

1

ISSN 0233-7673

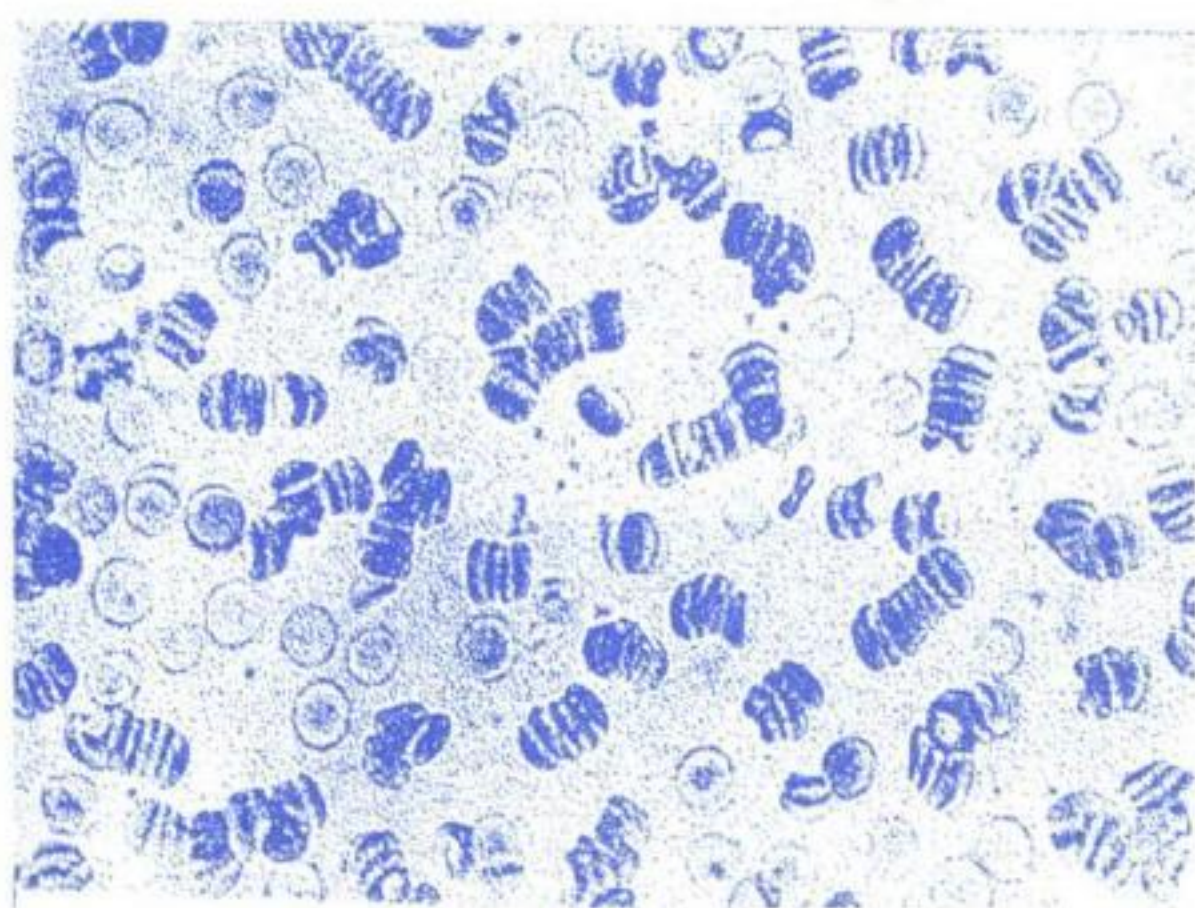
НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ,
ОТДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ, БИОХИМИИ,
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
И КЛИНИЧЕСКОЙ ФИЗИОЛОГИИ

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ
И КРИОМЕДИЦИНЫ



1998

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ



ПУПОВИННАЯ КОРДОВАЯ КРОВЬ ЧЕЛОВЕКА КАК ИСТОЧНИК
ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ КЛЕТОК ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕ-
НЕНИЯ. ЧАСТЬ I. ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕМОПОЭТИЧЕСКОГО
ПОТЕНЦИАЛА *Гольцев А. Н., Калиниченко Т. А.*

ГИПОТЕРМИЧЕСКАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ ФОРМЫ ЭРИТРОЦИТОВ
ЧЕЛОВЕКА КАК ОЦЕНКА СТЕПЕНИ ВЫРАЖЕННОСТИ
ПАТОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА *Кулешова Л. Г.*

ПРИМЕНЕНИЕ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ В
ЛАПАРОСКОПИЧЕСКОЙ ХИРУРГИИ *Гринёв Р.Н., Шеремет А.И.,
Бычков С. А.*

Главный редактор **В.И.Грищенко**

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

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

EDITORIAL BOARD

S.I.Aksenov (Moscow), G.A.Babiychuk (Kharkov), A.M.Belous (Associated Editor, Kharkov), M.E.Beker (Riga), Yu.P.Bлагоj (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



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

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ
И КРИОМЕДИЦИНЫ

НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ОСНОВАН В 1985 ГОДУ
ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

1998

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

- Гольцев А. Н., Калчищенко Т. А. Пуповинная кордовая кровь человека как источник гемопоэтических клеток для клинического применения. Часть I. Характеристика гемопоэтического потенциала 3
- Емец О. Н., Воронков В. Н., Пашовкин Т. Н., Пахотин П. И. Срезы гиппокампа бодрствующих и глубоко спящих сусликов *Citellus undulatus* одинаково способны восстанавливать нейронную активность после травматического шока в условиях околонулевой гипотермии 24
- Орлова Н. В., Шпакова Н. М. Действие двухвалентных катионов на чувствительность эритроцитов к гиперосмотическому стрессу и холодовому шоку 30
- Бабенко Н. Н., Вотякова И. А., Лобынцева Г. С. Особенности пролиферации и дифференцировки нативных и криоконсервированных эмбриональных нервных клеток человека. Сообщение 1. Клеточный состав мозга эмбрионов человека 5–13 недель гестации 35
- Коваленко И. Ф., Панина Ю. Е., Розанов Л. Ф. Механизм и динамика повреждения эритроцитов человека в гипертоническом растворе проникающего в клетки криопротектора 40
- Бондаренко Т. П., Луцкова Н. А. Исходные условия и устойчивость эритроцитов к осмотическому стрессу. 1. Флуоресцентные исследования 43
- Кулешова Л. Г. Гипотермическая устойчивость формы эритроцитов человека как оценка степени выраженности патологического процесса 48

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

- Орлик В. В. Результати лабораторно-клінічного вивчення розморожених відмитих еритроцитів, кріоконсервованих при -20°C 53
- Гальченко С. Е., Мамонтова А. В., Сандомирский Б. П. Влияние режимов криоконсервирования фрагментов селезенки свиньи на интенсивность перекисных процессов 58

КРИОМЕДИЦИНА

- Гринёв Р. Н., Шеремет А. И., Бычков С. А. Применение низкотемпературного воздействия в лапароскопической хирургии 61

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- Марченко В. С. Экзистозэнцефалические механизмы повышения устойчивости организма к гипо- и гипертермии 64
- Гарбузенко О. Б., Перский Е. Э. Влияние охлаждения на обмен коллагена и эластина в коже крыс 66
- Кузнецов И. В., Соловьева А. С., Зинченко А. В., Перский Е. Э. Быстрая структурно-метаболическая адаптация коллагена к температуре 67

НАШИ ЮБИЛЯРЫ 69

© Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной Академии наук Украины, "Проблемы криобиологии", 1998

This One



Z4LE-1CN-UX8T

Зареєстровано в Державному реєстрі авторських прав

CONTENTS

THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

<i>Goltsev A. N., Kalinichenko T. A.</i> Human umbilical cord blood as a source of hemopoietic cells for clinical application. Part I. Nature of hemopoietic potential	3
<i>Yemets O. N., Voronkov V. N., Pashovkin T. N., Pakhotin P. I.</i> Hippocampal slices of deep-hibernating and awaked ground squirrels <i>Citellus undulatus</i> are equally able to restore neuronal activity after traumatic shock under deep hypothermia	24
<i>Orlova N. V., Shpakova N. V.</i> Action of divalent cations on susceptibility of red cells to hyperosmotic stress and cold shock	30
<i>Babenko N. N., Votyakova I. A., Lobyntseva G. S.</i> Specific features of proliferation and differentiation of native and cryopreserved human embryonic nervous cells. Report I. Cellular composition of human embryonic brain, aged 5–13 weeks of gestation	35
<i>Kovalenko I. F., Panina Yu. E., Rozanov L. F.</i> Mechanism and dynamics of injury of human red cells in hypertonic solution of penetrating cryoprotectants	40
<i>Bondarenko T. P., Lupilova N. A.</i> Original conditions and resistance of red cells to osmotic stress. I. Fluorescence studies	43
<i>Kuleshova L. G.</i> Hypertonic resistance of human erythrocyte shape as the estimation of pathological process manifestation degree	48

CRYOPRESERVATION OF BIOSYSTEMS

<i>Orlyk V. V.</i> Laboratory and clinical investigation of thawed washed red cells, cryopreserved at -20°C	53
<i>Galchenko S. E., Mamontova A. V., Sandomirsky B. P.</i> Influence of modes of cryopreservation of porcine spleen fragments on intensity of peroxidation	58

CRYOMEDICINE

<i>Grinyev R. N., Sheremet A. I., Byuchkov S. A.</i> Application of low temperature exposure in laparoscopic surgery	61
--	----

BRIEF COMMUNICATIONS

<i>Marchenko V. S.</i> Existence of mechanisms of the increase of organism's resistance to hypo- and hyperthermia	64
<i>Garbuzenko O. B., Persky E. E.</i> The influence of cooling on collagen and elastin exchange in rat skin	66
<i>Kuznetsov I. V., Solovjova A. S., Zinchenko A. V.</i> Quick structural-metabolic adaptation of collagen to the temperature influence	67

OUR ANNIVERSARIES	69
-----------------------------	----

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

Адрес редакции:

310015, Харьков,

ул. Переяславская, 23,

тел. (0572) 72-10-39,

e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Научный редактор *В.И.Луговой*

Редактор *Е. Д. Пазыч*

Компьютерный набор и верстка: *И. Г. Пятигорская*

Подп. в печ. 02.02.98. Формат 70x108/16. Бум. тип. № 1. Печать офсетная. Усл. печ. л. 7,2. Тираж 350 экз. Цена договорная. Оригинал-макет подготовлен в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины. Отпечатано в Харьковской городской типографии № 16, 310003, Харьков, ул. Университетская, 16. Зак.

А.Н.Гольцев, Т.А.Калиниченко

**ПУПОВИННАЯ КОРДОВАЯ КРОВЬ ЧЕЛОВЕКА КАК
ИСТОЧНИК ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ КЛЕТОК ДЛЯ
КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ.
ЧАСТЬ I. ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕМОПОЭТИЧЕСКОГО
ПОТЕНЦИАЛА**

На основании данных литературы об экспериментальных и клинических исследованиях трансплантационного потенциала пуповинной кордовой крови человека проанализированы особенности качественных и количественных параметров гемопоэтических клеток, а также биологии этой кроветворной ткани в целом. Рассматриваются особенности количественного содержания стволовых и коммитированных кроветворных предшественников в кордовой крови, их функциональный статус, в частности, пролиферативный потенциал, оцененный в системах *in vitro* и *in vivo*. Особое внимание уделено одному из главнейших кроветворных элементов — $CD34^+$ -клеткам, оценке свойств отдельных его субпопуляций, содержанию в сравнительном аспекте с другими кроветворными тканями.

Анализируются проблемы возможности и эффективности применения кордовой крови для восстановления иммуногемопоэза у подростков и взрослых, иммунологические аспекты особенностей взаимодействия этой ткани с организмом реципиента. Приводятся данные о лиганд-рецепторных взаимодействиях регуляторных цитокинов с мембранными структурами кроветворных элементов кордовой крови и возможности их экспансии под влиянием медиаторов *ex vivo*, изменения трансплантатбельности и характера кооперативных взаимодействий с кроветворным микроокружением.

Значительное место в общем анализе биологических свойств кордовой крови занимает раздел, относящийся к проблеме долгосрочного ее хранения. В сравнительном аспекте рассматривается возможность использования различных технологий консервирования материала (условий сбора, хранения перед консервированием, использование сепарационных процедур, программ криоконсервирования и др.), которые обеспечивают сохранение основных структурно-функциональных параметров мононуклеаров кордовой крови.

Длительное время трансплантация костного мозга (КМ) являлась основным методом лечения широкого спектра патологических состояний иммуногемопоэтической системы различного генеза. Однако трудности, обусловленные сложностью и длительностью подбора HLA-идентичных доноров КМ, необходимостью их госпитализации, риском для доноров, связанным с проведением общей анестезии при заборе КМ, а также повышенной опасностью возникновения осложнений у реципиентов в результате относительно высокого уровня инфицированности КМ взрослых такими латентными возбудителями, как цитомегаловирус, вирусы гепатита С, Эпштейна–Барра, иммунодефицита человека и др. [55], осложнения посттрансплантационного периода, связанные с развитием иммунных конфликтов в системе донор–реципиент при пересадке аллогенных миелокариоцитов [7], определили необходимость поиска альтернативных КМ источников гемопоэтических клеток. Особое внимание было обращено на клетки эмбриональной печени (КЭП) определенных сроков гестации, обладающих значительно меньшей иммунологической реактивностью и, следовательно, имеющих в этом плане серьезное преимущество перед аллогенным КМ [4]. Вместе с тем проблемы этического и юридического характера, связанные с получением этого материала, заставили ученых и клиницистов изыскивать новые источники кроветворной ткани. Экспериментально установленный факт циркуляции стволовых кроветворных элементов в пери-

фетической крови (ПК) [59] позволил рассматривать эту ткань как самостоятельный источник кроветворных клеток [15, 40]. Одновременно возникла идея получить такого рода клетки из пуповинной кордовой крови (ПКК), содержащей гемопоэтические элементы сформированного в эмбриогенезе лимфогемопоэтического плацдарма плода [19, 21].

Гемопоэз во время эмбрионального и фетального развития представлен как феномен миграции [8, 61]. Стволовые клетки ПКК занимают как бы "промежуточное" положение между фетальными гемопоэтическими клетками и стволовыми клетками КМ ребенка, что предопределяет особенности этих неонатальных гемопоэтических клеток.

В конце 80-х годов Broxmeyer H. E. et al. [19, 21] выдвинули предположение, что неонатальная кровь, сохраняющаяся в плаценте, содержит достаточное количество стволовых и коммитированных кроветворных клеток и может быть использована как гемопоэтический трансплантационный материал. Экспериментально было показано, что в единице объема ПКК содержится большее количество клеток-предшественников относительно ПК взрослого и приблизительно эквивалентное единице объема КМ взрослого. Эти предварительные заключения предопределили активизацию исследований по изучению ПКК человека как материала для клинического применения в качестве гемопоэтической ткани. Дальнейшими результатами работ Tavassoli M. [61], Hows J. M. et al. [37], Pettengell R. et al. [53] было подтверждено, что содержание гемопоэтических предшественников в фетальной крови непосредственно перед родами эквивалентно или даже превышает концентрацию этих клеток в КМ. Для выполнения одной из первостепенных задач программ по хранению и трансплантации ПКК — изучение пропорций гемопоэтических предшественников [36] — проводятся исследования колоний *in vitro*. Эти исследования демонстрируют присутствие в образцах ПКК поли- и мультипотентных колониеобразующих единиц: дающей смешанные колонии — КОЕ-Смеш (CFU-Mix), бластной — КОЕ-Бласт (CFU-Blast), гранулоцитарно-эритроидно-мегакариоцитарно-макрофагальной — КОЕ-ГЭММ (CFU-GEMM), гранулоцитарно-макрофагальной — КОЕ-ГМ (CFU-GM), макрофагальной — КОЕ-М (CFU-M), гранулоцитарной — КОЕ-Г (CFU-G), бурсообразующей единицы эритроидных клеток — БОЕ-Э (BFU-E) (см. таблицу).

Количество гемопоэтических клеток-предшественников, необходимых для восстановления кроветворения при миелодепрессии, определяется рядом условий [55]. Однако общепринято, что удачное приживление алломиелотрансплантатов грубо коррелирует с общим количеством введенных ядерных клеток, составляющих дозу от 1 до $3 \cdot 10^8$ ядерных клеток на килограмм массы реципиента [6, 34, 55]. Исходя из данных литературы о содержании ядерных клеток в отдельном образце ПКК (см. таблицу) очевидно, что образцы ПКК среднего объема являются достаточными по этому параметру для трансплантаций детям младшего возраста, следовательно, для ограниченного круга реципиентов. Кроме того, как более специфический способ индикации биологической пригодности трансплантата применяется определение содержания в нем КОЕ-ГМ, так как присутствие определенного количества предшественников миелоидного ростка может свидетельствовать о репопуляционной способности трансплантата [20, 53, 55]. Доза КОЕ-ГМ ориентировочно должна составлять от 1 до $10 \cdot 10^3$ на килограмм массы реципиента [6, 31]. Наличие в ПКК и КМ взрослого КОЕ-ГМ в одинаковых абсолютных количествах (в

Содержание ядерных клеток и колониеобразующих единиц в отдельном образце ПМК (данные литературы)

№ п/п	Ис-точ-ник	Количество образцов, их объем	Количество ядерных клеток	Количество CFU-GM (общее, содержание в 1 мл)	Количество других колоние-образующих единиц	Условия культивирования	Цель исследований. Результат трансплантации (если производилась)
1	2	3	4	5	6	7	8
1	[14]	n = 710 84 ± 27 (15 – 225) мл	(14,9 ± 4,6) · 10 ³ лейкоцитов/мл	(9,38 ± 11,16) · 10 ³ /мл 69 ± 79 (0 – 924) · 10 ⁴ клеток	(10,69 ± 6,53) · 10 ³ BFU-E/мл (1,3 ± 1,45) · 10 ³ CFU-Mix/мл 102 ± 71 (3 – 458) · 10 ⁴ BFU-E и 12 ± 14 (0 – 108) · 10 ⁴ CFU-Mix BFU-E: (6,5 ± 3,8) · 10 ⁵ (3,9 – 15,6) · 10 ⁵ CFU-GEMM: (0,8 ± 0,3) · 10 ⁵ (0,5 – 1,4) · 10 ⁵	Среда (Tetgy Fox Lab., Canada), содержащая 12,5% лошадиной сыворотки, 12,5% фетальной телячьей сыворотки (ФТС), 10 ^{–4} моль/л 2-меркаптоэтанола, 2 ммоль/л L-глутамина, 0,2 ммоль/л i-инозитола, 20 ммоль/л фолиевой кислоты, антибиотики, 2,5 ед/мл Еро, 10 нг/мл И-3, GM-CSF, 500 ед/мл И-6 с или без SCF и др. Условия: 5% CO ₂ , t = 37 °C в течение 3, 5, 10, 14 дней CFU-GM: от 7 до 14 дней в культуре, содержащей 1 мл Iscov's-модифицированной среды Dulbecco с 0,8% метилцеллюлозы и 15% ФТС; как источник КСФ — клеточная линия 5637; BFU и CFU-GEMM: до 14 дней в культуре, содержащей 1 ед. Еро, 1% деионизированного бычьего альбумина и 10 ^{–5} М 2-меркаптоэтанола	Тестирование образцов для организации банка
2	[22]	100 ± 25,7 (57 – 129) мл	Общее количество: (6,72 ± 2,7) · 10 ⁸ (2,4 – 13,4) · 10 ⁸ , из них гранулоцитов 47,9 ± 10,2 (22 – 63)%; мононуклеаров 45 ± 12,1 (28 – 71)%	(3,24 ± 2,1) · 10 ⁵ (1,4 – 6,9) · 10 ⁵	BFU-E: (6,5 ± 3,8) · 10 ⁵ (3,9 – 15,6) · 10 ⁵ CFU-GEMM: (0,8 ± 0,3) · 10 ⁵ (0,5 – 1,4) · 10 ⁵	CFU-GM: от 7 до 14 дней в культуре, содержащей 1 мл Iscov's-модифицированной среды Dulbecco с 0,8% метилцеллюлозы и 15% ФТС; как источник КСФ — клеточная линия 5637; BFU и CFU-GEMM: до 14 дней в культуре, содержащей 1 ед. Еро, 1% деионизированного бычьего альбумина и 10 ^{–5} М 2-меркаптоэтанола	Тестирование образцов перед замораживанием
3 а)	[13]	n = 1; 150 мл	Общее количество 12,7 · 10 ⁸	В агаре: 1,8 · 10 ⁵ колоний, 5,3 · 10 ⁵ колоний+кла-стеры; в метилцеллюлозе: 3,8 · 10 ⁵ колоний	BFU-E: 16,5 · 10 ⁵ ; CFU-GEMM: 0,8 · 10 ⁵	14 дней инкубации (5% CO ₂ , 5% O ₂ в увлажненных условиях) CFU-GM: 0,3%-я агаровая среда; как источник КСФ — 10% (об/об) клеточной среды — 5637; CFU-GM, BFU-E, CFU-GEMM: метилцеллюлозная среда с добавлением 1 ед Еро, 10% (об/об) клеточной среды — 5637	Индикация потенци-альных доноров; достигнуто полное приживле-ние у 2-х реципиентов

1	2	3	4	5	6	7	8
б)		$n = 1; 160$ мл	$11,9 \cdot 10^8$	В агаре: $1,5 \cdot 10^5$ колоний, $2,5 \cdot 10^5$ колоний+ +кластеры; в метилцеллюлозе: $1,6 \cdot 10^5$ колоний	BFU-E: $4,0 \cdot 10^5$; CFU-GEMM: $0,4 \cdot 10^5$	То же	
в)		$n = 1; 282$ мл	$46,7 \cdot 10^8$	В агаре: $21 \cdot 10^5$ колоний, $49,3 \cdot 10^5$ колоний+ +кластеры; в метилцеллюлозе: $108,5 \cdot 10^5$ колоний	BFU-E: $38,1 \cdot 10^5$; CFU-GEMM: $12,8 \cdot 10^5$	То же	
г)		$n = 1; 99$ мл	$5,42 \cdot 10^8$	В агаре: $0,22 \cdot 10^5$ колоний, $0,73 \cdot 10^5$ колоний+ +кластеры; в метилцеллюлозе: $0,14 \cdot 10^5$ колоний	BFU-E: $0,03 \cdot 10^5$; CFU-GEMM: $0,01 \cdot 10^5$	То же	Трансплантация не про- изводилась, так как у предполагаемого донора была диагностирована анемия фанкони
4*	[1]	20 мл	Лейкоциты: $(18,7 \pm 5,9) \cdot 10^9/\text{л}$; Мононуклеары: $(0,7 \pm 1,1) \cdot 10^9/\text{л}$	КОЕ-ГМ в 1 мл крови 7728 ± 1058 ; крупные колонии: $(2,84 \pm 1,7)\%$, колонии/кластеры: $(0,9 \pm 0,2)\%$	—	Система: агаровая капля — жидкая среда (7 дней в атмосфере $5-8\% \text{CO}_2$ и 100% влажности); среда: McCoу's — 40 мл, ЭТС — 10%, L-глутамин, пени- циллин-стрептомицин 0,1 на мл среды + тестируемые клетки в концентрации $1 \cdot 10^5$ в 0,3%-м агаре	Состав ПКК при не- осложненной беремен- ности
5	[67]	$n = 1; 89$ мл	Общее количество: $7,1 \cdot 10^8$; $4,9 \cdot 10^7/\text{кг}$ массы реципиента ($m = 14,7$ кг)	$2,7 \cdot 10^4/\text{кг}$ массы реципиента ($m = 14,7$ кг)	CFU-GEMM: $0,6 \cdot 10^4/\text{кг}$ массы реципиента BFU-E: $2,9 \cdot 10^4/\text{кг}$ массы реципиента;	Метилцеллюлозная среда	Трансплантация от HLA- идентичного сиблинга ре- бенку с ювенильной хро- нической миелолейкеми- ей; стабильное лимфо- гемопозитическое восста- новление донорского происхождения

1	2	3	4	5	6	7	8
6	[39]	$n = 1; 44$ мл	$5,46 \cdot 10^8$ клеток или $0,39 \cdot 10^8$ /кг массы реципиента	Всего $2,29 \cdot 10^5$ или $1,6 \cdot 10^4$ /кг массы реципиента	—	—	Трансплантация от HLA-идентичного сиблинга пациентке 2,5 лет с диагнозом: E- β -талассемия; клиническое выздоровление
7	[65]	$n = 1; 80$ мл	$0,34 \cdot 10^8$ /кг массы реципиента ($m = 18$ кг)	$0,6 \cdot 10^4$ /кг массы реципиента ($m = 18$ кг)	—	—	Трансплантация от частично HLA-идентичного сиблинга ребенку с острой лимфобластной лейкемией; достигнуто полное приживание

*Перед определением способности колониеобразования в ПКК выделяли фракцию мононуклеаров в градиенте плотности Ficoll-Paque (плотность 1,077 г/мл)

среднем от 2 до $2,5 \cdot 10^6$) [55], которые ассоциируются с успешным приживлением в ауто- и HLA-идентичных ситуациях трансплантаций КМ, свидетельствует о пригодности образцов ПКК для клинических трансплантаций. Такого количества гемопоэтических клеток может быть достаточно для восстановления кроветворения при условии, что отношение стволовые клетки/клетки-предшественники не на много ниже, чем в КМ [44]. По данным Broxmeyer H. E. et al. [20], Leary A. G., Ogawa M. [43], Hows J. M. et al. [37] концентрация самых ранних гемопоэтических клеток-предшественников, определяемых *in vitro* в этой ткани, одинакова или превосходит концентрацию в КМ взрослого. Известно, что детекция клеток-предшественников *in vitro* сильно зависит от условий культивирования. Так, исследования [20] показали, что добавление к средам культивирования действующего на популяции ранних кроветворных клеток одного цитокина SLF (steel faktor) или в комбинации с другими колониестимулирующими факторами (КСФ) вызывает различную степень детекции миелопролиферирующих клеток (МПК) в ПКК и КМ, что свидетельствует о качественных различиях субпопуляций этих клеток в двух источниках. При оценке содержания МПК в ПКК и КМ взрослых в условиях стимуляции SLF+КСФ оказалось, что увеличение колониеобразующей способности (КОС) КОЕ-ГЭММ в ПКК сочеталось с уменьшением обнаружения БОЕ-Э, в то время как в КМ наблюдалось увеличение КОС и БОЕ-Э, и КОЕ-ГЭММ. Однако при этом увеличения обнаружения КОЕ-ГЭММ и КОЕ-ГМ в КМ были значительно меньше, чем в ПКК при одних и тех же условиях культивирования. Эти результаты предполагают, что большинство БОЕ-Э, обнаруженных в ПКК при других условиях культивирования, могут в действительности быть КОЕ-ГЭММ — возможным индикатором способности самообновления. Таким образом, авторы [20] считают возможным содержание большего количества относительно более молодых (менее зрелых) субпопуляций МПК в ПКК, чем в КМ взрослого.

В дальнейшем для изучения клоногенного и репликационного потенциалов ранних гемопоэтических предшественников из ПКК была использована модель измерения относительной гемопоэтической способности фенотипически определенных популяций — клеток, инициирующих долгосрочную культуру (long-term culture-initiating cells — LTCICs), которые являются аналогами человеческих гемопоэтических клеток с характеристиками стволовых [37, 53]. Так, при измерении потенциала роста клеток ПКК *in vitro* в клоногенных исследованиях были получены результаты, подтверждающие, что ПКК, как и нормальный КМ взрослого, продуцирует множество колоний гемопоэтических клеток, однако при этом обнаруживается более высокая пропорция колоний самых примитивных клеток. В долгосрочных же культурах ПКК такие показатели, как продукция клеток-предшественников и продолжительность жизни культур, были значительно выше для ПКК, чем для КМ взрослого. Гемопоэтические предшественники из ПКК персистируют в долгосрочной культуре дольше, чем из КМ, т.е. способны генерировать более долгосрочный гемопоэз *in vitro* [37].

Позднее эти результаты были дополнены методом сравнительной количественной оценки активностей гемопоэтических стволовых клеток в клинических образцах ПКК, ПК и КМ, а также при исследованиях методом лимитирующих разведений клеток, инициирующих долгосрочную культуру [53]. По данным указанных исследований пропорция LTCICs и в ПКК, и в ПК была либо сходной с КМ, либо даже превышала ее, причем в одинаковой степени

как в стандартной долгосрочной культуре, так и при исследовании лимитирующих разведений, что дало основания авторам сделать вывод, что трансплантационный потенциал стволовых клеток ПКК является по меньшей мере таким же, как соответствующих клеток КМ.

Существенным моментом в получении дополнительной информации о биологии человеческих гемопоэтических стволовых клеток-предшественников было освоение методов их культивирования в модели *in vivo*. Так, Vogtmoor J. et al. [66] предложили экспериментальную систему гемопоэза, вызванного клетками ПКК человека, которая, по их мнению, пригодна для изучения ряда свойств неонатальных гемопоэтических клеток. В данной модели несепарированные или фракционированные клетки ПКК человека трансплантировали сублетально облученным мышам с комбинированным иммунодефицитом (severe combined immunodeficient — SCID). В результате были получены высокие уровни мультилинейного приживления (80%) донорских образцов с экспансией миелоидных и лимфоидных линий. В КМ реципиентов присутствовали в больших количествах мультипотентные и коммитированные предшественники миелоидных и эритроидных линий, были обнаружены незрелые CD34⁺-клетки, у отдельных мышей определялись CD19⁺ В-клетки. Дополнительным подтверждением, что мышинный КМ был репопулирован донорскими клетками-предшественниками, является то, что человеческий гемопоэз поддерживался как минимум до 14 недель. О высокой трансплантатбельности и защитном потенциале ПКК говорит тот факт, что у значительного количества мышей при введении им 1 мл ПКК, содержащей $5 \cdot 10^6$ ядерных клеток, более 50% костномозгового кроветворения было человеческого происхождения. Неонатальные клетки в *in vivo*-модели не нуждались, в отличие от взрослого КМ, в человеческих цитокинах для приживления в мышинном организме. Это интересное наблюдение объясняется либо различиями в реакциях неонатальных и взрослых гемопоэтических клеток на мышинное микроокружение, либо тем, что неонатальные клетки обеспечивают свои собственные цитокины в паракринном виде. Кроме того, феномен независимости гемопоэза из клеток ПКК от факторов роста в SCID-мышинной модели был объяснен более высоким пролиферативным потенциалом этих клеток в сравнении с предшественниками из КМ взрослого.

Таким образом, данные приведенных исследований позволяют считать, что по качеству и количеству гемопоэтических стволовых клеток ПКК не уступает нормальному КМ человека, а по некоторым показателям и превосходит его.

Остается актуальным вопрос о возможности использования как трансплантатбельного гемопоэтического материала не только гетерогенных клеточных субстратов той или иной ткани, но и сепарированных из них кроветворных предшественников [63]. Признано, что примитивные гемопоэтические клетки могут быть отделены от более зрелых с помощью идентификации определенных клеточных молекул на их поверхности [12, 27, 48, 54]. Типичным примером такой структуры может быть открытый в последние годы на гемопоэтических клетках поверхностный гликофосфопротеин — CD34 [41], уровень экспрессии которого максимален на клеточной поверхности самых ранних гемопоэтических клеток. В процессе созревания этих клеток он снижается до неопределяемых показателей [45]. В настоящее время, несмотря на то что функция CD34-фосфогликопротеина еще не определена, CD34-маркер используется как “ярлык” для индикации наличия стволовых/кле-

ток-предшественников в КМ, ПК, ПКК, а также как мишень для иммунологической очистки этих клеток при клинических трансплантациях и генной терапии [16].

Установлено, что фракция $CD34^+$ костномозговых клеток содержит плюрипотентные гемопоэтические клетки с характеристиками стволовых (КОЕ-Смеш, КОЕ-Бласт), способные полностью восстанавливать при миелодепрессии стабильный длительный лимфогемопоэз [12, 16, 27], т. е. включает прекурсоры всех лимфогемопоэтических линий, а также более поздние предшественники (КОЕ-ГМ, КОЕ-М, КОЕ-Г, БОЕ-Э). Исследования *in vitro* показали, что очищенные $CD34^+$ -клетки КМ и ПКК в 10–100 раз обогащены колониеобразующими единицами, при этом самые зрелые унипотентные КОЕ могут также входить и в состав $CD34$ -негативной клеточной фракции [41]. Для окончательного подтверждения того, что $CD34$ -антиген действительно экспрессирован на стволовых гемопоэтических клетках человека, необходимы дальнейшие клинические испытания трансплантатов $CD34^+$ -клеток, в том числе в аллогенных ситуациях. При этом наличие долгосрочного мультилинейного лимфогемопоэза свидетельствовало бы о способности трансплантированных клеток к самообновлению и к мультилинейной дифференциации, что и явилось бы убедительным доказательством их соответствия параметрам стволовых [41]. Получены первые положительные результаты таких трансплантаций [15].

Известно, что для восстановления гемопоэза необходимо, чтобы трансплантат не только содержал клетки с характеристиками стволовых, но и чтобы количество этих клеток было достаточным для реконституции. В настоящее время еще не установлено минимальное количество $CD34^+$ -клеток, необходимых для эффективной клинической трансплантации [41], что зависит от состава $CD34^+$ -популяции, в которую входят как субпопуляция примитивных стволовых клеток, так и более зрелые предшественники. Кроме того, оказалось, что $CD34^+$ фенотипический пул клеток из различных источников (фетальная печень, ПКК, ПК, КМ взрослого) состоит из функционально различных субпопуляций, отличающихся как потенциалом пролиферации, так и ответом на воздействие гемопоэтических цитокинов [46]. Следовательно, для выделения кроветворных клеток из определенной ткани с помощью негативно-позитивных селекционных методик необходимо знать фенотипический состав ее $CD34^+$ -клеток, а также функциональные особенности отдельных их субпопуляций. Такой анализ позволяет отделить более дифференцированные клетки от ранних гемопоэтических предшественников.

Для выделения и подсчета субпопуляций $CD34^+$ гемопоэтических клеток широко используется метод проточной цитометрии [30, 41, 46, 48, 54, 63]. По данным различных авторов, процент $CD34^+$ -клеток в низкоплотной фракции МНК ПКК ниже, чем в аналогичной фракции КМ, а именно: 0,02–1,6% в МНК ПКК и в МНК КМ 1,63–5% [14, 30, 54]. Как и в КМ [29], популяция $CD34^+$ -клеток ПКК состоит из субпопуляций, отличающихся относительными уровнями поверхностной $CD34$ -экспрессии. Высокий уровень экспрессии $CD34$ -антигена ($CD34^{+++}$ или $CD34^{hi}$) проявляют клетки, относящиеся к незрелым гемопоэтическим предшественникам. Так, было обнаружено, что в субпопуляции $CD34^{+++}$ -клеток ПКК колониеформирующими были 91%, а в $CD34^+$ -популяции — только 40% [45]. При этом ни одной колониеобразующей клетки не было выявлено в $CD34$ -негативной популяции, что несколько противоречит утверждению Krause D. S. et al. [41], что

самые зрелые унипотентные КОЕ могут входить в ее состав. Несмотря на относительно меньшее процентное содержание CD34-позитивных МНК в образцах ПКК в сравнении с КМ, около 80% этих клеток имеют высокий уровень экспрессии CD34-антигена, в то время как в КМ таких клеток не более 25%, что, по мнению авторов [30], предполагает более выраженную гемопоэтическую активность этой популяции ПКК. Этот тезис подтверждается результатами сравнения тотальной эффективности клонирования CD34⁺⁺⁺-клеток ПКК и КМ при равных условиях, которая составляет соответственно 88 и 58% [45]. Детальное изучение характеристики CD34⁺⁺⁺-популяции ПКК на уровне отдельной клетки показало высокую их клоногенную и репликационную способность *in vitro* в присутствии сыворотки и широкого спектра таких цитокинов, как фактор роста стволовых клеток (stem cell factor — SCF), известный как kit ligand или mast cell growth factor — MGF, или steel factor — SF (SLF), а также колониестимулирующие факторы: гранулоцитарно-макрофагальный — ГМ-КСФ (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor — GM-CSF), гранулоцитарный — Г-КСФ (granulocyte-CSF — G-CSF), интерлейкин-3 — Ил-3 (interleukin-3 — IL-3) и эритропоэтин — Эпо (erythropoietin — Epo). Считается, что эти клетки эквивалентны мышинным колониеобразующим клеткам с высоким потенциалом пролиферации (high proliferativ potential colony-forming cells — HPP-CFC). Они составляют не менее 50% CD34⁺⁺⁺-популяции клеток-предшественников ПКК. Для сравнения во фракции CD34⁺⁺⁺-клеток КМ выявляется HPP-CFC-подобных клеток только 6,5%. При исследовании способности самообновления HPP-CFC оказалось, что они могут реплицироваться, по крайней мере, в пять отдельных клональных трансферов каждые 21 день культивирования. Интересна морфология этих HPP-CFC: они больших размеров, с большим количеством цитоплазмы, содержат одно или более ядер с несколькими ядрышками. Именно огромная способность к самообновлению HPP-CFC кордовой крови считается одной из причин того, что отдельный образец ПКК (~10⁹ ядерных клеток) успешно приживляется и восстанавливает гемопоэз в организме реципиента [45].

