-Garcia R., Revilla M. A.* Cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of Olea europaea L. var. Arbequina // Cryo-Lett.– 1999.– 20, № 1.– P. 29–36.
34. *Moran M., Cacho M.* A protocol for the cryopreservation of Digitalis thapsi L. cell cultures // Cryo-Lett.– 1999.– 20, № 3.– P. 193–198.
35. *Plessis P., Leddet C., Collas A. et al.* Cryopreservation of Vitis vinifera L. cv Chardonnay shoot tips by encapsulation-dehydration: effects of pretreatment, cooling and postculture conditions // Cryo-Lett.– 1993.– 14, № 5.– P. 309–320.
36. *Powell W.* Tissue culture // Annu rept, 1989.– Perth: Scotl. Crop Res. Inst., 1990.– P. 50–56.
37. *Power J. B., Chapman J. V.* Isolation, culture and genetic manipulation of plant protoplasts // Plant Cell Cult.: Pract. Approach.– Oxford, Washington, D. C., 1985.– P. 37–66.
38. *Pritchard H. W., Grout B. W. W., Short K. C.* Osmotic stress as a pregrowth procedure for cryopreservation. 3. Cryobiology of sycamore and soybean cell suspensions // Ann. Bot. (USA).– 1986.– 57, № 3.– P. 379–387.
39. *Shatnawi M. A., Engelmann F. et al.* Cryopreservation of apices of *in vitro* plantlets of almond (Prunus dulcis mill.) // Cryo-Lett.– 1999.– 20, № 1.– P. 13–20.
40. *Swan T. W., O'Hare, Gill R. A. et al.* Influence of preculture conditions on the post-thaw recovery of suspension cultures of Jerusalem artichoke (Helianthus tuberosus L.) // Cryo-Lett.– 1999.– 20, № 5.– P. 325–336.
41. *Thing N. T., Takai H., Yashima S.* Cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of banana (Musa Spp.) by vitrification method // Cryo-Lett.– 1999.– 20, № 3.– P. 163–174.
42. *Towill L. E., Jarret R. L.* Cryopreservation of sweet potato (Ipomoea batatas [L] Lam.) shoot tips by vitrification // Plant Cell Repts.– 1992.– 11, № 4.– P. 175–178.
43. *Watanabe K., Kuriyama A. et al.* Effect of cryoprotectant treatment and post-thaw washing on the survival of cultured rice (Oryza sativa L.) cells after cryopreservation // Cryo-Lett.– 1999.– 20, № 6.– P. 377–382.
44. *Wu Y., Engelmann F., Zhao Y. et al.* Cryopreservation of apices shoot tips: Importance of cryopreservation technique and conditioning of donor plants // Cryo-Lett.– 1999.– 20, № 2.– P. 121–130.
45. *Zhao Y., Wu Y., Engelmann F. et al.* Cryopreservation of apple shoot tips by encapsulation-dehydration: effect of preculture, dehydration and freezing procedure on shoot regeneration // Cryo-Lett.– 1999.– 20, № 2.– P. 103–108.

Поступила 14.03.2000

Accepted in 14.03.2000

Матеріал, захищений авторським правом

УДК [612.65: 612.119]: 615.361.014.413

UDC [612.65: 612.119]: 615.361.014.413

Криоконсервирование гемопоэтических стволовых клеток из кордовой крови человека

А. А. ЦУЦАЕВА, В. И. ГРИЩЕНКО, О. В. КУДОКОЦЕВА, А. В. ЩЕГЛОВ, Г. С. ТУПЧИЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Cryopreservation of Hematopoietic Stem Cells out of Human Cord Blood

A. A. TSUTSAYEVA, V. I. GRISCHENKO, O. V. KUDOKOTSEVA, A. V. SCHEGLOV, G. S. TUPCHIENKO

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

Изучалась криоустойчивость кроветворных клеток в зависимости от состава суспензионных сред и от используемых криопротекторов. Показано, что наиболее эффективным является эндоцеллюлярный криопротектор Me_2SO. Введение в состав среды аутологичной плазмы позволяет повысить процент жизнеспособных кроветворных клеток.

Вивчалась кріостійкість кровотворних клітин кордової крові в залежності від складу суспензійних середовищ і від кріопротекторів, що використовувались. Показано, що найбільш ефективним є ендоцелюлярний кріопротектор Me_2SO. Уведення до складу середовища аутологічної плазми дозволяє підвищити відсоток життєздатних кровотворних клітин.

The cryostability of umbical cord blood stem cells depending on the composition of suspension media and using cryoprotective agents were studied. It was shown that Me_2SO — intracellular cryoprotective agent was much more effective that PEO-400. The percentage of viable hemopoetic stem cells in suspension after cryopreservation was higher when autologous plasm was used as a component of cryoprotective medium.

Альтернативным костному мозгу взрослых доноров источником кроветворных клеток является кордовая кровь [11, 12]. Кроветворные клетки кордовой (пуповинной) крови, как правило, используют для лечения гемодефицитных состояний у детей [9, 10]. Однако их количество достаточно для трансплантации и взрослым реципиентам [7, 9]. Трансплантации суспензий кроветворных клеток кордовой крови имеют ряд преимуществ перед трансплантацией кроветворных клеток костного мозга взрослых доноров в связи с их низкой иммуногенностью, низкой частотой возникновения gvh-болезни.

Накопленный фактический материал [6–9] свидетельствует о том, что наиболее актуальной задачей создания банков кордовой крови является унификация всех стадий долгосрочного хранения кроветворных клеток: методов забора кордовой крови, выделения популяций ядросодержащих клеток, обогащенных кроветворными клетками; способа их подготовки к криоконсервированию; технологического процесса замораживания; метода отогрева; способа подготовки к трансплантации; методов оценки свойств кроветворных клеток кордовой крови до и после криоконсервирования, определяющих их пригодность для использования в клинической практике и безвредность для реципиента.

Cord blood is another source of hematopoietic cells, which is alternative to the bone marrow of adult donors [11, 12]. Hematopoietic cells of cord (umbilical) blood are normally used in the therapy of haemodeficient states in children [9, 10]. However, their amount is sufficient to allow them to be transplanted to adult recipients [7, 9]. Transplantations of suspensions of the cord blood hematopoietic cells have some advantages over transplantation of hematopoietic cells of the adult donor bone marrow cells due to their low immune genicity, and low occurrence rate of a GVH-disease.

The data currently available testify to the fact [6–9] that the most urgent task is unification of all the stages of a long-term storage of hematopoietic cells: (i) methods of collection of cord blood; (ii) isolation of populations of the nucleated cells, enriched with hematopoietic cells; (iii) method of their preparation for cryopreservation; (iv) technological process of freezing; (v) method of thawing; (vi) method of preparation for transplantation; (vii) methods of evaluation of properties of hematopoietic cells of cord blood prior to and after cryopreservation, which determine their suitability for clinical hazard-free application.

The aim of the given research is to conduct a comparative study of the methods of cryopreservation of hematopoietic cells of the cord blood, which differ

Матеріал, захищений авторським правом

Цель данной работы – сравнительное изучение способов криоконсервирования кроветворных клеток кордовой крови, отличающихся составом криоконсерванта. Изучались криозащитные свойства эндоцеллюлярного криопротектора Me_2SO и криопротектора смешанного действия ПЭО-400, не требующего удаления перед введением в организм, а также эффективность использования различных суспензионных сред (культуральная среда и плазма кордовой крови).

Образцы кордовой крови брали от здоровых доноров без патологии беременности. Кровь собирали в стерильные флаконы, содержащие раствор ЦФД (цитратно-фосфатно-декстрозный) [12], после отстаивания при 4 °С ее центрифугировали (1 000 об/мин) в течение 20 мин. Из надэритроцитарного лейкоцитарного слоя с примесью эритроцитов в градиенте фиколл-верографина выделяли фракцию, обогащенную кроветворными клетками. Ядерные клетки отмывали фосфатным буфером и взвешивали в плазме или среде 199 в концентрации $4{,}0 \pm 2{,}0 \cdot 10^7$ кл/мл. Количество сохранных клеток в суспензии определяли с помощью суправитального красителя (в исходной суспензии их было $> 90\%$). Количество жизнеспособных клеток учитывали по количеству и форме колоний, образованных при культивировании суспензии кроветворных клеток в агаровых средах на 7- и 14-е сутки культивирования [6]. Детальная идентификация колоний производилась на гистологически окрашенных срезах, приготовленных из агаровых блоков [4].

Суспензии ядерных клеток после отмывания взвешивали в плазме или культуральной среде 199 и разделяли на несколько частей. К одной части суспензии приливали раствор криопротектора ПЭО-400, ко второй — раствор димексида. Исходная концентрация криопротекторов составляла 15%. Криопротекторы добавляли медленно к суспензии клеток 1:1, конечная их концентрация достигала 7,5%.

Замораживание суспензии ядерных клеток проводили по двухэтапной программе [3] на установке УОП-6 (СКТБсОП ИПКиК НАНУ). Образцы отогревали при температуре 40–41 °С в течение 60 с в специальной установке. Статистическую обработку результатов выполняли по методу Стьюдента–Фишера. Достоверность расчетов 95%.

После криоконсервирования кроветворных клеток в среде с добавлением Me_2SO содержание сохранных клеток после отогрева достоверно не отличалось от их содержания в интактных суспензиях (таблица). Если в состав среды входил криопротектор ПЭО-400, количество сохранных клеток снижалось. Содержание сохранных клеток после криоконсервирования в плазме с добавлением Me_2SO или ПЭО-400 не отличалось от их содержания в интактных суспензиях ($p > 0{,}05$).

in the compositions of cryopreservatives. The authors investigated cryoprotective properties of an Me_2SO endocellular cryoprotectant and a PEO-400 mixed-action cryoprotectant, which does not require elimination prior to injection into the organism; they also studied efficiency of applying various suspending media (cultural medium and cord blood plasma).

The samples of cord blood were collected from healthy donors without pathologies of pregnancy. The blood was harvested into sterile flasks, containing a CPD solution (citrate-phosphate-dextrose) [12]. After thawing at 4 °C it was centrifuged at 1,000 rpm for 20 min. The fraction, enriched with hematopoietic cells, was isolated from the supraerythrocytic leukocytic layer with a mixture of red cells in a Ficoll-Verografine gradient. The nucleated cells were washed with a phosphate buffer and suspended in the plasma or medium 199 in the concentration of $4.0 \pm 2.0 \cdot 10^7$ cells/ml. The amount of viable cells in the suspension was determined with a supravital dye. In the original suspension their portion exceeded 90%. The number of viable cells was calculated by the amount and types of colonies, formed during culturing of the hematopoietic cell suspension in agar media by the 7th and 14th days of culturing [6]. Detailed identification of colonies was done with histologically stained slices, prepared out of the agar blocks [4].

Suspensions of the nucleated cells after washing were weighed in the plasma or cultural medium 199 and were separated into several parts. A solution of a PEO-400 cryoprotectant was added to one of the parts, while a solution of dimexide – to another part. The original concentration of cryoprotectants was 15%. Cryoprotectants were added slowly to the cell suspension in a 1:1 ratio, and their finite concentration was as high as 7.5%.

Suspension of the nucleated cells was frozen with an UOP-6 freezer (designed and developed by Special Construction-Designing Bureau with Experimental Production Unit of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine) using a two-stage program. The samples were thawed at the temperature of 40–41 °C for 60 sec with a special device. The results obtained were statistically processed with a Student–Fischer method. The significance of the results was 95%.

Following cryopreservation of hematopoietic cells in the medium with the added Me_2SO the content of viable cells after thawing did not significantly differ from that in the intact suspensions (Table). When the medium comprised a PEO-400 cryoprotectant, the amount of viable cells was reduced. The content of viable cells after cryopreservation in the plasma with the added Me_2SO or PEO-400 did not differ from that in the intact suspensions ($p > 0.05$).

When hematopoietic cells were cryopreserved in the plasma under protection of Me_2SO, the content of viable cells, which formed colonies in agar (CFUc), did not differ significantly from that in the original

Матеріал, захищений авторським правом

Влияние различных условий криоконсервирования на количество сохранных ядерных и жизнеспособных гемопоэтических клеток в кордовой крови человека, замороженных по 2-этапной программе

Криопротектор	Количество ядерных клеток в 1 мл	Количество сохранных клеток, проц. от натива	Количество колоний в агаре, проц. от натива	
			7-е сутки	14-е сутки
Среда 199	$2{,}1 \cdot 10^7$	$49 \pm 5^*$	$13 \pm 4^*$	$19 \pm 5^*$
Плазма	$2{,}9 \cdot 10^7$	90 ± 2	$16 \pm 2^*$	$65 \pm 4^*$
7,5% Me_2SO на среде	$2{,}5 \cdot 10^7$	89 ± 4	$63 \pm 5^*$	$69 \pm 2^*$
7,5% Me_2SO на плазме	$2{,}6 \cdot 10^7$	93 ± 3	72 ± 2	81 ± 6
7,5% ПЭО-400 на среде	$2{,}5 \cdot 10^7$	$69 \pm 3^*$	$30 \pm 3^*$	$34 \pm 2^*$
7,5% ПЭО-400 на плазме	$2{,}8 \cdot 10^7$	80 ± 6	$55 \pm 4^*$	$63 \pm 4^*$

Примечание. * — результаты опыта имеют достоверные различия ($p < 0{,}05$) по сравнению с нативным образцом.

Если кроветворные клетки криоконсервировались в плазме под защитой Me_2SO, то содержание жизнеспособных клеток, образующих колонии в агаре (КОЕк), достоверно не отличалось от содержания таких клеток в исходных суспензиях. Было отмечено некоторое снижение количества КОЕк в клеточных суспензиях, криоконсервированных в плазме под защитой ПЭО-400, но это количество также не отличалось от количества КОЕк в интактных суспензиях. Когда суспензии кроветворных клеток криоконсервировались в культуральной среде под защитой Me_2SO или ПЭО-400, количество КОЕк снижалось по сравнению с количеством этих клеток в интактных суспензиях. Более значительное снижение отмечено в суспензиях под защитой ПЭО-400 ($p < 0{,}05$).

Эффективность использования димексида для криоконсервирования ядерных клеток, включая кроветворные, отмечена в [2, 3, 7]. Одним из существенных недостатков криопротектора Me_2SO является необходимость его удаления перед введением суспензии клеток в организм, тогда как криопротектор ПЭО-400 в используемой концентрации не требует удаления [1, 2]. При введении в состав криоконсерванта плазмы достоверно повышалось количество жизнеспособных кроветворных клеток. Вероятно, введение в состав криоконсерванта высокомолекулярных белков плазмы снижает интенсивность воздействия концентрационных градиентов на клетки — ведущего повреждающего фактора, который реализуется на этапах замораживания. В этих случаях, вероятно, процессы кристаллизации и типы образуемых кристаллов оказывают минимальное повреждающее действие на клетки. Таким образом, плазма усиливает криозащитный эффект при использовании криопротекторов.

Известно, что при замораживании кроветворных клеток человека и клеток кордовой крови оптимальными являются медленные скорости охлаждения [2, 3, 8]. При изучении эффективности

Action of various conditions of cryopreservation on the amount of viable nucleated hematopoietic cells in human cord blood, frozen with a 2-stage program

Cryoprotectant	Amount of nucleated cells in 1 ml	Amount of viable cells, percentage from the native	Amount of colonies in agar, percentage from the native	
			7th day	14th day
Medium 199	$2.1 \cdot 10^7$	$49 \pm 5^*$	$13 \pm 4^*$	$19 \pm 5^*$
Plasma	$2.9 \cdot 10^7$	90 ± 2	$16 \pm 2^*$	$65 \pm 4^*$
7.5%-Me_2SO on the medium	$2.5 \cdot 10^7$	89 ± 4	$63 \pm 5^*$	$69 \pm 2^*$
7.5%-Me_2SO on the plasma	$2.6 \cdot 10^7$	93 ± 3	72 ± 2	81 ± 6
7.5%-PEO-400 on the medium	$2.5 \cdot 10^7$	$69 \pm 3^*$	$30 \pm 3^*$	$34 \pm 2^*$
7.5%-PEO-400 on the plasma	$2.8 \cdot 10^7$	80 ± 6	$55 \pm 4^*$	$63 \pm 4^*$

Note: * — the experimental results differ significantly ($p < 0.05$) as compared with the native sample.

suspensions. There was reported a minor reduction in the amount of CFUc in the cell suspensions, cryopreserved in the plasma under protection of PEO-400, though this amount did not also differ from the number of CFUc in intact suspensions. When suspensions of hematopoietic cells were cryopreserved in the cultural medium under protection of Me_2SO or PEO-400, the amount of CFUc was reduced as compared with the number of these cells in the intact suspensions. A stronger reduction was reported in the suspensions under protection of PEO-400 ($p < 0.05$).

The efficiency of using dimexide for cryopreservation of nucleated cells, hematopoietic including, was studied by some researchers [2, 3, 7]. One of the significant drawbacks of an Me_2SO cryoprotectant is the necessity to eliminate it prior to injection of the cell suspension into the organism, while a PEO-400 cryoprotectant in the above concentrations does not require elimination [1, 2]. Incorporation of the plasma into the cryoprotectant significantly increased the number of viable hematopoietic cells. Apparently, incorporation of the highly molecular plasma proteins into the cryopreservative reduces the intensity of action of concentration gradients on the cells — a leading factor of cryoinjury, which is realized at the stage of freezing. There, apparently, the processes of crystallization and types of the crystals being formed exercise a minimum damaging action on the cells. Thus, plasma enhances a cryoprotective effect during usage of cryoprotectants.

It is known that slow cooling rates are optimum for freezing of human hematopoietic cells and cord blood cells [2, 3, 8]. When studying the efficiency of applying different rates for freezing of hematopoietic cells of adult donors the authors have found that the most expedient are slow rates (1–4 °C/min) at the first stage of cooling with a temperature stop at –20 °C for 20 min [3]. Rates of cooling, which are used in this programme, facilitate formation of a fine granular ice structure which is optimum for the cells, ensure reduction of the extent of manifestation of saline gra-

Матеріал, захищений авторським правом

использования различных скоростей замораживания для кроветворных клеток взрослых доноров нами было установлено, что наиболее оптимальными являются медленные скорости (1–4 °С/мин) на первом этапе охлаждения с температурной остановкой при –20 °С в течение 20 мин [3]. Режимы охлаждения, используемые в этой программе, способствуют образованию мелкокристаллической структуры льда, оптимальной для клеток, щадящего обезвоживания клеток, снижению степени выраженности солевых градиентов. Экспозиция клеток при –20 °С перед их погружением в азот позволяет стабилизировать системы в зоне низких температур [3]. Значение скоростей охлаждения на этапе замораживания кроветворных клеток кордовой крови было показано в [1, 3, 12]. Для кроветворных клеток кордовой крови медленная двухэтапная программа замораживания [3] также оказалась оптимальной, что наряду с использованием оптимального состава криоконсерванта позволяет добиться высоких показателей сохранности всех свойств клеток.

В [2, 8] было показано, что под влиянием криоконсервирования ингибируется клоногенная активность кроветворных клеток кордовой крови. Причин ее снижения может быть несколько. Одной из них является гибель части более зрелых кроветворных клеток $CD34^+$, $CD38^+$ и сохранение кроветворных клеток на ранних стадиях их коммитирования [2]. Нельзя исключить, что при выделении популяции $CD34^+$ либо обогащении популяции мононуклеаров $CD34^+$ клетками в суспензии снижается количество вспомогательных клеток, запускающих или поддерживающих пролиферацию и созревание кроветворных клеток при их культивировании. Под влиянием криоконсервирования обратимо изменяются физико-химические свойства мембран клеток и мембранных рецепторов, акцептирующих регуляторные сигналы [2, 5]. Не исключая вышеизложенного, мы склонны считать, что одной из основных причин снижения клоногенной активности кроветворных клеток кордовой крови после криоконсервирования является развитие в них нелетальных, репарируемых повреждений, которые развиваются практически во всех клетках и проявляются в ингибировании их функциональной и пролиферативной активности, обратимой ингибиции метаболизма [1, 5]. Нельзя исключить и селекцию определенной популяции клеток из гетерогенной по составу популяции кроветворных клеток на этапах криоконсервирования. Было показано, что в состав кроветворных клеток входят популяции, отличающиеся разной криостабильностью [2, 3].

Полученные нами результаты свидетельствуют о незначительной ингибиции пролиферативной активности на этапах замораживания-отогрева. Показано, что при криоконсервировании в культуральной среде под защитой криопротекторов

dients and provide for a sparing mode of cell dehydration. Exposure of cells at –20 °C prior to their immersion into nitrogen makes it possible to stabilize the systems within the zone of low temperatures [3]. The value of the rates of cooling at the stage of freezing of hematopoietic cells of the cord blood was demonstrated elsewhere [1, 3, 12]. For hematopoietic cells of the cord blood a two-stage freezing programme [3] also turned out to be optimum, which, together with applying the optimum composition of the cryopreservative, permit to achieve high indices of survival of all the properties of cells.

Elsewhere [2, 8] it was reported that cryopreservation inhibits clonogenic activity of the cord blood hematopoietic cells. There may be several reasons for such a reduction. One of them, as believed by the authors, is the death of some more mature cells $CD34^+$ and $CD38^+$, and maintenance of hematopoietic cells at the early stages of their commission [2]. It cannot be excluded that during isolation of a $CD34^+$ population or enrichment of the $CD34^+$ mononucleated cells by the cells in the suspension the amount of the auxiliary cells, triggering or supporting proliferation and maturation of hematopoietic cells during their culturing, is reduced. Cryopreservation results in the reversible changes in physical-chemical properties of the cell membranes and membrane receptors, which accept regulatory signals [2, 5]. While not saying otherwise, the authors believe that one of the basic reasons for a reduction in the clonogenic activity of hematopoietic cells of the cord blood after cryopreservation are the nonlethal repairable injuries to the cells, which are developed in nearly all of them and which are manifested in the inhibition of their functional and proliferative activity and reversible inhibition of metabolism [1, 5]. A selection of a certain population of cells out of heterogeneous population of hematopoietic cells at the stages of cryopreservation cannot be excluded, too. Elsewhere it was reported that hematopoietic cells incorporate populations, which differ in their cryostability [2, 3].

The results obtained testify to a minor inhibition of proliferative activity of hematopoietic cells at the stages of freeze-thawing. It was shown that during cryopreservation in the cultural medium under protection of cryoprotectants the nonlethal repairable injuries in the cells are manifested stronger as compared with the cells, cryopreserved in the plasma under protection of cryoprotectants. Thus, plasma is a necessary component of a cryopreservative irrespective of the cryoprotectant being used. Besides, plasma contains a whole range of highly and low molecular proteins, monokines, vitamins and other components, which exercise a favorable effect after injection to the recipient.

REFERENCES

1. *Cryobiology* and biotechnology / A. A. Tsutsayeva, ed.– Kiev: Naukova dumka publ., 1987.– 216 p.
2. *Cryoimmunology* / A. A. Tsutsayeva, ed.– Kiev: Naukova dumka publ., 1988.– 176 p.

Матеріал, захищений авторським правом

нелетальные репарируемые повреждения в клетках более выражены, чем в клетках, криоконсервированных в плазме под защитой криопротекторов. Таким образом, плазма является необходимым компонентом криоконсерванта независимо от используемого криопротектора. Кроме того, плазма содержит набор полезных для организма высоко- и низкомолекулярных белков, монокинов, витаминов и других компонентов, оказывающих благоприятный эффект при введении реципиенту.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Криобиология* и биотехнология / Под ред. А. А. Цуцаевой.– Киев: Наук. думка, 1987.– 216 с.
2. *Криоиммунология* / Под ред. А. А. Цуцаевой.– Киев: Наук. думка, 1988.– 176 с.
3. *Криоконсервирование* клеточных суспензий / Под ред. А. А. Цуцаевой.– Киев: Наук. думка, 1983.– 240 с.
4. *Меркулов Г. А.* Курс патологической техники.– М.: Медгиз, 1961.– 240 с.
5. *Холодовой* стресс и биологические системы / Под ред. А. А. Цуцаевой.– Киев: Наук. думка, 1991.– 172 с.
6. *Broxmeyer H. E., Douglas G. W., Hangoc G. et al.* Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells // Proc. Acad. Sci. USA.– 1989.– 86.– P. 3828–3832.
7. *Certulo C. L., Sbarra A. J., Certulo Cl. Jr.* Collection and cryopreservation of cord blood for the treatment of hematopoietic disorders: the obstetrician's overview // Hematother.– 1996.– 5, № 2.– P. 149–151.
8. *Donaldson C., Armitage W. J., Denning-Kendall P. A. et al.* Optimal cryopreservation of human umbilical cord blood // Bone Marrow Transplantation.– 1996.– 18.– P. 725–731.
9. *Gluckman E.* European organization for cord blood banking // Blood Cells.– 1994.– 20, № 2.– P. 601–608.
10. *Gluckman E.* Umbilical cord blood biology and transplantation // Curr. Opin. Hematol.– 1995.– 2, № 6.– P. 413–416.
11. *Harris D.T., Schumacher M. J., Rychlik S. et al.* Collection, separation and cryopreservation of umbilical cord blood for use in transplantation // Bone Marrow Transplantation.– 1994.– 13, № 2.– P. 135–143.
12. *Querol S., Gabarro M., Amat L. et al.* The placental blood programs of the Barcelona Cord Blood Bank // Bone Marrow Transplantation.– 1998.– 22, № 1.– P. 3–5.

