



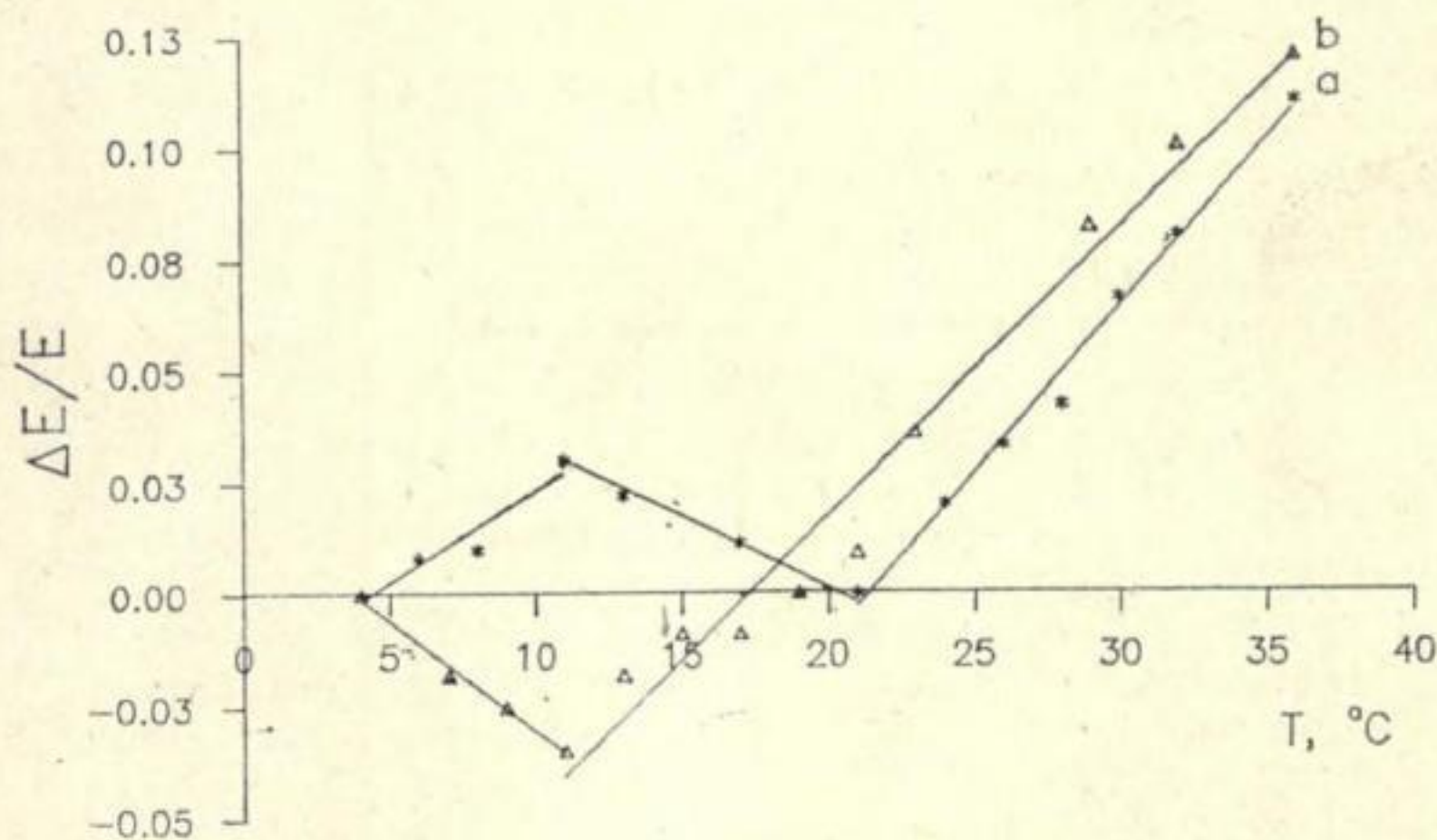
АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ,
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ
И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ
И КРИОМЕДИЦИНЫ



1992

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ



ГРИЩЕНКО В.И., БЕЛОУС А.М. Итоги научно-организационной деятельности института (к 20-летию Института проблем криобиологии и криомедицины АН Украины)

МАЛАЯ Л.Т., ЯРМЫШ Н.В., БРОВКОВИЧ В.М. Влияние кофеина и Ca^{2+} на Ca^{2+} -транспортирующую активность СР в гомогенате из нормо- и гипотермически ишемизированных сердец крыс

КАРАНОВА М.В., АНДРЕЕВ А.А., ПЕТРОПАВЛОВ Н.Н. Низкотемпературная кристаллизация водных растворов в присутствии антифризных гликопротеинов сыворотки трески *Gadus morrhua*

ЭБИНЕ К., ТАМУРА С., ЛИ М., САТО К., ЙОКОМУРО М., СУМИДА С., ОХСАКА А., МАТСУШИТА К. Новая модель для оценки жизнеспособности переохлажденного сердца кролика, предназначенного для трансплантации

КИРПАТОВСКИЙ В.И., КУДРЯВЦЕВ Ю.В., БУРОВ В.Н. Криоконсервация почки кролика

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

В. И. Грищенко (главный редактор), А. М. Белоус (зам. гл. редактора), С. И. Аксенов, Г. А. Бабийчук, М. Е. Бекер, Ю. П. Благой, Л. Вонг (Канада), А. Н. Гольцев, К. Дж. Грин (Великобритания), Г. Ф. Жегунов, В. И. Луговой, В. Я. Малеев, Г. Маттес (ФРГ), П. Мнержичка (ЧСФР), Е. Я. Панков, Ф. А. Приходько (отв. секретарь), Н. С. Пушкарь, Б. П. Сандомирский, А. С. Снурников, А. А. Цуцаева, С. А. Шалимов, Т. Н. Юрченко, Э. З. Эмирбеков

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

А. Д. Бугров, В. Я. Волков, В. М. Гордиенко, 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

EDITORIAL BOARD

V. I. Grishchenko (Editor-in-Chief), A. M. Belous (Associated Editor), S. I. Aksekov, G. A. Babiychuk, M. E. Beker, Yu. P. Blagoj, L. Wang (Canada), A. N. Goltsev, C. J. Green (Great Britain), G. F. Zhegunov, V. I. Lugovoj, V. Ya. Maleyev, G. Matthes (FRG), P. Mericka (CSFR), E. Ya. Pankov, F. A. Prikhodko, N. S. Pushkar, B. P. Sandomirsky, A. S. Snurnikov, A. A. Tsutsayeva, S. A. Shalimov, T. N. Yurchenko, E. Z. Emirbekov

EDITORIAL COUNCIL

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

CRYO-LETTERS

В ЖУРНАЛЕ CRYO-LETTERS ПУБЛИКУЮТСЯ ОРИГИНАЛЬНЫЕ РАБОТЫ, ПОСВЯЩЕННЫЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЮ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР В ФИЗИКЕ, ХИМИИ, БИОЛОГИИ, ЭКОЛОГИИ И ДРУГИХ ОБЛАСТЯХ НАУКИ И ТЕХНИКИ.

Статья с положительной рецензией публикуется в течение 8 недель. В состав редколлегии и рецензентов включены ученые разных стран. Работы публикуются бесплатно. Авторы-подписчики получают бесплатно 50 оттисков своих работ. Журнал распространяется во всех странах мира. Резюме статей используют основные информационные агентства.

Главный редактор Dr. F. Franks, Department of Botany, University of Cambridge, Cambridge, CB2 3EA, U. K.

Тел.: (0223) 420921; Факс: (0223) 420502

По вопросам подписки и публикации обращаться в редакцию журнала: Cryo-Letters, 7 Wootton Way, Cambridge CB3 9LX, U. K.

Журнал выходит 6 раз в год.

Стоимость подписки для индивидуальных подписчиков £ 25.00 (US \$50.00), для коллективных — £ — 78.00 (US \$155.00).



АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ,
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ
И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ
И КРИОМЕДИЦИНЫ

ВСЕСОЮЗНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ
ЖУРНАЛ

ОСНОВАН В 1985 ГОДУ
ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

1992

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

СОДЕРЖАНИЕ

Грищенко В. И., Белоус А. М. Итоги научно-организационной деятельности института (к 20-летию Института проблем криобиологии и криомедицины АН Украины) 3

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

Белоус А. М. Проблемы регенерации тканей при местном криовоздействии 14
Малая Л. Т., Ярмыш Н. В., Бровкович В. М. Влияние кофеина и Ca^{2+} на Ca^{2+} -насосную функцию ретикулума после глубокой гипотермической ишемии миокарда 18

Каранова М. В., Андреев А. А., Петропавлов Н. Н. Низкотемпературная кристаллизация водных растворов в присутствии антифризных гликопротеинов сы-
воротки трески *Gadus morrhua* 23

Эбине К., Тамура С., Ли М., Сато К., Йокомуро М., Сумида С., Охсака А.,
Мацушита К. Новая модель для оценки жизнеспособности переохлажденного
сердца кролика, предназначенного для трансплантации 27

Розанова Е. Д., Науменко Е. И., Моисеев В. А., Нардид О. А., Репин Н. В.
Структурно-функциональные параметры цитохромоксидазы в растворе и в соста-
ве липосом: влияние глицерина 32

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

Грищенко В. И., Осташко Ф. И., Исаченко В. В., Исаченко Е. Ф., Кривохар-
ченко А. С., Рябых В. П., Сушко А. Б., Федотова И. А. Витрификация, сверх-
быстрое замораживание мышинных, крысиных и коровьих эмбрионов 35

Кирпатовский В. И., Кудрявцев Ю. В., Буров В. Н. Криоконсервация почки
кролика 40

Очкур С. И., Копейка Е. Ф. Влияние факторов криоконсервирования на дыха-
ние и подвижность спермиев петухов 46

КРИОМЕДИЦИНА

Водолажская Л. П., Павлова Т. Д. Опыт использования криохирургии в комби-
нированном лечении ранних стадий рака шейки матки 53

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Скидан К. В., Останкова Л. В., Точилковская Р. В. Влияние гелий-неонового
лазера на цитоморфологический состав экспериментальных язв слизистой обо-
лочке полости рта 55

© Институт проблем криобиологии и криомедицины АН Украины
«Проблемы криобиологии», 1992 г.

This One



GCKT-XXD-Z40B

Материал, защищенный авторским правом

ХРОНИКА

ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИЙ

CONTENTS

<i>Grishchenko V. I., Belous A. M.</i> Results of scientific and organization activities of the Institute (to the 20th anniversary of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the Ukrainian Academy of Sciences)	3
--	---

THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

<i>Belous A. M.</i> Problems of tissue regeneration after local freezing	14
<i>Malaya L. T., Yarmysh N. V., Brovkovich V. M.</i> The influence of caffeine and calcium on the Ca^{2+} -pump function of sarcoplasmic reticulum after deep hypothermic myocardial ischemia	18
<i>Karanova M. V., Andreyev A. A., Petropavlov N. N.</i> Low temperature crystallization of aqueous solutions in the presence of serum antifreeze glycoproteins of <i>Gadus morrhua</i>	23
<i>Ebine K., Tamura S., Lee M., Sato K., Yokomuro M., Sumida S., Ohsaka A., Matsushita K.</i> A new model to evaluate the viability of supercooled rabbit heart for transplantation	27
<i>Rozanova E. D., Naumenko E. I., Moiseyev V. A., Nardid O. A., Repin N. V.</i> Structure-functional parameters of cytochrome oxidase in solution and as a part of liposome: the effect of glycerol	32

CRYOPRESERVATION OF BIOLOGICAL SYSTEMS

<i>Grishchenko V. I., Ostashko F. I., Isachenko V. V., Isachenko E. F., Krivokharchenko A. S., Ryahykh V. P., Sushko A. B., Fedotova I. A.</i> Vitrification, ultrarapid freezing of mouse, rat and cattle embryos	35
<i>Kirpatovsky V. I., Kudriavtsev Yu. V., Burov V. N.</i> Cryopreservation of the rabbit kidney	40
<i>Ochkur S. I., Kopelka E. F.</i> The influence of cryopreservation factors on the respiration and motility of fowl spermatozoa	46

CRYOMEDICINE

<i>Vodolazhskaya L. P., Pavlova T. D.</i> An experience of using cryosurgery in the combined treatment of early cancer of cervix uteri	53
--	----

SHORT COMMUNICATIONS

<i>Skidan K. V., Ostankova L. V., Tochilovskaya R. V.</i> The effect of helium-neon laser on the cytomorphological composition of experimental ulcers of mouth mucosa	55
---	----

CHRONICLE

DEFENSE OF THESES

Адрес редакции:

310015, Харьков, 15,
ул. Переяславская, 23,
тел. 72-10-39

Научный редактор А. М. Белоус

Редактор З. В. Линевиц

Технический редактор В. Н. Волкова

Сдано в набор 16.10.91. Подп. в печ. 25.12.91. Формат 70×108¹/₁₆. Бум. тип. № 1. Выс. печ. Усл. печ. л. 4,9. Усл. кр.-отт. 5,6. Уч. изд. л. 5,46. Тираж 535 экз. Зак. 1-388. Цена 1 р. 20 к. Отпечатано с матриц Харьковской книжной фабрики им. М. В. Фрунзе в Харьковской городской типографии № 16. 310003, Харьков-3, ул. Университетская, 16. Зак. 78.

В. И. Грищенко, А. М. Белоус

ИТОГИ НАУЧНО-ОРГАНИЗАЦИОННОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ИНСТИТУТА (К 20-летию ИНСТИТУТА ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ И КРИОМЕДИЦИНЫ АН УКРАИНЫ)

Обобщены результаты двадцатилетней научно-организационной деятельности Института проблем криобиологии и криомедицины АН Украины, научного центра, в котором проводятся фундаментальные исследования физико-химических процессов в биологических объектах при низких температурах, механизмов криоповреждения и криозащиты, разрабатываются новые виды криоконсервантов и криогенной техники для исследовательских и медицинских целей.

Институт проблем криобиологии и криомедицины АН Украины — первый научный центр в нашей стране, в котором проводятся фундаментальные исследования физико-химических процессов, сопровождающих процессы кристаллизации в простых и сложных системах, механизмов криоповреждения и криозащиты биообъектов различного уровня организации, разрабатываются новые виды криоконсервантов и криогенной техники для исследовательских и медицинских целей.

Созданный на базе двух лабораторий Физико-технического института низких температур и проблемной научно-исследовательской лаборатории низкотемпературной консервации костного мозга и крови Харьковского института усовершенствования врачей, Институт проблем криобиологии и криомедицины в системе АН Украины начал свою деятельность 11 февраля 1972 года.

Инициаторами создания института были академик АН Украины Б. И. Веркин и чл.-кор. АН Украины Н. С. Пушкарь, которые после объединения двух подразделений создали материальную базу и кадровый состав для становления и развития нового института. С 1972 г. институт возглавил лауреат Государственной премии СССР, чл.-кор. АН Украины Н. С. Пушкарь, являющийся крупным криобиологом нашей страны, известным исследователем в области создания методов криоконсервации различных биообъектов.

С 1983 г. по настоящее время институтом руководит лауреат Государственных премий СССР и УССР, академик АН Украины В. И. Грищенко.

Институт проблем криобиологии и криомедицины развивался как комплексное научно-исследовательское учреждение, где в тесном сотрудничестве с физиками, химиками, математиками и инженерами работают биологи и медики.

Общими усилиями сотрудники института осуществляют исследования в следующих направлениях:

- фундаментальные исследования механизмов криоповреждений, репарации и криозащиты биологических объектов различного уровня организации (молекулярном, клеточном и тканевом);

- изучение механизмов холодовой устойчивости биологических объектов при адаптации их в естественных и искусственных условиях;

- разработка, синтез и создание новых сред и средств искусственной криозащиты биообъектов;

- научное обоснование и применение гипотермии и криотерапии в медицинской практике;

- разработка технологий криоконсервирования различных биообъектов;

— разработка и создание технических средств холодового воздействия на организм, ткани, органы и клетки.

Начав работу в составе 47 человек в неприспособленном для научной работы здании, без специализированных лабораторных помещений и современной аппаратуры, коллектив института за 20 лет вырос до 389 человек, среди которых 22 доктора и 92 кандидата наук.

В настоящее время институт располагает новым лабораторным корпусом, в котором расположено 12 отделов и 12 лабораторий, научная библиотека, вычислительный центр. Начато строительство нового корпуса для научных и научно-технических исследований в области криобиологии. При институте имеется специальное конструкторско-технологическое бюро с опытным производством, организованное 1 января 1981 г., в котором работает более 200 человек.

Институт имеет сложившуюся научную репутацию и широкие контакты в стране и с зарубежными криобиологическими центрами США, Англии, ФРГ, Индии, ЧСФР, Бельгии, Болгарии, Нидерландов, Польши, которые предусматривают выполнение комплексных программ по криобиологии репродуктивных клеток, консервированию клеток и тканей, а также взаимную стажировку сотрудников.

В настоящее время институт занимает в нашей стране одно из ведущих мест в области фундаментальной и прикладной криобиологии и криомедицины. Комплексные исследования по раскрытию механизмов криоповреждений, репарации и криозащиты на молекулярном и клеточном уровнях, синтезу и созданию новых криоконсервантов снискали ему признание в нашей стране и за ее пределами.

Многие научные направления института разрабатываются в тесном контакте с институтами Академии наук нашей страны и различными специальными ведомствами. Институт разрабатывает и координирует крупную комплексную программу по криобиологии, в которой играет роль ведущей организации.

Поддерживаются тесные связи с вузами г. Харькова, поскольку ряд сотрудников института являются по совместительству преподавателями университета и мединститута, а студенты этих вузов проходят стажировку по криобиологии на базе института, тем самым способствуя подготовке квалифицированных специалистов криобиологов в области медицины и биологии.

Деятельность института в различных областях криобиологической науки нашла отражение в организации встреч ученых.

Начиная с 1972 года институтом самостоятельно и совместно с другими институтами организованы и проведены 4 всесоюзные конференции и школы для молодых ученых по проблемам, непосредственно связанным с тематикой института, в том числе и 2 международные конференции по криобиологии (1983, 1988 г.), а также ряд научных встреч с учеными ФРГ, Японии и Англии.

Результаты работы института отражены более чем в 73 монографиях и сборниках трудов, 2147 научных статьях. Получено 13 патентов и 281 авторское свидетельство. За научные достижения и внедрение результатов в практику 5 сотрудников получили Государственные премии СССР и УССР (В. И. Грищенко, Н. С. Пушкар, М. И. Шраго, Т. Н. Юрченко, Т. М. Шарлай), и 9 — именные премии АН Украины (А. М. Утевский, А. М. Белоус, Н. С. Пушкар, Ю. А. Иткин, Б. П. Сандомирский, Н. А. Волкова, Ю. И. Исаев, В. А. Чуйко, А. К. Гулевский, В. А. Бондаренко).

Институтом издается всесоюзный журнал «Проблемы криобиологии», главным редактором которого является академик АН Украины В. И. Грищенко. В 1981 г. при институте создан докторский защитный совет по криобиологии, в котором 23 научным работникам присвоена степень доктора наук и 114 — кандидата наук (председатель совета академик АН Украины В. И. Грищенко, ученый секретарь — д. м. н. А. Н. Гольдсв).