Сам факт экспрессии CD34-антигена и его степень выраженности на кроветворных клетках позволяют реализовать лишь один из этапов каскадного процесса фракционирования суспензий кроветворных тканей. Для распознавания примитивных и более коммитированных предшественников используется также коэкспрессия на CD34⁺-клетках таких антигенов, как Thy-1, панели дифференцировочных (линейноспецифических — lineage-specific — Lin) антигенов: CD2 (Т-лимфоциты), CD14 (моноциты), CD15 (гранулоциты), CD16 (естественные киллеры), CD19 (В-лимфоциты), гликофорин А (эритроидные) и др. [30]. Мононуклеары ПКК, экспрессирующие высокие уровни CD34-антигена при отсутствии дифференцировочных (Lin⁻) антигенов на их поверхности, содержат некоммитированные гемопоэтические клетки [30, 46, 54, 63]. Было обнаружено, что при дополнительной сепарации ПКК, базированной на экспрессии Thy-1 антигена, выделяются Thy-1⁺ колониеформирующие клетки, имеющие более высокий потенциал пролиферации в сравнении с Thy-1-негативными клетками, т. е. CD34^{hi}/Thy-1⁺-популяция является более примитивной, обладающей повышенной гемопоэтической активностью при исследованиях *in vitro* [28, 48]. В частности, Mayani H. et al. [46, 48] показали, что наиболее примитивные гемопоэтические клетки ПКК человека заключены в субпопуляции клеток, имеющих одновременно высо-

кий уровень CD34-экспрессии и низкие или неопределяемые уровни экспрессии CD45RA и CD71 и являющихся при этом Thy-1 положительными. Было обнаружено, что эти клетки ПКК обогащены HPP-CFC, тогда как Thy-1-негативная субпопуляция содержала CFU-Mix. Культивирование CD34⁺/CD45RA^{lo}/CD71^{lo}/Thy-1⁺-клеток в полутвердых или жидких культурах в присутствии анти-Thy-1 антител дало значительное снижение количеств клеток-предшественников (особенно HPP-CFC). Таким образом, в ПКК антиген Thy-1 экспрессирован на примитивных предшественниках с высочайшим потенциалом пролиферации *in vitro*. Предполагают [48], что Thy-1 является поверхностно-клеточной молекулой, вовлеченной в механизм ингибции пролиферации незрелых гемопоэтических клеток, хотя физиологический смысл и характер осуществления этого процесса еще предстоит определить.

Позднее DiGiusto D. L. et al. [30] дополнили этот вывод результатами своих исследований. Они обнаружили, что только клеточные популяции с фенотипом CD34^{hi}/Thy-1⁺/Lin⁻ содержат предшественники с вторичным потенциалом переноса в долгосрочных культурах и, следовательно, все примитивные гемопоэтические стволовые клетки. Поскольку эта популяция имеет в своем составе наибольшее количество примитивных клеток, фенотип CD34^{hi}/Thy-1⁺/Lin⁻ может быть использован как маркер для оценки относительного количества клеток с характеристиками стволовых в образцах ПКК. Более того, среди CD34^{hi}/Lin⁻-популяции можно обнаружить еще 21±13% CD34^{hi}/Lin⁻-клеток, коэкспрессирующих низкие уровни Thy-1 антигена, гемопоэтический потенциал которых при исследованиях в долгосрочной культуре втрое или четверо выше, чем у CD34^{hi}/Lin⁻-клеток. В образце ПКК, содержащем 4·10⁸ мононуклеаров, имеется приблизительно 3,6·10⁶ CD34^{hi}/Lin⁻-клеток и 7·10⁵ CD34^{hi}/Thy-1⁺/Lin⁻-клеток [30].

Одним из возможных вариантов фенотипической идентификации примитивных кроветворных клеток-предшественников в ПКК может быть использование фенотипа CD34⁺CD38⁻. Qian-Lin Hao et al. [54] сравнили способность генерировать неадгезивные и колониеобразующие единицы (colony-forming unit-cells — CFU-C) как CD34⁺CD38⁻-популяций, так и CD34⁺CD38⁺-популяций из ПКК и КМ. Тотальная экспансия неадгезивных клеток была значительно выше в культурах клеток с фенотипом CD34⁺CD38⁻. При этом максимальный пик клеточной экспансии в культурах из CD34⁺CD38⁺-клеток приходился на 30-й день культивирования, в то время как пик экспансии в культурах из клеток с фенотипом CD34⁺CD38⁻ был определен между 60-м и 80-м днями. Продукция CFU-C после 35-го дня культивирования из CD34⁺CD38⁻-популяций была выше, чем из CD34⁺CD38⁺-популяций, а начиная с 40-го дня, отмечалась исключительно в культурах CD34⁺CD38⁻-клеток. В этих культурах наблюдался двухфазный пик продукции CFU-C (на 40–50-й и 60–80-й день) с персистенцией до 80–120 дней культивирования. Авторы исходили из предположения, что гемопоэз в условиях пролонгированных (от 60 до 100 дней) долгосрочных культур (extended long-term culture — E-LTC) инициируется более примитивной субпопуляцией клеток-предшественников (E-LTCIC), чем стандартная LTCIC. Отличительной чертой примитивных CD34⁺CD38⁻-клеток КМ и ПКК является способность продуцировать CFU-C сверх 8 недель. Отсрочка колониеобразования E-LTCIC наводит на мысль о глубоко “пассивной” кле-

точной популяции, которая отвечает на цитокиновую стимуляцию меньше, чем стандартная LTCIC. Кроме того, анализ клеточного цикла с флуоресцентным DNA-красящим 7-аминоактиномицином D показал, что процент $CD34^+$ -клеток, находящихся в цикле (S – G_2 / M фаза), прямо коррелирует с повышением CD38-экспрессии (процент более примитивных $CD34^+CD38^-$ -клеток, находящихся в клеточном цикле, ниже, чем процент находящихся в клеточном цикле $CD34^+CD38^+$ или $CD34^+CD38^{dim(тусклых)}$ -клеток. Как в КМ, так и в ПКК процент клеток, находящихся в S – G_2 / M фазе, повышается с увеличением CD38-антигенэкспрессии.

Таким образом, $CD34^+CD38^-$ -фенотип относится к популяции примитивных клеток как в КМ, так и в ПКК. Вместе с тем очевидны важные функциональные различия $CD34^+CD38^-$ -популяций из этих гемопоэтических тканей. Так, клетки ПКК имеют более высокую эффективность клонирования, однако их культивирование с костномозговой стромой не дает значительного повышения эффективности клонирования, тогда как костномозговых — повышает клоногенную эффективность в 6 раз. $CD34^+CD38^-$ -клетки ПКК быстрее пролиферируют в ответ на цитокиновую стимуляцию и производят за один и тот же промежуток времени приблизительно в 7 раз большее потомство, чем $CD34^+CD38^+$ -клетки КМ, что, по мнению авторов [54], частично обусловлено более высоким процентом гемопоэтических стволовых клеток ПКК, находящихся в клеточном цикле *in vivo*, а также большей способностью покоящихся клеток ПКК отвечать на стимуляцию. Кроме того, несмотря на меньшее процентное содержание $CD34^+$ -моноклеаров в ПКК, чем в КМ, частота их $CD34^+CD38^-$ -клеток сходна (приблизительно 0,05%), очевидно, за счет относительно большей пропорции $CD34^+CD38^-$ -клеток в ПКК. Эти данные свидетельствуют о более высокой частоте некоммутированных стволовых/клеток-предшественников в моноклеарной фракции ПКК, чем в КМ [54].

Необходимо отметить, что работы, ведущиеся в настоящее время в направлениях идентификации клеточных мембранных антигенов, коэкспрессируемых $CD34^+$ -клетками ПКК, а также изучения функциональных особенностей этих клеток, имеют принципиально важное значение. Они позволяют определить состав коктейлей моноклональных антител (МоАт), оптимальных для отбора гемопоэтических клеток с характеристиками "стволовых" именно из этого гемопоэтического источника. Индивидуальность таких исследований для каждой кроветворной ткани определяется еще и тем, что выделенные из нее $CD34^+$ -клетки со сходным фенотипом, по-видимому, могут иметь функциональные особенности. В отличие от фенотипа $CD34^+CD38^-$, который представляет примитивные субпопуляции гемопоэтических предшественников во всех известных источниках кроветворной ткани, HLA-DR-экспрессия на клетках-предшественниках каждого кроветворного источника имеет свои особенности. Так, Huang Sh. и Terstappen L. W. M. M. [38] обнаружили, что в фетальном КМ характерные черты примитивных гемопоэтических стволовых клеток присущи клеткам, имеющим фенотип $CD34^+CD38^-HLA-DR^+$, в то время как только 9% клеток с фенотипом $CD34^+CD38^-HLA-DR^-$ проявляли, наряду с лимфоидным, и миелоидный потенциал пролиферации. По данным Muench O. et al. [51], в фетальной печени стволовые/клетки-предшественники (HPP-CFC), содержащиеся в основном в субпопуляции $CD34^+CD33^+CD38^-$, гетерогенны по HLA-DR экспрессии. Известно, что в

КМ взрослого присутствие стволовых клеток демонстрирует только субпопуляция клеток с фенотипом $CD34^+HLA-DR^-$, но не $CD34^+HLA-DR^+$ субпопуляция [56, 60]. Данные относительно HLA-DR экспрессии на ранних предшественниках из ПКК противоречивы. Согласно одним исследованиям [64], в ПКК $HLA-DR^+$ субпопуляция $CD34^+$ -клеток является более примитивной, чем $CD34^+HLA-DR^-$ -субпопуляция; в то же время существует мнение [63], что малая популяция $CD34^+HLA-DR^-$ -клеток ПКК функционально соответствует $CD34^+HLA-DR^-$ -клеткам КМ, способным формировать клеточные колонии бластов и поддерживать долгосрочный гемопоэз *in vitro*.

Наряду с характеристикой самых ранних $CD34^+$ кроветворных клеток, представляет интерес и идентификация фенотипа фракции $CD34^+$ -мононуклеаров ПКК в целом, содержащая в том числе и коммитированные к определенным линиям дифференциации гемопоэтические клетки-предшественники. Так, Thoma S. J., Lamping Ch. P., Ziegler B. L. [63, 69], используя проточный цитометр, обнаружили на большинстве этих клеток антиген CD38, характерный для плазматических/В-клеток, тимоцитов, активированных Т-клеток, моноцитов; CD18 — лейкоцитарный антиген; HLA-DR — антиген, экспрессируемый иммунокомпетентными Т- и В-клетками, активированными Т-лимфоцитами; CD33 — антиген, определяемый на моноцитах, предшественниках миело-, эритроидных клеток, и идентифицировали малые субпопуляции $CD34^+CD38^-$, $CD34^+CD18^-$, $CD34^+HLA-DR^-$, $CD34^+CD33^-$ -клеток. Значительное количество $CD34^+$ -клеток ПКК экспрессируют CD13 — структуры, представленные на миелоидных клетках-предшественниках, моноцитах, CD45RA — общем антигене Т-клеточных субпопуляций, естественных киллеров (natural killer — NK), В-клеток. На небольшом количестве клеток встречается CD71 — антиген, общий для активированных Т- и В-клеток, макрофагов, ранних эритроидных клеток [63, 69]. Интересно, что большинство клеток, экспрессирующих высокие уровни CD45RA и низкие уровни CD71 ($CD34^+CD45RA^+CD71^{lo}$ -клетки), являются коммитированными предшественниками миелоидной линии дифференциации, в то время как клеточная субпопуляция с фенотипом $CD34^+CD45RA^{lo}CD71^+$ обогащена эритроидными предшественниками; субпопуляция $CD34^+CD45RA^{lo}CD71^{lo}$ частично обогащена мультипотентными предшественниками (~42%) [46, 47]. Данные о коэкспрессии $CD34^+$ -клетками ПКК мембранных антигенов CD13, CD18, CD33, CD45RA, CD71 [63] согласуются с результатами фенотипирования $CD34^+$ -популяций КМ [57]. Кроме того, на небольшом количестве $CD34^+$ -клеток ПКК были идентифицированы такие антигены, как CD36, экспрессируемый на тромбоцитах, моноцитах, ретикулоцитах; CD51, присущий α_v -субъединицам тромбоцитов; и CD61, характерный для структур GP11a (β_3) тромбоцитов, мегакариоцитов [63]. Трехцветный цитометрический анализ показал, что $CD34^+$ -клетки, окрашенные антителами к этим антигенам, могут представлять подгруппы клеток-предшественников эритроидного и/или мегакариоцитарного происхождения. Хотя экспрессия тромбоцитарно-мегакариоцитарных антигенов на гемопоэтических предшественниках все еще остается спорной, было обнаружено, что $CD34^+CD61^+$ -клетки ПКК могут быть самостоятельными предшественниками мегакариоцитов. Малая часть этих клеток несет на себе еще и маркер CD41a. Не исключено, что эти клетки представляют собой мегакариоцитарные предшественники. В то же время тромбоциты экспрессируют CD41b и CD61, а также CD36-антиген, который

обнаруживается на широком круге клеток, включающем ранние эритроидные предшественники, моноциты и тромбоциты/макрофаги. Исходя из сказанного становится очевидным, что вся популяция $CD34^+$ -клеток в целом может быть разделена на субпопуляции и по этим маркерам, т. е. на $CD34^+CD36^+CD61^-$, $CD34^+CD36^-CD61^+$ и $CD34^+CD36^+CD61^+$ -субпопуляции. Отсюда очевидно, что для предотвращения снижения количества $CD34^+$ -клеток при применении негативных селекционных методик не должны использоваться МоАт, направленные против тромбоцитарных антигенов. При анализе фенотипа недостающих звеньев маркеров дифференциации, например CD-2, 5, 7 и некоторых других, был использован чувствительный метод DNA-полимеразной цепной реакции, с помощью которого исследовался *mRNA* — фенотип редких популяций гемопоэтических клеток ПКК [63]. Оказалось, что циркулирующие $CD34^+CD7^+$ -клетки (пре-Т-клетки, НК, тимоциты) и $CD34^+CD19^+$ (В-клетки, пре-В-клетки) могут быть выявлены только этим чувствительным методом, так как ПКК содержит либо очень маленькие количества этих клеток, либо антигенная плотность CD7 и CD19 на $CD34^+$ -клетках ниже лимита чувствительности проточного цитометра.

Такой детальный анализ композиции клеточных мембранных антигенов, ко-экспрессированных на $CD34^+$ -клетках ПКК, позволяет создать набор МоАт, необходимых для исследования пригодности отдельного образца перед клинической трансплантацией в каждом конкретном случае, т. е. поможет определять не только общее количество клеток-предшественников в данном экземпляре, но и процентное содержание клеток, генерирующих популяции жизненно необходимых реципиенту сразу после трансплантации клеток.

Одним из самых важных вопросов, касающихся создания банков ПКК для клинического применения, является проблема достаточности стволовых клеток-предшественников в отдельном экземпляре кордовой крови для восстановления гемопоэза реципиента [13, 18, 55]. Именно разнообразие экземпляров относительно объема и состава клеток-предшественников вызывает необходимость эффективного контроля качественно-количественных параметров каждого образца, предназначенного для клинического применения [13, 20, 36].

Что же влияет на качество образца? Представляет интерес обнаруженная статистически значимая обратная корреляция между общим количеством клеток-предшественников (КОЕ-ГМ, БОЕ-Э) и гестационным возрастом на момент родов [35, 62]. Однако экземпляры, собранные от младенцев с одинаковым гестационным возрастом, также могут быть разнообразны по содержанию клеток-предшественников как качественно, так и количественно. Возможно, что содержание небольшого количества предшественников в этих экземплярах может быть связано, например, с ранней миграцией этих клеток в КМ [62]. Предпринимались попытки сопоставить содержание гемопоэтических клеток в образце с некоторыми акушерскими параметрами: количеством предшествовавших беременностей, родов, полом ребенка и типом родов. При этом корреляции выявлено не было [35, 62]. Имеются сведения об отсутствии влияния на клеточный состав ПКК, а также на количество и пролиферативный потенциал гранулоцитарно-макрофагальных предшественников в ней таких видов патологии беременности, как скорректированная железодефицитная анемия, умеренная форма нефропатии, угроза самопроизвольного прерывания беременности [1]. Замечено, что циркуляция гемопоэтических предшественников ПКК в количественном отношении подчиняется циркадному ритму

(самое низкое их содержание было обнаружено при сборе в родах между 6 и 12 часами) [14]. Существуют различные мнения относительно связи таких показателей, как объем образца и содержание ядерных элементов с количеством клеток-предшественников в нем. Так, по данным бельгийских исследователей Beguin Y. et al. [14], собранный объем и количество нуклеаров коррелирует с количествами $CD34^{+}$ -клеток, КОЕ-ГМ, БОЕ-Э, КОЕ-Смеш, а количество $CD34^{+}$ -клеток и клеток-предшественников зависит почти исключительно от объема и количества лейкоцитов. Однако, по мнению Gluckman E., Thierry D. et al. [35, 62], корреляции между объемом образца и количеством собранных стволовых кроветворных клеток не существует. Авторы считают, что даже в малых экземплярах ПКК может содержаться достаточное для трансплантации количество клеток-предшественников. Что касается соотношения ядерных и гемопоэтических клеток в образце, то в работе Aueg-bach A. D. et al. [13] приведены данные, свидетельствующие об отсутствии прямой зависимости между этими показателями. При оценке пригодности образцов для трансплантации с точки зрения наличия в них минимального содержания $2 \cdot 10^3$ КОЕ-ГМ на килограмм массы реципиента Gluckman E. et al. [35] было подсчитано, что около 90% образцов пригодны для трансплантации ребенку, при этом 49% из них содержат достаточное количество клеток для приживления взрослому весом более 50 кг; 10% образцов не могут быть использованы из-за недостаточного количества клеток. Однако только опыт клинических трансплантаций может дать окончательный ответ на вопросы: достаточно ли одного образца ПКК для восстановления гемопоэза у взрослого пациента с депрессией кроветворения, а также насколько быстро и стабильно протекает такое восстановление [20, 36, 44]. Характер и особенности проявления механизма реализации “защитного потенциала” образцов ПКК будут зависеть от исходного состояния лимфогемопоэтического комплекса реципиента с возможным приживлением и полной компенсацией апластического состояния до костимулирующего эффекта при частичных повреждениях системы.

Первая трансплантация ПКК была произведена в октябре 1988 г. [34]. Накоплен опыт уже около 300 таких трансплантаций пациентам с различными видами патологии. Хотя большинство реципиентов были детьми, имеются результаты удачных трансплантаций ПКК пациентам, имеющим вес до 80 кг, среди них есть взрослые в возрасте до 45 лет [18]. Опыт таких трансплантаций свидетельствует, что гемопоэтические клетки ПКК могут восстанавливать стабильный гемопоэз в организме реципиента, хотя приживление протекает медленнее, чем при введении клеток КМ. При этом важно, что болезнь “трансплантат против хозяина” протекает слабее, чем при пересадке донорских клеток КМ [33, 34, 39, 65, 67]. Следовательно, ПКК имеет достаточный потенциал для трансплантаций гемопоэтических клеток, в том числе и пациентам, нуждающимся в такой терапии, но не имеющим подходящих доноров КМ [55].

Так как сбор ПКК производится только в момент родов, процедуру взятия повторить не возможно. В связи с тем, что далеко не все экземпляры имеют достаточное количество стволовых/клеток предшественников для восстановления гемопоэза у пациентов весом более 40 кг [33], постоянно ведутся исследования в направлении изыскания альтернативных возможностей дополнения уже имеющегося в наличии образца.

Получили поддержку технологии увеличения количества и степени пролиферации примитивных гемопоэтических клеток в системе *in vitro*. Обогащение образцов клетками-предшественниками и их экспансия осуществляются под воздействием цитокинов, что позволяет при необходимости получить достаточное для трансплантации количество клеток [33]. Современными подходами к экспансии гемопоэтических клеток *ex vivo* являются: технологии инкубации очищенных примитивных гемопоэтических клеток (CD34 положительных) в жидких культурах с комбинациями высоких доз цитокинов, а также долгосрочные перфузионные культуры нефракционированных популяций гемопоэтических клеток [33]. Экспансия с помощью факторов роста [46, 50], долгосрочные культуры часто приводят к истощению гемопоэтического потенциала [68]. Добавление к культуре высоких доз цитокинов вызывает пролиферацию и дифференциацию больших количеств ранних предшественников, находящихся в CD34⁺-популяции, тем самым сильно расширяя пулы более дифференцированных клеток. Не известно, поддерживает ли какая-либо из применяемых технологий культивирования человеческих гемопоэтических клеток *ex vivo* амплификацию пула самых примитивных кроветворных клеток [33]. Работы в области исследований гемопоэтического потенциала ПКК позволяют предположить, что с помощью этих технологий все же возможно расширение пулов ее наиболее примитивных клеток-предшественников, причем, по-видимому, в большей степени, чем аналогичных клеток КМ или ПК, так как стволовые/клетки-предшественники ПКК обладают более высоким потенциалом пролиферации, а также повышенной способностью к самообновлению [20, 21, 23, 26, 33, 37, 45, 48]. Однако результаты влияния таких манипуляций на гемопоэтический потенциал ПКК изучены еще не достаточно.

Гемопоэз, как известно, контролируется семейством гемопоэтических факторов роста, которые регулируют пролиферацию и дифференциацию гемопоэтических клеток различной степени зрелости [9, 17, 49]. Среди работ по выявлению влияния цитокинов на физиологию гемопоэтических предшественников ПКК следует упомянуть исследование Abe T. et al. [10], изучавших эффекты воздействия различных концентраций рекомбинантного эритропоэтина (Эпо) на примитивные предшественники ПКК в долгосрочных культурах типа "Dexter". По их результатам Эпо, взаимодействуя с цитокинами стромальных клеток КМ, может играть важную роль в поддержании и пролиферации незрелых стволовых/клеток-предшественников. Исследования действия на субпопуляции миелоидных и эритроидных предшественников из CD34⁺-клеток ПКК таких цитокинов, как фактор роста стволовых клеток (MGF), Ил-6, Ил-3, Эпо, ГМ-КСФ/Ил-3 смешанный протеин — СП (GM-CSF/Il-3 fusion protein — FP), М-КСФ (macrophage-CSF), Г-КСФ (G-CSF) были выполнены Mayani H. et al. [46]. Перечисленные цитокины применялись в комбинациях, воздействующих преимущественно либо на эритропоэз, либо на миелопоэз, вызывая, как и в культуре КМ, модуляцию пролиферации и ускоренную дифференциацию предшественников. Не исключено, что для стволовых клеток ПКК существуют специфические наборы цитокинов-стимуляторов. Так, Charboro P. et al. [24] обнаружили для ПКК синергичный эффект действия Ил-3 и факторов плазмы человека, применение которых стимулировало колониеобразование и увеличивало размеры колоний в культуре. Синергичный эффект действия фактора роста и развития мегакариоцитов (megakaryocyte growth and development factor — MGDF), Ил-3 и фактора

стволовых клеток (SCF) проявляется в стимуляции способности ранних предшественников мегакариоцитов ПКК пролиферировать в суспензионной культуре в течение трех недель [52]. Добавление SCF к культуре ПКК, содержащей Ил-3, Г-КСФ, ГМ-КСФ и Эпо, значительно стимулирует рост КОЕ-ГЭММ и КОЕ-ГМ [11]. Об этом свидетельствуют и результаты исследований [20] воздействия на МПК кордовой крови только SCF и в комбинации с одним из перечисленных выше цитокинов. Инкубация клеток ПКК в течение 7 дней в суспензионной культуре с одним SCF вызывала увеличение КОЕ-ГМ в 7,9, БОЕ-Э — в 2,2, КОЕ-ГЭММ — в 2,7 раза. Этот эффект еще больше усиливался при добавлении второго цитокина. Сопоставляя эти данные с результатами Durand B. et al. [32] о том, что примитивные клетки ПКК ведут себя как факторзависимые от Ил-3 и SCF клеточные линии, мы находим подтверждение функциональной взаимозависимости от продуцируемых медиаторов стволовых элементов и клеток кроветворного микроокружения. Об этом свидетельствуют исследования DiGiusto D. L. et al. [30], в которых обращено внимание на возможность поддержания продукции клеток ПКК с характеристиками стволовых путем культивирования очищенных $CD34^{hi}/Lin^{-}$ -клеток в жидкой культуре в присутствии смеси цитокинов (20 нг/мл Ил-3, 20 нг/мл Ил-6, 50 нг/мл SCF) в течение 7 дней. Полученные в результате культивирования клетки были трансплантированы SCID-мышам с имплантированной человеческой гемопоэтической тканью для оценки трансплантационного потенциала этих клеток. Данная модель содержала элементы конкуренции трансплантированных гемопоэтических клеток ПКК с клетками-предшественниками в организме хозяина, роль которых выполняли клетки фетальных тканей человека (либо тимуса и аутологичной печени, либо КМ), заблаговременно подсаженные мышам. При этом было отмечено, что введения адекватных количеств гемопоэтических клеток ПКК, полученных в результате культивирования *in vitro*, были так же эффективны, как и трансплантации некультивированных клеток. В эксперименте использовались транспланты, содержащие как минимум 10^4 $CD34^{hi}/Lin^{-}$ -клеток. Тем самым было продемонстрировано, что не исключена возможность экспансии пула примитивных клеток ПКК в *ex vivo*-культурах без истощения их восстановительного, т. е. трансплантационного потенциала. Таким образом, мультипотентные предшественники ПКК могут быть до некоторой степени подвержены экспансии без значительных утрат потенциала приживления *in vivo*.

Накопленный опыт исследований в области изучения распространения трансплантабельных клеток ПКК с помощью цитокинов дает основание надеяться на положительные клинические результаты. Однако при использовании данных технологий требуется значительная осторожность. По мнению некоторых авторов [9], высокие концентрации факторов роста могут приводить к необратимым изменениям свойств стволовых кроветворных клеток, в частности, к неуправляемой дифференцировке. Не исключено, что такие изменения (или их отсутствие) могут обуславливаться характером образца ПКК, культивируемого с суперконцентрациями цитокинов *ex vivo*, и, в частности, тем, какова степень изоляции стволовых элементов от регуляторных факторов их микроокружения. Тем не менее многие исследователи все же склонны видеть в использовании унилинейных и мультилинейных гемопоэтических факторов роста как *ex vivo*, так и *in vivo* будущее трансплантаций гемопоэтических клеток ПКК [20, 30, 33, 35].

Среди работ по изучению потенциала гемопоэтического микроокружения самой ПКК обращает внимание исследование [23], в котором приводятся сравнительные данные о потенциале реплицирования мультипотентных клеток-предшественников КОЕ-ГЭММ ПКК *in vitro* при добавлении различных факторов роста: Эпо, SLF и фетальной бычьей сыворотки (ФБС) или же с использованием только плазмы ПКК. Обнаружено значительное увеличение репликационной эффективности этих клеток, а именно увеличения количества клеток из отдельной первичной КОЕ-ГЭММ колонии при добавлении к культурам плазмы ПКК. Другими словами, добавление к культуре плазмы ПКК вызвало увеличение количества вторичных колоний клеток-предшественников КОЕ-ГЭММ в первичной колонии и их размеров. Напротив при добавлении плазмы ПК взрослого, а также среды, кондиционированной клетками эндотелия кордовой вены (endotelial cell-conditioned medium — ЕССМ), ФБС+ЕССМ или ФБС + комбинация цитокинов: Ил-1, Ил-3, Ил-6, Ил-11+Г-КСФ, ГМ-КСФ, такого эффекта не наблюдалось. Присутствие в первичных культурах исключительно ЕССМ или же комбинации ФБС+ЕССМ сопровождалось увеличением колонисобразования КОЕ-ГМ и КОЕ-ГЭММ. Выдвинуто предположение, что в микроокружении пупочной корды присутствует смесь факторов роста, которая способна воздействовать на потенциал репликации субпопуляции стволовых клеток. Интересен факт отсутствия увеличения экспансии кроветворных предшественников при добавлении во вторичную культуру ЕССМ, поскольку известно, что эндотелиальные клетки как составная часть гемопоэзиндуцирующего микроокружения [5] высвобождают множество факторов роста, среди них — стволовой клеточный фактор, известный как *c-kit ligand*, который стимулирует рост примитивных гемопоэтических клеток [42], содержащих *c-kit*-рецептор. Результаты исследований [17] показывают, что эндотелиальные клетки пупочной вены человека продуцируют как трансмембранную, так и растворимую формы SCF и его рецептор *c-kit*, с которым связана индукция роста примитивных гемопоэтических клеток. Продукция растворимого *c-kit*-рецептора предполагает возможность модулирования эндотелиальными клетками локальной SCF-биоактивности. Сопоставление результатов [23] и данных относительно цитокинпродуцирующей активности эндотелиальных клеток корды еще раз подчеркивает значимость сбалансированного содержания регуляторных цитокинов в проявленной функциональной активности стволовой клетки.

Среди работ по изучению причин относительной независимости гемопоэтических предшественников из ПКК от влияния экзогенных факторов роста следует упомянуть исследования Schibler K. R. et al. [58]. В культуральной среде, содержащей гемопоэтические предшественники ПКК, удалось обнаружить продуцируемые этими клетками ГМ-КСФ и Ил-3. Авторы считают, что такая находка объясняет, по-видимому, некоторые из уникальных характерных черт роста *in vitro* этих клеток.

При рассмотрении ПКК как источника гемопоэтических клеток для трансплантации необходимо коснуться взаимодействия аксессуарных клеток ПКК и клеток-предшественников из этой ткани, ибо ПКК как потенциальный трансплантат становится объектом криоконсервирования. Известно, что функциональная полноценность миелотрансплантата определяется, кроме сохранности кроветворных предшественников, в значительной степени и сохранностью клеток кроветворного микроокружения [2, 3]. Необходимость в непосредственном межклеточном взаимодействии кроветворных и аксессуарных клеток

для увеличения количества колоний наблюдали Ciccuttini F. M. et al. [25]. В системе двойных культур они установили взаимодействия между очищенными $CD34^+$ -клетками и изолированными НК-, Т-клетками ($CD3^+$), моноцит/макрофагами ($CD14^+$) из ПКК в различных комбинациях. При этом повышение количества эритроидных предшественников наблюдалось при сокультивировании $CD34^+$ -клеток с НК-клетками, а одновременное увеличение как эритроидных, так и незритроидных колониеобразующих клеток — при сокультивировании $CD34^+$ -клеток либо с Т-клетками, либо с моноцит/макрофагами.

Таким образом, анализ представленных в первой части статьи работ дает основание считать, что кордовая кровь человека обладает достаточным для клинического применения запасом кроветворных предшественников разной степени дифференцировки, т. е. трансплантационным потенциалом. Содержащиеся в ПКК гемопоэтические клетки-предшественники имеют функциональные особенности, связанные с природой этих клеток, а именно с их промежуточным положением на ступенях иерархии онтогенетического созревания кроветворной системы от желточного мешка до костного мозга ребенка. В настоящее время ученые-экспериментаторы и клиницисты рассматривают ПКК человека как особо перспективный для трансплантаций источник гемопоэтических клеток. Свобода заготовки наряду с богатым содержанием клеток-предшественников с характеристиками стволовых, а также относительно низкая иммунореактивность — основные преимущества, которые выгодно выделяют ПКК человека в ряду других источников кроветворной ткани при клиническом применении. О специфике иммунных взаимодействий ПКК с организмом реципиента будет сообщено в следующей части статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеев И. В., Волюнец М. Д., Владимирская Е. Б. и др. Клеточный состав пуповинной крови при патологической и неосложненной беременности // Гематология и трансфузиология. — 1996. — 41, № 2. — С. 16–18.
2. Гольцев А. Н., Луценко Е. Д. Криоконсервирование как возможный метод оценки роли компонентного состава миелотрансплантата в проявлении функциональной активности кроветворных клеток // Пробл. криобиологии. — 1994. — № 1. — С. 3–13.
3. Гольцев А. Н., Останкова Л. В., Луценко Е. Д., Дубрава Т. Г. Функциональная активность криоконсервированных кроветворных клеток (KOE_c) в зависимости от компонентного состава миелотрансплантата // Пробл. криобиологии. — 1993. — № 4. — С. 34–39.
4. Грищенко В. И., Лобынцева Г. С., Вотякова И. А., Шерешков С. И. Гемопоэтические клетки эмбриональной печени (эмбриогенез, трансплантация и криоконсервирование). — Киев: Наук. думка, 1988. — 192 с.
5. Дыгай А. М., Шахов В. П. Роль межклеточных взаимодействий в регуляции гемопоэза. — Томск: Изд-во Том. ун-та, 1989. — 224 с.
6. Моисеев С. И., Козер П., Принот О. и др. Опыт применения различных методов сепарации и криоконсервирования костного мозга в центрах трансплантации костного мозга регионального госпиталя г. Больцано (Италия) и института гематологии и переливания крови Санкт – Петербурга // Терапевтический архив. — 1994. — 66, № 7. — С. 21–25.
7. Окунев Б. Б., Афанасьев Б. В. Иммунологические аспекты трансплантации костного мозга // Вопросы онкологии. — 1992. — 38, № 4–6. — С. 387–396.
8. Торубарова Н. А., Кошэль И. В., Яцык Г. В. Кроветворение плода и новорожденного. — М.: Медицина, 1993. — 208 с.
9. Чертков И. Л. Нормальное кроветворение: стволовая кроветворная клетка // Гематология и трансфузиология. — 1993. — № 4. — С. 3–4.
10. Abe T., Takaue Y., Kawano Y., Kuroda Y. Effect of recombinant erythropoietin in interaction with stromal factors on cord blood hematopoiesis // Blood. — 1996. — 87, № 8. — P. 3212–3217.

11. Almici C., Carlo-Stella C., Wagner J. E., Rizzoli V. Density separation and cryopreservation of umbilical cord blood cells: evaluation of recovery in short- and long-term cultures // *Acta Haematologica*. – 1996. – 95, № 3–4. – P. 171–175.
12. Andrews R. G., Bryant E. M., Bartelmez S. H. et al. CD34⁺ marrow cells, devoid of T and B lymphocytes, reconstitute stable lymphopoiesis and myelopoiesis in lethally irradiated allogeneic baboons // *Blood*. – 1992. – 80, № 7. – P. 1693–1701.
13. Auerbach A. D., Liu Q., Pollack M. S. et al. Prenatal identification of potential donors for umbilical cord blood transplantation for Fanconi anemia // *Transfusion*. – 1990. – 30, № 8. – P. 682–687.
14. Beguin Y., Cornu G., Brichard B. et al. Belgian cord blood banking project: hematological results and practical issues // *Blood*. – 1995. – 86, № 10 (suppl. 1). – P. 116a.
15. Bensinger W. T., Buckner C. D., Shannon-Dorcy R. et al. Transplantation of allogeneic CD34⁺ peripheral blood stem cells in patients with advanced hematologic malignancy // *Blood*. – 1996. – 88, № 11. – P. 4132–4138.
16. Berenson R. J., Bensinger W. J., Hill R. S. et al. Engraftment after infusion of CD34⁺ marrow cells in patients with breast cancer or neuroblastoma // *Blood*. – 1991. – 77, № 8. – P. 1717–1722.
17. Broudy V. C., Kovach N. L., Bennett L. G. et al. Human umbilical vein endothelial cells display high-affinity c-kit receptors and produce a soluble form of the c-kit receptor // *Blood*. – 1994. – 83, № 8. – P. 2145–2152.
18. Broxmeyer H. E. Placental cord blood for clinical bone marrow transplantation // *The 33rd Annual Meeting of the Society for Cryobiology*. – Indianapolis, Indiana, USA, 1996. – P. 4.
19. 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. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1989. – 86. – P. 3828–3832.
20. Broxmeyer H. E., Hangoc G., Cooper S. et al. Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1992. – 89. – P. 4109–4113.
21. Broxmeyer H. E., Kurtzberg J., Gluckman E. et al. Umbilical cord blood hematopoietic stem and repopulating cells in human clinical transplantation // *Blood Cells*. – 1991. – 17, № 2. – P. 313–329.
22. Campos L., Roubi N., Guyotat D. Definition of optimal conditions for collection and cryopreservation of umbilical cord hematopoietic cells // *Cryobiology*. – 1995. – 32, № 6. – P. 511–515.
23. Carow C. E., Hangoc G., Broxmeyer H. E. Human multipotential progenitor cells (CFU-GEMM) have extensive replating capacity for secondary (CFU-GEMM): An effect enhanced by cord blood plasma // *Blood*. – 1993. – 81, № 4. – P. 942–949.
24. Charboro P., Newton L., Schaal J. P., Herve P. The separation of human cord blood by density gradient does not induce a major loss of progenitor cells // *Fetal Liver Transplantation*. – 1992. – Suppl. – P. 109–110.
25. Cicuttini F. M., Loudovaris M., Boyd A. W. Interactions between purified human cord blood haemopoietic progenitor cells and accessory cells // *Br. J. Haematol.* – 1993. – 84, № 1. – P. 365–373.
26. Cicuttini F. M., Martin M., Salvaris E. et al. Support of human cord blood progenitor cells on human stromal cell lines transformed by SV40 large T antigen under the influence of an inducible (metallothionine) promoter // *Blood*. – 1992. – 80, № 1. – P. 102–112.
27. Civin C. I., Strauss L. C., Brovall C. et al. Antigenic analysis of hematopoiesis 111. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-la cells // *J. Immunol.* – 1984. – 133, № 1. – P. 157–165.
28. Craig W., Key R., Culter R. L., Lansdorp P. M. Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells // *J. Exp. Med.* – 1993. – 177, № 5 – P. 1331–1342.
29. DiGiusto D., Chen S., Combs J. et al. Human fetal bone marrow progenitors for T, B, and myeloid cells are found exclusively in the population expressing high levels of CD34 // *Blood*. – 1994. – 84, № 2. – P. 421–432.
30. DiGiusto D. L., Lee R., Moon J. et al. Hematopoietic potential of cryopreserved and *ex vivo* manipulated umbilical cord blood progenitor cells evaluated *in vitro* and *in vivo* // *Blood*. – 1996. – 87, № 4. – P. 1261–1271.
31. Douay L., Gorin N. C., Mary J. J. et al. Recovery of CFU-GM from cryopreserved marrow and *in vivo* evaluation after autologous bone marrow transplantation are predictive of engraftment // *Exp. Hematol.* – 1986. – 14. – P. 358–365.
32. Durand B., Migliaccio G., Yee N. S. et al. Long-term generation of human mast cells in serum-free cultures of CD34⁺ cord blood cells stimulated with stem cell factor and interleukin-3 // *Blood*. – 1994. – 84, № 11. – P. 3667–3674.
33. Emerson S. G. *Ex vivo* expansion of hematopoietic precursors, progenitors, and stem cells: the next generation of cellular therapeutics // *Blood*. – 1996. – 87, № 8. – P. 3082–3088.
34. Gluckman E., Broxmeyer H. E., Friedman H. S., Auerbach A. D. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical cord blood from an HLA-identical sibling // *New Engl. J. Med.* – 1989. – 321, № 7. – P. 1174–1189.