Поступила 20.12.98

3. *Cryopreservation* of cell suspensions / A. A. Tsutsayeva, ed.– Kiev: Naukova dumka publ., 1983.– 240 p.
4. *Merkulov G. A.* A course on pathological technique.– M.: Medgiz publ., 1961.– 240 p.
5. *Cold* shock and biological systems / A. A. Tsutsayeva, ed.– Kiev: Naukova dumka publ., 1991.– 172 p.
6. *Broxmeyer H. E., Douglas G. W., Hangoc G. et al.* Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells // Proc. Acad. Sci. USA.– 1989.– 86.– P. 3828–3832.
7. *Certulo C. L., Sbarra A. J., Certulo Cl. Jr.* Collection and cryopreservation of cord blood for the treatment of hematopoietic disorders: the obstetrician's overview // Hematother.– 1996.– 5, № 2.– P. 149–151.
8. *Donaldson C., Armitage W. J., Denning-Kendall P. A. et al.* Optimal cryopreservation of human umbilical cord blood // Bone Marrow Transplantation.– 1996.– 18.– P. 725–731.
9. *Gluckman E.* European organization for cord blood banking // Blood Cells.– 1994.– 20, № 2.– P. 601–608.
10. *Gluckman E.* Umbilical cord blood biology and transplantation // Curr. Opin. Hematol.– 1995.– 2, № 6.– P. 413–416.
11. *Harris D.T., Schumacher M. J., Rychlik S. et al.* Collection, separation and cryopreservation of umbilical cord blood for use in transplantation // Bone Marrow Transplantation.– 1994.– 13, № 2.– P. 135–143.
12. *Querol S., Gabarro M., Amat L. et al.* The placental blood programs of the Barcelona Cord Blood Bank // Bone Marrow Transplantation.– 1998.– 22, № 1.– P. 3–5.

Accepted in 20.12.98

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 611.36.018:57.043:577.1

UDC 611.36.018:57.043:577.1

Перекисное окисление липидов в фрагментах печени новорожденных и половозрелых свиней при различных условиях криоконсервирования

Л. Н. ТЫНЫНЫКА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Lipid Peroxidation in Fragments of Liver of Newborn and Mature Pigs under Various Conditions of Cryopreservation

L. N. TYNYNYKA

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

На основании исследований и обобщения литературных данных по проблеме перекисного окисления липидов в фрагментах печени (ФП) новорожденных и половозрелых свиней при различных условиях криоконсервирования было показано, что оптимальными условиями криоконсервирования этого биоматериала по уровню накопления малонового диальдегида (МДА) являются сверхбыстрые скорости охлаждения в присутствии ПЭО-1500 и ДМСО и медленные — в присутствии ДМСО.

На підставі досліджень і узагальнення літературних даних щодо проблеми перекисного окислення ліпідів у фрагментах печінки (ФП) новонароджених і статевозрілих свиней за різними умовами кріоконсервування було показано, що оптимальними умовами кріоконсервування цього біоматеріалу за рівнем накопичення малонового діальдегіду (МДА) є надшвидкі режими охолодження у присутності ПЕО-1500 і ДМСО і повільні — у присутності ДМСО.

Analysis of the results of experimental research and the reported data on lipid peroxidation in the fragments of the liver of the newborn and mature pigs under various conditions of cryopreservation makes it possible to conclude that the optimum conditions for cryopreservation of this biological material, judging by the level of malone dialdehyde (MDA), is the application of suprahigh rates of freezing in the presence of PEO-1500, and of slow rates in the presence of DMSO.

В условиях замораживания-отогрева плазматические мембраны и мембраны органелл изменяются. Степень крионарушений мембран клеток зависит от их физико-химических и биохимических свойств. Развитию низкотемпературной патохимии мембран клетки способствует свободнорадикальное перекисное окисление липидов (ПОЛ), которому подвергаются главным образом полиненасыщенные жирные кислоты. Основными факторами, ведущими к инициированию процессов ПОЛ в липидном бислое мембран при охлаждении и замораживании-отогреве, являются гипоксия, лиотропное действие гиперконцентрированных солей и нарушение структурной интеграции мембраны. В результате действия этих факторов при замораживании-отогреве в мембранах микросом или митохондрий в составе фрагмента происходит избыточное накопление анион-радикалов O_2^-, которые в присутствии НАД-Н активируют процессы ПОЛ [1–3, 8, 12, 15].

Высокая чувствительность к действию низких температур биообъекта может быть обусловлена специфической организацией мембран его митохондрий, прежде всего высоким содержанием в них полиненасыщенных жирных кислот, негеминового железа и геминовых белков. Нарушение структурной упорядоченности мембран при охлаждении в фазе вымерзания свободной воды суспензии в зоне

Plasma membranes and membranes of organelles change during freeze-thawing.The extent of cryoinjuries to the cell membranes depend on their physical-chemical and biochemical properties. The development of low temperature pathochemistry of the cell membrane is facilitated by a free radical lipid peroxidation (LPO), which affects mainly polyunsaturated fatty acids. The basic factors, which initiate occurrence of the LPO processes in the membrane lipid bilayer during cooling and freeze-thawing are hypoxia, lyotropic action of hyperconcentrated salts and impairment to the membrane structural integration. The action of these factors during freeze-thawing results in the excessive accumulation of anion-radicals O_2^- in the membranes of microsomes or mitochondria, which activate the LPO processes in the presence of NAD-H [1–3, 8, 12, 15].

High susceptibility of the biological system to the action of low temperatures may be due to a specific organization of its mitochondrial membranes, in the first place, to a high content of polyunsaturated fatty acids and non-hemine iron and hemine proteins in them. Impairment of the structural organization of the membranes during cooling at the phase of free water freezing out in the eutectics zone, resulting from the lyotropic action of electrolytes, also brings about development of lipid peroxidation during catalytic involvement of cytochrome C [1, 2].

Матеріал, захищений авторським правом

эвтектики, вызванное лиотропным действием электролитов, также приводит к развитию перекисного окисления при каталитическом участии цитохрома С [1, 2].

В работе оценивалась сохранность ФП новорожденных и половозрелых свиней по степени интенсификации в них процессов ПОЛ после действия различных режимов криоконсервирования с учетом того, что наиболее криочувствительными являются мембраны клеток и их органелл.

Объектом исследования были ФП новорожденных и половозрелых свиней размером 1–3 мм, которые получали продавливанием кусочков ткани через предварительно охлажденную решетку с диаметром отверстий 1 мм. Полученные ФП многократно отмывали в 10-кратном объеме охлажденного физиологического раствора (0,9%-й NaCl) с *pH* 7,4. В процессе отмывки вследствие рыхлости структуры самого органа происходит его дезагрегация на фрагменты. Клетки в составе таких фрагментов (агрегатов) находятся в привычной для них упаковке и процесс их гибели при криоконсервировании менее интенсивен. При этом лучше сохраняется естественная структура клеток, их дезинтеграция наблюдается в меньшей степени. Взвесь ФП является компромиссом между дезинтеграцией органа на клетки и использованием целого органа или его срезов.

Забор ткани печени половозрелых свиней (70) осуществляли на Харьковском мясокомбинате, а печени новорожденных поросят (300) — в условиях стерильной операционной вивария ИПКиК НАН Украины.

Учитывая, что модель ФП поросят и свиней изучена мало, важно было провести ее исследование в сравнении с уже известными моделями печени (гомогенатом и срезами) по интенсивности протекания перекисных процессов в этих биообъектах до замораживания-отогрева, т.е. на нативном биоматериале. У животного, находящегося под тиопенталовым наркозом, быстро извлекали печень и помещали в охлажденный физиологический раствор (0 °С). Навеску печени отмывали охлажденным физиологическим раствором и на льду с помощью лезвия готовили срезы печени массой 0,1–0,12 г, которые затем отмывали и помещали в охлажденный физиологический раствор для дальнейших исследований. Гомогенат печени получали на льду (0 °С) с помощью ручного гомогенизатора Даунса в среде выделения: 0,3 М сахарозы, 10 мМ трис-HCl, 1 мМ этилендиаминтетраацетата.

Медленное замораживание биообъектов (1 °С/мин) осуществляли на программном замораживателе УОП-6 производства СКТБсОП ИПКиК НАН Украины. Быстрые скорости охлаждения (1 000 °С/мин) реализовывали погружением контейнеров из алюминиевой фольги в жидкий азот [16].

The authors evaluated survival of the liver fragments (LF) of the newborn and mature pigs by the extent of intensification of the LPO processes in them after exposure to various modes of cryopreservation, considering the fact, that cell membranes and their organelles possess the highest susceptibility.

The liver fragments of the newborn and mature pigs with the dimensions of 1–3 mm were used in the experiments. They were collected by pressing the tissue fragments through a pre-cooled grid with the size of the holes of 1 mm. Thus collected LF were repeatedly washed in a 10-fold volume of the cooled physiological saline (0.9% NaCl) with *pH* 7.4. In the process of washing due to a loose structure of the organ itself there occurs its desaggregation into fragments. The cells within such fragments (aggregates) are in their normal packing, and the process of their death during cryopreservation is less intensive. Here the natural structure of the cells is better maintained, their disintegration occurs to a lower extent. The LF suspension is a compromise between disintegration of the organ into cells and application of the whole organ or its slices.

Collection of the tissue of the liver of the mature pigs (70 animals) was done at Kharkov Meat-Processing factory, while the livers of the newborn pigs (300 animals) were collected under sterile conditions in the surgery room of the vivarium of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine.

Taking into account that a LF model of the newborn and mature pigs still waits to be studied thoroughly, the authors strived to investigate it in comparison with the already known models of the liver (homogenates and slices) by the intensity of occurrence of the LPO processes in these biosystems prior to freeze-thawing, i.e. using native biomaterials. The liver was rapidly extracted from the thiopental-anaesthesized animal and placed into a cooled physiological saline (0 °C). The fragment of the liver was washed with a cooled physiological saline, and the slices of the liver with the weights of 0.1–0.12 g were prepared on ice using blade, which were subsequently washed and placed into a cooled physiological saline for further studies. The homogenate of the liver was harvested on ice (0 °C) using a Downes hand-operated homogenizer in the isolation medium: 0.3 M sucrose, 10 mM tris-HCl, 1 mM EDTA.

The biosystems were slowly frozen (1 °C/min) with an UOP-6 programmable freezer (made in Ukraine by Special Construction-Designing Bureau with Experimental Production Unit of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine). Rapid cooling rates (1,000 °C/min) were realized by immersing the containers, made out of the aluminium foil, into liquid nitrogen [16].

The following cryoprotectants were used in the research: PEO-400, PEO-1500, DMSO (dimethyl sulfoxide) in the finite concentrations of 20%. The level

Матеріал, захищений авторським правом

В работе были использованы криопротекторы: ПЭО-400, ПЭО-1500, диметилсульфоксид (ДМСО) в конечной концентрации 20%. Уровень накопления малонового диальдегида (МДА) определяли как в нативных, так и деконсервированных пробах ФП, уровень ПОЛ – в соответствии с методикой [3] по реакции МДА с 2-тиобарбитуровой кислотой с образованием окрашенного продукта триметинового комплекса, выявляемого при 532–535 нм на спектрофотометре "Specord UV VIS".

Результаты исследований статистически обрабатывали по методу Стьюдента–Фишера [7]. Для сравнения влияния различных режимов криоконсервирования на сохранность ФП поросят и свиней использовали скорости охлаждения 1 и 1 000 °С/мин.

Для адекватной оценки ПОЛ по накоплению МДА в образцах ФП поросят и свиней было целесообразно сравнить динамику изменения исследуемого показателя в гомогенате и срезах печени. Как известно [1, 2, 8], образование активных форм кислорода в печени в процессе работы цитохром Р-450 зависимой системы монооксигеназ является постоянным физиологическим процессом. Кроме того, печень высокочувствительна к дефициту O_2. Поэтому изучение роли процессов ПОЛ по накоплению МДА в сравниваемых модельных системах представляет особый интерес.

Анализ результатов оценки исследуемого показателя в препаратах из нативной печени поросят и свиней (рис. 1) показал, что увеличение времени изотермической инкубации (37 °С) от 15 до 60 мин способствует повышению уровня накопления вторичного продукта ПОЛ в 1,5 раза в гомогенате печени поросят и свиней и в 1,4 раза в ФП и срезах печени поросят. В образцах печени свиней (ФП и срезах) исследуемый показатель сохранности биоматериала имеет тенденцию к повышению в процессе изотермической инкубации от 15 до 60 мин.

Результаты исследования процессов ПОЛ в нативной ткани печени без инкубации (нмоль/г

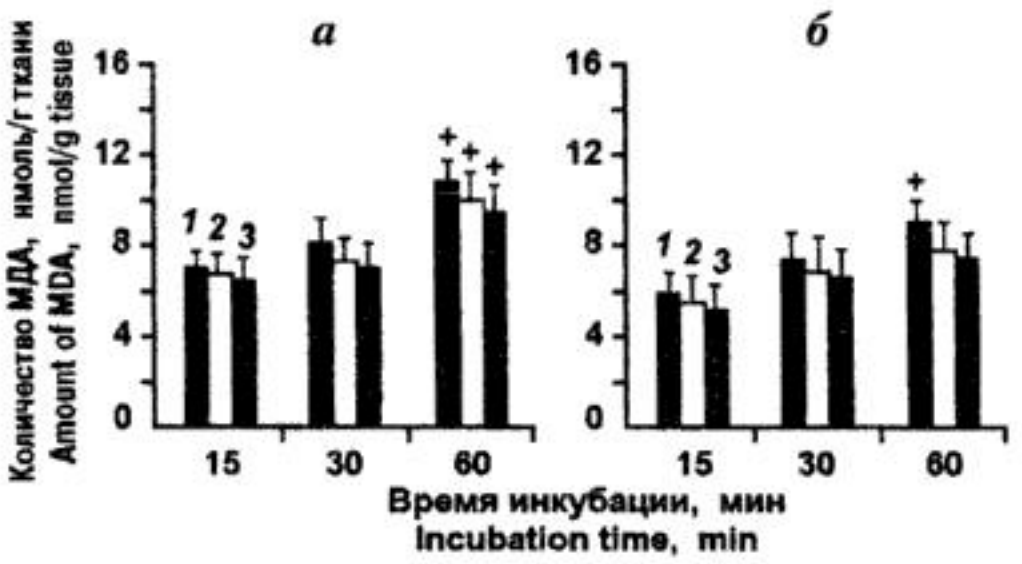


Рис. 1. Уровень перекисного окисления липидов в образцах печени: *а* – поросят; *б* – свиней; *1* – гомогенате; *2* – ФП; *3* – срезах печени. **Примечание**. + – различие достоверно по сравнению с результатами, полученными при 15-минутной инкубации ($p < 0{,}05$).

Fig. 1. Level of lipid peroxidation in the liver fragments of: *a* – newborn pigs; *б* – mature pigs; *1* – homogenate; *2* – LF; *3* – liver slices. **Note**: + – the difference is significant as compared with the results, obtained during 15-min incubation ($p < 0.05$).

of accumulation of malone dialdehyde (MDA) was determined both in the native and thawed LF samples. The level of LPO was calculated as reported elsewhere [3] by the reaction of MDA with 2-thiobarbituric acid with formation of a stained product of trimethyn complex, identified with a Specord UV VIS spectrophotometer. The results thus obtained were statistically processed with a Student–Fisher method [7]. To compare the effect of various modes of cryopreservation on survival of the LF of newborn and mature pigs the following cooling rates were applied: 1 and 1,000 °C/min.

The authors applied comparative analysis of the dynamics of changes of the studied feature in the homogenate and slices of the liver for adequate evaluation of the LPO by accumulation of MDA in the LF samples of newborn and mature pigs. It is known [1, 2, 8] that formation of active forms of oxygen in the liver during operation of a cytochrome P-450-dependent system of monooxygenases is a continuous physiological process. Besides, the liver is highly susceptible to the deficit of O_2. That is why investigation of the LPO processes by accumulation of MDA in the model systems being compared is of particular interest.

The analysis of the results of evaluation of the studied feature within the preparations of the native liver of newborn and mature pigs (Fig. 1) showed that prolongation of duration of isothermic incubation (37 °C) from 15 to 60 min facilitated a rise in the level of accumulation of the LPO secondary product by 1.5-fold in the homogenates of the livers of newborn and mature pigs, and by 1.4-fold – in the LF and slices of the livers of newborn pigs. In the liver samples (LF and slices) of mature pigs the studied feature of the biomaterial survival demonstrated a tendency towards increasing in the process of isothermic incubation from 15 to 60 min.

The results of studying the LPO processes in the native tissue of the liver without incubation (nmol/g tissue: 7.0 ± 0.4 – in the homogenate; 6.5 ± 0.8 – LF; 6.2 ± 0.9 – in the liver slices of newborn pigs, and 5.5 ± 0.4, 5.0 ± 0.9, 5.0 ± 0.7 in mature pigs, respectively) do not practically differ from those during 15- and 30-min incubation in the tissues samples of both newborn and mature pigs ($p > 0.05$). Comparative analysis shows that the level of MDA accumulation has a tendency towards increasing in the liver samples of newborn pigs with respect to that level in the liver samples of mature pigs ($p > 0.05$).

Thus, the activity of peroxidative processes, assessed by the level of the MDA accumulation, is less intensive in the LF as compared with the homogenate, and is higher than in the slices, though the studied features in these samples are nearly similar ($p > 0.05$), while the levels of the MDA accumulation in the homogenate of the livers of newborn and mature pigs increase significantly with a prolongation in the duration of the isothermic incubation from 15 to 60 min ($p < 0.05$). As reported elsewhere [8] the content of

Матеріал, захищений авторським правом

ткани: $7{,}0 \pm 0{,}4$ — в гомогенате, $6{,}5 \pm 0{,}8$ — в ФП, $6{,}2 \pm 0{,}9$ — в срезах печени у поросят и $5{,}5 \pm 0{,}4$, $5{,}0 \pm 0{,}9$, $5{,}0 \pm 0{,}7$ — у свиней соответственно) практически не отличаются от таковых при 15- и 30-минутной инкубации в тканевых образцах как поросят, так и свиней ($p > 0{,}05$). В сравнительном аспекте уровень накопления МДА имеет тенденцию к увеличению в нативных образцах печени поросят по отношению к уровню в образцах печени свиней ($p > 0{,}05$).

Таким образом, активность перекисных процессов, оцениваемая по уровню накопления МДА, в ФП менее интенсивна, чем в гомогенате, и более, чем в срезах, но исследуемый показатель в этих образцах практически одинаков ($p > 0{,}05$), тогда как уровень накопления МДА в гомогенате печени поросят и свиней достоверно повышается с увеличением времени изотермической инкубации от 15 до 60 мин ($p < 0{,}05$). По данным [8], содержание МДА в изолированной печени крыс, инкубируемой при 37 °С в течение часа, достоверно повышалось. Кратковременный (30 мин) рост в гомогенате печени первичных продуктов ПОЛ и более длительное (60 мин) повышение содержания МДА были показаны на модели тяжелой неполной ишемии печени собак [8]. Очевидно, в данном случае процесс гомогенизации в какой-то степени индуцирует перекисные процессы в гомогенате печени, так как при гомогенизации происходят нарушение морфофункциональной структуры гепатоцитов и выход в среду органелл. Поэтому при дальнейшей изотермической инкубации перекисные процессы в поврежденных мембранах протекают более интенсивно, что приводит к более высокому уровню накопления МДА. К тому же МДА может метаболизироваться митохондриями и реагировать с другими внутриклеточными компонентами [3].

Влияние различных условий криоконсервирования на сохранность образцов ФП поросят и свиней, которая была оценена по интенсивности протекания перекисных процессов в этом биоматериале, показано на рис. 2. Так, при скорости охлаждения 1 °С/мин в образцах ФП поросят уровень накопления МДА в 4 раза больше по сравнению с контролем и в 3 раза — в образцах ФП свиней. Однако у деконсервированного биоматериала отмечены возрастные различия. При этом исследуемый показатель в ФП свиней в 1,5 раза ниже у новорожденных поросят, хотя в нативных образцах ФП этих животных (контроль) уровень накопления МДА практически одинаков ($p > 0{,}05$). Очевидно, антиоксидантная система свиней более адаптирована к различным повреждающим факторам. В процессе жизнедеятельности у них вырабатывается определенная система защиты на любое повреждающее воздействие как на организменном, так и на кле-

MDA in the isolated rat liver, incubated for 1 hour at 37 °C, increased significantly. A short-term (30 min) growth of the LPO primary products in the homogenate of the liver and a more prolonged (60 min) rise in the content of MDA were demonstrated using a model of a severe incomplete ischemia of canine liver [8]. However, in this case, the process of homogenization to some extent induces peroxidative processes in the liver homogenate, since during homogenization the morphofunctional structures of hepatocytes are injured, and organelles are outflown into the medium. That is why during further isothermic incubation peroxidative processes in the injured membranes occur more intensively, thus resulting in a higher level of the MDA accumulation. Moreover, MDA may be metabolized by mitochondria and react with other intracellular components [3].

The effect of various conditions of cryopreservation upon survival of the LF samples of newborn and mature pigs, which was evaluated by the intensity of occurrence of peroxidative processes in this biomaterial, is shown in Fig. 2. For example, when the cooling rate was 1 °C/min, the level of the MDA accumulation in the LF samples of newborn pigs was by 4-fold higher as compared with control, and by 3-fold — in the LF samples of mature pigs. However, thawed biomaterial demonstrated age-dependent differences. Here the studied feature in the LF samples of pigs is by 1.5-fold lower as compared with that in newborn pigs, though in the native LF samples of these animals (control) the levels of the MDA accumulation are nearly similar ($p > 0.05$). Apparently, antioxidative system of pigs is stronger adapted to various damaging factors. In the process of vital activity the animals developed a certain protective system for any damaging exposure both at the organismic and cellular levels [3], which once again support the fact of higher resistance of the antioxidative system of the liver of mature pigs to cold exposure.

The effect of conditions of cryopreservation, which are realized with the help of cooling rates, on survival of the studied biomaterial without applying cryoprotective solutions, facilitates development of peroxidative processes in the LF. According to the concept of

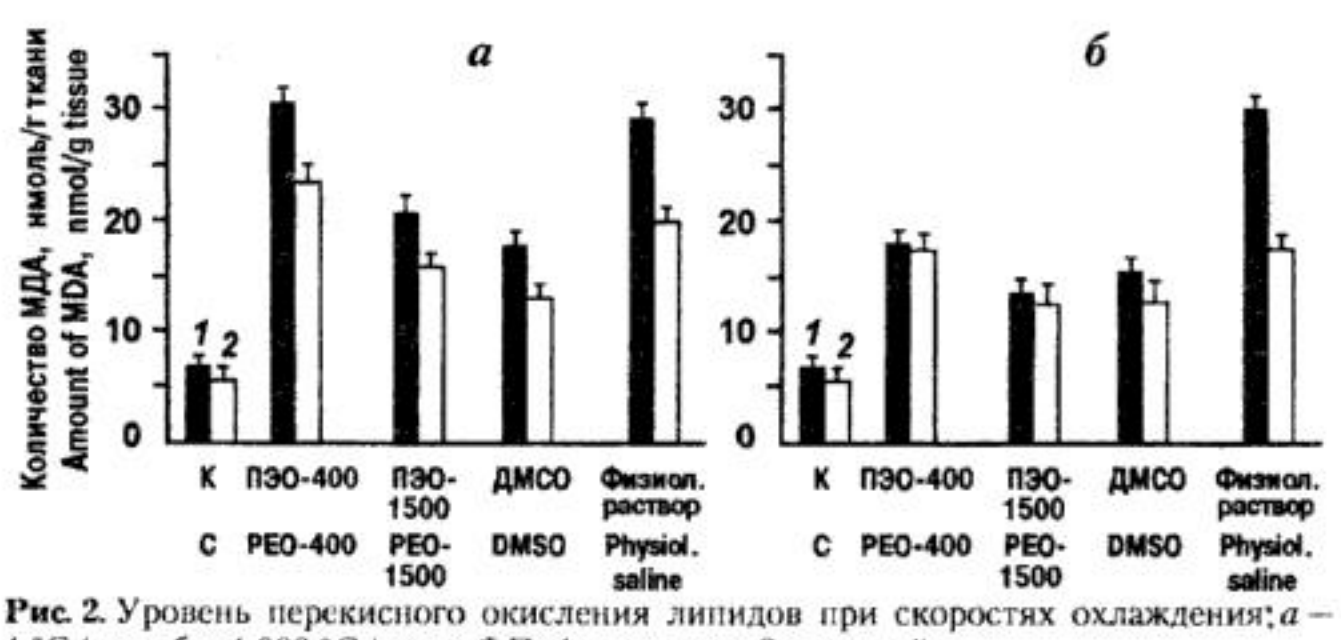


Рис. 2. Уровень перекисного окисления липидов при скоростях охлаждения: *а* — 1 °С/мин; *б* — 1 000 °С/мин в ФП; *1* — поросят; *2* — свиней.

Fig. 2. Level of lipid peroxidation with the cooling rates of: *а* — 1 °C/min; *б* — 1,000 °C/min in the LF of: *1* — newborn pigs; *2* — mature pigs.

Матеріал, захищений авторським правом

точном уровнях [3, 11], что еще раз подтверждает факт большей устойчивости антиоксидантной системы печени свиней к действию холода.

Влияние условий криоконсервирования, реализуемых с помощью скоростей охлаждения, на сохранность исследуемого биоматериала без использования криозащитных растворов способствует развитию перекисных процессов в ФП. Согласно концепции солевого повреждения клеток [5], концентрация физиологического раствора NaCl в эвтектической точке (–21 °С) достигает 5 М и такая насыщающая солевая среда разрушает структуру мембран, особенно при медленных скоростях охлаждения, когда вымораживается экстра- и интрацеллюлярная вода. В результате нарушения водородных, ионных и гидрофобных связей между компонентами мембран под влиянием высокой концентрации солей мембраны теряют часть фосфолипидов и холестерин, нарушаются также барьерные свойства мембран для ионов и метаболитов [5, 6]. Однако в диапазоне быстрых скоростей охлаждения в данном случае использовали скорость охлаждения 1 000 °С/мин, когда переохлажденные клетки не успевают дегидратировать и повреждаются в основном внутриклеточными кристаллами льда, т.е. клетки не успевают обезводиться, вследствие чего возрастает частота зарождения внутриклеточных кристаллов [9], нарушающих целостность клеточной мембраны. Очевидно, подобные процессы могут происходить и в ФП при замораживании-отогреве, индуцирующем развитие в них перекисных процессов.