В настоящее время разрабатывается конструкторская документация для изготовления действующих макетов и опытных образцов комплектов криооборудования, отдельных приборов и криоинструментов. При этом осуществляется изготовление опытных и промышленных образцов для реализации технологических процессов криоконсервирования и сублимационной сушки различных биоматериалов, создание технических средств гипотермии и криотерапии, а также приборов для научных медицинских и биологических исследований в условиях единичного и мелкосерийного производства.

В частности, разработаны и изготовлены многоканальные, управляемые микропроцессором приборы для измерения температуры (д. т. н. А. С. Снурников) в нескольких точках или разности температур между двумя любыми точками с минимальным возмущением температурного поля объекта и точной локализацией места измерения, мобильные программные замораживатели эмбрионов животных, которыми оснащены станции трансплантации и подвижные зообиолаборатории. Созданы лабораторные и полупромышленные установки для сублимационного высушивания различных биоматериалов малых объемов с использованием жидкого азота, элементов Пельтье и безазотных холодильных агрегатов.

Разработан и испытан аппарат универсальной гипотермии для охлаждения организма и отдельных участков тела человека с использованием краниocereбральной и локальной гипотермии, а также новый тип криокоагулятора к эндоскопам, позволяющий проводить локальные холодовые воздействия распылением и электрокоагуляцией на поверхностях желудка и двенадцатиперстной кишки с помощью источника холода (Хладон-12).

Фундаментальные исследования по криобиологии и криомедицине в институте проводились в нескольких направлениях: биофизика и биохимия низких температур, иммунологические, морфологические и патофизиологические аспекты действия холода на биологические объекты.

Существенное место в научной деятельности института занимает комплекс биофизических исследований (ЭПР, ЯМР, оптическая спектроскопия, микрокалориметрия, СВЧ-диэлектрометрия), которые позволили выяснить фазовое состояние внутриклеточного содержимого, барьерные свойства мембран для электролитов и неэлектролитов, величины дегидратации клеток и характер взаимодействия их с криопротекторами (д. б. н. В. А. Моисеев). В частности, установлено, что при температурах $37 \div 0^\circ\text{C}$ развиваются обратимые кооперативные структурно-фазовые переходы в биополимерах и мембранах, а ниже фазового перехода вода — лед возникают необратимые структурные переходы, которые ведут к стойкому изменению функциональных свойств биомакромолекул. Важным является тот факт, что инициируемые структурно-фазовыми переходами в биополимерах криоповреждения клеточных мембран проявляются в основном на этапе отогрева при регидратации клеток за счет развития гистерезисных явлений.

Обнаруженная способность молекул криопротекторов образовывать комплексы с биокатионами и стабилизировать конформацию белков явилась основой гипотезы криозащиты биологических систем криопротекторами от повреждающего действия гиперконцентрации солей.

На основе использования ЯМР-спектроскопии высокого разрешения разработана неразрушающая методика исследования динамики макроэргических соединений в клетке на различных стадиях ее криоконсервирования. Такие оценки функционального состояния клеток могут служить основой новых научных подходов при разработке криотехнологий крупных органов и тканей.

Дальнейшее углубление исследований физико-химических свойств растворов криопротекторов и клеточных суспензий в зоне низких температур (-196°C до значения температуры расстеклования) позволило выявить новый механизм криоповреждения клеток — механоэлектрический, суть которого состоит в том, что при изменении температуры образца на границе

раздела кристалл — стекло наблюдается растрескивание вещества и появление заряда на вновь образованных поверхностях. Возникающая при этом разность потенциалов способна вызвать ионизацию вещества и электростатическое излучение, которое вызывает необратимое нарушение в клетках и субклеточных структурах.

Криобиохимические исследования в институте развивались в направлении изучения структурно-функциональных свойств отдельных белков, систем генерации энергии и биосинтеза, а также биохимической модификации компонентов плазматических и внутриклеточных органелл (чл.-кор. АН Украины А. М. Белоус). Основными направлениями фундаментальных исследований в области криобиохимии в начальный период формирования института, явилось изучение структурно-функциональных свойств изолированных и в составе клеток ферментов с четвертичной структурой, включая лизосомальные гидролазы, в результате чего была определена их роль в развитии латентных повреждений замороженной клетки.

Выяснено, что замораживание изолированных ферментов в растворах неорганических солей сопровождается нарушением их молекулярной конформации и активности, которые обусловлены главным образом концентрационными солевыми эффектами в доэвтектическом диапазоне температур.

В результате выяснения механизмов криоповреждений митохондриальной системы генерации энергии и микросомального окисления были установлены закономерности повреждения внутриклеточных органелл в зависимости от скоростей охлаждения и состава криозащитных сред, а также определена природа физико-химических процессов, ведущих к нарушению барьерной и структурной интеграции клетки (д. б. н. В. В. Лемешко).

На основании всесторонних исследований по выяснению роли фазово-структурных переходов липидов и белков, ионных переносчиков и внутриклеточных фосфолипаз А. М. Белоус, В. А. Бондаренко и соавт. (1978) впервые обосновали структурную гипотезу криоповреждений, которая придавала значение термодинамическим, физико-химическим и биохимическим уровням изменений в плазматических мембранах клеток как первичной мишени криовоздействия.

Изучая влияние замораживания отогрева и криопротекторов на структурно-функциональное состояние ионотранспортирующей системы мембран саркоплазматического ретикулума, д. б. н. Г. Ф. Жегунов впервые выдвинул гипотезу, постулирующую механизм разобщения гидролиза АТФ ферментов с процессом транспорта иона в везикулы саркоплазматического ретикулума после низкотемпературного воздействия, которая имела принципиальное значение для понимания феномена низкотемпературного «активирования» мембранного фермента-переносчика в деконсервированных системах. Принципиально важные данные, касающиеся закономерностей нарушения систем транспорта катионов и метаболитов через плазматические мембраны на различных этапах криоконсервирования, были изложены в докторской диссертации А. К. Гулевского, в которой было доказано, что нарушения барьерной функции плазматических мембран эритроцитов при замораживании — отогреве происходят в широком диапазоне субнулевых температур и характеризуются формированием в них микромакроефектов, размеры которых зависят от степени снижения температуры, фазово-структурных переходов липидов и уровня вымерзания воды в мембране.

Основные положения о механизмах развития и предупреждения температурного шока клеток были изложены д. б. н. В. А. Бондаренко, в которых утверждалось, что факторами, контролирующими чувствительность эритроцитов к холодовому шоку, являются исходный объем и разница осмотического давления между внутриклеточной и наружной средой, а повреждение эритроцитов связано с деформацией упругих элементов мембранного скелета при его осмотической дегидратации и нарушении метастабильности клетки. На основе фундаментальных исследований, посвященных выяснению эффективности ряда мембранных стабилизаторов и ингибиторов метаболизма

созданы новые методы криоконсервации клеток крови. В частности, использование непроникающих криопротекторов в комбинации с предварительной холодовой адаптацией клеток при 0 °С позволило разработать безотмывочный метод криоконсервации эритроцитов человека.

Всесторонние исследования с применением методов криомикроскопии, оптической и ядерной спектроскопии и математического анализа во многом способствовали созданию новых и усовершенствованию существующих способов криоконсервирования клеточных суспензий, тканей и органов (чл.-кор. АН Украины Н. С. Пушкарь).

В частности, в результате изучения скоростей замораживания — отогрева, вида и концентрации криопротектора были разработаны методы криоконсервации клеток крови человека, костного мозга, перитонеального экссудата и тканевых лимфоцитов экспериментальных животных. При изучении характера процессов кристаллообразования и кинетики изменений формы и объема клеток выявлено, что механическое взаимодействие растущих кристаллов льда с клетками обусловлено расклинивающим давлением, возникающим в тонкой пленке жидкости между кристаллами и клетками. Показано, что на этапе отогрева переохлажденных концентрированных растворов криопротекторов возникающие в этих растворах при температуре ниже температуры стеклования трещины могут играть роль центров кристаллизации. Изучение методами акустической эмиссии, калориметрии и дилатометрии процессов, протекающих в замороженных биообъектах при температурах $-60 \div -180$ °С, выявило ведущую роль механических напряжений и характера их релаксации в повреждении клеток при этих температурах. Для профилактики развития температурного шока клеток построены и экспериментально подтверждены физико-математические модели осмотического лизиса, обезвоживания и внутриклеточной кристаллизации модельных и нативных систем. На основе проведенных фундаментальных исследований разработан метод низкотемпературного консервирования ядродержащих клеток крови под защитой 10 % ПЭО-400, спермы осетровых рыб, обеспечивающий оплодотворяющую способность спермы на уровне 55 %, а также способ комбинированного нагрева замороженных биообъектов с помощью СВЧ-нагрева и теплопередачи.

Проведенное физико-математическое описание поведения клеток при быстром двухступенчатом замораживании и построение общей физико-математической модели позволили установить взаимосвязь между формой и распределением отдельных компонентов в мембране эритроцита и объяснить физическую причину их латеральной сепарации (д. б. н. Е. А. Гордиенко).

Большое значение для повышения криорезистентности клеток в процессе их замораживания — отогрева имели исследования по изучению действия таких физических факторов на свойства клеток, как ультразвуковое, СВЧ облучение и поле постоянного магнита (д. б. н. В. И. Вишневский). В частности, методами ЯМР-спиновое эхо и ионселективной электрометрии показано, что ультразвуковая обработка клеток приводит к уменьшению проницаемости их мембран для воды и K^+ , а также способствует активной репарации деконсервированного материала.

В начале 1980-х годов в институте начались интенсивные криобиохимические исследования в области естественного гипобиоза, которые были сосредоточены главным образом на выяснении механизмов перестройки функции сердца и метаболического состояния клеток печени и крови у гибернирующих животных. Получены также новые биохимические данные, касающиеся обмена нуклеиновых кислот и белков в различные периоды процесса гибернации (д. б. н. Г. Ф. Жегунов).

В последнее время большое внимание уделяется криобиохимическим исследованиям структурно-функционального состояния белков цитоскелета, которые играют большую роль в стабилизации клеток в условиях осмотического или температурного воздействия. Установлено, что явления ста-

бильности клеток, развивающиеся при охлаждении до 0 °С, и дегидратации под действием непроникающих криопротекторов связаны со структурными изменениями актина, спектрин и других белков примембранного комплекса, которые связаны с увеличением степени фосфорилирования белков цАМФ-независимой спектринкиназой, что приводит к более тесной связи их с внутренней мембранной поверхностью.

Расширение исследований в области криобиохимии привело к созданию в 1990 г. двух новых отделов — отдела биохимии холодовых адаптаций, целью которого является дальнейшее углубление изучения биохимических закономерностей и молекулярных основ, лежащих в основе адаптации животных к охлаждению и замерзанию, а также отдела криофизиологии клетки, который решает проблемы искусственной адаптации клеток к воздействию охлаждения и низких температур с помощью биологически активных модификаторов структуры и функции мембранных систем клеток.

Важным фундаментальным направлением института является проблема создания научных основ, экспериментального синтеза и первичного скрининга новых видов криопротекторов и комплексных криоконсервантов (д. б. н. В. И. Луговой). В результате изучения ряда веществ, обладающих криозащитными свойствами — полиолов, алифатических амидов их изомеров и производных, полученных путем включения в структуру веществ заданных химических радикалов и оксиэтилирования многоатомных спиртов — этиленгликоля, глицерина, пропиленгликоля — получены новые криозащитные соединения. Установлено, что вещество, полученное в итоге присоединения 7—8 оксиэтильных звеньев к этиленгликолю (ПЭО-400), обладает оптимальными показателями криозащитной активности при замораживании ядродержащих клеток: миелокариоцитов, лейкоцитов. Продукт оксиэтилирования этиленгликоля более высокой молекулярной массы, например ПЭО-1500, обеспечивает селективную сохранность эритроцитов. Синтезированы новые криозащитные вещества, оксиэтилированные глицерины, которые эффективны при криоконсервировании перевиваемых клеточных культур, лейкоцитов и тромбоцитов (д. б. н. М. И. Шраго).

Принципиально важными явились факты о том, что влияние как алкилирования, так и оксиэтилирования при создании криопротекторов определяется положением гидроксильной группы, по которой идет оксиэтилирование. Аналогичная закономерность обнаружена при изучении токсичности веществ как на организменном, так и на клеточном уровне, что чрезвычайно важно при получении химических соединений с заданными криопротекторными свойствами.

Важным параметром, характеризующим свойства синтезированных криопротекторов, является их способность влиять на характер фазовых переходов вода—лед при замораживании и отогреве. В связи с этим разработан состав многокомпонентных криозащитных сред, включающих криопротекторы, модификаторы фазового перехода вода — лед, соли, биологически активные вещества, буферные добавки.

В настоящее время на основе использования новых многокомпонентных криоконсервантов, содержащих солевые и буферные добавки, мембраноактивные вещества, гликоли и амиды, разработаны методы криоконсервирования репродуктивных клеток животных, а также изучено влияние криопротекторов на зимостойкость растений и всхожесть семян.

На организменном уровне широко исследуются токсико-фармакологические свойства криопротекторов, а также их способность повышать толерантность теплокровных животных к глубокому охлаждению.

В настоящее время совместно с отделом криобиофизики (д. б. н. А. М. Воротилин) завершены с положительным результатом клинические испытания криоконсерванта пропандиосахароля, используемого для замораживания эритроцитов, а также нового осмодиуретического полиэтиленоксоля на основе ПЭО-400.

Фундаментальные исследования в области криоиммунологии были сосредоточены на проблемах искусственного холодового анабиоза иммунокомпетентных клеток (д. м. н. А. А. Цуцаева). Исследования проводились в направлении изучения механизмов индукции и репарации нелетальных повреждений, которые возникают в биологических объектах разных уровней организации при переводе их в состояние глубокого холодового анабиоза. Выяснилось, что под влиянием факторов криоконсервирования вирусы, бактерии и иммунокомпетентные клетки животных обратимо изменяют свойства биополимеров, в результате чего ингибируются процессы развития вирусов. Изменения функциональной активности клеток происходят в результате повышения проницаемости мембран для веществ, которые в обычных условиях не проникают через гидрофобную зону (сукцинат, НАДН, АТФ). При этом в мембранах изменяется пространственная топография и свойства рецепторов, процессы биосинтеза белка и нуклеиновых кислот. Впервые обнаружено, что под влиянием криоконсервирования в клетках прокариотов появляются «стресс-белки», синтез которых особенно интенсифицируется при неблагоприятных способах замораживания в клетках в ответ на воздействия гиперконцентрированных растворов солей.

Углубление исследований по выявлению механизмов индукции нелетальных повреждений позволило разработать эффективные способы репарации путем введения в среду замораживания препаратов нуклеиновых кислот, энергетических добавок и других биоактивных соединений. В результате иммунологических исследований было установлено, что после трансплантации нативных и криоконсервированных кроветворных клеток в течение определенного промежутка времени не происходит восстановления иммунологического статуса и кроветворения у летально облученных животных, что является следствием нарушения процессов и механизмов клеточной и гуморальной регенерации (д. м. н. А. Н. Гольцев). Сейчас интенсивно разрабатывается одно из перспективных направлений криоиммунологии — нейроиммунология. По результатам фундаментальных исследований разработаны новые виды технологии криоконсервирования и лиофилизации биологических объектов (вирусов, фагов, промышленных штаммов микроорганизмов, перевиваемых клеток, гибридом, кроветворных клеток и лимфоцитов), а также обосновываются практические пути повышения эффективности лечения иммунодефицитных состояний лучевого и нелучевого генеза (д. м. н. Н. Н. Попов).

Успешное развитие фундаментальной и прикладной криобиологии во многом связано с интенсификацией в институте криоморфологических исследований, которые нашли широкое применение при изучении характера микроскопических криоповреждений и репарации изолированных клеток и тканей (д. м. н. Т. Н. Юрченко). В качестве модельного объекта используется в основном ткань роговицы, что позволяет проводить корреляцию между изменяющимися структурно-функциональными показателями и жизнеспособностью ткани в прямом тесте — при трансплантации. Так, в частности, было обнаружено, что чувствительность клеток роговицы к воздействию криопротекторов и низких температур может быть сопоставима с реактивными изменениями в клетках костного мозга и крови, что находит отражение в различиях активности некоторых окислительно-восстановительных ферментов, определяемых цитохимическими методами.

Комплекс исследований, выполненных на роговой оболочке, явился основой разработки метода ее низкотемпературной консервации, в результате чего офтальмологические учреждения получили возможность использовать эту ткань при оптических и реконструктивных операциях.

На основании собственных данных и анализа современной литературы в отделе криоморфологии создана концепция, в которой изложена последовательность микроскопических процессов, развивающихся при действии предварительного охлаждения на клетку, и их роль в механизме гомеостатической перестройки метаболизма. В результате изучения динамики изме-

нения активности окислительно-восстановительных ферментов, ультраструктуры клеток и внутриклеточных органелл (д. б. н. А. С. Капрельянц) после гипотермического воздействия эта гипотеза получила дальнейшее развитие, она постулирует зависимость уровня адаптированности биообъекта к изменившимся условиям окружающей среды за счет структурно-функциональных перестроек системы гомеостаза, а также уровня ультраструктурной организации, вида и степени дифференцировки. Оказалось, что в процессе предварительного охлаждения структуры клеток приобретают способность повышенной резистентности к действию отрицательных температур.

Морфологические исследования, проведенные при изучении реакции организма как целостной системы на холодное воздействие, обнаружили, что быстрое охлаждение до -20°C по сравнению с медленным оказывает более выраженный кардиопатогенный эффект, часто сопровождающийся необратимыми контрактурными изменениями. Введение внутрь организма криопротекторов вызывает гидратационно-осмотический эффект (д. б. н. В. Ф. Козлова), который в зависимости от дозы и концентрации криопротектора индуцирует развитие неспецифических процессов адаптации от тренировки и активации до стресс-реакции.

Дальнейшее развитие исследований по изучению механизмов устойчивости организмов в условиях искусственного охлаждения нашло в работах по нейрофизиологии и нейрохимии процессов, регулирующих терморегуляцию и адаптацию животных и человека (д. б. н. Г. А. Бабийчук).

Проведенные комплексные исследования по изучению механизмов действия охлаждения на метаболические и физиологические процессы, протекающие в тканях головного мозга и сердечно-сосудистой системы, позволили выявить новые закономерности в реализации первичных механизмов ответной нейрогуморальной реакции организма на холодное воздействие. Этим первичным молекулярно-клеточным проявлением ответной реакции организма при воздействии охлаждения на головной мозг является индуцируемый выброс норадреналина из преоптической области гипоталамуса и подавление секреции серотонина, который в структурах мозга изменяется в зависимости от интенсивности охлаждения.

Впервые установлен факт, что охлаждение головного мозга животных влияет на степень сродства к нейромедиатору и количество β -адренорецепторов в мембранах нейросекреторных клеток, что снижает активность системы центральной внутриклеточной регуляции метаболизма и, в частности, аденилатциклазы и циклических нуклелидов. При этом перестройка пространственной синхронизации биоэлектрической активности головного мозга проходит в несколько волнообразных этапов в зависимости от глубины охлаждения мозга и хорошо коррелирует с изменениями процессов секреции, рецепции и проницаемости гемато-энцефалического барьера для норадреналина.

