

УДК 612.591

doi: 10.17238/issn2308-3174.2016.4.40

***ИЗУЧЕНИЕ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ СОСТОЯНИЙ ОРГАНИЗМА
МЕТОДОМ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ТКАНЕЙ
(из опыта Северного государственного медицинского университета)***

*В.П. Пащенко**

*Северный государственный медицинский университет (г. Архангельск)

В статье сообщается об использовании первичных тканевых культур в работе лаборатории тканевых и клеточных культур Северного государственного медицинского университета для оценки физиологического состояния клеток организма при стрессовых реакциях, экстремальных воздействиях и воздействиях биологически активных веществ. Использовали метод первичных тканевых культур на поверхности стекла (стенке пробирок). В качестве питательной среды брали среду 199 с 10–15 % бычьей сыворотки. опыты проводили на белых беспородных мышах с применением для культивирования ткани почек. Непосредственное охлаждение культивируемых фрагментов ткани почек в течение 1 ч при температуре 20 °С приводило к уменьшению количества растущих культур, но однократное охлаждение самих животных при температуре –10 °С до состояния выраженного холодового наркоза сопровождалось увеличением числа растущих культур ткани почек по сравнению с контролем, что указывало на повышение функциональной активности клеток в этом органе. Общее облучение мышей лучами Рентгена в дозах 500 г и 1000 г, старение животных и полное голодание в течение 5 дн., как и острое отравление животных хлористым кадмием – ингибитором сульфгидрильных групп, приводило к задержке образования клеточных колоний при культивировании фрагментов почки. Напротив, усиление роста культивируемых тканей почек наблюдалось через 3 и 5 дн. после подкожного ожогового воспаления, на 28-й и 30-й день роста в организме карциномы Эрлиха, на 3-й и 6-й день развития компенсаторной гипертрофии почки. В опытах *in vitro*, *in vivo* изучали также действие адреналина, ацетилхолина, гистамина, адренокортикотропного гормона (АКТГ) и некоторых веществ сульфгидрильной природы. Установили, что метод культивирования ткани может применяться для выявления цитофизиологического состояния клеток в тканях организма при экстремальных воздействиях.

Ключевые слова: методы культивирования тканей, экстремальные состояния организма, стрессовая реакция, рост и регенерация тканей.

Ответственный за переписку: Пащенко Владимир Петрович, адрес: 163000, г. Архангельск, просп. Троицкий, д. 51; e-mail: paschenkow@mail.ru

Для цитирования: Пащенко В.П. Изучение экстремальных состояний организма методом культивирования тканей (из опыта Северного государственного медицинского университета) // Вестн. Сев. (Арктич.) федер. ун-та. Сер.: Мед.-биол. науки. 2016. № 4. С. 40–48. doi: 10.17238/issn2308-3174.2016.4.40

Основное научное направление работ сотрудников Северного государственного медицинского университета (ранее – АГМИ) традиционно определяется региональной научно-практической программой «Здоровье населения Европейского Севера». В рамках этого направления в АГМИ в 1966–1967 годах была создана проблемная лаборатория по изучению акклиматизации человека на Крайнем Севере. Инициатором организации в составе этой лаборатории небольшой группы сотрудников, занимающихся тканевыми и клеточными культурами, был известный хирург, заведующий кафедрой общей хирургии АГМИ, профессор Г.А. Орлов, который внес значительный вклад в изучение влияния низких температур на организм человека [1]. Это и определило физиологическую направленность работы группы.

Основания для привлечения метода тканевых и клеточных культур для углубленного изучения экстремальных состояний организма и проблемы влияния холода можно найти в самых ранних исследованиях [2]. Известные нам в то время факты показывали, что рост клеточных культур зависит от состояния организма донора ткани, но многие вопросы оставались неизученными, в частности влияние пониженных температур и других экстремальных состояний организма на результаты культивирования.

Изучение реакции клеток на экстремальные воздействия – одно из традиционных направлений исследований ряда сотрудников и лабораторий Института цитологии АН СССР, связанное с изучением фундаментальных закономерностей влияния низких температур на клеточные структуры [3, 4]. Интерес к этой проблеме сохраняется и в настоящее время [5, 6]. В частности, привлекают внимание вопросы влияния экстремальных воздействий и низких температур на стволовые и опухолевые клетки. Ряд наших работ практического использования тканевых и клеточных культур также были опубликованы в изданиях этого института [7].