35. Gluckman E., Devergie A., Thierry D. et al. Clinical applications of stem cell transfusion from cord blood and rationale for cord blood banking // *Fetal Liver Transplantation*. – 1992. – Suppl. – P. 114–117.
36. Gluckman E., Traineau R., Brossard Y. et al. Placental cord blood banking and transplant // *Blood*. – 1995. – 86, № 10 (suppl. 1). – P. 389a.
37. Hows J. M., Bradley B. A., Marsh J. C. W. et al. Growth of human umbilical-cord blood in longterm haematopoietic cultures // *Lancet*. – 1992. – 340. – P. 73–76.
38. Huang Sh., Terstappen L. W. M. M. Lymphoid and myeloid differentiation of single human CD34⁺, HLA-DR⁺, CD38[–] hematopoietic stem cells // *Blood*. – 1994. – 83, № 6. – P. 1515–1526.
39. Issaragrisil S., Visuthisakchai S., Suvatte V. et al. Brief report: transplantation of cord-blood stem cells into a patient with severe thalassemia // *New Engl. J. Med.* – 1995. – 332, № 6. – P. 367–369.
40. Korbiling M., Champlin R. Peripheral blood progenitor cell transplantation: A replacement for marrow auto- or allografts // *Stem Cells*. – 1996. – 14, № 2. – P. 185–195.
41. Krause D. S., Fackler M. J., Civin C. J., May W. S. CD34: structure, biology, and clinical utility // *Blood*. – 1996. – 87, № 1. – P. 1–13.
42. Langley K. E., Bennett L. G., Wypych J. et al. Soluble stem cell factor in human serum // *Blood*. – 1993. – 81, № 3. – P. 656–660.
43. Leary A. G., Ogawa M. Blast cell colony assay for umbilical cord blood and adult bone marrow progenitors // *Blood*. – 1987. – 69, № 3. – P. 953–955.
44. Linch D. S., Brent L. Can cord blood be used? // *Nature*. – 1989. – 340, № 6236. – P. 676.
45. Lu L., Xiao M., Shen R. – N. et al. Enrichment, characterization, and responsiveness of single primitive CD34⁺⁺⁺ human umbilical cord blood hematopoietic progenitors with high proliferative and replating potential // *Blood*. – 1993. – 81, № 1. – P. 41–48.
46. Mayani H., Dragowska W., Lansdorp P. M. Characterization of functionally distinct subpopulations of CD34⁺ cord blood cells in serum free long term cultures supplemented with hematopoietic cytokines // *Blood*. 1993. – 82, № 9. – P. 2664–2672.
47. Mayani H., Dragowska W., Lansdorp P. M. Cytokine-induced selective expansion and maturation of erythroid versus myeloid progenitors from purified cord blood precursor cells // *Blood*. – 1993. – 81, № 12. – P. 3252–3258.
48. Mayani H., Lansdorp P. Thy-1 expression is linked to functional properties of primitive hematopoietic progenitor cells from human umbilical cord blood // *Blood*. – 1994. – 83, № 9. – P. 2410–2417.
49. Metcalf D. The molecular control of blood forming cells // *Nature*. – 1989. – 339, № 6219. – P. 27–30.
50. Migliaccio G., Migliaccio A. R., Druzin M. L. et al. Long term generation of colony forming cells in liquid culture of CD34⁺ cord blood cells in the presence of recombinant human stem cell factor // *Blood*. – 1992. – 79, № 10. – P. 2620–2627.
51. Muench M. O., Cupp J., Polakoff J. et al. Expression of CD33, CD38, and HLA-DR on CD34⁺ human fetal liver progenitors with a high proliferative potential // *Blood*. – 1994. – 83, № 11. – P. 3170–3181.
52. Olson T. A., Borchers J., Kotur M. et al. The effect of megakaryocyte growth and development factor on human cord blood megakaryocyte precursors // *Blood*. – 1995. – 86, № 10 (suppl 1). – P. 905a.
53. Pettengell R., Luft T., Henschler R. et al. Direct comparison by limiting dilution analysis of long-term culture-initiating cells in human bone marrow, umbilical cord blood, and blood stem cells // *Blood*. – 1994. – 84, № 11. – P. 3653–3659.
54. Qian – Lin Hao, Shah A. J., Thiemann F. T. et al. A functional comparison of CD34⁺CD38[–] cells in cord blood and bone marrow // *Blood*. – 1995. – 86, № 10. – P. 3745–3753.
55. Rubinstein P., Rosenfield R. E., Adamson J. W., Stevens C. E. Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution // *Blood*. – 1993. – 81, № 7. – P. 1679–1690.
56. Rusten L. S., Jacobsen S. E. W., Kaalhus O. et al. Functional differences between CD38[–] and DR[–] subfractions of CD34⁺ bone marrow cells // *Blood*. – 1994. – 84, № 5. – P. 1473–1481.
57. Saeland S., Duvert V., Caux C. et al. Distribution of surface-membrane molecules on bone marrow and cord blood CD34⁺ hematopoietic cells // *Exp. Hematol.* – 1992. – 20, № 1. – P. 24–33.
58. Schibler K. R., Li Y., Ohls R. K. et al. Possible mechanisms accounting for the growth factor independence of hematopoietic progenitors from umbilical cord blood // *Blood*. – 1994. – 84, № 11. – P. 3679–3684.
59. Siena S., Bregni M., Brando B. et al. Circulation of CD34⁺ hematopoietic stem cells in the peripheral blood of high-dose cyclophosphamide-treated patients: enhancement by intravenous recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor // *Blood*. – 1989. – 74, № 6. – P. 1905–1914.
60. Srour E. F., Brandt J. E., Briddell R. A. et al. Human CD34⁺HLA-DR[–] bone marrow cells contain progenitor cells capable of self-renewal, multilineage differentiation, and long-term *in vitro* hematopoiesis // *Blood Cells*. – 1991. – 17, № 2. – P. 287–295.

61. Tavassoli M. Embryonic and fetal hemopoiesis: An overview // *Blood Cells*. – 1991. – 17, № 2. – P. 269–281.
62. Thierry D., Hervatin F., Traineau R. et al. Hematopoietic progenitors cells in cord blood // *Fetal Liver Transplantation*. – 1992. – Suppl. – P. 101–104.
63. Thoma S. J., Lamping C. P., Ziegler B. L. Phenotype analysis of hematopoietic CD34⁺ cell populations derived from human umbilical cord blood using flow cytometry and cDNA-polymerase chain reaction // *Blood*. – 1994. – 83, № 8. – P. 2103–2114.
64. Traycoff C. M., Abboud M. R., Laver L. et al. Evaluation of the *in vitro* behavior of phenotypically defined populations of umbilical cord blood hematopoietic progenitor cells // *Exp. Hematol.* – 1994. – 22. – P. 215–222.
65. Vilmer E., Sterkers G., Rahimy C. et al. HLA-mismatched cord blood transplantation in a patient with advanced leukemia // *Transplantation*. – 1992. – 53, № 5. – P. 1155–1157.
66. Vormoor J., Lapidot T., Pflumio F. et al. Immature human cord blood progenitors engraft and proliferate to high levels in severe combined immunodeficient mice // *Blood*. – 1994. – 83, № 9. – P. 2489–2497.
67. Wagner J. E., Broxmeyer H. E., Byrd R. L. et al. Transplantation of umbilical cord blood after myeloablative therapy: analysis of engraftment // *Blood*. – 1992. – 79, № 7. – P. 1874–1881.
68. Williams D. A. *Ex vivo* expansion of hematopoietic stem and progenitor cells: Robbing Peter to pay Paul // *Blood*. – 1993. – 81, № 12. – P. 3169–3172.
69. Ziegler B. L., Thoma S. J., Lamping Ch. P. et al. Surface antigen expression on CD34⁺ cord blood cells: comparative analysis by flow cytometry and limiting dilution (LD) RT-PCR of chymopapain-treated or untreated cells // *Cytometry*. – 1996. – 25, № 1. – P. 46–57.

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

Поступила 15.12.97

А. М. ГОЛЬЦЕВ, Т. О. КАЛИНИЧЕНКО

ПУПОВИННА КОРДОВА КРОВ ЛЮДИНИ ЯК ДЖЕРЕЛО ГЕМОПОЕТИЧНИХ КЛІТИН ДЛЯ КЛІНІЧНОГО ЗАСТОСУВАННЯ. ЧАСТИНА I. ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕМОПОЕТИЧНОГО ПОТЕНЦІАЛУ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

На основі даних літератури з експериментальних та клінічних досліджень трансплантаційного потенціалу пуповинної кордової крові людини проаналізовано особливості якісних і кількісних параметрів гемопоетичних клітин та біології цієї кровотворної тканини в цілому. Розглядаються особливості кількісного вмісту стовбурових і комітованих кровотворних попередників у кордовій крові, їх функціональний статус, зокрема, проліферативний потенціал, який був досліджений у системах *in vitro* та *in vivo*. Значну увагу приділено оцінці одного з найважливіших кровотворних елементів — CD34⁺-клітин, властивостей окремих його субпопуляцій, вмісту у порівняльному аспекті з іншими кровотворними тканинами.

Аналізуються проблема можливості та ефективності використання кордової крові для поновлення імуногемопоезу у підлітків та дорослих, імунологічні аспекти особливостей взаємодії цієї тканини з організмом реципієнта. Наведені дані про ліганд-рецепторні взаємодії регуляторних цитокінів з мембранними структурами кровотворних елементів кордової крові та можливості їх експансії під впливом медіаторів *ex vivo*, зміни трансплантабельності та характеру кооперативних взаємодій з кровотворним мікрооточенням.

Значне місце в загальному аналізі біологічних властивостей кордової крові займає розділ, який відноситься до проблеми її довгострокового зберігання. У порівняльному аспекті розглядається можливість використання різних технологій консервування матеріалу (умов збирання, зберігання перед консервуванням, використання сепараційних процедур, програм кріоконсервування та ін.), які забезпечують збереження основних структурно-функціональних параметрів мононуклеарів кордової крові.

A. N. GOLTSEV, T. A. KALINICHENKO

HUMAN UMBILICAL CORD BLOOD AS A SOURCE OF HEMOPOIETIC CELLS FOR CLINICAL APPLICATION. PART I. NATURE OF HEMOPOIETIC POTENTIAL

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

The qualitative and quantitative distinguishing features of hemopoietic cells of human umbilical cord blood and biology of this tissue as a whole were analyzed on the basis of scientific reports available on

experimental and clinical studies of the transplantation potential of the umbilical cord blood. The given research deals with the problems, related to distinguishing features of the quantitative content of stem and committed hemopoietic progenitor cells in cord blood, their functional status, proliferative potential, in particular, which was evaluated in the system in vivo and in vitro. Particular attention was paid to one of the major hemopoietic elements — CD34⁺-cells, evaluation of properties of its separate subpopulations, and content as compared with other hemopoietic tissues. The authors speculate on the chances of effective application of cord blood for immune hemopoietic recovery in juveniles and adults, and on the immunologic aspects of specific features of interaction of this tissue with the recipient organism. Besides, the given report submit the data, related to ligand-receptor interactions of regulatory cytokines with membrane structures of hemopoietic elements of cord blood, and their possible mediator-induced expansion ex vivo, changes in transplantability and nature of cooperative interactions with hemopoietic microenvironment. A particular place in a general analysis of biological properties of cord blood is occupied by a section, dealing with the problem of its long-term storage. A comparative analysis of possible application of various technologies for cryopreservation of materials (conditions of harvesting, storage prior to preservation, application of separation procedures, programmes of cryopreservation, etc.) is done.

УДК [599.32:591.54]+57.085+57.043

О.Н.Емец*, В.Н.Воронков, Т.Н.Пашовкин, П.И.Пахотин

**СРЕЗЫ ГИППОКАМПА БОДРСТВУЮЩИХ
И ГЛУБОКОСПЯЩИХ СУСЛИКОВ *CITELLUS UNDULATUS*
ОДИНАКОВО СПОСОБНЫ ВОССТАНАВЛИВАТЬ НЕЙРОННУЮ
АКТИВНОСТЬ ПОСЛЕ ТРАВМАТИЧЕСКОГО ШОКА В
УСЛОВИЯХ ОКОЛОНУЛЕВОЙ ГИПОТЕРМИИ**

В срезах гиппокампа зимнеспящих животных показано восстановление способности к генерации популяционных спайков после хранения их в течение 2- и 24-х часов сразу после резки в условиях околонулевой гипотермии (4 °C). Активность регистрировалась после перемещения срезов из условий гипотермии в стандартные условия инкубации (31 °C) и быстро достигала стабильного уровня. Период “молчания”, характерный для срезов после их приготовления, полностью отсутствовал. В то же время в срезах хомяков и морских свинок, не впадавших в спячку, уже после 2-х часов хранения в гипотермии после их приготовления активность не выявлялась при последующем тестировании в стандартной инкубационной среде. Принципиально важным является то, что не было выявлено существенных различий между срезами бодрствующих и спящих сусликов относительно их способности восстанавливать нейронную активность после травматического шока в условиях околонулевой гипотермии.

Известно, что после резки в течение 20–35 мин активность в инкубируемых *in vitro* срезах мозга гомотермных млекопитающих отсутствует вследствие посттравматического шока, постепенно восстанавливается к 60-й минуте, достигает стабильного уровня к 70–80-й минуте [3, 6, 8, 11]. Это же явление наблюдается в срезах мозга зимнеспящих сусликов, но активность восстанавливается и стабилизируется за более короткий период — 30–45 мин [4, 11, 12]. Можно предполагать, что во время “электрического молчания” в срезах происходят адаптивные процессы, для которых необходимы оптимальные условия инкубации. В то же время известно, что ткани зимнеспящих животных обладают высокой толерантностью к условиям глубокой гипотермии и этим существенно отличаются от тканей гомотермных млекопитающих [4, 5, 10]. В частности, показано, что температура мозга и тела гибернирующих арктических и якутских сусликов, обитающих в суровых климатических условиях, способна понижаться до 0 °C и ниже (до –2,9 °C) без существенного нарушения жизненных функций этих животных [1, 5].

Цель данной работы — исследовать динамику восстановления электрической активности в срезах гибернирующих и гомотермных животных после резки в условиях глубокой гипотермии (4 °C). Исследования проводились на четырех группах животных: глубокоспящих и бодрствующих якутских сусли-

ках *Citellus undulatus*, морских свинок и не впадавших в спячку хомяках *Mesocricetus auratus*.

В экспериментах использовали срезы мозга как бодрствующих сусликов (июнь 1996 года) с температурой мозга 37 °С, так и глубокоспящих с температурой мозга не выше 7 °С (январь, февраль и март 1995 года). Для сравнения в аналогичных условиях тестировали активность срезов мозга морских свинок и хомяков *Mesocricetus auratus*, содержащихся в теплом помещении, не впадавших в спячку. После извлечения мозговой ткани срезы толщиной 450 мкм резали с помощью серийного вибратора МНТ-84 (разработка проф. А. Ю. Буданцева). Срезы инкубировали в среде Рингера-Кребса по стандартной методике [3], раствор, содержащий бикарбонатный буфер, насыщали карбогеном (95% O₂ и 5% CO₂).

Суперфузию срезов осуществляли в незамкнутом непрерывном протоке. Из поля CA1 срезов гиппокампа сусликов и морских свинок регистрировали популяционные спайки (ПС) в ответ на стимуляцию коллатералей Шаффера. С помощью специальной компьютерной программы производили усреднение полевых потенциалов по пяти ответам, следовавшим с интервалом 10 с, и измеряли амплитуду ПС и латентный период (ЛП) ответов. По этим данным строили графики, нормированные относительно значений ПС и ЛП на 90-й минуте, что позволяло сравнить динамику восстановления активности в разных срезах. Из срезов медиальной септальной области и гиппокампа хомяков экстраклеточно регистрировали спонтанную активность нейронов.

На первом этапе исследования получили результаты, подтверждающие уже известные данные о том, что сразу после резки электрическая активность срезов при помещении их в стандартные условия инкубации при температуре раствора 31 °С отсутствует. Электрическая активность после резки восстанавливалась в срезах мозга глубокоспящих сусликов быстрее, чем в срезах мозга морских свинок. Уже к 15-й минуте в срезах спящих сусликов ответы составляли около 85–100% от величины ПС на 90-й минуте. Далее следовали увеличение ответов до 135–160% и постепенное их уменьшение до 100% и стабилизация как амплитуды ПС, так и ЛП ответов. Динамика восстановления электрической активности в срезах бодрствующих сусликов была аналогичной наблюдавшейся у срезов спящих животных, но появление первых ответов и фаза стабилизации наступали на 5–10 мин позже. В срезах мозга морских свинок динамика ответов была более медленной, амплитуда поп-спайков достигала 100% к 55-й минуте и стабилизировалась к 70–80-й минуте. Спонтанная активность в срезах мозга хомяков восстанавливалась к 50–54-й минуте после резки, стабилизация частоты разрядов наступала к 60–70-й минуте.

На втором этапе исследования после приготовления срезы помещали в боксы с охлажденным (4 °С) насыщенным карбогеном раствором без протока среды и хранили в холодильнике при этой же температуре. Тестирование электрической активности осуществляли в стандартных условиях при температуре 31 °С в инкубационной камере. Было выбрано два режима воздействия гипотермией: одни срезы тестировали после нахождения в гипотермии в течение 2-х часов ($n = 10$ для каждого вида животных), другие — тестировали после хранения в этих же условиях в течение 24-х часов ($n = 8$).

В срезах морских свинок и хомяков при этих режимах воздействия гипотермией нам не удалось обнаружить ни спонтанной активности в срезах гиппокампа и септальной области (хомяки), ни вызванных полевых потенциалов

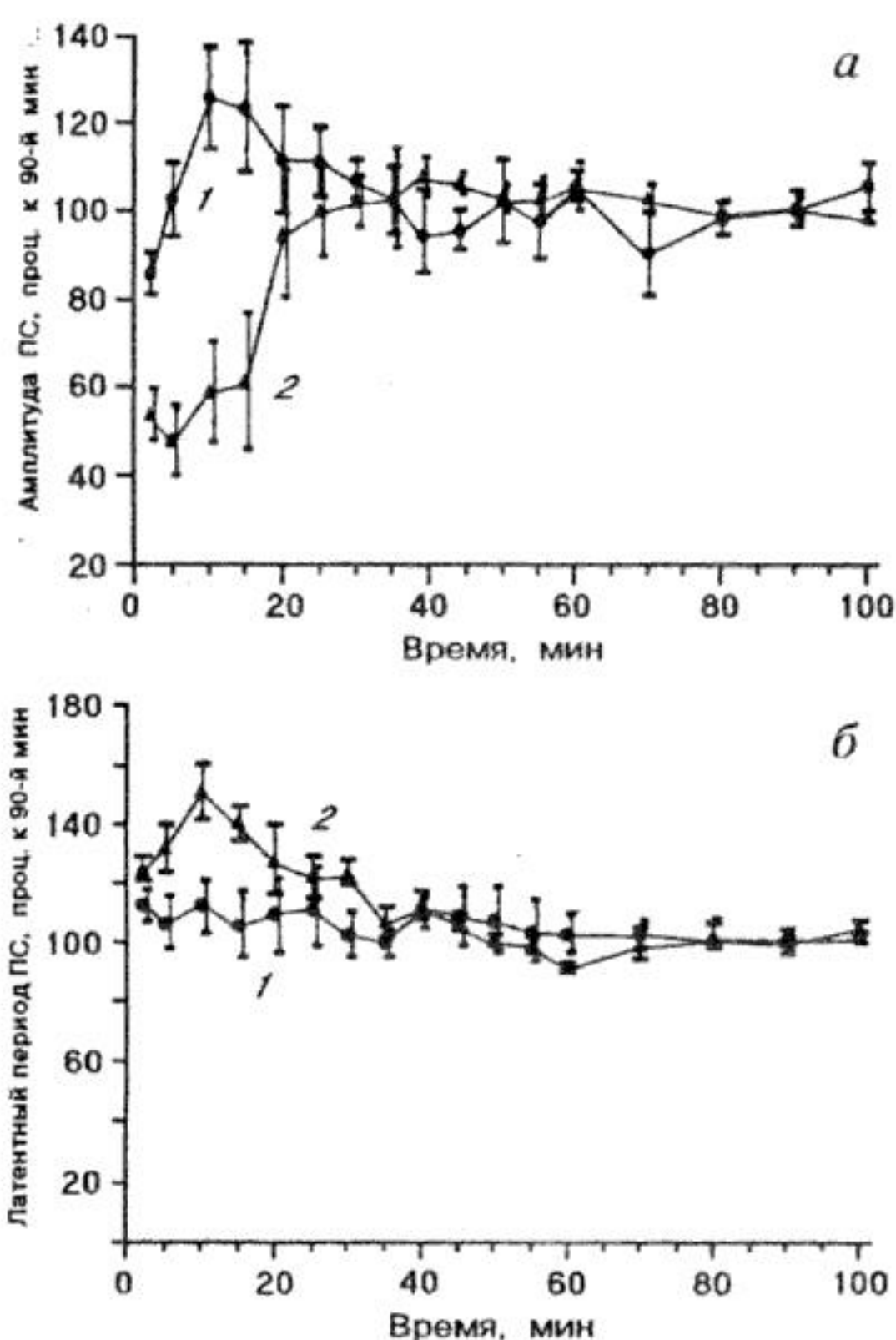


Рис. 1. Динамика амплитуды (а) и латентных периодов (б) популяционных спайков в поле СА1 срезов гиппокампа гибернирующих сусликов, хранившихся в течение 2-х (кривая 1) и 24-х часов сразу после приготовления в условиях околонулевой гипотермии

(морские свинки) за 100 мин и более (до 3-х часов) тестирования в стандартных условиях.

В то же время в срезах гиппокампа гибернирующих сусликов независимо от сроков содержания в гипотермии электрическая активность появлялась уже в первом тесте (на 2-й минуте) после помещения в стандартные условия инкубации (рис. 1). При этом следует отметить, что после 2-х часов нахождения в гипотермии (кривая 1) амплитуда ответа первые 15 мин составляла около 50–60% от уровня 90-й минуты, а затем быстро начала нарастать, достигая 110%, и в дальнейшем медленно снижалась до 100%. Подобная динамика стабилизации наблюдалась и в отношении ЛП ответов, но с обратным знаком, т.е. первые 25–30 мин ЛП значительно превышали уровень 90-й минуты, затем постепенно достигали 100%. За исключением первых 20 мин динамика восстановления амплитуды и ЛП ответов напоминала динамику

восстановления активности сразу после приготовления срезов.

Динамика вызванных ответов в срезах, содержащихся в условиях гипотермии в течение 24-х часов (рис. 1, кривая 2), принципиально отличалась от динамики ответов в только что приготовленных срезах. Амплитуда ответов уже в первых тестах достигала 80–90% относительно 90-й минуты инкубации. Наблюдались краткий период “экзальтации” ответов и постепенная их стабилизация; ЛП полевых потенциалов в начале тестирования превышал 100%, а затем медленно стабилизировался.

На третьем этапе исследования для выяснения существования толерантности к холоду у гиппокампальных срезов бодрствующих сусликов была проведена серия опытов на группе июньских животных. Были выбраны те же два режима воздействия гипотермией: 2 и 24 ч (4 °С). Результаты показали, что принципиальные различия в способности восстанавливать нейронную активность в срезах мозговой ткани бодрствующих и глубоко спящих сусликов отсутствуют.

Были обнаружены некоторые отличия у бодрствующих животных. При 2-часовом воздействии гипотермией амплитуда ПС на первых минутах тестирования составляла около 40% (рис. 2, кривая 1) от уровня 90-й минуты (55%

у спящих). При 24-часовом воздействии гипотермией начальный уровень ответа амплитуды ПС был несколько ниже — 70% (рис. 2, кривая 2) от уровня на 90-й минуте (80–90% у глубоко-спящих), а период “экзальтации” амплитуды ПС у бодрствующих сусликов был более длительный с выходом к уровню 100% к 45-й минуте (35-я минута у глубоко-спящих). Достоверных отличий по динамике ЛП ответов в срезах гиппокампа бодрствующих сусликов за исключением первых 15 мин выявлено не было (рис. 2, б).

Исследования, проведенные в зимний период (1989–90 гг.) на срезах мозга морских свинок, гибернирующих и бодрствующих сусликов, показали, что помещение препаратов мозга сразу после резки в условия глубокой гипотермии приводит к необратимому нарушению их способности к электрогенезу в срезах всех трех групп животных [11]. Результаты работы подтвердили ранее полученные данные только в отношении срезов мозга морских свинок, тогда как срезы и спящих, и бодрствующих сусликов восстанавливали способность к электрогенезу в гипотермических условиях. Поскольку условия тестирования были аналогичными в обоих исследованиях, кажется, эти противоречия трудно объяснить. Однако следует учесть, что обе работы проведены на сусликах в первый сезон после отлова (без предварительного содержания в течение сезона в виварии). Известно, что существуют весьма значительные вариации глубины погружения в спячку и выживаемости животных в различные сезоны в зависимости от состава пищи и других природных факторов [2, 7]. Косвенным подтверждением правоты подобного объяснения служат и результаты, полученные в данной работе на хомяках. Эти животные потенциально способны впадать в спячку при определенных условиях [2], но содержались при комнатной температуре в виварии и, возможно, по этой причине срезы, изолированные из их мозга, не восстанавливали способность к генерации спонтанной активности при помещении в глубокую гипотермию сразу после резки. Безусловно, расхождение результатов ранее проведенного исследования [11] и представленных в данной работе требуют дальнейшего изучения для более точного анализа зависимости репарационной способности срезов мозга от условий содержания

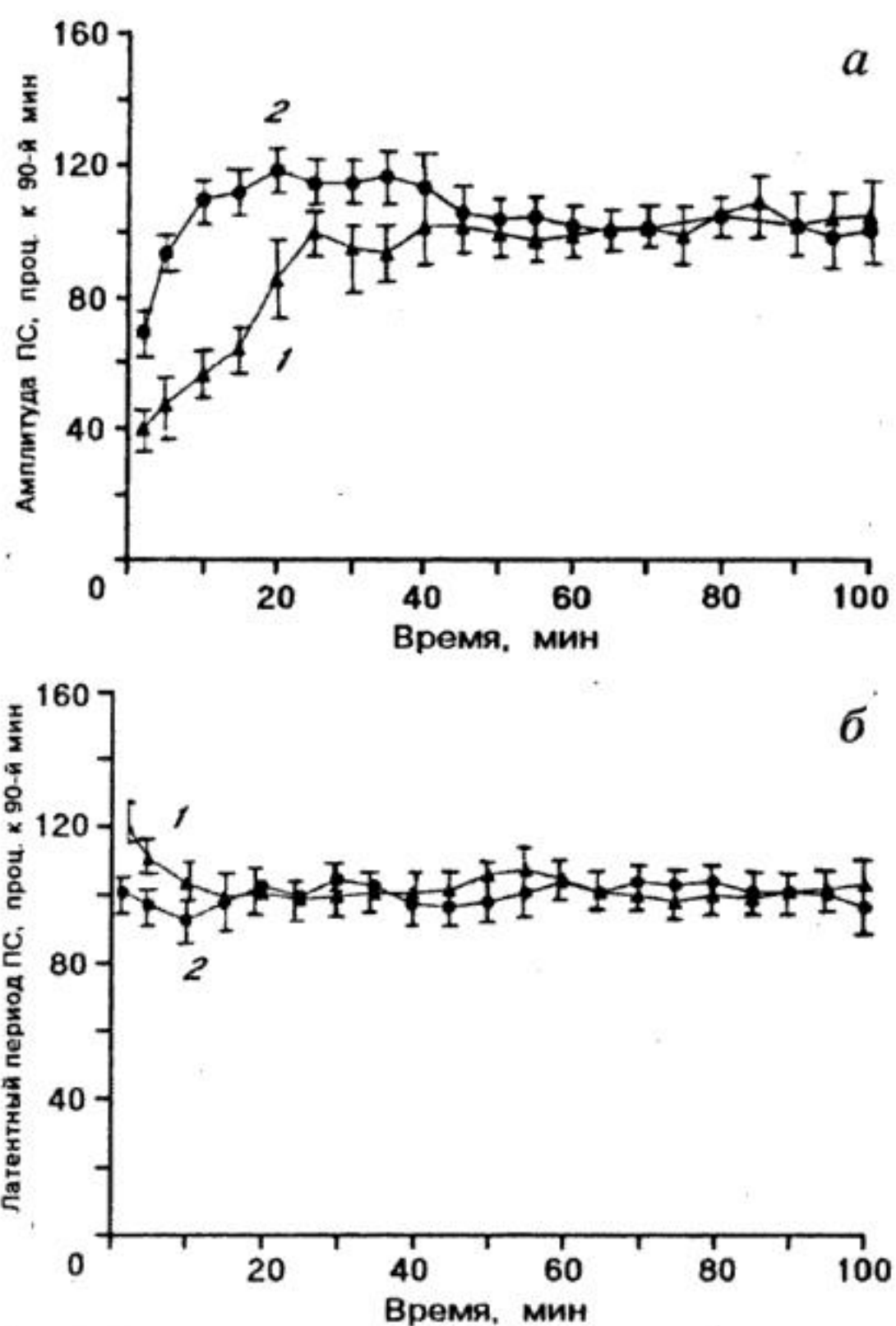


Рис. 2. Динамика амплитуды (а) и латентных периодов (б) популяционных спайков в поле СА1 срезов гиппокампа бодрствующих сусликов, хранившихся в течение 2-х (кривая 1) и 24-х часов (кривая 2) сразу после приготовления в условиях околонулевой гипотермии

и кормления животных. Однако выявлена принципиальная возможность восстановления электрогенеза в тканях мозга зимнеспящих животных в условиях околонулевой гипотермии, что, вероятно, является следствием подготовки к спячке и непосредственно самого гипотермического воздействия на животное.

Важным результатом данной работы является выявление отсутствия существенных различий между гиппокампальными срезами бодрствующих и глубокоспящих сусликов относительно их способности восстанавливать нейронную активность после травматического шока в условиях околонулевой гипотермии.

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что посттравматическая адаптация срезов сусликов может происходить в иных, чем у незимне-спящих, температурных диапазонах. Посттравматические явления наблюдаются в срезах как обычных лабораторных животных, так и зимне-спящих, но различие состоит в том, что восстановительные процессы для тканей зимне-спящих, очевидно, имеют более широкий температурный диапазон. При этом восстановительные процессы для сусликов в условиях гипотермии требуют значительно больше времени, чем при температуре 31 °С. Так, после содержания в гипотермии в течение 2-х часов, хотя и отсутствует период полного "молчания" нейронов, но требуется дополнительное время для достижения 100%-го стабильного уровня. В то же время амплитуда ответов в срезах сусликов, находившихся в гипотермии в течение 24-х часов, практически сразу близка к 100%, а быстрая активационная фаза ответа, вероятно, может быть связана с реакцией на резкий температурный скачок, поскольку имеются данные о температурной чувствительности нейронов гиппокампа [9, 13, 14].

Авторы выражают благодарность проф. В. А. Бондаренко и А. Ю. Буданцеву, а также канд. биол. наук А. Е. Калинину за ценные замечания и помощь во время обсуждения результатов работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ануфриев А. И., Соломонова Т. Н., Круман И. И. Наблюдения за зимней спячкой якутского длиннохвостого суслика в условиях эксперимента. Адаптация животных к холоду. — Новосибирск: Наука, 1990. — С. 21–27.
2. Калабухов Н. И. Спячка млекопитающих. — М.: Наука, 1985. — 260 с.
3. Отмахов Н. А. Переживающие срезы мозга. — Пушкино, 1987. — 70 с.
4. Павлик Л. Л., Пахотин П. И., Мошков Д. А. Влияние длительной гипотермии на структуру и функцию нейронов переживающих срезов гиппокампа морской свинки и суслика // Цитология. — 1991. — № 33. — С. 23–29.
5. Barnes B. M. Freeze avoidance in a mammal: body temperatures below 0 °C in an arctic hibernator // Science. — 1989. — 244. — P. 1593–1595.
6. Fredholm B. B., Dunwiddie T. V., Bergman B., Lindström K. Levels of adenosine and adenine nucleotides in slices of rat hippocampus // Brain. Res. — 1984. — 295. — P. 127–136.
7. Geiser F. Dietary lipids and thermal physiology // Life in the cold. Ecological, physiological and molecular mechanisms / Ed. by C. Carey, G. L. Florant, B. A. Wunder, B. Horwitz. — Boulder. San Francisco. Oxford: Westview Press, 1993. — P. 141–153.
8. Harvey J. A., Scholfield C. N., Brown D. A. Evoked surface-positive potentials in isolated mammalian olfactory cortex // Brain. Res. — 1974. — 76. — P. 235–245.
9. Hooper D. C., Martin S. M., Horowitz J. M. Temperature effects on evoked potentials of hippocampal slices from euthermic chipmunks, hamsters and rats // J. Therm. Biol. — 1985. — 10. — P. 35–40.
10. Pakhotin P. I., Pakhotina I. D. Preparation of isolated perfused ground squirrel brain // Brain. Res. Bulletin. — 1994. — 33. — P. 719–721.
11. Pakhotin P. I., Belousov A. B. and Otmakhov N. A. Functional stability of the brain slices of ground squirrels, *Citellus undulatus*, kept in conditions of prolonged deep periodic hypothermia: electrophysiological criteria // Neuroscience. — 1990. — 38. — P. 591–598.

12. Pakhotin P. I., Pakhotina I. D., Belousov A. B. The study of brain slices from hibernating mammals *in vitro* and some approaches to the analysis of hibernation problems *in vivo* // Progress in Neurobiol. – 1993. – 40. – P. 123–161.
13. Schiff S. J., Somjen G. G. The effects of temperature on synaptic transmission in hippocampal tissue slices // Brain. Res. – 1985. – 345. – P. 279–284.
14. Thompson S. M., Masukawa L. M., Prince D. A. Temperature dependence of intrinsic membrane properties and synaptic potentials in hippocampal CA1 neurons *in vitro* // J. Neurosci. – 1985. – 5. – P. 817–824.

*Ин-т теоретической и экспериментальной биофизики РАН,

Пушино, Московская обл., Россия

Ин-т биофизики клетки РАН, Пушино, Московская обл., Россия

Поступила 06.08.96

О. М. ЄМЕЦЬ*, В. М. ВОРОНКОВ, Т. М. ПАШОВКІН, П. І. ПАХОТІН

ЗРІЗИ ГІППОКАМПА АКТИВНИХ ТА ГЛИБОКОСПЛЯЧИХ ХОВРАХІВ *CITELLUS UNDULATUS* ОДНАКОВО ЗДАТНІ ВІДНОВЛЮВАТИ НЕЙРОННУ АКТИВНІСТЬ ПІСЛЯ ТРАВМАТИЧНОГО ШОКУ В УМОВАХ БЛИЗЬКОНУЛЬОВОЇ ГІПОТЕРМІЇ

*Інститут теоретичної та експериментальної біофізики РАН, Пушино, Московська обл., Росія

Інститут біофізики клітини РАН, Пушино, Московська обл., Росія

У зрізах гіпокампа зимовосплячих тварин виявлено відновлення здатності генерувати популяційні спайки після зберігання їх на протязі 2- і 24-х годин відразу після приготування в умовах близьконульової гіпотермії (4 °C). Активність реєструвалася після перенесення зрізів із умов гіпотермії у стандартні умови інкубації (31 °C) і швидко досягала стабільного рівня. Період "мовчання", характерний для зрізів після їх приготування, був повністю відсутнім. У той же час у зрізах хом'яків і морських свинок, які ніколи не впадали в сплячку, вже після 2-х годин зберігання в гіпотермії відразу після їх приготування активність не виявлялась при наступному тестуванні в стандартному інкубаційному середовищі. Принципово важливим є те, що не було виявлено істотної різниці між зрізами активних та сплячих ховрахів щодо їх здатності відновлювати нейронну активність після травматичного шоку в умовах близьконульової гіпотермії.

O. N. YEMETS*, V. N. VORONKOV, T. N. PASHOVKIN, P. I. PAKHOTIN

HIPPOCAMPAL SLICES OF DEEP-HIBERNATING AND AWAKED GROUND SQUIRRELS *CITELLUS UNDULATUS* ARE EQUALLY ABLE TO RESTORE NEURONAL ACTIVITY AFTER TRAUMATIC SHOCK UNDER DEEP HYPOTHERMIA

*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow region, Russia

Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow region, Russia

In hippocampal slices of hibernating ground squirrels a restoration of ability has been shown of generation of population spikes immediately after preparation, after the slices have been stored for 2 and 24 hours in conditions of sub-zero hypothermia (4 °C). After the slices have been moved from hypothermic conditions into standard incubation conditions (31 °C), activity was registered immediately after replacement, after which the activity promptly reached a stable level. The period of electrical "silence", which is typical for freshly prepared slices, was completely absent. Activity was not showing in the standard incubation medium in freshly prepared slices from non-hibernating laboratory animal — guinea pigs and hamsters after two hours hypothermic storage. Essential was the fact that differences were not found between deep-hibernating and awakened ground squirrels in their ability of restoration of neuronal activity of brain slices after traumatic shock under deep hypothermia.

Н.В. Орлова, Н.М. Шпакова**ДЕЙСТВИЕ ДВУХВАЛЕНТНЫХ КАТИОНОВ
НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ
К ГИПЕРОСМОТИЧЕСКОМУ СТРЕССУ
И ХОЛОДОВОМУ ШОКУ**

Представлены результаты исследований, свидетельствующие о том, что двухвалентные катионы Ca^{2+} и Zn^{2+} защищают эритроциты при действии гиперосмотического стресса. Степень выраженности полученного эффекта зависит от температуры и исходного уровня дегидратации клеток, так что при оптимальных условиях подвергаются лизису только 10% эритроцитов. В условиях холодового шока Ca^{2+} не оказывает влияния на клетки, тогда как Zn^{2+} значительно снижает гемолиз эритроцитов. На основе анализа литературных данных обсуждаются возможные механизмы выявленного защитного эффекта двухвалентных катионов.