На основе результатов этих работ выдвинута концепция о большом вкладе нейротрансмиттерных механизмов норадренергической природы в изменение пространственной синхронизации биоэлектрической активности коры и гипоталамуса головного мозга при охлаждении тела, а также о роли проницаемости для норадреналина гемато-энцефалического барьера гипоталамуса в наблюдаемой при гипотермии динамике биоэлектрической активности. Согласно выдвинутой концепции, уровень пространственной синхронизации секундного ритма биоэлектрической активности в коре и гипоталамусе может отражать функциональное состояние терморегуляторных центров при охлаждении, что позволяет прогнозировать и управлять программой снижения температуры тела человека и животных в условиях применения краниocereбральной гипотермии, особенно в направлении разработки практических рекомендаций по использованию холода как лечебного фактора.

Способ охлаждения тела с помощью краниocereбральной гипотермии оказался эффективным при лечении отдельных последствий черепно-мозговых травм, экзотоксических ком, алкогольного абстинентного синдрома, психозов, маниакально-депрессивного состояния, бесплодия, токсикозов беременности, вегетососудистых расстройств.

В последнее время в институте все более широкое развитие приобрели исследования в области изучения механизмов криоповреждения и криозащиты репродуктивных клеток (гамет, эмбрионов, гонад) животных и человека, которые используются в сельскохозяйственной и медицинской практике (академик АН Украины В. И. Грищенко).

Традиционным направлением в проблеме криобиологии репродуктивных систем является изучение механизмов криоповреждений половых продуктов рыб и создание технологических процессов их криоконсервирования. На основании изучения механизмов криоповреждения и криозащиты спермы редких, исчезающих и промысловых видов рыб получены важные в теоретическом и прикладном плане данные о природе факторов, влияющих на исходную криоустойчивость спермиев (условия обитания, характер пищи).

Так, например, в эксперименте выявлен более высокий уровень молекулярного отношения холестерин/фосфолипиды в спермиях морских видов рыб по сравнению с таковым пресноводных особей, что позволило сделать вывод о существенной значимости этого механизма в развитии устойчивости спермиев морских рыб к осмотическим градиентам среды. Сейчас создан первый в нашей стране коллекционный криобанк спермы рыб, в котором хранится 2000 образцов при -196°C , что позволяет проводить широкие селекционные работы. Так, получен гетерозисный гибрид немецкого карпа и сазана, который характеризуется скоростью роста в два раза большей, чем у родительских форм. На основе фундаментальных исследований установлена сохранность спермиев человека и эмбрионов мышей при сверхвысоких скоростях замораживания, а также криозащитная эффективность метильных, этильных, этоксильных производных глицерина и ацетамида, содержащих различное число функциональных групп в молекуле стартового вещества с различным пространственным расположением.

На основе моноэтилового эфира глицерина разработана среда, позволяющая сохранять эмбрионы на протяжении двух суток в условиях гипотермии без потери ими биологической полноценности, а также метод криоконсервации с применением сверхвысоких скоростей охлаждения на основе криоконсерванта, в котором концентрация криозащитного вещества не превышает 4,5 %, но позволяет сохранять жизнеспособность до 95 % эмбрионов. Криоконсервант на основе глицерина и метил-содержащего холинхлорида в сочетании со сверхскоростным охлаждением обеспечивает выживаемость спермиев человека до 85 %, при сохранении его энергетического потенциала и акрозина в спермиях. В настоящее время так же разработан способ хранения спермиев в течение нескольких дней при 8°C без добавления криопротекторов для оплодотворения *in vitro*, при котором сохранность клеток обеспечивается специальным составом питательной среды и щадящим режимом снижения температуры.

Способы сверхбыстрого замораживания спермы и эмбрионов человека запатентованы в США, Англии, Франции, ФРГ и Японии. На базе Харьковского акушерско-гинекологического центра функционирует криобанк донорской спермы, в котором содержится более 10 тыс. спермодоз криоконсервированного биоматериала. Это позволяет успешно решать проблемы бесплодия в браке, обусловленного патоспермией мужа. В условиях криобанка сохраняется овариальная ткань, законсервированная по новой разработанной методике. Аллотрансплантация этой ткани в амниотической оболочке является эффективным методом коррекции генеративной функции женщин при эндокринном бесплодии.

Освоение, внедрение и совершенствование программы экстракорпорального оплодотворения человека потребовало осуществления ряда опы-

тов на экспериментальных животных, в которых важное значение имели разработка сред и изучение их влияния на эквilibрационный период, разработка режимных параметров замораживания — отогрева и хранения.

Установлено, что наиболее устойчивы к криовоздействию яйцеклетки, полученные у женщин с нормальным гормональным преовуляторным фоном, а при повышении концентрации в крови эстрадиола, пролактина изолированные яйцеклетки после замораживания — оттаивания характеризуются низкой жизнеспособностью.

Научно-исследовательские работы, проведенные совместно с Харьковским мединститутом, по разработке, освоению и внедрению в клиническую практику метода экстракорпорального оплодотворения *in vitro*, позволили осуществить в 1990—1991 гг. серию эмбриотрансплантаций и 20 беременностей, 5 из которых уже завершились рождением нормальных детей «из пробирки» (впервые на Украине).

Важное научно-практическое значение имеют исследования, позволившие разработать метод криоконсервирования гемопоэтических клеток эмбриональной печени человека и изучить влияние факторов криоконсервации на гемопоэтические клетки-предшественники эмбриональной печени человека.

Клинические испытания, проведенные в 5 клиниках Украины, свидетельствуют о восстановлении гемопоэза после трансфузии криоконсервированных клеток эмбриональной печени человека больным с анемическими и апластическими состояниями различного генеза. Дальнейшее развитие проблема криомедицины получила после более широкого использования не только клеточных суспензий, но и биологически активных тканей в лечебной практике. Толчком к практической реализации этого вопроса явилась разработка способа низкотемпературного консервирования и изучение клинической эффективности трансплантации размороженной щитовидной железы (чл.-кор. АН Украины Н. С. Пушкарь, д. б. н. В. А. Чуйко). Практической реализации этих методов в клинических условиях предшествовали всесторонние экспериментальные исследования особенностей криоповреждения клеток желез внутренней секреции и разработка методов их криозащиты. В результате этих изысканий была выявлена высокая криозащитная эффективность димексида, который оказывает стимулирующее и восстанавливающее действие на щитовидную железу после ее замораживания. На основании изучения процессов роста и размножения клеток щитовидной железы в органной культуре выяснены особенности приживания и восстановления функциональной активности криоконсервированного тиреоидного трансплантата и определена эффективность трансплантации криоконсервированной щитовидной железы как метода восстановления тиреоидной недостаточности.

В отличие от существующих в криобиологической литературе представлений о фатальной неизбежности возникновения в биологических объектах после замораживания их до -196°C без криопротектора криоповреждений, нередко носящих необратимый характер, получены доказательства почти полного сохранения после замораживания важнейших функциональных процессов в щитовидной железе. Это связано с тем, что действие низких температур на щитовидную железу носит характер модуляции, т. е. приводит к увеличению активности процессов органификации иодидов, активности катепсина Д, нестимулируемой и фторидчувствительной активностей аденилатциклазы и связывания норадреналина. При этом замораживание может вызывать снижение аккумуляции иодида и включения ^{14}C -аминокислот в белки, однако эти процессы носят обратимый характер. Сейчас в институте разработан и применяется технологический процесс получения препарата криоконсервированных ксеногепатоцитов, включающий в себя все этапы от подготовки донорского органа и получения изолированных ксеногепатоцитов до транспортировки криоконсервированного материала в лечебное учреждение и подготовки его к клиническому приме-

нению при лечении эндотоксических синдромов (печеночная кома, отравления, желтуха, гепатиты различного генеза) и хирургической патологии. Существенные перспективы намечаются в результате клинического использования криоконсервированной гормон-продуцирующей ткани поджелудочной железы для лечения сахарного диабета и его осложнений.

Проблемы криомедицины развиваются также в направлении использования низких температур как для разрушения паталогически измененных тканей, так и в качестве фактора, стимулирующего процессы заживления криораны (д. м. н. Б. П. Сандомирский). Это направление в криомедицине нашло практическую проверку прежде всего в области камбустиологии, когда для пластики у обожженных больных использовали криоконсервированную кожу и экспериментально обосновали методику криотерапии ожоговых ран.

Логическим продолжением работ в данной области явилось изучение возможности благоприятного действия холода на деструктивно-восстановительные процессы в печени, пораженной хроническим гепатитом и циррозом, поскольку криодеструкция малых объемов паренхим печени приводит к стимуляции процессов регенерации в этом органе.

Изучение возможностей сочетания низких температур с другими физическими факторами (ультразвук, лазер, плазменный скальпель) позволило создать оригинальные методы атипической резекции печени ультразвуковым скальпелем после предварительного замораживания части органа, криокоагуляцию полипов и кровоточащих сосудов в просвете желудка и двенадцатиперстной кишки. Реализация этих новых методов лечения стала возможной после создания специального эндоскопического криоинструмента-криоэлектрокоагулятора КЭК-1, который нашел применение в клиниках страны и за рубежом, а также других эндоскопических криоинструментов для холодого лечения печени, опухолей мочевого пузыря.

Описанные выше исследования сочетались с разработкой дифференцированных подходов к созданию биологических покрытий из консервированных и солевых растворов амниотической и хориальной оболочек, лиофилизированной плаценты, криоконсервированной с высокими скоростями охлаждения кожи человека для лечения ожоговых поражений.

Оценивая пройденный 20-летний путь научно-организационной деятельности первого в нашей стране института, можно с полной уверенностью утверждать о большом его вкладе в становление и развитие криобиологии как науки, которая по праву заняла подобающее ей место среди таких фундаментальных дисциплин как биология, биофизика, радиология, биохимия. Создан теоретический, экспериментальный и прикладной базис для дальнейшего всестороннего изучения действия холода на сложные биологические объекты вплоть до организменного уровня, что открывает большие перспективы для практики биологии и особенно медицины.

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

Поступила 11.10.91

V. I. GRISHCHENKO, A. M. BELOUS

RESULTS OF SCIENTIFIC AND ORGANIZATION ACTIVITIES OF THE
INSTITUTE (TO THE 20TH ANNIVERSARY OF THE INSTITUTE FOR
PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY AND CRYOMEDICINE OF THE UKRA-
INIAN ACADEMY OF SCIENCES)

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

The results of 20 years of scientific and organization activities of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the Ukrainian Academy of Sciences are presented. Fundamental studies of physico-chemical processes in biological systems at low temperatures, mechanisms of cryoinjury and cryoprotection are carried out at the Institute, new types of cryoprotectants and cryogenic equipment for research and medical purposes are developed.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

УДК 616-003.9:615.832.9

А. М. Белоус

ПРОБЛЕМЫ РЕГЕНЕРАЦИИ ТКАНЕЙ ПРИ МЕСТНОМ КРИОВОЗДЕЙСТВИИ

В статье ставится для обсуждения вопрос о механизмах регенерации тканей при локальном криовоздействии на ткани, когда заживление раны происходит более благоприятно, чем при других видах травм. При этом остаются неясными природа и характер факторов, регулирующих процесс заживления холодной раны.

Воздействие низкими температурами на ткани и органы сопровождается двумя типами эффектов: деструкцией тканей либо стимуляцией процессов регенерации. В условиях регулируемого низкотемпературного воздействия на патологически измененные ткани течение регенерации приобретает характер восстановления, при котором формирование рубцово-соединительных тканей минимально, в то время как при других видах воздействий, например высокотемпературном, химическом или механическом повреждениях, развитие рубцовой ткани в очаге регенерации приобретает весьма интенсивный характер. Механизмы, лежащие в основе более благоприятного течения процессов регенерации клеток и тканей при холодном воздействии, до настоящего времени практически не исследованы и некоторые из них могут быть проанализированы при рассмотрении течения процессов регенерации в различных условиях.

В данной статье автор ставит своей целью привлечь внимание исследователей к изучению актуальной проблемы криомедицины — регенерации тканей после регулируемого локального низкотемпературного воздействия, которое сопровождается специфическим и достаточно своеобразным течением восстановительных процессов. Действительно, до настоящего времени остаются не вполне ясными причины, лежащие в основе более благоприятного заживления криоран по сравнению, например, с высокотемпературными повреждениями. Для выяснения этих вопросов необходимы углубленные морфологические и биохимические исследования, которые позволят понять молекулярно-клеточные механизмы регенерации после локального криовоздействия. Под регенерацией понимают комплекс процессов, направленных на замещение различных структур живого после естественного их изнашивания либо повреждения, сопровождающегося формированием новых структур. Существует два основных вида регенерации: физиологическая и репаративная. Физиологическая регенерация — это воссоздание клеток или тканей после их разрушения в процессе обновления живой системы. В организме человека и животных процессы физиологической регенерации протекают непрерывно, отмирающие клетки обновляются, структуры их восстанавливаются. Так, например, с определенной циклическостью регенерируют клетки крови и костного мозга, эпителий кожи и роговицы, идет замена клеток печени и кишечника.

Репаративная регенерация — это процесс восстановления или воссоздания новых структур (клеток, тканей) в результате их повреждения физическими, механическими, химическими травмами и различными патологическими процессами. Иными словами, можно сказать, что репаративная регенерация — это процесс вторичного развития, вызванного повреждением.

Процессы регенерации протекают с различной скоростью и интенсивностью в онтогенезе у разных видов животных. Чем ниже находится тот или иной вид животного на эволюционной лестнице развития, тем интен-

сивнее и полноценнее протекают процессы восстановления клеток, тканей и органов. У высокоразвитых животных и человека процессы регенерации протекают более медленно и не в таком объеме, как у менее развитых организмов. Например, если так называемая эпиморфная регенерация конечностей у беспозвоночных протекает почти с полным восстановлением части или целой конечности, то у млекопитающих, в том числе человека, восстановление утраченной конечности не происходит. Это свидетельствует о том, что в процессе эволюции произошло изменение природы факторов и систем регуляции, управляющих процессами регенерации у высших млекопитающих.

В зависимости от вида механизма, инициирующего процесс регенерации, различают регенерацию путем индукции, внутриклеточную регенерацию и регенерацию по типу гипертрофии. В первом и втором случаях речь идет о появлении в очаге повреждения специфических индукторов и регуляторов эндогенной и экзогенной природы, которые инициируют или стимулируют процессы восстановления. Процессы регенерации в общем виде разделяют на две фазы: начальную, регрессивную, в ходе которой доминируют процессы разрушения биомолекул, клеток и тканей, сопровождающиеся их дедифференцировкой и деградацией, и прогрессивную фазу, для которой характерна интенсификация процессов пролиферации, роста и дифференцировки.

Любая травма механической, химической, температурной либо другой природы сопровождается воспалительным процессом, который включает в себя комплекс изменений на молекулярном, клеточном и тканевом уровнях, составляющий в целом механизм начальной фазы регенерации. Исходы этого процесса очень сильно зависят от типа травм, их локализации, природы пораженных тканей и принципиально могут развиваться в нескольких направлениях: восстановления, перехода в хронический процесс либо разрушения. Как и всякая другая травма, холодовое воздействие на клетки и ткани сопровождается развитием процессов, характерных для фаз воспалительной реакции. В случае, если холодovому воздействию подвергается ткань в составе организма, то в зависимости от ее природы и силы холодового воздействия возникает определенная цепь процессов, первичным звеном которой является реакция микрогемоциркуляторной сосудистой системы, которая влияет на течение регенерации в целом. После низкотемпературного воздействия рефлекс через рецепторные зоны сосудов вызывает реакцию симпатoadренальной системы, в результате чего в кровь выделяются в большом количестве катехоламины и гормоны коры надпочечников, которые вызывают спазм сосудов, следствием которого является развитие гипоксии тканей. Таким образом, при холодovом поражении сосудистой системы тканей в зависимости от его интенсивности возникает стадия нейрорефлекторного спазма, которая затем сменяется стадией стаза крови и пареза капилляров. В результате этого проницаемость капилляров очень сильно нарушается и жидкая часть крови выходит в прикапиллярное русло, а непосредственно в капиллярах развивается агрегация клеток. Установлено, что при действии температуры ниже -30°C первичный спазм сосудов приводит к полному обескровливанию тканей, возникают тромбоз сосудов и некроз тканей. Формирование тромбов в сосудах крови под влиянием холода во многом связано с нарушением функции противосвертывающей системы крови и повреждением структуры внутренней стенки сосудов. В результате развития гипоксического синдрома в тканях аэробный тип обмена сменяется анаэробным, накапливаются недоокисленные продукты, снижается pH , активируются процессы перекисного окисления липидов, внутримембранные фосфолипазы и лизосомальные гидролазы. В силу этого в очаге повреждения накапливаются токсические продукты (альдегиды, свободные жирные кислоты), оказывающие денатурирующее действие на белки. Из-за распада тканей в очаге криораны накапливаются тканевые гормоны (гистамины, серотонин, кинины) и метаболиты (пироват,

малат, сульфаты), которые потенцируют повреждение сосудов, поддерживают их спазм и тромбообразование.

Вышедший из русла крови белковый экссудат и форменные элементы крови совместно с указанными выше продуктами распада тканей формируют в очаге повреждения так называемые некрогормоны, которые оказывают сильное воздействие на процессы дифференцировки и пролиферации клеток.

Существенным фактором, влияющим на регенерацию тканей после холодового воздействия, является возникновение и течение последующего экссудативного процесса, степень проявления которого зависит от интенсивности замораживания и скорости распространения температуры в тканях по вертикали и горизонтали. Это означает, что развитие прогрессивной фазы регенерации зависит от исхода воспалительной реакции, в которой активное участие принимают иммунокомпетентные клетки: нейтрофилы и макрофаги. Присутствие в очаге поражения большого количества нейтрофилов сопровождается торможением прогрессивной фазы регенерации, течение процесса приобретает торпидный характер, формируются обширные рубцовые ткани. Воспалительная реакция, осуществляемая макрофагами, наоборот, способствует нормальному ходу регенерации. Различие между нейтрофилами и макрофагами заключается в том, что нейтрофилы обычно секретируют во внеклеточную среду высокоактивные, а иногда и токсичные соединения (лизосомальные ферменты, супероксиды), тогда как макрофаги в гораздо большей степени участвуют в поглощении продуктов распада. Хотя продуцируемые нейтрофилами вещества обладают цито- и бактериотоксическими свойствами, однако продукты их метаболизма отрицательно влияют на клетки, способные к регенерации. Макрофаги не обладают такими свойствами, но эти клетки активно участвуют в иммунных реакциях, протекающих в очаге регенерации. Однако процессы, связанные с участием клеточных популяций при регенерации локальных криоран, изучены в недостаточной мере. Известно, что при криодеструкции тканей и, в частности, опухолей возникает иммунный ответ, который подавляет рост живых опухолевых клеток. Экспериментальные и клинические наблюдения показывают, что после криодеструкции тканей заживление ран, как правило, происходит первичным натяжением без образования грубой рубцовой ткани. Это свидетельствует о том, что заживление криоран протекает несколько по другому пути, чем, например, заживление повреждений, вызванных патологическим процессом или механической травмой. Это, очевидно, связано как с особенностями общей реакции организма на холодовую травму, так и с характером течения местного воспалительного процесса. Выяснено, что деструктивные процессы в коже при локальном кратковременном воздействии аппликатором с температурой наконечника -100 и -185 °C наиболее интенсивно развиваются спустя 1,5—2 сут после замораживания, то есть имеется довольно продолжительный латентный период распада клеток. При этом деструкция клеток и тромбоз сосудов в криоране спустя 2 сут сменяются быстroteкущими процессами регенерации, а уже к 7 сут в очаге поражения происходят активная пролиферация клеток и увеличение эпидермального пласта. В случае высокотемпературного воздействия в эти сроки происходят в основном некробиотические процессы, а репаративные процессы практически заторможены. Очевидно, различие в течении восстановительных процессов при низко- и высокотемпературных воздействиях обусловлено степенью сохранности нативной структуры тканевых регуляторов «некрогормонов», которые в случае низкотемпературного воздействия в меньшей степени разрушаются.