В начале исследований сотрудников группы тканевых культур АГМИ были изучены различные способы культивирования тканей взрослых

животных как с использованием плазмы, так и без нее, а также различные варианты культивирования: на покровных стеклах, на «плоту», в сосудах Карреля и др. Наиболее приемлемым оказался метод бесплазменного культивирования ткани в пробирках, когда фрагменты ткани размещали на ее стенке, а пробирки, закрытые пробками, помещали в неподвижных штативах в термостат. Опыты проводили на белых беспородных мышах. В качестве питательной среды использовали среду 199 с добавлением 10–15 % бычьей сыворотки [8].

Для морфологических исследований культивирование кусочков ткани производили первоначально на покровных стеклах в пробирках. На каждом покровном стекле размером 24×8 мм размещали до 8 кусочков. После культивирования покровные стекла обмывали в растворе Хенкса при температуре 37 °С, затем культуры фиксировали в смеси Буэна и производили окраску препаратов в гематоксилине Карацци и эозине. В дальнейшем для этих целей использовали миллипоровые фильтры «Синпор» (Чехия) и «Миллипор» (Merck Millipore).

Для культивирования мы пробовали использовать ткани различных органов взрослых животных: легких, селезенки, печени, кишечника, почки, семенников, яйцеводов. От взрослых животных весом 20–25 г удалось получить рост ткани почек, семенников и яйцеводов, культуры тканей других органов были получены только от молодых животных весом 5–7 г. В связи с этим наиболее подходящими оказались ткани почек. С точки зрения физиологии почка – сложный и жизненно важный выделительный орган, тесно связанный с метаболическими процессами в организме, в т. ч. с процессами терморегуляции и стрессовой реакцией. Культура ткани почек достаточно однородна и состоит в основном из эпителиальных клеток.

Следует сказать, что зависимость образования и роста культур от величины и формы эксплантата вызывала необходимость использовать приемы, обеспечивающие равноценность отбора кусочков в сравниваемые группы на-

блюдений. Небольшие размеры кусочков и неправильная их форма не позволяли производить отбор фрагментов ткани по каким-либо определенным признакам. Для получения сравнимых результатов в опыте мы брали равные фрагменты органов, продолжительность их измельчения была одинакова, кусочки отбирали одной и той же пастеровской пипеткой. Чтобы случайные изменения условий культивирования в одной из пробирок не влияли на результаты, эксплантаты размещали в нескольких пробирках. Для сопоставимости результатов при проведении исследований мы широко использовали таблицы случайных чисел [9]. Опыты проводили с учетом статистических рекомендаций [9–11]. Специально проведенные наблюдения показали, что используемые нами методики и приемы обеспечивают 5–10 %-ю точность однократного определения, которая зависит от количества используемых фрагментов ткани. Для статистического сравнения результатов в контрольных и опытных пробах, учитывая асимметричность распределения клеточных колоний по их величине в исходной совокупности, а также исходя из особенностей планирования опытов, мы использовали непараметрический критерий Вилкоксона и коэффициент корреляции рангов Спирмена [12, 13]. Рост клеток оценивали путем их подсчета в зонах роста и вычисления средних показателей численности по отношению к эксплантированным кусочкам.

В дальнейших методических исследованиях нами были изучены следующие факторы, влияющие на результаты культивирования тканей взрослых животных [14]: влияние количества сыворотки в среде в диапазоне ее концентраций от 5 до 40 %; оптимальное количество фрагментов ткани, культивируемых в одной пробирке, при использовании 1 мл среды; динамика роста культур в пробирках по дням без смены питательной среды; влияние величины тканевого эксплантата на размер клеточной колонии; влияние инактивированной и не инактивированной сыворотки на рост культур; значенные сроки хранения сыворотки; роль качества стекла пробирок; роль центрального экспланта-

та для последующего развития клеточной колонии (после его удаления) и значение исходного рН среды. В результате данных исследований удалось выбрать адекватные условия для культивирования тканей почки взрослых животных в закрытых пробирках при использовании 1 мл среды 199 и содержании сыворотки 15 %. Наиболее оптимальным для роста культур оказалось исходное рН среды 6,9, использование от одного животного 30–40 фрагментов ткани, размещаемых на границе жидкой и газовой фаз среды. Выявилась также зависимость роста культур от возраста животного, дополнительного внесения в питательную среду глутатиона или цистеина, которые оказывали на рост культур взрослых животных значительное активизирующее влияние.