При скорости охлаждения 1 °С/мин образцов ФП поросят и свиней, криоконсервированных в присутствии ПЭО-1500 и ДМСО, уровень накопления МДА достоверно ниже ($p < 0,05$) по сравнению с такими как в присутствии ПЭО-400, так и при отсутствии КП. При использовании ПЭО-400 в качестве КП при скорости охлаждения 1 °С/мин его криозащитный эффект для ФП поросят и свиней не выявлен. Имеются также данные о зависимости токсичного эффекта ПЭО-400 от его молекулярной массы [5, 10], т.е. с ее увеличением токсичность полимера понижается. Следовательно, можно предполагать, что при криоконсервировании образцов ФП с растворами ПЭО-400 данный КП вносит отрицательное действие, способствуя тем самым активации в них перекисных процессов, которая менее выражена при использовании в качестве криопротекторов ПЭО-1500 и ДМСО.

Уровень накопления МДА в образцах ФП поросят, криоконсервированных с КП при скорости охлаждения 1 000 °С/мин (рис. 2), почти в 2 раза ниже по сравнению с образцами, криоконсервированными без КП, т.е. при таких условиях криоконсервирования на образцах ФП поросят показан криозащитный эффект для всех используемых в работе КП, хотя исследуемый показатель при этом в 2 раза выше контрольного. Для образцов ФП

salt injury to cells [5], the concentration of a physiological saline at the eutectic point (–21 °C) is as high as 5 M, and such a saturating saline medium destroys the membrane structures, especially at slow cooling rates, when extra- and intracellular water is frozen out. Due to ruptures of the hydrogen, ionic and hydrophobic bonds between the membrane components under the action of high concentrations of salts the membranes loose some phospholipids and cholesterol, and the barrier properties of the membranes to ions and metabolites are disturbed [5, 6]. However, within the range of high cooling rates in the given research the authors applied the cooling rate of 1,000 °C/min, when the supercooled cells failed to get dehydrated and were injured, mainly, by the intracellular ice crystals, i.e. the frequency of development of the intracellular crystals [9] increased, which disturbed the integrity of the cell membrane. Apparently, these processes may also occur in the LF during freeze-thawing, which induces development of peroxidative processes in them.

When the LF samples of newborn and mature pigs, cryopreserved in the presence of DMSO, are cooled with the rate of 1 °C/min, the level of the MDA accumulation is significantly lower ($p < 0.05$) as compared with those in the presence of PEO-400 and in the absence of cryoprotectants (CPs). When PEO-400 is used as a CP and the rate of cooling 1 °C/min, its cryoprotective effect for the LF of newborn and mature pigs is not observed. The data are available on the dependence of a toxic effect of PEO-400 on its molecular mass [5, 10], i.e. a rise in the latter reduces toxicity of the polymer. Hence, it may be supposed that during cryopreservation of the LF samples with the solutions of PEO-400 the given CP exercises a negative action, thus facilitating activation of peroxidative processes in them, which is less manifested when PEO-1500 and DMSO are used as cryoprotectants.

The level of the MDA accumulation in the LF samples of newborn pigs, cryopreserved with CPs with the cooling rate of 1,000 °C/min (Fig. 2), is by nearly 2-fold lower as compared with the samples, cryopreserved without cryoprotectants, i.e. under these conditions of cryopreservation of the LF samples of newborn pigs the authors managed to demonstrate a protective effect for all the CPs, used in the research, though the studied feature here is by 2-fold higher as compared with control. During cryopreservation of the LF samples of mature pigs a cryoprotective effect was demonstrated for PEO-1500 and DMSO, and the level of the MDA accumulation in the LF samples of mature pigs, cryopreserved with the given CPs, was significantly different from those in the absence of CPs ($p < 0.05$). When the cooling rate was 1,000 °C/min in the LF of newborn pigs the cryoprotective effect was evidenced for all the applied cryoprotectants, since the level of the MDA accumulation was reduced by nearly 2-fold in the biosystem under study as compared with the data, obtained during cryopreservation of the LF of newborn pigs in the

Матеріал, захищений авторським правом

свиней криозащитный эффект выявлен при их криоконсервировании с ПЭО-1500 и ДМСО, уровень накопления МДА в образцах ФП свиней, криоконсервированных с данными КП, достоверно отличается от таковых при их отсутствии ($p < 0,05$). При скорости охлаждения порядка 1 000 °С/мин в ФП поросят криозащитный эффект оказывали все используемые в работе КП, так как в исследуемом биообъекте происходило снижение уровня накопления МДА почти в 2 раза по сравнению с данными, полученными при криоконсервировании ФП поросят без КП. Наиболее эффективными КП являются ПЭО-1500 и ДМСО при данных условиях криоконсервирования ФП поросят. Указанные выше КП эффективны также и при криоконсервировании ФП свиней, но их защитный эффект выражен в меньшей степени, чем в образцах ФП новорожденных животных.

По данным [2, 13, 14] известно, что 10–15%-е растворы ПЭО-1500 при замораживании образуют аморфные структуры, которые способствуют замедлению процесса кристаллизации и уменьшению размеров образующихся кристаллов. В этих условиях увеличивается тенденция к переохлаждению сред, что заметно снижает температуру начальной фазы их кристаллизации. Так как ПЭО-1500 кристаллизуется неодновременно с водой, очевидно, проникая в пространство между кристаллами, он может разбавлять солевые растворы и не допускать образования высокой концентрации. К тому же вероятно, что этот КП приводит к стабилизации гидратационных решеток, окружающих белки, что также снижает эффект экстремальных воздействий, возникновение которых обусловлено влиянием процессов замораживания-отогрева [5].

Таким образом, подбирая оптимальные условия криоконсервирования ФП поросят и свиней по уровню накопления МДА, отражающем степень повреждения клеточных мембран в этом биообъекте, было показано, что наиболее эффективными условиями криоконсервирования для ФП поросят являются сверхбыстрые скорости охлаждения в присутствии ПЭО-1500, ДМСО и медленные — в присутствии ДМСО, который, обладая коллигативными свойствами, проникает внутрь объекта и предотвращает клетки от критических степеней дегидратации, минимального объема и гиперконцентрации солей. Эффективность ПЭО-1500, очевидно, обусловлена свойством стабилизировать пространственную структуру воды, повышая вязкость раствора, способствуя тем самым развитию витрификации в образцах, понижая при этом степень криоповреждений их биологических структур.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Антонов В. Ф., Смирнова Е. Ю., Шевченко Е. В.* Липидные мембраны при фазовых превращениях.– М.: Наука, 1992.– 136 с.
2. *Белоус А. М.* Проблемы криобиохимии мембранных структур // Пробл. криобиологии.– 1997.– № 1–2.– С. 19–23.

absence of cryoprotectants. The most effective cryoprotectants are PEO-1500 and DMSO under the given conditions of cryopreservation of LF of newborn pigs. The above CPs are also effective during cryopreservation of the LF of mature pigs, though their protective effects was manifested to a lower extent as compared with the samples of the LF of newborn pigs.

Elsewhere [2, 13, 14] it was reported that 10-15% solutions of PEO-1500 during freezing form amorphous structures, which facilitate slowing down of the processes of crystallization and reducing in size of the crystals being formed. Under these conditions a tendency towards supercooling of the media is reduced, thus strongly the temperature of the original phase of their crystallization. Since PEO-1500 is crystallized not simultaneously with water, and, apparently, it penetrates into the spaces between ice crystals, it may dilute saline solutions and prevent formation of high concentrations. Probably, the given CP stabilizes hydration grids, surrounding proteins, thus also reducing the effect of extreme exposures, which are developed due to the action of the processes of freeze-thawing [5].

Thus, by selecting the optimum conditions for cryopreservation of the LF of newborn and mature pigs by the level of the MDA accumulation, which reflects the extent of cryoinjuries to the membranes in this biosystem, the authors managed to demonstrate that the most effective conditions for cryopreservation for the LF of newborn pigs are suprahigh rates of cooling in the presence of PEO-1500, DMSO, and slow rates — in the presence of DMSO, which, while possessing colligative properties, penetrates inside the system and protects cells against critical extents of dehydration, minimum volume and hyperconcentration of salts. The efficiency of PEO-1500 is, apparently, due to the ability to stabilize spatial structure of water, thus increasing viscosity of the solution and facilitating development of vitrification within the samples, and reducing the extent of cryoinjuries to their biological structures.

REFERENCES

1. *Antonov V. F., Smirnova E. Yu., Schevchenko E. V.* Lipid membranes during phase transformations.– M.: Nauka publ., 1992.– 136 p.
2. *Belous A. M.* Problems of cryobiochemistry of membrane structures // Probl. kriobiologii.– 1997.– № 1–2.– P. 19–23.
3. *Vladimirov Yu. A., Archakov A. I.* Lipid peroxidation in biological membranes.– M.: Meditsina publ., 1972.– 252 p.
4. *Galchenko S. E.* Peculiarities of cryopreservation of biological systems using high cooling rates: Abstr. Thesis Cand. Biol. Sci.– M., 1990.– 16 p.
5. *Gonskiy Ya. I., Korda M. M., Klisch I. M.* Antioxidative action of dimethyl sulfoxide during acute injury to the liver by tetrachlormethane // Vopr. med. khimii.– 1992.– 38, № 2.– P. 43–44.
6. *Grischenko V. I., Kalugin Yu. V., Luchko N. A.* Suprahigh cooling rates and vitrifying solutions in cryobiology // Probl. kriobiologii.– 1993.– № 3.– P. 3–13.
7. *Zaitsev G. N.* Mathematical statistics in experimental botany.– M.: Nauka publ., 1984.– 424 p.
8. *Khachatauryan M. L., Gusakov V. M., Komarov P. G. et al.* Comparative evaluation of the features of lipid peroxidation in the heart, liver and brain of rats with different resistance

Матеріал, захищений авторським правом

3. *Владимиров Ю. А., Арчаков А. И.* Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.– М.: Медицина, 1972.– 252 с.
4. *Гальченко С. Е.* Особенности криоконсервирования биологических объектов с применением больших скоростей охлаждения: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.– М., 1990.– 16 с.
5. *Гонский Я. И., Корда М. М., Клищ И. М.* Антиокислительное действие диметилсульфоксида при остром поражении печени тетрахлорметаном // Вопр. мед. химии.– 1992.– 38, № 2.– С. 43–44.
6. *Грищенко В. И., Калугин Ю. В., Лучко Н. А.* Сверхбыстрые скорости охлаждения и витрифицирующие растворы в криобиологии // Пробл. криобиологии.– 1993.– № 3.– С. 3–13.
7. *Зайцев Г. Н.* Математическая статистика в экспериментальной ботанике.– М.: Наука, 1984.– 424 с.
8. *Хачатурьян М. Л., Гусаков В. М., Комаров П. Г. и др.* Сравнительная оценка показателей перекисного окисления липидов сердца, печени и мозга крыс с различной устойчивостью к гипоксии // Бюл. эксперим. биологии и медицины.– 1996.– № 2.– С. 138–143.
9. *Anchordoguy J. T., Cecchini C. A., Crowe J. H.* et al. Insights into the cryoprotective mechanism of dimethyl sulfoxide for phospholipid bilayers // Cryobiology.– 1991.– 28, № 4.– P. 467–473.
10. *Arakawa T., Carpenter J. F., Kita Y. A., Crowe J. H.* The basis for toxicity of certain cryoprotectants: An hypothesis // Cryobiology.– 1990.– 27, № 4.– P. 401–415.
11. *Elder H. Y., Gray C. C., Jardine A. G., Chapman J. N.* Optimum conditions for cryoquenching of small tissue blocks in liquid cooling // J. Microsc.– 1982.– 126, № 1.– P. 45–61.
12. *Ekins S.* Vitrification of precision-cut liver slices // Cryo-Lett.– 1996.– 17, № 7.– P. 7–12.
13. *Fisher R. L., Hasal S. J., Jeffery T. S. et al.* Cold- and cryopreservation of dog liver and kidney slices // Cryobiology.– 1996.– 33, № 1.– P. 163–171.
14. *Peyridie J. F., Baudot A., Boutron P. et al.* Critical cooling and worming rates to avoid ice crystallization in small pieces of mammalian organs permeated with cryoprotective agents // Cryobiology.– 1996.– 33, № 4.– P. 436–446.
16. *Whiteley G. S., Fuller B. J., Hobbs K. E.* Lipid peroxidation on liver tissue specimens stored at subzero temperatures // Cryo-Lett.– 1992.– 13, № 2.– P. 83–86.
14. *Pat. 4.817.397 USA, F25B 19/00* Device for refrigeration and freezing of biological objects / V. I. Grischenko, V. F. Tarasov, S. E. Galchenko et al.– Publ. April 4, 89 (USSR)

Поступила 17.08.99

to hypoxia // Bull. eksperim. biologii i meditsiny.– 1996.– № 2.– P. 138–143.
9. *Anchordoguy J. T., Cecchini C. A., Crowe J. H.* et al. Insights into the cryoprotective mechanism of dimethyl sulfoxide for phospholipid bilayers // Cryobiology.– 1991.– 28, № 4.– P. 467–473.
10. *Arakawa T., Carpenter J. F., Kita Y. A., Crowe J. H.* The basis for toxicity of certain cryoprotectants: An hypothesis // Cryobiology.– 1990.– 27, № 4.– P. 401–415.
11. *Elder H. Y., Gray C. C., Jardine A. G., Chapman J. N.* Optimum conditions for cryoquenching of small tissue blocks in liquid cooling // J. Microsc.– 1982.– 126, № 1.– P. 45–61.
12. *Ekins S.* Vitrification of precision-cut liver slices // Cryo-Lett.– 1996.– 17, № 7.– P. 7–12.
13. *Fisher R. L., Hasal S. J., Jeffery T. S. et al.* Cold- and cryopreservation of dog liver and kidney slices // Cryobiology.– 1996.– 33, № 1.– P. 163–171.
14. *Peyridie J. F., Baudot A., Boutron P. et al.* Critical cooling and worming rates to avoid ice crystallization in small pieces of mammalian organs permeated with cryoprotective agents // Cryobiology.– 1996.– 33, № 4.– P. 436–446.
16. *Whiteley G. S., Fuller B. J., Hobbs K. E.* Lipid peroxidation on liver tissue specimens stored at subzero temperatures // Cryo-Lett.– 1992.– 13, № 2.– P. 83–86.
14. *Pat. 4.817.397 USA, F25B 19/00* Device for refrigeration and freezing of biological objects / V. I. Grischenko, V. F. Tarasov, S. E. Galchenko et al.– Publ. April 4, 89 (USSR)

Accepted in 17.08.99

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 615.361.031.014.413: 611.08

Использование криоконсервированных эмбрионов человека во вспомогательных репродуктивных технологиях

М. П. ПЕТРУШКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

UDC 615.361.031.014.413: 611.08

Application of Cryopreserved Human Embryos in the Assisted Reproductive Technologies

M. P. PETRUSHKO

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

В обзоре литературы представлены данные по разработке методов криоконсервирования эмбрионов человека, находящихся на разных стадиях своего развития, уровню их выживаемости и частоте наступления беременности в программе экстракорпорального оплодотворения.

В огляді літератури представлено дані щодо розроблення методів кріоконсервування ембріонів людини, які знаходяться на різних стадіях свого розвитку, рівня їх виживання і частоти настання вагітності в програмі екстракорпорального запліднення.

The review of the literature deals with the data on the elaboration of methods of cryopreservation of human embryos, staying at different stages of their development, level of their survival and pregnancy occurrence rate in the program of the extracorporal fertilization.

Развитие вспомогательных репродуктивных технологий, в частности метода экстракорпорального оплодотворения, позволило получать предимплантационные эмбрионы человека и изучать особенности их развития *in vitro* [5]. В результате применения индукторов суперовуляции стало возможным аспирировать не единичные ооциты как при естественной овуляции. Усовершенствование эмбриологического этапа экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) увеличило частоту оплодотворения [24], появилась возможность получать эмбрионов больше, чем необходимо для переноса в полость матки пациентки. Поэтому актуален вопрос хранения так называемых "лишних" эмбрионов [9–11].

Как правило, в полость переносят 3–4 эмбриона, поскольку перенос большего количества клеток чреват возникновением многоплодной беременности. Оставшиеся эмбрионы в условиях *in vitro* жизнеспособны 6–7 сут и, достигая стадии экспандированной бластоцисты, погибают. Поэтому замораживание эмбрионов позволило переносить их при необходимости в следующих менструальных циклах без применения гормональной стимуляции [14].

Естественный менструальный цикл контролируется с помощью ультразвукового и гормонального мониторинга, и когда нормализуется эндокринный статус женщины, эмбрионы переносят в матку. Криоконсервированные эмбрионы позволяют снижать количество врачебных манипуляций, время пребывания пациентки в лечебном учреждении и стоимость процедуры. Использовать криоконсер-

Elaboration of the auxiliary reproductive technologies, a method of extracorporal fertilization, in particular, made it possible to collect pre-implantation human embryos and to investigate the distinguishing features of their development *in vitro* [5]. Application of the inductors of superovulation allowed to aspirate not only single oocytes as during natural ovulation. Modification of the embryological stage of the *in vitro* fertilization (IVF) increased the frequency of the fertilization occurrence rate [24], thus making it possible to collect more embryos that it is required for transfer into the uterine cavity of the patient. That is why the problem of storing the so-called "superfluous" embryos became urgent [9–11].

Normally, 3–4 embryos are transferred into the cavity, since transfer of a larger amount of cells may result in multiple pregnancy. The remaining embryos maintain viability *in vitro* for 6–7 days; they die after reaching the stage of the expanded blastocyst. That is why freezing of embryos made it possible to transfer them if required during the menstrual cycles without applying hormonal stimulation [14].

Natural menstrual cycle is controlled by means of the ultrasound and hormonal monitoring, and when the endocrine status of the woman is normalized, the embryos are transferred into the uterus. Cryopreserved embryos permit to reduce the number of therapeutic manipulations, duration of staying in the hospital and cost of treatment. Cryopreserved embryos should be used when it is obviously ineffective to transfer the collected embryos into the uterine cavity

Матеріал, захищений авторським правом

вированные эмбрионы следует, если в лечебном цикле переносить полученные эмбрионы в полость матки пациентки заведомо неэффективно (например, при синдроме гиперстимуляции яичников, незрелости эндометрия). Одной из проблем подготовки пациенток, взятых на программу ЭКО, является трудность ведения лютеиновой фазы цикла после введения экзогенных менопаузального и хорионического гонадотропинов (ХГ). Большое содержание ХГ или прогестерона вызывает искусственную лютеиновую фазу, несовместимую с ростом плода. Криоконсервирование эмбрионов открывает новые возможности суррогатного материнства.

Первая беременность после переноса деконсервированного эмбриона была получена в 1983 г. [5]. Во всем мире насчитывается более 5 000 таких детей.

Появились сообщения о получении многоплодных беременностей. В 1995 г. впервые после переноса трех эмбрионов была диагностирована монохориальная триамниотическая беременность, закончившаяся рождением трех здоровых нормальных мальчиков [4], а в 1998 г. была получена пятиплодная беременность после переноса пяти деконсервированных эмбрионов [20]. Средняя эффективность метода криоконсервирования эмбрионов человека определяется по частоте наступления беременности и составляет по данным различных центров от 11 [11] до 37% [22].

Стандартным методом криоконсервирования эмбрионов человека остается метод медленного охлаждения по специальным программам с использованием, как правило, проникающих криопротекторов [7]. Этот метод обеспечивает высокую степень дегидратации клеток, что позволяет устранить вероятность образования внутриклеточных кристаллов льда. Эмбрионы человека криоконсервируют в средах, предназначенных для культивирования гамет и эмбрионов человека в условиях *in vitro*. Криоконсервантом служит преимущественно диметилсульфоксид или 1,2-пропандиол. Эмбрионы проводят через серию растворов с увеличивающейся концентрацией раствора криопротектора, охлаждают от комнатной температуры со скоростью 1–2 °С/мин. Вблизи точки депрессии создается значительное переохлаждение, что требует инициирования кристаллизации (сидинг). Сидинг производят при температуре –6 ÷ –7 °С. Установлено, что внутриклеточное образование льда в эмбрионах происходит интенсивно в интервале температур –30 ÷ –50 °С, поэтому последующее охлаждение осуществляется очень медленно (0,2–0,5 °С/мин). После достижения температуры –50 °С скорость охлаждения увеличивают до 1 °С/мин. При –150 °С эмбрионы переносят в жидкий азот [6].

Для жизнедеятельности эмбрионов не менее важен процесс оттаивания. Преимущественно используется быстрая скорость отогрева, поскольку при медленном оттаивании эмбрионы погибают вследствие развития внутриклеточной рекристал-

of the recipient (e.g. during the syndrome of hyperstimulation of the ovaries, immaturity of the endometrium). One of the problems in preparation of the patients for the ECF program is difficult monitoring of the luteinic phase of the cycle after injection of the exogenous menopausal and chorionic gonadotropins (CG). A high content of CG or progesterone produces an artificial luteinic phase, incompatible with the growth of the fetus. Cryopreservation of embryos opens up new prospects for substitutive maternity.

The first pregnancy following a transfer of the thawed embryo was obtained in 1983 [5]. Currently there are about 5,000 children all over the world born after such pregnancies.

Elsewhere there were reported on the multiple pregnancies. In 1995 for the first time after a transfer of three embryos there was diagnosed a monochorial triamnionic pregnancy, which gave birth to three healthy normal boys [4], and in 1998 there was registered a 5-fetus pregnancy following a transfer of 5 thawed embryos [20]. The mean efficiency of the method of thawing of human embryos is determined by the frequency of the pregnancy occurrence rate and comprises from 11 to 37% as reported by various sources [22].

A standard method of cryopreservation of human embryos is a method of slow cooling by the special programs normally using penetrating cryoprotectants [7]. This method provides for a high dehydration of cells, thus eliminating the risk of formation of the intracellular ice crystals. Human embryos are cryopreserved in the media, designed for culturing of human gametes and embryos *in vitro*. Dimethylsulfoxide or 1,2-propanediol are mainly used as cryopreservatives. The embryos are staged through a series of solutions with increasing concentration of the cryoprotective solution, and cooled down to the room temperature with the rate of 1–2 °C/min. A considerable supercooling is created close to the point of depression, which requires initiation of crystallization (seeding). Seeding is performed at the temperature of –6 ÷ –7 °C. It was found that intracellular formation of ice in the embryos intensively occurs within the temperature range of –30 ÷ –50 °C, hence, subsequent cooling is realized very slowly (0.2–0.5 °C/min). After reaching the temperature of –50 °C the rate of cooling is increased up to 1 °C/min. At –150 °C the embryos are transferred into liquid nitrogen [6].

The process of thawing is very important for the vital activity of embryos. Mainly the rapid rate of thawing is applied, since during slow thawing the embryos die due to intracellular recrystallization. The next important stage is elimination of the cryoprotectant by staging the embryos through solutions with decreasing concentration of the cryoprotectant. Then the embryos should be transferred into the culturing medium. Lately there appeared numerous reports on the introduction of new methods of embryo cryopreservation [12, 13]. Vitrification is one of them. The

Матеріал, захищений авторським правом

лизации. Следующий важный этап – удаление криопротектора путем проведения эмбрионов через растворы с уменьшающейся концентрацией криопротектора. Далее эмбрионы необходимо перенести в среду культивирования.

В последнее время появились публикации по внедрению новых методов криоконсервирования эмбрионов [12, 13]. Один из них – витрификация. Данный метод основан на предварительной экспозиции эмбрионов в растворах высоких концентраций криопротекторов – проникающих (ДМСО, ацетамид, пропиленгликоль) и непроникающих (полиэтиленгликоль, фиколл, сахароза) [17]. При этом, как правило, не образуется кристаллов льда ни внутри клеток, ни в окружающем их растворе [3].

При использовании витрификации эмбрионы уравновешиваются в смеси криопротекторов и после того, как цитоплазма обезводится, суспензию эмбрионов помещают в жидкий азот. Скорость охлаждения практически не имеет значения, если она достаточно высока для того, чтобы предотвратить кристаллизацию. Единственный недостаток витрификации – химическая токсичность растворов криопротекторов, которая прямо пропорциональна концентрации, времени и температуре экспозиции эмбриона в данных растворах. Результативность данного метода показана в [12, 13].

В последнее время витрификация применяется к эмбрионам, находящимся на стадии морулы–бластоцисты, поскольку традиционные методы консервирования не дают удовлетворительных результатов.

Дискуссионным остается вопрос оптимальной стадии развития эмбриона, способной перенести условия глубокого охлаждения. Van Steirteghem [21, 22] показал, что оптимальной стадией для криоконсервирования является стадия 2-х бластомеров или менее. С этими выводами согласуются данные [23]. Автор демонстрирует, что после криоконсервирования эмбрионов на стадии пронуклеусов, жизнеспособными остаются 72, на стадии 2-х бластомеров – 60, а на стадии бластоцисты – 38%. Частота беременности после переноса замороженно-оттаянных эмбрионов – 47, 14 и 0% соответственно. Аналогичные результаты получены Fugger [10].

Miller [16] предлагает криоконсервировать только зиготы, поскольку именно эта стадия приводит к оптимальным показателям выживания, дробления и частоты наступления беременности. Аналогичные результаты представлены Abbeel [1, 2]. Freemann [9] считает оптимальной стадией криоконсервирования 8-клеточный эмбрион.