До настоящего времени нам практически неизвестен молекулярный механизм и характер действия тканевых регуляторов при регенерации тканей после низкотемпературного воздействия. В общих чертах известно, что кроме веществ, участвующих в процессах регенерации как тканевые

регуляторы («некротормоны»), большую роль играют нейрогуморальные факторы, а также низкомолекулярные вещества, влияющие на интенсивность процесса регенерации, но не участвующие в его регуляции (аминокислоты, витамины, микроэлементы). Среди множества веществ-регуляторов в тканях содержится по крайней мере два класса биомолекул, оказывающих активное воздействие на пролиферацию клеток,— это стимуляторы, содержащиеся в цитоплазме (полипептиды и ингибиторы, кейлоны) и локализованные в ядерном аппарате клеток. Регенерация тканей регулируется главным образом кейлонами, которые становятся активными при образовании комплекса с адреналином или кортикостероидами. Существует группа так называемых гомологичных ингибиторов белков антигенной природы, полученных из экстрактов органов животных, которые обладают высокой органной специфичностью. Другая группа белков, которым приписывают роль регуляторов (репрессоров) активности генов,— это гистоны и некоторые виды белков, образующих нуклеопротеиды и обладающие способностью органоспецифично влиять на процессы регенерации. К числу гуморальных факторов регуляции регенерации относятся гормоны (прежде всего гипофизарные тропины), гормоноподобные вещества (например, эритро- и лейкопоэтины, биостимуляторы роста клеток). Все эти вещества являющиеся белками либо гликопротеидами, в крови образуют комплексы с γ - или α_2 -глобулинами плазмы крови, где приобретают свойства активаторов или ингибиторов. К их числу может быть отнесен стимулирующий комплекс яичного белка и альбумина с билирубином плазмы или другими продуктами, перерабатываемыми печенью, а также большой класс естественных антител (нормальные антитела, γ -глобулины) и фагоцитов. Кроме комплексов, в очаге регенерации присутствуют другие вещества, более или менее специфично влияющие на пролиферацию и дифференцировку клеток регенерата (РНК, ДНК, их комплексы, специфические пептиды).

Таким образом, набор и природа факторов, регулирующих процессы регенерации после криовоздействия, весьма различны и в настоящее время не представляется возможным осветить механизмы их действия на молекулярно-клеточном уровне. Вместе с тем известно, что благоприятное заживление криораны без формирования рубцовых тканей происходит в том случае, когда криовоздействие не вызывает глубокую деструкцию тканей. Очевидно, при регулируемом криовоздействии степень криоденатурации «некротормонов» вполне обратима и спустя небольшой промежуток времени после криовоздействия биологически активные соединения, сохранившие свою нативную структуру, начинают стимулировать процессы дифференцировки и пролиферации клеток. Причем индукция этих процессов носит клеточноспецифичный характер, так как в криоране происходит замещение дефекта своей собственной, а не рубцовой тканью. В этих процессах большую роль играют иммуноактивные «некротормоны», вещества и клетки, однако пока характер молекулярно-клеточных проявлений иммунных реакций в зоне криораны не исследован. Следует учитывать также, что холодное воздействие на ткани вызывает общую нейрогуморальную реакцию, которая, очевидно, по характеру своего ответа отличается от отклика, происходящего при других видах травм. Следовательно, уже на первых этапах регенерации криораны развивается другой характер нейрогуморальных процессов в тканях, которые отличаются от таковых при регенерации после механической, термической либо другого вида травмы.

Таким образом, в процессе регулируемого криоразрушения компонентов ткани и, прежде всего, белков, очевидно, формируются биологические продукты с более сохраненной структурно-функциональной активностью, чем после высокотемпературного воздействия, когда происходит глубокая, необратимая денатурация белков и их комплексов, которые теряют способность выполнять роль инициаторов дифференцировки и пролиферации клеток. Поэтому уже на первых этапах регенерации тканей криораны создаются, очевидно, более благоприятные условия течения тканевых и клеточ-

ных процессов, которые под влиянием «некротормонов» способны активировать митотическую и синтетическую активность клеток. На этом этапе регенерации, когда происходит включение в процессы анаболических гормонов, создается благоприятный метаболический фон, на котором восстановление синтеза специфических белков, участвующих в формировании той или иной ткани в зоне раны, происходит достаточно интенсивно. Очевидно, по этой причине после криовоздействия зона криораны замещается очень часто собственной тканью без выраженных рубцовых образований.

Высказанные в настоящей статье соображения в отношении направленности течения репаративных процессов и роли регуляторных факторов при заживлении криораны носят дискуссионный характер и отнюдь не претендуют на исчерпывающий ответ о природе, характере и эволюции процессов репаративной регенерации после низкотемпературного воздействия.

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

Поступила 19.06.91

A. M. BELOUS

PROBLEMS OF TISSUE REGENERATION AFTER LOCAL FREEZING

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

The problem is presented for discussion about mechanisms of tissue regeneration after local freezing when wound healing proceeds in a more favorable way than after other injuries. The nature of factors which regulate the process of healing cold wounds remains unclear.

УДК 612.172:612.58-612.12:092

Л. Т. Малая, Н. В. Ярмыш, В. М. Бровкович

ВЛИЯНИЕ КОФЕИНА И Ca^{2+} НА Ca^{2+} -НАСОСНУЮ ФУНКЦИЮ РЕТИКУЛУМА ПОСЛЕ ГЛУБОКОЙ ГИПОТЕРМИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ МИОКАРДА

Исследовался эффект кофеина и Ca^{2+} на Ca^{2+} -транспортирующую активность СР в гомогенате из нормо- и гипотермически ишемизированных сердец крыс. Обнаружено трехкратное уменьшение скорости поглощения Ca^{2+} после 30-минутной нормотермической ишемии. Под действием 1 мМ кофеина транспорт ионов Са СР ингибируется приблизительно на 60 % при ишемии (37 °С), в то же время в гомогенате из контрольных и гипотермически ишемизированных сердец ингибирование составляет около 45 %. При ишемии наблюдается повреждение Ca^{2+} -зависимой стимуляции поглощения Ca^{2+} СР, более выраженное в случае нормотермии. Делается вывод о том, что глубокая гипотермия (5 °С) оказывает защитный эффект, по крайней мере частично, на уровне регуляции Ca^{2+} -насоса СР в ишемизированном миокарде.

Ионы кальция (Ca^{2+}) играют важную роль в жизнедеятельности клетки. Они способны активировать различные метаболические процессы. Значительную роль Ca^{2+} играет в молекулярных механизмах регуляции цикла сокращения — расслабления сердечной мышцы. К числу основных структур, поддерживающих Ca^{2+} -гомеостаз в миоците, относятся мембраны сарколеммы, саркоплазматического ретикулума и митохондрий [15]. Каждая мембрана выполняет специфическую физиологическую роль в регуляции Ca^{2+} -баланса. В настоящее время убедительно доказана роль системы мембран саркоплазматического ретикулума (СР) в процессе инициации сокращения и расслабления миофибрилл [5,13]. СР обладает замечательным свойством аккумулировать ионы Са из саркоплазмы до уровня, вызывающего диссоциацию Ca^{2+} -тропонинового комплекса. При сокращении мышцы происходит обратная реакция, т. е. выброс Ca^{2+} из СР, сопровождающаяся повышением цитозольной концентрации ионов Са до 10 мкМ. Процесс поглощения Ca^{2+} из саркоплазмы в цистерны СР опосредуется работой

Ca²⁺-насоса, основным из белков которого является Ca²⁺-АТФаза. Известно, что мембраны СР обладают структурной и функциональной гетерогенностью [11]. Одна из его фракций, а именно фракция терминальных цистерн, имеет систему выброса ионов Са, которая в условиях *in vitro* активируется Ca²⁺ и кофеином [5,17]. Действие последнего является строго специфичным.

В результате нарушения Ca²⁺-гомеостаза могут наблюдаться изменения сократимости мышцы и даже гибель клетки. Минорные нарушения в проницаемости мембран к этому катиону ведут к значительным изменениям в его цитозольной концентрации.

Различная степень повреждения Ca²⁺-аккумулирующих свойств сердечного СР показана при некоторых типах сердечной недостаточности [7, 15]. При миокардиальной ишемии, в частности, результатом определенной цепи событий является снижение сократимости мышцы, накопление Ca²⁺ в миоплазме, нарушение функциональной активности Ca²⁺-насоса СР [2, 12] и т. д. Последнее может происходить не только из-за нарушений структурной целостности мембран в результате активации процессов перекисного окисления липидов, фосфолиполиза, накопления лизофосфолипидов, но и вследствие нарушений регуляции Ca²⁺-насоса, а именно его чувствительности к кофеину [9], изменения оптимального для его работы рСа [2]. Глубина этих нарушений коррелирует со степенью патологического воздействия.

Одним из основных методов защиты миокарда при острой ишемии является гипотермия. Некоторые авторы сообщают о положительном эффекте низких температур на ишемизированное сердце [3, 9], тогда как существуют данные и о повреждающем действии длительной глобальной гипотермии (до 1 ч) на субклеточные фракции [4]. В частности, Хесс и др. [9] показали, что гипотермия сохраняет активность Ca²⁺-АТФазы, но не способна защитить липидную компоненту мембран при ишемии. В то же время практически отсутствуют данные о влиянии низких температур на регуляторные механизмы функционирования Ca²⁺-транспортирующей системы СР при ишемии миокарда.

Целью нашей работы является исследование Ca²⁺-аккумулирующей способности СР в условиях гипотермической ишемии при различных концентрациях кофеина и внешнего Ca²⁺.

Опыты проводились на крысах линии Вистар (возраст — 1 год). Тотальную ишемию создавали, помещая сердца животных в 0,9 % NaCl при соответствующей температуре на 30 мин. Животных делили на 3 группы: контрольную, нормотермической ишемии (37 °С), гипотермической ишемии (5 °С). Сердца продавливались через пресс и гомогенизировались в среде выделения, которая содержала: 20 мМ HEPES, 5 мМ NaN₃, 100 мМ KCl (рН 7,4), с помощью гомогенизатора Поттера при 2000 об/мин в течение 1 мин. Отношение сырой массы ткани к объему среды выделения составляло приблизительно 1 : 5.

Скорость поглощения Ca²⁺ измеряли с помощью Ca²⁺-селективного электрода (модель 9320, «Орион Ресч», США). Среда измерения содержала 100 мМ KCl, 6 мМ MgCl₂, 5 мМ NaN₃, 10 мМ *трис*, 15 мМ оксалата калия, 5 мМ АТФ, различные концентрации Ca²⁺ (рН 7,0). Реакцию инициировали добавлением 200 мкл гомогената в 5 мл среды измерения. Для поддержания постоянного уровня АТФ использовалась АТФ-регенерирующая система.

Добавление в среду выделения азидата натрия, а в среду измерения и оксалата калия позволяет считать, что регистрируется скорость поглощения Ca²⁺ преимущественно везикулами СР. Опыты проводились на гомогенате для исключения артефактов, которые могли возникнуть при выделении изолированной фракции СР [7]. Время ишемии (30 мин) было выбрано, исходя из того, что в течение этого периода заканчиваются основные повреждения как мембран кардиомиоцитов [10], так и в том числе мембран СР [2].

Тридцатиминутная нормотермическая ишемия приводит к трехкратному снижению Ca²⁺-транспортирующей активности СР в гомогенате

(табл. 1). Исходя из данных, представленных на рис. 1, концентрация кофеина 1 мМ является критической, приводящей к максимальному ингибированию поглощения Ca^{2+} в наших условиях. В контрольной группе концентрация кофеина 1 мМ снижает скорость поглощения ионов Са приблизительно на 45%. В группе гипотермической ишемии это ингибирование практически не отличается от контроля, при нормотермической ишемии (37 °С) наблюдается уменьшение скорости поглощения Ca^{2+} , вызванного кофеином, почти на 60 %.

Таблица 1

Эффект нормотермической ишемии на Ca^{2+} — транспортирующую активность саркоплазматического ретикула в гомогенате миокарда крыс

Время ишемии, мин	30	60	Конт- роль
Скорость поглощения Ca^{2+} ретику- лумом в гомогенате, мкмоль/мин·г ткани	2,5	2,5	7,5

Таблица 2

Скорость поглощения Ca^{2+} саркоплазматическим ретикулумом в гомогенате из сердец крыс, ишемизированных в нормотермических и гипотермических условиях при различной концентрации вневезикулярного Ca^{2+} , %

Концентрация свободного кальция, мкМ	Температура ишемии, °С		Конт- роль
	37	5	
15	100	100	100
1,5	117	155	200

За 100 % принята скорость поглощения Ca^{2+} в гомогенате при концентрации свободного Ca^{2+} в среде измерения 15 мкМ

При более низких концентрациях кофеина Ca^{2+} -транспорт в СР ингибируется во всех трех группах. В частности, скорость поглощения ионов Са в нормотермически ишемизированных сердцах при концентрации кофеина 1 мкМ уменьшается приблизительно на 35 %, в то же время в контрольной группе и при гипотермической ишемии — на 20—25 %. Таким образом, величина ингибирования почти на 10—15 % меньше в гомогенатах из контрольных и гипотермически ишемизированных сердец, чем ингибирование после нормотермической ишемии.

Во второй части нашей работы исследовали скорость поглощения Ca^{2+} при различных концентрациях Ca^{2+} (табл. 2), которые создавали с помощью Са—ЭГТА буфера, используя кажущиеся константы связывания по Фабиато [6]. При уменьшении концентрации внешнего Ca^{2+} с 15 до 1,5 мкМ наблюдалась активация поглощения ионов Са во всех трех группах. В нормотермически ишемизированных сердцах это увеличение составляло около 17 %, тогда как в контрольной группе скорость поглощения Ca^{2+} возрастала приблизительно в 2,5 раза. При ишемии в условиях низких температур увеличение Ca^{2+} -транспорта было большим, чем в нормотермически ишемизированных сердцах, но не достигало уровня контрольной группы (табл. 2).

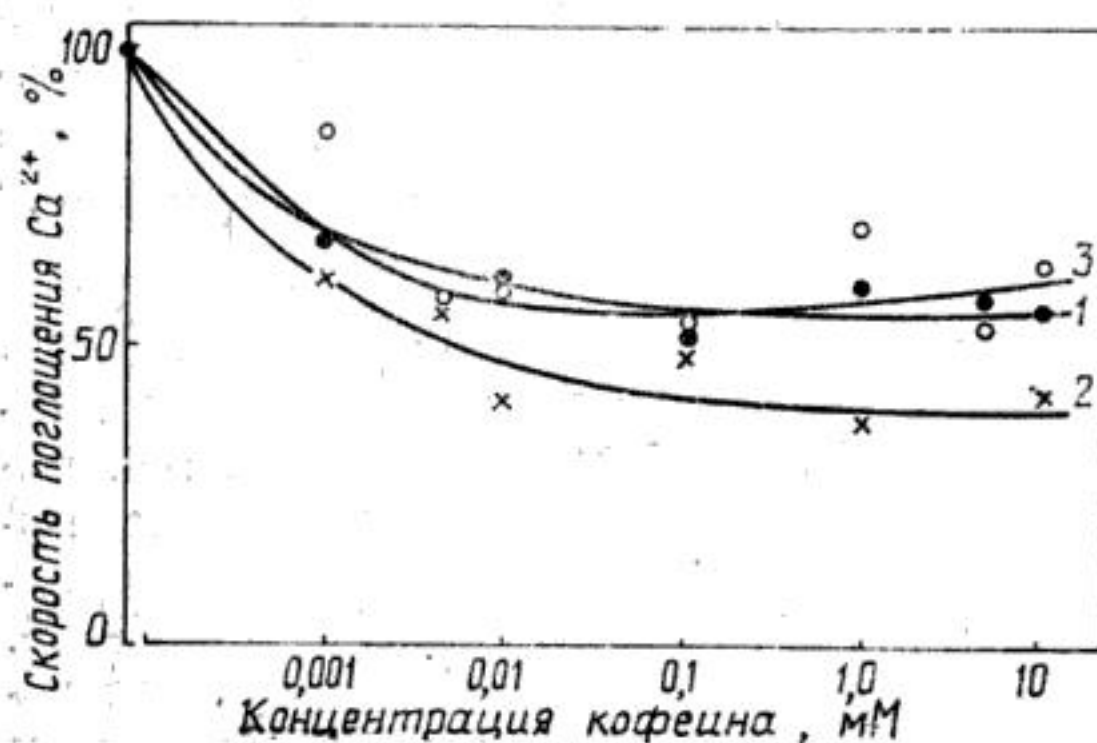


Рис. 1. Скорость поглощения ионов Са саркоплазматическим ретикулумом в гомогенате нормотермических и гипотермических сердец при различной концентрации кофеина, %: За 100 % принята скорость поглощения Ca^{2+} в гомогенате при отсутствии кофеина в среде измерения; 1 — скорость поглощения Ca^{2+} в гомогенате из контрольных сердец; 2 — скорость поглощения Ca^{2+} в гомогенате сердца после нормотермической ишемии; 3 — скорость поглощения Ca^{2+} в гомогенате сердца после гипотермической ишемии

Из литературных данных известно, что кофеин в миллимолярных концентрациях активирует систему освобождения ионов Са из везикул терминальных цистерн СР [17]. Многие авторы показали 40 %-ное ингибирование скорости аккумуляции Са²⁺ СР в гомогенате из миокарда крыс под действием кофеина при концентрации последнего 5 и 10 мМ [11]. В наших экспериментах скорость поглощения Са²⁺ в гомогенате из контрольных сердец также уменьшается, но при значительно более низких (микромолярных) концентрациях кофеина. По данным Су, Хассельбах [16] эффект кофеина зависит от концентрации вневезикулярного Са²⁺. В нашем случае концентрация ионов Са в среде измерения, рассчитанная по [6], составляла 15 мкМ. Поэтому весьма вероятно, что эффект кофеина, проявляющийся в наших условиях в области микромолярных концентраций, обусловлен более высоким, чем в работах [1, 2, 14], содержанием ионов Са в среде измерения.