Методика постановки культур была нами дополнительно стандартизирована и уточнена в зависимости от размещения культур на определенном расстоянии от дна пробирки и величины кусочков. Для отбора кусочков определенной величины мы предложили использовать микропипетку, снабженную грушей с загнутым носиком и с небольшим диаметром входного отверстия. Также была предложена специальная пипетка для суспендирования взвеси фрагментов ткани.

Охлаждение мышей проводили при остром, подостром и хроническом режимах в холодильной камере. Кроме того, в отдельных опытах охлаждению подвергали и непосредственно фрагменты ткани, выделенные из организма перед культивированием [15, 16].

На основании проведенных методических исследований, постановку культур производили следующим образом: после извлечения в стерильных условиях фрагменты отдельных органов измельчали ножницами в чашках Петри, содержащих по 3 мл раствора Хенкса с антибиотиками (500 ед./мл пенициллина и стрептомицина). Пастеровской пипеткой кусочки ткани по одному переносили на стенку пробирок и размещали их продольно на расстоянии 4,0–4,5 см от дна пробирки. При однократном определении роста культур от одного

животного брали до 60 кусочков ткани, которые размещали в 8–12 пробирках, до 10 кусочков в каждой.

В пробирки для культивирования вносили 1 мл среды 199 с 15 % бычьей сыворотки и 100 ед./мл пенициллина и стрептомицина, для активации роста дополнительно в среду вносили 0,06 % цистеина. Пробирки с культурами под углом 2° помещали в неподвижных штативах в термостат при температуре 37,5 °С. Число выросших клеточных колоний и размер зон роста культур (оцениваемых по числу клеток в колонии) определяли через 72 ч от начала культивирования [14–16].

Исследования, проведенные с использованием нашей методики культивирования ткани, показали, что клетки тканей почки при их непосредственном кратковременном охлаждении перед размещением в термостат проявляли высокую чувствительность к пониженным температурам. Охлаждение фрагментов ткани в течение 1 ч при температуре 20 °С приводило к угнетению образования культур на 31,5 %, а при 0 °С – на 43 %. С увеличением экспозиции охлаждения угнетение роста культур было еще более выражено. Экспозиция фрагментов ткани при минусовых температурах вызывала почти полное подавление роста культур. Однако при охлаждении уже растущих культур устойчивость клеток к кратковременному охлаждению повышалась.

После однократного охлаждения непосредственно самих животных при температуре –10 °С до состояния выраженного холодового наркоза (что имитировало замерзание человека в воде или на суше), напротив, наблюдалось увеличение образования культур на 51,0 % по сравнению с контролем. При заборе ткани через 72 ч после охлаждения животного отмечались еще большее увеличение образования культур и их более интенсивный рост. Все это указывает на то, что острое однократное охлаждение организма сопровождается резко выраженной активацией клеточной активности. Вместе с тем хроническое повторное глубокое охлаждение мышей в течение 14 дн. приводило

к угнетению способности к росту клеток при культивировании на 26,0 % ($p < 0,001$). Данные результаты совпадают с выраженными физиологическими явлениями в организме у любителей зимнего плавания [17] и характером заболевания рабочих и рыбаков, подвергавшихся длительному хроническому охлаждению, особенно во влажной среде [18].

Кроме воздействия пониженных температур на рост культур также изучали целый ряд других экстремальных воздействий на организм и некоторых веществ, влияющих на его обменные процессы. Рост клеток тканей путем культивирования старались оценивать при тех же физиологических состояниях, при которых изучались изменения митотической активности клеток в организме [19–22]. Выбор широкого спектра экстремальных воздействий был обусловлен необходимостью анализа различных механизмов регуляции этого процесса в организме. Свойства клеток тканей почек мышей путем культивирования исследовали при следующих состояниях организма: при старении животных, общем облучении рентгеном в дозах 500 г и 1000 г (ЛД/50–ЛД/100), полном голодании животных в течение 5 дн. и остром отравлении хлористым кадмием – ингибитором сульфгидрильных групп в организме (0,05 мг на 1 г веса животного). Результаты исследований показали, что все эти воздействия на организм животного сопровождаются задержкой образования и роста клеточных колоний.