Изменения осмотических и температурных условий среды являются основными факторами криоповреждения [1], что позволяет использовать перенос клеток в высококонцентрированные растворы при положительных температурах (гиперосмотический стресс), а также охлаждение клеток от 37 до 0 °C (холодовой шок) для моделирования замораживания. Известно, что чувствительность клеток к стрессовым воздействиям можно направленно модифицировать. В частности, в результате предварительной дегидратации устойчивость эритроцитов к гиперосмотическому шоку существенно повышается [6]. Показано, что минимальную чувствительность к последующему гиперосмотическому шоку проявляют клетки, которые предварительно находились в 0,45 М NaCl. Изменение концентрации соли в среде инкубации приводит к снижению устойчивости клеток к гиперосмотическому стрессу. Верхняя граница концентрации NaCl в среде предварительной инкубации, когда максимально проявляется чувствительность клеток к гиперосмотическому стрессу, — 0,7 М. Исходя из вышеизложенного, средами предварительной инкубации были выбраны: 0,15 М NaCl — контроль; 0,45 М NaCl — зона оптимальной устойчивости и 0,7 М NaCl — зона неустойчивости клеток к последующему переносу в 4,0 М NaCl. Двухвалентные катионы отличаются широким спектром действия на мембраны [3]. В зависимости от концентрации они могут оказывать множественное влияние на различные структурные элементы клетки [3]. Ранее полученные данные о способности двухвалентных катионов, в частности ионов Ca^{2+} и Zn^{2+} , повышать устойчивость эритроцитов к гипотоническому шоку, постгипертоническому лизису и действию порообразующих агентов [7, 10] позволяют предположить, что эти катионы могли бы защищать клетки от повреждения в условиях гиперосмотического стресса и холодового шока.

Работа посвящена изучению влияния двухвалентных катионов, в частности Ca^{2+} и Zn^{2+} , на устойчивость эритроцитов к переносу в 4,0 М NaCl и при охлаждении от 37 до 0 °C в стационарных по тоничности условиях (1,2 М NaCl).

Эритроциты получали из донорской крови группы А. После удаления плазмы их дважды отмывали физиологическим раствором (0,15 М NaCl, 10 мМ трис, $\text{pH} = 7,4$) и хранили в виде плотного осадка не более 2-х часов при 0 °C. Для изучения влияния гиперосмотического стресса эритроциты предварительно помещали в среды с различным содержанием NaCl (0,15, 0,45, 0,7 М) при определенной температуре на 2 мин, а затем изотермически

переносили в гипертонический раствор NaCl (4,0 М) с различными концентрациями ионов Ca^{2+} или Zn^{2+} (конечный гематокрит 0,4%). Для проведения холодового шока эритроциты после инкубации в 1,2 М NaCl при 37 °С в течение 10 мин переносили в среды той же тоничности с различным содержанием ионов Ca^{2+} или Zn^{2+} при 0 °С (время экспозиции то же). После этого целые клетки осаждали центрифугированием и спектрофотометрически на длине волны 543 нм определяли количество гемоглобина в супернатанте. Выход гемоглобина из клеток рассчитывали в процентах по отношению к 100%-му гемолизу в присутствии тритона X-100 (0,1%). В работе использованы реактивы отечественного производства квалификации "хч" и "чда".

Как видно из рис. 1, ионы Ca^{2+} оказывают протектирующий эффект на клетки, перенесенные из изотонической среды в 4,0 М NaCl. Защитное действие ионов Ca^{2+} начинает проявляться при достижении концентрации 500 мкМ как при 0, так и при 37 °С, а ионов Zn^{2+} — при использовании их в концентрации 5 мкМ. Таким образом, для получения максимального протектирующего эффекта при действии гиперосмотического стресса необходима концентрация ионов Zn^{2+} на два порядка меньше по сравнению с Ca^{2+} . Следует отметить, что при использовании Ca^{2+} минимальный гемолиз составляет 30–40%, а Zn^{2+} — 15–20%.

При изменении условий предварительной инкубации, а именно предварительное экспонирование клеток с 0,7 М NaCl, появляются различия в характере действия ионов Ca^{2+} и Zn^{2+} на клетки в условиях гиперосмотического стресса (рис. 1, 2). Так как профили кривых гемолиза контрольных и дегидратированных эритроцитов от концентрации ионов Zn^{2+} в 4,0 М NaCl идентичны, можно сделать вывод, что концентрация NaCl в среде предварительной инкубации не оказывает влияния на проявление защитного действия ионов Zn^{2+} в рассматриваемых условиях (рис. 1,б, 2,б). Из рис. 1,а и 2,а видно, что ионы Ca^{2+} от гиперосмотического повреждения в большей степени протектируют дегидратированные клетки, чем контрольные. Для дегидратированных клеток концентрация катиона, при которой защитный эффект максимален, уменьшается.

Предварительная частичная дегидратация клеток в 0,45 М NaCl позволяет значительно снизить их повреждение при переносе в 4,0 М NaCl [6]. Как видно из рис. 3, гемолиз клеток в этих условиях при 0 °С составляет 18%, а при 37 °С — 40%. Использование двухвалентных катионов приводит к до-

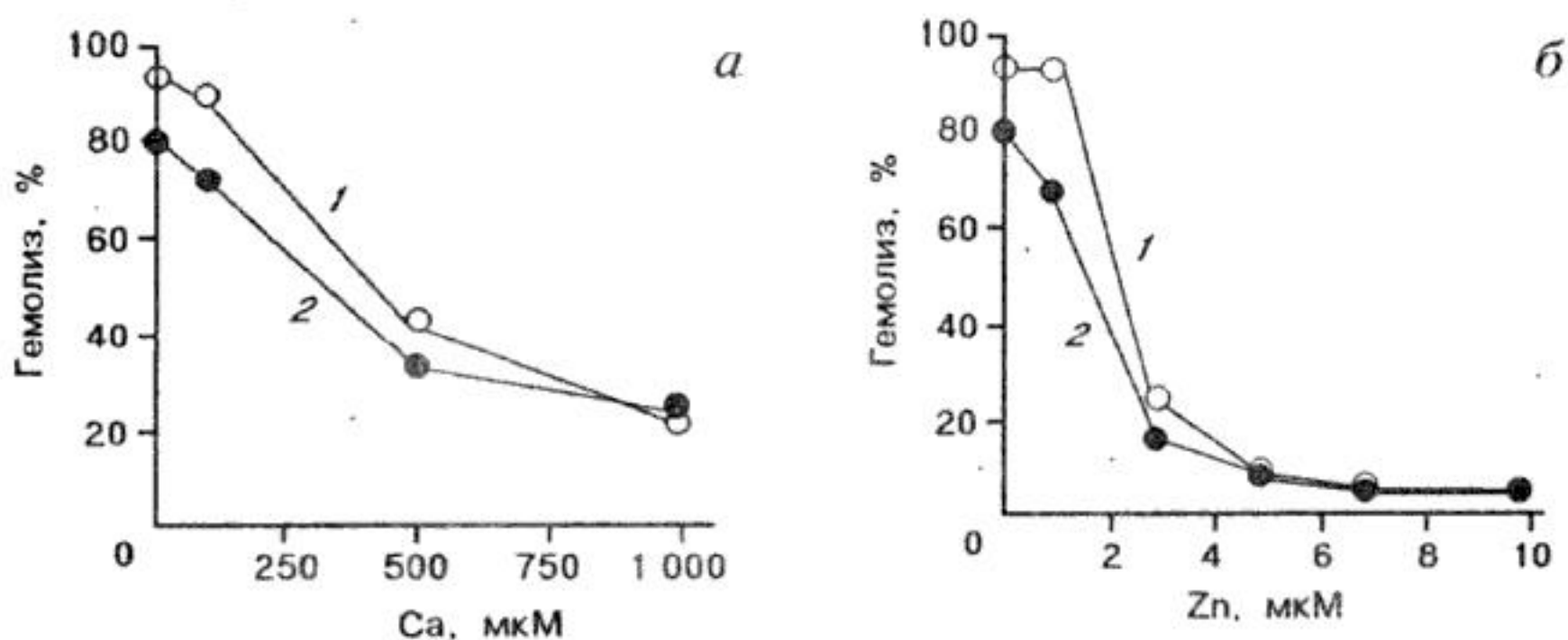


Рис. 1. Влияние двухвалентных катионов Ca^{2+} (а) и Zn^{2+} (б) на уровень гемолиза эритроцитов, перенесенных в 4,0 М NaCl из 0,15 М NaCl; температура 37 (1) и 0 °С (2)

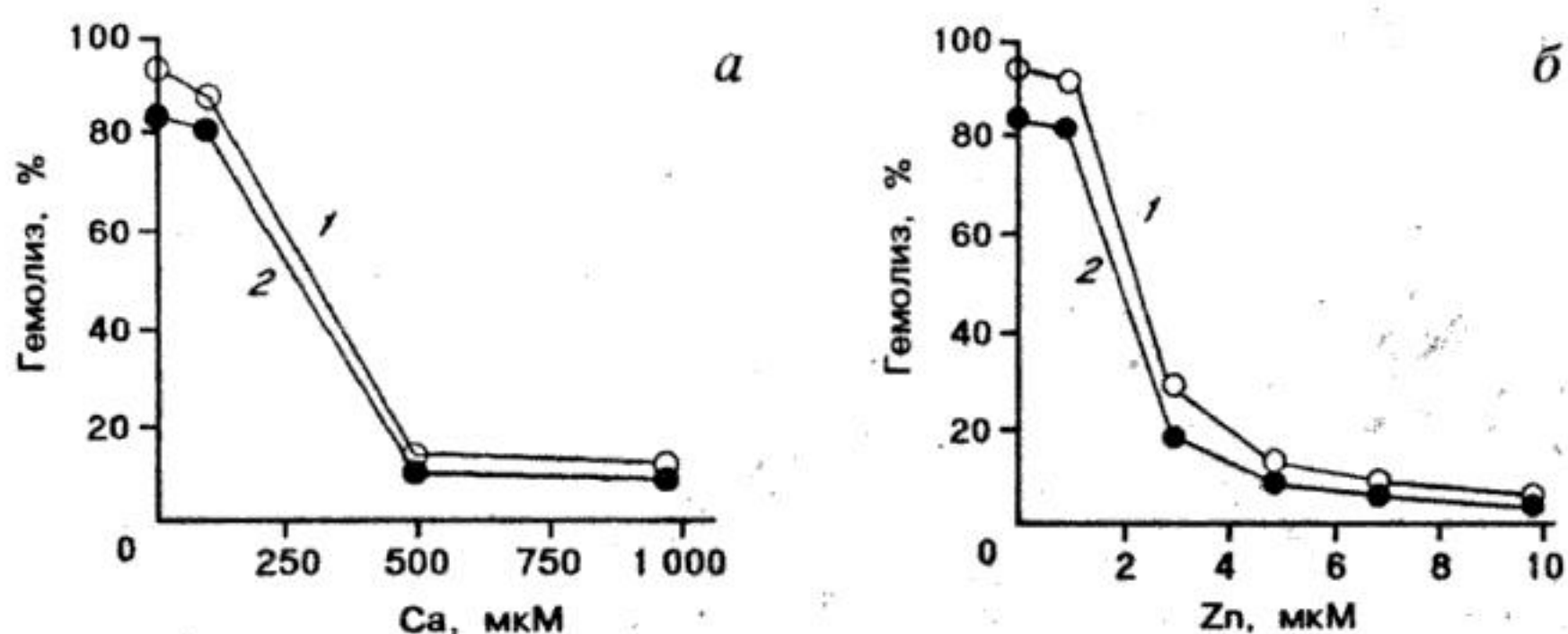


Рис. 2. Влияние двухвалентных катионов Ca^{2+} (а) и Zn^{2+} (б) на уровень гемолиза эритроцитов, перенесенных в 4,0 М NaCl из 0,7 М NaCl; температура 37 (1) и 0 °С (2)

полнительной защите клеток, перенесенных из 0,45 в 4,0 М NaCl при 37 °С. Таким образом, при физиологической температуре сочетанное действие предварительной дегидратации клеток в 0,45 М NaCl и двухвалентных катионов позволяет максимально снизить гемолиз в 4,0 М NaCl до величин, регистрируемых при 0 °С (рис. 3).

Величина повреждения эритроцитов в 4,0 М NaCl зависит от температуры [1]. Как видно из рис. 1–3, двухвалентные катионы протектируют клетки в 4,0 М NaCl, при этом нивелируются различия в степени повреждения эритроцитов, обусловленные температурой.

Холодовой шок эритроцитов рассматривается как процесс, связанный с начальным этапом формирования каналов утечки для ионов калия. При охлаждении происходит увеличение размеров дефектов, уравниваются небольшие молекулы, клетки набухают по коллоидно-осмотическому механизму и лизируют [2].

Охлаждение клеток от 37 до 0 °С в гипертонических растворах приводит к их повреждению, которое максимально проявляется в среде, содержащей 1,2 М NaCl [1]. На рис. 4 представлены данные о влиянии двухвалентных катионов (Ca^{2+} , Zn^{2+}) на клетки в условиях холодового стресса (1,2 М NaCl, 37–0 °С). Как видно, ионы Ca^{2+} при использовании в диапазоне концентраций 100–1 000 мкМ не оказывают влияния на клетки. В то же время ионы Zn^{2+} значительно снижают гемолиз эритроцитов (до 5%) при охлаждении,

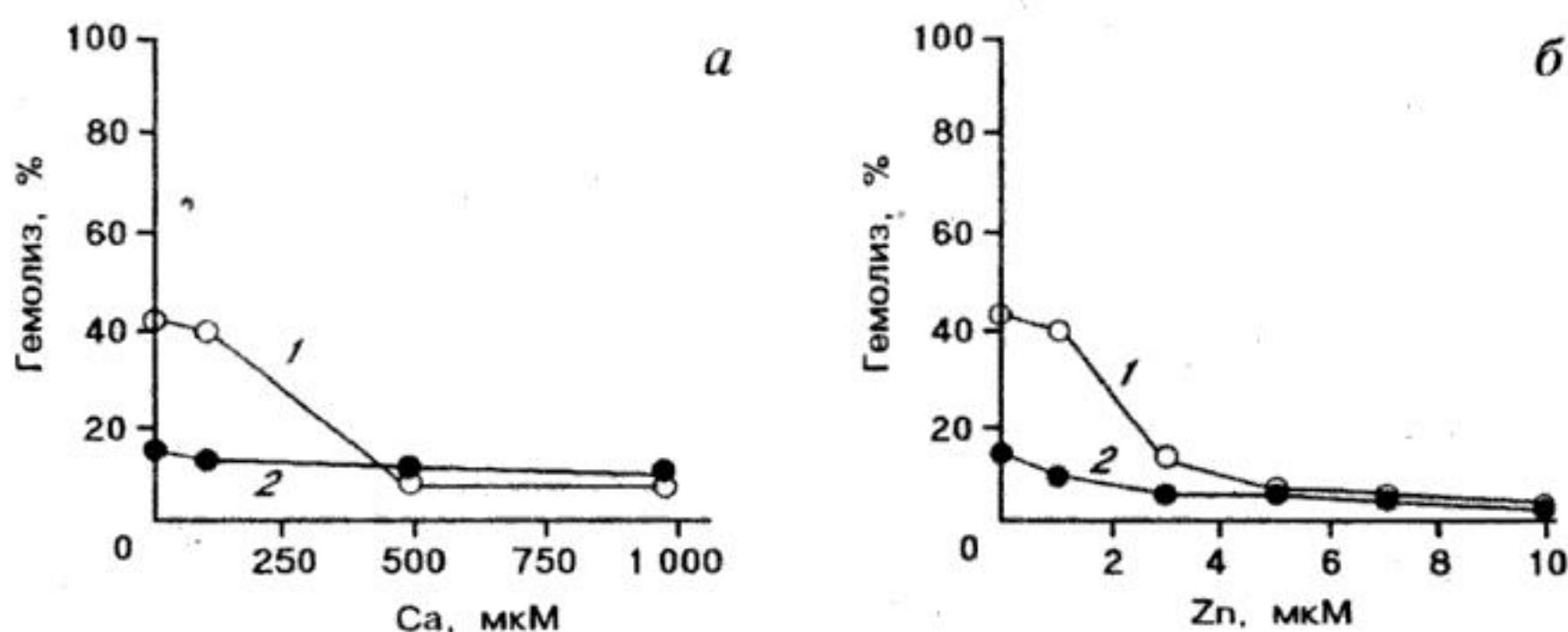


Рис. 3. Влияние двухвалентных катионов Ca^{2+} (а) и Zn^{2+} (б) на уровень гемолиза эритроцитов, перенесенных в 4,0 М NaCl из 0,45 М NaCl; температура 37 (1) и 0 °С (2)

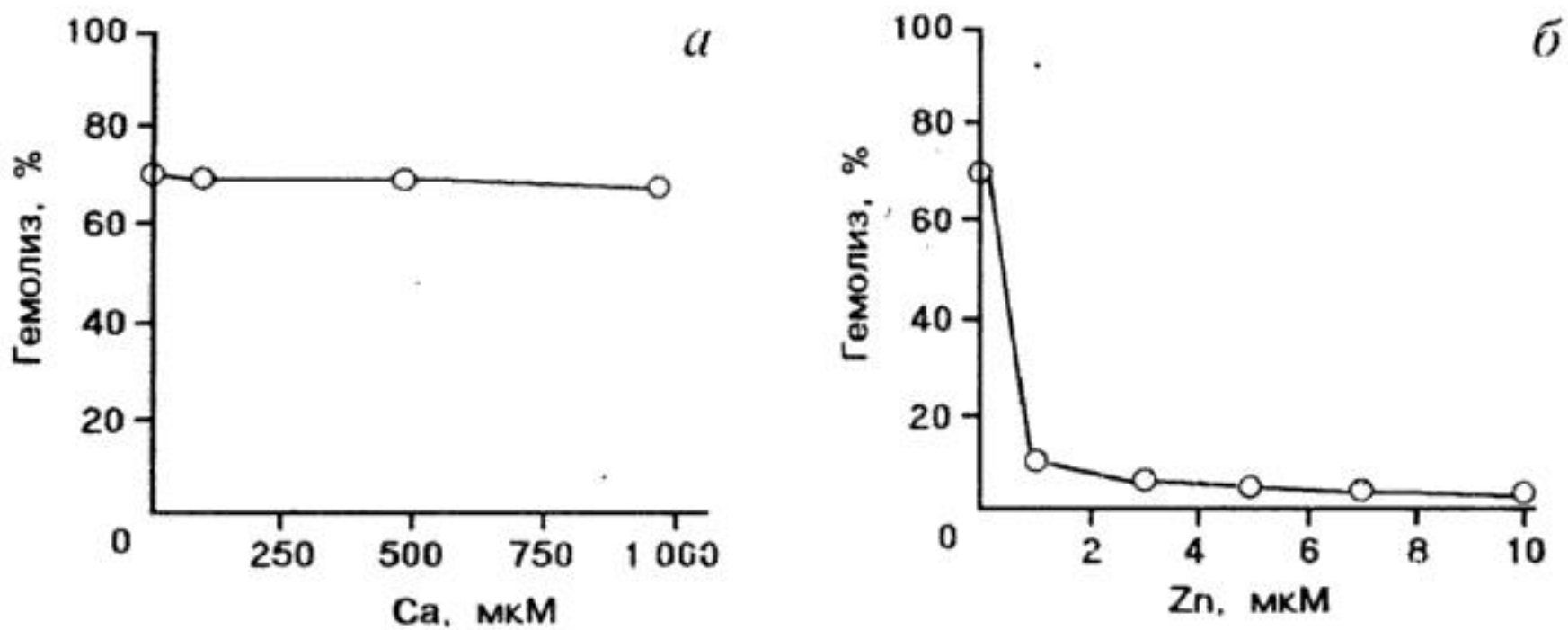


Рис. 4. Концентрационные зависимости уровня гемолиза эритроцитов при охлаждении от 37 до 0 °C в 1,2 М NaCl в присутствии ионов Ca^{2+} (а) и Zn^{2+} (б)

причем протектирующее действие начинает проявляться при меньших концентрациях по сравнению с гиперосмотическим стрессом и оптимальный эффект достигается при концентрации 3 мкМ. Таким образом, механизмы действия ионов Ca^{2+} и Zn^{2+} на клетки в условиях холодового шока различны.

Двухвалентные катионы оказывают множественное влияние на клетки и клеточные структуры [3, 5]. Ионы кальция обеспечивают регуляцию внутриклеточных функций при действии на клетку различных внешних факторов. Ионы цинка необходимы для функционирования некоторых ферментов [3]. Двухвалентные катионы стабилизируют мембраны при действии на клетки различных литических агентов и стрессовых факторов. Известно, что двухвалентные катионы предотвращают гемолиз, вызванный литическими агентами [10]. Ионы металлов облегчают слияние клеток путем ингибирования лизиса [13]. При использовании кальциевого ионофора А 23187 показано, что кальций в зависимости от внутриклеточной концентрации может оказывать как сенсibiliзирующий, так и протектирующий эффект на развитие холодового шока эритроцитов [8].

Внутриклеточные концентрации двухвалентных катионов увеличиваются в условиях повышенной осмолярности среды. Это может быть обусловлено повышением концентрации катионов при осмотическом обезвоживании клетки, а также неспецифическим увеличением проницаемости мембраны для двухвалентных катионов в гипертонических средах, в частности, для ионов Ca^{2+} [14]. Возросшие внутриклеточные концентрации Ca^{2+} могут приводить к активированию транскламиназы и появлению ковалентных сшивок в структуре цитоскелета [12], что сопровождается стабилизацией мембраны в условиях гиперосмотического стресса.

В основе повреждения клеток в условиях гиперосмотического стресса лежат образование и дальнейшая эволюция мембранных дефектов, которые могут достигать размера гемолитических пор. Полагают, что поры стабилизируются электростатически и их размер зависит от плотности отрицательно заряженных групп молекул, выстилающих их поверхность. Можно предположить, что катионы оказывают прямое влияние на образовавшиеся поры, взаимодействуя с их поверхностными группами по электростатическому механизму, что в конечном итоге приводит к репарации мембраны. В пользу этого предположения говорят данные об активирующем действии катионов на процесс замыкания теней эритроцитов [11].

На модельных мембранах, содержащих кислые фосфолипиды, было показано, что двухвалентные катионы индуцируют переход бислойных структур в небислойные. Подобные переходы ламеллярной фазы в гексагональную HII фазу регистрируются и в присутствии амфифильных соединений, которые способны защищать клетки от повреждения в условиях стресса [4, 9, 15]. Это позволяет предположить, что подобные перестройки могут отвечать за проявление наблюдаемого защитного эффекта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоус А.М., Бондаренко В.А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. – Киев: Наук. думка, 1982. – 255 с.
2. Белоус А.М., Бондаренко В.А., Бабийчук Л.А. и др. Единый механизм повреждения клетки при термальном шоке, замораживании и постгипертоническом лизисе // Криобиология. – 1985. – № 2. – С. 25–32.
3. Бужурин И.М., Панов М.А. Механизмы клеточного ответа на внешние воздействия // Итоги науки и техники. Сер. Общие проблемы физико-химической биологии. – № 3. – М.: ВИНТИ, 1986. – 214 с.
4. Дунаевская О.Н., Панталер Е.Р., Шпакова Н.М., Бондаренко В.А. Некоторые возможности повышения устойчивости эритроцитов к холодовым и осмотическим воздействиям при использовании катионных амфипатов // Пробл. криобиологии. – 1995. – № 1. – С. 21–26.
5. Левицкий Д.О. Кальций и биологические мембраны. – М.: Высш. шк., 1990. – 123 с.
6. Поздняков В.В. Влияние состава и осмолярности среды на устойчивость эритроцитов к осмотическому и температурному шоку: Автореф. ... дис. канд. биол. наук. – Харьков, 1989. – 16 с.
7. Руденко С.В., Пателарос С.В. Активирующее и ингибирующее влияние двухвалентных катионов на постгипертонический лизис эритроцитов // Биол. мембраны. – 1995. – 12, № 4. – С. 381–383.
8. Шпакова Н.М., Бондаренко В.А. Влияние ионов кальция на развитие гипертонического холодового шока эритроцитов // Криобиология. – 1989. – № 4. – С. 46–48.
9. Шпакова Н.М., Бондаренко В.А. Действие хлорпромазина на температурную и осмотическую чувствительность эритроцитов // Биохимия. – 1991. – 56, № 12. – С. 2125–2130.
10. Bashford C.L., Alder G.M., Graham J.M. et al. Ion modulation of membrane permeability: effect of cation on intact cell and on phospholipid bilayer treated with pore-forming agents // J. Membr. Biol. – 1988. – 103, № 1. – P. 79–94.
11. Bodemann H., Passow H. Factors controlling the resealing of the human erythrocyte ghosts after hypotonic lysis // J. Membr. Biol. – 1978. – 8, № 1. – P. 1–26.
12. Lorand L., Weissmann L.B., Edel D.L., Bruner-Lorand J. Role of the intrinsic transglutaminase in the Ca^{2+} -mediated cross-linking of erythrocyte proteins // Proc. Nat. Acad. Sci. – 1976. – 73, № 13. – P. 4479–4481.
13. Zakai N., Loyter A., Kulka R.G. Prevention of hemolysis by bivalent metal ions during virus induced fusion of erythrocytes with ehrlich ascites tumor cells // Febs. Lett. – 1974. – 40, № 2. – P. 331–334.
14. Plishker G.A., Gitelman H.J. Calcium transport in human red blood cells under hypertonic conditions // Amer. J. Physiol. – 1979. – 237, № 1. – P. 96–101.
15. Verkleij A.J., de Maagd, Leunissen J. et al. Divalent cations and chlorpromazine can induce non-bilayer structures in phosphatidic acid containing model membranes // Biochim. Biophys. Acta. – 1982. – 684, № 2. – P. 255–262.

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

Поступила 19.11.97

Н. В. ОРЛОВА, Н. М. ШПАКОВА

ДІЯ ДВОВАЛЕНТНИХ КАТІОНІВ НА ЧУТЛИВІСТЬ ЕРИТРОЦИТІВ ДО ГІПЕРТОНІЧНОГО СТРЕСУ ТА ХОЛОДОВОГО ШОКУ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Представлені результати досліджень, які свідчать про те, що двовалентні катіони Ca^{2+} і Zn^{2+} захищають еритроцити при дії гіперосмотичного стресу. Ступінь вияву отриманого ефекту залежить від температури та початкового рівня дегідратації клітин, так що при оптимальних умовах зазнають лізису тільки 10% еритроцитів. В умовах холодового шоку Ca^{2+} не впливає на клітини, тоді як Zn^{2+} значно знижує гемоліз еритроцитів. На основі аналізу літературних даних обговорюються можливі механізми виявленого захисного ефекту двовалентних катіонів.

N. V. ORLOVA, N. V. SHPAKOVA

ACTION OF DIVALENT CATIONS ON SUSCEPTIBILITY OF RED CELLS TO HYPEROSMOTIC STRESS AND COLD SHOCK

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

The report deals with the results of investigations, indicating that divalent cations Ca^{2+} and Zn^{2+} protect red cells, exposed to the action of hyperosmotic stress. The extent of manifestation of the obtained effect depends on the temperature and original level of cell dehydration, so that only 10% of red cells experience lysis under optimum conditions. During cold stress Ca^{2+} does not affect the cells, while Zn^{2+} significantly reduces hemolysis of red cells. The authors speculate on the possible mechanisms of the identified protective effect of divalent cations.

УДК 615.361.018.014.413

Н.Н.Бабенко, И.А.Вотякова, Г.С.Лобынцева

ОСОБЕННОСТИ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ НАТИВНЫХ И КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ НЕРВНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА. СООБЩЕНИЕ 1. КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ МОЗГА ЭМБРИОНОВ ЧЕЛОВЕКА 5–13 НЕДЕЛЬ ГЕСТАЦИИ

Изучен клеточный состав мозга эмбрионов человека 5–13 недель гестации для подбора оптимальных сроков развития трансплантатов при лечении различных нейродегенеративных заболеваний. Установлено, что в данный период развития эмбриональный мозг человека представлен клетками следующих типов: медуллобласты, глиобласты, нейробласты на разных стадиях дифференцировки и астроциты. Образование дифференцированных нейронов и утрата ими способности к делению происходят в конце 12-й и начале 13-й недель гестации.

Изучение морфофункциональных свойств эмбриональной нервной ткани и клеток (ЭНТ и ЭНК) остается актуальной проблемой в связи с расширением области их применения для лечения различных патологических состояний путем трансплантации эмбрионального материала.

Многочисленные опыты на животных свидетельствуют об успешном приживлении трансплантатов с созданием новых и реконструкцией поврежденных внутримозговых систем, что приводит к возмещению функционального дефицита [6].

Результаты аллопересадок эмбриональных нервных клеток человека указывают на эффективность их применения при болезни Паркинсона [1, 7, 9], черепно-мозговых и спинно-мозговых травмах [5, 8]. Методы лечения других нейродегенеративных заболеваний (болезнь Альцгеймера, Гентингтона, эпилепсия, инсульт, рассеянный склероз, нарушение функций гипоталамо-гипофизарной системы, детский церебральный паралич) находятся на стадии экспериментальной разработки [3, 10].

Широкое применение в клинике трансплантации эмбриональных нервных клеток предполагает наличие их постоянных запасов, что может быть обеспечено только с помощью криоконсервирования. При этом не только увеличивается срок хранения трансплантатов, но и создается возможность для их всестороннего исследования с тестированием образцов на отсутствие бактериального и вирусного загрязнения, степени сохранности их в жизнеспособном состоянии и определением их морфофункциональных свойств. Поэтому одним из ведущих направлений исследований является создание эффективных способов долгосрочного хранения и низкотемпературного банка клеток и эмбриональных нервных тканей для последующего их использования в клинике.

Однако в литературе мы не встретили работ, посвященных изучению клеточного состава и степени дифференцировки клеток нервной ткани зародышей человека первого триместра беременности, что не позволяет объективно выбрать наилучший срок развития эмбриона, чтобы изъять пригодные для трансплантации ткани развивающегося мозга.

Цель данной работы — исследование клеточного состава нервной ткани эмбрионов человека 5–12 недель гестации для последующего применения их при лечении различных патологий и травм мозга.

Материалом исследования были образцы нервной ткани эмбрионов человека, полученные при искусственных абортах в стационаре гинекологического отделения клиники.

Анализ морфологического состава мозга эмбрионов человека проводили на мазках-отпечатках, фиксированных в метаноле в течение 10 мин и окрашенных методами как специфической, так и неспецифической окраски. Неспецифическое окрашивание осуществляли краской Романовского–Гимзы в течение 25 мин, а специфическое — метиленовым синим по Ниссля согласно методике [4]. В последнем случае присутствие глыбок вещества Ниссля является критерием для выявления дифференцирующихся и зрелых нейрональных элементов. Микроскопический анализ окрашенных препаратов производили на микроскопе "BIOLAR" при увеличении $\times 100$ под иммерсией. Таким образом было проанализировано 34 образца эмбрионального мозга человека 5–13 недель гестации.

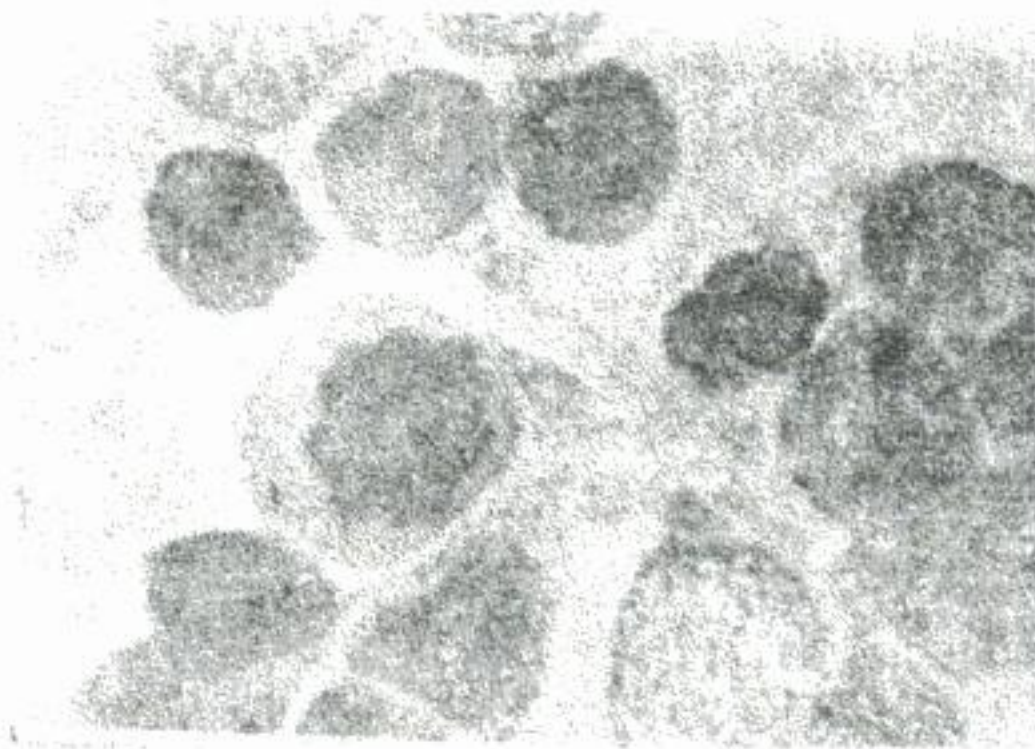


Рис. 1. Медуллобласты и нейробласты в мазке мозга эмбриона человека. Окраска азур-эозин по Романовскому

Нервная ткань человеческого эмбриона 5–6 недель гестации (Э5–6) представлена медуллобластами, малодифференцированными нейробластами и глиобластами. Медуллобласты являются наиболее многочисленной популяцией. Это довольно крупные, лишенные отростков, округлые клетки с узким ободком базофильной цитоплазмы, пузырьвидным гиперхромным ядром без ядрышек (рис. 1).

Изредка встречались малодифференцированные нейробласты с довольно крупным яд-

ром, содержащим равномерно распределенный по всей нуклеоплазме хроматин. Характерным было наличие 1–2 или 3-х крупных компактных ядрышек, обычно прилегающих к ядерной оболочке. Ободок цитоплазмы узкий, при окраске по Ниссля глыбки вещества Ниссля не выявлялись.

Более мелкие клетки с гиперхромным ядром без ядрышек, оптически темной цитоплазмой с одним длинным, тонким, часто извитым выростом предположительно можно отнести к глиобластам.

У эмбрионов 7–8 недель внутриутробного развития (Э7–8) наблюдалась дальнейшая дифференцировка нейробластов, выражающаяся в уменьшении ядерно-цитоплазматического отношения, эксцентрично сдвинутом ядре,

увеличении количества цитоплазмы, особенно с одного полюса клетки (рис. 2).

Но наряду с этим, множество клеток было подобно по строению нейробластам Э5–6 и расположено в основном группами по 4–5 клеток. Среди них преобладающее большинство клеток находилось в состоянии митотического деления (рис. 1).

Клеточный состав мозга 9–10 недель эмбрионального развития (Э9–10) представлен дифференцирующимися нейробластами и глиобластами, а также иногда встречающимися элементами менингоэпителия. Дифференцирующиеся нейробласты Э9–10 имеют вид клеток с четко очерченным овальным светлым ядром, 2–3 компактными ядрышками и широким ободком цитоплазмы, в которой еще не выявляются глыбки вещества Ниссля.

Глиальные элементы имеют отростки 2-х типов: светлые, протоплазматические, соответствующие астробластам, и темные прямолинейные, неветвящиеся. В мазке мозга Э9–10 преобладали глиобласты, астробласты встречались очень редко (рис. 3).

Менингоэпителий мозга Э9–10 представлен фибробластоподобными клетками. Они имели вытянутую веретенообразную форму. Клетки вступали в тесный контакт между собой, образуя волокна. Цитоплазма этих клеток содержала одно крупное, слегка вытянутое ядро, с одним–четырьмя, иногда большим количеством плотных базофильных ядрышек.

Характерным является тесный контакт между клетками менингоэпителия и глиальными элементами. Очевидно, установление такого типа межклеточных контактов влияет на формирование и функционирование нейрональных элементов путем выделения биологически активных веществ (рис. 3).