Наши результаты исследования скорости поглощения ионов Са везикулами СР (табл. 1) согласуются с данными других авторов о повреждающем действии ишемии на Са²⁺-транспортирующую систему СР [2, 7, 12]. Структурные изменения, происходящие при ишемии в результате активации перекисного окисления липидов, фосфолипидиза, накопления свободных жирных кислот и лизофосфолипидов и других процессов, приводят к нарушению работы Са²⁺-насоса [3,8]. Вероятно, в этих патологических условиях могут происходить не только нарушения структурной целостности, но и изменение регуляторных механизмов функционирования Са²⁺-транспортирующей системы СР. Действительно, как показали наши исследования, ингибирование скорости поглощения Са²⁺ 1 мМ кофеина в гомогенате сердца после нормотермической ишемии приблизительно на 18 % больше ингибирования в контрольной группе (рис. 1). Это может происходить за счет относительного увеличения кофеинчувствительных везикул СР в гомогенате из ишемизированного сердца по сравнению с контрольным. Сходные результаты получены ранее [2].

При сравнении действия кофеина (1 мМ) на Са²⁺-насос в контрольной и гипотермически ишемизированной группах обнаружена практически одинаковая степень ингибирования процесса транспорта.

Ингибирование скорости поглощения ионов Са в гомогенатах из нормотермически ишемизированных сердец 1 мкМ кофеина больше приблизительно на 10 % по сравнению с контрольными и гипотермически ишемизированными сердцами. Между последними не обнаружено существенного различия. Можно предположить, что Са²⁺-транспортирующая система СР после нормотермической ишемии более чувствительна к действию кофеина (рис. 1). Таким образом, защитный эффект гипотермии при ишемии осуществляется не только на структурном уровне [3,9], но и на уровне регуляции Са²⁺-насоса СР миокарда.

Известно, что в процессе цикла сокращения — расслабления концентрация ионов Са в саркоплазме изменяется от 10⁻⁵ М при сокращении до 10⁻⁷ М при расслаблении. Нарушения регуляторных механизмов функционирования Са²⁺-насоса СР сердечной мышцы при нормотермической ишемии обнаружены и в экспериментах, в которых транспорт Са²⁺ в гомогенате измерялся при различных концентрациях внешнего Са²⁺. В гомогенате ишемизированных сердец при уменьшении вневезикулярного Са²⁺ от 15 до 1,5 мкМ наблюдается активация скорости поглощения ионов Са приблизительно на 17 %, что значительно меньше, чем в контрольной группе, в которой Са²⁺-транспортирующая активность повышается в 2,5 раза (табл. 2). Очевидно, что стимуляция Са²⁺-насоса СР при изменении вневезикулярной концентрации Са²⁺ физиологически предопределена и необходима для функционирования этого процесса в условиях постоянно меняющейся концентрации ионов Са. Нарушение сократимости сердца при ишемии может быть обусловлено, по крайней мере частично, показанным нами изменением Са²⁺-зависимой регуляции транспорта Са²⁺ СР.

После ишемии сердца при низких температурах с уменьшением концентрации внешнего Ca^{2+} до 1,5 мкМ активация поглощения ионов Са СР приблизительно на 40 % больше, чем после нормотермической ишемии (табл. 2), т. е. можно предположить защитное действие гипотермии на Ca^{2+} -зависимую регуляцию процесса транспорта ионов Са.

Таким образом, представленные данные позволяют сделать вывод о том, что нормотермическая (37 °С) ишемия приводит к значительному изменению функциональных характеристик Ca^{2+} -насоса СР, а именно, к уменьшению Ca^{2+} -транспортирующей активности, повышению чувствительности к кофеину, нарушению Ca^{2+} -зависимой регуляции транспорта Ca^{2+} . Глубокая гипотермия (5 °С) позволяет частично предотвратить эти изменения, что может являться одной из причин защитного действия гипотермии на ишемизированный миокард.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беневоленский Д. С., Меньшикова Е. В., Левицкий Д. О. и др. Влияние кофеина на Ca^{2+} -транспортирующую функцию пузырьков саркоплазматического ретикулума из миокарда крыс / Бюл. эксперим. биологии и медицины.— 1985.— № 9.— С. 315—317.
2. Бровкович В. М., Беневоленский Д. С., Левицкий Д. О. Нарушение функции саркоплазматического ретикулума при тотальной ишемии миокарда, защитное действие кверцетина // Кардиология.— 1987.— № 10.— С. 102—105.
3. Малая Л. Т., Бровкович В. М., Лазарева С. А. и др. Гипотермическая защита мембран ишемизированного миокарда // Международ. конф. Достижения и перспективы развития криобиологии и криомедицины, 10—12 февраля 1988 года.— Харьков.— 1988.— С. 111—112.
4. Engedal H. E., Skagseth E., Saetersdal T. S., Myklebust R. Cardiac hypothermia evaluated by ultrastructural studies in man // J. Thorac. Cardiovasc. Surg.— 1978.— 75, N 5.— P. 548—554.
5. Fabiato A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum // Amer. J. Physiol.— 1983.— 245, N 8.— P. C1—C14.
6. Fabiato A., Fabiato F. Calculator programs for computing the composition of the solutions containing multiple metals and ligands used for experiments in skinned muscle cells // J. Physiol (Paris).— 1979.— 75, N 5.— P. 463—505.
7. Feher J. J., Briggs F. N., Hess M. L. Characterization of cardiac sarcoplasmic reticulum from ischemic myocardium: comparison of isolated sarcoplasmic reticulum with unfractionated homogenates // J. Mol. Cell. Cardiol.— 1980.— 12, N 7.— P. 427—432.
8. Franson R., Gamache D., Blackwell W. et al. Sarcoplasmic reticulum dysfunction: phospholipid alterations induced by lysosomal phospholipase C // Am. J. Physiol.— 1986.— 251, N 5.— P. H1017—H1023.
9. Hess M. L., Krause S. M., Robbins A. D., Greenfield L. J. Excitation—contraction coupling in hypothermic ischemic myocardium // Amer. J. Physiol.— 1981.— 240, N 9.— P. H336—H341.
10. Jennings R. B., Reimer K. A., Hill M. L., Mayer S. E. Total ischemia in dogs heart in vitro. I. Comparison of high energy phosphate production, utilization and depletion of adenine nucleotide catabolism in total ischemia *in vitro* vs. severe ischemia *in vivo* // Circ. Res.— 1981.— 49.— P. 892—900.
11. Jones L. R., Besch H. R., Fleming J. W. et al. Separation of vesicles of cardiac sarcolemma from vesicles of cardiac sarcoplasmic reticulum // J. Biol. Chem.— 1979.— 254, N 2.— P. 530—539.
12. Krause S., Hess M. L. Characterization of cardiac sarcoplasmic reticulum dysfunction during short-term, normothermic, global ischemia // Circ. Res.— 1984.— 55, N 2.— P. 176—184.
13. Levitsky D. O., Aliev M. K., Kuzmin A. V. et al. Isolation of calcium pump system and purification of calcium ion-dependent ATPase from heart muscle // Biochim. Biophys. Acta.— 1976.— 443.— P. 468—484.
14. Nayler W. G., Dresel P. E. Ca^{2+} and the sarcoplasmic reticulum // J. Mol. Cell. Cardiol.— 1984.— 16, N 11.— P. 165—174.
15. Shamoo A. E., Ambudkar I. S. Regulation of calcium transport in cardiac cells // Can. J. Physiol. Pharmacol.— 1984.— 62, N 1.— P. 9—22.
16. Su J. Y., Hasselbach W. Caffeine-induced calcium release from isolated sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle // Pflügers Arch.— 1984.— 400, N 1.— P. 14—21.
17. Weber A. The mechanism of action of caffeine on sarcoplasmic reticulum // J. Gen Physiol.— 1968.— 52.— P. 760—772.

НИИ терапии МЗ Украины
г. Харьков

Поступила 28.07.89

L. T. MALAYA, N. V. YARMYSH, V. M. BROVKOVICH

THE INFLUENCE OF CAFFEINE AND CALCIUM ON THE Ca^{2+} -PUMP FUNCTION OF SARCOPLASMIC RETICULUM AFTER DEEP HYPOTHERMIC MYOCARDIAL ISCHEMIA

Research Institute for Therapy of Kharkov of the Ukrainian Ministry of Health, Kharkov

The effect of caffeine and calcium on the Ca^{2+} -transport activity of sarcoplasmic reticulum was studied in the homogenate of rat hearts subject to hypothermic ischemia. A 3-fold decrease in Ca^{2+} uptake has been found after 30 min normothermic ischemia. The transport of SR Ca^{2+} ions was inhibited by 1 mM caffeine approximately by 60 % in ischemic (37 °C) hearts while the inhibition was nearly 45 % in the homogenate of control and ischemic hearts. The impairment in Ca^{2+} -dependent stimulation of the Ca^{2+} influx observed under ischemia was greater in case of normothermia. It has been concluded that deep hypothermia (5 °C) exerts a protective effect, at least partially, at the level of Ca^{2+} -pump in ischemic myocardium.

УДК 57.043:577.217

М. В. Каранова, А. А. Андреев, Н. Н. Петропавлов

НИЗКОТЕМПЕРАТУРНАЯ КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ В ПРИСУТСТВИИ АНТИФРИЗНЫХ ГЛИКОПРОТЕИНОВ СЫВОРОТКИ ТРЕСКИ *GADUS MORRHUA*

При замораживании в присутствии различной степени очищенности антифризных гликопротеинов (АФГП), выделенных из сыворотки атлантической трески, образующийся лед имеет мелкокристаллическую структуру с нечетко выраженными границами между кристаллами. В некоторых экспериментах образующиеся кристаллы имели четко выраженную осевую направленность.

Существуют обширные исследования того, как влияют на размеры и форму кристаллов общеизвестные криопротекторы (диметилсульфоксид, глицерин, полиэтиленоксид и др.), применяемые при низкотемпературном криоконсервировании. Антифризные белки, или антифризные гликопротеины (АФГП), присутствующие в крови арктических и антарктических рыб [1], понижают температуру замерзания отнюдь не так значительно, как криопротекторы (всего на 1 °C), однако, обладая рядом уникальных специфических свойств, они, как и криопротекторы, способны изменять фазовые превращения жидкой части в лед, хотя, к сожалению, данные, представленные в литературе по этой проблеме, весьма ограничены [4]. Представляет немаловажный интерес для вопросов, связанных с криоконсервацией биологических объектов, подробная информация о том, какой характер кристаллизации присущ растворам АФГП, причем не только очищенным и достаточно дорогостоящим в связи с многочисленностью процедур, требуемых для их очистки [2], но и препаратам АФГП, хотя и гетерогенным по своему составу, но выделенным нетрудоемким и быстрым способом. Целью настоящей работы явилось исследование влияния различных препаратов АФГП, полученных из сыворотки крови атлантической трески *Gadus morrhua*, на рост кристаллов льда в условиях медленного замораживания.

Треску *Gadus morrhua* отлавливали в октябре месяце в западном секторе Баренцева моря при температуре воды 8 °C. После удаления из сыворотки глобулинов 25 %-ным сульфатом аммония добавляли сульфат аммония до 45 %-ной концентрации, и осажденные белки после центрифугирования пропускали через колонку с сефадексом Г-25 и лиофилизировали. Из полученной фракции, обогащенной АФГП и далее обозначаемой как суммарная фракция АФГП, получали очищенные препараты АФГП, как описано в предыдущей работе [2].

Концентрацию белка определяли на спектрофотометре СФ-16 при 230 нм. Электрофорез проводили в 15 %-ном полиакриламидном геле в присутствии 0,1 %-ного додецилсульфата натрия [5]. Понижение температуры замерзания (антифризную активность) измеряли на осмометре ОМКА ИЦ-01 (результаты см. в примечании к рис. 3).

Кристаллизацию исследуемых растворов изучали на лабораторной установке, состоящей из камеры с вмонтированными в нее микроскопом и системой охлаждения, через которую подавался жидкий азот. Толщина замораживаемого слоя — 200 мкм. Кювета кварцевая (камера Горяева).



Рис. 1. Электрофореграмма суммарной фракции АФГП: 1-я линия — 15 мкг белка, 2-я линия — 20 мкг. Сила тока — 10 мА на полосу; продолжительность электрофореза — 4 ч

Электрофореграмма суммарной фракции белка, полученной в результате осаждения 45 % сульфатом аммония, представлена на рис. 1. Электрофоретический паттерн суммарной фракции, сопоставленный с распределением в полиакриламидном геле белков-маркеров, свидетельствует о том, что в состав суммарной фракции входит, по-видимому, преимущественно альбумин (Мол. вес 60.000), обычно осаждаемый концентрациями сульфата аммония, превышающими половину от концентрации насыщения. Кроме альбумина, как минорные компоненты на электрофореграмме выявляются белки с довольно разнообразным спектром молекулярных весов. Поскольку эта фракция, как показали результаты измерения антифризной активности с помощью осмометра при концентрации белка 10 мг/мл, понижает температуру замерзания раствора до $-0,3^{\circ}\text{C}$, имеются основания предполагать, что среди белков, выявляемых на электрофореграмме, находятся и антифризные. Белки, элюированные из хроматографической колонки с сефадексом Г-100, как показано нами в предыдущей работе [2], выявили на электрофореграмме наличие лишь одной окрашенной полосы, что свидетельствует о гомогенности полученных препаратов. Молекулярный вес двух из этих белков соответствовал 25.100 и 31.500 дальтон, понижение температуры замерзания составляло (при такой же концентрации 10 мг/мл) — $0,42^{\circ}\text{C}$ и $-0,53^{\circ}\text{C}$, соответственно; именно эти белки мы использовали для изучения визуального характера ингибирования льдообразования.

Замораживание водных растворов АФГП (криомикроскопия). Замораживание осуществляли со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Кристаллообразование инициировали мелкими частицами льда, а в отдельных случаях иодистым серебром. Однако при наличии АФГП в растворе, вероятно, было переохлаждение, так как процесс кристаллизации (скорость движения фронта замерзания раствора) был заметно медленнее, возможно, за счет ингибирования роста кристаллов льда молекулами белка. Для сравнения с исследуемым материалом (и в качестве контроля) были заморожены дистиллированная вода (рис. 2,а) и бычий сывороточный альбумин, 23 мг/мл (рис. 2,б). Структура льда, развивающаяся при кристаллизации воды, представляла собой крупноячеистые «соты» (или сетку), ячейки которых имели различные размеры. При замораживании альбумина фронт кристаллизации имел ярко выраженную осевую направленность, кристаллы льда были крупными, игловидной формы.

Фотография замораживания сыворотки трески, разбавленной в 10 раз, представлена на рис. 3,а. Кристаллизационная картина в этом случае совершенно иная: структуры, похожие на кристаллические, значительно мень-

ше, чем при замораживании воды, округлые, имеют очень слабо выраженные дендриты, границы ячеек кристаллов льда размыты, в «упаковке» кристаллов видна некоординированность, произвольность, хаотичность. Характерной особенностью льдообразования при замораживании суммарной фракции АФГП (3 мг/мл) является наличие значительно более мелкой кристалличе

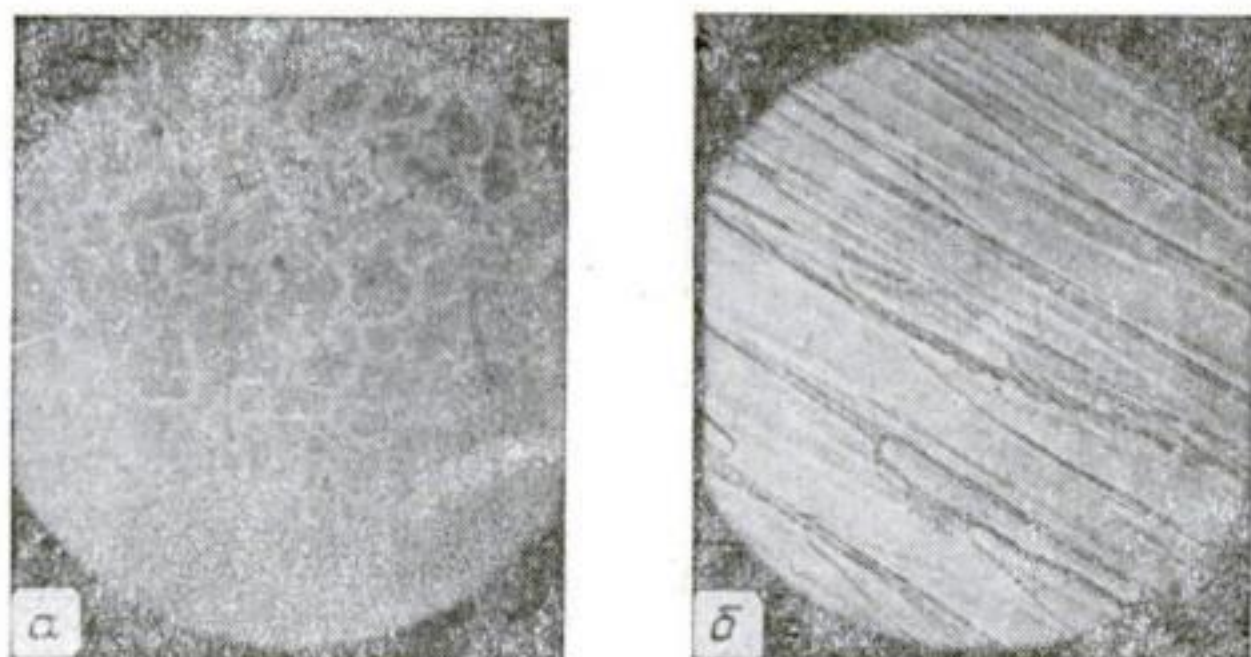


Рис. 2. Замораживание дистиллированной воды (а) и бычьего сывороточного альбумина (23 мг/мл) (б). Скорость замораживания 1 °С/мин. Увеличение в 80 раз

ской структуры, чем при замораживании сыворотки, частичное сохранение округлости (на периферии снимка) и появление новой формы кристаллов, напоминающей листья папоротника (рис. 3,б).