Напротив, усиление способности к росту культивируемых тканей почек наблюдалось через 3 и 5 дн. после подкожного ожогового воспаления, на 28-й и 30-й день роста в организме карциномы Эрлиха, на 3-й и 6-й день развития компенсаторной гипертрофии почки, вызванной удалением парного органа и однократной интенсивной физической нагрузкой. Изменений роста тканей почек животных при культивировании не наблюдалось после непрерывного эфирного и миналового наркоза в течение 2,5 ч [23].

В дальнейших наблюдениях мы попытались установить действие ряда биологически

активных веществ, принимающих участие в регуляции физиологических процессов в организме. Для опытов мы избрали адреналин, ацетилхолин, гистамин, АКТГ и некоторые вещества сульфгидрильной природы (цистеин и глутатион), а также ингибитор сульфгидрильных групп – хлористый кадмий. Выбор этих веществ был не случаен. Адреналин и ацетилхолин являются основными медиаторами нервной системы, АКТГ – важнейшим гормоном, принимающим участие в развитии стрессовой реакции. Цистеин и глутатион регулируют деление клеток. Гистамин способствует фагоцитозу и пролиферации клеток в организме, активирует ретикулоэндотелиальную систему [23].

Влияние данных веществ на способность тканей к росту при культивировании мы изучали как в условиях *in vitro*, так и при введении этих веществ в организм животных. Характер их влияния зависел от дозы и продолжительности экспозиции. При внесении их в среду на весь срок культивирования (72 ч) в большинстве случаев наблюдалось угнетение роста культур. Наиболее значительное угнетающее действие вызывали адреналин, гистамин и ингибитор сульфгидрильных групп – хлористый кадмий. В пересчете на молярные концентрации минимальное статистически значимое ($p < 0,05$) действие адреналина проявлялось при $3,04 \cdot 10^{-5}$ М, ацетилхолина – при минимальной концентрации $3,44 \cdot 10^{-4}$ М, гистамина – при концентрации $5,1 \cdot 10^{-5}$ М, а хлористого кадмия – в концентрации $6,74 \cdot 10^{-4}$ М.

Напротив, активирующее действие цистеина и глутатиона выявлялось в широком диапазоне концентраций (от 0,0054 до 0,1000 %). Стимулирующее влияние цистеина на рост тканей взрослых животных было более значительно, чем влияние глутатиона. После однократного введения этих веществ животным статистически значимое изменение роста ткани почек мышей в культуре отмечалось в первые 2–4 ч после введения на 1 г веса животного: гистамина – 0,2500 мг, ацетилхолина – 0,0300 мг и адреналина – 0,0066 мг. При повторных введениях мышам в течение 4 дн. гистамина, адре-

налина, а также в течение 12 дн. АКТГ по 5 ед. ежедневно изменений в образовании и росте клеток почек в культуре обнаружено не было.

Таким образом, проведенные исследования показали, что действие адреналина, ацетилхолина, гистамина, АКТГ на образование и рост клеточных колоний проявляется лишь в достаточно высоких дозах, значительно превышающих физиологические. Обращает на себя внимание активирующее влияние на рост культур цистеина и глутатиона. Вместе с тем полученные результаты показали, что влияние этих веществ на образование клеточных колоний менее выражено по сравнению с действием на митотическую активность клеток в организме.

В результате проделанной работы можно заключить, что путем культивирования удастся обнаружить изменения свойств клеток не только при старении, но и при некоторых других физиологических и экстремальных состояниях организма: остром и хроническом охлаждении, воспалении, опухолевом росте, стрессе, физической нагрузке, голодании, компенсаторной гипертрофии, облучении рентгеном и др. Показано влияние ряда биологически активных веществ на процессы, связанные с образованием и ростом тканевых культур. Однако оказалось, что при культивировании на ранних этапах роста культур каких-либо морфологических особенностей клеток в зоне роста выявить не удастся.