Эффективность хранения эмбрионов при низких температурах на стадии кавитированной бластоцисты показана в [18, 24]. Так, Menezo с соавторами довел, что после эмбриотрансплантации деконсервированной бластоцисты частота беременности составила 21%. Причем автор считает, что более поздние стадии легче переносят условия кон-

given method is based on the pre-exposure of embryos in the solutions of high concentrations of cryoprotectants – penetrating (DMSO, acetamide, propylene glycol) and non-penetrating (polyethylene glycol, ficoll, sucrose) [17]. There ice crystals are not normally formed neither inside cells nor in the surrounding solution [3].

During vitrification the embryos are equilibrated in the mixture of cryoprotectants and after dehydration of the cytoplasm the suspension of embryos is placed into liquid nitrogen. The rate of cooling is actually of no importance, if it is sufficiently high for prevention of crystallization. The only drawback of vitrification is chemical toxicity of the cryoprotective solutions, which is directly proportional to the concentration, duration and temperature of exposure of the embryo in these solutions. The efficiency of this method was supported elsewhere [12, 13].

Lately vitrification has been applied to the embryos, being at the stage of morula-blastocyst, since routine methods of cryopreservation at these stages do not produce satisfactory results.

Still under discussion is the problem of the optimum stage of the embryo development, capable of tolerating conditions of profound freezing.

Van Steirteghem [21, 22] showed that the optimum stage for cryopreservation is the stage of 2 blastomeres or less. The data reported elsewhere [23] nicely correlate with this. The author claims that following cryopreservation of embryos at the stage of pronuclei the viability is maintained by 72% of embryos, at the stage of 2 blastomeres – by 60%, and at the stage of blastocyst – by 38% of embryos. The frequency of the pregnancy occurrence following transfer of the frozen-thawed embryos is 47, 14 and 0%, respectively. Similar results were obtained by Fugger [10].

Miller [16] propose to cryopreserve only zigotes, since this very stage produces the optimum features of survival, cleavage and frequency of pregnancy occurrence. Similar results were presented by Abbeel [1, 2]. Freemann [9] believes the optimum stage for cryopreservation to be the 8-cell embryo.

The efficiency of storage of embryos at low temperatures at the stage of the cavitated blastocyst was reported elsewhere [18, 24]. For example, Menezo et al. demonstrated that following emrbyo transplantation of the thawed blastocyst the frequency of the pregnancy occurrence was 21%. The author believes that later stages easier tolerate the conditions of preservation, since the volume of the cell does not increase with the development of the embryo, and blastomeres are compactisized; even if one or several blastomeres are injured, the remaining ones may start the development of the whole organism [15]. Apparently, the frequency of the pregnancy occurrence after transfer of the thawed embryos is affected by the integrity of their morpho-functional state. However, the opinion of experts differ on this matter. For example, some of them believe that embryo transfer

Матеріал, захищений авторським правом

сервирования, поскольку с развитием эмбриона объем клетки не увеличивается, происходит компактизация бластомеров и даже если один или несколько бластомеров все же были повреждены, то остальные могут дать начало развитию целого организма [15]. Очевидным является тот факт, что на частоту беременности после переноса деконсервированных эмбрионов влияет сохранность их морфофункционального состояния. Однако и в этом вопросе единодушное мнение специалистов отсутствует. Так, одни считают, что эмбриоперенос следует производить сразу же после оттаивания клеток [13], другие подчеркивают необходимость проследить темпы дробления эмбрионов в культуре [8]. Интересными в данном направлении являются работы [25, 26], в которых сравниваются две группы эмбрионов: с последующим дроблением после деконсервации и без такового. В этих группах частота беременности составила 28 и 11% соответственно. Аналогичные результаты получил Elst [6].

Zeibe и др. отмечают, что при сохранности хотя бы одного бластомера эмбрион можно считать перенесшим криоконсервирование [25], Abbeel, Obasaju тщательно анализируют сохранность бластомеров, целостность мембраны и zona pellucida [1, 19]. По данным большинства авторов, эмбрион считают пережившим криоконсервирование, если по крайней мере половина бластомеров остаются целыми [1].

Таким образом, существует несколько методов криоконсервирования предимплантационных эмбрионов человека, основанных на различных скоростях охлаждения и составе криоконсерванта. Это методы медленного охлаждения, витрификация и быстрое охлаждение.

За последнее десятилетие произошла эволюция всех этих методов: от использования сложного оборудования до сверхбыстрых методов с прямым погружением эмбрионов в жидкий азот; от методов с использованием больших концентраций криопротекторов до их минимальных концентраций либо полного отсутствия в составе криоконсерванта. Однако целый спектр проблем остается открытым. Наиболее важный – вопрос о влиянии факторов криоконсервирования на генетический аппарат эмбрионов человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Abbeel E., Camus M., Waesberghe L. et al.* Viability of partially damaged human embryos after cryopreservation // Hum. Reprod.– 1997.– 12, № 9.– P. 2006–2010.
2. *Abbeel E., Camus M., Waesberghe L. et al.* A randomized comparison of the cryopreservation of one-cell human embryos with a slow controlled-rate cooling procedure or a rapid cooling procedure by direct plunging into liquid nitrogen // Hum. Reprod.– 1997.– 12, № 7.– P. 1554–1560.
3. *Barg P. E., Barad D. H.* Ultrarapid freezing of mouse and human preembryos: a modified approach // J. In Vitro Fert. Embryo Transfer.– 1990.– 7, № 6.– P. 355–357.
4. *Belaisch-Allart J., Elaoufir A., Mayenga J. M. et al.* Monozygotic triplet pregnancy following transfer of frozen-thawed embryos // Hum. Reprod.– 1995.– 10, № 11.– P. 3064–3066.
5. *Edwards R. G., Handyside A. H.* Future developments in IVF // Med. Bull.– 1990.– 46, № 3.– 823 p.

should be implemented immediately after thawing of cells [13]. Other stress the necessity for monitoring the rates of the embryo cleavage in the culture [8]. Very interesting in this respect seems the research [25, 26] in which two groups of embryos are compared: with subsequent cleavage after thawing and without it. The frequency of the pregnancy occurrence in these groups comprised 28 and 11%, respectively. Similar results were obtained by Elst [6].

Zeibe et al. report that even when the only one blastomere is intact, the embryo may be considered as the one survived cryopreservation [25]. Abbeel, Obasaju thoroughly analyze survival of blastomeres, intactness of the membrane and zona pellucida [1, 19]. As reported by most authors the embryo is considered as survived cryopreservation even if, at least, half the blastomeres remain intact [1].

Thus, currently there are employed several methods of cryopreservation of human pre-implantation embryos, based upon application of different cooling rates and compositions of the cryopreservatives. These methods are slow cooling, vitrification and rapid cooling.

In the last decade these methods were significantly improved: from applying complicated equipment to suprahigh methods with direct immersion of embryos into liquid nitrogen; from utilizing high concentrations of cryoprotectants to minimizing their concentrations or completely eliminating their presence within the cryopreservative. However, a whole range of problems still waits to be solved. The most important among them is the problem of influence of the factors of cryopreservation on the genetic apparatus of human embryos.

REFERENCES

1. *Abbeel E., Camus M., Waesberghe L. et al.* Viability of partially damaged human embryos after cryopreservation // Hum. Reprod.– 1997.– 12, № 9.– P. 2006–2010.
2. *Abbeel E., Camus M., Waesberghe L. et al.* A randomized comparison of the cryopreservation of one-cell human embryos with a slow controlled-rate cooling procedure or a rapid cooling procedure by direct plunging into liquid nitrogen // Hum. Reprod.– 1997.– 12, № 7.– P. 1554–1560.
3. *Barg P. E., Barad D. H.* Ultrarapid freezing of mouse and human preembryos: a modified approach // J. In Vitro Fert. Embryo Transfer.– 1990.– 7, № 6.– P. 355–357.
4. *Belaisch-Allart J., Elaoufir A., Mayenga J. M. et al.* Monozygotic triplet pregnancy following transfer of frozen-thawed embryos // Hum. Reprod.– 1995.– 10, № 11.– P. 3064–3066.
5. *Edwards R. G., Handyside A. H.* Future developments in IVF // Med. Bull.– 1990.– 46, № 3.– 823 p.
6. *Elst J., Abbeel E., Vitrier S. et al.* Selective transfer of cryopreserved human embryos with further cleavage after thawing increases delivery and implantation rates // Hum. Reprod.– 1997.– 12, № 7.– P. 1513–1521.
7. *Elst J., Camus M., Abbeel E. et al.* Prospective randomized study on the cryopreservation of human embryos with dimethylsulfoxide or 1.2-propanediol protocols // Fertil. Steril.– 1995.– 63, № 1.– P. 92–100.
8. *Fehilly C. B., Cohen J., Simons R. F. et al.* Cryopreservation of cleaving embryos and expanded blastocysts in the human: a comparative study // Fertil. Steril.– 1985.– 44, № 5.– P. 638–644.
9. *Freemann L., Trounson A., Kirby C. J.* Cryopreservation of human embryos: progress on the clinical use of the tech-

Матеріал, захищений авторським правом

6. *Elst J., Abbeel E., Vitrier S. et al.* Selective transfer of cryopreserved human embryos with further cleavage after thawing increases delivery and implantation rates // Hum. Reprod.– 1997.– 12, № 7.– P. 1513–1521.
7. *Elst J., Camus M., Abbeel E. et al.* Prospective randomized study on the cryopreservation of human embryos with dimethylsulfoxide or 1.2-propanediol protocols // Fertil. Steril.– 1995.– 63, № 1.– P. 92–100.
8. *Fehilly C. B., Cohen J., Simons R. F. et al.* Cryopreservation of cleaving embryos and expanded blastocysts in the human: a comparative study // Fertil. Steril.– 1985.– 44, № 5.– P. 638–644.
9. *Freemann L., Trounson A., Kirby C. J.* Cryopreservation of human embryos: progress on the clinical use of the technique in human *in vitro* fertilization // J. In Vitro Embryo Transf.– 1986.– 3, № 1.– P. 53–61.
10. *Fugger E. F.* Clinical status of human embryo cryopreservation in the United States of America // Fertil. Steril.– 1989.– 52, № 6.– P. 986–990.
11. *Fugger E. F., Bustillo M., Dorfmann A. D., Schulman J. D.* Human preimplantation embryo cryopreservation: selected aspects // Hum. Reprod.– 1991.– 6, № 1.– P. 131–135.
12. *Gordts S., Roziers P., Campo R., Noto V.* Survival and pregnancy outcome after ultrarapid freezing of human embryos // Fertil. Steril.– 1990.– 53, № 3.– P. 469–472.
13. *Lai A. C., Lin B. P., Chang C. C. et al.* Pregnancies after transfer of ultrarapidly frozen human embryos // Assist. Reprod. Genet.– 1996.– 13, № 8.– P. 625–628.
14. *Mandelbaum J., Belasch-Allart J., Junca A. M. et al.* Cryopreservation in human assisted reproduction is now routine for embryos but remains a research procedure for oocytes // J. Human Reprod.– 1998.– 13, № 3.– P. 161–174.
15. *Menezo A., Nicolet B., Herbaut N.* Freezing cocultured human blastocysts // Fertil. Steril.– 1992.– 58, № 5.– P. 977–980.
16. *Miller K. F., Golderberg J. M.* In vitro development and implantation rates of fresh and cryopreserved sibling zygotes // Obstet. Gynecol.– 1995.– 85, № 6.– P. 999–1002.
17. *Mukaida T., Wada S., Takahashi K. et al.* Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell mouse embryos // Hum. Reprod.– 1998.– 13, № 1.– P. 2874–2879.
18. *Nakayama T., Goto Y., Kanzaki H. et al.* // Assist. Reprod. Genet.– 1995.– 12, № 4.– P. 239–243.
19. *Obasaju M. F., Venier W., Blake M. et al.* Comparative study of the survival rate of frozen-thawed embryos with perforated zonae from microsurgical fertilization and frozen-thawed embryos with intact zonae // Fertil. Steril.– 1994.– 61, № 5.– P. 886–890.
20. *Pereress M. R., Phillips H. M.* Quintuplet gestation following transfer of five cryopreserved embryos: conditions stimulating thawed embryo implantation // J. Assist. Reprod. Genet.– 1998.– 15, № 8.– P. 521–523.
21. *Steirteghem A. C., Abbeel E., Camus M., Devroey P.* Cryopreservation of human embryos // Clin. Obstet. Gynaecol.– 1992.– 6, № 2.– P. 313–325.
22. *Steirteghem A. C., Elst J., Abbeel E. et al.* Cryopreservation of supernumerary multicellular human embryos obtained after intracytoplasmic sperm injection // Fertil. Steril.– 1994.– 62, № 4.– P. 775–780.
23. *Troup S. A., Matson P. L., Critchlow J. D. et al.* Cryopreservation of human embryos at the pronucleate, early cleavage, or expanded blastocyst stages // Eur. J. Obstet. Cynecol. Reprod. Biol.– 1991.– 38, № 2.– P. 133–139.
24. *Tucker M. J., Morton P. C., Sweitzer C. L., Wright G.* Cryopreservation of human embryos and oocytes // Curr. Opin. Obstet. Gynecol.– 1995.– 7, № 36.– P. 188–192.
25. *Zeibe S., Bech B., Petersen K.* Resumption of mitosis during post-thaw culture: a key parameter in selecting the right embryos for transfer // Hum. Reprod.– 1998.– 13, № 1.– P. 178–181.
26. *Zeibe S., Petersen K., Lindenberg S. et al.* Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after *in vitro* fertilization // Hum. Reprod.– 1997.– 12, № 7.– P. 1545–1549.

Поступила 22.02.2000

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 618.11-002-097: 611.013.84: 615.014.41

UDC 618.11-002-097: 611.013.84: 615.014.41

Влияние криоэкстракта хориона на состояние иммунитета женщин с подострым сальпингоофоритом

В. А. ПИТЬКО

Харьковский государственный медицинский университет

В. И. ГРИЩЕНКО, Н. П. СУББОТА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Action of Chorion Cryoextract on the Immunity State of Females with Subacute Salpingo-oophoritis

V. A. PIT'KO

Kharkov State Medical University

V. I. GRISCHENKO, N. P. SUBBOTA

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

Показана положительная динамика исследованных клинико-иммунологических показателей, не требующая проведения дополнительных методов иммунокоррекции, при использовании фетального биопрепарата криоэкстракта хориона в комплексном лечении женщин с подострым сальпингоофоритом.

Показана позитивна динаміка досліджених клініко-імунологічних показників, яка не потребує проведення додаткових методів імунокорекції, при використанні фетального біопрепарату кріоекстракту хоріона в комплексному лікуванні жінок з підгострим сальпінгоофоритом.

There was shown a positive dynamics of the studied clinical-immunological features, which does not require additional methods of immune correction, when using chorion cryoextract fetal biopreparation in complex treatment of females with subacute salpingo-oophoritis.

В течение многих лет не теряет своей актуальности проблема лечения воспалительных процессов придатков матки, так как эти заболевания влияют на репродуктивную функцию женщин и вызывают перинатальные осложнения при последующей беременности. Публикации последних лет свидетельствуют об изменении течения воспалительных процессов: преобладают подострые заболевания, их формированию способствует длительная персистенция бактериальных и вирусных возбудителей, обусловленная сниженной реактивностью организма [1].

Лечение воспалительных заболеваний женских половых органов обычно является продолжительным процессом и в большинстве случаев базируется на использовании различных антибактериальных средств, которые могут оказывать отрицательное влияние на общую и иммунологическую реактивность организма, усугубляя тем самым иммунологическую недостаточность больных, связанную с данной патологией.

Несмотря на усовершенствование методов лечения, его эффективность остается недостаточно высокой, что проявляется в хронизации процесса заболевания и его рецидивировании. Для решения проблемы регуляции нарушенных функций организма перспективно использование в комплексе с

For many years the problem of treating the inflammatory processes of the uterine appendages remains urgent, since these diseases affect the reproductive function in females, thus causing complications during subsequent pregnancy.

Recent reports testify to a change in the occurrence of the inflammatory processes: subacute diseases became predominant. Their development is facilitated by a long term persistence of bacterial and viral infections, resulting from reduced reactivity of the organism [1].

Treatment of the inflammatory diseases of female genital organs normally takes much time and is mostly based on application of various antibacterial means, which may negatively affect total and immunologic reactivity of the organism, thus worsening immunological insufficiency of patients, related to the given pathology. Despite modifications of the methods of treatment, its efficiency remains insufficiently high, which is manifested in acquiring a chronic and recurring nature by the process.

Application of biological stimulators of the specific and nonspecific resistance of the organism, in particular, those harvested from the human fetal tissues, in combination with basic preparations seems to be promising for solving the problem of regulating the impaired functions of the organism.

Матеріал, захищений авторським правом

базовыми препаратами биологических стимуляторов специфической и неспецифической резистентности организма, в частности полученных из фетальных тканей человека.

Нами была обоснована эффективность использования криоэкстракта хориона при лечении воспалительных процессов у животных [7]. Цель данной работы – изучение эффективности применения нового биостимулятора криоэкстракта хориона [6] в комплексной терапии подострых воспалительных процессов придатков матки.

Проведено клинико-иммунологическое обследование 63 больных с подострым сальпингоофоритом и 30 здоровых женщин (контрольная группа). Контрольную группу составили соматически здоровые женщины в возрасте 25,2 ± 0,9 лет, в анамнезе которых отсутствовали гинекологические заболевания и за 6 месяцев до обследования не наблюдалось каких-либо воспалительных процессов. Возраст больных женщин колебался от 17 до 35 лет (средний возраст 26,5 ± 0,7).

Сравниваемые группы больных были сопоставимы по возрасту и клиническим проявлениям. С учетом клинического течения заболевания всем больным проводилась комплексная противовоспалительная терапия.

Первую группу составили больные (31 женщина), получавшие этиотропную антибактериальную терапию с обязательным приемом нистатина или леворина в среднетерапевтических дозах. Проводились медикаментозная детоксикация, витаминотерапия B_1, E, C; вводились биостимуляторы ФиБС, плазмол, стекловидное тело; седативные, антигистаминные средства. Пациенты принимали физиотерапевтические процедуры.

Больные 2-й группы (32 женщины) в комплексе с традиционной терапией в качестве биостимулятора получали криоэкстракт хориона (5 раз) по 1,0 мл через день.

Иммунологический контроль осуществляли до лечения и после его окончания. Показатель естественной неспецифической резистентности организма – определение фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови методом завершенного фагоцитоза [3] в прямом визуальном тесте со стафилококком – штамм С 52.

Т-систему лимфоцитов исследовали с помощью реакции спонтанного розеткообразования (Е-РОК) с эритроцитами барана [9], количество Т-супрессоров оценивали методом термостабильных розеток с эритроцитами барана [10], количество В-лимфоцитов – методом розеткообразования с эритроцитами мыши [9]. Уровень иммуноглобулинов (Ig) основных классов (G, A, M) определяли методом радиальной иммунодиффузии по Манчини с использованием коммерческих моноспецифических сывороток. Количество циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) измеряли спектрофотомет-

The authors have earlier substantiated the efficiency of applying chorion cryoextract for treatment of the inflammatory processes in animals [7]. The aim of the given research was to investigate the efficiency of applying new biostimulator – chorion cryoextract [6] – in complex therapy of subacute inflammatory processes of the uterine appendages.

There was conducted a clinical-immunological examination of 63 patients with subacute salpingo-oophoritis and 30 healthy women (control group). The latter was made up of somatically healthy females, aged 25.2 ± 0.9, in the anamnesis of whom gynecological diseases were missing and no inflammatory processes were identified during 6-month period prior to examination. The sick females were aged 17–35 (26.5 ± 0.7 on average).

The two groups were comparable on age and clinical manifestations. Taking into account clinical occurrence all patients experienced complex antiinflammatory therapy.

The first group comprised 31 females, who received etiotropic antibacterial therapy with obligatory taking of nystatin or levorin in mean therapeutic doses. There were conducted medicamentous detoxication and vitamin B_1, E, C-therapies; biostimulators FiBS, plasmol, vitreous body and sedative, antihistaminic preparations were injected. The patients had physiotherapeutic procedures.

The patients of the second group (32 females) received 1.0 ml of chorion cryoextract as a biostimulator every other day.

The immunological control was performed prior to and after treatment. Evaluation of phagocytic activity of neutrophiles of peripheral blood by a method of completed phagocytosis [3] within a direct visual test with a staphylococcus strain C52 was used as an index of the natural nonspecific resistance of the organism.

The lymphocyte T-system was studied using a reaction of spontaneous rosette-formation (E-RF) with ram red cells [9], the amount of T-suppressors was evaluated with a method of thermally stable rosettes with ram red cells [10], and the number of B-lymphocytes – by a method of rosette formation with murine red cells [9]. The levels of immune globulins (Ig) of the major classes (G, A, M) were assessed by a method of radial immune diffusion according to Mancini using commercial monospecific sera. The amount of the circulating immune complexes (CIC) was measured by a spectrophotometric method of precipitation with polyethylene glycol (PEG) with the molecular mass of 6 000 D [2].

The results obtained were statistically processed with a Student–Fisher method. The mean statistical features of the studied parameters of the immunities of patients with subacute salpingo-oophoritis are submitted in the Table.

It follows from the data submitted that prior to treatment there was reported a significant (with respect to control) reduction in the relative and absolute

Матеріал, захищений авторським правом

рическим методом преципитации с полиэтиленгликолем (ПЭГ) молекулярной массой 6 000 Д [2].

Статистическую обработку полученных результатов проводили по критерию Стьюдента – Фишера. Среднестатистические показатели изучаемых параметров иммунитета пациентов с подострым сальпингоофоритом приведены в таблице.

Как видно из представленных данных, до лечения отмечаются достоверное (по отношению к контролю) снижение относительного и абсолютного количества Т-лимфоцитов, повышенный уровень Т-супрессоров, снижение абсолютного содержания В-лимфоцитов. При этом относительное количество последних остается на уровне показателей контрольной группы.

У всех больных до лечения наблюдали достоверно высокий уровень ЦИК, повышенный уровень IgG и IgM, не выходящий за доверительный интервал нормальных значений этих показателей.

Несмотря на сохранение поглотительной способности фагоцитирующих нейтрофилов периферической крови больных на данный срок наблюдения (процент фагоцитирующих нейтрофилов и фагоцитарное число), имеет место достоверное снижение их переваривающей способности, что выражается в отсутствии завершенности фагоцитоза.

Таким образом, в результате проведенного иммунологического обследования больных с подострыми сальпингоофоритами до лечения выявлены среднестатистические изменения изучаемых показателей иммунограмм: снижение относительного и абсолютного количества тимусзависимых лимфо-

Состояние изучаемых показателей иммунитета у больных с подострыми сальпингоофоритами до и после комплексного лечения с использованием различных биостимуляторов

Изучаемые показатели	Здоровые женщины ($n = 30$)	До лечения ($n = 63$)	После лечения	
			Группа 1 ($n = 31$)	Группа 2 ($n = 32$)
Лимфоциты, %	29,81 ± 0,74	24,46 ± 1,23*	19,77 ± 1,62*	26,38 ± 1,74**
$\times 10^9$/л	1,34 ± 0,09	0,94 ± 0,06*	0,67 ± 0,06*	1,06 ± 0,08**
Т-лимфоциты, %	59,57 ± 1,14	45,40 ± 3,36*	42,34 ± 3,12*	54,35 ± 2,82**
$\times 10^9$/л	1,00 ± 0,03	0,44 ± 0,03*	0,28 ± 0,04*	0,67 ± 0,06*,**
Т-супрессоры, %	16,47 ± 0,05	23,87 ± 2,10*	23,30 ± 2,21*	20,70 ± 1,22*
В-лимфоциты, %	8,65 ± 0,31	8,74 ± 0,75	9,52 ± 0,81	7,60 ± 0,64
$\times 10^9$/л	0,17 ± 0,01	0,08 ± 0,01*	0,06 ± 0,02*	0,13 ± 0,01**
ЦИК, усл. ед.	56,00 ± 4,89	136,26 ± 12,84*	146,51 ± 14,20*	71,14 ± 4,01*,**
IgG, г/л	10,40 ± 0,52	14,58 ± 1,05*	9,16 ± 0,48	11,22 ± 1,03
IgA, г/л	3,22 ± 0,25	2,26 ± 0,20	1,17 ± 0,11*	2,23 ± 0,20*
IgM, г/л	1,32 ± 0,14	1,61 ± 0,13	1,44 ± 0,12	1,56 ± 0,09
Фагоцитирующие нейтрофилы, %	78,24 ± 2,30	90,13 ± 2,54*	89,33 ± 2,42*	88,90 ± 2,24*
Фагоцитарное число, усл. ед.	3,11 ± 0,30	3,70 ± 0,29	3,30 ± 0,26	3,33 ± 0,20
Индекс завершенности фагоцитоза, усл. ед.	1,19 ± 0,08	0,83 ± 0,02*	0,81 ± 0,06*	1,06 ± 0,02**

Примечания. * — достоверность различия по отношению к норме, $p < 0,05$; ** — достоверность различия между 1-й и 2-й группой после лечения, $p < 0,05$.