Характер и вид кристаллизации льда при замораживании очищенных препаратов АФГП с молекулярным весом 25.100 и 31.500 дальтон (концентрация замороженного белка — 3 мг/мл (рис. 3, в, г) довольно существенно

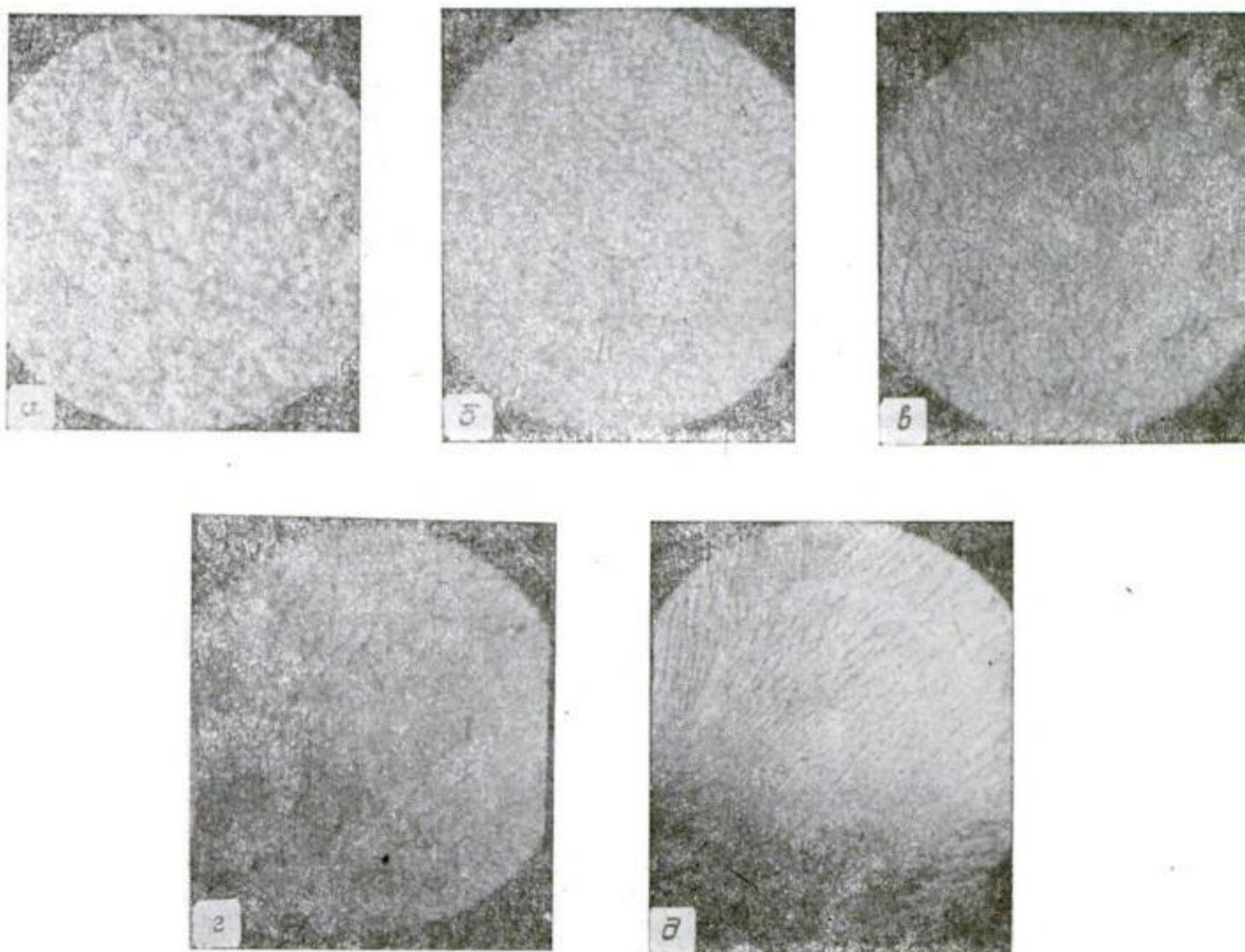


Рис. 3. Замораживание различных фракций АФГП: а — диализованная сыворотка трески, 3 мг/мл; б — суммарная фракция АФГП 3 мг/мл; в — очищенный АФГП с м. в. 25.100, 3 мг/мл; г — очищенный АФГП с м. в. 31.500; 3 мг/мл; д — суммарная фракция АФГП, 10 мг/мл. Антифризная активность, измеренная на осмометре, при концентрации белка 3 мг/мл: сыворотка трески — ($-0,2^{\circ}\text{C}$); суммарная фракция АФГП — ($-0,28^{\circ}\text{C}$); АФГП, 25.100 дальтон — ($-0,2^{\circ}\text{C}$); АФГП, 31.500 дальтон — ($-0,22^{\circ}\text{C}$); суммарная фракция АФГП при концентрации белка 10 мг/мл — ($-0,6^{\circ}\text{C}$)

отличается от наблюдаемого при замораживании суммарной фракции (рис. 3,б). При наличии мелкокристаллической сетчатой структуры на фотоснимках видны очень разветвленные дендриты, появилось множество мелких центров кристаллизации (особенно для АФГП с молекулярным весом 25.100 дальтон, рис. 3, в). В целом же картина замораживания обоих этих белков имеет много сходства, хотя для высокомолекулярного АФГП ячейки сетчатой структуры более крупные, меньше центров кристаллизации. В обоих случаях такое же отсутствие осевой направленности, как это имело место при замораживании суммарной фракции, содержащей такое же количество белка (рис. 3,б).

В то же время при замораживании более концентрированной суммарной фракции (10 мг/мл) форма кристаллов меняется: мелкокристаллическая структура становится волокнистой и приобретает четко выраженную осевую направленность кристаллов (рис. 3,д). Именно эти снимки более всего аналогичны снимкам, полученным ранее при замораживании «1—5» АФГП, очищенным из сыворотки широколобика и имеющим в среднем молекулярный вес 15.000 [4], однако мы не вправе сравнивать наши результаты с вышеупомянутыми, полученными в совершенно другом техническом исполнении (с помощью сканирующего микроскопа и при неизвестной нам скорости замораживания, не указанной в статье).

Сравнение полученных нами результатов действия на кристаллизационные процессы АФГП и известных из литературы данных о замораживании растворов диметилсульфоксида (ДМСО), одного из самых широко применяемых при криоконсервации протекторов, интересно тем, что замораживание растворов ДМСО, начиная с концентрации 5 % и выше, способствовало формированию такой же мелкокристаллической структуры, как и замораживание АФГП [3], и образующаяся при замораживании 5 % ДМСО мелкоперистая структура льда незначительно отличалась от сетчатой структуры при замораживании АФГП (рис. 3, б—г). Из литературных данных известно, что при замораживании 12 % ДМСО, как и 15 % полиэтиленоксида — 400 (концентрации, обычно используемой при замораживании биологических объектов), на кристаллограммах видно образование аморфной структуры с едва различимыми кристаллами и малодифференцируемыми центрами кристаллизации [3]. Однако такая, казалось бы, благоприятная для биологического материала стекловидная структура является неустойчивой и при оттаивании возникают явления рекристаллизации, губительно действующие на клетки и являющиеся основной причиной их разрушения. Найт и соавт. [4] провели исследование, в результате которого обнаружили, что при оттаивании очень разбавленных растворов АФГП рекристаллизации не происходит. Этот факт, наряду со способностью АФГП блокировать рост кристаллов льда, расширяет наши представления об уникальности свойств АФГП и делает перспективной возможность их использования при криоконсервации. Суммируя все вышеизложенное, мы можем сделать вывод, что не только очищенные препараты АФГП, но и весьма гетерогенная суммарная фракция, в которой преобладал альбумин, в такой же степени, как и очищенный белок, влияют на характер льдообразования, в одинаковой степени ингибируя рост кристаллов льда и создавая тем самым мелкокристаллическую (а иногда и аморфную) структуру. Таким образом, для ряда задач криоконсервации есть смысл ограничиваться лишь выделением суммарной фракции АФГП, не требующей для своего выделения такой затраты времени, как это имеет место при получении более гомогенных препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Каранова М. В., Петропавлов Н. Н., Андреев А. А. Антифризные макромолекулы // Деп. в ВИНТИ. 1987. № 7725—В87.
2. Каранова М. Е., Андреев А. А., Петропавлов Н. Н., Щипакина Т. Г. Антифризные белки сыворотки трески *Gadus morhua*: выделение, очистка и характеристика // Криобиология. — 1991. — 3. — С. 11—16.

3. Низкотемпературная кристаллизация в биологических системах.— Киев : Наук. думка, 1977.— 238 с.
4. Knight C. A., DeVries A. L., Oolman L. D. Fish antifreeze protein and the freezing and recrystallization of ice // Nature.— 1984.— 308.— P. 295—296.
5. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4 // Nature.— 1970.— 227.— P. 680—685.

Ин-т биофизики АН СССР,
г. Пущино

Поступила 24.08.90

M. V. KARANOVA, A. A. ANDREYEV, N. N. PETROPAVLOV

LOW TEMPERATURE CRYSTALLIZATION OF AQUEOUS SOLUTIONS IN THE PRESENCE OF SERUM ANTIFREEZE GLYCOPROTEINS OF *CADUS MORRHUA*

Institute of Biological Physics of the USSR Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region

The structure of ice formed upon freezing of aqueous solutions in the presence of antifreeze glycoproteins of different purification degree isolated from *Gadus morrhua* serum consists of fine crystals with indistinct interfaces. Sometimes, crystals had a distinct axial direction.

УДК 57.043

К. Эбине, С. Тамура, М. Ли, К. Сато, М. Йокомуро, С. Сумида,
А. Охсака, К. Мацушита

НОВАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ПЕРЕОХЛАЖДЕННОГО СЕРДЦА КРОЛИКА, ПРЕДНАЗНАЧЕННОГО ДЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦИИ

Представлен новый метод оценки жизнеспособности консервированного сердца донора с помощью ^{31}P -ЯМР спектроскопии. Изучалось влияние простой гипотермии (4°C) и переохлаждения (-3°C) с холодовой кардиоплегией. Уровень креатинфосфата ($\Phi_{\text{кр}}$) и аденозинтрифосфата (АТФ) донорского сердца быстро снижался в процессе операции, а содержание неорганического фосфата ($\Phi_{\text{н}}$) имело тенденцию к увеличению. Уровень $\Phi_{\text{кр}}$ и АТФ в переохлажденных органах сохранялся на достаточном уровне по сравнению с органами после гипотермического хранения, а также значительно раньше наступало восстановление энергетического метаболизма миокарда при реперфузии в группе переохлажденных органов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что ЯМР является хорошим неинвазивным методом оценки состояния сердца перед трансплантацией, а наиболее благоприятным условием для трансплантации является переохлаждение.

При большом распространении трансплантации сердца в качестве терапевтического метода, все более актуальной становится задача адекватного хранения органа и предоперационной неинвазивной оценки жизнеспособности донорского сердца.

В данной работе представлен новый метод оценки жизнеспособности консервированного сердца донора, согласно которому сердце кролика исследовали с помощью ^{31}P -ЯМР спектроскопии, изучали также влияние простой гипотермии (4°C) и переохлаждения (-3°C) с холодовой кардиоплегией.

У кроликов (весом 1,5 кг) сердце удаляли под анестезией путем торакотомии и сразу же останавливали инфузией раствора Янга (2—3 мл) при 4°C , после чего консервировали в растворе Колинза М. После консервации при 4°C методом простого погружения или при $-2^\circ\text{C} \div -4^\circ\text{C}$ (переохлаждение) в течение 24 ч (таблица) донорское сердце реперфузировали кровью при нормальной температуре через канюлю, соединенную с правой бедренной артерией другого здорового половозрелого кролика (3 кг), поддерживая перфузионное давление на уровне 80—90 мм рт. ст., гематокрит 35 % и температуру 37°C . При этом наблюдали за энергетичес-

Метод удаления и консервирования донорского сердца кролика в эксперименте

Удаление

Кролик-донор (1,5 кг)

- ← гепаринизация под анестезией
- ← торакотомия
- ← быстрая остановка сердца раствором Янга (2—3 мл) при 4 °С
- ← удаление сердца
- ← промывка сердечно-сосудистого ложа раствором Коллинза М

Консервирование

Изолированное сердце

(1) Контрольная группа, n-5

- ← без консервации

(2) Простая гипотермия, n-5

- ← консервация при 4 °С в течение 24 ч методом простого погружения

(3) переохлаждение, n-5

- ← Консервация при $-1 \div -4$ °С в течение 24 ч методом простого погружения

ким метаболизмом донорского сердца, помещенного в ампулу диаметром 25 мм (рис. 1), методом неинвазивной ^{31}P -ЯМР спектроскопии при 109,17 МГц на ЯМР спектрометре JNM-GSX 270. Спектры получали после 600 сканов в течение 120 мин. Использовали импульсы длительностью 80 мкс (45°) с периодом повторения 1 с. По полученным спектрам определяли значения химического сдвига сигналов неорганического фосфата ($\Phi_{\text{н}}$), креатинфосфата ($\Phi_{\text{кр}}$), фосфата аденозинтрифосфата (АТФ) в положениях α , β , и γ , вычисляли площадь пиков и соотношение $\Phi_{\text{н}}$ и $\Phi_{\text{кр}}$ или АТФ.

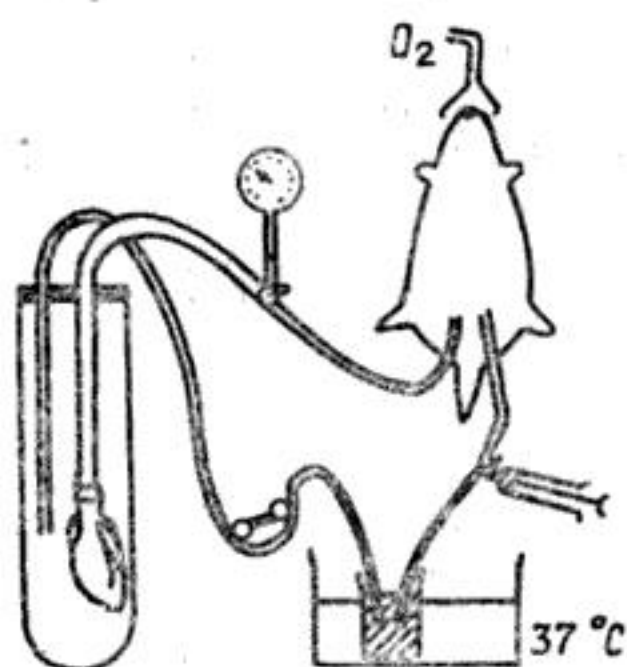


Рис. 1. Схема экспериментальной установки для оценки жизнеспособности консервированного донорского сердца методом ^{31}P -ЯМР спектроскопии

АТФ снижается (рис. 3). При этом в контрольной группе наблюдаются такие же изменения, как и в двух других [1, 2]. Это свидетельствует, что при удалении сердца в миокарде происходит существенное изменение уровня метаболизма макроэргов.

Спектр ^{31}P -ЯМР сердца кролика в норме представлен на рис. 2. В спектре видны сигналы следующих фосфосодержащих соединений (слева направо): $\Phi_{\text{н}}$, $\Phi_{\text{кр}}$, АТФ (γ) + АДФ (β); АТФ (α) + АДФ (α) и АТФ (β) [1].

Во время консервирования в изолированном донорском сердце контрольных животных в предперфузионный период, а также в группах после простой гипотермии и переохлаждения состояние макроэргических соединений изменяется таким образом, что уровень $\Phi_{\text{н}}$ резко возрастает, а концентрация $\Phi_{\text{кр}}$ и

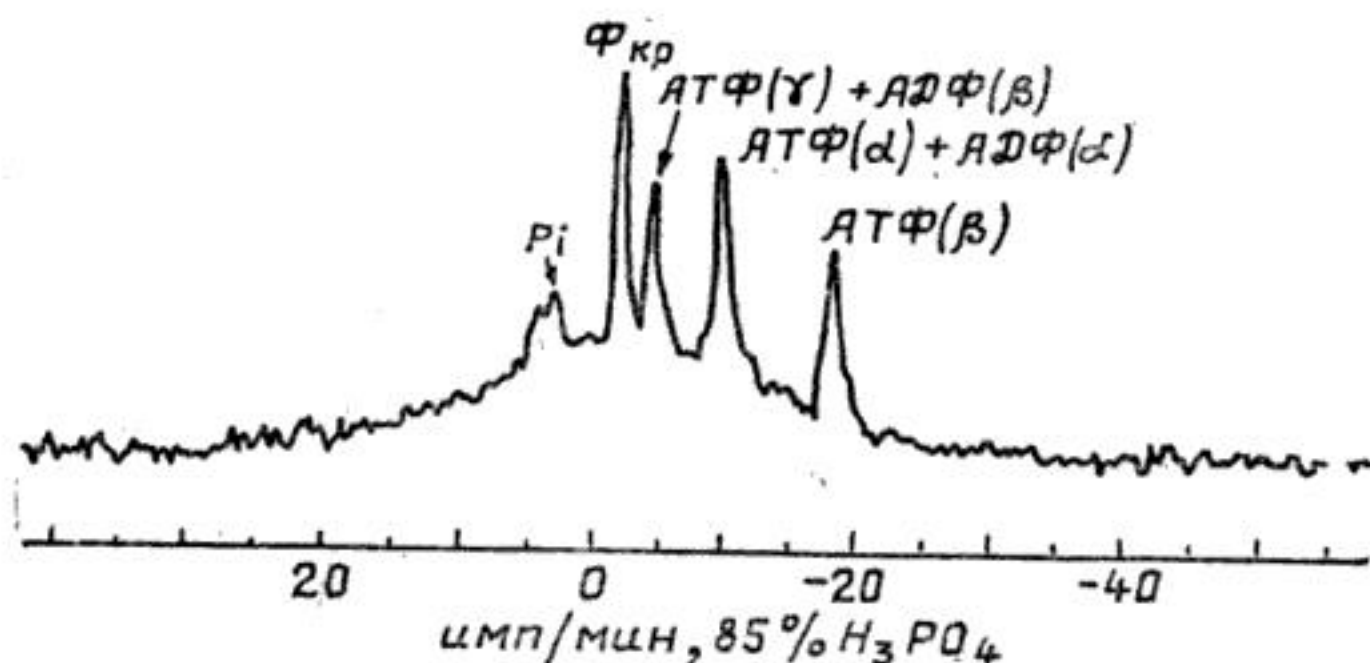


Рис. 2. Спектр ^{31}P -ЯМР сердца кролика в норме

В начале перфузии донорского сердца уровень Φ_n снижался, однако значения $\Phi_{кр}$ и АТФ постепенно увеличивались. Через 30 мин эти изменения достигали плато, после чего находились на одинаковом уровне во всех группах в течение 120 мин (рис. 4, 5, 6). Метаболизм макроэргов в донорском сердце улучшался в одинаковой степени при перфузии во всех трех группах, т. е. практически никаких различий не выявлено [2].