С учетом того, что исследования, выполняемые в лаборатории тканевых и клеточных структур, связаны с адаптацией человека к экстремальным условиям, казалось логичным обсуждать полученные результаты также с позиций физиологии и патофизиологии, привлекая физиологические механизмы адаптации, стрессовую реакцию, явления общего адаптационного синдрома, при которых также происходят мобилизация пластического материала, повышение уровня синтетических процессов, гормональной активности и физиологической регенерации. При этом наиболее четко изменения обнаруживаются в фазы мобилизации и резистентности, когда отмечается усиление

образования и роста клеточных колоний при культивировании, а также в фазу истощения, которая сопровождается их угнетением. Не противоречит этому и мнение А.А. Кронтовского, утверждавшего, что условия жизни клеток тканей при культивировании во многом сходны с теми, которые имеют место в организме при регенерации, заживлении ран, новообразовании тканей, воспалении [24]. Аналогичного мнения придерживалась В.М. Смирнова [25]. Н.Г. Хлопин в своей монографии «Культура тканей» писал, что явления, наблюдаемые в эксплантатах, имеют много общего с процессами регенерации и так называемыми воспалительными разрастаниями в целом организме [26]. С.Я. Залкинд также считал, что культура тканей является удобным объектом для изучения некоторых важных сторон процесса регенерации и что регенерация культуры имеет известные черты сходства с заживлением ран в организме [27].

На основании проведенных исследований мы пришли к следующим выводам:

1. Метод культивирования ткани может применяться для выявления цитофизиологического состояния клеток организма, их жизнеспособности при перестройке метаболизма в новых условиях; способности клеток к трансформации и миграции, взаимодействию со стеклом и образованию растущей колонии, митотической активности и других явлений начальной фазы культивирования.

2. Образование и рост тканей взрослых животных при культивировании *in vitro* зависит от ряда условий: характера подложки, рН среды, способов размещения тканей на подложке, свойств сыворотки. Значительное влияние на интенсивность роста культур оказывают свойства первичного эксплантата (вид

ткани, возраст донора), используемого для культивирования, который является основным источником пролиферативно-активных клеток в зоне роста.

3. Воспроизводимость результатов при использовании тканевых культур для оценки роста тканей взрослых животных и человека может достигать 5–10 %. Дальнейшее повышение точности наблюдений может достигаться, в частности, за счет увеличения числа микрофрагментов ткани и совершенствования критериев оценки их роста.

4. Изучение роста тканей *in vitro* показало, что при различных физиологических и экстремальных состояниях организма удается установить как усиление, так и угнетение активности клеток при образовании и росте клеточных культур.

5. Изучение влияния на образование и рост клеток *in vitro* и *in vivo* ряда биологически активных веществ: адреналина, ацетилхолина, гистамина, АКТГ, цистеина, глутатиона и хлористого кадмия – показало, что наиболее значительное угнетающее влияние на рост клеток оказывают адреналин, гистамин и хлористый кадмий, в то время как цистеин и глутатион оказывают на рост культур активирующее действие. При этом действующие на образование и рост культур почек *in vitro* дозы адреналина, ацетилхолина, гистамина и хлористого кадмия были значительно выше, чем активные физиологические дозы этих веществ для самого организма.

6. Количественный метод оценки свойств клеток организма путем культивирования может быть рекомендован для изучения физиологических и экстремальных состояний организма, а также биологического действия фармакологических и токсических веществ.

Список литературы

1. Пащенко В.П., Попов В.А. Профессор Г.А. Орлов. Хирургическая, научная и педагогическая школы. Архангельск, 2011. 424 с.
2. Румянцев А.В. Культуры тканей вне организма и их значение в биологии. М., 1932. 322 с.