States of the studied features of immunity in patients with subacute salpingo-oophoritis prior to and after complex treatment using various biostimulators

Features being studied	Healthy females $n = 30$	Prior to treatment $n = 63$	After treatment	
			Group 1 $n = 31$	Group 2 $n = 32$
Lymphocytes, %	29.81 ± 0.74	24.46 ± 1.23*	19.77 ± 1.62*	26.38 ± 1.74**
$\times 10^9$/l	1.34 ± 0.09	0.94 ± 0.06*	0.67 ± 0.06*	1.06 ± 0.08**
T-lymphocytes, %	59.57 ± 1.14	45.40 ± 3.36*	42.34 ± 3.12*	54.35 ± 2.82**
$\times 10^9$/l	1.00 ± 0.03	0.44 ± 0.03*	0.28 ± 0.04*	0.67 ± 0.06*,**
T-suppressors, %	16.47 ± 0.05	23.87 ± 2.10*	23.30 ± 2.21*	20.70 ± 1.22*
B-lymphocytes, %	8.65 ± 0.31	8.74 ± 0.75	9.52 ± 0.81	7.60 ± 0.64
$\times 10^9$/l	0.17 ± 0.01	0.08 ± 0.01*	0.06 ± 0.02*	0.13 ± 0.01**
CIC, rel. units	56.00 ± 4.89	136.26 ± 12.84*	146.51 ± 14.20*	71.14 ± 4.01*,**
IgG, g/l	10.40 ± 0.52	14.58 ± 1.05*	9.16 ± 0.48	11.22 ± 1.03
IgA, g/l	3.22 ± 0.25	2.26 ± 0.20	1.17 ± 0.11*	2.23 ± 0.20*
IgM, g/l	1.32 ± 0.14	1.61 ± 0.13	1.44 ± 0.12	1.56 ± 0.09
Phagocyting neutrophiles, %	78.24 ± 2.30	90.13 ± 2.54*	89.33 ± 2.42*	88.90 ± 2.24*
Phagocytic number, rel. units	3.11 ± 0.30	3.70 ± 0.29	3.30 ± 0.26	3.33 ± 0.20
Index of completion, rel. units	1.19 ± 0.08	0.83 ± 0.02*	0.81 ± 0.06*	1.06 ± 0.02**

Notes: * — the difference is significant as compared to the normal values, $p < 0.05$; ** — the difference is significant between groups 1 and 2 after treatment, $p < 0.05$.

amounts of T-lymphocytes, an increased level of T-suppressors, and a decrease in the absolute content of B-lymphocytes. And the relative amount of the latter remains at the level of the indices of the control group.

All the patients prior to treatment demonstrated a significantly high level of CIC, an increased level of IgG and IgM, which did not, however, go beyond the normal confidence range of these features.

Despite current maintenance of a consuming ability of the phagocyting neutrophiles in peripheral blood of patients (portion of phagocyting neutrophiles and phagocytic number), their digestive ability is reduced, which is manifested in the absence of completion of phagocytosis.

Thus, the conducted immunological examination of patients with subacute salpingo-oophoritis prior to treatment demonstrated mean statistical changes in the studied features of the immunograms, namely: reduction in the relative and absolute amounts of thymus-dependent lymphocytes, decrease in the absolute amount of B-lymphocytes with their normal relative levels, increased content of CIC, inhibition of digestive ability of peripheral blood neutrophiles. This is indicative of the fact that subacute inflammation of the uterine appendages is accompanied by changes in the immunograms. That is why a reduction in the amount of

Матеріал, захищений авторським правом

цитов, снижение абсолютного количества В-лимфоцитов с их нормальным относительным уровнем, повышенное содержание ЦИК, угнетение переваривающей способности нейтрофилов периферической крови. Это свидетельствует о том, что подострое воспаление придатков матки сопровождается изменениями в иммунограммах. Поэтому снижение количества Т-лимфоцитов, наблюдаемое нами при данной патологии до лечения, есть не что иное, как реакция на развившийся воспалительный процесс, а отсутствие такого снижения свидетельствует об ареактивности иммунной системы [4].

Реакция иммунной системы в ответ на воспаление часто сопровождается повышением уровня сывороточных иммуноглобулинов классов М и G [5], что и показано в нашей работе при обследовании больных до лечения.

Известно, что в норме образование ЦИК (комплекса антиген–антитело) является динамическим биологическим процессом, играющим важную роль в иммуногенезе и иммунорегуляции. Это обязательный этап любой иммунной реакции, обеспечивающей уничтожение и элиминацию патогенного материала (токсинов, микроорганизмов продуктов клеточного и тканевого распада и т.д.). Низкий уровень ЦИК в крови здоровых людей свидетельствует о нормализации физиологической элиминации чужеродных антигенов или продуктов тканевого распада. Элиминация этих комплексов из организма также обусловлена нормальным фагоцитированием системы, к которой относятся нейтрофилы периферической крови. Выявленные в наших исследованиях высокий уровень ЦИК в сыворотке крови больных с подострыми сальпингоофоритами и снижение функциональной активности нейтрофилов периферической крови, связанное с угнетением их киллерной (переваривающей) способности до лечения, свидетельствуют о недостаточном выведении данных комплексов из кровообращения. В то же время избыточное накопление ЦИК может оказать блокирующий эффект на рецепторное звено Т-лимфоцитов, что приведет к превалированию гуморальных факторов над клеточными и снижению специфической и неспецифической резистентности организма.

После комплексного лечения с использованием различных биостимуляторов на фоне антибактериальной терапии у больных 1-й группы наблюдались дальнейшее снижение относительного и абсолютного количества Т-лимфоцитов, нормализация относительного количества тимусзависимых лимфоцитов у больных 2-й группы, получавших в качестве биостимулятора криоэкстракт хориона. При этом абсолютное содержание данной субпопуляции клеток в этой группе больных не достигало уровня нормальных величин, находясь в пределах нижней границы доверительного интервала для здоровых женщин. Необходимо отметить, что относительное и абсолютное количество Т-лимфоцитов

T-lymphocytes, which is observed during this pathology prior to treatment, is nothing less than a response to the developed inflammatory process, while the absence of such a reduction indicates failed reactivity of the immune system [4].

A response of the immune system to inflammation is often accompanied by a rise in the level of serum immunoglobulins of the M and G classes [5], which was supported by the given research when examining patients prior to treatment.

Formation of CIC (a complex of antigen-antibodies) under normal conditions is known to be a dynamic biological process, which plays a major role in immunogenesis and immune regulation. This is an obligatory stage of any immune response, which provides for destruction and elimination of the pathogenic material (toxins, microorganisms, products of cell and tissue decay, etc.). A low level of CIC in healthy blood testifies to a normalization of physiological elimination of alien antigens or products of tissue decay. Elimination of these complexes out of the organism is also due to a normal phagocytation of the system, to which neutrophiles of peripheral blood belong. A revealed high level of CIC in the blood serum of patients with subacute salpingo-oophoritis and a reduction in the functional activity of the peripheral blood neutrophiles, related to the inhibition of their killer (digestive) ability prior to treatment, indicate an insufficient elimination of the given complexes out of the circulation. At the same time excessive accumulation of CIC may exercise a blocking effect on the receptor link of T-lymphocytes, which will result in prevailing of the humoral factors over cellular ones and in reduction of the specific and nonspecific resistance of the organism.

Following complex treatment with the application of various biostimulators during antibacterial therapy the patients of the 1st group demonstrated further reduction in the relative and absolute amounts of T-lymphocytes, normalization of the relative amount of the thymus-dependent lymphocytes in the patients of the 2nd group, who received chorion cryoextract as a biostimulator. Here the absolute content of the subpopulation of cells in this group of patients does not reach the level of the normal values, staying within the range of the lower limit of the confidence range for healthy females. It should be noted that the relative and absolute amounts of T-lymphocytes in the 1st group of patients were significantly lower as compared with the 2nd group (Table).

A portion of T-suppressors in the studied groups of patients after treatment was nearly similar and did not exceed the upper limit of the normal confidence range. The level of CIC in the patients of the 1st group did not exercise any significant changes and remained high, while in the in the females of the 2nd group it was significantly reduced; however, it did not get completely normalized.

Матеріал, захищений авторським правом

в 1-й группе больных было достоверно ниже, чем во 2-й (таблица).

Процент Т-супрессоров в исследуемых группах пациентов после лечения был практически одинаков и не превышал верхнюю границу доверительного интервала нормы. Уровень ЦИК у больных 1-й группы не претерпевал существенных изменений и оставался высоким, а у женщин 2-й группы после лечения он снижался, однако полностью не нормализовался.

Нормализация переваривающей способности нейтрофилов периферической крови после лечения наблюдалась у больных 2-й группы.

Таким образом, после лечения женщин с подострыми сальпингоофоритами с использованием криоэкстракта хориона наблюдаются активация функциональной активности фагоцитирующих нейтрофилов периферической крови с полной нормализацией их переваривающей функции, снижение содержания ЦИК и повышение до нормальных значений относительного количества Т-лимфоцитов. Данный препарат помимо непосредственного клинического эффекта оказывает иммуномодулирующее действие, что не требует дополнительных методов иммунокоррекции [8].

ЛИТЕРАТУРА

1. *Батырова А. К., Мезинова Н. Н., Шаронина Л. В.* О диагностическом и прогностическом значении иммунологических исследований у женщин с воспалительными процессами придатков матки // Акушерство и гинекология.– 1991.– № 5.– С. 71–74.
2. *Гриневич Ю. А., Алферов А. И.* Определение иммунных комплексов в крови онкологических больных // Лаб. дело.– 1981.– № 8.– С. 493–495.
3. *Кудрявицкий А. И.* Оценка киллерной бактерицидности нейтрофилов периферической крови здоровых доноров и больных в прямом визуальном тесте // Лаб. дело.– 1985.– № 1.– С. 45–47.
4. *Лебедев К. А., Понякина И. Д., Авдеева В. С.* Системное представление о спокойном и активном функционировании иммунной системы // Успехи совр. биологии.– 1991.– Вып. 2.– С. 229–245.
5. *Лебедев К. А., Понякина И. Д.* Иммунограмма в клинической практике.– М.: Наука, 1990.– 224 с.
6. *Суббота Н. П., Грищенко В. И., Питько В. А. и др.* Получение, хранение и применение фрагментов, суспензий и криоэкстракта хориона: Метод. рекомендации.– Харьков, 1997.– 8 с.
7. *Суббота Н. П., Питько В. А.* Экспериментальное обоснование целесообразности использования криоэкстракта хориона при воспалительных заболеваниях. 1.Гистологические и иммунологические исследования // Врач. практика.– 1999.– № 1.– С. 81–85.
8. *Цвелев Ю. В., Хавинсон В. Х., Дячук А. В. и др.* Тимоген в комплексном лечении воспалительных заболеваний женской половой сферы // Акушерство и гинекология.– 1992.– № 2.– С. 54–57.
9. *Чередиев А. Н.* Количественная и функциональная оценка Т- и В-систем иммунитета // Общие вопросы патологии. Серия иммунология.– М., 1976.– Т. 4.– С. 132–135.
10. *Olinescu A., Hristescu S., Roman S.* The human peripheral T-lymphocytes are endowed weith a heat stable E-receptor // Arch. Roum. Patol. Rap. and microbiol.– 1987.– V. 46, № 4.– P. 311–319.

Поступила 10.12.99

Normalization of the digestive ability of the peripheral blood neutrophiles in the patients of the 2nd group was observed after treatment.

Thus, treatment of females with subacute salpingo-oophoritis, using chorion cryoextract, results in the activation of the functional activity of the peripheral blood phagocyting neutrophiles with complete normalization of their digestive function, reduction in the content of CIC and a rise in the relative amount of T-lymphocytes up to the normal values. The results obtained demonstrate that the given preparation, beside direct clinical effect, exercises an immune-modulating action, which does not require additional methods of immune correction [8].

REFERENCES

1. *Batyrova A. K., Mezinova N. N., Sharonina L. V.* On the diagnostic and prognostic importance of immunological research in females with inflammatory processes of the uterine appendages // Akusherstvo i ginekologiya.– 1991.– № 5.– P. 71–74.
2. *Grinevich Yu. A., Alferov A. I.* Identification of immune complexes in blood of oncological patients // Lab. delo.– 1981.– № 8.– P. 493–495.
3. *Kudryavitsky A. I.* Evaluation of killer bactericidity of neutrophiles of peripheral blood of healthy donors and sick people during direct visual test // Lab. delo.– 1985.– № 1.– P. 45–47.
4. *Lebedev K. A., Ponyakina I. D., Avdeyeva V. S.* Systemic notion of the sleeping and active functioning of immune system // Uspekhi sovr. biologii.– 1991.– Issue 2.– P. 229–245.
5. *Lebedev K. A., Ponyakina I. D. Immunogram in clinical practice.– M.: Nauka publ., 1990.– 224 p.*
6. *Subbota N. P., Grischenko V. I., Pitko V. A. et al.* Harvesting, storage and application of fragments, suspensions and cryoextract of chorion: Method. recommendations.– Kharkov, 1997.– 8 p.
7. *Subbota N. P., Pitko V. A.* Experimental substantiation of expediency of applying chorion cryoextract during inflammatory diseases. 1. Histological and immunological research // Vrach. praktika.– 1999.– № 1.– P. 81–85.
8. *Tsvelev Yu. V., Khavinson V. Kh., Dyachuk A. V. et al.* Thymogene in complex treatment of inflammatory diseases of female sexual origin // Akusherstvo i ginekologiya.– 1992.– № 2.– P. 54–57
9. *Cherednev A. N.* Quantitative and functional evaluation of T- and B-systems of immunity // General problems of pathology. Immunology series.– M., 1976.– V. 4.– P. 132–135.
10. *Olinescu A., Hristescu S., Roman S.* The human peripheral T-lymphocytes are endowed with a heat stable E-receptor // Arch. Rom. Pathol. Rap. and Microbiol.– 1987.– V. 46.– № 4.– P. 311–319.

Accepted in 10.12.99

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 616.24/25-002.3: (591.441+615.361.014.413)

UDC 616.24/25-002.3: (591.441+615.361.014.413)

Применение криоконсервированных фрагментов ксеноселезенки в лечении больных с гнойными процессами легких и плевры

В. В. БЫЗОВ

Городская больница № 13, г. Харьков

Application of Cryopreserved Fragments of Xenospleen in Treatment of Patients with Suppurative Processes of Lungs and Pleura

V. V. BYZOV

City Hospital № 13, Kharkov

Разработаны методы местного применения криоконсервированных фрагментов ксеноселезенки и их экстракта для лечения больных с гнойными процессами в легких и плевре. Приведен первый опыт эндоплеврального и эндобронхиального применения ККФКС и их экстракта у 17 больных с указанной патологией. Полученные предварительные результаты свидетельствуют о целесообразности применения данного метода в комплексном лечении больных с гнойными процессами в легких и плевре.

Розроблено методи місцевого застосування кріоконсервованих фрагментів ксеноселезінки та їх екстракту для лікування хворих з гнійними процесами в легенях і плеврі. Наведено перший дослід ендоплеврального та ендобронхіального застосування ККФКС і їх екстракту у 17 хворих із зазначеною патологією. Отримані попередні результати свідчать про доцільність застосування даного методу в комплексному лікуванні хворих з гнійними процесами в легенях і плеврі.

The authors elaborated the methods of local application of cryopreserved fragments of xenospleen and their extracts. The first experience of endopleural and endobronchial application of CFXS and their extracts in 17 patients with the said pathology. The preliminary results obtained testify to the expediency of applying the given method in complex treatment of patients with suppurative processes in the lungs and pleura.

Актуальность проблемы лечения гнойных процессов в легких и плевре обусловлена их значительной распространенностью, тяжелым течением, высокой вероятностью перехода острой формы в хроническую [6]. При лечении больных с гнойными процессами в легких и плевре соблюдаются известные принципы: санация гнойного очага путем бронхоскопий, пункций и дренирования; антибактериальная, дезинтоксикационная и иммуномодулирующая терапия. При прогрессировании гнойного процесса или его хронизации с дальнейшей бесперспективностью консервативного лечения предпринимаются различные хирургические вмешательства с высокой и крайней степенью риска. Однако лечение больных с обширными поражениями легких и плевры, особенно с осложненным течением болезни, не всегда эффективно [6, 10]. Все вышесказанное делает актуальным поиск новых методов лечения по двум направлениям: локальное воздействие на гнойный очаг [1, 2, 12] и иммунокоррекция [4, 11].

В качестве биологического сорбента и иммуномодулятора целесообразно использовать селезенку, которая является мощной естественной сорбирующей системой организма, играющей важную роль в захвате и элиминации ксенобиотиков. Одно из наиболее ценных свойств селезенки — ее способность продуцировать иммуноглобулины (Ig), опсонины, пропердины и другие биологически активные ве-

The urgency of treatment of suppurative processes in the lungs and pleura is due to their high and heavy occurrence and high probability of the acute form of the disease becoming chronic [6]. Well-known principles are observed in the therapy of patients with suppurative processes in the lungs and pleura. They are: sanation of the suppurative focus by bronchoscopy, punctures and drainage; antibacterial, desintoxicative and immune modulating therapies. When the suppurative process is progressing or becoming chronic and further conservative treatment seems useless, various surgical interventions are employed which involve high and extreme risks. However, treatment of patients with extensive injuries to the lungs and pleura, especially when the disease occurrence is complicated, is not always effective [6, 10]. All the above makes a search for new methods of treatment rather urgent, and it proceeds along two routes: local exposure of the suppurative process [1, 2, 12] and immune correction [4, 11].

Application of the spleen as a biological sorbent and immune modulator seems expedient, since it is a powerful natural sorptive system of the organism, which plays an important role in capturing and elimination of xenobiotics. One of the most valuable properties of the spleen is its ability to produce immune globulins (Ig), opsonins, properdins and other biologically active substances, which are very important in providing for immune homeostasis of the organism [5].

Матеріал, захищений авторським правом

щества, имеющие большое значение в обеспечении иммунного гомеостаза организма [5]. Ксеноселезенка используется для детоксикации организма при гнойно-септических заболеваниях [5, 8], целом ряде аутоиммунных процессов [9].

Следует отметить, что в литературе удалось найти лишь два способа применения ксеноселезенки: перфузия крови больного через экстракорпорально подключенную ксеноселезенку, либо ее срезы или фрагменты,в том числе криоконсервированные [3, 8, 9]; внутривенное введение перфузата ксеноселезенки [7].

В этой связи актуальна дальнейшая разработка новых способов применения криоконсервированных фрагментов ксеноселезенки (ККФКС) и их экстракта. Нами разработаны методы и начато практическое применение местного, в частности, эндоплеврального и эндобронхиального введения ККФКС и их экстракта.

С декабря 1998 года по август 1999 года проведено лечение с использованием местного применения ККФКС и их экстракта 17 больных: из них с абсцессом легкого – 10, гангреной легкого – 1, эмпиемой плевры – 5, двухсторонними мешотчатыми бронхоэктазами – 1. Все больные были мужчины в возрасте от 19 до 72 лет. Основная клиническая характеристика больных представлена в табл. 1–3. Потеря массы тела составляла от 4 до 12 кг, двое больных были в состоянии кахексии. Бактериальный анализ мокроты и экссудата показал наличие микробных ассоциаций с преобладанием: пиогенного стрептококка – у 6 больных, золотистого стафилококка – 4, кишечной палочки – 5, у 2-х больных высевались пневмококк и синегнойная палочка. Достоверно сепсис установлен у одного больного, в крови высеян золотистый стафилококк. До применения ККФКС больные пролечены по общепринятой схеме [6] с неудовле-

The xenospleen is applied for detoxication of the organism during pyo-septic diseases [5, 8], and a whole range of autoimmune processes [9].

It should be noted that a review of the reports available made it possible to identify two ways of applying the xenospleen: perfusion of the patient's blood through the extracorporally attached xenospleen, or its slices or fragments, including cryopreserved ones [3, 8, 9]; intravenous injection of the xenospleen perfusate [7].

In this respect it seems expedient to further elaborate new methods of applying cryopreserved fragments of xenospleen (CFXS) and their extracts. The authors have developed the methods and started practical usage of the local, endopleural and endobronchial, in particular, injections of CFXS and their extracts.

On the total 17 patients underwent therapy with local application of CFXS and their extracts from December, 1998, till August, 1999: 10 patients with abscess of the lung, 1 patient with gangrene of the lung, 5 people with purulent pleurisy, and 1 patient with bilateral saccular bronchiectasia. All the patients were males, aged 19–72. Basic clinical features of the patients are submitted in Tables 1–3. The loss of the body weight was 4–12 kg, and two patients were in the state of cachexia. Bacterial analysis of the sputum and exudate detected the availability of microbial associations with predomination of: pyogenic streptococcus – in 6 patients, Staphylococcus aureus – in 4 people, *Escherichia coli* – in 5 cases, and in 2 patients pneumococcus and Pseudomonas aeruginosa were detected. Sepsis was authentically identified in 1 patient, and Staphylococcus aureus was inoculated in the blood. Prior to application of CFXS all the patients underwent routine therapy [6] which produced unsatisfactory results. The patients received endopleural injections of CFXS or endobronchial ad-

Таблица 1

Table 1

Характеристика больных с эмпиемой плевры

Characteristic features of the patients with the empyema of the pleura

Формы заболевания Forms of the disease	Причина эмпиемы Cause of the empyema			Длительность процесса Duration of the process		Распространенность Occurrence		Количество гнойного отделяемого по дренажу, мл/сут Amount of the suppurative discharge by drainage, ml/day	
	абсцесс легкого Abscess of the lung	рак легкого Cancer of the lung	пульмонэктомия Pulmonectomy	до 1 мес Up to 1 month	свыше 3-х лет Over 3 years	распространенные Wide	ограниченные Limited	до 200 upto 200	свыше 200 over 200
Острая с деструкцией легкого, с бронхоплевральным свищем Acute, with destruction of the lung, broncho-pleural fistula	2	1	0	3	0	3	0	0	3
Хроническая, в стадии обострения Chronic, acute attack of the disease	1	0	1	0	2	0	2	2	0

Матеріал, захищений авторським правом

Таблица 2 **Table 2**

Характеристика больных с гнойно-деструктивными процессами в легких

Characteristic features of the patients with pyo-destructive processes in the lungs

Тяжесть заболевания Severity of the disease			Срок заболевания Duration of the disease		Гнилостный запах Putrefactive odor		Количество гнойной мокроты, мл/сут Amount of suppurative sputum, ml/day		
легкая Light	средняя Medium	тяжелая Heavy	до 1 мес Up to 1 month	свыше 1 мес Over 1 month	имеется Available	отсутствует Missing	до 100 Up to 100	100–200	свыше 200 Over 200
0	3	9	9	3	11	1	1	6	5

Таблица 3 **Table 3**

Характеристика полиорганных поражений

Поражение органов и систем	Количество
Инфекционно-токсический миокардит	3
Синдром инфекционно-токсической почки	10
Резкое угнетение гемопоэза	12
Увеличение размеров печени от 2 до 7 см	9
Парез кишечника и задержка стула 5–7 сут	5
Асцит	1
Периферические отеки	12
Дыхательная недостаточность II–III ст.	15
Недостаточность кровообращения II–III ст.	8

Characteristic features of the polyorganic injuries

Injury to the organs and systems	Amoumt
Infectious toxic myocarditis	3
Syndrome of the infectious toxic kidney	10
Strong inhibition of hemopoiesis	12
Increase in the size of the liver from 2 to 7 cm	9
Paresis of the intestine and delay in stool for 5-7 days	5
Ascitis	1
Peripheral edemas	12
Respiratory insufficiency of the 2nd–3rd degree	15
Insufficiency of circulation of the 2nd–3rd degree	8

творительным эффектом. Больным вводили эндоплеврально ККФКС или эндобронхиально экстракт ККФКС по следующим показаниям: обильное гнойное отделяемое из плевральной полости по дренажу или обильная гнойная мокрота; лихорадочный синдром, озноб; вторичный структурный иммунодефицит; выраженный эндотоксикоз; неуклонное нарастание инфильтративных и деструктивных изменений в легких; неэффективность традиционных методов лечения.

ККФКС, доставленные в специальном контейнере из ИПКиК НАН Украины в сосуде Дьюара с жидким азотом, отогревали на водяной бане при температуре 40 °С непосредственно перед введением в плевральную полость больным с эмпиемой плевры . Дополнительно измельченные ККФКС (3,5–7 г) разбавляли физиологическим раствором в количестве 50–100 мл (в зависимости от объема плевральной полости) и самотеком через дренаж вводили в плевральную полость. Затем дренаж перекрывали на 120 мин. После этого плевральную полость тщательно отмывали растворами антисептиков до "чистой воды".

Больным с гнойными процессами в легких эндобронхиально через микротрахеостому вливали экстракт ККФКС по 5 мл 2 раза в сутки в течение 10 дней. Экстракт доставляли из ИПКиК НАН Украины в стеклянных флаконах по 5 мл в замороженном виде и отогревали непосредственно перед процедурой. Контроль за эффектом лечения осуществляли по динамике температурной кривой, биохимическим показателям крови, изменениям рентгенологической картины легких, результатам посевов крови, мокроты и экссудата, а также по изменениям в лейкоцитарной формуле крови, по лейкоцитарному индексу интоксикации. Девяти больным выполнены иммунологические исследования.

ministration of the CFXS extract according to the following indications:(i) plentiful suppurative discharge from the pleural cavity by drainage or plentiful suppurative sputum; (ii) feverish syndrome, rigor; secondary structural immune deficit; manifested endotoxicosis; continuous increase in infiltrative and destructive changes in the lungs; inefficiency of routine therapy.

The patients with the empyema of the pleura were injected with CFXS, delivered in special containers, placed into Dewar bottles with liquid nitrogen, from the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, and which were thawed on water bath immediately prior to injection into pleural cavity. Additionally fragmented CFXS (3.5–7 g) were diluted with physiological saline in the amount of 50–100 ml (depending on the volume of the pleural cavity) and then drifted to the pleural cavity. Then the drainage was stopped for 120 min. After that the pleural cavity was washed with antiseptic solutions until a "clear water" state.

A CFXS extract was endobronchially injected via microtracheostoma at a dose of 5 ml 2 times a day during 10 days to the patients with suppurative processes in the lungs. The extract was delivered from the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine in glass vials with 5-ml volumes in a frozen state, and was thawed directly prior to the procedure. Control over the therapeutic effect was done by the dynamics of the temperature curve, biochemical features of the blood, changes in the X-ray pattern of the lungs, results of inoculation of the blood, sputum and exudate, as well as by the leukocytic index of intoxication. Nine patients underwent immunological examinations.