Метаболизм энергетических эквивалентов в донорском сердце в контрольной группе уменьшался при перфузии (рис. 4), а в группе после простой гипотермии был таким же, как и в контрольной (рис. 5). Изменения в органах, подвергнутых переохлаждению, были такими же, как и в двух

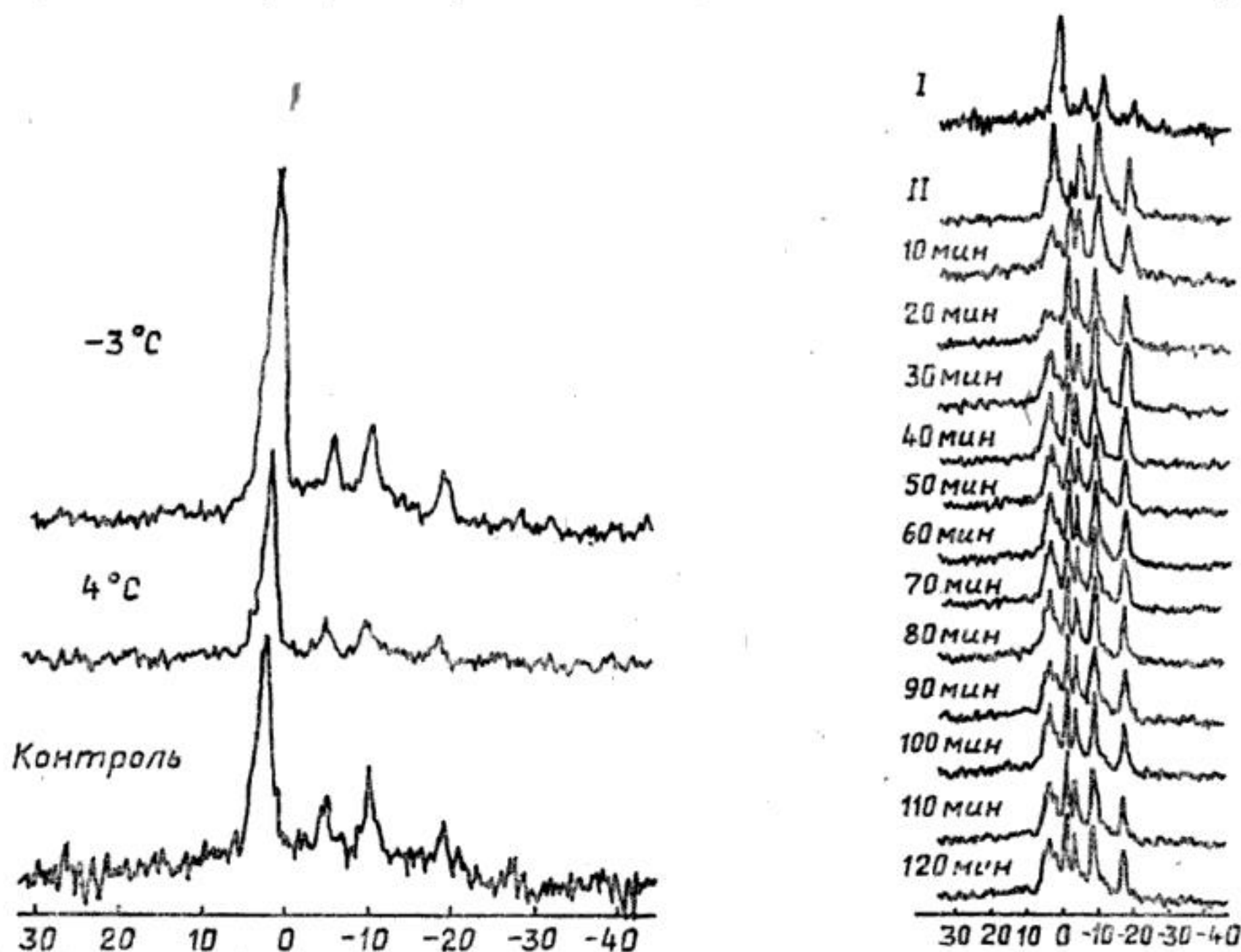


Рис. 3. Спектры ^{31}P -ЯМР сердца кролика до реперфузии

Рис. 4. Спектры ^{31}P -ЯМР сердца кролика (контроль: I — до реперфузии; II — после реперфузии)

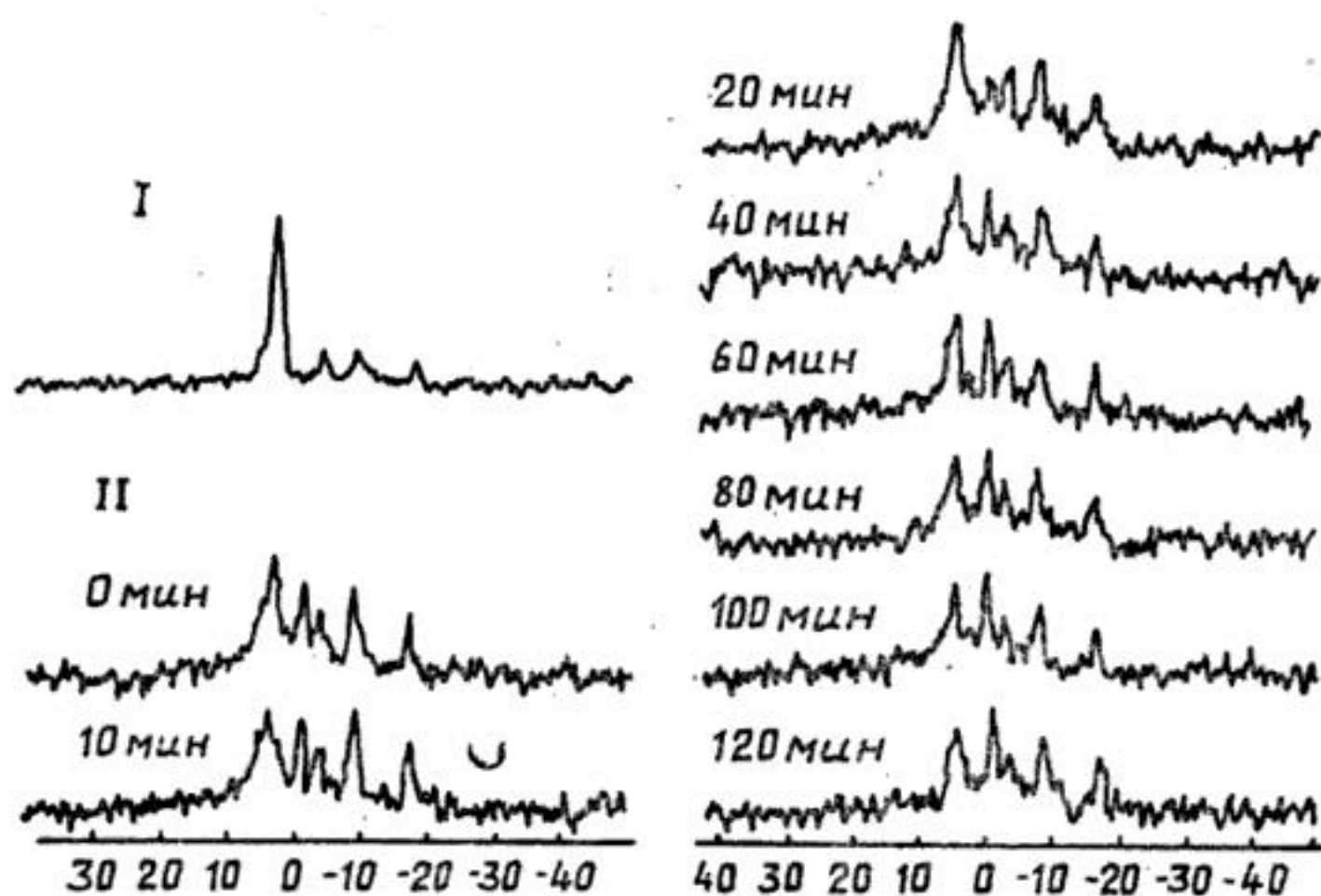


Рис. 5. Спектры ^{31}P -ЯМР сердца кролика, консервированного при 4°C в течение 24 ч: I — до реперфузии; II — после реперфузии

других группах (рис. 6). Все это свидетельствует о том, что при перфузии донорского сердца жизнеспособность миокардиоцитов сохраняется в тех случаях, когда уровень $\Phi_{кр}$ и АТФ сохраняется, а Φ_n снижается.

Анализ данных, касающихся изменений отношения Φ_n к $\Phi_{кр}$ во времени, показал, что способность донорского сердца синтезировать $\Phi_{кр}$ при перфузии

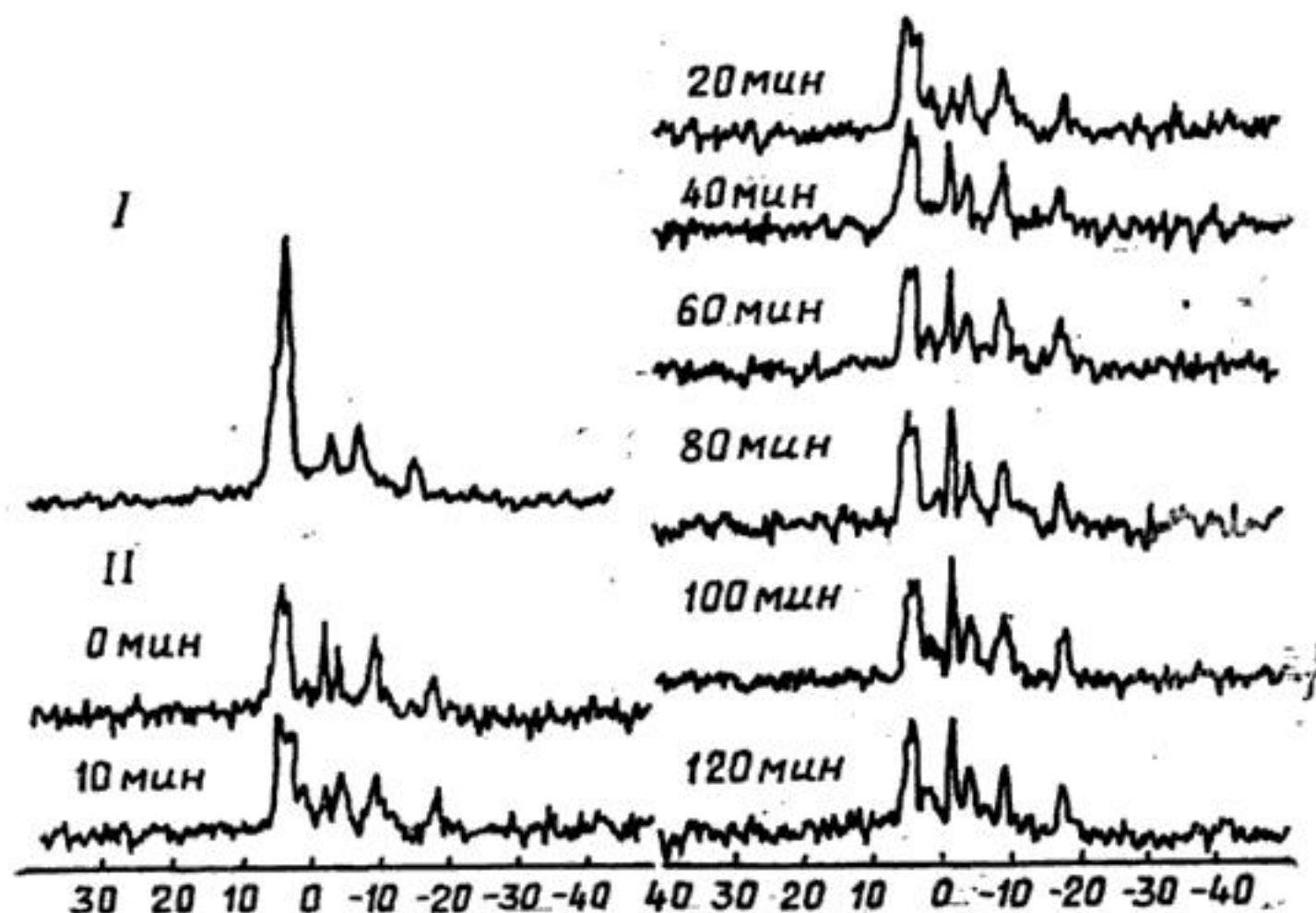


Рис. 6. Спектры ^{31}P -ЯМР сердца кролика, консервированного при 4°C в течение 24 ч: I — до реперфузии; II — после реперфузии

была более высокой в контрольной группе, затем в группе с переохлаждением органов и, наконец, в группе после простой гипотермии (рис. 7).

Определение соотношения $\Phi_n/\text{АТФ}$ показало, что способность синтезировать АТФ миокардом сохраняло аналогичные закономерности, описанные выше (рис. 8).

Таким образом, исследование синтетической способности миокарда показывает, что состояние переохлаждения является более благоприятным для сохранения его функции по сравнению с простой гипотермией.

Наблюдались случаи, когда синтез $\Phi_{кр}$ и АТФ в сердце вообще не осуществлялся и их значения постепенно снижались к нулю. В этом случае метаболизм макроэргов в перфузированном донорском сердце снижался даже тогда, когда синтез АТФ сохранялся в предперфузионный период на

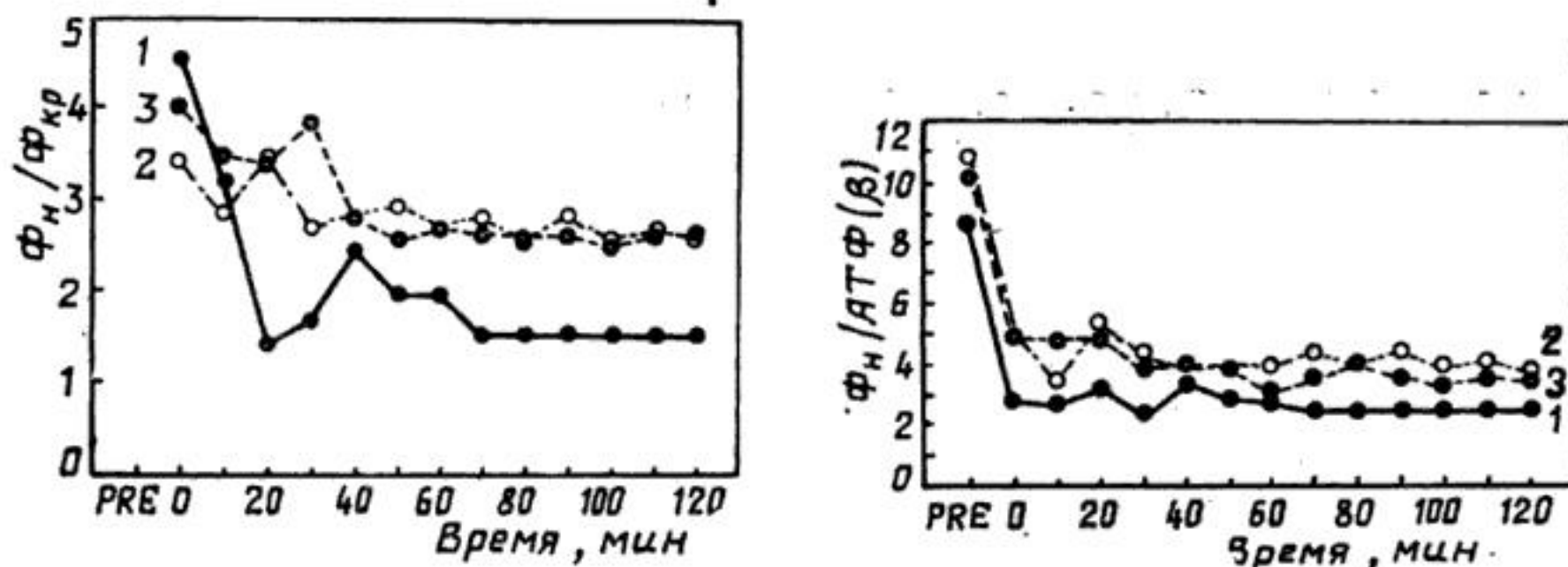


Рис. 7. Изменения в соотношении $\Phi_n/\Phi_{кр}$: 1 — контрольная группа; 2 — простая гипотермия (4°C); 3 — переохлаждение (-3°C)

Рис. 8. Изменения в соотношении $\Phi_n/\text{АТФ}$ (β):

1 — контрольная группа; 2 — простая гипотермия (4°C); 3 — переохлаждение (-3°C)

должном уровне (рис. 9). В этих случаях, которые отмечались только в группе простой гипотермии органов, отсутствовала жизнеспособность миокарда.

На основании приведенных выше результатов сделан вывод о том, что ЯМР является хорошим неинвазивным методом оценки трансплантата сердца перед пересадкой. При использовании простого метода погружения на 24 ч лучшим условием является состояние переохлаждения, по сравнению с простой гипотермией.

Выводы

В данной работе исследовали жизнеспособность донорского сердца кролика, консервированного методом простого погружения на 24 ч, и сравнивали различия между простым гипотермическим и переохлажденным состояниями с помощью ^{31}P -ЯМР спектроскопии.

1. Определены значительные изменения в энергетическом метаболизме в миокарде не только в консервированных при 4°C (простая гипотермия) и при $-2^\circ\text{C} \div -4^\circ\text{C}$ (переохлаждение) в течение 24 ч донорских органах, но и сразу после удаления сердца (контроль).

2. Энергетический метаболизм улучшался в трех группах перфузированных донорских сердец. При этом уровень Φ_{H} снижался, $\Phi_{\text{кр}}$ и АТФ увеличивался.

3. Возрастающее во времени отношение Φ_{H} и $\Phi_{\text{кр}}$ было более выражено в контрольной группе и постепенно снижалось в группах переохлаждения и гипотермии.

4. Наблюдались случаи, когда синтез $\Phi_{\text{кр}}$ и АТФ не осуществлялся, а уровень Φ_{H} повышался, энергетический метаболизм ухудшался. При этом жизнеспособность миокарда не сохранялась при простой гипотермии.

Сделан вывод, что ЯМР является эффективным неинвазивным методом оценки трансплантата сердца перед пересадкой. При использовании метода простого погружения на 24 ч консервирование в переохлажденном состоянии является предпочтительным условием по сравнению с простой гипотермией.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nunnally R. L., Bottemley P. A. Assesment of pharmacological treatment of myocardial infarction by phosphorous-NMR with surface coil // Science.— 1981.— 211.— P. 177.
2. Imai S., Katano Y., Nakazawa M. Use of ^{31}P -NMR for the study of myocarbial energy metabolism // Jpn. J. Pharmac.— 1981.— 31. (suppl).— P. 154.

Перевод с англ. З. В. Линевиц

Токийский ун-т;
Национальный центральный госпиталь,
г. Фукуока;
Национальный ин-т здравоохранения;
Джеол, Лтд.; г. Токио

Поступила 08.02.88

K. EBINE, S. TAMURA, M. LEE, K. SATO, M. YOKOMURO, S. SUMIDA,
A. OHSAKA, K. MATSUSHITA

A NEW MODEL TO EVALUATE THE VIABILITY OF SUPERCOOLED RABBIT HEART FOR TRANSPLANTATION

Toho University, Tokyo; National Fukuoka Central Hospital; National Institute of Health, Tokyo; Jeol, Ltd, Tokyo

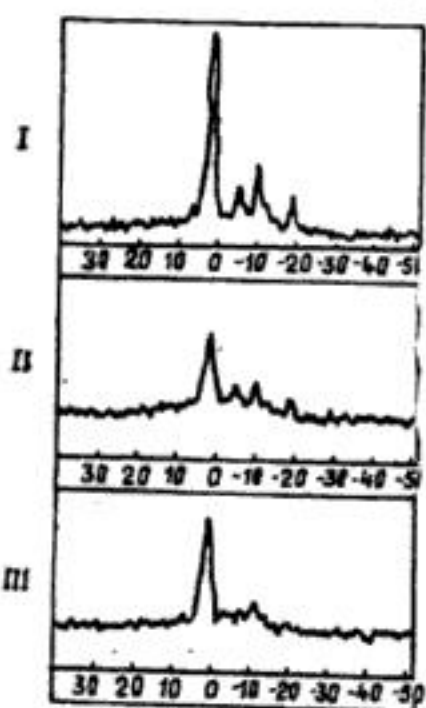


Рис. 9. Спектры ^{31}P -ЯМР донорского сердца, консервированного при 4°C методом простого погружения: I — до реперфузии; II — через 30 мин после реперфузии; III — через 40 мин после реперфузии

In this study of a new model to evaluate the viability of preserved donor heart, ^{31}P -NMR spectroscopy was introduced into the preserved rabbit hearts, and the effects of simple hypothermia (4°C) and supercooling (-3°C) with cold cardioplegia were studied. The levels of creatine phosphate (P_{Cr}) and adenosine triphosphate (ATP) of donor hearts rapidly declined during surgical procedure to remove the heart from the donor rabbits, but the inorganic phosphate (P_i) level tended to rise. The levels of P_{Cr} and ATP in the supercooled group were significantly well maintained as compared with those in the simple hypothermic group. Significantly earlier recovery of the myocardial energy metabolism during the reperfusion was also observed in the supercooled group. These results suggest that NMR will be a useful nondestructive tool to evaluate the graft hearts before transplantation, and the supercooling will be a better condition to the grafts.