3. Вольфензон Л.Г. Влияние низких температур на витальное окрашивание фибробластов и гистиоцитов рыхлой соединительной ткани кролика // Реакция клеток на экстремальные воздействия: сб. М.; Л., 1963. С. 75–79.
4. Лозина-Лозинский Л.К. О реакции биологических систем на экстремальные воздействия в связи с задачами экзобиологии // Реакция клеток и их белковых компонентов на экстремальные воздействия: сб. М.; Л., 1966. С. 3–10.
5. Полянская Г.Г., Кольцова А.М. Проблема нестабильности генома при культивировании эмбриональных стволовых клеток человека // Клеточные культуры: информ. бюл. Вып. 29. СПб., 2013. С. 3–13.
6. Райдан М., Шубин Н.А., Николаенко Н.С., Блинова М.И., Прохоров Г.Г., Пинаев Г.П. Степень устойчивости опухолевых клеток к действию низких температур по сравнению со стволовыми клетками костного мозга // Клеточные культуры: информ. бюл. Вып. 29. СПб., 2013. С. 65–71.
7. Пащенко В.П. Опыт использования тканевых и клеточных культур в клинической практике // Клеточные культуры: информ. бюл. Вып. 32. СПб., 2016. С. 53–62.
8. Пол Д. Культура клеток и тканей. М., 1963. 346 с.
9. Бейли Н. Статистические методы в биологии. М., 1962. 260 с.
10. Чернов Г., Мозес Л. Элементарная теория статистических решений. М., 1962. 405 с.
11. Урбах В.Ю. Математическая статистика для биологов и медиков. М., 1963. 323 с.
12. Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. Л., 1973. 141 с.
13. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. М., 1990. 383 с.
14. Пащенко В.П. Влияние условий культивирования на количественную оценку жизнеспособности тканей организма // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1978. № 11. С. 629–631.
15. Пащенко В.П. Влияние экстремальных воздействий на рост почечной ткани в культуре // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1970. № 8. С. 94–98.
16. Пащенко В.П. Количественная оценка жизнеспособности почечной ткани при различных воздействиях на организм донора // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1976. № 12. С. 1514–1515.
17. Белобородов Г.С. Ускорение процесса приспособления к условиям севера средствами закаливания и физической культуры: автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 1981. 26 с.
18. Орлов Г.А. Генерализация при хроническом охлаждении во влажной среде // Акклиматизация и краевая патология человека на Севере: материалы межобл. конф. сев.-зап. областей РСФСР по акклиматизации и краевой патологии человека на Севере (октябрь–ноябрь 1969 г., Архангельск). Архангельск, 1970. С. 131–133.
19. Алов И.А. Цитофизиология и патология митоза. М., 1972. 264 с.
20. Альперн Д.Е. Воспаление (вопросы патогенеза). М., 1959. 544 с.
21. Горизонтов П.Д., Протасова Т.Н. Роль АКТГ и кортикостероидов в патологии (к проблеме стресса). М., 1968. 335 с.
22. Бузников Г.А. Низкомолекулярные физиологически активные вещества в регуляции первых делений дробления // Межклеточные взаимодействия в дифференцировке и росте. М., 1970. С. 150–163.
23. Пащенко В.П. Влияние физиологических, экстремальных и патологических состояний организма на рост тканей при культивировании: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Архангельск, 1994. 47 с.
24. Кронтовский А.А. Культура тканей // Большая мед. энцикл. М., 1930. Т. 15. С. 74–98.
25. Смирнова В.М. Тканевые культуры. Л., 1933. 320 с.
26. Хлопин Н.Г. Культура тканей. М., 1940. 372 с.
27. Залкинд С.Я. Жизнь клеток вне организма. М., 1953. 131 с.

References

1. Pashchenko V.P., Popov V.A. *Professor G.A. Orlov. Khirurgicheskaya, nauchnaya i pedagogicheskaya shkoly* [Professor G.A. Orlov. Surgical, Scientific and Pedagogical Schools]. Arkhangelsk, 2011. 424 p.
2. Rumyantsev A.V. *Kul'tury tkaney vne organizma i ikh znachenie v biologii* [Tissue Cultures Outside the Body and Their Importance in Biology]. Moscow, 1932. 322 p.

3. Vol'fenzon L.G. Vliyanie nizkikh temperatur na vital'noe okrashivanie fibroblastov i gistotsitov rykhloy soedinitel'noy tkani krolika [The Effect of Low Temperatures on the Vital Staining of Fibroblasts and Histiocytes of Rabbit Loose Connective Tissue]. *Reaktsiya kletok na ekstremal'nye vozdeystviya* [Cellular Response to Extreme Exposure]. Moscow, Leningrad, 1963, pp. 75–79.

4. Lozina-Lozinskiy L.K. O reaktsii biologicheskikh sistem na ekstremal'nye vozdeystviya v svyazi s zadachami ekzobiologii [On the Response of Biological Systems to Extreme Exposure in Connection with Exobiological Problems]. *Reaktsiya kletok i ikh belkovykh komponentov na ekstremal'nye vozdeystviya* [The Response of Cells and Their Protein Components to Extreme Exposure]. Moscow, Leningrad, 1966, pp. 3–10.

5. Polyanskaya G.G., Kol'tsova A.M. Problema nestabil'nosti genoma pri kul'tivirovani embrional'nykh stvolovykh kletok cheloveka [The Problem of Genomic Instability When Culturing Human Embryonic Stem Cells]. *Kletochnye kul'tury: inform. byul.* [Cell Cultures: Information Bulletin]. Iss. 29. St. Petersburg, 2013, pp. 3–13.