Матеріал, захищений авторським правом

Умерло 2 больных, у которых абсцесс легкого осложнился эмпиемой плевры с легочно-плевральным свищем. Один из них с сопутствующей постинфарктной аневризмой сердца умер внезапно от тромбоэмболии легочной артерии на фоне яркого улучшения клинико-лабораторных показателей, второй больной умер при нарастающих явлениях полиорганной недостаточности. Умер также больной с распадающимся раком легкого, осложненным эмпиемой плевры. Летальный исход у этих больных не связан с примененным методом лечения. Остальные 14 больных выписаны (в сроки от 16 до 113 дней) с клиническим излечением, либо клиническим улучшением (2-е больных с хронической эмпиемой плевры).

В группе больных с эмпиемой плевры после однократного введения в плевральную полость ККФКС уже на следующий день значительно уменьшалось количество гнойного отделяемого из плевральной полости (с 400–100 до 100–50 мл). У одного больного гнойный характер экссудата поменялся на серозный и через 3-е суток посев экссудата на флору не дал роста. Параллельно с уменьшением гнойного отделяемого уменьшался объем плевральной полости. У больных с гнойными процессами в легких уменьшалось количество гнойной мокроты в 2–3 раза, ослабевал и к 7–8 дню полностью исчезал гнилостный запах.

У 15 из 17 больных клиническое улучшение отмечено на 3–5-е сутки и сопровождалось снижением температуры тела до субфебрильных и нормальных цифр, нормализацией формулы крови, снижением эндотоксикоза. Рентгенологическая динамика отмечена на 6–7-е сутки и проявилась в отграничении и рассасывании зоны инфильтрации. У одного больного, на фоне улучшения клинико-лабораторных показателей, рентгенологическая картина существенно не менялась.

При изучении иммунологических показателей у 2-х из 9 обследованных больных отмечена выраженная Т-лимфопения в остром периоде болезни (0,6–0,8), которая сохранялась и в динамике заболевания. У остальных пациентов содержание Т-лимфоцитов от нормы значительно не отличалось. В остром периоде заболевания у всех пациентов отмечено увеличение содержания 0-клеток и Т-активных лимфоцитов, которые приходили к норме в динамике заболевания. Приведенные данные, полученные при местном применении ККФКС в пульмонологической практике, демонстрируют улучшение результатов лечения группы тяжелых и малоперспективных для выздоровления больных, чему также способствует раннее включение предложенного метода в комплексную терапию. Следует оговориться, что данные результаты мы рассматриваем как предварительные.

Таким образом, в комплексном лечении больных с гнойными процессами в легких и плевре, в том числе осложненных сепсисом, местное приме-

Two patients died in whom the abscess of the lung was complicated with the empyema of the pleura with the pulmonary-pleural fistula. One of them, suffering from the accompanying postinfarction aneurisma of the heart, died suddenly because of the thromboembolism of the pulmonary artery, while clinical-laboratory features were vividly improved. The second patient died after an increase in the events of the polyorganic insufficiency. Another patient with the degenerating cancer of the lung, complicated by the empyema of the pleura, also died. Lethal yield in these patients is not related to the applied method of therapy. The rest of 14 patients were released either clinically cured (within the period of 16–113 days) or with clinical improvement (2 patients with chronic empyema of the lung).

The amount of the suppurative discharge from the pleural cavity was significantly reduced (from 400–100 down to 100–50 ml) in the group of patients with the empyema of the pleura on the next day after single injection of CFXS into the pleural cavity. In one of the patients the suppurative nature of the exudate changed to a serous one, and in 3 days the inoculation of the exudate on the flora produced no growth. Simultaneously with a reduction in the suppurative discharge the volume of the pleural cavity also decreased. In patients with the suppurative processes in the lungs the amount of the suppurative sputum was reduced by 2–3-fold, and putrefactive odor lessened and by the 7–8th day disappeared completely.

In 15 patients out of 17 clinical improvement was reported by the 3–5th day and was accompanied by lowering of the body temperature down to subfebrile and normal values, normalization of the blood formula, reduction in endotoxicosis. The X-ray dynamics was reported by the 6–7th day, and it was manifested in the separation and resorption of the zone of infiltration. In one of the patients, together with improvement of clinical-laboratory features, the X-ray pattern was not changed significantly.

When studying the immunological features, 2 patients out of 9 demonstrated a manifested T-lymphopenia during the acute stage of the disease (0.6–0.8), which was maintained through the time course of the disease. In the rest of the patients the content of T-lymphocytes did not significantly differ from the normal values.

During the acute period of the disease all the patients reported a rise in the content of 0-cells and T-active lymphocytes, which returned to the normal level in the time course of the disease. The data obtained after a local application of CFXS in pulmonological practice demonstrate improvement of the yield of treatment of the group of severely sick patients, which is also facilitated by the early incorporation of the proposed method into complex therapy. It should be mentioned that the given results should be considered as preliminary only.

Матеріал, захищений авторським правом

нение ККФКС дает выраженный противовоспалительный и иммуномодулирующий эффект. Местное применение ККФКС особенно эффективно при адекватном комплексном лечении и местной санации гнойного очага.

Простота транспортировки и размораживания криоконсервированного материала облегчает применение фрагментов ксеноселезенки, а также позволяет использовать материал на большом удалении от банка криоконсервированной ткани.

Автор выражает искреннюю благодарность сотрудникам ИПКиК НАН Украины проф. Б. П. Сандомирскому, ст. науч. сотр. С. Е. Гальченко, инж. I категории А. П. Штокман за оказанную помощь.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Баззаев Т. В.* Применение восковой мази для лечения эмпиемы плевры // 4-й Рос. нац. конгресс "Человек и лекарство": Тез. докладов.– М., 1997.– С. 152.
2. *Горелов Ф. И., Ходько Е. И.* Лечение хронической эмпиемы плевры после пневмонэктомии герметическими пункциями // Груд. и серд.-сосуд. хирургия.– 1998.– № 3.– С. 47–50.
3. *Коблов Н. Л.* Экстракорпоральная гемоперфузия через криоконсервированные фрагменты ткани ксеноселезенки в комплексном лечении гнойно-септических состояний у урологических больных: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.– М., 1991.– 20 с.
4. *Малиновский Н. Н., Решетников Е. А., Шипилов Г. Ф. и др.* Иммунотерапия хирургического сепсиса // Хирургия.– 1997.– I.– С. 4–8.
5. *Мануйлов Б. М.* Некоторые механизмы защитного действия экстракорпорально подключенной донорской селезенки при септических состояниях: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.– М., 1986.– 20 с.
6. *Митюк И. И., Попов В. И., Шевчук В. В.* Опыт комплексного лечения больных острыми абсцессами и гангреной легких // Основные пути совершенствования специализированной пульмонологической помощи населению: Сб. науч.тр.– Львов., 1990.– С. 193–194.
7. *Никонов С. Д., Цыпин А. Б., Макаров А. А. и др.* Первый опыт применения перфузата ксеноселезенки в лечении больных с обширными гнойно-деструктивными заболеваниями легких и плевры // Груд. и серд.-сосуд. хирургия.– 1991.– № 2.– С. 42–45.
8. *Ситников В. А., Цыпин А. Б., Стяжкина С. Н. и др.* Антитоксическое действие ксеноселезенки при лечении гнойно-септических осложнений в хирургии // Вестн. хирургии.– 1992.– 4–5–6.– С. 101–105.
9. *Цыпин А. Б., Насонова В. А., Ведерникова Л. А. и др.* Спленоперфузия в комплексном лечении больных системной красной волчанкой // Терапевт. архив.– 1993.– 65, № 5.– С. 61–65.
10. *Шалаев С. А., Чепчерук Г. С., Тулупов А. Н., Лишенко В. В.* Лечебная тактика при гнойно-деструктивных заболеваниях легких, осложненных эмпиемой плевры // Основные пути совершенствования специализированной пульмонологической помощи населению: Сб. науч. тр.– Львов, 1990.– С. 189–191.
11. *Шойхет Я. Н., Ерин Е. Н., Елыкомов В. А. и др.* Лечение острого абсцесса и гангрены легкого с применением криосупернатантной фракции плазмы // Груд. и серд.-сосуд. хирургия.– 1998.– № 2.– С. 56–59.
12. *Шойхет Я. Н., Оглоблина О. Г., Цеймах Е. А., Мальченко Т. Д.* Применение препаратов стрептокиназы при эмпиеме плевры и пиопневмотораксе // Терапевт. архив.– 1994.– 66, № 3.– С. 64–67.

Поступила 26.10.99

Thus, local application of CFXS in complex treatment of patients with suppurative processes in the lungs and pleura produce a manifested antiinflammatory and immune-modulating effect. Local application of CFXS is particularly effective in the adequate complex therapy and local sanation of the suppurative focus.

Easy transportation and thawing of cryopreserved material facilitate application of fragments of xenospleen as well as allow to use the material at long distances from the bank of cryopreserved tissues.

Acknowledgments: the author expresses his sincere gratitude to Prof. B. P. Sandomirsky, Senior scientific worker S. E. Galchenko, Engineer of the 1st category A. P. Shtockman for their kind assistance.

REFERENCES

1. *Bazzayev T. V.* Application of waxy ointment for treatment of the empyema of the pleura // 4th Russian Natl.Congress "Man and medicine": Abstr. repts.– M., 1997.– P. 152.
2. *Gorelov F. I., Khodko E. I.* Treatment of the chronic empyema of the pleura following pneumoectomy by sealed punctures // Grud. i serd.-sosud. khirurgiya.– 1998.– № 3.– P. 47–50.
3. *Koblov N. L.* Extracorporal haemoperfusion through cryopreserved fragments of xenospleen in complex treatment of pyo-septic states in urologic patients: Abstr.Thesis Cand. Med. Sci.– M., 1991.– 20 p.
4. *Malinovsky N. N., Reshetnikov E. A., Shipilov G. F. et al.* Immune therapy of surgical sepsis // Khirurgiya.– 1997.– № 1.– P. 4–8.
5. *Manuilov B. M.* Some mechanisms of protective action of extracorporally attached donor spleen during septic states: Abstr.Thesis Cand. Biol. Sci.– M., 1986.– 20 p.
6. *Mityuk I. I., Popov V. I., Shevchuk V. V.* Experience of complex treatment of patients with acute abscesses and gangrene of the lungs // Basic means for improving specialized pulmonological care: Collection of sci. works.– Lvov, 1990.– P. 193–194.
7. *Nikonov S. D., Tsypin A. B., Makarov A. A. et al.* First experience in applying perfusate of the xenospleen for treatment of patients with extensive pyo-destructive diseases of the lungs and pleura // Grud. i serd.-sosud. khirurgiya.– 1991.– № 2.– P. 42–45.
8. *Sitnikov V. A., Tsypin A. B., Styazhkina S. N. et al.* Antitoxic action of xenospleen in treatment of pyo-septic complications in surgery // Vestn. khirurgii.– 1992.– 4–5–6.– P. 101–105.
9. *Tsypin A. B., Nasonova V. A., Vedernikova L. A. et al.* Splenoperfusion in complex treatment of patients with systemic lupus erythematosus // Terapevt. arkhiv.– 1993.– 65, № 5.– P. 61–65.
10. *Shalayev S. A., Chepcheruk G. S., Tulupov A. N., Lishenko V. V.* Therapeutic tactics for pyo-destructive diseases of the lungs, complicated by the empyema of the pleura // Basic means for improving specialized pulmonological care: Collection of sci. works.– Lvov, 1990.– P. 189–191.
11. *Shoikhet Ya. N., Erin E. N., Elykomov V. A. et al.* Treatment of the acute abscess and gangrene of the lung with application of cryosupernatant fraction of the plasma // Grud. i serd.-sosud. khirurgiya.– 1998.– № 2.– P. 56–59.
12. *Shoikhet Ya. N., Ogloblina O. G., Tseimakh E. A., Malchenko T. D.* Application of preparation of streptokinase in treatment of the empyema of the pleura and pneumotorax // Terapevt.arkhiv.– 1994.– 66, № 3.– P. 64–67.

Accepted in 26.10.99

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 612.44-592: 615-441-02: 616.441-089.87: 617-089.843 UDC 612.44-592: 615-441-02: 616.441-089.87: 617-089.843

Деструктивно-метаболічні зміни і перебіг репаративних процесів у тканинах щитовидної залози після локального кріовпливу

Ю. І. КАРАЧЕНЦЕВ

Український НДІ фармакотерапії ендокринних захворювань, м. Харків

Destructive-metabolic Changes and Occurrence of Reparative Processes in Thyroid Gland Tissues Following Local Cryoexposure

Yu. I. KARACHENTSEV

Ukrainian Scientific Research Institute of Pharmacotherapy of Endocrine Diseases, Kharkov

Вивчено особливості морфофункціонального стану щитовидної залози (ЩЗ) з експериментальним аутоімунним тиреоїдитом (ЕАІТ) після локального кріовпливу. Отримані результати свідчать про збільшення репаративних процесів, переважно у вигляді повної регенерації, за рахунок посиленого фолікулоутворення. У той же час продовжує зменшуватися ступінь виразності аутоімунної реакції і не розвиваються склероз і ліпоматоз.

Изучены особенности морфофункционального состояния щитовидной железы (ЩЖ) с экспериментальным аутоиммунным тиреоидитом (ЭАИТ) после локального криовоздействия. Полученные результаты свидетельствуют об увеличении репаративных процессов, преимущественно в виде полной регенерации, за счет усиленного фоликулообразования. В то же время продолжает уменьшаться степень выраженности аутоиммунной реакции и не развиваются склероз и липоматоз.

The research deals with investigating particular features of the morphofunctional state of the thyroid gland (TG) by the experimental autoimmune thyroiditis (EAIT) following local cryoexposure. The results obtained testify to an intensification of the reparative processes, mainly in the form of a complete regeneration, due to an increased follicles formation. At the same time the extent of manifestation of the autoimmune response continues to decrease, and sclerosis and lypomatosis are not developed.

Кріогенний метод — один з найбільш універсальних методів використання холоду як лікувального фактора. Значні потенційні можливості низькотемпературного впливу і розвиток відповідних технічних засобів дозволили розширити використання кріогенних методів [2, 3, 6, 9].

В ендокринології ці методи застосовували лише для лікування пухлин гіпофізу [4, 5], для пригнічення функціонального стану надниркових залоз [11]. Дані [1, 8, 10] свідчать про посилення репаративної регенерації тканини під впливом локальної кріодеструкції, її імуностимулюючий та імунокоригуючий ефекти. Крім того, відомо, що при локальному кріовпливі активуються клітинні фактори імунітету, підвищується функціональна активність Т-лімфоцитів, відзначається коригуюча дія на гуморальні реакції організму [7, 10]. Природньо, що вказані ефекти можуть використовуватись при лікуванні такої хвороби, як хронічний аутоімунний тиреоїдит (АІТ). Це дозволяє розглядати розробку кріогенних методів лікування АІТ як важливу проблему, що має соціальне значення.

Мета нашого дослідження — вивчення морфофункціональних особливостей ЩЗ тварин з ЕАІТ після локального кріовпливу.

Експериментальна частина роботи виконана на 23 кролях породи Шиншила вагою 2,5–3,0 кг, яким була створена модель ЕАІТ шляхом їх годування мерказолілом у дозі 30 мг на добу на протязі 2,5 міс.

Cryogenic method is one of the universal means of applying cold as a therapeutic factor. Substantial potential of the low temperature exposure and development of corresponding technical means permitted to expand application of cryogenic methods [2, 3, 6, 9].

In endocrinology these methods were applied only for treatment of the hypophysial tumors [4, 5], and for inhibition of the functional state of the adrenal glands [11]. The data available [1, 8, 10] testify to the enhancement of the reparative regeneration of the tissue under the action of local cryodestruction, its immunestimulating and immune-correcting effects. Besides, it is known that during local cryoexposure the cell factors of the immunity are activated, functional activities of T-lymphocytes increase, and a correcting action on the humoral responses of the organism is reported [7, 10]. Naturally, the above effects may be applied for treatment of such a disease as chronic autoimmune thyroiditis (AIT). This makes it possible to consider the elaboration of cryogenic methods of the AIT treatment as an important problem, which is of great social importance.

The aim of the given research is to investigate the morphofunctional particular features of the TG of the animals with the AIT following local cryoexposure.

The experiments were done with 23 Shinshilla rabbits with the body weights of 2.5–3.0 kg, in which the EAIT was modelled by feeding them with mercazol at a dose of 30 mg per day during 2.5 months.

Матеріал, захищений авторським правом

Операція на ЩЗ у тварин проводилася під гексеналовим наркозом. Кріоаплікація виконувалася автономним кріоінструментом з діаметром наконечника 0,2 см. Точка прикладення — центр правої долі ЩЗ кроля, експозиція — 1 хв, температура — –150 ÷ –196 °С. Потім рана шар за шаром асептично ушивалася.

Структурно-функціональні зміни ЩЗ експериментальних тварин після інтраопераційного кріовпливу були вивчені через 1 і 2 міс. Тварин забивали методом повітряної емболії (введенням повітря у краєву вену вуха).

Видалені ЩЗ фіксували у 10%-му нейтральному формаліні та рідині Карнуа, заливали у целоїдин-парафін. Зрізи товщиною 5–6 мкм забарвлювали гематоксиліном та еозином, пікрофуксином за методом Ван-Гізона, ставили ШИК-реакцію з контролем амілазою, реакцію Браше на РНП (контроль кристалічною рибонуклеазою), реакцію Фельгена–Россенбека на ДНК (контроль гідроліз із соляною кислотою). На парафінових та кріостатних зрізах виконували імуноморфологічні дослідження непрямим методом Кунса з моноклональними антитілами серій ІКО-31, ІКО-86, ІКО-90, ІКО-12, ІКО-1, ІКО-20.

Гістологічно через 1 міс після локального кріовпливу на ЩЗ тварин з ЕАІТ спостерігались розростання міжчасточкової сполучної тканини, явища мукоїдного та фібриноїдного набрякання, а також утворення з осередків фібриноїдного некрозу (рисунок *а*).

У паренхімі залози переважали великі та середні фолікули, а дрібні частіше в центрі часток. При цьому звертало увагу "витягнення" всіх фолікулів в одному напрямку без залежності від розміру. Поздовжній розмір фолікулів був значно більше поперечного (рисунок *б*).

Частіше за все просвіти фолікулів були заповнені густим, маловакуолізованим колоїдом з яскраво ШИК-позитивною реакцією. Фолікулярний епітелій сплощений. Ядра клітин частіше гіперхромні, з переважанням гетерохроматину та помірно позитивною реакцією Фельгена-Россенбека. Цитоплазма клітин нерясна, нерівномірно еозинофільна та піронінофільна, з яскраво ШИК-позитивним матеріалом в апікальному кінці клітини. Велика вісь ядер відхилена від перпендикуляру до базальної мембрани і наближається до паралелі. Досить часто у міжчасточковій стромі відзначаються ліпоцити, які розташовані як дифузно (рисунок *б*), так і групами (3–6 клітин). Інтерфолікулярний епітелій представлений тиреоцитами зі світлим ядром та рясною цитоплазмою, серед яких знайдений ШИК-позитивний колоїд.

Переважно периваскулярно у вигляді невеликих осередків спостерігаються лімфоплазмоцитарні елементи. Імуноморфологічно в осередках лімфоплазмоцитарної інфільтрації виявлені CD3-лімфоцити (загальна популяція Т-лімфоцитів), які

The surgeries of the TG in the animals were done under a hexenal anaesthesia. Cryoapplication was performed by the autonomous cryoinstrument with the diameter of the tip of 0.2 cm. The point of application was in the center of the right-hand portion of the rabbit TG, the exposure lasted for 1 min, and the temperature was –150 ÷ –196 °C. Then the wound was sutured layer by layer.

Structure-functional changes in the TG of the experimental animals following intraoperational cryoexposure were analyzed in 1 and 2 months. The animals were decapitated with a method of the air embolism (injection of air into the marginal auricular vein).

The removed TGs were fixed in a 10%-neutral formalin and Carnua's solution, and embedded into celloidin-paraffin. The slices with the thickness of 5–6 μm were stained with hematoxylin and eosin, picrofuxin with a Van Gizon's method; then the following reactions were staged: TIC-reaction with an amylase control, Brashe's reaction for RNP (control with a crystalline ribonuclease), Volgen–Rossenbech's reaction (control of hydrolysis with hydrochloric acid). Immunological studies were carried out on the paraffin and cryostage slices using an indirect method of Kuns with monoclonal antibodies of the series IKO-31, IKO-86, IKO-90, IKO-12, IKO-1, IKO-20.

Expansion of the interlobular connective tissue, the events of the mucoid and fibrinoid swelling, formation of the fibrinoid necrosis out of the cells were histologically observed in 1 month after local cryotreatment of the TGs of the animals with the EAIT (Figure *а*). In the parenchyma of the gland large and medium-sized follicles were predominant, while small follicles were more often found in the middle of the particles. Here attention should be paid to "stretching" of all the follicles in one direction independently of the size. The longitudinal dimensions of these follicles were much larger as compared with the cross-sectional ones (Figure *б*).

Most frequently the lumens of the follicles were filled with a dense, poorly vacuolized colloid with a bright TIK-positive response. The follicular epithelium appeared to be flattened. The nuclei of the cells are often hyperchromic with predominant heterochromatin and moderately positive Velgen-Rossenbech's reaction. The cytoplasm of the cells is not dense, irregularly eosinophilic and pyroninophilic, with a TIK-positive material at the apical end of the cell. The large axis of the nucleus is deviated from the perpendicular to the basal membrane and approach to the parallel. Very often lipocytes are found in the interlobular stroma, which are located both diffusively (Figure *б*) and in groups (3–6 cells). The interfollicular epithelium is represented by thyrocytes with light-colored nuclei and dense cytoplasm, among which a TIK-positive colloid is found.

Lymphoplasmocytic elements are mainly identified perivascularly in the form of small cells. Immunologically CD3-lymphocytes (total population of T-lymphocytes) are found in the cells of the lymphoplasmocytic infiltration, which are located in the above cell conglomerations, and the CD22-lymphocytes, posi-

Матеріал, захищений авторським правом

розташовані у вищеописаних осередкових скупченнях, та CD22-лімфоцити (В-лімфоцити), розташовані по периферії CD3-зон (рисунок *в*). При подальшій імуноморфологічній ідентифікації було виявлено зменшення популяції CD4-лімфоцитів на фоні збільшення кількості CD8-лімфоцитів. Зустрічались одиничні HLA-Dr$^+$ клітини, тоді як популяція CD38$^+$ (антигенактивовані Т і В-лімфоцити та ЕК-клітини) була представлена в більшій кількості.

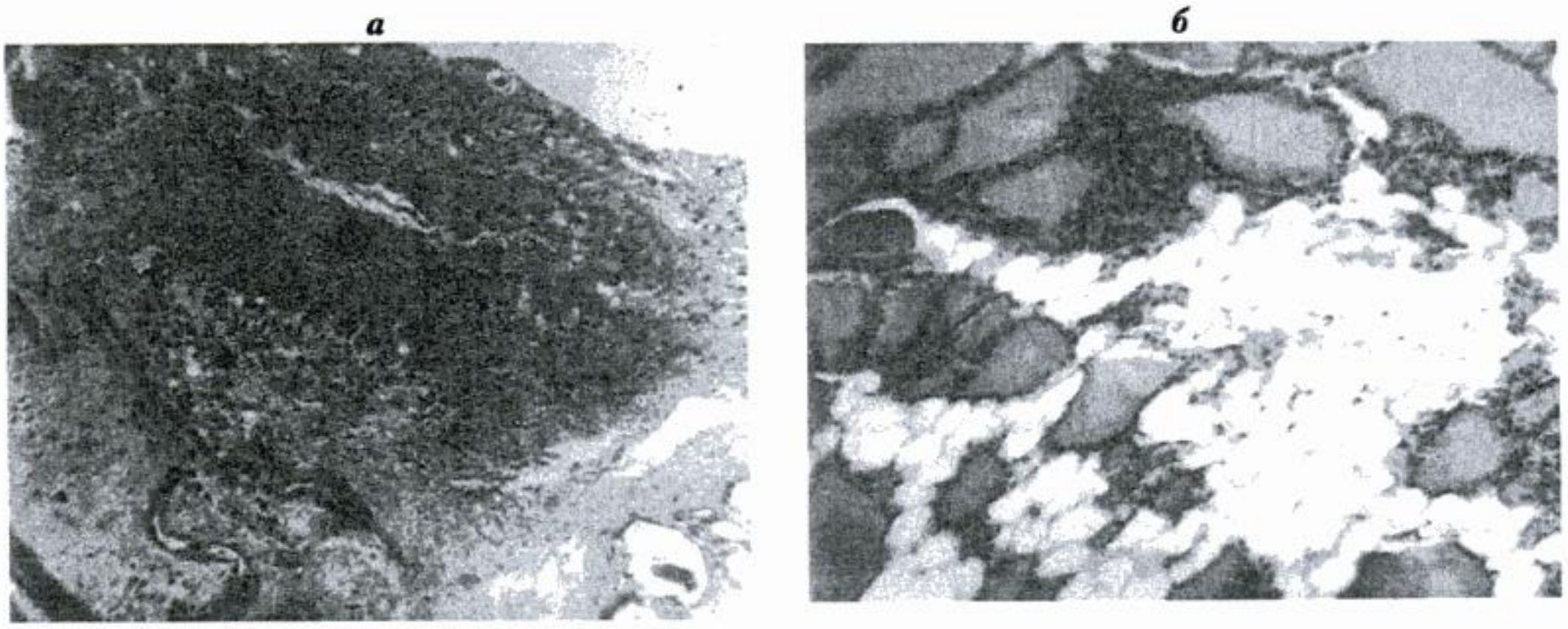
Для визначення тривалості позитивного ефекту кріовпливу була проведена друга серія експериментів на тваринах з ЕАІТ через 1 та 2 міс після створення моделі. Було з'ясовано, що явища аутоімунної агресії з часом в групах порівняння зростають. Так, через 2 міс. після створення моделі ЕАІТ відсоток лімфоплазмоцитарної інфільтрації зріс у 1,9 рази порівняно з 1-м місяцем. Збільшився і вміст строми у 1,1, жиру у 1,3 рази.