Для эмбрионов 11–12-недельного срока развития (Э11–12) характерна не только дальнейшая дифференцировка клеточных элементов, но и установление межклеточных контактов. Часть нейробластов превращалась в молодые нейроны, имеющие округлое или овальное тело, окруженное плотным нейропилем. В центре сомы располагалось ядро правильной круглой формы,

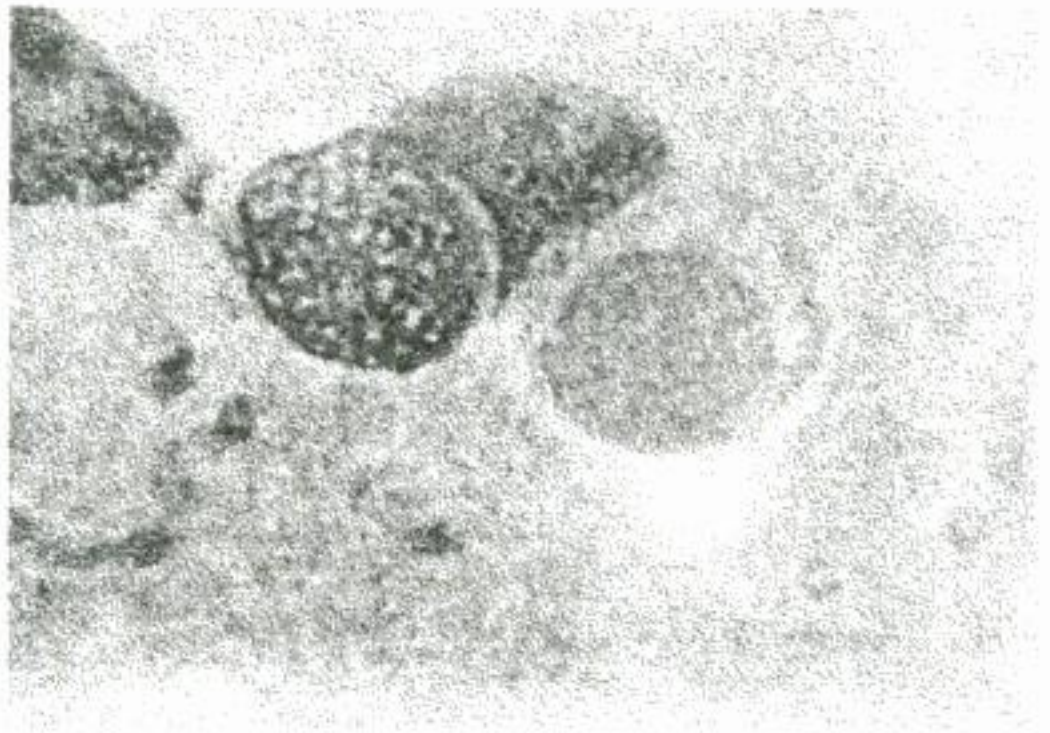


Рис. 2. Нейробласты в мазке мозга Э7–8. Окраска азур-эозин по Романовскому. Видно увеличение количества цитоплазмы с одного полюса клетки на месте будущего аксона

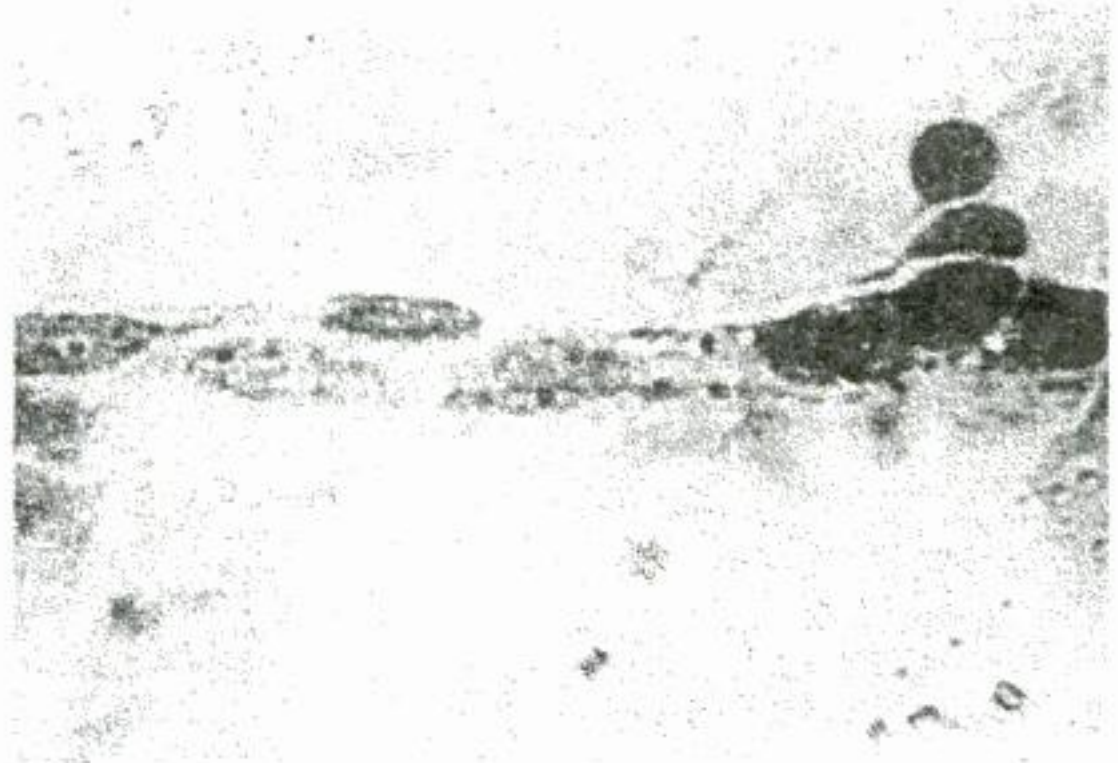


Рис. 3. Менингоэпителий и глиобласт в мазке мозга Э9–10. Окраска азур-эозин по Романовскому

в котором хорошо заметно более темное ядрышко. Ядро окружала гомогенная цитоплазма, содержащая глыбки вещества Ниссля, которые располагаются, как правило, концентрическими слоями вокруг ядра. Иногда можно было проследить отходящие от тела нейрона начальные участки дендритов, обычно также содержащие тельца Ниссля.

Глиальные элементы Э11–12 представлены в основном астробластами со светлыми протоплазматическими отростками. Это довольно крупные клетки округлой или грушевидной формы с двумя или более отростками, один из которых всегда более длинный и более выраженный. Возможно, этот отросток у астробластов является аналогом так называемых астроцитарных ножек астроцитов, устанавливающих контакт со стенкой капилляров и тем самым обеспечивающих трофическую функцию глии.

Элементы мозга 13 недель гестации (Э13) представлены в основном дифференцирующимися нейронами, встречались еще и нейробластные клетки. Наличие малодифференцированных нейробластов подтверждает гипотезу о гетерохронии созревания нейронов ЦНС [2].

Дифференцирующиеся нейроны — это крупные клетки с относительно небольшим ядром и большим количеством цитоплазмы, в которой присут-

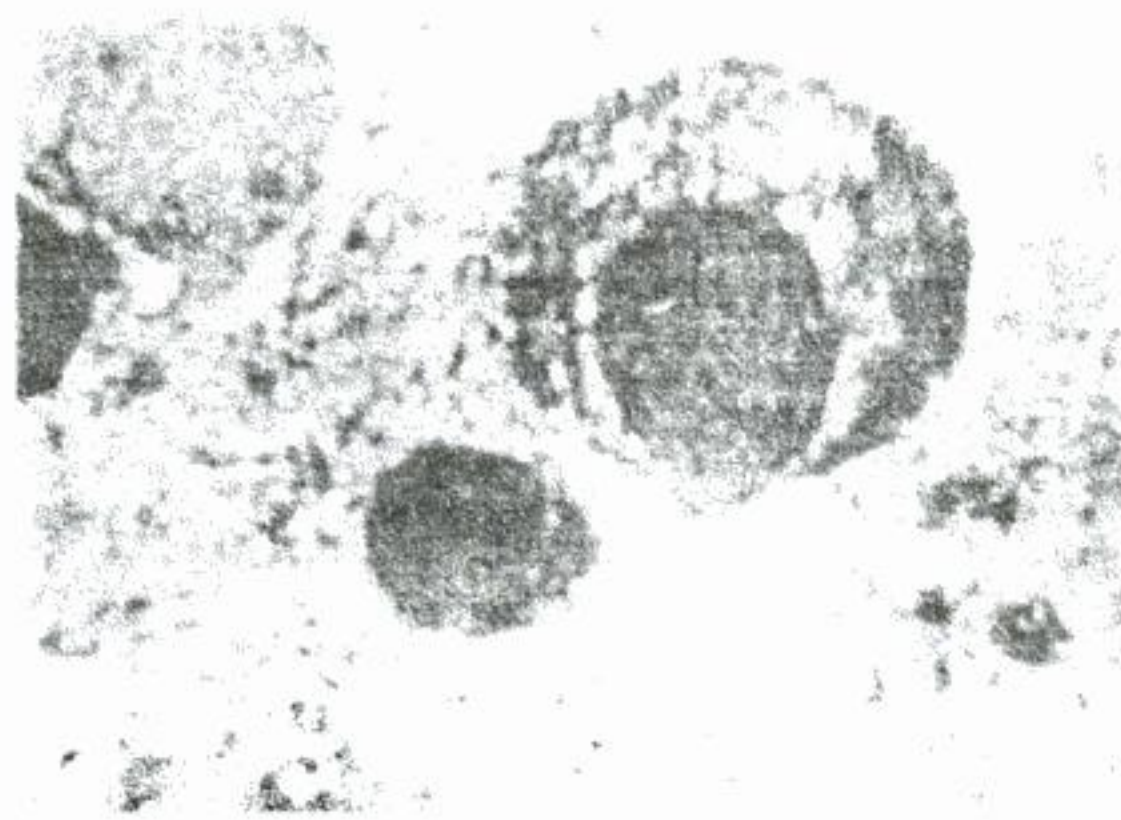


Рис. 4. Дифференцирующийся нейрон в мазке мозга Э13. Окраска метиленовым синим по Ниссля



Рис. 5. Устройство нейропилия в мазке мозга Э13. Окраска метиленовым синим по Ниссля

вуют глыбки вещества Ниссля. У молодых нейронов вещество Ниссля имело мелкодисперсную облакоподобную структуру, выявляемую при окрашивании по Ниссля. В цитоплазме более дифференцированных нейронов вещество Ниссля представлялось в виде большого количества разнообразных гранул; располагающихся вокруг ядра, отчего цитоплазма приобрела сетчатую структуру (рис. 4).

Характерным для этого срока гестации является формирование сложного нейропилия. Отростки нейральных и глиальных элементов, переплетаясь, образовывали сложную структурную сеть (рис. 5).

Глиальные элементы приобретали типичный астроцитарный вид с разветвленной системой отростков и ядром без ядрышек либо с одним ядрышком, расположенным центрально.

Таким образом, в результате проведенных исследова-

ний було встановлено, що в період розвитку от 5–13 тижнів ембріональний мозок людини представлений малодиференційованими клітинами наступних типів: медуллобластами, нейробластами на різних стадіях диференціювання, гліобластами, астроцитами.

На 10–11-й тижні з'являється менингеоцити. Утворення диференційованих нейронів відбувається в кінці 12-го і на початку 13-го тижнів.

Активно протікаючі процеси проліферації кліток мозку людини, спостережені у ембріонів 7–9 тижнів гестації, дозволяють передбачити, що саме такі трансплантати здатні восполнити структурний дефіцит патологічно зміненого мозку реципієнта, а 10–12-тижневий трансплантат — функціональний дефіцит, так як саме в цей термін розвитку ембріонального мозку людини спостерігається становлення і обособлення нейронних і гліальних елементів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бехтерева Н. П., Гилерович Е. Г., Гурчин Ф. А. О трансплантации эмбриональных нервных тканей в лечении паркинсонизма // Журнал невропат. и психиатрии им. С.С.Корсакова. — 1990. — 90. — № 11. — С. 10–13.
2. Грачева И. Д. Сроки возникновения и пути миграции клеток в гистогенезе коры полушарий большого мозга // Архив анатомии. — 1973. — Т. 65. — С. 21–29.
3. Гребенникова Н. В., Буркова М. И., Фисенко А. П. и др. Влияние трансплантации фетальных тканей человека на развитие высших психических функций у детей с болезнью Дауна // Клинический вестник. — 1995. — № 2. — С. 44–45.
4. Руководство по культивированию нервной ткани. Методы. Техника. Проблемы. — М.: Наука, 1976. — С. 352.
5. Сипитый В. К., Пятикоп В. А., Чмут В. А. и др. Современные данные о применении криоконсервированной эмбриональной мозговой ткани для трансплантации больным с травматическими повреждениями спинного мозга // I з'їзд укр. товариства кріобіології і кріомедицини. — Харків, 1995. — С. 235–237.
6. Трансплантация ткани мозга в биологии и медицине. — М.: Наука, 1993. — С. 239.
7. Backlund E. D., Granberg P. O., Hamberger B. et al. Transplantation of adrenal medullary tissue to striatum in parkinsonism: First clinical trials // J. Neurosurg. — 1985. — Vol. 62, № 2. — P. 169–173.
8. Clowry Gavin, Sieradzka Kotarzyna, Vroba Gierta. Transplants of embryonic motoneurons to adult spinal cord: Survival and innervation abilities // Trends Neurosci. — 1991. — 14, № 8. — P. 355–357.
9. Molina H., Quinones R., Galarraga J. et al. Human fetal substantia nigra transplants to the candidate nucleus as treatment for parkinson's disease // Трансплантация ткани мозга млекопитающих Тез. докладов. — Пушкино, 1988. — С. 73.
10. Rosenfeld Jeffrey V. Human neural transplantation // J. Clin. Neurosci. — 1994. — 1, № 4. — P. 231–242.

Ин-т проблем кріобіології
і кріомедицини НАН України, г. Харків

Поступила 17.07.97

Н. М. БАБЕНКО, І. А. ВОТЯКОВА, Г. С. ЛОБИНЦЕВА

ОСОБЛИВОСТІ ПРОЛІФЕРАЦІЇ І ДИФЕРЕНЦІАЦІЇ НАТИВНИХ І КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ЕМБРІОНАЛЬНИХ НЕРВОВИХ КЛІТИН ЛЮДИНИ. ПОВІДОМЛЕННЯ 1. КЛІТИННИЙ СКЛАД МОЗКУ ЕМБРІОНІВ ЛЮДИНИ 5–13 ТИЖНІВ ГЕСТАЦІЇ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Вивчено клітинний склад мозку ембріонів людини 5–13 тижнів гестації для підбору оптимального строку розвитку трансплантатів при лікуванні різних нейродегенеративних захворювань. Встановлено, що у зазначений період розвитку ембріональний мозок людини подано клітинами різних типів: медуллобластами, гліобластами, нейробластами на різних рівнях диференціації та астроцитами. Утворення диференційованих нейронів та втрата ними здатності до поділу відбувається в кінці 12-го і на початку 13-го тижнів гестації.

N. N. BABENKO, I. A. VOTYAKOVA, G. S. LOBYNTSEVA

SPECIFIC FEATURES OF PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION OF NATIVE AND CRYOPRESERVED HUMAN EMBRYONIC NERVOUS CELLS. REPORT I. CELLULAR COMPOSITION OF HUMAN EMBRYONIC BRAIN, AGED 5–13 WEEKS OF GESTATION

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

A cellular composition of the human embryonic brain, aged 5–13 weeks of gestation, was studied for selecting the optimum terms of development of a transplant for treatment of various neurodegenerative disorders. It was found that at the given stage of development the human embryonic brain is represented by the cells of the following types: medulloblasts, glioblasts, neuroblasts at various stages of differentiation, and astroblasts. Formation of differentiated neurons the loss of their ability for cleavage occurs at the end of 12 and beginning of 13 weeks of gestation.

УДК 612.111.13:577.352.4:57.043

И.Ф.Коваленко, Ю.Е.Панина, Л.Ф.Розанов

МЕХАНИЗМ И ДИНАМИКА ПОВРЕЖДЕНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА В ГИПЕРТОНИЧЕСКОМ РАСТВОРЕ ПРОНИКАЮЩЕГО В КЛЕТКИ КРИОПРОТЕКТОРА

Методами микроскопии, малоуглового рассеяния света и численного моделирования изучен процесс гемолиза эритроцитов человека в гипертонических растворах проникающих в клетки криопротекторов. Теоретические представления об этом процессе, предсказывающие, что он происходит вследствие образования мембранной поры в периодически изотропно растягиваемой мембране, удовлетворительно согласуются с экспериментальными данными.

По современным представлениям необходимым условием для гемолиза эритроцитов является образование мембранной поры, размеры которой превышают размер молекулы гемоглобина. Образование такой поры происходит вследствие растяжения мембраны, причиной которого может стать, например, оводнение клетки, при котором ее объем превышает исходное значение после помещения клетки в гипотоническую среду, а также при экспозиции в среде, в которой осмотическое давление не проникающего через клеточные мембраны компонента имеет меньшее значение, чем осмотическое давление физиологической среды. Причиной этого процесса может быть также возникновение проницаемости клеточной мембраны для в норме не проникающего сквозь нее внеклеточного растворенного вещества, что может быть обусловлено как прямым химическим взаимодействием клеточных мембран с окружающим клетку раствором, так и пластической деформацией клеточных мембран на этапе дегидратации клеток.

Проведенное нами микроскопическое исследование процесса гемолиза эритроцитов донорской крови человека в первоначально гипертонических водных растворах глицерина, 1,2-пропандиола и диметилсульфоксида, которые не содержат не проникающих в клетки добавок, а также в водных растворах хлорида натрия, выявило следующее. В гипертонических растворах NaCl гемолизу дегидратированных клеток предшествуют увеличение объема первоначально обезвоженных клеток и трансформация их в округлые формы. Это, по-видимому, свидетельствует о том, что гемолизу в данном случае предшествует возникновение мембранной проницаемости для ионов натрия, которые в норме можно считать не проникающими через клеточные мембраны эритроцитов.

Изучение процесса гемолиза эритроцитов в водных растворах глицерина с концентрациями 1, 3 и 6 М под микроскопом показало, что время регидратации эритроцитов до исходного объема составляет соответственно 40, 60 и 300 с. В дальнейшем процесс набухания идет по пути “дискоцит — стоматоцит — набухший стоматоцит — сфероцит”. Набухший стоматоцит (рис. 1) был преимущественной предгемолитической формой эритроцитов в растворах глицерина, не содержащих непроникающих добавок. Процесс гемолиза состоит из двух четко выраженных стадий: 1) резкое потемнение фазово-контрастного изображения набухшей клетки, которое сопровождается потерей ею светлого ореола, а иногда и смещением клетки в горизонтальном направлении; 2) постепенное обесцвечивание изображения клетки до полного слияния ее с фоном. Первая стадия протекает настолько быстро, что кадровая съемка с частотой 1 кадр/с позволяет зафиксировать только начальное и конечное состояния. Эта стадия, по нашему мнению, связана с выбросом части гемоглобина из клетки во внеклеточную среду. Вторая стадия, возможно, обусловлена дальнейшим более медленным выходом гемоглобина из клетки наружу. Отметим тот факт, что форма белых и красных теней непосредственно после гемолиза близка к стоматоциту (рис. 2), что, по-видимому, свидетельствует о том, что постепенно тени возвращаются к равновесной для них при отсутствии деформации форме — дискоциту. Первая стадия гемолиза иногда сопровождается внезапным перемещением клетки на расстояния, сравнимые с ее размером, что объясняется реактивным эффектом [2]. На второй стадии гемолиза скорость обесцвечивания эритроцитов уменьшается по мере увеличения исходной концентрации криопротектора в гипертоническом растворе, окружающем клетки. Например, в 1, 3 и 6 М раство-

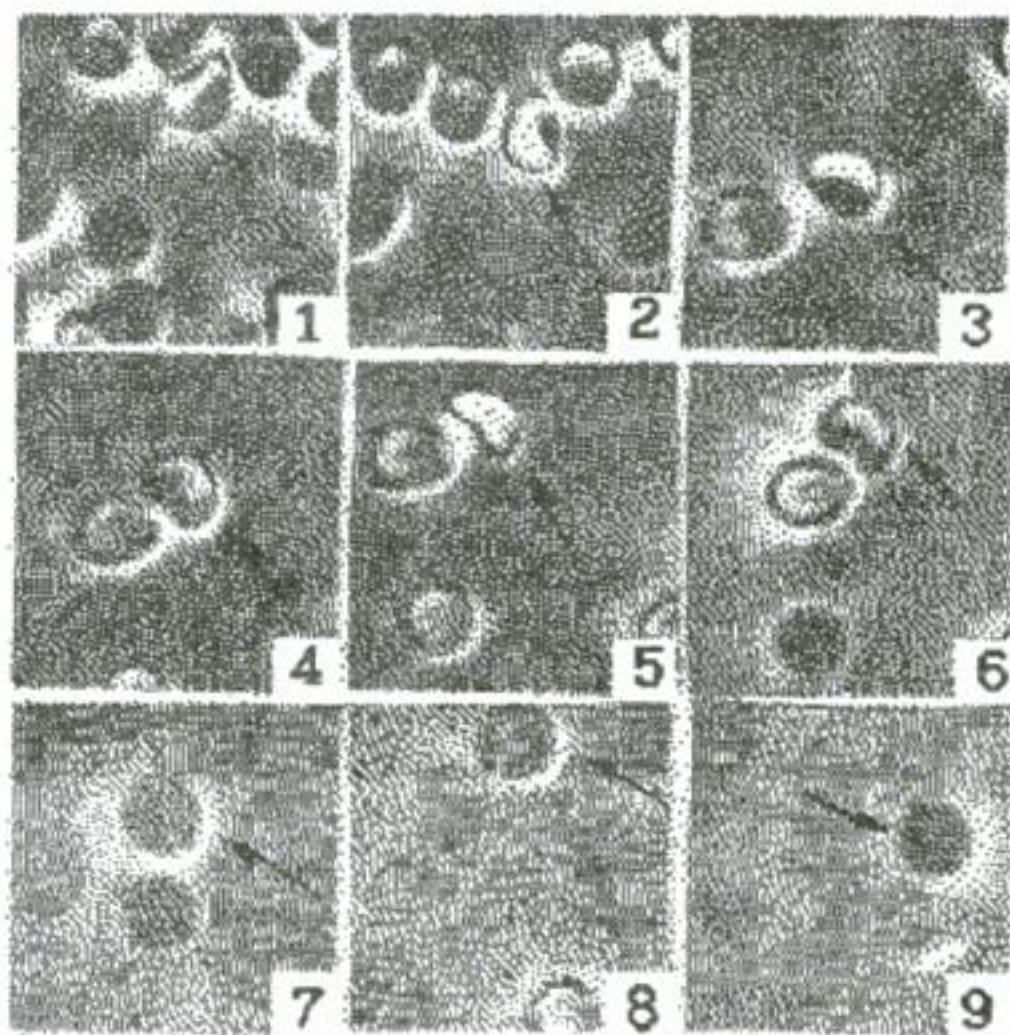


Рис. 1. Трансформация и гемолиз эритроцитов человека в 1 М водном растворе глицерина в зависимости от времени (с): 1 — 122; 2 — 138; 3 — 170; 4 — 178; 5 — 186; 6 — 194; 7 — 258; 8 — 350; 9 — 354

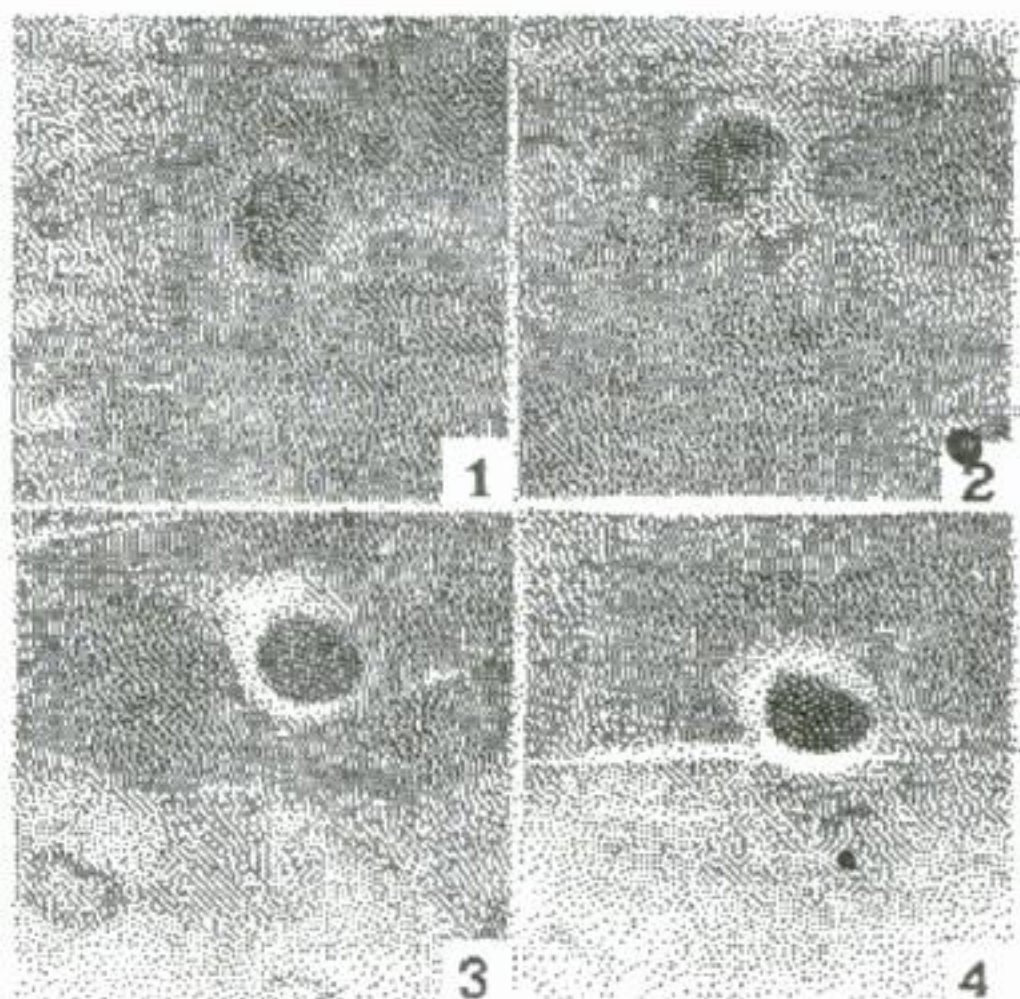


Рис. 2. Формы красной и белых теней эритроцитов, появляющиеся в процессе гемолиза клеток в 1 М водном растворе глицерина в зависимости от времени (с): 1 — 640; 2 — 720; 3 — 1000; 4 — 1005

рах глицерина среднее время обесцвечивания составляет соответственно 15, 30 и 60 с.

Как правило, набухание эритроцитов до начала гемолиза происходит преимущественно без видимых нарушений мембранной проницаемости до момента начала гемолиза. Однако некоторые клетки подвергаются гемолизу в самом начале экспозиции в гипертонических растворах, не проходя стадий трансформации “дискоцит – стоматоцит – набухший стоматоцит”. Эксперименты показывают, что существует определенный для каждого криопротектора критический уровень его концентрации, превышение которого ведет к резкому снижению времени 50%-го гемолиза. Возможно, это объясняется значительным увеличением проницаемости мембран эритроцитов для молекул криопротекторов при таких концентрациях. В пользу такого предположения свидетельствует тот факт, что с увеличением концентрации криопротектора прирост гемолиза в первые минуты экспозиции в соответствующем растворе заметно возрастал.

Нами изучена кинетика гипотонического гемолиза эритроцитов методом численного моделирования этого процесса с использованием уравнений трансмембранного переноса веществ Кедем–Качальского [4]. Физическая модель гипотонического лизиса эритроцитов базируется на том факте, что при отсутствии не проникающих через клеточные мембраны веществ в окружающей клетки среде, даже если начальная концентрация внеклеточного раствора является гипертонической, клетки после сравнительно быстрого обезвоживания не только восстанавливают объем до исходного значения, но и значительно превышают его. При этом мембрана клетки по мере ее оводнения превращается в сферу, а затем подвергается изотропному растяжению, достигая значений, при которых в ней неизбежно образуется макроскопическая пора [1]. Этот процесс является вероятностным и описывается статистически [4]. Образование макроскопической поры и наличие избыточного внутриклеточного давления, которое по закону Лапласа связано с натяжением мембраны, приводят к выбросу части внутриклеточного содержимого, в том числе и гемоглобина, из клетки наружу, в результате чего объем клетки в момент начала гемолиза немного уменьшается и натяжение мембраны также понижается. При этом пора в мембране “залечивается”, после чего снова начинается увеличение объема клетки под действием осмотических сил, так как произошедший до этого выброс части внутриклеточного содержимого не

Экспериментальная и теоретическая зависимости времени (с), при котором интенсивность рассеяния суспензией эритроцитов под углом 9° к направлению падающего пучка света становится максимальной ($t_{\max}$), уменьшается на четверть ($t_{1/4}$) и наполовину ($t_{1/2}$) для разных концентраций внеклеточного водного раствора глицерина при температуре 37°C и $pH = 7,0$.

Концентрация глицерина, % (об/об)	Эксперимент		
	Теория		
	$t_{\max}$	$t_{1/4}$	$t_{1/2}$
10	$20,0 \pm 4,5$	$67,3 \pm 5,5$	$103,0 \pm 12,1$
	20	90	117
20	$30,1 \pm 3,5$	$165,8 \pm 8,2$	$238,6 \pm 13,0$
	30,1	165	240
30	$39,2 \pm 4,8$	$277,7 \pm 14,3$	$422,4 \pm 26,2$
	39,2	270	420

приводит к исчезновению трансмембранного градиента концентрации растворенных веществ. Далее процесс гемолиза циклически продолжается до тех пор, пока не произойдет практически полный гемолиз. Расчетные данные о времени 50%-го гемолиза, полученные с помощью физико-математической модели, опирающейся на такие представления, вполне удовлетворительно согласуются с экспериментальными данными (таблица), что свидетельствует в пользу выдвинутых модельных представлений о гемолизе эритроцитов в гипертонических растворах проникающих в клетки веществ. Однако не вполне ясным остается вопрос о влиянии на этот процесс распределения клеток по размерам, форме и механическим характеристикам их мембран.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гордиенко Е. А., Гордиенко О. И. О механизме осмотического лизиса эритроцитов // Криобиология. – 1986. – № 2. – С. 23–25.
2. Гордиенко Е. А., Некоз И. А. Реактивный эффект при осмотическом лизисе клеток // Биол. мембраны. – 1989. – 6, № 11. – С. 1170–1175.
3. Гордиенко Е. А., Пушкарь Н. С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. – Киев: Наук. думка. – 1994. – 143 с.
4. Katchalsky A., Kedem O. Thermodynamics of flow processes in biological systems // Biophys. J. – 1962. – № 2. – P. 53–78.

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

Поступила 11.11.97

І. Ф. КОВАЛЕНКО, Ю. Є. ПАНІНА, Л. Ф. РОЗАНОВ

МЕХАНІЗМ І ДИНАМІКА ПОШКОДЖЕННЯ ЕРИТРОЦИТІВ ЛЮДИНИ В ГІПЕРТОНІЧНОМУ РОЗЧИНІ ПРОНИКАЮЧОГО В КЛІТИНИ КРІОПРОТЕКТОРА

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Методами мікроскопії, малокутового розсіювання світла та чисельного моделювання було вивчено процес гемолізу еритроцитів людини в гіпертонічних і гіпотонічних розчинах проникаючих у клітини кріопротекторів. Теоретичні уявлення про цей процес, які передбачають, що він має місце внаслідок утворення мембранної пори в мембрані, яка періодично ізотропно розтягується, задовільно збігаються з експериментальними даними.

I. F. KOVALENKO, YU. E. PANINA, L. F. ROZANOV

MECHANISM AND DYNAMICS OF INJURY OF HUMAN RED CELLS IN HYPERTONIC SOLUTION OF PENETRATING CRYOPROTECTANTS

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

The process of hemolysis of human red cells in hypertonic solutions of penetrating cryoprotectants was studied using methods of spectroscopy, low-angle scattering of light and numerical modelling. Theoretical knowledge of this process, which predict it to occur due to formation of a membrane pore in a arbitrarily stretched membrane, nicely correlate with experimental data.

УДК 57.043:612.111.45: 577.112

Т.П.Бондаренко, Н.А.Лупилова

ИСХОДНЫЕ УСЛОВИЯ И УСТОЙЧИВОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ К ОСМОТИЧЕСКОМУ СТРЕССУ. 1. ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведено исследование барьерных характеристик эритроцитов (по выходу гемоглобина) и их сохранности по уровню флуоресценции флуоресцеиндиацета (ФДА) в условиях действия сильного гипертонического стресса (3,00–4,00 М NaCl) в зависимости от начальных условий обработки (0,15–3,00 М NaCl). Полученные результаты указывают на существование умеренно ги-

пертонических областей концентрации NaCl, в пределах которых клетки имеют повышенную устойчивость к действию длительного осмотического стресса.

Среди многих факторов, действующих на клетки в зоне низких температур и способных вызвать их повреждение, можно выделить несколько основных. Если исключить механические факторы, сопровождающие кристаллизацию и рекристаллизацию, то среди остальных повреждающих факторов особого внимания заслуживают две группы: первая связана с процессами, развивающимися при снижении температуры (температурозависимые изменения, прежде всего, холодовой шок), вторая — с изменением осмотических условий (осмотический шок, постгипертонический и изотермический лизис). Глубина развития последних процессов связана с дегидратацией и опосредована модификацией комплекса цитоскелет–мембрана. Если раньше считалось, что дегидратация является повреждающим фактором, то в настоящее время имеются доказательства, что степень дегидратации может способствовать как повреждению, так и повышению устойчивости клеток к действию неблагоприятных факторов.

Цель данного исследования — изучение барьерных характеристик эритроцитов (по выходу гемоглобина) и оценка их устойчивости по флуоресценции флуоресцеиндиацета при действии сильного гипертонического стресса [3] в зависимости от начальных условий обработки клеток, способствующих частичной дегидратации.

Объектом исследования служили эритроциты донорской крови человека, полученные с Харьковской областной станции переливания крови. Эритроциты трижды отмывали от плазмы и других форменных элементов крови по стандартной методике и последующие эксперименты проводили с эритромасой с определенным гематокритом в зависимости от целей эксперимента. Выход гемоглобина определяли спектрофотометрически при 543 нм и выражали в процентах по отношению к содержанию гемоглобина в клетках до начала эксперимента. Насыщение ФДА, отмывку от ФДА и регистрацию флуоресценции эритроцитов осуществляли по методу [3].

Ассоциация белкового скелета с интегральными компонентами плазматической мембраны обеспечивает сохранение ее непрерывности. При действии температуры и осмотического стресса белковый цитоскелет может качественно изменять свое структурное состояние [1,2]. Его стабильность, а следовательно, и стабильность клетки зависят от концентрации белка в единице объема внутриклеточного растворителя. Указанная специфика влияния процессов, связанных с удалением части внутриклеточного растворителя, видна из данных, представленных на рис. 1, 2.

Результаты экспериментов, в которых клетки исходно (10 мин) инкубировались в растворах с концентрацией NaCl 0,15 и 3,00 М, а затем на 180 мин помещались в 3,00 М NaCl, показали, что повышение концентрации NaCl на первом этапе выше 0,65 М (рис. 1, кривая 1) сопровождается в изотермических условиях ($37 \rightarrow 37^\circ\text{C}$) резким возрастанием осмотической чувствительности эритроцитов при наличии максимума чувствительности и концентрации NaCl 1,00–1,20 М. При сдвиге температуры на втором этапе (рис. 1, кривая 2) до 0°C не отмечается каких-либо изменений в профилях кривых, отражающих взаимосвязь между чувствительностью клеток к осмотическому воздействию и осмолярностью среды на первом этапе. Можно

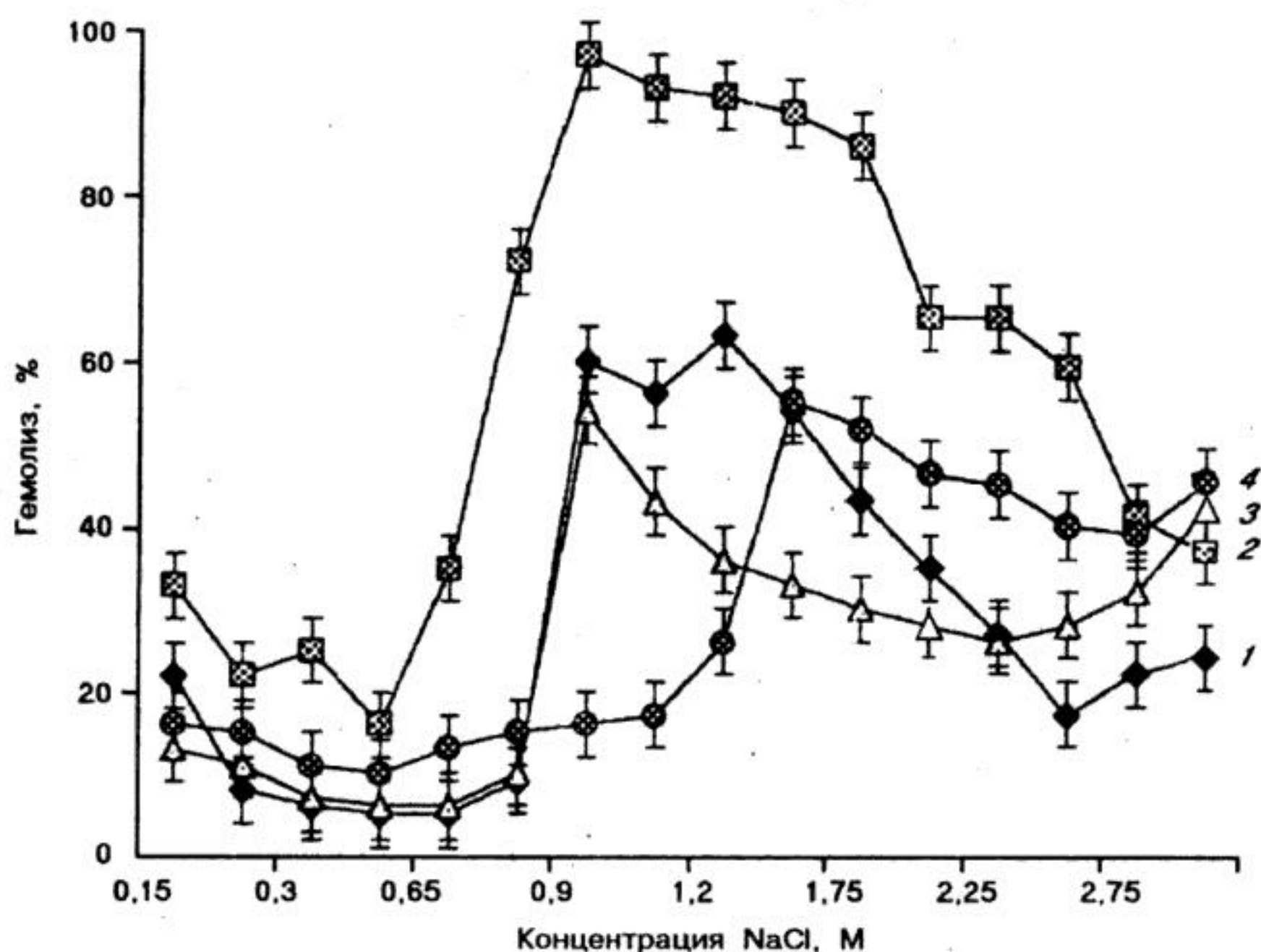


Рис. 1. Влияние начальных условий обработки эритроцитов (0,15–3,00 М NaCl, 10 мин) на их чувствительность к гипертоническому стрессу (180 мин, 3,00 М NaCl). 1 — 37 → 37 °C; 2 — 37 → 0 °C; 3 — 0 → 0 °C; 4 — 0 → 37 °C

говорить лишь о резком увеличении числа нестабильных клеток при переходе через область концентрации NaCl в 0,65 М.