6. Raydan M., Shubin N.A., Nikolaenko N.S., Blinova M.I., Prokhorov G.G., Pinaev G.P. Stepen' ustoychivosti opukholevykh kletok k deystviyu nizkikh temperatur po sravneniyu so stvolovymi kletkami kostnogo mozga [The Degree of Tumor Cells Resistance to Low Temperatures in Comparison with Bone Marrow Stem Cells]. *Kletochnye kul'tury: inform. byul.* [Cell Cultures: Information Bulletin]. Iss. 29. St. Petersburg, 2013, pp. 65–71.

7. Pashchenko V.P. Opyt ispol'zovaniya tkanevykh i kletochnykh kul'tur v klinicheskoy praktike [The Experience of Using Tissue and Cell Cultures in Clinical Practice]. *Kletochnye kul'tury: inform. byul.* [Cell Cultures: Information Bulletin]. Iss. 32. St. Petersburg, 2016, pp. 53–62.

8. Paul J. *Cell and Tissue Culture*. Edinburgh, 1959 (Russ. ed.: Pol D. *Kul'tura kletok i tkaney*. Moscow, 1963. 346 p.).

9. Bailey N.T.J. *Statistical Methods in Biology*. 1959 (Russ. ed.: Beyli N. *Statisticheskie metody v biologii*. Moscow, 1962. 260 p.).

10. Chernov G., Mozes L. *Elementarnaya teoriya statisticheskikh resheniy* [Elementary Theory of Statistical Decisions]. Moscow, 1962. 405 p.

11. Urbakh V.Yu. *Matematicheskaya statistika dlya biologov i medikov* [Mathematical Statistics for Biologists and Physicians]. Moscow, 1963. 323 p.

12. Gubler E.V., Genkin A.A. *Primenenie neparametricheskikh kriteriev statistiki v mediko-biologicheskikh issledovaniyakh* [The Use of Nonparametric Statistics in Biomedical Research]. Leningrad, 1973. 141 p.

13. Avtandilov G.G. *Meditsinskaya morfometriya* [Medical Morphometry]. Moscow, 1990. 383 p.

14. Pashchenko V.P. Vliyanie usloviy kul'tivirovaniya na kolichestvennyu otsenku zhiznesposobnosti tkaney organizma [The Influence of Culture Conditions on the Quantitative Assessment of Tissue Viability]. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*, 1978, no. 11, pp. 629–631.

15. Pashchenko V.P. Vliyanie ekstremal'nykh vozdeystviy na rost pochechnoy tkani v kul'ture [The Influence of Extreme Effects on the Growth of Renal Tissue in Culture]. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*, 1970, no. 8, pp. 94–98.

16. Pashchenko V.P. Kolichestvennaya otsenka zhiznesposobnosti pochechnoy tkani pri razlichnykh vozdeystviyakh na organizm donora [Quantitative Assessment of Kidney Tissue Viability at Various Effects on the Donor's Body]. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*, 1976, no. 12, pp. 1514–1515.

17. Beloborodov G.S. *Uskorenie protsessa prispobleniya k usloviyam severa sredstvami zakalivaniya i fizicheskoy kul'tury: avtoref. dis. ... kand. med. nauk* [Acceleration of the Process of Adaptation to the Conditions of the North by Means of Cold Conditioning and Physical Exercises: Cand. Med. Sci. Diss. Abs.]. Moscow, 1981. 26 p.

18. Orlov G.A. Generalizatsiya pri khronicheskom okhlazhdenii vo vlazhnoy srede [Generalization in Chronic Cooling in Wet Environments]. *Akklimatizatsiya i kraevaya patologiya cheloveka na Severe: materialy mezhl. konf. sev.-zap. oblastey RSFSR po akklimatizatsii i kraevoy patologii cheloveka na Severe* [Acclimatization and Local Human Pathology in the North: Proc. Interregional Conf. of Northwestern Regions of the RSFSR on Human Acclimatization and Local Pathology in the North]. October–November 1969, Arkhangelsk. Arkhangelsk, 1970, pp. 131–133.