Протилежна картина спостерігалася після кріовпливу. Через 2 міс відмічалося подальше зростання відносних обсягів фолікулярного (у 1,75 рази) та інтерфолікулярного епітелію (у 1,22 рази) на фоні зменшення відносних обсягів лімфоплазмоцитарної інфільтрації у 1,45, жиру у 1,25 та строми у 1,35 рази. Це свідчить про стійку позитивну динаміку.

tioned on the periphery of the Cd3-zones (Figure *в*). Subsequent immune morphological identification revealed a reduction in the population of the CD4-lymphocytes, accompanied by a rise in the amount of the CD8-lymphocytes. Single HLA-Dr$^+$ cells were also come across, while the population of the CD38$^+$ (antigen-activated T- and B-lymphocytes and EK-cells) cells was available in bigger amounts.

To determine the duration of the positive effect of the cryoexposure the author staged a second series of experiments with the EAIT-affected animals in 1 and 2 months after making up a model. It was found that the events of the autoimmune aggression increased in the groups being compared in the due time course. For example, in 2 months after staging the EAIT model a portion of the lymphoplasmocytic infiltration increased by 1.9-fold as compared with the first month. The content of the also increased by 1.1-fold, and that of the fat – by 1.3-fold.

The opposite patterns was observed following cryoexposure. For example, in 2 months there was reported a further growth in the relative volumes of the follicular (by 1.75-fold) and interfollicular epithelium (by 1.22-fold), accompanied by reduction in the relative volumes of the lymphoplasmocytic infiltration by 1.45-fold, fat – by 1.25-fold and stroma – by 1.35-fold. This is indicative of a persisting positive dynamics



Локальний кріовплив на ЩЗ з ЕАІТ (мікрофото: зб. об. 10,0×0,8; ок 10,0): *а* – явища фібриноїдного набряку та некрозу в сполучній тканині. Забарвлення гематоксиліном та еозином; *б* – "витягнення" форми фолікулів на фоні вираженого ліпоматозу. Забарвлення пікрофуксином за методом Ван-Гізона; *в* – невеликі лімфоплазмоцитарні інфільтрати в інтерфолікулярному просторі. Загальна популяція CD3 та CD22. Непрямий метод Кунса з МКА ІКО-90 та ІКО-12.

Local cryoexposure of the TG with the EAIT (microphotography: magn. vol. 10.0×0.8; ok 10.0): *a* – events of the fibrinoid edema and necrosis in the connective tissue. Staining with hematoxylin and eosin. *б* – "stretching" of the shapes of follicles accompanied by manifested lypomatosis. Staining by pirofuxin with a Van Gizon's method. *в* – small lymphoplasmocytic infiltrates in the interfollicular space. Total population of CD3 and CD22. Indirect method of Kuns with MKA IKO-90 and IKO-12.

Матеріал, захищений авторським правом

наміку кріовпливу на фоні активації явищ аутоімунної агресії в групі порівняння.

Таким чином, кріовплив на ЩЗ з EAIT проявляється у зміні розвитку різноспрямованих процесів. Через 1 міс. у залозі іноді спостерігаються деструктивні процеси, пов'язані з дезорганізацією надмірно розвинутої строми у вигляді мукоїдного та фібриноїдного набряку, фібриноїдного некрозу, деструкції ліпоцитів. Але це відбувається, на нашу думку, за рахунок продовження негативного впливу мерказолілу, яким ініційований EAIT. У цей період дія кріовпливу на тиреоїдний епітелій ще проявляється у пригніченні як синтетичних, так і резорбційних процесів (у порівнянні з контролем), тоді як у порівнянні з $EAIT_2$ відзначається стимулююча дія кріовпливу на тиреоїдну активність ЩЗ. Крім того, спостерігається тенденція до пригнічення місцевих імунних, у тому числі аутоімунних реакцій.

Через 2 міс після безпосереднього кріовпливу на ЩЗ в органі з'являються ознаки посилення репаративних процесів, переважно у вигляді повної регенерації за рахунок посиленого фолікулоутворення, продовжує зменшуватися ступінь виразності аутоімунної реакції і не розвиваються склероз та ліпоматоз.

Таким чином, при кріовпливі на ЩЗ тварин з EAIT вдається не тільки зменшити інтенсивність виявлення лімфоплазмоцитарної інфільтрації, але й змінити її характер, що, в свою чергу, може привести до повного загасання аутоімунного процесу. Можливо, зникнення клітин з HLA-Dr антигеном стабілізувало функцію CD8-лімфоцитів, які пригнічують проліферацію CD4-хелперів і проліферативну активність В-лімфоцитів, а також депресують їх здатність до трансформації та антитілоутворення.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Белоус В. И.* Криогенное лечение халазиона // Тез. доп. І з'їзд Укр. товариства кріобіології і кріомедицини, Харків, 18–20 жовтня 1995 р.– Харків, 1995.– С. 17–19.
2. *Влияние* охлаждения на структуру клетки / Под ред. Т. Н. Юрченко.– Киев: Наук. думка, 1992.– 145 с.
3. *Грищенко В. И.* Гипотермия и криохирургия в акушерстве и гинекологии.– М.: Медицина, 1974.– С. 280.
4. *Кандель Э. И.* Криохирургия.– М.: Медицина, 1974.– 303 с.
5. *Пушкарь Н. С., Чуйко В. А., Утевский А. М., Цариковская Н. Г.* Консервация и трансплантация эндокринных органов и тканей.– Харьков, 1981.– 36 с.
6. *Коцько Н. И.* Обоснование применения низких температур при атипических резекциях печени: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.– Харьков, 1983.– 23 с.
7. *Криоиммунология* / Под ред. А. А. Цуцаевой.– Киев: Наук. думка, 1988.– 176 с.
8. *Лукьянчиков В. С., Калинин А. П., Рафинбеков Д. С. и др.* Иммунологический мониторинг патологических состояний и иммунореабилитация.– М., 1995.– 38 с.
9. *Оларин М. М.* Гипотермия при повреждении верхних конечностей // Теорет. и практ. проблемы действия низких температур на организм.– Л.: Медицина, 1975.– С. 143–144.
10. *Практическая* криомедицина / Под ред. В. И. Грищенко и Б. П. Сандомирского.– Киев: Здоров'я, 1987.– 245 с.
11. *Fregly H. T.* Activity of hupothalamic pituitory thyroid axis during exposure to cold // Pharmacol and ofher.– 1989.– V. 4, № 1–2.– P. 85 (8142).

Надійшла 02.02.2000

of cryoexposure when the events of the autoimmune aggression in the group of comparison are activated.

Thus, cryoexposure of the TG with EAIT is manifested by changes in the occurrence of a diversely directed processes. In 1 month after cryoexposure the gland sometimes demonstrated destructive processes, related to disorganization of the excessively developed stroma in the form of mucoid and fibrinoid edemas, fibrinoid necrosis, destruction of lypocytes. Though the author believes it is due to continuing negative action of mercazol, which initiated the EAIT. At that time cryoexposure of the thyroid epithelium is still manifested in the inhibition of both synthetic and resorptive processes (as compared with control), while in comparison with the $EAIT_2$ there is reported a stimulating cryoexposure of the thyroid activity of the TG. Besides, a tendency to inhibiting local immune and autoimmune responses is evidenced.

In 2 months after direct cryoexposure of the TG the organ developed the symptoms of intensification of the reparative processes, mainly in the form of complete regeneration due to enhanced follicle formation, and the extent of the autoimmune response continues to decrease, and sclerosis and lypomatosis are not developed.

Thus, cryoexposure of the TGs of the animals with the EAIT not only reduces the intensity of manifestation of the lymphoplasmocytic infiltration, but also changes its nature, which, in turn, may result in complete termination of the autoimmune process. Probably, elimination of the cells with the HLA-DR-antigen stabilized functioning of the CD8-lymphocytes, which inhibited proliferation of the CD4-helpers and proliferative activity of B-lymphocytes, as well as depressed their ability for transformation and antibody-formation.

REFERENCES

1. *Belous V. I.* Cryogenic treatment of chalazion // Abstr. Repts. 1st Congress of the Society for Cryobiology and Cryomedicine, Kharkov, October 18–20, 1995.– Kharkov, 1995.– P. 17–19.
2. *Effect* of cooling on the cell structure / Ed. by T. N. Yurchenko.– Kiev: Naukova dumka publ., 1992.– 145 p.
3. *Grischenko V. I.* Hypothermia and cryosurgery in obstetrics and gynecology.– M.: Meditsina publ., 1974.– P. 280.
4. *Kandel E. I.* Cryosurgery.– M.: Meditsina publ., 1974.– 303 p.
5. *Pushkar N. S., Chuiko V. A., Utevsky M., Tsarikovskaya N. G.* Preservation and transplantation of the endocrine organs and tissues.– Kharkov, 1981.– 36 p.
6. *Kotsko N. I.* Substantiation of the application of low temperatures during atypic resections of the liver: Abstr. Thesis Cand. Med. Sci.– Kharkov, 1983.– 23 p.
7. *Cryoimmunology* / Ed. by A. .A. Tsutsayeva.– Kiev: Naukova dumka publ., 1988.– 176 p.
8. *Lukyanchikov V. S., Kalinin A. P., Rafinbekov D. S. et al.* Immunological monitoring of the pathological states and immune rehabilitation.– M., 1995.– 38 p.
9. *Oparin M. M.* Hypothermic treatment of the injuries to upper limbs // Theoretical and practical aspects of the action of low temperatures on the organism.– L.: Meditsina publ., 1975.– P. 143–144.
10. *Practical* cryomedicine / V. I. Grischenko, B. P. Sandomirsky, eds.– Kiev: Zdorovya publ., 1987.– 245 p.
11. *Fregly H. T.* Activity of hypothalamic pituitary thyroid axis during exposure to cold // Pharmacol. and ofher.– 1989.– V. 4, № 1–2.– P. 85 (8142).

Accepted in 02.02.2000

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 612.451: 577.17.49: 612.592: 612.66 UDC 612.451: 577.17.49: 612.592: 612.66

Действие общего охлаждения на морфофункциональные особенности надпочечников и содержание микро- и макроэлементов у животных разного возраста

А. Е. КУТИКОВ, И. Н. НИКИШКОВА
Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина

Ж. П. ГОРДИЕНКО
Украинский НИИ клинической и экспериментальной неврологии и психиатрии, г. Харьков

Action of Total Cooling on Morphofunctional Properties of Adrenal Glands and Content of Micro- and Macroelements in Animals of Various Age

A. E. KUTIKOV, I. N. NIKISHKOVA
V. Karazin National University, Kharkov

Zh. P. GORDIENKO
Ukrainian Scientific-Research Institute of Clinical and Experimental Neurology and Psychiatry, Kharkov

Адаптация организма к различным неблагоприятным факторам, в том числе и экологическим, осуществляется благодаря морфофункциональной перестройке всех звеньев гипоталамо-гипофизарной и адренокортикальной систем. Повреждение же любого звена этих систем может нарушить протекание адаптивных процессов, вплоть до возникновения болезней адаптации [3, 6]. Одним из факторов влияния на организм является воздействие низких температур.

Цель работы – изучение состояния тканей надпочечников, а также содержания микро- и макробиоэлементов (БЭ) в сыворотке крови у крыс пубертатного (3 мес.) и половозрелого (6 мес.) возрастов под влиянием общего охлаждения.

Опыты выполнены на белых крысах-самцах линии Вистар 3-х и 6-ти месяцев. Общее охлаждение животных при температуре 10 ± 1 °С в течение 1 ч/сут осуществлялось 3 сут в одно и то же время. Забивали животных путем декапитации.

Обзорное изучение тканей надпочечников проводили при окраске гематоксилин-эозином по методу Ван-Гизона. В сыворотке крови определяли содержание калия и натрия методом пламенной фотометрии; кальция, магния, цинка и меди – методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии ферментативную активность медьсодержащего фермента церулоплазмина – по методу Ревина в модификации С. В. Бестужева [5].

При общем охлаждении животных пубертатного возраста в надпочечниках наблюдалась извитость капсулы, свидетельствующая об уменьшении их объема. В коре, главным образом, за счет сетчатой зоны отмечались некробиотические изменения с гиперемией и гемосидерозом, достигающие кое-где четко контурирующейся клубочковой зоны, наряду с преимущественно умеренной вакуолизацией и вертикальной упорядоченностью клеток в пучковой зоне.

В мозговом слое цитоплазма большей части клеток светлая, умеренно вакуолизирована, округлые ядра клеток – нормо- или гиперхромные, четко структурированы. В некоторых сосудах наблюдались гиалиновые тромбы.

В составе БЭ охлажденных животных по сравнению с интактными отмечалось: повышение содержания калия, кальция, магния и меди в сыворотке крови; снижение содержания кальция и цинка и повышение содержания магния и меди в почках;

Adaptation of the organism to various unfavorable factors, ecological including, is realized due to morphofunctional re-structuring of all the links of the hypothalamo-hypophysial and adrenocortical systems. Injury to any link of these systems may disturb occurrence of the adaptive processes, and may result even in the development of adaptive diseases [3, 6]. One of the factors, which influence the organism, is the action of low temperatures.

The aim of the given research was to investigate the state of the adrenal gland tissues, and to study the content of micro- and macrobioelements (BE) in blood serum in the rats of pubertal (3 months) and mature (6 months) age under the action of total cooling.

White male Wistar rats, aged 3 and 6 months, were used in the experiments. Total cooling of animals at the temperature of 10 ± 1 °C for 1 hour/day was carried out for 3 days at one and the same time. The animals were slaughtered by decapitation.

General study of the adrenal gland tissues was implemented during staining by hematoxylin-eosin according to Van-Gisone method. In the blood serum the contents of potassium and sodium were determined with a method of flame photometry; the contents of calcium, magnesium, zinc and copper – by a method of atomic-absorption spectrophotometry; enzymatic activity of a copper-containing enzyme ceruloplasmin was determined with a method of Revin, modified by S. V. Bestuzhev [5].

During total cooling of pubertal animals their adrenal glands demonstrated windiness of the capsule, which indicates a reduction in their volumes. Together with predominantly moderate vacuolization and vertical arrangement of cells in the zona fasciculata the necrobiotic changes with hyperemia and hemosiderosis were reported in the cortex, occurring mainly due to the zona reticulosa, which in some places stretch out to a clearly cut zona glomerulosa.

In the brain layer the cytoplasm of the most cells is clear, moderately vacuolized, and rounded nuclei of the cells are normo- or hyperchromic, and clearly structured. In some vessels the hyaline thrombi were evident. The following was reported as to the composition of BE of the cooled animals as compared with intact animals: an increase in the content of potassium, calcium, magnesium and copper in the blood serum; a reduction in the content of calcium and zinc and an increase in the content of magnesium and

Матеріал, захищений авторським правом

Таблица 1 **Table 1**

Динамика содержания БЭ в тканях (мг/кг сырого веса) и сыворотке крови (ммоль/л — для K, Na, Ca, Mg; мкмоль/л — для Zn и Cu) животных в возрасте 3-х месяцев под влиянием общего охлаждения

Dynamics of the content of bioelements in the tissues (mg/kg of raw weight) and blood serum (mmol/k for K, Na, Ca, Mg; μmol/l for Zn and Cu) of the animals, aged 3 months, under the action of total cooling

Биообъекты Biosystems	Биоэлементы Bioelements											
	K		Na		Ca		Mg		Zn		Cu	
	Животные Animals											
	интактные intact	охлажденные cooled	интактные intact	охлажденные cooled	интактные intact	охлажденные cooled	интактные intact	охлажденные cooled	интактные intact	охлажденные cooled	интактные intact	охлажденные cooled
Сыворотка крови Blood serum	4,19 ± 0,16	4,60 ± 0,22***	134,5 ± 2,97	134,7 ± 1,77	1,29 ± 0,045	2,68 ± 0,14***	0,97 ± 0,05	1,02 ± 0,047*	27,44 ± 0,51	27,14 ± 0,57	20,22 ± 0,58	21,05 ± 0,68***
Почки Kidneys	145,2 ± 8,41	141,2 ± 2,42	94,78 ± 2,95	94,86 ± 1,32	2,32 ± 0,04	1,24 ± 0,03*	1,98 ± 0,10	2,15 ± 0,16*	2,60 ± 0,17	2,25 ± 0,07***	0,29 ± 0,01	0,27 ± 0,01***
Легкие Lungs	133,4 ± 1,56	134,3 ± 2,90	93,71 ± 4,16	103,0 ± 2,46***	2,23 ± 0,11	2,10 ± 0,1	1,65 ± 0,33	1,78 ± 0,08***	1,96 ± 0,065	2,50 ± 0,10***	0,42 ± 0,02	0,30 ± 0,02***

Примечание. *$p < 0,05$; **$p < 0,01$; ***$p < 0,001$.

Notes. *$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$.

Таблица 2 **Table 2**

Динамика содержания БЭ в тканях (мг/кг сырого веса) и сыворотке крови (ммоль/л — для K, Na, Ca, Mg; мкмоль/л — для Zn и Cu) животных в возрасте 6-ти месяцев под влиянием общего охлаждения

Dynamics of the content of bioelements in the tissues (mg/kg of raw weight) and blood serum (mmol/k for K, Na, Ca, Mg; μmol/l for Zn and Cu) of the animals, aged 6 months, under the action of total cooling

Биообъекты Biosystems	Биоэлементы Bioelements											
	K		Na		Ca		Mg		Zn		Cu	
	Животные Animals											
	интактные intact	охлажденные cooled	интактные intact	охлажденные cooled	интактные intact	охлажденные cooled	интактные intact	охлажденные cooled	интактные intact	охлажденные cooled	интактные intact	охлажденные cooled
Сыворотка крови Blood serum	4,34 ± 0,19	3,76 ± 0,25***	136,4 ± 1,827	131,4 ± 4,09**	2,19 ± 0,18	2,26 ± 0,15***	0,94 ± 0,07	0,98 ± 0,06	26,97 ± 0,62	27,25 ± 0,35	19,49 ± 0,96	19,61 ± 0,34
Почки Kidneys	153,6 ± 4,89	148,68 ± 2,76**	106,0 ± 2,05	98,13 ± 1,63***	1,41 ± 0,07	1,45 ± 0,06***	2,36 ± 0,10	1,64 ± 0,07***	2,13 ± 0,11	2,20 ± 0,10	0,29 ± 0,02	0,29 ± 0,03
Легкие Lungs	139,6 ± 2,00	165,9 ± 3,40***	94,70 ± 1,70	107,0 ± 2,10	3,0 ± 0,09	2,50 ± 0,10***	1,80 ± 0,07	1,30 ± 0,05***	2,06 ± 0,10	2,50 ± 0,12***	0,30 ± 0,01	0,35 ± 0,02***

Примечание. *$p < 0,05$; **$p < 0,01$; ***$p < 0,001$.

Notes. *$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$.

Матеріал, захищений авторським правом

повышение содержания всех изучаемых БЭ (кроме меди) в ткани легких (табл. 1).

Общее охлаждение у половозрелых животных сопровождалось более выраженными деструктивными изменениями тканей надпочечников, извитостью капсулы, изменением соотношения толщины их слоев. В клубочковой зоне наблюдалась гиперплазия ядер. В пучковой зоне, наряду с полями некробиоза и некроза, отмечалось обилие темных клеток, среди которых встречались и круглые светлые. Сетчатый слой был гиперемирован, гомогенизирован. Отмечено уменьшение объема мозгового слоя с резкой вакуолизацией клеток и гиперхромией ядер. В тканях почек, легких и сыворотке крови этой группы животных наиболее значительными были изменения содержания калия и натрия (табл. 2). Достоверны также снижение содержания кальция и магния и повышение содержания цинка в легких.

Особое внимание необходимо обратить на изменение уровня всех изучаемых БЭ в ткани легких половозрелых животных, которые свидетельствуют о важной роли этого органа в регуляции обменных процессов при охлаждении.

Выявленные изменения в тканях надпочечников и содержании БЭ в сыворотке крови, почках и легких отражают динамику функционального состояния надпочечников под влиянием общего охлаждения. Изменения ширины различных слоев коры у половозрелых животных, гиперплазия и гипертрофия клеток клубочковой зоны указывают на интенсивный синтез минералокортикоидов, играющих важную роль в поддержании гомеостаза [1, 6], основным из которых у крыс является альдостерон, определяющий соотношение между натрием и калием в крови и клетках, участвующий в регуляции водного обмена. Такая высокая функциональная активность звеньев адренокортикальной системы с выбросом кортикостероидов, ферментной активностью, судя по динамике БЭ, направлена на регуляцию адаптивных процессов, освобождение энергетических и пластических материалов для замещения нарушенных вследствие действия повреждающего фактора (в данном случае общего охлаждения) звеньев этой системы или в связи с повышением интенсивности функций организма [4].

В группе животных пубертатного возраста выявлена преимущественная динамика изменения магния, цинка, меди, а также кальция в органах и крови. Это дает основание говорить о том, что в этом возрасте процесс адаптации к холоду в основном осуществляется не за счет истощения ресурсов организма, а путем формирования адекватной функциональной системы, и механизмы регуляции адаптационных реакций у молодых и взрослых животных несколько отличны, что подтверждается и данными [2].

ЛИТЕРАТУРА

1. *Артишевский А. А.* Надпочечные железы. Строение, функции, развитие.– Минск: Беларусь, 1977.– 127 с.
2. *Бажанова Е. Д., Черниговская Е. В., Данилова О. А.* Гипоталамическая регуляция функции коры надпочечников у старых и молодых крыс // Журн. эволюц. биохимии и физиол.– 1998.– 34, № 2.– С. 233–239.
3. *Барабаш Н. А., Двуреченская Г. П.* Адаптация к холоду // Физиология адаптационных процессов.– М.: Наука, 1982.– С. 283–293.
4. *Бродский В. Я., Урываева И. В.* Клеточная полиплодия. Пролиферация и дифференцировка.– М.: Наука, 1981.– 259 с.
5. *Колб В. Г., Камышников В. С.* Справочник по клинической химии.– Минск: Беларусь, 1982.– С. 365.
6. *Селье Г.* На уровне целого организма / Пер. с англ.– М.: Наука, 1972.– 122 с.

Поступило 09.12.99

copper in the kidneys; a rise in the content of all the studied BE (with the exception of copper) in the tissue of the lungs (Table 1).

Total cooling in mature animals was accompanied with stronger manifested destructive changes in the adrenal gland tissues, windiness of the capsule, changes in the ratio of the depths of their bilayers. Hyperplasia of the nuclei was identified in the zona glomerulosa. The zona fasciculata, together with the fields of necrosis and necrobiosis, demonstrated plenty dark cells, among which rounded light-colored cells were found. The reticular layer was hyperemic and homogenized. A reduction in the volume of the brain layer with rapid vacuolization of cells and hyperchromia of the nuclei was reported.In the tissues of the kidneys, lungs and blood serum in this group of animals the largest changes concerned the content of potassium and sodium (Table 2). A reduction in the contents of calcium and magnesium and a rise in the content of zinc in the lungs were also significant.

Particular attention should be paid to the change in the level of all the studied BE in the tissue of the lungs of mature animals, which testify to an important role of this organ in the regulation of exchange processes during cooling.

The observed changes in the tissues of adrenal glands and BE content in the blood serum, kidneys and lungs reflect the dynamics of the functional state of the adrenal glands under the action of total cooling. Changes in the widths of different cortical layers, hyperplasia and hypertrophy of cells of the zona glomerulosa indicate to an intensive synthesis of mineral corticoids, which play a major part in the maintenance of homeostasis [1, 6], the major one in rats is aldosterone, determining the ratio between sodium and potassium in blood and cells, participating in the regulation of water exchange. Such a high functional activity of the links of the adrenocortical system with the discharge of corticosteroids, enzymatic activity, as judged by the BE dynamics, is directed towards regulation of the adaptive processes, release of energetic and plastic materials for substitution of the links of this system, injured due to the action of the damaging factor (total cooling in this case), or due to a rise in the intensity of the functions of the organism [4].

Predominant dynamics of changes of magnesium, zinc, copper and calcium in organs and blood was observed in the group of animals of pubertal age. This allows to assume that at this age the process of adaptation to cold is realized mainly not due to exhaustion of the organism resources, but due to a formation of an adequate functional system, and the mechanisms of regulation of adaptive responses in young and adult animals are somewhat different, which is also supported by other researchers [2].

REFERENCES

1. *Artishevsky A. A.* Adrenal glands. Structure, functions, development.– Minsk: Belarus publ., 1977.– 127 p.
2. *Bazhanova E. D., Chernigovskaya E. V., Danilova O. A.* Hypothalamic regulation of the function of the adrenal gland cortex in adult and young rats // Zhurn. evol. biokhimii i fiziol.– 1998.– 34, № 2.– P. 233–239.
3. *Barabash N. A., Dvurechenskaya G. Ya.* Adaptation to cold // Physiology of adaptive processes.– M.: Nauka publ., 1982.– P. 283–293.
4. *Brodksiy V. Ya., Uruvayeva I. V.* Cell polyploidy. Proliferation and differentiation.– M.: Nauka publ., 1981.– 259 p.
5. *Kolb V. G., Kamyshnikov V. S.* Reference guide on clinical chemistry.– Minsk: Belarus publ., 1982.– P. 365.
6. *Selye G.* At the level of the whole organism / Transl. from English.– M.: Nauka publ., 1972.– 122 p.