При сопоставлении данных (рис. 1 и 2), когда было увеличено время инкубации на первом этапе до 60 мин, можно видеть, что процессы протекают практически одинаково. При этом очевидно наличие двух клеточных популяций, одна из которых характеризуется осмотической чувствительностью (кривые 1), а другая — температурной (кривые 2). При сдвиге температуры происходит более ранняя модификация структурных механизмов, контролирующих реактивность клеток по отношению к долговременному осмотическому шоку. Скорее всего у всех клеток уменьшается число контактов, связывающих цитоскелет и мембрану и контролирующих барьерные свойства клетки.

При изотермическом варианте 0 → 0 °C (рис. 2, кривая 3) отмечаются сужение области максимальной чувствительности и смещение ее в область концентраций 0,65–0,95 М по сравнению с 0,95–1,20 М (рис. 1, кривая 3).

Анализ второго неизотермического варианта 0 → 37 °C (рис. 1, 2, кривые 4) указывает на расширение области осмолярности, в пределах которой клетки приобретают устойчивость к длительному осмотическому стрессу. Она смещается с 0,45 М (рис. 1, кривая 4) до 0,45–1,60 М NaCl (рис. 2, кривая 4). Очевидно, в данном случае имеет место ситуация, при которой низкая температура (0 °C) и дегидратация увеличивают число контактов, а низкая температура — прочность этих контактов.

Из данных, представленных на рис. 1 и 2, наибольший интерес заслуживают результаты, указывающие на существование умеренно гипертонических

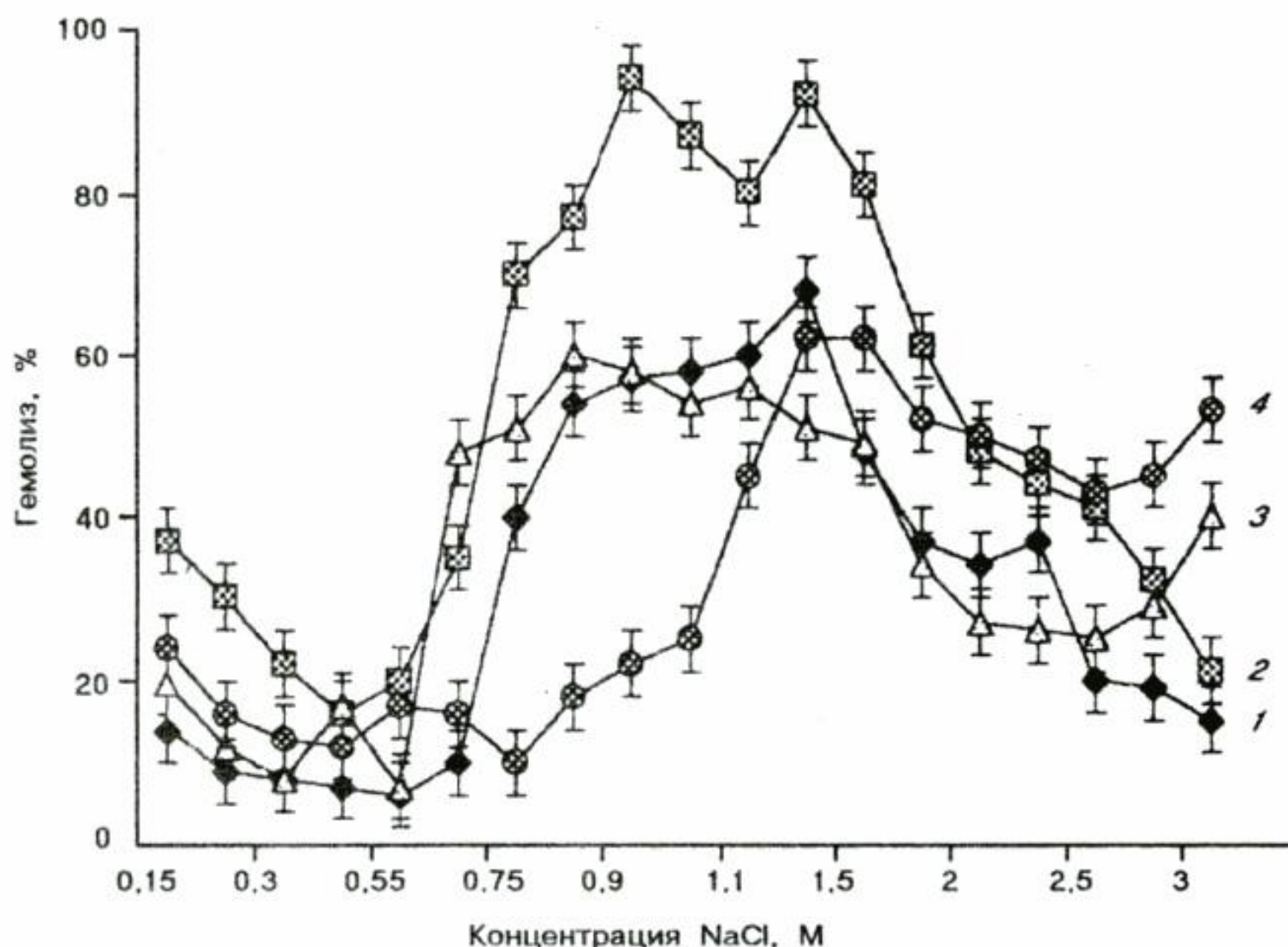


Рис. 2. Влияние начальных условий обработки эритроцитов (0,15–3,00 М NaCl, 60 мин) на их чувствительность к гипертоническому стрессу (180 мин, 3,00 М NaCl). 1 — 37 → 37 °C; 2 — 37 → 0 °C; 3 — 0 → 0 °C; 4 — 0 → 37 °C

областей NaCl, при которых клетки имеют повышенную устойчивость к действию длительного осмотического стресса. В связи с этим в последующих экспериментах использовали для исходной обработки клеток на первом этапе только эту область концентраций NaCl, а на втором, кроме того, повысили осмотический стресс, увеличив концентрацию NaCl до 4,00 М. Из данных, представленных на рис. 3, видно, что при осмотическом шоке в цикле 0–0 °C наблюдается отчетливый максимум сохранности в интервале 0,40–0,50 М NaCl с двумя ветвями снижения сохранности: левой — изотонической и правой — гипертонической. Эти дан-

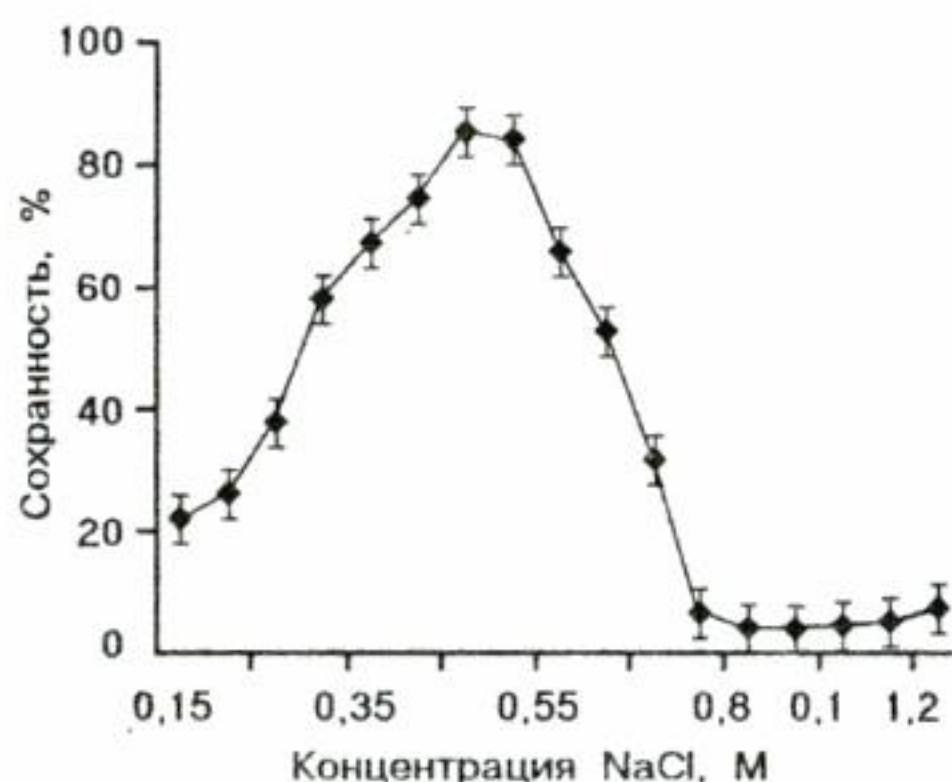


Рис. 3. Зависимость между исходной тоничностью среды и чувствительностью эритроцитов к переносу в 4,00 М NaCl (0 → 0 °C). Время инкубации на каждом этапе 10 мин

ные послужили основой для постановки экспериментов по флуоресцентному исследованию эритроцитов с использованием ФДА, который только в жизнеспособных клетках обладает способностью под действием биохимических превращений переходить во флуоресцирующую форму, что позволяет судить о количестве жизнеспособных клеток. Клетки насыщали ФДА при изотонических условиях и при условии их максимальной стабильности — 0,45 М NaCl, а затем клетки на 0–120 мин помещали в растворы NaCl (0,15–0,90 М). Результаты исследования приведены на

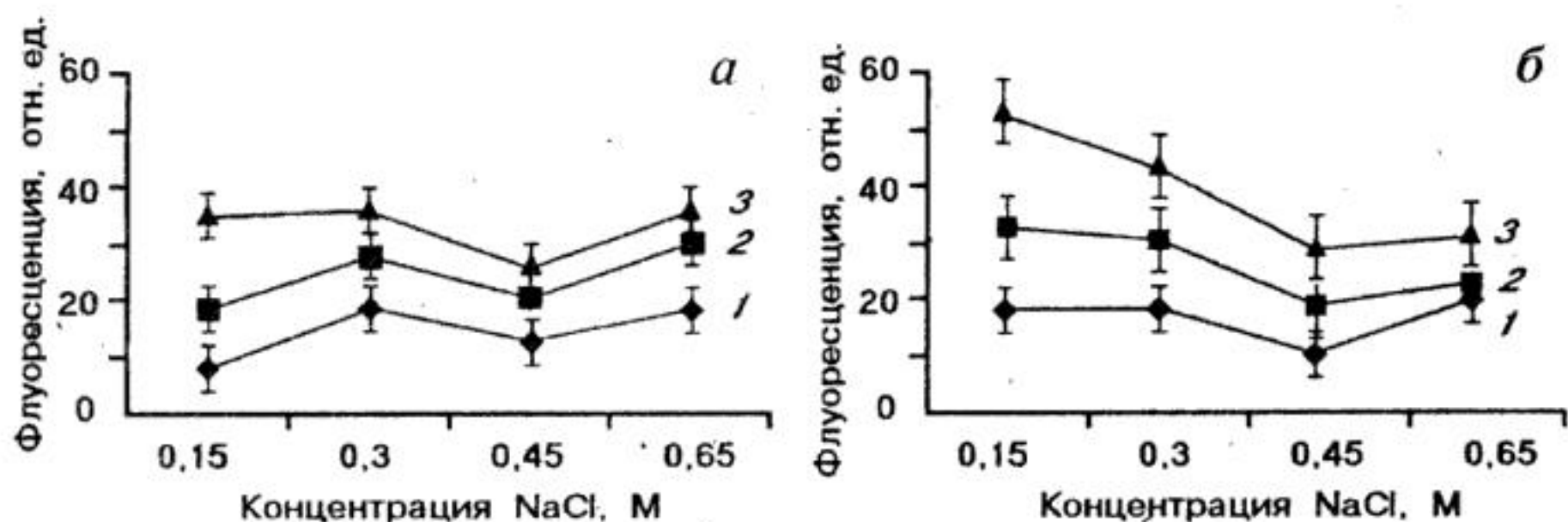


Рис. 4. Уровень флуоресценции ФДА суспензии эритроцитов (0–2 ч) в зависимости от условий обработки и концентрации NaCl в наружной среде: а — насыщение эритроцитов ФДА в 0,15 М NaCl, б — в 0,45 М NaCl. 1 — 0 ч инкубации; 2 — 1 ч; 3 — 2 ч

рис. 4. Исследование суммарной флуоресценции суспензии эритроцитов показало наличие минимума флуоресценции в области 0,45 М концентрации NaCl, причем временные профили кривых совпадали. Однако эти данные свидетельствовали о том, что жизнеспособность клеток в “лучших условиях” была меньше. Это означало наличие какого-то артефакта. Согласно данным, гемоглобин мешает определению истинного значения флуоресценции. Чем больше гемоглобина, тем меньше флуоресценция. Наличие экранирования молекулами гемоглобина флуоресценции ФДА подтвердили исследования, проведенные при добавлении растворов гемоглобина с различной концентрацией к образцам с одинаковым уровнем флуоресценции (данные не приведены). Оказалось, что чем больше концентрация гемоглобина, тем больше экранируется исходный уровень флуоресценции. Очевидно, этим фактом можно объяснить и растущую во времени (рис. 4) флуоресценцию объектов. Незначительная потеря гемоглобина во времени способствовала росту флуоресценции. Исследование надосадков (рис. 5) эритроцитарных суспензий показало также наличие в флуоресценции в области 0,45 М минимума концентрации NaCl. Это согласуется с наличием минимальной концентрации гемоглобина, вышедшего из клеток в окружающую среду (рис. 6). Завышенный уровень гемоглобина связан с тем, что используется раствор ФДА, приготовленный на ацетоне, обладающем гемолитической активностью.

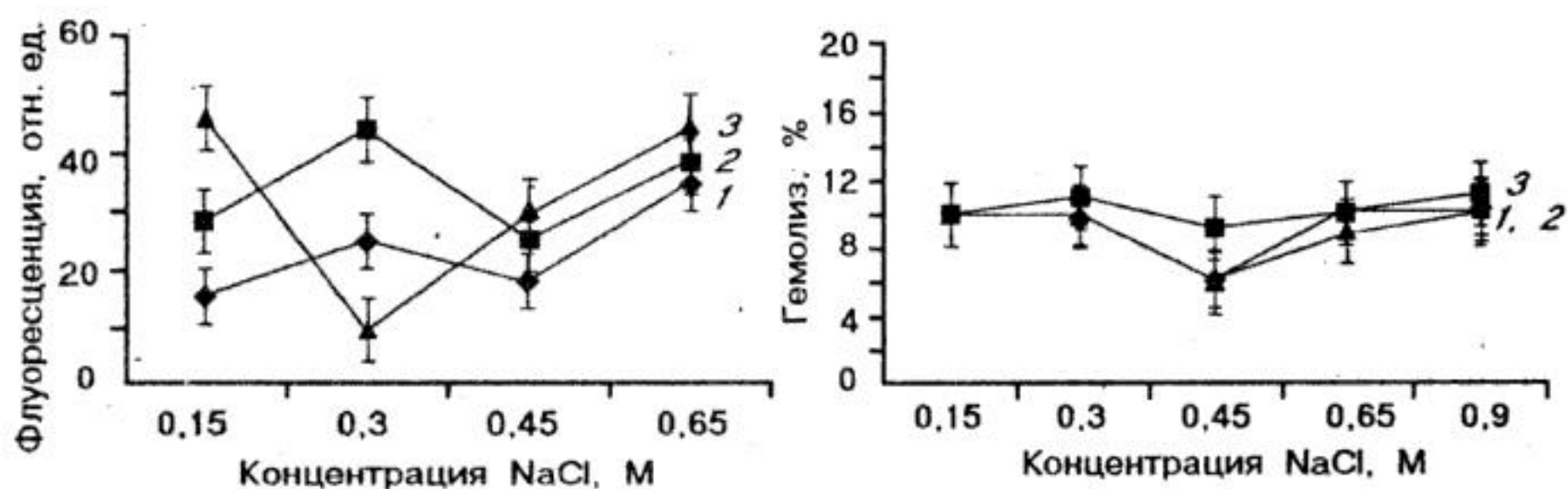


Рис. 5. Уровень флуоресценции ФДА в супернатантах эритроцитов после инкубации (0–2 ч) в растворах NaCl (0,15–0,65 М NaCl). 1 — 0 ч инкубации; 2 — 1 ч; 3 — 2 ч

Рис. 6. Влияние исходной обработки эритроцитов 0,45 М раствором NaCl на их чувствительность к переносу в 0,15–0,9 М NaCl. 1 — 0 ч инкубации; 2 — 1 ч; 3 — 2 ч

рыми обрабатываются клетки на начальных этапах. Имеется область концентраций NaCl 0,45–0,65 М, обеспечивающая повышение стабильности клеток к действию сильного осмотического фактора (3,00–4,00 М NaCl) во времени (0–180 мин). Анализ сохранности эритроцитов с использованием ФДА затруднен из-за экранировки флуоресценции гемоглобином.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоус А. М., Бондаренко В. А. Структурное изменение биологических мембран при охлаждении. – Киев: Наук. думка, 1982. – 256 с.
2. Бондаренко Т. П. Осмолярность и температура среды как факторы, регулирующие чувствительность эритроцитов к охлаждению и осмотическому стрессу: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Харьков, 1994. – 47 с.
3. Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. – М.: Наука, 1980. – 320 с.

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

Поступила 18.10.97

Т. П. БОНДАРЕНКО, Н. О. ЛУПИЛОВА

ПОЧАТКОВІ УМОВИ ТА СТІЙКІСТЬ ЕРИТРОЦИТІВ ДО ОСМОТИЧНОГО СТРЕСУ. 1. ФЛУОРЕСЦЕНТНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Досліджено бар'єрні характеристики еритроцитів (за виходом гемоглобіну) та їх цілість (за рівнем флуоресценції флуоресцеїндіацета (ФДА) при дії сильного гіпертонічного стресу (3,00–4,00 М NaCl) в залежності від початкових умов обробки (0,15–3,00 М NaCl). Отримані результати вказують на користь існування помірно гіпертонічних зон концентрації NaCl, у межах яких клітини мають підвищену стійкість до дії тривалого осмотичного стресу.

T. P. BONDARENKO, N. A. LUPILOVA

ORIGINAL CONDITIONS AND RESISTANCE OF RED CELLS TO OSMOTIC STRESS. 1. FLUORESCENCE STUDIES

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

The authors studied barrier characteristics of red cells (by hemoglobin production) and their survival (by the level of fluorescence — FDA) under the action of strong hypertonic stress (3.00–4.00 M NaCl) depending on the original conditions of exposure (0.15–3.00 M NaCl). The results obtained testify to the existence of moderate hypertonic regions of a NaCl concentration, within which the cells demonstrate increased resistance to the action of long-term osmotic stress.

УДК 611-018.51:57.043.043+57.086.2:681.7.014

Л. Г. Кулешова

ГИПОТЕРМИЧЕСКАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ ФОРМЫ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА КАК ОЦЕНКА СТЕПЕНИ ВЫРАЖЕННОСТИ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА

Методом световой микроскопии на микроскопе МБИ-15У с фотографической регистрацией морфологической картины крови изучена устойчивость формы эритроцитов больных вибрационной болезнью в условиях их гипотермического хранения при 4 °С. Установлено, что в зависимости от тяжести патологического процесса в морфоэритрограммах прослеживается прогрессирующее нарастание куполообразных форм эритроцитов (стоматоцитоз). Получены кинетические зависимости накопления предемолитических форм эритроцитов от сроков гипотермического хранения крови, позволяющие дифференцировать степень заболевания вибрационной болезнью.

Гемореологические свойства крови играют важную роль в патогенезе самых различных заболеваний. Основными характеристиками, определяющими текучесть крови в капиллярах, являются ее вязкость и деформируемость

эритроцитов. Обладая в норме уникальной способностью к каплеподобному поведению, эритроциты проникают через кровеносные сосуды, которые значительно меньше их собственного размера, осуществляя тем самым текучесть крови и обеспечивая ее кислородно-транспортную функцию [3]. Отношения объема к площади, толщины к диаметру, а также двояковогнутая форма определяют эластичность и пластичность эритроцитов, способствующие изменению формы клетки и ее деформируемости при циркуляции в кровеносном русле. Любой сдвиг геометрических соотношений эритроцитов снижает их пластичность [4]. Установлено, что сферической форме эритроцитов, которая является предгемолитической, соответствует минимум деформируемости [14]. Вполне понятно, что патологические процессы, в основе которых лежат аутоиммунные расстройства, интоксикации, гипоксия, нарушение клеточного метаболизма, должны отражаться, прежде всего, на морфологических и функциональных свойствах эритроцитов.

Известные методики исследования морфологических особенностей эритроцитов при различных патологических процессах в организме (фиксация в спиртах, глютаральдегиде, окраска мазков, сканирующая электронная и фазово-контрастная микроскопия) имеют ряд существенных недостатков, делающих невозможной прижизненную оценку первоначальной формы эритроцитов [7,12].

В данной работе проиллюстрирована чувствительность микроскопического метода анализа состояния эритроцитов человека в различные сроки гипотермического хранения крови при оценке степени выраженности патологического процесса, обусловленного вибрационной болезнью.

Проблема вибрационной болезни остается одной из приоритетных в профпатологии, что связано с высокой распространенностью данного заболевания, достаточно полиморфной клинической симптоматикой с вовлечением в патологический процесс многих органов и систем (периферическое кровообращение, нервная система, опорно-двигательный аппарат). Основными наиболее характерными признаками неблагоприятного воздействия вибрации считаются нервососудистые расстройства в верхних конечностях [11] с системными нарушениями микроциркуляции, гемостаза, транспорта, диффузии и утилизации кислорода. В работах [1, 10] показана роль эритроцитов в нарушении микроциркуляции при вибрационной болезни. Несомненный интерес представляло дальнейшее изучение морфофункциональных характеристик эритроцитов периферической крови больных вибрационной болезнью для уяснения роли этих клеток в формировании клинических проявлений данной патологии.

Объектом исследования служила кровь больных вибрационной болезнью от воздействия локальной вибрации I и II степени тяжести (диагноз степени тяжести вибрационной болезни предварительно устанавливался клиникой НИИ гигиены труда и профессиональных заболеваний г. Харькова). Для контроля служила кровь лиц, никогда ранее не подвергавшихся вибрации.

Исследования проведены методом световой микроскопии на микроскопе МБИ-15У с фотографической регистрацией морфологической картины крови. Общее состояние клеток оценивали в капле, которая помещалась между предметным и покровным стеклами и равномерно распределялась тонким слоем. При этом эритроциты находились во взвешенном состоянии, что позволяло всесторонне фиксировать их форму. Степень устойчивости эритроцитов оценивали в процентном отношении путем количественного подсчета нормоцитов и суммарно трансформированных эритроцитов — по микроснимкам в различные сроки гипотермического хранения крови (до 11 суток)

при температуре 4 °С [6]. В морфологической оценке особенностей формы и поверхностной архитектоники эритроцитов использована классификация, приведенная в [13]. Статистическая обработка экспериментальных данных проводилась по стандартной методике Фишера–Стьюдента для $P = 0,95$ [2].

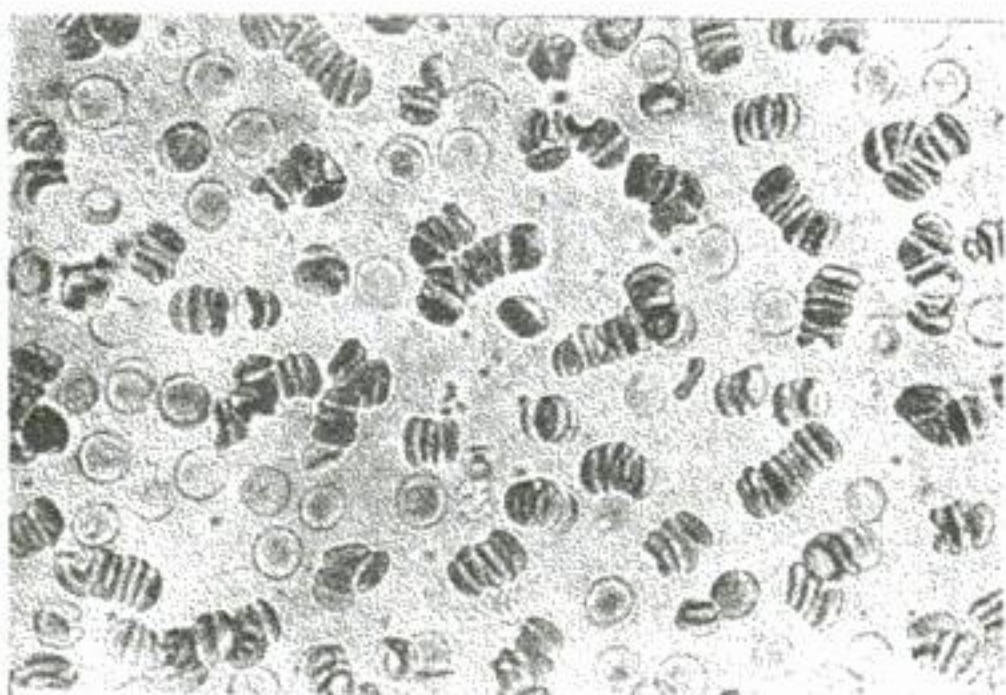


Рис. 1. Морфоэритрограмма крови контрольной группы

формируются короткие линейные столбики эритроцитов, которые во второй стадии агрегации образуют небольшие конгломераты. Эритроциты в столбиках уменьшены в поперечном сечении и несколько утолщены, что указывает на их трансформацию во вздутые диски. Количество эхиноцитарных форм в пределах нормы — до 2,8%.

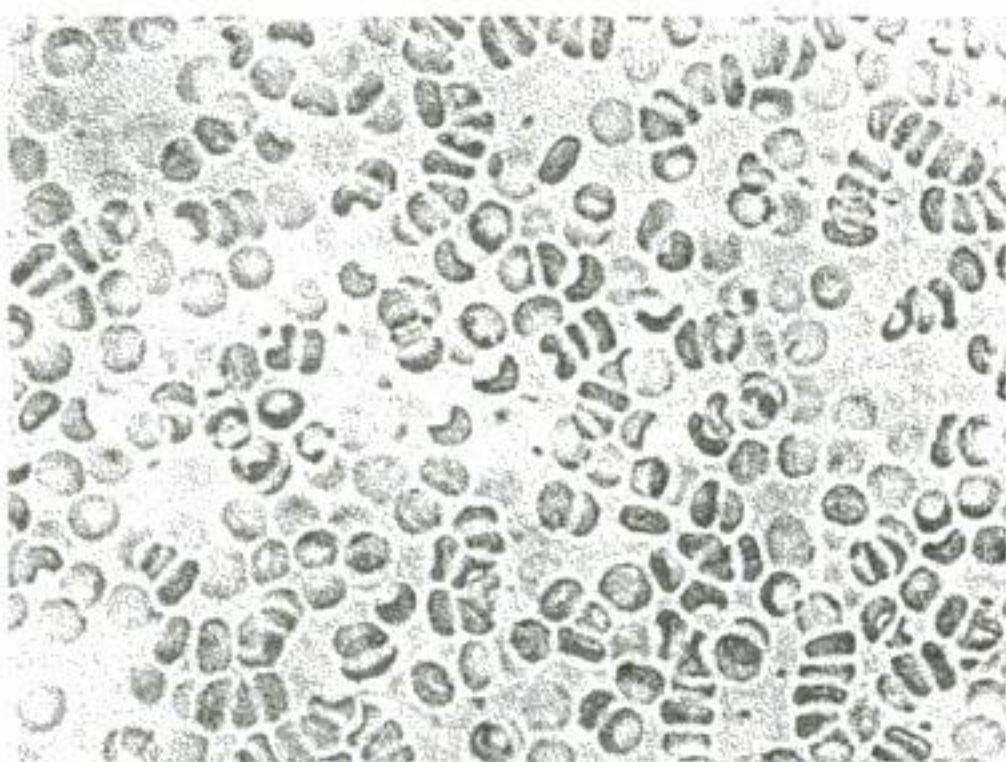


Рис. 2. Морфоэритрограмма крови больных вибрационной болезнью

сти стоматоцитоза при вибрационной болезни нами оценена в условиях гипотермического хранения крови. Кинетика накопления предгемолитических форм эритроцитов в крови больных вибрационной болезнью различной степени тяжести представлена на рис. 3. Видно, что гипотермическая устойчивость эритроцитов больных заметно снижена по сравнению с контролем, причем четко различимы первая и вторая стадии заболевания. Скорость накопления предгемолитических форм составляет: в контрольной группе — 3,5, в крови больных первой стадии — 4, второй — 5%/сут (рис. 3).

Таким образом, проведенный микроскопический анализ морфоэритрограмм позволил установить, что патологический процесс в крови больных вибрационной болезнью сопровождается стоматоцитозом. Снижение же гипотер-

Анализ экспериментальных данных показал, что в морфоэритрограммах крови лиц контрольной группы отмечается формирование разветвленной сети монетных столбиков, эритроциты в которых находятся в двояковогнутой форме. Эхиноцитарных форм — до 2,6% (рис. 1).

В морфоэритрограммах больных вибрационной болезнью наблюдается заметное снижение дискоидных клеток. В первой стадии развития болезни в поле зрения

По мере развития патологического процесса в морфоэритрограммах больных на фоне вздутых дисков наблюдается прогрессивное нарастание преимущественно куполообразных форм — стоматоцитов. В поле зрения заметно повышается количество сфероэхиноцитов до 4,6% (рис. 2).

Поскольку стоматоциты относятся к компенсаторно-приспособительной форме и в определенных условиях возможна их обратная трансформация в дискоциты [5, 9], степень выраженно-

мической устойчивости формы эритроцитов может служить показателем степени выраженности патологического процесса.

Своеобразием структуры эритроцитарной клетки является наличие единственной органеллы — мембраны. Естественно, что изменение формы эритроцита свидетельствует о ее нарушении. Согласно мозаично-жидкостной гипотезе, мембрана эритроцита состоит из двух взаимосвязанных слоев, причем

наружный протеиновый менее подвижен [15]. Форма и размеры эритроцита зависят от разности площадей двух листов бислоя [16]. Организация липидного бислоя, состоящего из различных классов фосфолипидов, холестерина и гликолипидов, прямо или косвенно влияет на все важнейшие функции мембраны. Активность многих мембранных белков, ферментов, рецепторов, функционирование ионных каналов регулируются состоянием их гидрофобного окружения, обеспечиваемого липидами. Перестройка липидного бислоя мембраны и изменение их фазового состояния являются тем первичным звеном, которое приводит либо к адаптации, либо к повреждению мембран, следовательно, к нарушению функции клетки. Установлено, что сдвиг ферментативного равновесия в мембране, особенно ферментов энергетического обмена, сопровождается трансформацией эритроцитов. Так, снижение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы от 1,5 до 0,5% приводит к переходу эритроцитов из дисков в сферы. Низкая активность этого фермента от 0,5 до 0,2% обуславливает появление акантоцитов, кератоцитов и других нерегулярных форм эритроцитов [8, 9]. Нарушение работы Na^+ -помпы вызывает срыв компенсации избыточного внутриклеточного осмотического давления, вследствие чего эритроциты стремятся принять сферическую форму [8, 9]. Поскольку эритроцит относится к иммунокомпетентной клетке, способной связывать и удалять из кровотока иммунные комплексы, изменение геометрии клеточной мембраны при трансформации может сопровождаться потерей доступности мембранных рецепторов, что в свою очередь может быть одним из механизмов нарушения иммунного гомеостаза больного.

Таким образом, трансформация эритроцитов свидетельствует о целом комплексе взаимосвязанных изменений как в структуре самой мембраны, так и на ее поверхности, следствием чего является нарушение жизненно важных функций клетки. Выявление корреляции между специфичностью трансформации эритроцитов при определенной патологии и состоянием мембраны требует глубокого биохимического изучения спектра мембранных фосфолипидов, их количественного соотношения, активности транспортных АТФаз и других показателей, а также целого ряда биофизических параметров. Количественный же микроскопический анализ морфоэритрограмм является весьма информативным при оценке наличия и степени выраженности патологического процесса в организме.

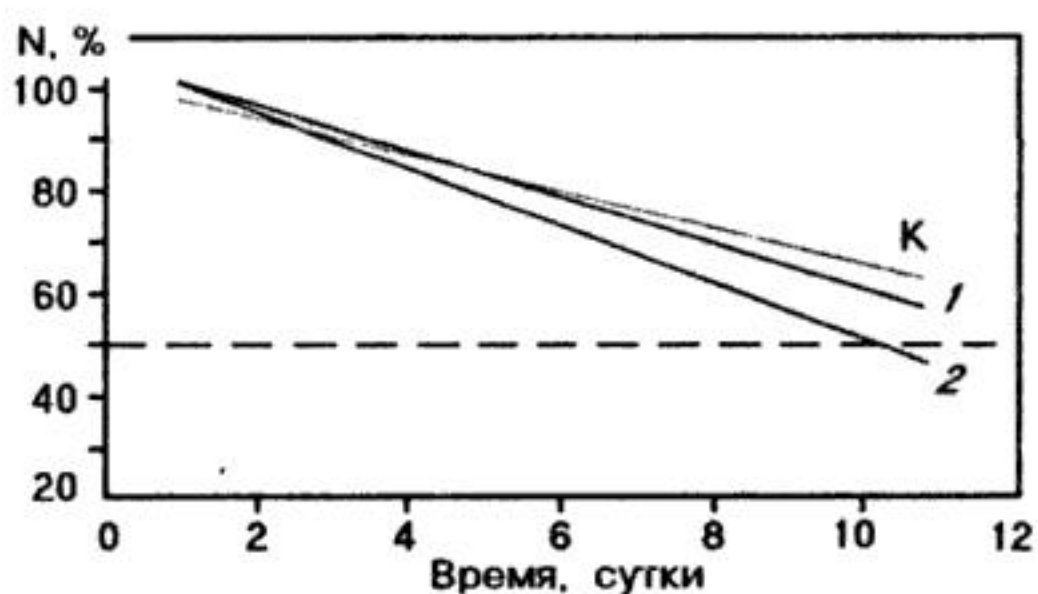


Рис. 3. Кинетика накопления предгемолитических форм эритроцитов в крови больных вибрационной болезнью: К — контроль; 1 — первая стадия; 2 — вторая стадия

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеева Г.А., Погорелов В.М. Состояние эритроцитов периферической крови при воздействии вибрации // Медицина труда и промышленная экология. – 1995. – № 5. – С. 27–30.
2. Дьяконов В.П. Справочник по алгоритмам и программам на языке Бейсик для персональных ЭВМ. – М.: Наука. – 1987. – 240 с.
3. Карабанов Г.Н., Инченко К.С. Деформируемость эритроцитов в клиническом аспекте // Вестн. хирургии им. И.И. Грекова. – 1986. – № 12. – С. 99–102.
4. Клиническая гематология / Под ред. Шт.Берчану. – Бухарест: Мед. изд-во. – 1985. – 1221 с.
5. Крымский Л.Д., Пестайло Г.В., Рыбалов А.Г. Растровая электронная микроскопия сосудов и крови. – М.: Медицина, 1976. – 168 с.
6. Кулешова Л.Г., Загнойко В.И. Сравнительная оценка устойчивости формы эритроцитов гетеротермных животных в условиях гипотермического хранения // Пробл. криобиологии. – 1994. – № 2. – С. 25–28.
7. Лиссовский В.А., Кидалов В.Н., Гуц В.В. Трансформация эритроцитов как диагностический тест в клинической практике // Лаб. дело. – 1985. – № 10. – С. 594–598.
8. Одинокова В.А., Квитко Н.Н., Олышанский А.Я. Морфофункциональные изменения эритроцитарных мембран при некоторых экстремальных состояниях // Сов. мед. – 1985. – № 10. – С. 20–22.
9. Одинокова В.А., Каликштейн Д.Б., Мороз Л.А., Квитко Н.Н. Эритроциты при некоторых аллергических заболеваниях // Лаб. дело. – 1985. – № 6. – С. 344–347.
10. Попов М.П., Зюбан Д.И., Сорокин А.В., Реук В.Д. Изменение агрегационных и физико-химических свойств крови при вибрационной болезни // Гематол. и трансфузиол. – 1992. – № 11–12. – С. 28–30.
11. Суворов Г.А., Артамонова В.Г. Современные аспекты этиологии, патогенеза, клиники и профилактики вибрационной болезни от воздействия локальной вибрации // Вестн. АМН СССР. – 1992. – № 1. – С. 28–32.
12. Baumler H., Djenev I., Iovtchev S. et al. Polarizability of human red blood cells and conformational state of glycocalyx // Stud. biophys. – 1988. – 125, № 1. – P. 45–51.
13. Bessis M. Living Blood Cells and their Ultrastructure. – Berlin, Heidelberg, New-York. 1973. – 767 p.
14. Feo C.J., Phyllips W.M. The influence of suspension osmolarity and erythrocyte volume on cells deformability // Nouv. Rev. franc. Hematol. – 1982. – 24, № 5. – P. 295–300.
15. Nakao M., Miwa S. Red cell membrane // Acta haematol Jap. – 1983. – V. 46. – P. 41–42.
16. Svetina S., Zeka B. Bilayer couple hypothesis of red cell shape transformations and osmotic hemolysis // Biomed. biochim. acta. – 1983. – 42, № 11–12. – P. 86–90.

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

Поступила 11.02.97

Л. Г. КУЛЕШОВА

ГІПОТЕРМІЧНА СТІЙКІСТЬ ФОРМИ ЕРИТРОЦИТІВ ЛЮДИНИ ЯК ОЦІНКА СТУПЕНЯ ВИРАЖЕННЯ ПАТОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Методом світлової мікроскопії за допомогою мікроскопа МБІ-15У з фотографічною реєстрацією морфологічної картини крові вивчена стійкість форми еритроцитів хворих на вібраційну хворобу в умовах їх гіпотермічного зберігання при 4 °С. Встановлено, що в залежності від тяжкості патологічного процесу в морфоеритрограмах простежується прогресуюче наростання куполоподібних форм еритроцитів (стоматоцитоз). Отримано кінетичні залежності накопичення трансформованих еритроцитів від терміну гіпотермічного зберігання крові, які дозволяють відлифференціювати ступінь захворювання вібраційною хворобою.