19. Alov I.A. *Tsitofiziologiya i patologiya mitoza* [Cytophysiology and Mitotic Pathology]. Moscow, 1972. 264 p.

20. Al'pern D.E. *Vospalenie (Voprosy patogeneza)* [Inflammation (Issues of Pathogenesis)]. Moscow, 1959. 544 p.

21. Gorizontov P.D., Protasova T.N. *Rol' AKTG i kortikosteroidov v patologii (k probleme stressa)* [The Role of ACTH and Corticosteroids in Pathology (to the Issue of Stress)]. Moscow, 1968. 335 p.

22. Buznikov G.A. Nizkomolekulyarnye fiziologicheski aktivnye veshchestva v regulyatsii pervykh deleniy drobleniya [Low Molecular Weight Physiologically Active Substances in the Regulation of Early Cleavage Divisions]. *Mezhkletchnye vzaimodeystviya v differentsirovke i roste* [Cellular Interactions in the Differentiation and Growth]. Moscow, 1970, pp. 150–163.

23. Pashchenko V.P. *Vliyaniye fiziologicheskikh, ekstremal'nykh i patologicheskikh sostoyaniy organizma na rost tkaney pri kul'tivirovaniy*: avtoref. dis. ... d-ra med. nauk [The Effect of the Body's Physiological, Extreme, and Pathological Conditions on Tissue Growth Under Cultivation: Dr. Med. Sci. Diss. Abs.]. Arkhangelsk, 1994. 47 p.

24. Krontovskiy A.A. Kul'tura tkaney [Tissue Culture]. *Bol'shaya med. entsikl.* [Great Medical Encyclopaedia]. Moscow, 1930. Vol. 15, pp. 74–98.

25. Smirnova V.M. *Tkanevye kul'tury* [Tissue Cultures]. Leningrad, 1933. 320 p.

26. Khlopin N.G. *Kul'tura tkaney* [Tissue Culture]. Moscow, 1940. 372 p.

27. Zalkind S.Ya. *Zhizn' kletok vne organizma* [Cell Life Outside the Body]. Moscow, 1953. 131 p.

doi: 10.17238/issn2308-3174.2016.4.40

*Vladimir P. Pashchenko**

*Northern State Medical University (Arkhangelsk, Russian Federation)

THE STUDY OF EXTREME STATES OF THE HUMAN BODY BY TISSUE CULTURE (from the Experience of Northern State Medical University)

The article reports on the work of the Tissue and Cell Culture Laboratory (Northern State Medical University) regarding the use of primary tissue cultures to assess the physiological state of cells by studying their response to stress, extreme effects and impacts of biologically active substances. The method of primary tissue cultures on the glass surface (tube wall) was utilized. Medium 199 with 10–15 % bovine serum was taken as a nutrient medium. The experiments were conducted on white outbred mice with the use of kidney tissue. Direct cooling of tissue for one hour at a temperature of 20 °C resulted in a decrease in the number of growing cultures, whereas a single cooling of the animals at a temperature of –10 °C to the state of cold anaesthesia was accompanied by an increase in the number of kidney tissue cultures compared to the control, indicating an improvement in the functional activity of cells in this organ. Total irradiation of mice with X-rays in the doses of 500 r and 1000 r, ageing of the animals and their complete starvation for 5 days, as well as their acute poisoning with cadmium chloride – an inhibitor of sulfhydryl groups – resulted in delayed formation of cell colonies. Conversely, an enhanced growth of cultivated kidney tissues was observed on the 3rd and 5th day after subcutaneous burn inflammation, 28th and 30th growth day of Ehrlich carcinoma, and on the 3rd and 6th day of the development of compensatory renal hypertrophy. Further, *in vitro* and *in vivo* experiments studied the effect of adrenaline, acetylcholine, histamine, adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and some substances of sulfhydryl nature. It was found that the method of tissue culture can be applied to identify the cytophysiological state of the body's tissue cells under extreme stress.

Keywords: *tissue culture techniques, extreme states of the body, stress response, tissue growth and regeneration.*

Поступила 10.06.2016

Received 10 June 2016

Corresponding author: Vladimir Pashchenko, *address:* prosp. Troitskiy 51, Arkhangelsk, 163000, Russian Federation; *e-mail:* paschenkow@mail.ru

For citation: Pashchenko V.P. The Study of Extreme States of the Human Body by Tissue Culture (from the Experience of Northern State Medical University). *Vestnik Severnogo (Arkticheskogo) federal'nogo universiteta. Ser.: Mediko-biologicheskie nauki*, 2016, no. 4, pp. 40–48. doi: 10.17238/issn2308-3174.2016.4.40