Accepted in 09.12.99

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 611.82.013: 615.361.014.413

UDC 611.82.013: 615.361.014.413

Влияние гипотермического хранения на жизнеспособность фрагментов коры и гипоталамуса эмбрионов крыс

В. В. ЛОМАКО, Л. И. ШУЛЯК

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Hypothermic Storage on the Viability of the Fragments of Rat Embryonic Cortex and Hypothalamus

V. V. LOMAKO, L. I. SHULYAK

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

В последние годы проблема трансплантации эмбриональных нервных тканей (ЭНТ) с лечебной целью вышла за пределы фундаментальных исследований и становится предметом клинических разработок. Наибольшее применение трансплантация ЭНТ человека и животных находит при неврологических заболеваниях. Возможности и эффективность данного метода в клинике зависят от ряда факторов. Основным является определение оптимального способа хранения трансплантационного материала для максимального сохранения его жизнеспособности. Было показано, что при трансплантации криоконсервированной ЭНТ наблюдается существенное снижение приживления и иннервации по сравнению с пересадкой нативной ткани [1].Жизнеспособность материала после трансплантации, в основном, оценивается самой трансплантацией. Очевидно, что разработка и использование адекватных методов *in vitro* для определения функционального состояния биообъектов после гипо- и криотермического хранения приобретают особую актуальность [1, 4].

Так как этап гипотермического хранения (ГХ) различной продолжительности необходим при методах как кратко-, так и долгосрочной консервации тканей перед трансплантацией и не требует применения криопротекторов, обладающих определенной токсичностью, то целью работы явилось изучение влияния гипотермического хранения при температуре 4 °С на жизнеспособность фрагментов ЭНТ коры и гипоталамуса крыс, определяемую по уровню синтеза белка и ДНК.

Фрагменты коры и гипоталамуса были получены от 16–17-дневных эмбрионов крыс линии Вистар. Кусочки ЭНТ переносили в полиэтиленовые пробирки с 1 мл охлажденной среды 199 с 10% амниотической жидкости (*pH* 7,4) и хранили при 4 °С в течение 1, 5 и 12 сут. После гипотермического хранения в фрагментах ЭНТ радиоизотопным методом по включению меченых предшественников ^{3}H-лейцина и ^{3}H-тимидина определяли интенсивность биосинтеза белка и ДНК соответственно.

Результаты экспериментов показали, что синтез белка и ДНК после ГХ претерпевает сходную динамику (таблица). Через 1 сут ГХ наблюдается значительное увеличение уровня синтеза белка (более чем в 2 раза) и ДНК в ЭНТ коры и гипоталамуса крыс, что может свидетельствовать о сохранении способности клеток к делению. Через 5 сут ГХ синтез белка уменьшается, а ДНК – снижается до уровня неспецифической сорбции. Как оказалось, биосинтетический аппарат ДНК более чувствителен к ГХ, в то время как синтез белка находится на значительном уровне и к 12-м суткам хранения.

Фрагменты ЭНТ гетерогенны и содержат глиальные компоненты, которые, в отличие от нейронов, имеют достаточно выраженные антигенные свойства. Поэтому такие фрагменты, обладающие повышенной пролиферативной активностью (за счет увеличения количества мезоглиальных клеток при делении), повышают вероятность отторжения трансплантата. В настоящее

Recently the problem of therapeutic transplantation of the embryonic nervous tissues (ENT) exceeded the bounds of the fundamental research and became the object of clinical trials. Human and animal ENT are applied mostly for treatment of some neurological diseases. The abilities and efficiency of the given method depend on certain factors. The basic one is selection of the optimum method of storage of the transplantation material with the aim of the maximum preservation of its viability. Transplantation of cryopreserved ENT was shown to result in a significant reduction in grafting and innervation as compared with transplantation of the native tissue [1]. The viability of the material after transplantation is evaluated, basically, by the procedure itself. Apparently, development and application of the adequate methods *in vitro* for determination of the functional states of biosystems after hypo- and cryothermic storage become rather urgent [1, 4].

Since a stage of the hypothermic storage (HS) of various duration is required for both short- and long-term preservation of tissues prior to transplantation and does not require application of cryoprotectants, which possess certain toxicity, the aim of the given research was to investigate the effect of hypothermic storage at the temperature of 4 °C on the viability of the fragments of the rat ENT cortex and hypothalamus, determined by the level of synthesis of protein and DNA.

Fragments of the cortex and hypothalamus were collected from the Wistar rat embryos, aged 16–17 days. The ENT pieces were transferred into polyethylene vials, containing 1 ml of the cooled medium 199 with 10%-amniotic fluid (*pH* 7.4), and stored at 4 °C for 1, 5 and 12 days. Following hypothermic storage the intensities of biosynthesis of the protein and DNA, respectively, were determined in the ENT by a radioisotopic method according to inclusion of the labeled precursors of ^{3}H-leucine and ^{3}H-thymidine.

The results obtained showed that synthesis of the protein and DNA after HS experienced similar dynamics (Table). In 1 day of hypothermic storage there is observed a significant rise in the levels of synthesis of the protein (by more than 2-fold) and DNA in the ENT of the cortex and hypothalamus of the rats, which may indicate a maintenance of the ability of the cells for cleavage. In 5 days the protein synthesis is reduced, and that of the DNA decreases down to the level of a non-specific sorption. It turned out that the DNA biosynthetic apparatus is more susceptible to HS, while the protein synthesis stays at a high level even by the 12th day of storage.

The ENT fragments are heterogeneous and contain glial components, which, in contrast to neurons, possess strongly manifested antigenic properties. That is why these fragments, which have an increased proliferative activity (due to a rise in the number of mesoglial cells during cleavage), make a probability of the transplant rejection higher. Currently a research on harvesting of transplants with reduced proliferative activity is under way [2]. In this respect of certain interest are the ENT fragments, stored at 4 °C for 5 and

Матеріал, захищений авторським правом

Влияние гипотермического хранения (4 °С) на уровень синтеза белка (имп/мг белка/мин×10^{-3}) и ДНК (имп/ед. массы ДНК/мин×10^{-3}) в фрагментах ЭНТ крыс

Сроки ГХ, сут	Кора		Гипоталамус	
	Белок	ДНК	Белок	ДНК
Контроль	12,2 ± 0,1	2,3 ± 0,15	16,7 ± 0,2	3,25 ± 0,05
1	26,5 ± 0,5	3,91 ± 0,04	35,1 ± 0,5	6,45 ± 0,05
5	18,1 ± 0,5	1,1 ± 0,1	17,3 ± 0,4	1,3 ± 0,1
12	22,5 ± 0,4	—	22,1 ± 0,2	—

время проводятся работы по получению трансплантатов с пониженной пролиферативной активностью [2]. В этой связи представляют интерес фрагменты ЭНТ, хранившиеся при 4 °С в течение 5 и 12 сут, которые уже не обладают митотической активностью, но еще способны синтезировать белок (т.е. сохранять функциональную активность).

Следовательно, в зависимости от срока ГХ, можно получать кусочки ЭНТ с различной функциональной активностью и использовать их при трансплантации для достижения различного эффекта. Так, например, при гетеротопической (периферической) пересадке ткани трансплантат не защищен гематоэнцефалическим барьером (ГЭБ) от иммунокомпетентных клеток, поэтому целесообразнее использовать ЭНТ через 5 и 12 сут ГХ. При гомотопической трансплантации, когда ГЭБ препятствует развитию иммунной реакции, возможно применение ЭНТ после 1 сут хранения. В этом случае повышенная пролиферативная активность такой ткани должна обеспечить лучшую интеграцию трансплантата с мозгом хозяина и, следовательно, более полную компенсацию нарушенных функций [3].

Как указывают полученные данные, после ГХ синтез белка и ДНК даже превышает контрольный уровень. Это, по-видимому, связано с развитием репарационных процессов, направленных на компенсацию функциональных нарушений после гипотермического воздействия. Однако следует учитывать и возможность того, что наблюдаемое увеличение может быть связано с усилением протеолитической активности. Тем не менее, по нашему мнению, усиление биосинтеза может свидетельствовать о степени функциональных повреждений. В то же время высокий уровень синтеза указывает, что синтетический аппарат в клетках фрагментов ЭНТ после ГХ обладает достаточно высокой функциональной активностью. Усиление синтетической активности может быть также обусловлено гиперкомпенсаторными реакциями, индуцированными гипотермическим воздействием, и, как следствие, обеспечиваются большая устойчивость клеток фрагментов ЭНТ к стрессорным воздействиям и большая сохранность трансплантационного материала.

Таким образом, результаты проведенных экспериментов показали, что ГХ в течение 1, 5 и 12 сут обеспечивает биологическую полноценность фрагментов ЭНТ коры и гипоталамуса 16-дневных эмбрионов крысы, сохранность которых определяется по способности синтезировать белок и ДНК, что может служить адекватным методом оценки жизнеспособности биоматериала *in vitro*.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Аникин А. Ю., Козлова М. В., Блитченко Ю. А. и др.* Опиоидные пептиды увеличивают выживаемость нервной ткани плода человека после криопрезервации в культуре // Бюл. эксперим. биол. и мед.– 1994.– № 4.– С. 408–411.
2. *Аркатов Ю. М.* Действие аномальных нуклеотидов на эмбриональную нервную ткань и их использование при интрацеребральной аллотрансплантации // Сб. науч. тр. "Трансплантация ткани мозга млекопитающих".– Пущино, 1988.– С. 6–7.
3. *Ганнушкина И. В., Сабурина И. Н., Конорова И. Л., Полежаев Л. В.* Роль гемато-энцефалического барьера при трансплантации в головной мозг нервной ткани млекопитающих // Сб. науч. тр. "Трансплантация ткани мозга млекопитающих".– Пущино, 1988.– С. 15–16.
4. *Humpal C., Bygdeman M., Olson L., Stromberg I.* Human fetal cortical tissue fragments survive grafting following one-week storage at +4 °C // Cell Transplant.– 1994.– Nov.–dec. 3:6.– P. 478–479.

Поступило 07.07.99

Effect of hypothermic storage (4 °C) on the levels of synthesis of the protein (pulses/mg protein/min×10^{-3}) and DNA (pulses/un. of DNA mass/min×10^{-3}) in the rat ENT fragments

HS duration, days	Cortex		Hypothalamus	
	Protein	DNA	Protein	DNA
Control	12.2 ± 0.1	2.3 ± 0.15	16.7 ± 0.2	3.25 ± 0.05
1	26.5 ± 0.5	3.91 ± 0.04	35.1 ± 0.5	6.45 ± 0.05
5	18.1 ± 0.5	1.1 ± 0.1	17.3 ± 0.4	1.3 ± 0.1
12	22.5 ± 0.4	—	22.1 ± 0.2	—

12 days, which have no more mitotic activity but are still capable of synthesizing the protein (i.e. maintaining functional activity).

Hence, depending on the duration of HS, it is possible to collect the ENT fragments with differing functional activity and use them during transplantation for achieving various yields. For example, during heterotropic (peripheral) grafting of the tissue the transplant is not protected by the blood-brain barrier (BBB) against the immune competent cells, that is why it is more expedient to use the ENT in 5 and 12 days of HS. During homotopic transplantation, when the BBB prevents development of the immune response, it is possible to apply the ENT after 1-day storage. In this case an increased proliferative activity of such a tissue should provide for a better integration of the transplant with the host brain and, consequently, a more complete compensation of the disturbed functions [3].

The data obtained testify to the fact that after HS synthesis of the protein and DNA even exceeds the control level. This, apparently, relates to the development of the reparative processes, aimed at compensation of the functional impairments after hypothermic treatment. However, it should also be taken into account that the observed increased may relate to enhancement of the proteolytic activity. Nevertheless, the authors believe that intensification of biosynthesis may testify to the scale of the functional disturbances. At the same time a high level of synthesis indicates that the synthetic apparatus in the cells of the ENT fragments after HS possesses a significantly high functional activity. Intensification of the synthetic activity may also be due to the hypercompensatory responses, induced by a hypothermic exposure, and, consequently, a higher resistance of the ENT cells to stress exposures and higher survival of the transplantation material are achieved.

Thus, the results of the experiments conducted demonstrate that HS for 1, 5 and 12 days provides for a biological integrity of the ENT fragments of the cortex and hypothalamus of the rat embryos, aged 16 days, the survival of which is determined by their ability for synthesizing the protein and DNA, which may be used as an adequate method of evaluating survival of biomaterial *in vitro*.

REFERENCES

1. *Anikin A. Yu., Kozlova M. V., Blitchenko Yu. A. et al.* Opioid peptides increase survival of the human fetal nervous tissue following cryopreservation in the culture // Bull. eksperim. biol. i med.– 1994.– № 4.– P. 408–411.
2. *Arkatov Yu. M.* Action of the anomalous nucleotides on the embryonic nervous tissue and their application during intracerebral allotransplantation // Collection of sci. works "Transplantation of the mammalian brain tissue".– Puschino, 1988.– P. 6–7.
3. *Gannushkina I. V., Saburina I. N., Konorova I. L., Polezhayev L. V.* Role of the blood-brain barrier during transplantation of the mammalian nervous tissue into the brain // Ibid.– P. 15–16.
4. *Humpal C., Bygdeman M., Olson L., Stromberg I.* Human fetal cortical tissue fragments survive grafting following one-week storage at +4 °C // Cell Transplant.– 1994.– Nov.–dec. 3:6.– P. 478–479.

Accepted in 07.07.99

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 615.915: 612.111.014

UDC 615.915: 612.111.014

Исследование методом ^{23}Na-ЯМР накопления внутриклеточного натрия в эритроцитах человека после криоконсервирования с 1,2-пропандиолом

В. Д. ЗИНЧЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

A Study of Accumulation of the Intracellular Sodium in Human Red Cells after Cryopreservation with 1.2-propanediol Using a ^{23}Na-NMR Method

V. D. ZINCHENKO

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

В настоящее время установлено, что процессы замораживания-оттаивания эритроцитов под защитой криопротекторов приводят к существенному повышению скорости накопления в клетках ионов Na^+. Это дает основание думать, что скорость активного выброса натрия становится недостаточной для поддержания внутриклеточного пула Na^+ на постоянном уровне в условиях возрастающего его потока в клетку по механизму пассивной диффузии. Активный выброс натрия из эритроцитов против градиента концентрации осуществляется только в результате функционирования Na^+K^+АТФазы за счет гидролиза АТФ.

Концентрация внутриклеточного натрия может увеличиваться: а) при возрастании пассивного потока ионов через "каналы утечки", возникающие в мембранах при криоконсервировании; б) снижении активности Na^+K^+АТФазы; в) совместном действии этих факторов.

В настоящей работе предпринята попытка оценить роль пассивного транспорта ионов Na^+ через трансмембранные каналы в возрастании его концентрации в криоконсервированных эритроцитах. Эксперимент основывался на модуляции ионной проницаемости мембран при помощи нистатина, который относится к классу полиеновых антибиотиков, образующих в мембранах ионные каналы молекулярных размеров, каждый из которых представляет собой пору, пронизывающую мембрану насквозь и возникающую в результате сшивки двух пор. Под действием нистатина возрастает пассивный поток ионов через мембрану по градиенту концентраций.

При наблюдении за быстрыми изменениями содержания внутриклеточного натрия (Na^+_{in}) в эритроцитах использовался метод ^{23}Na-ЯМР. Для разделения сигналов внутри- и внеклеточного натрия применяли сдвигающие комплексы диспрозия с триполифосфатом по методике, описанной в [2]. Криоконсервирование эритроцитов проводили по методике [1]. Трансмембранный перенос натрия исследовали при температуре 20 °С.

На рисунке (вставка) показаны спектры ^{23}Na-ЯМР эритроцитов в присутствии сдвигающих комплексов диспрозия. Левый сигнал – эталон, средний – внутриклеточный натрий, правый – внеклеточный натрий. После добавления нистатина в концентрации 50 мкг/мл (в расчете на весь объем образца) концентрация Na^+_{in} быстро повышается. Для интактных клеток (рисунок *а*) через 50 мин достигается состояние насыщения, уровень Na^+_{in} за это время возрастает примерно в 9 раз по сравнению с исходным значением.

В клетках после криоконсервирования (рисунок *б*) скорость возрастания концентрации Na^+_{in} значительно выше и насыщение достигается через 18 мин. При этом значение уровня насыщения по сравнению с интактными клетками увеличивается не сильно, уровень концентрации Na^+_{in} по сравнению с начальным уровнем во втором случае (после криоконсервирования) примерно в 10 раз выше исходного значения. Более высокая ско-

It is common knowledge that the processes of freeze-thawing of red cells under protection of cryoprotectants result in a considerable rise in the rate of accumulation of the Na+ ions in the cells. Thus it may be assumed that the rate of the active outflow of sodium becomes insufficient for maintaining the intracellular pool of Na+ at a constant level when its inflow into the cell using a mechanism of passive diffusion increases. Active discharge of sodium out of red cells against the concentration gradient is exercised only as a result of the functioning of Na^+K^+ATPase due to the ATP hydrolysis.

Concentration of the intracellular sodium may increase: a) after a rise in the passive flow of ions through the "leaking channels", which are developed in membranes during cryopreservation; b) after reduction in the activity of Na^+K^+ATPase; c) during joint action of these factors.

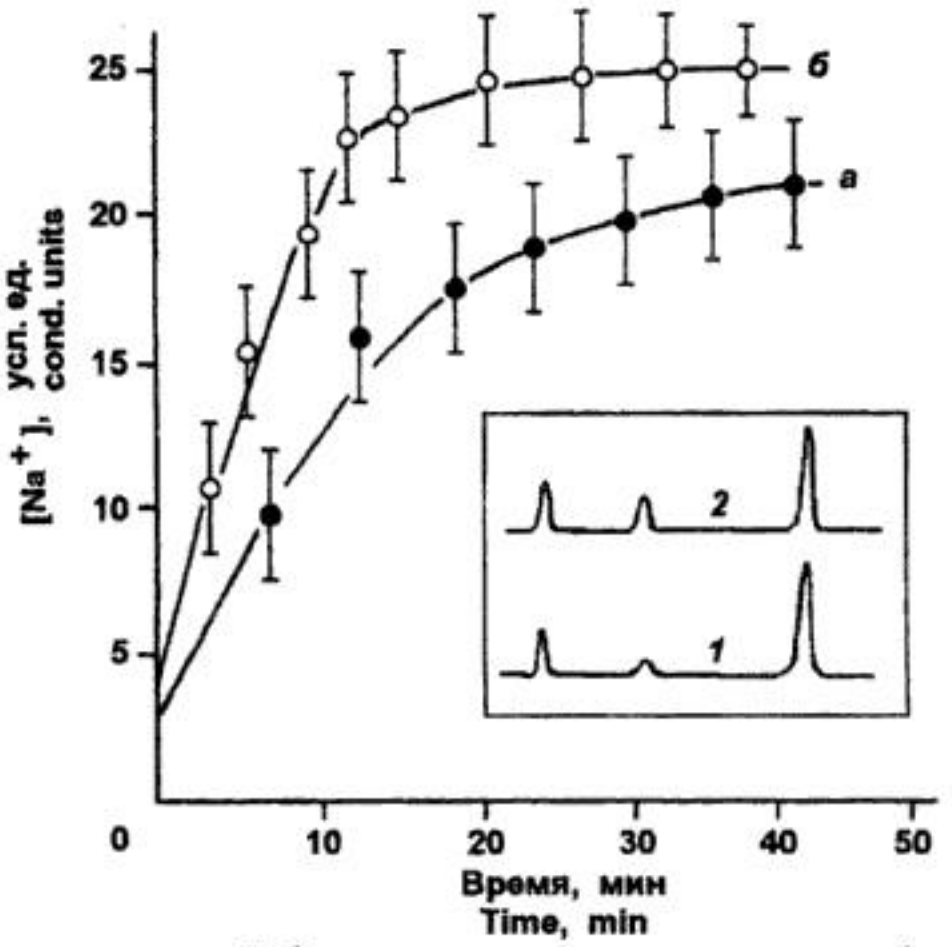
The given research is aimed at evaluating the role of the passive transport of ions through the membrane channels in increasing its concentration in cryopreserved red cells. The experiments were based on the modulation of the membrane ionic permeability with nystatin, which belongs to a class of polyene antibiotics, forming ionic channels of the molecular dimensions in the membranes, each of which is a pore, which penetrates the membrane and which is developed due to suturing of two semipores. The action of nystatin brings about a rise in the passive flow of ions through the membrane along the concentration gradient.

A ^{23}Na-NMR method was used for identification of rapid changes in the content of the intracellular sodium (Na+in) in red cells. To separate the signals of the intra- and extracellular sodium the shifting complexes of dysprosium with tripolyphosphate were according to the technique described elsewhere [2]. Red cells were cryopreserved with a method of [1]. A transmembrane transfer of sodium was studied at the temperature of 20 °C.

The figure (insertion) shows the ^{23}Na-NMR spectra of red cells in the presence of the shifting complexes of dysprosium. The left signal is standard, medium – intracellular sodium, right one – extracellular sodium. Addition of nystatin in the concentration of 50 μg/ml (per total volume of the sample) results in a rapid increase in the concentration of Na^+_{in}. For intact cells (Figure *a*) the state of saturation is achieved in 50 min, and the level of Na^+_{in} increases by that time nearly by 9-fold as compared with the original value.

The concentration of Na^+_{in} in the cells after cryopreservation (Figure *б*) increases much faster, and the saturation is achieved already in 18 min. Here the value of the level of saturation does not increase significantly as compared with intact cells, while the level of the Na^+_{in} concentration in the second case is by nearly 10-fold higher as compared with the original value. A higher rate of an increase in Na^+_{in} in the second case is understandable – beside the pores, formed by nystatin in the membranes, there exist the pores, which are developed due to cryopreservation. At the same time it is evident that more that a 2-fold increase in the velocity of the transmembrane flow does not result in significant differences in

Матеріал, захищений авторським правом



Зависимость концентрации внутриклеточного натрия от времени в эритроцитах человека в присутствии 50 мкг/мл нистатина: *а* – интактные клетки; *б* – после криоконсервирования с 1,2-пропандиолом. На вставке: спектр ^{23}Na-ЯМР (105,84 мГц) суспензии интактных эритроцитов, содержащих 20 мМ $DyCl_3$, 50 мМ $Na_5P_3O_{10}$ и 50 мкг/мл нистатина, *pH* 7,4: *1* – после введения нистатина; *2* – через 10 мин инкубации с нистатином. Пояснения в тексте.

Dependence of concentration of intracellular sodium on time in human red cells in the presence of 50 μg/ml nystatin: *a* – intact cells; *б* – after cryopreservation with 1.2-propanediol. The insertion shows a ^{23}Na-NMR spectrum (105.4 mHz) of intact red cell suspension, containing 20 mM $DyCl_3$, 50 mM $Na_5P_3O_{10}$ and 50 μg/ml nystatin, *pH* 7.4: *1* – immediately after injection of nystatin; *2* – after 10-min incubation with nystatin. See the text for more details.

рость возрастания Na^+_{in} во втором случае понятна — в мембранах, помимо пор, образованных нистатином, существуют поры, возникшие в результате криоконсервирования. Вместе с тем видно, что увеличение скорости трансмембранного потока более чем в два раза не приводит к сильному отличию уровня насыщения Na^+_{in}. Следовательно, Na^+K^+АТФаза в начальный момент после криоконсервирования обладает некоторым резервом активности и способна реагировать на возрастающие трансмембранные потоки натрия, а в увеличение общего пула Na^+_{in} в этот период преимущественный вклад вносит, вероятно, появление новых каналов утечки и возрастание в результате этого пассивного потока натрия по градиенту концентраций.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Воротилин А. М., Гучок М. М., Гучок В. М., Лоевский М. М.* Сравнительное изучение эффективности криоконсервирования эритроцитов под защитой 1,2-пропандиола (α-пропиленгликоля) и глицерина // Пробл. гематологии и переливания крови.– 1982.– 27, № 12.– С. 15–19.
2. *Shinar H., Navon G.* NMR relaxation studies of intracellular Na^+ in red blood cells // Biophys. Chem.– 1984.– 20, № 4.– P. 275–283.

Поступило 21.01.99

the level of saturation of Na+in. Hence, Na^+K^+ATPase at the initial moment after cryopreservation posses a certain reserve of activity, and it is capable to respond to increasing transmembrane flows of sodium, while a rise of the total Na^+_{in} pool at that period is accounted for, mainly, by development of new leaking channels, thus resulting in a rise in the passive flow of sodium along the concentration gradient.

REFERENCES

1. *Vorotilin A. M., Guchok M. M., Loyevsky M. M.* A comparative study of the efficiency of cryopreservation of red cells under protection of 1.2-propanediol (α-propylene glycol) and glycerol // Probl. gematologii i perelivaniya krovi.– 1982.– 27, № 12.– P. 15–19.
2. *Shinar H., Navon G.* NMR relaxation studies of intracellular Na^+ in red blood cells // Biophys. Chem.– 1984.– 20, № 4.– P. 275–283.

Accepted in 21.01.99

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 28.03.2000. Формат 60×84 1/8. Бум. тип. № 1. Печать офсетная. Усл. печ. л. 11,2. Тираж 350 экз. Цена договорная. Отпечатано МЧП "Райдер", г. Харьков, ул. Артема, 4.

Матеріал, захищений авторським правом

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY

1

2000

Индекс 70474

Index 70474

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

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

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

Subscription orders should be addressed to

Editor-in-Chief V. I. Grishchenko
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine
23 Pereyaslavskaya Str., 61015 Kharkov, Ukraine
Tel. (0572) 72-41-43
Fax (0572) 72-00-84
E-mail: cryo@online.kharkov.ua