L. G. KULESHOVA

HYPERTONIC RESISTANCE OF HUMAN ERYTHROCYTE SHAPE AS THE ESTIMATION OF PATHOLOGICAL PROCESS MANIFESTATION DEGREE

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

The erythrocyte shape resistance in patients with vibrational disease under conditions of their hypothermic storage at 4 °C was studied by means of light microscopy with MBE-15U microscope together with photographic registration of blood morphological picture. It has been established that depending on the severity of pathological process in morphoerythrograms a progressive rise in dome-like shapes of erythrocytes (stomatocytosis) was traced. Kinetic dependences of accumulation of prehemolytical erythrocyte shapes depending on the terms of blood hypothermic storage, allowing to differentiate the degree of vibrational disease extent were obtained.

РЕЗУЛЬТАТИ ЛАБОРАТОРНО-КЛІНІЧНОГО ВИВЧЕННЯ РОЗМОРОЖЕНИХ ВІДМИТИХ ЕРИТРОЦИТІВ, КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ПРИ -20°C

Проведено лабораторно-клінічне вивчення розморожених відмитих еритроцитів, які зберігались 12 місяців при помірно низькій температурі (-20°C) у побутових морозильниках вітчизняного виробництва. Встановлено, що розморожені відмиті еритроцити, кріоконсервовані при -20°C , є функціонально повноцінним гемотрансфузійним середовищем, застосування якого ефективне для лікування хворих.

Розробка довготривалого зберігання еритроцитів у замороженому стані є однією з важливих задач сучасної трансфузіології. З кожним роком розширюються дослідження як в області кріобіології еритроцитів, так і в напрямку вивчення терапевтичної ефективності розморожених відмитих еритроцитів. Довготривале зберігання крові за допомогою кріоконсервування дозволяє мати запас дефіцитних груп крові, а також крові хворих для ауотрансфузій, що позбавляє реципієнтів імунологічних реакцій і можливого зараження вірусами СНІД і гепатиту [1, 2, 12]. Обов'язкова процедура багаторазового відмивання еритроцитів після розморожування дозволяє видалити зруйновані і прегемолітичні популяції червоних клітин крові, вільний гемоглобін, калій, продукти метаболізму, велику частину лейкоцитів і тромбоцитів. При цьому видаляються також плазменні аглютиногени анти-А, анти-В і вимиваються віруси гепатиту В і С [9, 11, 13].

У літературі досить повно освітлені різні методи заморожування еритроцитів при ультранизкій і помірно низьких температурах з використанням ендоцелюлярних (гліцерин) і екстрацелюлярних кріофілактів (сахароза, маніт, полівінілпіролідон і т.д.). Перевага віддається більш економічним і простим методам заморожування при помірно низьких температурах [3, 4, 7, 8, 10].

У Львівському філіалі Київського НДІ гематології та переливання крові накопичено досвід кріоконсервування еритроцитів при -40°C з кінцевою концентрацією гліцерину 39,6% [6]. Однак, по-перше, з практичним застосуванням цього методу кріоконсервування еритроцитів виникли труднощі у зв'язку з тим, що імпортне електрохолодильне устаткування з указаним температурним режимом виробило свій ресурс, а його оновлення в найближчій перспективі з економічних причин малоймовірно. По-друге, велика концентрація гліцерину в захисному розчині значно ускладнює процеси обробки еритроцитів під час відмивання. Враховуючи вищеприведене, нами розроблено метод кріоконсервування еритроцитів з використанням побутових морозильників вітчизняного виробництва з температурою $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, застосовано кріозахисний розчин з кінцевою концентрацією гліцерину в суміші до 20%, вивчена клінічна ефективність даного трансфузійного середовища.

Об'єктами дослідження були: еритроцитна маса, отримана з донорської крові, яка зберігалася при $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ не більше 2-х діб після її взяття; відмиті розморожені еритроцити, кріоконсервовані при -20°C ; хворі, яким переливалося одержане гематотрансфузійне середовище.

Після макроскопічної оцінки консервованої крові та розморожених відмитих еритроцитів, яка включала прозорість, колір плазми та надосадкової рідини, наявність в ній ниток фібрину, згустків крові, проявів видимого гемолізу, вивчалися такі морфофізико-біохімічні показники: загальний гемоглобін крові — ціанідним методом; вільний гемоглобін у плазмі крові та надосадковій рідині — кількісним калориметричним методом; позаклітинний калій — методом полум'яної фотометрії на апараті ФПЛ-1; аденозинтрифосфат (АТФ) після семихвилинного гідролізу трихлороцтових фільтратів в 1-Н розчині соляної кислоти при 100 °С (з малахітовим зеленим); 2,3-дифосфогліцерат (2,3-ДФГ) — методом Раппопорту у модифікації Н. П. Мешкової та Н. В. Алексахіної [5]; осмотична резистентність еритроцитів — макроскопічним методом Лімбека і Рібера.

Отримані цифрові дані оброблялись методом варіаційної статистики. Достовірність різниці між середніми показниками в порівняльних групах (p) встановлювали з використанням критерію Стюдента.

Основні показники, які характеризують якість еритроцитної маси, яка піддавалася заморожуванню, свідчать про її біологічну повноцінність (табл. 1).

Т а б л и ц я 1
Основні показники якості еритроцитної маси до змішування з кріоконсервантом $M \pm m$ ($n = 30$)

Показники	$M \pm m$
Загальний гемоглобін, г/л	$214,60 \pm 4,60$
Вільний гемоглобін, г/л	$0,35 \pm 0,03$
Гематокрит, л/л	$0,69 \pm 0,03$
Позаклітинний калій, ммоль/л	$8,90 \pm 1,21$
Аденозинтрифосфорна кислота (АТФ), мкмоль/г Нв	$3,31 \pm 0,35$
2,3-дифосфогліцерат (2,3-ДФГ), мкмоль/г Нв	$10,10 \pm 0,45$
Концентрація йонів водню крові (pH)	$6,70 \pm 0,01$
Парціальний тиск кисню крові (pO_2), мм рт.ст.	$51,10 \pm 2,61$
Насичення гемоглобіну киснем (Нв O_2), %	$44,30 \pm 2,71$

Після відділення плазми і лейкоцитної плівки еритроцити змішували з кріоконсервантом і заморожували. Для кріофілактики використовували гліцерин з кінцевою концентрацією в суміші до 20%. Заморожені еритроцити зберігалися в побутових морозильниках при температурі -20°C від місяця до року. Після розморожування еритроцитів проводилося їх відмивання з використанням гіперосмолярних розчинів глюкози та завішування в ресуспендуючому лактано-сахарозо-фосфатному розчині.

У табл. 2 подано результати досліджень морфофункціональних властивостей розморожених відмитих еритроцитів. Як свідчать дані, незважаючи на тривалий термін зберігання при від'ємній температурі, немає тенденції вираженого зменшення проценту відновлених клітин. Не відмічено суттєвої різниці у вмісті вільного гемоглобіну та позаклітинного калію в надосадковій рідині при зберіганні еритроцитів до 12 місяців. Не встановлена також різниця у вмісті АТФ, показників гематокриту, осмотичної резистентності еритроцитів. Аналіз отриманих даних показав, що еритроцити, які зберігалися при -20°C , залишаються повноцінними до року. Виявити яку-небудь різницю як у морфологічній, так і біохімічній характеристиках еритроцитів у залежності від терміну їх зберігання не вдалося.

Вивчена ефективність трансфузії розморожених відмитих еритроцитів, кріоконсервованих при помірно низькій температурі (-20°C), в комплексному лікуванні 96 хворих з анемією, яка виникла внаслідок гематологічних за-

хворювань: гострого лейкозу, гіпо-, апластичної, набутої та спадкової гемолітичної, залізодефіцитної, В₁₂-дефіцитної анемії, мієломної хвороби, остеомієлофіброзу, еритромієлозу, лімфолейкозу, лімфогранулематозу. Вік хворих — від 18 до 70 років. Еритроцити переливали від одного до п'яти разів з частотою 1–3 рази на тиждень в дозах 200–250 мл. Всього було використано 256 доз еритроцитів.

Для оцінки переносності трансфузій кріоконсервованих еритроцитів враховували як загальний стан хворих, так і динаміку змін деяких клінічних показників: систолічного та діастолічного артеріального тиску, частоти пульсу, дихання, температури тіла. До переливання розморожених еритроцитів систолічний, діастолічний тиск, частота пульсу і дихання у хворих були в межах норми. Протягом 3-х та 24-х годин після трансфузій ці показники не змінювалися. Встановлено, що температура тіла хворих не змінювалася на всіх етапах досліджень.

Результати спостережень показали, що трансфузії еритроцитів, кріоконсервованих при –20 °С, добре переносилися хворими: під час та після переливань не було зафіксовано посттрансфузійних реакцій та ускладнень.

Нами визначався рівень вільного гемоглобіну у крові хворих до, після і через 24 години після проведених гемотрансфузій.

Результати досліджень показали, що до трансфузій рівень вільного гемоглобіну був $0,137 \pm 0,0192$ г/л ($n = 21$). Безпосередньо після переливань розморожених відмитих еритроцитів спостерігалось несуттєве збільшення цього показника до $0,197 \pm 0,0251$ г/л ($p > 0,05$) ($n = 21$). Через 24 години рівень вільного гемоглобіну зменшився до $0,130 \pm 0,0120$ г/л ($p > 0,05$) ($n = 21$), наблизившись до вихідної величини.

Отримані результати про несуттєве підвищення вільного гемоглобіну в крові хворих після переливання розморожених еритроцитів свідчать про відсутність гемолізу, стійкість перелитих червоних клітин крові в кров'яному руслі реципієнта.

Про відсутність гемолітичної реакції у відповідь на введення ресуспендованих розморожених відмитих еритроцитів свідчили результати вивчення гаптоглобіну та білірубину в крові хворих. Вміст гаптоглобіну в сироватці крові до переливання дорівнював $1,10 \pm 0,145$ г/л ($n = 10$). Після трансфузії

Т а б л и ц я 2

Характеристика розморожених відмитих еритроцитів, ресуспендованих в лактатно-сахарозо-фосфатному розчині ($n = 15$)

Показники	Термін зберігання при –20 °С, міс	$M \pm m$
Загальна втрата клітин, %	3	$3,16 \pm 0,09$
	6	$3,55 \pm 0,31, p > 0,05$
	12	$3,83 \pm 0,10, p > 0,05$
Відновлені клітини, %	3	$96,80 \pm 0,63$
	6	$96,50 \pm 1,80, p > 0,05$
	12	$96,10 \pm 0,20, p > 0,05$
Вільний гемоглобін, г/л	3	$0,31 \pm 0,04$
	6	$0,34 \pm 0,02, p > 0,05$
	12	$0,41 \pm 0,03, p > 0,05$
Гематокрит, л/л	3	$0,49 \pm 0,03$
	6	$0,39 \pm 0,05, p > 0,05$
	12	$0,37 \pm 0,02, p > 0,05$
Позаклітинний калій, ммоль/л	3	$1,32 \pm 0,23$
	6	$1,22 \pm 0,14, p > 0,05$
	12	$1,18 \pm 0,07, p > 0,05$
АТФ, мкмоль/г Нв	3	$3,90 \pm 0,10$
	6	$3,80 \pm 0,26, p > 0,05$
	12	$3,60 \pm 0,10, p > 0,05$
Мінімальна осмотична резистентність еритроцитів	3	$0,44 \pm 0,01$
	6	$0,50 \pm 0,06, p > 0,05$
	12	$0,62 \pm 0,02, p > 0,05$
pH	3	$6,80 \pm 0,07$
	6	$6,84 \pm 0,09, p > 0,05$
	12	$6,80 \pm 0,02, p > 0,05$

розморожених еритроцитів спостерігалось незначне зниження вмісту цього показника до $1,02 \pm 0,138$ г/л ($p > 0,05$) ($n = 10$), на нашу думку, за рахунок зв'язування гаптоглобіну з незначною кількістю вільного гемоглобіну. Через 24 години рівень гаптоглобіну повертався до вихідної величини та складав $1,09 \pm 0,053$ г/л ($p > 0,05$) ($n = 10$). Показник білірубину крові до трансфузії знаходився в межах нормальних величин та складав $9,65 \pm 1,282$ ммоль/л ($n = 10$). Після переливання розморожених відмитих еритроцитів, а також через 24 години після трансфузій величина цього показника майже не змінювалась, відповідно $11,2 \pm 2,280$ та $10,8 \pm 0,376$ ммоль/л ($p > 0,05$) ($n = 10$).

Виходячи з того, що за рівнем осмотичної стійкості еритроцитів можна оцінити приживлення перелитих еритроцитів у кро'яному руслі реципієнта, ми вивчали осмотичну стійкість еритроцитів крові хворих після переливання розморожених відмитих еритроцитів. Отримані результати свідчать про те, що показники максимальної та мінімальної стійкості еритроцитів крові реципієнтів були в межах норми (максимальна — $0,260 \pm 0,023$ ($n = 21$), мінімальна — $0,570 \pm 0,035$ ($n = 21$)) і практично не змінювалися на всіх етапах досліджень. Безпосередньо після трансфузій: максимальна — $0,240 \pm 0,010$ ($p > 0,05$) ($n = 21$), мінімальна — $0,560 \pm 0,013$ ($p > 0,05$) ($n = 21$). Через 24 години після переливань відповідно: максимальна — $0,260 \pm 0,018$ ($p > 0,05$) ($n = 21$), мінімальна — $0,580 \pm 0,016$ ($p > 0,05$) ($n = 21$). Стабільність показників осмотичної стійкості еритроцитів крові реципієнтів свідчить про структурно-функціональну повноцінність та добре приживлення перелитих розморожених еритроцитів у кро'яному руслі хворих.

При вивченні динаміки змін вмісту фосфорорганічних сполук АТФ і 2,3-ДФГ у крові хворих виявлено, що після переливань розморожених відмитих еритроцитів спостерігалось підвищення рівня АТФ від $2,0 \pm 0,18$ мкмоль/г Нв до $2,4 \pm 0,01$ мкмоль/г Нв ($p > 0,05$) ($n = 12$), а через 24 години — до $2,7 \pm 0,17$ мкмоль/г Нв ($p < 0,05$) ($n = 12$). У той самий час після переливання розморожених відмитих еритроцитів значно збільшився вміст 2,3-ДФГ від $9,9 \pm 0,18$ мкмоль/г Нв ($n = 12$) до $11,2 \pm 0,14$ мкмоль/г Нв ($p < 0,05$) ($n = 11$), а через добу після трансфузії рівень цього показника зріс до $12,2 \pm 0,32$ мкмоль/г Нв ($p < 0,05$) ($n = 11$). Отримані результати свідчать, що після проведених трансфузій підвищувався енергетичний потенціал еритроцитів крові реципієнтів, знижувалось споріднення гемоглобіну до кисня, підвищувалась киснево-транспортна функція крові хворих. Цей факт є ще одним підтвердженням високої життєздатності еритроцитів, кріоконсервованих при -20°C .

Для з'ясування можливої замісної дії розморожених відмитих еритроцитів, кріоконсервованих при -20°C , вивчено вплив переливань даного середовища на показники червоної крові хворих. Аналіз отриманих даних показав, що до трансфузій у крові хворих були понижені: кількість еритроцитів — $2,76 \pm 0,18 \cdot 10^{12}$ /л ($n = 25$), вміст гемоглобіну — $85,0 \pm 3,4$ г/л ($n = 25$). Це свідчило про наявність у хворих анемії. Після переливань еритроцитів, кріоконсервованих при -20°C , спостерігалась позитивна динаміка показників червоної крові хворих: кількість еритроцитів досягла $3,50 \pm 0,36 \cdot 10^{12}$ /л ($p < 0,05$) ($n = 25$), зріс рівень гемоглобіну до $101,2 \pm 4,6$ г/л ($p < 0,05$) ($n = 25$). Результати проведених досліджень показали виражений замісний ефект переливань розморожених відмитих еритроцитів, кріоконсервованих при -20°C , який проявлявся в усуненні проявів анемії у хворих.

Таким чином, на відміну від раніше розроблених методів зберігання еритроцитів при помірно низьких температурах створено економічний і доступний для впровадження метод криоконсервування еритроцитної маси при -20°C з використанням побутових морозильників вітчизняного виробництва. Застосовано захисний розчин, який містить більш низьку концентрацію гліцерину (20%), що дозволяє спростити процеси гліцеринізації і дегліцеринізації еритроцитів і отримати високий вихід інтактних клітин при менших затратах часу, реактивів і праці. Проведено лабораторно-клінічне вивчення розморожених відмитих еритроцитів, які зберігалися при помірно низькій температурі (-20°C). Встановлено, що розморожені відмиті еритроцити, криоконсервовані при -20°C , є функціонально повноцінним гемотрансфузійним середовищем, яке ефективно для лікування хворих. Термін зберігання еритроцитів у замороженому стані протягом 12 місяців достатній для проведення робіт у банках крові.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Аграненко В. А. Современные подходы к переливанию эритроцитов и тромбоцитов у детей // Гематол. и трансфузиол. – 1996. – Т. 41, № 2. – С. 41–43.
2. Аграненко В. А., Федорова Л. И. Замороженная кровь и ее клиническое применение. – М.: Медицина, 1983. – 156 с.
3. Воробьева Г. С., Аграненко В. А., Виноград-Финкель Ф. Р. Изучение свойств эритроцитов, замороженных с большими концентрациями глицерина при умеренно низких температурах, и их клиническое применение // Пробл. гематол. – 1975. – № 9. – С. 8–13.
4. Мельникова В. Н. Метод криоконсервирования эритроцитов при $-38 \pm 2^{\circ}\text{C}$ со сниженной концентрацией глицерина // Всесоюз. съезд гематол. и трансфузиол.: Тез. докл. – М., 1991. – С. 61.
5. Мешкова Н. П., Алексахина Н. В. Раздельное определение кислоторастворимых фосфорных соединений // Успехи биол. химии. – 1954. – № 2. – С. 277–291.
6. Орлик В. В., Качоровский Б. В., Криворучко Р. А. Длительное хранение эритроцитов при умеренно низкой температуре (-40°C) и клиническая оценка их эффективности // Пробл. криобиологии. – 1991. – № 2. – С. 27–31.
7. Петренко Г. М., Сидоркевич С. В., Багаутдинов Ш. М. Опыт замораживания эритроцитов при $-80 \div -140^{\circ}\text{C}$ // Актуальн. вопросы службы крови и трансфузиол.: Тез. докл. Рос. конф. – С.-Петербург, 1995. – С. 225–226.
8. Семенова Н. В., Азовская С. А. Криоконсервирование эритроцитов при -30°C // Гематол. и трансфузиол. – 1987. – № 8. – С. 23–26.
9. Терехов Н. Т., Петров М. М. Клиническое применение консервированных эритроцитов. – Киев: Здоров'я, 1983. – 144 с.
10. Терехов Н. Т., Петров М. М., Буденная М. П. Долгосрочное хранение эритроцитов методом замораживания при умеренно низких температурах ($-60 \div -40^{\circ}\text{C}$): Метод. рекоменд. – Киев, 1986. – 15 с.
11. Beal R. W., Isbister J. P. Blood component therapy in clinical practice. – Oxford, 1985. – 282 p.
12. Hansen E., Hofstadter F., Taeger K. Autologous transfusion in tumor surgery // Infusinsth. – 1994. – Vol. 21, № 5. – P. 337–347.
13. Sally C. Davies, Milica Brozovic. Transfusion of red cells // ABC of Transfusion. – 1992. – P. 9–14.

Львівський філіал Київського НДІ гематології
та переливання крові

Надійшла 19.08.97

В. В. ОРЛИК

РЕЗУЛЬТАТЫ ЛАБОРАТОРНО-КЛИНИЧЕСКОГО ИЗУЧЕНИЯ РАЗМОРОЖЕННЫХ ОТМЫТЫХ ЭРИТРОЦИТОВ, КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ПРИ -20°C

Львовский филиал Киевского НИИ гематологии и переливания крови

Создан экономичный и доступный для практического внедрения метод криоконсервирования эритроцитной массы. Проведено лабораторно-клиническое изучение размороженных отмытых эритроцитов, которые сохранялись 12 месяцев при умеренно низкой температуре (-20°C) в бытовых морозильниках отечественного производства. Установлено, что размороженные отмытые

эритроциты, криоконсервированные при -20°C , являются функционально полноценной гемотрансфузионной средой, применение которой эффективно для лечения больных.

V. V. ORLYK

LABORATORY AND CLINICAL INVESTIGATION OF THAWED WASHED RED CELLS, CRYOPRESERVED AT -20°C

Lvov Branch of Kievskiy Scientific Research Institute of Hematology and Blood Transfusion

A practical and economic method for cryopreservation of the erythrocytic mass was developed. A laboratory and clinical study of the thawed washed red cells was conducted, which were stored for 12 months at moderately low temperatures (-20°C) in utility home-made freezers. Thawed washed red cells, cryopreserved at -20°C , were found to be a functionally integral hemotransfusion medium, the application of which is effective for therapeutic purposes.

УДК 615.361.41.014.41+577.115

С.Е.Гальченко, А.В.Мамонтова, Б.П.Сандомирский

ВЛИЯНИЕ РЕЖИМОВ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ ФРАГМЕНТОВ СЕЛЕЗЕНКИ СВИНЬИ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ ПЕРЕКИСНЫХ ПРОЦЕССОВ

Изучалось влияние режимов криоконсервирования на интенсивность перекисных процессов в фрагментах ткани селезенки свиньи. Показано, что использование в качестве криопротекторов ДМСО, глицерина, ПЭО-400 и ПЭО-1500 в концентрации 20% позволяет сохранить изученные показатели (количество гидроперекисей и устойчивость мембран к перекисному окислению) на уровне, близком к контролю.

Последствием изменения состояния липидного бислоя мембран клеток после воздействия неблагоприятных факторов, возникающих при криоконсервировании биологических объектов, может быть нарушение скорости липоперекисеобразования [2, 3, 5]. Перекисное окисление липидов — процесс, когда липиды клеточных мембран окисляются молекулярным кислородом до перекисей и других продуктов. Свободнорадикальная цепь окисления липидов формирует путь, при котором кислород становится токсичным для живых организмов и клеток.

В настоящее время установлено, что перекисное окисление липидов, сопровождающееся спонтанной хемилюминесценцией, является одной из компонент гомеостаза [4]. Однако в норме организм млекопитающих располагает целой системой механизмов, регулирующих уровень свободнорадикальных процессов. Прежде всего это встроенные во все биологические мембраны антиоксиданты, ингибирующие перекисное окисление липидов. В гуморальных средах присутствуют водорастворимые антиоксиданты, обеспечивающие дополнительную защиту мембран [1]. Структура интактных мембран также препятствует продолжению цепей свободнорадикального окисления. В клетках и жидкостях организма функционируют специальные ферментные системы и комплексы, осуществляющие дезактивацию активных продуктов свободнорадикального окисления: супероксиддисмутаза, дисмутирующая супероксидные ионы; глутатион-пероксидаза, инактивирующая перекиси; каталаза, разлагающая перекись водорода. Однако эти системы рассчитаны на нормальные условия функционирования и имеют ограниченные возможности [1]. Воздействие неблагоприятных факторов, в частности низких температур, может приводить к активации перекисных процессов.

Таким образом, изучая интенсивность хемилюминесценции биологических объектов после воздействия тех или иных экстремальных факторов и ис-

пользуя соответствующие методические приемы, можно получать информацию о различных сторонах процесса липоперекисеобразования в биологическом объекте. Цель работы — изучение влияния различных режимов криоконсервирования на интенсивность перекисных процессов в фрагментах ткани селезенки.

Объектом исследования служили фрагменты селезенки половозрелых свиней. Селезенку получали на Харьковском мясокомбинате, доставляли в лабораторию на льду, иссекали на фрагменты размером 1–3 мм и три раза отмывали в 10-кратном объеме физиологического раствора. В качестве криопротекторов использовали глицерин, ДМСО, ПЭО-400 и ПЭО-1500 в конечной концентрации 20%. Растворы криопротекторов, содержащих их двойную концентрацию, добавляли каплями к фрагментам ткани в соотношении 1:1. Взвесь фрагментов расфасовывали в пластиковые контейнеры объемом 1 мл или в контейнеры из фольги для сверхбыстрого замораживания. Замораживание со скоростями 1, 10 и 100 °С осуществляли с помощью программного замораживателя УОП-6, а с большими скоростями — с помощью устройства для замораживания биологических объектов. Отогревали на водяной бане при +40 °С, отмывали от криопротекторов сахарозными средами с последующей их заменой на физиологический раствор.

Интенсивность хемилюминесценции изучали, добавляя в ячейку хемилюминометра, содержащую 1 мл физиологического раствора и 100 мкл гомогената ткани, 200 мкл 5%-го раствора перекиси водорода или 100 мкл раствора, содержащего 1 ммоль Fe^{++} , и в течение 1 мин регистрировали интенсивность свечения. Результат выражали в относительных единицах.

В табл. 1 представлены данные интенсивности хемилюминесценции фрагментов селезенки, индуцированной Fe^{++} , после их замораживания без криопротектора и в присутствии 20% ДМСО, ПЭО-400 и ПЭО-1500. При этом интенсивность хемилюминесценции пропорциональна количеству гидроперекисей в ткани. Как видно из этих данных, замораживание в среде без криопротектора приводит к значительному увеличению количества гидроперекисей в ткани, особенно при скорости охлаждения 100 °С/мин. Использование криопротекторов позволяет значительно снизить количество гидроперекисей, что свидетельствует об антиоксидантном эффекте применяемых криопротекторов. Минимальная активация перекисных процессов в деконсервированных образцах происходит при скорости охлаждения 1 °С/мин, при 1 000 °С/мин наблюдается второй минимум активации, однако уровень хемилюминесценции несколько выше, чем в первом случае. Использование криопротекторов в концентрациях 10 и 5% также позволяет снизить количество образующихся гидроперекисей, однако все же их количество в 1,5–2 раза превышает контрольные значения. Таким образом, можно сделать вывод, что исследованные криопротекторы в концентрации 20% сохраняют интенсивность перекисных процессов на уровне, близком к контролю, при скорости охлаждения 1 °С/мин.

Вместе с тем количество спонтанно образовавшихся гидроперекисей характеризует только одну из сторон процесса перекисидации. Так как при воздействии экстремальных факторов криоконсервирования происходит определенное напряжение всех звеньев антиоксидантной защиты мембран и клеток, то количество свободных мощностей этих систем при различных режимах консервирования может быть разным.

Т а б л и ц а 1

Интенсивность хемилюминесценции фрагментов селезенки (отн.ед. и нормированное значение), индуцированной Fe^{++} в зависимости от применяемого криопротектора и скорости охлаждения

Крио-протектор	Определяемые показатели	Контроль	Скорость охлаждения, °C/мин					
			1	10	100	1 000	8 000	80 000
Без крио-протектора	Светосумма Нормировка	244±23 1,0	1506±98 5,2*	2098±175 8,6*	2318±211 9,5*	1073±108 4,4*	1220±110 5,0*	1439±127 5,9*
ДМСО	Светосумма Нормировка	208±20 1,0	204±18 1,0	305±29 1,5*	352±31 1,7*	251±24 1,0	320±34 1,5*	380±30 1,8*
ПЭО-400	Светосумма Нормировка	211±22 1,0	240±26 1,1	365±33 1,7*	452±39 2,1*	291±24 1,4*	408±44 1,9*	618±59 2,9*
ПЭО-1500	Светосумма Нормировка	228±21 1,0	241±20 1,1	362±31 1,6*	480±37 2,1*	320±29 1,4*	401±37 1,8*	598±48 2,6*

* — достоверно отличается от контроля. $P > 0,05$

В табл. 2 представлены данные об интенсивности хемилюминесценции фрагментов селезенки, индуцированной перекисью водорода. Как видно, замораживание этого биообъекта без криопротекторов приводит к значительному увеличению интенсивности свечения, т.е. выраженному уменьшению устойчивости мембран к перекисному окислению. Это может быть вызвано как нарушениями структуры мембран, так и потерей антиоксидантов, встроенных в мембрану. Использование криопротекторов позволяет в значительной степени сохранить устойчивость мембран к перекисному окислению. При высоких скоростях охлаждения более выраженным защитным эффектом обладает ПЭО-400, а при скорости охлаждения 1 °C/мин все изученные криопротекторы достаточно эффективно защищают биологические мембраны.

Таким образом, на основании данных об интенсивности перекисных процессов в деконсервированных фрагментах селезенки и их устойчивости к перекисному окислению можно сделать вывод, что подбором соответствующих криопротекторов и их концентрации можно добиться минимального повреждающего действия замораживания на эти показатели при медленных скоростях охлаждения.

Т а б л и ц а 2

Интенсивность хемилюминесценции фрагментов селезенки (отн.ед. и нормированное значение), индуцированной H_2O_2 в зависимости от применяемого криопротектора и скорости охлаждения

Крио-протектор	Определяемые показатели	Контроль	Скорость охлаждения, °C/мин					
			1	10	100	1 000	8 000	80 000
Без крио-протектора	Светосумма Нормировка	248±29 1,0	1186±97 4,8*	1289±113 5,2*	1240±128 5,0*	694±64 2,8*	917±87 3,7*	1289±131 5,2*
ДМСО	Светосумма Нормировка	260±19 1,0	286±24 1,1	312±30 1,2	754±76 2,9*	312±29 1,2	676±62 2,6*	884±81 3,4*
ПЭО-400	Светосумма Нормировка	288±25 1,0	304±28 1,1	365±32 1,3*	452±42 1,6*	291±25 1,0	379±34 1,3*	420±39 1,4*
ПЭО-1500	Светосумма Нормировка	290±24 1,0	319±55 1,1	377±29 1,3*	928±86 3,2*	406±38 1,4*	696±62 2,4*	928±99 3,2*

* — достоверно отличается от контроля. $P > 0,05$

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барабой В.А., Чеботарев Е.Е. Проблема перекисного окисления в радиологии // Радиология. – 1986. – № 26. Вып. 5. – С. 591–597.
2. Бондаренко Т.П., Белоус А.М. Изменения фосфолипидного состава митохондрий после замораживания-оттаивания в присутствии дитионита // Укр. біохім. журн. – 1978. – 50, № 1. – С. 57–59.
3. Жиров В.В., Лукьянчук В.Д. Механизмы действия динитроортокрезола на структурные компоненты биомембран // Докл. АН СССР. Сер. Б. – 1984. – № 4. – С. 69–71.
4. Журавлев А.И., Журавлева А.И. Сверхслабое свечение сыворотки крови и его значение в комплексной диагностике. – М.: Медицина, 1975. – 128 с.
5. Левина Н.В. Изучение вспышки хемилюминесценции и перекисного окисления липидов в мембранах эритроцитов // Биофизика. – 1975. – № 20, Вып. 5. – С. 944–945.

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

Поступила 6.10.97

С. Є. ГАЛЬЧЕНКО, А. В. МАМОНТОВА, Б. П. САНДОМИРСЬКИЙ

ВПЛИВ РЕЖИМІВ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ФРАГМЕНТІВ СЕЛЕЗІНКИ СВИНІ НА ІНТЕНСИВНІСТЬ ПЕРЕКИСНИХ ПРОЦЕСІВ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Вивчався вплив режимів кріоконсервування на інтенсивність перекисних процесів у фрагментах тканини селезінки свині. Показано, що використання в ролі кріопротекторів ДМСО, гліцерину, ПЕО-400 і ПЕО-1500 у концентрації 20% дозволяє зберегти вивчені показники (кількість гідроперекисів і стійкість мембран до перекисного окислення) на рівні, близькому до контролю.

S. E. GALCHENKO, A. V. MAMONTOVA, B. P. SANDOMIRSKY

INFLUENCE OF MODES OF CRYOPRESERVATION OF PORCINE SPLEEN FRAGMENTS ON INTENSITY OF PEROXIDATION

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

The given research deals with studying the influence of the modes of cryopreservation on the intensity of peroxidation in the porcine spleen tissue fragments. It was shown that application of DMSO, glycerol, PEO-400 and PEO-1500 in a 20%-concentration permit to maintain the studied features (amount of hydroperoxides and resistance of membranes to peroxidation) at the level, close to control.

КРИОМЕДИЦИНА

УДК [616.366-089.87+616.342-002+616.381-072]: 615.832.9

Р.Н.Гринёв, А.И.Шеремет, С.А.Бычков

ПРИМЕНЕНИЕ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ В ЛАПАРОСКОПИЧЕСКОЙ ХИРУРГИИ

Представлен опыт выполнения 50 лапароскопических операций (ЛО) с применением низкотемпературного влияния. Для криовоздействия использовался аппликатор собственной конструкции. Анализ полученных результатов позволяет рекомендовать более широко использовать низкие температуры при лапароскопических операциях.

Последнее десятилетие в хирургии отмечено дальнейшим развитием новых прогрессивных технологий (с применением волоконной оптики и видеоскопических систем), которые вошли в клиническую практику под названием лапароскопической (эндоскопической) хирургии. Диапазон выполняемых лапароскопических операций чрезвычайно широк: холецистэктомия; различные виды ваготомий, иногда в сочетании с дренирующими операциями; антирефлюксные операции; резекция желудка, пищевода и толстой кишки [3, 5].

По мере накопления опыта совершенствуется техника выполнения лапароскопических операций. Положительное стимулирующее регенеративное действие низких температур на ткани организма и наличие данных, свидетельствующих об отсутствии регенерации нервов и сохранении васкуляризации на участках, подвергшихся локальному криовоздействию, побудили нас использовать низкие температуры при ЛО.

В клинике с 1994 года выполнено 532 ЛО, из них — 517 лапароскопических холецистэктомий (ЛХЭ) и 15 лапароскопических ваготомий (ЛВ).

ЛХЭ производили больным холецистолитиазом, из них с хроническим калькулёзным холециститом — 358 пациентам, острым калькулёзным холециститом — 159. Женщин было 440, мужчин — 77. Возраст больных — от 18 до 85 лет, при этом 103 пациента были старше 60 лет. Острый катаральный холецистит диагностирован интраоперационно в 62 случаях, флегмонозный — в 83 и гангренозный — в 14. ЛХЭ выполнялась по общепринятой методике в условиях карбоперитонеума из 5 троакарных точек [6]. Во всех случаях оперативное вмешательство завершали дренированием брюшной полости полихлорвиниловой трубкой, которую устанавливали либо к ложу желчного пузыря, либо в надпечечное пространство. При остром холецистите через дренаж производили фракционную инстилляцию антибиотиков в течение 3–5 дней. Продолжительность пребывания больных в клинике после операции от 3-х до 7 суток. Трудоспособность восстанавливалась через 12–16 дней.

При выполнении ЛХЭ в 97 случаях возникли технические трудности в процессе мобилизации желчного пузыря из его ложа, обусловленные в 72 случаях выраженным воспалительным процессом при острых деструктивных формах холецистита и в 25 — рубцово-склеротическими изменениями при многолетнем течении желчно-каменной болезни. Данные изменения вынуждают более интенсивно использовать диатермокоагуляцию при выделении желчного пузыря из его ложа, что приводит к значительным повреждениям ткани печени. Этим часто обусловлен повышенный болевой синдром в послеоперационном периоде (вследствие наличия обширной некротической поверхности), в некоторых случаях — повышенное кровотечение и желчеистечение из печеночной паренхимы.

Для ускорения регенерации диатермонекротизированной паренхимы печени нами предложен метод криообработки ложа желчного пузыря при ЛХЭ. Экспериментальное исследование было проведено на 16 кроликах, которым после диатермодеструкции участка печени производили криовоздействие в 4–6 точках с экспозицией 1–2 мин в каждой. Температура на рабочей поверхности криоаппликатора составляла -80°C . Забор печеночной ткани для гистологического исследования выполняли на 3-, 7-, 14- и 30-е сутки после операции. При гистологическом исследовании выявлено вовлечение в процесс стромального компонента. Возникающая по периферии грануляционная ткань содержала значительное количество эозинофилов и плазматических клеток, т.е. основных компонентов гуморального иммуногенеза. Кроме этого, выявлены процессы стадийной полиплоидизации гепатоцитов в “интактной” печеночной паренхиме, что указывает на включение механизмов репаративной регенерации органа. Таким образом, при действии низких температур имеет место локальный деструктивный и резорбтивный стимулирующий эффект криовоздействия.

В нашей клинике выполнено 44 ЛХЭ в комплексе с криообработкой ложа желчного пузыря с помощью криоаппликатора собственной конструкции, который вводили в брюшную полость через десятимиллиметровый троакар. Носителем источника холода являлась закись азота. Температура на рабочей поверхности оливы инструмента была -80°C . Криообработку производили после мобилизации желчного пузыря из ложа в 4–6 точках с экспозицией 1–2 мин. Конструкцией аппарата предусмотрен электроотгрев оливы криоаппликатора. Средняя продолжительность ЛХЭ в комплексе с низкотемпературной обработкой ложа желчного пузыря составляла 68 мин. Послеоперационных осложнений не было.

У всех больных, оперированных с применением данного метода, отмечалось выраженное снижение болевого синдрома в послеоперационном периоде, не было случаев кровотечения и желчеистечения из печеночной паренхимы.

В последние годы активно разрабатывается методика применения ЛО для лечения дуоденальных язв. Наибольшее распространение получил органосохраняющий принцип лечения. Техника выполнения ЛВ различных модификаций соответствует традиционным хирургическим операциям [1, 4]. Нами выполнено 15 ЛВ (задняя стволовая и передняя селективная проксимальная ваготомия).

Оперативному лечению подвергались пациенты с хроническими дуоденальными язвами со стойким болевым синдромом, отсутствием эффекта от продолжительного медикаментозного лечения и без осложнений язвенной болезни (стеноз пилорического канала, наличие каллезной язвы, кровотечение). Возраст больных — от 24 до 56 лет. Мужчин было 10, женщин — 5. Язвенный дефект не превышал 0,8 см. У 12 больных отмечена гиперацидность и у 3-х — нормацидность. У 9 пациентов после задней стволовой ваготомии выполнялась электрокоагуляционная серозомиотомия малой кривизны желудка. У 6 пациентов передняя селективная проксимальная ваготомия производилась путем лапароскопической низкотемпературной денервации малой кривизны желудка. Эффективность криоваготомии обоснована экспериментальными исследованиями по низкотемпературной денервации желудка, большим клиническим опытом применения криоваготомии посредством лапаротомного доступа [2].

Нами разработан и применяется лапароскопический криоаппликатор, температура на рабочей поверхности оливы составляет -80°C , источником хладагента является закись азота. Селективную проксимальную криоваготомию осуществляли через десятимиллиметровый троакар, криовоздействие производили по малой кривизне в 5–6 точках, время экспозиции составляло 3 мин. Технологические характеристики криоваготомии, выработанные на основании экспериментальных исследований, достаточны для полной денервации и не приводили к ишемическим нарушениям в стенке желудка. Интраоперационная *pH*-метрия показала изменение *pH* желудочного сока от 3,0–3,6 в начале операции до 6,0–6,4 в ее конце. Послеоперационных осложнений и летальности не было.

С первых суток после операции больные были активны, перевод на энтеральное питание осуществлялся через 16–18 ч с момента операции, отсутствовала необходимость применять наркотические анальгетики. Гастродуоденоскопия (срок 8–12 дней) показала рубцевание язв во всех случаях.

Учитывая вышесказанное, успешное клиническое применение лапароскопической криоваготомии открывает новые возможности в лечении больных с неосложненными дуоденальными язвами. Анализ результатов лечения показывает ее высокую эффективность.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балалыкин А. С., Брискин Б. С., Корниченко А. А. и др. Первый опыт лапароскопической ваготомии в лечении язвенной болезни // Хирургия. – 1995. – № 5. – С. 9–11.
2. Сандомирский Б. П., Хворостов Е. Д. Криохирургические методы в лечении язвенной болезни двенадцатиперстной кишки // Хирургия. – 1988. – № 11. – С. 24–28.
3. Dallemagne B. C., Weerts J. M., Jehaes S. et al. Techniques and results of endoscopic fundoplication // Endosc. Surg. Allied Technol. – 1993. – 1, № 2. – P. 72–75.
4. Kathouda N., Mouiel J. A new technique of surgical treatment of chronic duodenal ulcer without laparotomy by videocoelioscopy // Amer. J. Surg. – 1991. – 161, № 3. – P. 361–364.
5. Mouret P., Francois Y., Vignal J. et al. Laparoscopic treatment of perforated peptic ulcer // Brit. J. Surg. – 1990. – 77, № 9. – P. 1066–1068.
6. Nathanson L. K., Shimi S., Cushieri A. LC: The Dundee technique // Brit. J. Surg. – 1991. – 78, № 2. – P. 155–159.

Харьк. гос. ун-т

Поступила 06.06.97

Р. М. ГРИНЬОВ, А. І. ШЕРЕМЕТ, С. О. БИЧКОВ

ЗАСТОСУВАННЯ НИЗЬКОТЕМПЕРАТУРНОГО ВПЛИВУ В ЛАПАРОСКОПІЧНІЙ ХІРУРГІЇ

Харківський державний університет

Представлено досвід виконання 50 лапароскопічних операцій із застосуванням низькотемпературного впливу. Для кріовпливу використовувався аплікатор власної конструкції. Аналіз отриманих результатів дозволяє рекомендувати ширше застосовувати низькі температури при лапароскопічних операціях.

R. N. GRINYEY, A. I. SHEREMET, S. A. BYUCHKOV

APPLICATION OF LOW TEMPERATURE EXPOSURE IN LAPAROSCOPIC SURGERY

Kharkov State University

The report describes 50 laparoscopic surgeries using low temperature exposure, which was done with an applicator, designed by the authors. The analysis of the results obtained make it possible to recommend low temperatures for a wider application during laparoscopic surgeries.

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 612.822.1:615.832.9

В. С. Марченко

ЭКЗИСТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ПОВЫШЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ ОРГАНИЗМА К ГИПО- И ГИПЕРТЕРМИИ

До настоящего времени не создано достаточно эффективного способа повышения как холодовой, так и тепловой устойчивости гомеотермных организмов. Однако науке давно известны уникальные случаи, когда после глубокого охлаждения или перегрева жизнедеятельность организма полностью восстанавливалась, что указывает на наличие и принципиальную возможность активации большого резервного потенциала адаптационных механизмов [2, 3]. Среди возможных подходов к решению этой проблемы криобиологии перспективным является развитие идей о “раскачке” установочной точки гомеостаза как нервно-гормональном механизме периодического расширения его температурных границ [4], который мы называем экзистозэнцефалической системой. Моделирование этого феномена наиболее успешно при ритмических холодовых воздействиях на организм, что, по нашему мнению [2], связано с периодической активацией в этих условиях гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). В связи с этим представлялось целесообразным изучить устойчивость крыс к экстремальным температурам при активации ритмической

гипотермией экзистэнцефалической системы, структурно-функциональной основой которой являются ГЭБ и медленная управляющая система мозга [1, 2].

Эксперименты проведены на белых крысах массой 180–220 г. Холодовая и тепловая устойчивость наркотизированных животных после ритмической гипотермии с частотой воздействия на каудальные терморецепторы 0,1 Гц [2] оценивалась по времени изменения ректальной температуры на 0,5 °С при помещении животных в холодовую камеру (4 °С) или в термостат (42 °С). Проводился спектрально-корреляционный анализ биоэлектрической активности, радиоизотопным методом изучалась проницаемость ГЭБ [2].

Результаты экспериментов показали, что в начале ритмической гипотермии происходит резкое снижение выраженности секундного ритма сверхмедленной биоэлектрической активности, которое сменяется существенным повышением мощности дзета-ритма в спектре сверхмедленных потенциалов (таблица). Это свидетельствует об активации медленной управляющей системы мозга в ответ на систематически действующий холодовой раздражитель [1].

Влияние ритмической гипотермии на некоторые параметры функционального состояния организма крыс

Время воздействия, мин	Мощность секундного ритма, %	Устойчивость, %		Проницаемость, %		
		холодовая	тепловая	ГЭБ ³ H-НА	ГЭБ ³ H-АХ	ГЭБ ³ H-СТ
20–30	30±3*	98±6	200±10*	98±7	98±7	210±11*
50–60	160±10*	190±12*	98±7	300±24*	305±25*	95±5

Примечание. Контрольные значения приняты за 100%. * — различия достоверны по сравнению с контролем ($P < 0,05$)

Интересно отметить, что минимум выраженности сверхмедленной активности после 20–30 мин холодового воздействия соответствует максимуму тепловой устойчивости экспериментальных животных, а на максимуме повышения мощности секундного ритма возрастает их холодовая устойчивость. Эти результаты противоречат некоторым сложившимся представлениям о перекрестной адаптации организма к экстремальным воздействиям [3]. Однако, по нашему мнению, они хорошо объясняются существующими нейротрансмиттерными моделями центральной терморегуляции [5], если учесть возможность изменения проницаемости ГЭБ при гипотермии [2].

Действительно, на 20–30-й мин ритмических холодовых воздействий в 2 раза повышается проницаемость ГЭБ для ³H-серотонина (³H-СТ), который опосредует процессы теплоотдачи. Очевидно, стимуляция гипоталамических центров потери тепла серотонином из крови как локальным нейrogормоном и приводит к существенному увеличению тепловой устойчивости крыс. Продолжение гипотермического воздействия сопровождается повышением проницаемости ГЭБ для ³H-норадреналина (³H-НА) и ³H-ацетилхолина (³H-АХ) на 50–60-й мин ритмической гипотермии. Эти нейромедиаторы участвуют в процессах обеспечения теплопродукции [5], что хорошо объясняет повышение устойчивости животных к гипотермии на данном этапе экспериментального воздействия.

Таким образом, результаты экспериментов дают некоторые основания предполагать, что моделирование состояния повышенной активности экзистэнцефалической системы ритмической гипотермией с частотой, близкой к естественным секундным биотокам, ускоряет физиологическую по своей природе адаптацию животных, при которой происходит повышение устойчивости к гипо- и гипертермии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аладжало́ва Н.А. Психофизиологические аспекты сверхмедленной ритмической активности головного мозга. — М.: Наука, 1979. — 213 с.
2. 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. — № 1. — С. 24–32.
3. Меерсон Ф.З. Адаптация, стресс и профилактика. — М.: Наука, 1981. — 280 с.
4. Пастухов Ю.Ф. Явление сезонного гипометаболизма млекопитающих // Термофизиология. Информ. бюл. — № 2. — Минск, 1991. — С. 7–18.
5. Bligh J. The central neurology of mammalian thermoregulation // Neurosci. — 1979. — № 4. — P. 1213–1236.

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

Поступило 04.06.97

О.Б.Гарбузенко, Е.Э.Перский

ВЛИЯНИЕ ОХЛАЖДЕНИЯ НА ОБМЕН КОЛЛАГЕНА И ЭЛАСТИНА В КОЖЕ КРЫС

Важнейший фактор успешной трансплантации тканей и органов — сохранение жизнеспособности трансплантатов при их хранении в охлажденном состоянии, которая во многом зависит от того, изменяется ли характер обменных процессов. Изучено влияние охлаждения кожи на обмен и содержание коллагена и эластина — белков, в значительной степени определяющих процессы регенерации и механические свойства кожи.

Объектом исследования были коллаген и эластин кожи спины 3-месячных белых крыс-самок линии Вистар. Сравнивали обмен этих белков при инкубации кожи *in vitro* [2, 3] в интактных образцах при 37 °С с их обменом при 3 и 37 °С в образцах, охлаждавшихся в течение двух суток при 3 °С. Во всех трех случаях изучали также содержание коллагена и эластина в образцах кожи, которые растягивали при напряжениях $24,1 \cdot 10^4$ и $48,2 \cdot 10^4$ Н/м² по методике, описанной в [1]. Эти напряжения лежат в диапазоне механических нагрузок, действующих в нативной коже. Такая постановка эксперимента позволяет выявить влияние охлаждения на адаптивные перестройки соединительно-тканых структур к механическим напряжениям, в которых определяющую роль играют изменения обмена коллагена и эластина. Об особенностях обмена этих белков судили по

их концентрации в коже, отношению коллаген/эластин, а также по количеству свежесинтезированного коллагена. Концентрацию коллагена и эластина рассчитывали по содержанию в них оксипролина после разделения этих белков [4]. Свежесинтезированный коллаген экстрагировали из кожи 1 М раствором NaCl согласно [5]. Оксипролин определяли по [6].

Результаты эксперимента приведены на рис. 1, 2. Как видно, хранение кожи при 3 °С и дальнейшая ее инкубация при 37 °С приводят к накоплению указанных белков как в интактной коже, так и в коже, подвергнутой действию механического напряжения. Как было показано [1], растяжение кожи в пределах используемых напряжений, которое вызывает деформацию коллагенсинтезирующих клеток, приводит вначале к экспрессии (с максимумом при $24,1 \times 10^4$ Н/м²), а затем при напряжении $48,2 \cdot 10^4$ Н/м² — к снижению интенсивности синтеза коллагена. Динамика изменения интенсивности синтеза эластина в этом диапазоне напряжений имеет обратный характер.

В коже, которую после хранения при 3 °С инкубировали при той же температуре, не обнаружено существенных изменений накопления коллагена ни в интакт-

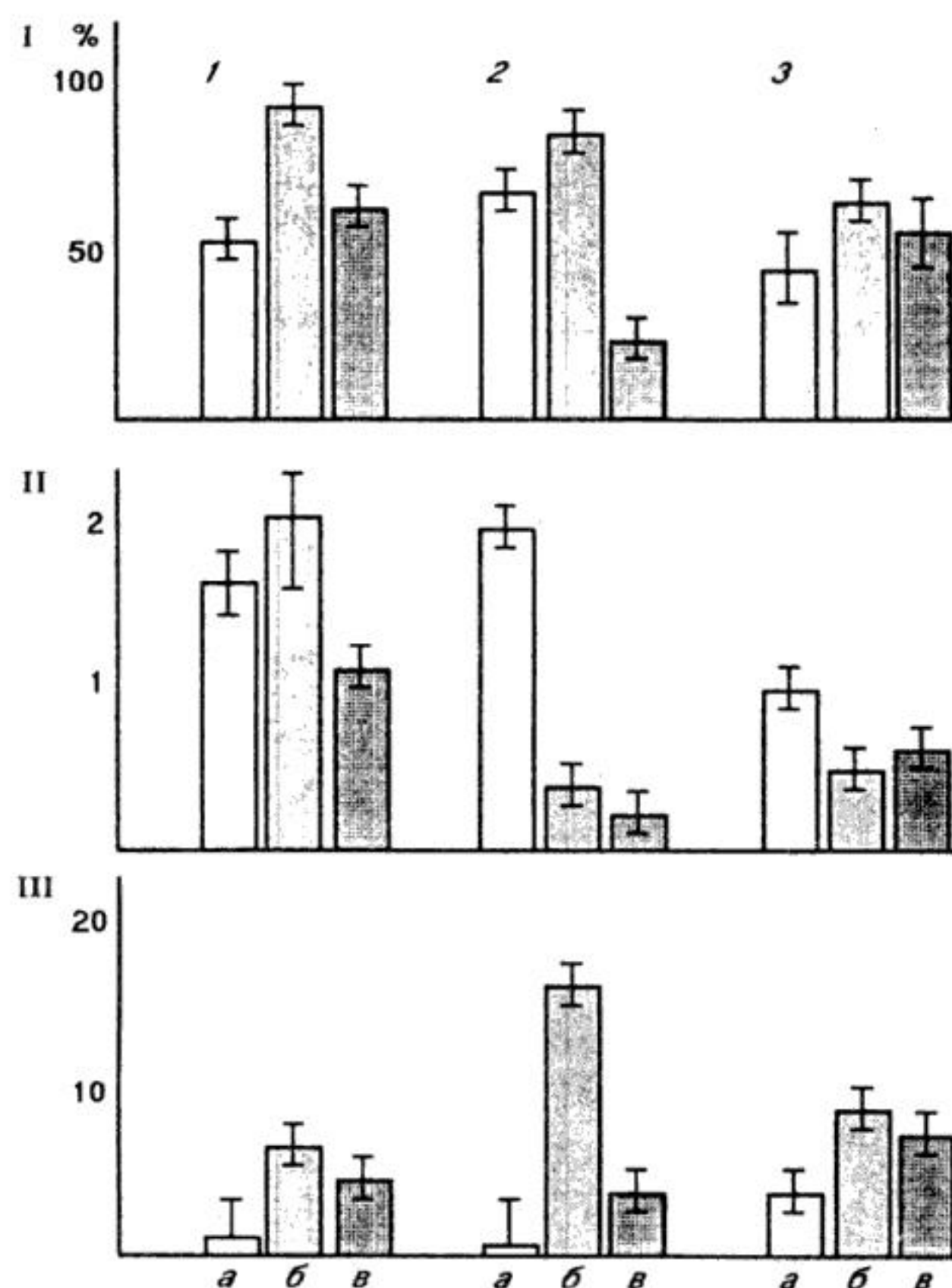


Рис. 1. Концентрация: I — общего коллагена; II — свежесинтезированного коллагена; III — эластина в коже (проц. на сухую массу); 1 — интактная кожа; 2 и 3 — кожа при напряжениях $24,1 \cdot 10^4$ и $48,2 \cdot 10^4$ Н/м²; а — интактная кожа, инкубированная при 37 °С; б и в — кожа, инкубированная при 37 и 3 °С после хранения в течение 2-х суток при 3 °С

ном состоянии, ни при обеих нагрузках. В то же время наблюдается увеличение его накопления в коже, инкубированной при 37 °С, после ее хранения при 3 °С. Содержание растворимого коллагена в коже без нагружения значительно не изменяется после ее охлаждения и последующей инкубации при 37 °С, уменьшается после инкубации при 3 °С и снижается под действием нагрузки при этих температурах инкубации. Это указывает на то, что в результате суммарного действия охлаждения и нагрузки степень поперечного связывания свежесинтезированного коллагена возрастает.

После холодового воздействия содержание эластина как в интактных, так и в подвергнутых растяжению образцах кожи резко возрастает. При этом отношение коллаген/эластин во всех трех случаях уменьшается (рис. 2). Это может свидетельствовать о том, что в результате хранения при температуре 3 °С кожа становится менее жесткой.

Таким образом, использованные условия хранения на холоду приводят к изменениям процессов обмена коллагена и эластина в коже, в результате которых ее механические свойства и способность адаптивно перестраиваться под действием нагрузок изменяются, что следует учитывать при использовании кожи в трансплантации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гарбузенко О.Б., Емец Е.Б., Перский Е.Э. Влияние деформации на обмен белков и механические свойства аорты и кожи крыс *in vitro* // Вестн. пробл. биол. и мед. – 1997. – № 25. – С. 12–18.
2. Лебедев Д.А. Методы изучения обмена коллагена в коже человека // Вопр. мед. химии. – 1978. – № 5. – С. 708–712.
3. Перский Е.Э., Кузнецов И.В., Гарбузенко О.Б. Температурная зависимость некоторых стадий обмена коллагена в коже крыс *in vitro* // Докл. НАН Украины. – 1997. – № 1. – С. 170–173.
4. Слуцкий Л.И. Биохимия нормальной и патологически измененной соединительной ткани. – Л.: Медицина, 1969. – 375 с.
5. Miller E.J., Rhodes R.K. Preparation and characterization of the different types of collagen // Meth. Enzymol. – 1982. – V. 82. – P. 33–64.
6. Stegemann H., Stalder K. Determination of hydroxyproline // Clin. Chim. Acta. – 1967. – V. 18, № 2. – P. 267–273.

Харьк. гос. ун-т

Поступило 18.11.97

УДК 577.12:577.112:577.24:577.322.7:577.21.06

**И.В.Кузнецов, А.С.Соловьева, А.В.Зинченко,
Е.Э.Перский**

БЫСТРАЯ СТРУКТУРНО-МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ АДАПТАЦИЯ КОЛЛАГЕНА К ТЕМПЕРАТУРЕ

Термостабильность коллагена коррелирует с содержанием в его молекулах остатков оксипролина. С увеличением их количества возрастают такие термодинамические характеристики про-

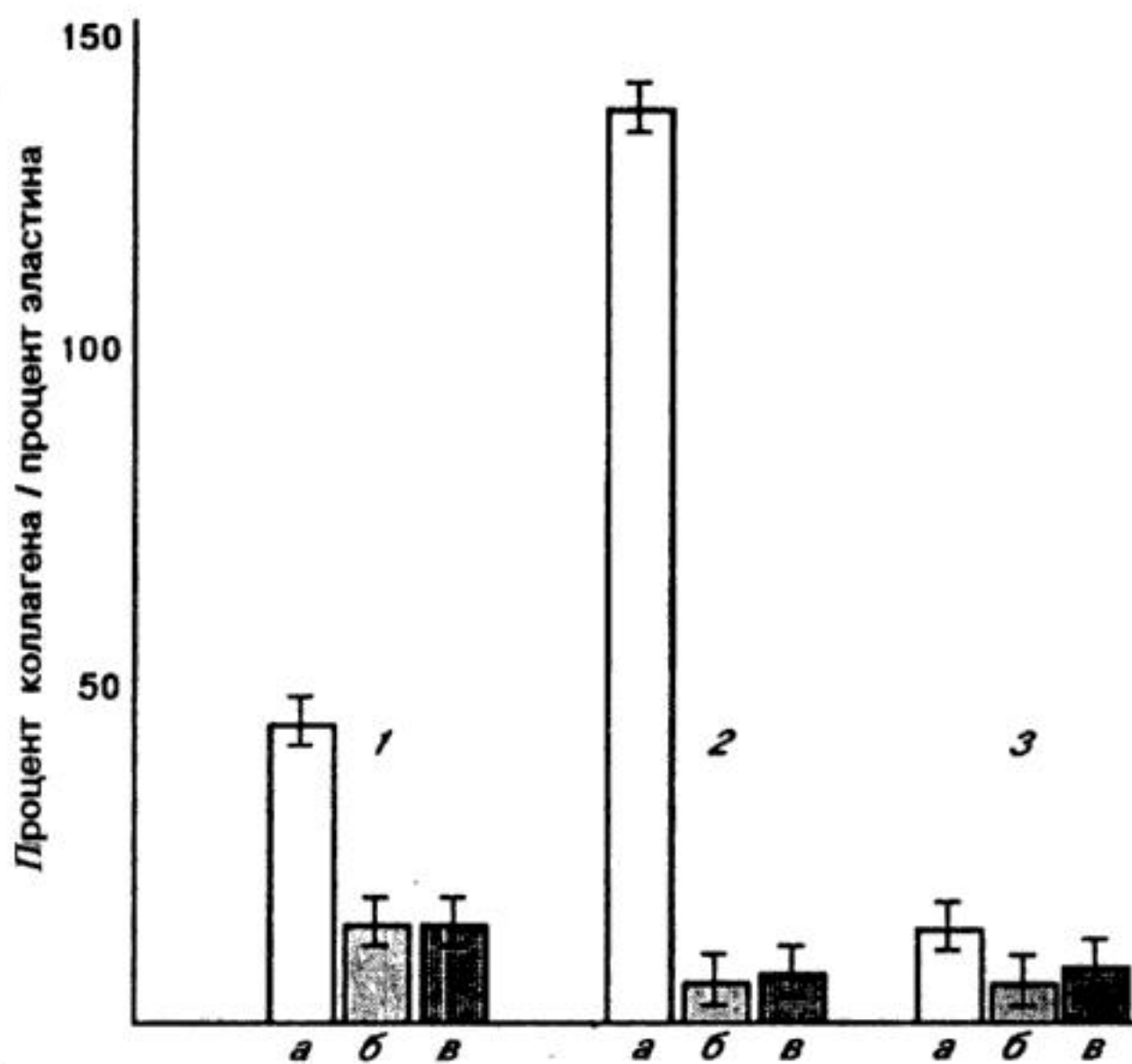
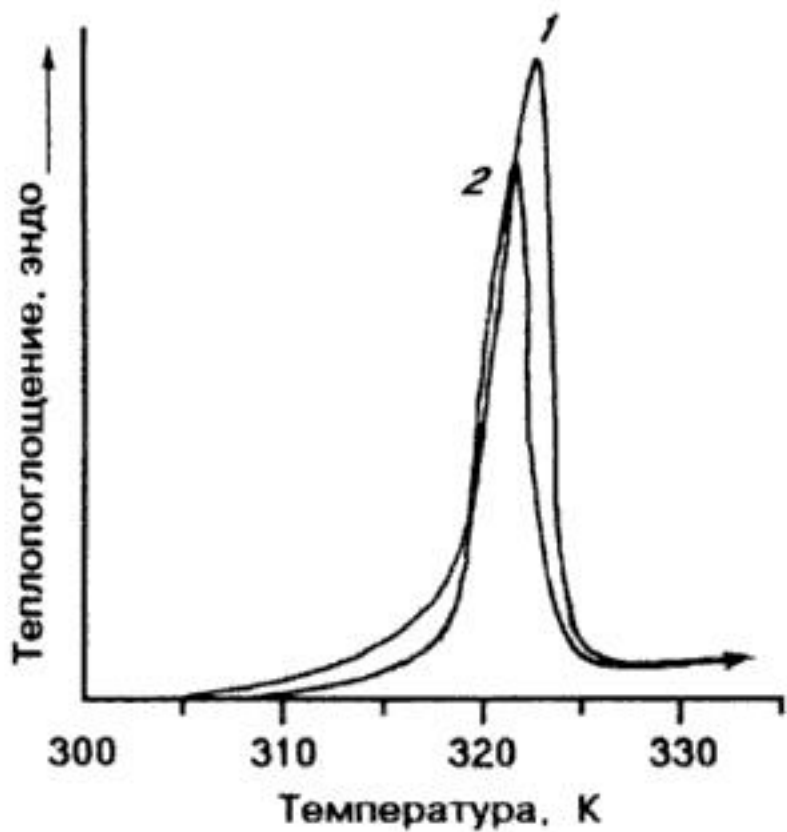


Рис. 2. Влияние охлаждения на отношение коллаген/эластин: 1 — в интактной коже; 2 и 3 — в коже при напряжениях $24,1 \cdot 10^4$ и $48,2 \cdot 10^4$ Н/м²; а — интактная кожа, инкубированная при 37 °С; б и в — кожа, охлаждавшаяся в течение 2-х суток при 3 °С и инкубированная при 37 и 3 °С после хранения в течение 2-х суток при 3 °С

цесса термоденатурации коллагена, как температура перехода спираль- клубок, тепловой эффект и энтропия денатурации. Эти особенности молекулы коллагена играют важную роль в температурной адаптации животных. Содержание оксипролина в коллагене колеблется так, что термостабильность данных белковых молекул у холоднокровных животных соответствует верхнему пределу температуры среды обитания, а у теплокровных — температуре тела [1, 2]. Содержание оксипролина в коллагене определяется в процессе посттрансляционной ферментативной обработки остатков пролина ферментом пролингидроксилаза. Показано, что *in vitro* интенсивность процесса гидроксирования остатков пролина в молекулах коллагена тканей как холоднокровных, так и теплокровных животных при 308 К выше, чем при 288 К [4]. Указанные изменения в работе фермента должны сказываться и на теплофизических параметрах процесса денатурации коллагена, синтезированного при данных температурах.



Кривые теплопоглощения коллагеновых фибрилл, образованных из коллагена, синтезированного при температурах 308 (1) и 288 К (2)

Цель работы — изучение термодинамических характеристик процесса денатурации коллагеновых фибрилл, синтезированных при температурах 288 и 308 К *in vitro*.

В работе был использован коллаген I типа, экстрагированный из кожи 3-месячных крыс-самок линии Вистар. Синтез коллагена и извлечение его из кожи проводили по методике, описанной в [6]. Концентрацию коллагена в растворе определяли по [7], а степень гидроксирования остатков пролина в молекуле коллагена — по методике [3]. После экстракции раствор коллагена, содержание остатков оксипролина в котором составляло 12,5–14,0 мкг/мл, инкубировали при температуре 293 К в течение 48 часов для образования коллагеновых фибрилл [5].

Калориметрические исследования были выполнены методом дифференциальной сканирующей калориметрии на приборе ДАСМ-4 (Пушино, Россия) при скорости сканирования 1 К/мин и избыточном давлении 2,5 атм.

Кривые теплопоглощения коллагеновых фибрилл, образовавшихся из молекул коллагена, синтезированного при 288 и 308 К, приведены на рисунке. Значения термодинамических параметров, полученные

в наших экспериментах, соответствуют значениям [5]. Степень гидроксирования коллагена, синтезированного в данных условиях, и термодинамические характеристики процесса плавления образованных из него фибрилл даны в таблице.

Степень гидроксирования коллагена, синтезированного при различных температурах, и термодинамические параметры плавления образованных из него фибрилл

Температура инкубации, К	Степень гидроксирования коллагена, %	Температура денатурации, К	Энтальпия денатурации (кДж/моль) · 10 ²	Энтропия денатурации, кДж/Кмоль
288	41,5	320,5	0,89±0,12	0,28±0,02
308	52,3	321,5	1,45±0,23	0,45±0,02

Полученные результаты свидетельствуют, что фибриллы, образованные из коллагена, синтезированного при 308 К, оказываются более термостабильными, что может быть связано с высоким содержанием в молекуле коллагена остатков оксипролина. Повышение значений термодинамических параметров денатурации в этих условиях может быть вызвано повышенной тенденцией к структурированию данных фибрилл по сравнению с фибриллами из коллагена, синтезированного при 288 К.

Таким образом, обнаруженный эффект является одним из механизмов быстрой адаптации коллагена животных к значительным перепадам температуры в осенне-зимний и весенне-летний периоды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бурджанадзе Т.В. К вопросу о роли 4-оксипролина в филогенетическом изменении термостабильности коллагена // Биофизика. — 1991. — Т. 36, № 5. — С. 778–779.
2. Есипова Н.Г., Григолава М.В., Щеголева Т.Ю. и др. Почему температура денатурации коллагена должна быть близка к температуре развития вида? // Биофизика. — 1981. — Т. 26, № 2. — С. 355–356.
3. Замараева Т.В. Определение ¹⁴С-оксипролина в модельных системах: Современные методы в биохимии. — М., 1977. — С. 265–270.

4. Кузнецов И.В., Гарбузенко О.Б., Кузьмис А.Э. и др. Особенности обмена коллагена кожи позвоночных животных при температурной адаптации // Пробл. криобиологии. — 1997. — № 3. — С. 27–31.
5. Николаева Т.И., Рочев Ю.А., Гаврилюк Б.К. Термодинамические характеристики коллагеновых фибрилл в процессе их образования // Биофизика. — 1995. — Т. 40, № 2. — С. 478–479.
6. Перский Е.Э., Кузнецов И.В., Гарбузенко О.Б. Температурная зависимость некоторых стадий обмена коллагена в коже крыс *in vitro* // Докл. НАН Украины. — 1997. — № 1. — С. 170–173.
7. Stegemann H., Stalder K. Determination of hydroxiprolin // Clin. Chim. Acta. — 1967. — V. 18, № 2. — P. 267–273.

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

Поступило 22.10.97

НАШИ ЮБИЛЯРЫ

60-летие

**Георгия Афанасьевича
БАБИЙЧУКА**



4 марта исполняется 60 лет со дня рождения заместителя директора по научной работе доктора биологических наук, профессора Георгия Афанасьевича Бабийчука.

В 1963 году он закончил Винницкий государственный медицинский институт, трудовую деятельность начал в г. Херсоне, работая врачом-травматологом.

В 1967 году поступил в клиническую ординатуру научно-исследовательского института протезирования, ортопедии и травматологии им. М. И. Ситенко г. Харькова. За время пребывания в ординатуре завершена работа над кандидатской диссертацией. Решением Министерства здравоохранения Украины Георгий Афанасьевич после ординатуры был оставлен в институте для дальнейшей научно-практической деятельности.

Начиная с 1972 года, принимает активное участие в организации и становлении Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, работая в нем заведующим лабораторией гипотермии отдела криофизиологии, а с 1988 года — заместителем директора по научной работе. Кроме того, Бабийчук Г. А. — заместитель директора центра по проблемам криобиологии и криомедицины, который создан НАН Украины МЗ Украины и АМН Украины, учредитель Украинского Общества криобиологии и криомедицины и заместитель председателя Общества, член двух специализированных ученых Советов и редакционной коллегии журнала “Проблемы криобиологии”. Им опубликовано 180 научных трудов, из них 3 монографии. Автор 20 изобретений и патентов на новые способы и устройства лечения различных заболеваний человека.

Георгий Афанасьевич — один из ведущих в мире ученых в области криобиологии и криомедицины, внесший существенный вклад в развитие представлений об искусственном гипобиозе при охлаждении организма человека

и животных. Его научной школой разработана оригинальная, не имеющая мировых аналогов, концепция роли гематоэнцефалического барьера в нейрохимических и нейрофизических процессах, обеспечивающих гомеостаз организма в условиях пониженных температур. На этой основе разрабатываются оригинальные способы управления функцией ГЭБ и, в частности, его проницаемости, что определяет перспективу направленного транспорта в ЦНС через барьер различных биологически активных веществ, медикаментов. Создаются патогенетически обоснованные методы лечения различных заболеваний ЦНС, обусловленных функциональной недостаточностью нейромедиаторных систем головного мозга, а также перевода теплокровных в состояние пойкилотермии. Проведенные исследования являются предпосылкой сохранения жизнедеятельности гомойотермных организмов при пониженных температурах.

Неоднократно юбиляр награждался почетными грамотами, а в 1993 году именной премией им. А. А. Богомольца Президиума Национальной Академии наук Украины.

Коллектив института сердечно поздравляет Георгия Афанасьевича с Юбилеем и желает ему крепкого здоровья, творческих свершений и открытий.

60-летие

Виктора Алексеевича МОИСЕЕВА



19 апреля исполняется 60 лет со дня рождения заведующего отделом криобиофизики лауреата Государственной премии Украины доктора биологических наук, профессора Виктора Алексеевича Моисеева.

В 1961 году он закончил Харьковский государственный университет, трудовую деятельность начал в Физико-техническом институте низких температур им. Б. И. Веркина.

С 1972 года научная и научно-организационная деятельность Виктора Алексеевича связана с Институтом проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины.

В. А. Моисеев — автор более 200 научных работ, в том числе 1 монографии и 15 авторских свидетельств и патентов на изобретение. Основные научные работы юбиляра посвящены выяснению молекулярных механизмов криоповреждения и криозащиты биообъектов различного уровня организации, а также поиску новых криоконсервантов.

Много внимания В. А. Моисеев уделяет приборному обеспечению проводимых под его руководством научных исследований. Благодаря его личной инициативе в ИПКиК НАН Украины получили широкое развитие такие современные биофизические методы с использованием высококачественного оборудования, как радиоспектроскопия магнитного резонанса, колебательная спектроскопия, СВЧ-диэлектрометрия, малоугловое рентгеновское рассеяние, микрокалориметрия в широком температурном диапазоне. Под его

непосредственным руководством разработан и изготовлен новый вид датчика теплового потока, который положен в основу дифференциального сканирующего калориметра, а также разработана аппаратура для обнаружения электромагнитных и электромеханических явлений в замороженных биологических объектах.

Моисеев В. А. является одним из ведущих ученых в области криобиологии, внесшим важный вклад в развитие представлений о молекулярных механизмах криоповреждений биологических объектов на различных этапах низкотемпературного консервирования. Им предложена модель развития повреждения мембран в твердофазной матрице, согласно которой одной из причин повреждения может быть развитие электрических полей, вызванных механическими напряжениями на границах между мембраной и твердой матрицей в замороженных растворах. Его научной школой разработана гипотеза криозащиты биологических объектов от деструктивного воздействия низких температур.

Большое внимание В. А. Моисеев уделяет подготовке научной смены. Среди его учеников 15 кандидатов и 2 доктора наук. Больше 20 лет он заведует отделом криобиофизики ИПКиК НАН Украины.

Виктор Алексеевич гармонично совмещает научную работу с активной научно-организационной и общественной деятельностью. Он является членом правления Украинского биофизического общества и общества криобиологов и криомедиков, редакционного совета журнала "Проблемы криобиологии", специализированных защитных советов по криобиологии при ИПКиК НАН Украины и по биофизике при ХГУ, председателем секции Ученого совета нашего института.

Заслуги юбиляра отмечались почетными грамотами, Государственной премией Украины в области науки и техники (1992 г.), а за разработку и внедрение сканирующего десорбционного калориметра В. А. Моисеев награжден медалью и дипломом 2-й степени ВДНХ Украины.

Поздравляя Виктора Алексеевича с Юбилеем, коллектив института желает ему здоровья, долгих лет жизни и новых творческих успехов.

60-летие

Бориса Петровича САНДОМИРСКОГО



30 апреля исполняется 60 лет со дня рождения заведующего отделом экспериментальной криомедицины доктора медицинских наук, профессора Бориса Петровича Сандомирского.

В 1961 году он закончил Харьковский медицинский институт и работал врачом-хирургом, с 1971 года — заведующим отделением ожогового центра. В 1971 году защитил кандидатскую диссертацию, в 1984 — докторскую, с 1986 года — профессор.

С 1974 года научная и научно-организационная деятельность Бориса Петровича связана с Институтом проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины. Проблематика его исследований сосредоточена в области экспериментальной и клинической криомедицины и направлена на изучение процессов, протекающих в органах и тканях после действия низких температур, для научного обоснования и создания новых эффективных методов криохирургии и криотерапии. Это направление получило развитие и подтверждение при разработке и внедрении методов холодового лечения ожоговых и гнойных ран, трофических язв, язвенной болезни 12-перстной кишки, заболеваний печени, хронического тонзиллита и др. За цикл работ по изучению действия низких температур на кожу с целью создания новых методов криотерапии и криоконсервирования в 1985 году д-р мед. наук Сандомирский Б. П. с сотрудниками отдела был удостоен премии им. А. А. Богомольца АН УССР.

Большое внимание проф. Сандомирский Б. П. уделяет созданию аппаратуры. Так, разработка и внедрение в лечебную практику специального эндоскопического криоинструмента — криоэлектрокоагулятора (КЭК-1), лапароскопического криоинструмента для холодового лечения печени велись при его непосредственном участии.

В 90-е годы проф. Б. П. Сандомирский возглавляет исследования, ориентированные на создание технологий получения и применения криоконсервированных клеток и фрагментов тканей для клинического применения (ксеногепатоциты, культуры инсулинпродуцирующей ткани поджелудочной железы, фрагменты селезенки и печени).

Результаты теоретических, экспериментальных и клинических разработок отражены в 202 научных статьях и 7 монографиях, их приоритет защищен 21 авторским свидетельством.

Профессор Сандомирский Б. П. подготовил 11 кандидатов и 1 доктора наук. Его многочисленные ученики стали высококвалифицированными специалистами, профессорами, возглавляют научные коллективы.

Б. П. Сандомирский — член специализированного докторского совета, редколлегии журнала “Проблемы криобиологии”, член научных объединений ученых Украины, а также является членом Международного общества по эндотоксинам.

В 1991 году по инициативе Бориса Петровича был создан Харьковский независимый фонд материальной помощи в повышении квалификации врачей (“Харьков-Квалимед”). Благодаря его энергии и организаторским способностям десятки практических врачей из разных регионов Украины и России получили возможность приобрести криоаппаратуру, получить новые знания, освоить метод криотерапии непосредственно в лучших клиниках города Харькова.

Сегодня юбиляр продолжает развивать возможности криовоздействия в лечении проблемной кожи, послеожоговых рубцов, угревой сыпи и др., полон энергии и новых интересных проектов.

Коллектив института сердечно поздравляет Бориса Петровича со славным Юбилеем, желает ему доброго здоровья, долгих лет творческой жизни, успехов во всех его добрых делах и начинаниях.

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

1 1998

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

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

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

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

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