УДК 577.151.04:547-426.1

*Е. Д. Розанова, Е. И. Науменко, В. А. Мусеев, О. А. Нардид,
Н. В. Репин*

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПАРАМЕТРЫ ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ В РАСТВОРЕ И В СОСТАВЕ ЛИПОСОМ: ВЛИЯНИЕ ГЛИЦЕРИНА

Методом дифференциальной спектрофотометрии и электронной микроскопии параллельно с измерением ферментативной активности изучено влияние глицерина на цитохромоксидазу в растворе и в составе липосом. Встраивание фермента в липосомы приводит к повышению его активности и появлению дополнительного температурного конформационного перехода в области 10°C , который не влияет на ферментативную активность и не изменяется при добавлении в раствор глицерина. Характер влияния глицерина на цитохромоксидазу в растворе и в составе искусственных мембран одинаков, кроме того, глицерин вызывает агрегацию липосом в растворе.

В настоящее время широко изучается влияние различных физико-химических факторов на изолированные биомакромолекулы. Вопрос о том, в какой мере можно перенести данные, полученные при изучении изолированных молекул на более сложные биологические системы, в которые они входят, пока остается открытым и требует всестороннего изучения. Целью данной работы явилось изучение структурно-функционального состояния цитохромоксидазы (КФ 1.9.3.1) в растворе и в составе искусственных мембран в присутствии глицерина, который широко применяется для изучения механизма действия ферментов в растворе, а также широко используется для низкотемпературного консервирования биологических объектов.

Цитохромоксидазу выделяли из сердца крупного рогатого скота по методу Кинга с некоторыми модификациями [6]. В качестве неионного детергента использовали твин-80. Для определения активности цитохромоксидазы использовали цитохром С производства Института биохимии АН Арм. ССР. Для получения липосом пользовались лецитином из яичного желтка производства Харьковского завода бактериальных препаратов. В работе применяли глицерин марки ХЧ, твин-80 фирмы «Мерк». Активность цитохромоксидазы измеряли спектрофотометрически [7]. Липосомы со встроенной цитохромоксидазой получали путем диализа [5]. Для характеристики структуры фермента использовали методы температурной и сольвентной дифференциальной спектрофотометрии. Спектры поглощения записывали на спектрофотометре «Пай Уникам». В ряде случаев проводили дифференцирование спектров поглощения с помощью ЭВМ. Экспозиция цитохромоксидазы в растворах глицерина перед исследованием была 20 мин. Влияние глицерина на фермент в тех случаях, когда исследовались не температурные зависимости, изучалось при 24°C . Форма и размеры липосом контролировались с помощью электронного микроскопа методом замораживания — скалывания [3].

Изучаемые в работе липосомы, согласно данным, полученным с помощью электронной микроскопии, были бислойные с диаметром ~ 1 мкм.

Прежде всего нами были изучены функциональные и структурные параметры встроеной в липосомы цитохромоксидазы, поскольку фермент в растворе был изучен ранее [4]. Активность фермента, находящегося в составе мембран, выше, чем активность цитохромоксидазы в растворе (соответственно 70 и 24 с⁻¹), что хорошо согласуется с результатами, полученными другими авторами, и объясняется более благоприятными условиями для взаимодействия с субстратом — цитохромом С.

Поскольку растворы липосом и фермента характеризуются высоким и различным по величине уровнем светорассеяния, мы сравнивали не спектры поглощения, а их первые производные, так как дифференцирование позволяет избавиться от влияния светорассеяния на спектры поглощения [1]. Структуры первых производных спектров поглощения цитохромоксидазы в растворе и в составе липосом идентичны с максимумом при 440 нм и минимумом при 406 нм.

Изучение температурных зависимостей температурных пертурбационных дифференциальных спектров (ТПДС) показало наличие двух аномалий в области 10 ÷ 12 °С и в области 20 °С (рис. 1, а), в то время как при исследовании белка в растворе наблюдалась только одна аномалия — в области 20 °С, соответствующая конформационному переходу [4]. Температурная зависимость активности фермента имеет одну область перегиба — в районе 20 °С (рис. 2, а). Таким образом, в белке, находящемся в составе искусственных мембран, в области 10 ÷ 12 °С происходят конформационные изменения, не оказывающие влияния на ферментативную активность и являющиеся результатом встраивания цитохромоксидазы в липосомы.

В присутствии глицерина наблюдаются сольвентные пертурбационные дифференциальные спектры (СПДС), структура которых практически не изменяется при встраивании цитохромоксидазы в липосомы. Изменение интенсивности СПДС при увеличении концентрации глицерина в растворе для изолированного и встроеного в липосомы белка приведено на рис. 3, из которого видно, что характер взаимодействий одинаков, однако значения концентраций глицерина, при которых наблюдается излом на концентрационной зависимости, различны. Структура СПДС при всех изученных концентрациях глицерина (0 ÷ 50 %) как для цитохромоксидазы в растворе, так и в составе липосом была одинакова, что не позволяет сделать однозначный вывод об изменении конформации белка, происходящей под действием замены растворителя. Мы предполагаем, что это нарушение линейности концентрационной зависимости СПДС связано не с изменением конформации белка, а с изменением доступности глицерина к хромофорам вследствие налипания молекул глицерина на поверхность липосом [2].

Температурные зависимости интенсивности ТПДС цитохромоксидазы при различных концентрациях глицерина различны. При концентрациях

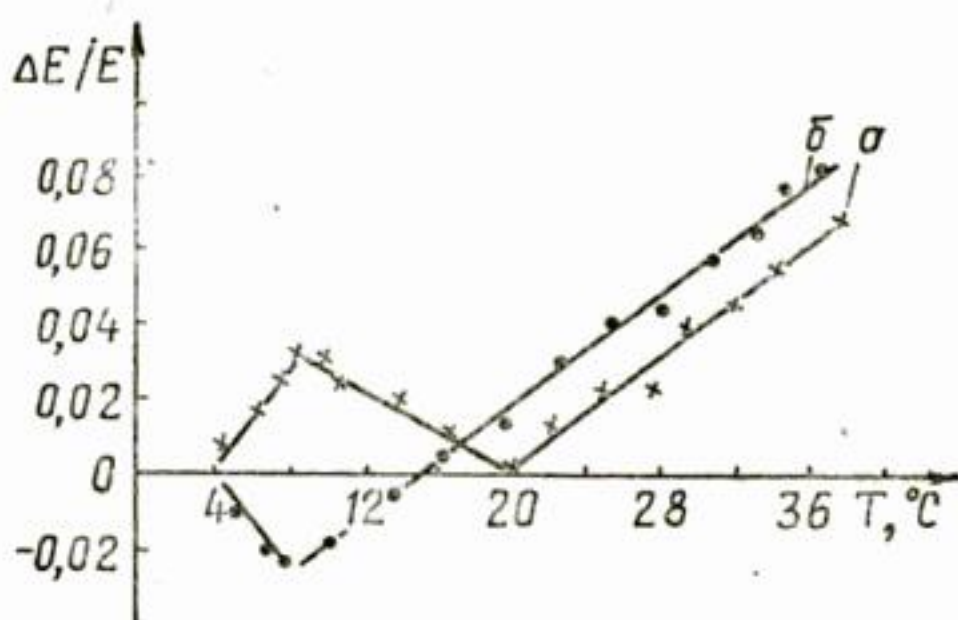


Рис. 1. Температурные зависимости интенсивности ТПДС цитохромоксидазы, встроеной в липосомы: а — контроль; б — в присутствии 40 % глицерина

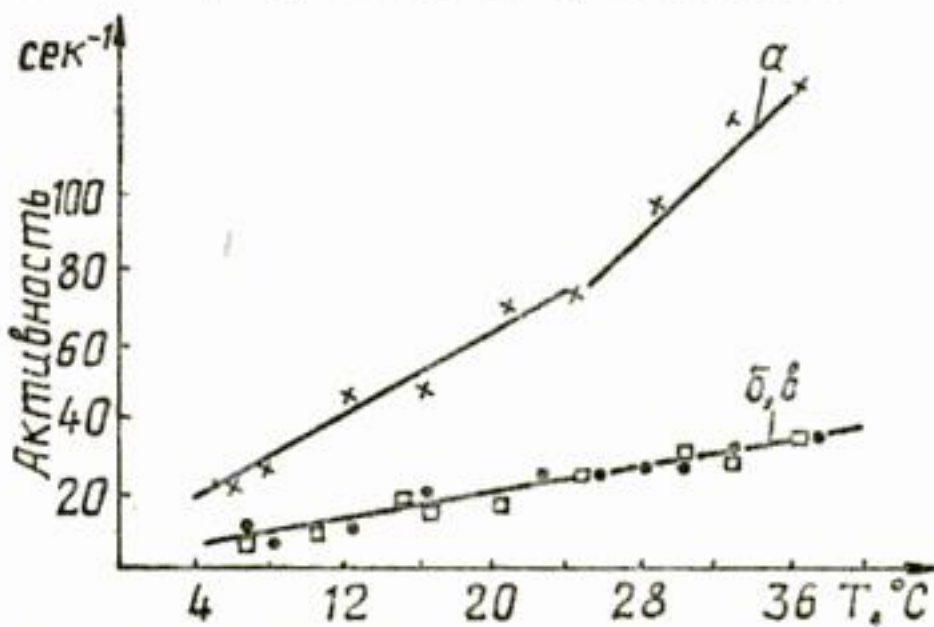


Рис. 2. Температурные зависимости активности встроеной в липосомы цитохромоксидазы: а — контроль; б — в присутствии 20 % глицерина; в — в присутствии 40 % глицерина

глицерина выше тех, при которых наблюдается излом на концентрационной зависимости интенсивности СПДС, температурная зависимость линейна в области изученных концентраций, при меньших концентрациях глицерина температурный переход сдвигается в область высоких температур. С цитохромоксидазой, встроенной в липосомы, получены аналогичные результаты. Однако излом на температурной зависимости интенсивности ТПДС в области $10 \div 12^\circ\text{C}$ оставался при всех изученных концентрациях глицерина (рис. 1,б).

Активность цитохромоксидазы, находящейся в растворе, практически не зависела от присутствия глицерина в пределах изученных концентраций.

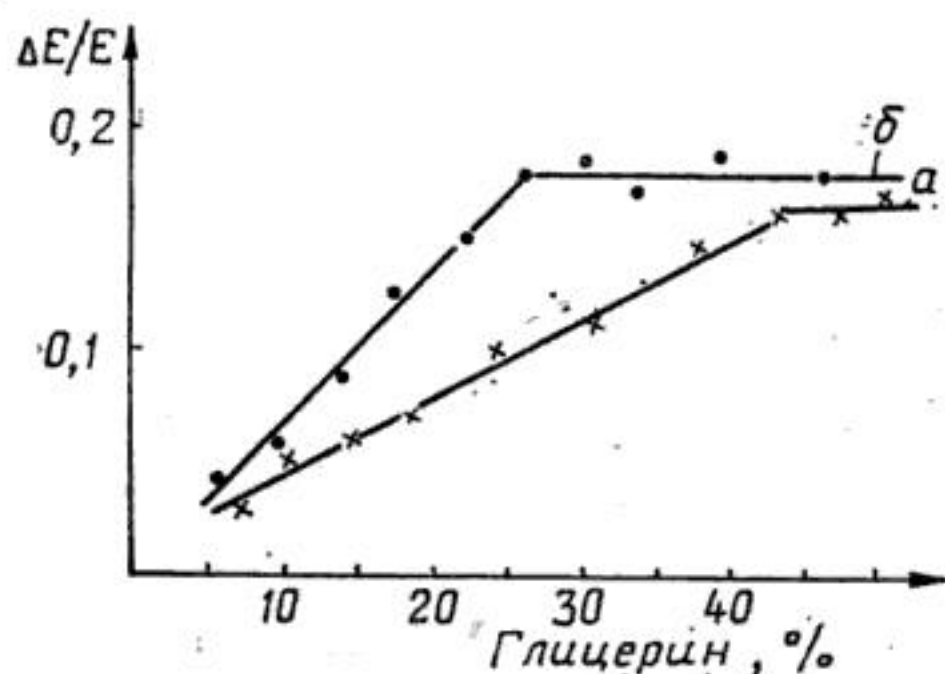


Рис. 3. Зависимость интенсивности СПДС цитохромоксидазы от концентрации глицерина: а — фермент в растворе; б — фермент в составе липосом

В то же время активность фермента, встроенного в липосомы, снижается значительно (рис. 2, б, в). При этом следует отметить, что после достижения 20 %-ной концентрации глицерина дальнейшего снижения активности не наблюдается.

Изучение липосом методом электронной микроскопии и сравнение результатов с данными, полученными по изменению светорассеяния, показало, что при увеличении концентрации глицерина до 20 % наблюдается агрегация липосом. При более высоких концентрациях дальнейших изменений не происходит.

Таким образом, показано, что встраивание цитохромоксидазы в лецитиновые липосомы приводит к появлению конформационного перехода в области $10 \div 12^\circ\text{C}$, фиксируемого на температурной зависимости ТПДС в районе полосы Соре, который, по-видимому, связан с влиянием на фермент липидного бислоя. Характер влияния глицерина на цитохромоксидазу, встроенную в липосомы и находящуюся в растворе, практически одинаков. Исключение составляет конформационный переход в области 10°C , который не изменяется в присутствии изученных концентраций глицерина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Демченко А. П. Дифференцирование спектров как метод исследования растворов белков с высоким уровнем мутности // Укр. биохим. журн. — 1979. — 51, N 1. — С. 80—83.
2. Моисеев В. А. Молекулярные механизмы криоповреждения и криозащиты белков и биологических мембран: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. — Харьков, 1985. — 46 с.
3. Репин Н. В., Скорняков Б. А. Методические особенности и техническое обеспечение электронно-микроскопического метода замораживания — скалывания // Криобиология и криомедицина. — 1982. — Вып. 10. — С. 89—92.
4. Розанова Е. Д., Моисеев В. А., Науменко Е. И. Влияние замораживания — отогрева на структуру и функцию цитохромоксидазы // Укр. биохим. журн. — 1985. — 57, N 1. — С. 61—64.
5. Kawato S., Yoshida S., Orii Y. Nanosecond time-resolved fluorescence investigation of temperature-induced conformational changes in cytochrome oxidase in phosphatidylcholine vesicles and solubilized systems // Biochim. biophys. acta. — 1981. — 634, N 1. — P. 85—92.
6. Kuboyama M., Jong F. C., King T. E. Studies on cytochrome oxidase // J. Biol. Chem. — 1972. — 247, N20. — P. 1278—1283.
7. Yonetani T., Ray G. S. Studies on cytochrome oxidase // J. Biol. Chem. — 1965. — 240, N 8. — P. 3392—3408.

Ин-т проблем криобиологии и криомедицины АН Украины, Поступила 08.04.91
г. Харьков

E. D. ROZANOVA, E. I. NAUMENKO, V. A. MOISEYEV, O. A. NARDID,
N. V. REPIN

STRUCTURE-FUNCTIONAL PARAMETERS OF CYTOCHROME OXIDASE IN SOLUTION AND AS A PART OF LIPOSOME: THE EFFECT OF GLYCEROL

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

The effect of glycerol on cytochrome oxidase in solution and in liposomes was studied by measurement of the enzyme activity and by the methods of differential spectrophotometry and electron microscopy. Incorporation of the enzyme into liposomes led to an increase in activity and appearance of an additional conformational transition near 10 C° which did not affect the enzyme activity and remained unchanged after addition of glycerol. The character of the effect of glycerol on cytochrome oxidase in solution and in artificial membranes appeared to be similar, in addition, glycerol caused the aggregation of liposomes in solution.

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

УДК 611.013.15

*В. И. Грищенко, Ф. И. Осташко, В. В. Исаченко, Е. Ф. Исаченко,
А. С. Кривохарченко, В. П. Рябых, А. Б. Сушко, И. А. Федотова*

ВИТРИФИКАЦИЯ, СВЕРХБЫСТРОЕ ЗАМОРАЖИВАНИЕ МЫШИНЫХ, КРЫСИНЫХ И КОРОВЬИХ ЭМБРИОНОВ

Эмбрионы мышей, крыс, коров были криоконсервированы с использованием проникающих криопротекторов (глицерин, 1, 2-пропандиол) и смеси глицерина с сахарозой. По всем трем группам животных наилучшие результаты по выживаемости эмбрионов получены при использовании смеси глицерина с сахарозой.

Довольно длительное время метод замораживания эмбрионов, впервые предложенный [15] и заключающийся в медленном снижении температуры объекта до и после кристаллообразования, наиболее широко используется [17]. Предпринято много удачных попыток его модернизации с целью увеличения эффективности за счет упрощения [2, 6, 13, 14, 16].

Впервые описали результаты удачного эксперимента по получению живых эмбрионов мыши после криоконсервации их путем прямого погружения в жидкий азот с криопротекторами (диметилсульфоксид, ацетамид, этиленгликоль) [8]. Описанный этими исследователями метод привлек всеобщее внимание из-за отсутствия специальных устройств, необходимых для криоконсервации эмбрионов, и, главное, из-за того, что весь процесс непосредственно замораживания чрезвычайно прост и длится несколько секунд.

В последующем описаны предпринимаемые многими исследователями удачные попытки криоконсервации этим методом эмбрионов мыши, кролика, крупного рогатого скота [1, 3, 4, 5, 9, 10, 11, 12, 13, 14]. Во всех случаях в качестве криопротекторов использовались либо только проникающие криопротекторы [9, 14], либо комплекс проникающих и непроникающих криопротекторов.

Целью наших исследований является выбор метода криоконсервации эмбрионов путем прямого погружения в жидкий азот, являющегося наиболее перспективным для дальнейшего его углубленного изучения и совершенствования.

В работе использовали мышей F₁ (СВА × С57BL). Самок подсаживали к самцам на ночь и утром проверяли наличие копуляционных пробок. День обнаружения пробки считали первым днем. Мышей умертвляли на третий

день дислокацией шейных позвонков и извлекали эмбрионы на стадии восьми клеток путем промывания яйцеводов фосфатно-солевым раствором Дюльбекко (завод «Юрвецветбиопрепарат») с 20 % фетальной коровой сыворотки (ФКС, «ФЛОУ»). Все последующие реагенты готовили на этом же растворе.

Для замораживания обычным способом эмбрионы переносили в 10 % раствор глицерина («Серва») и выдерживали в нем 20 мин при комнатной температуре. Затем эмбрионы в этом растворе помещали в пластиковые соломинки и охлаждали на программном замораживателе «Мулти-Кул» (FTC «Системс», США) со скоростью 1 °С мин до -7 °С, вызывали кристаллизацию и затем охлаждали со скоростью 0,3 °С/мин до температуры -37 °С, после чего переносили в жидкий азот.

В первой серии опытов сверхбыстрое замораживание осуществляли по разным схемам:

I группа. Соломинку заполняли смесью криопротекторов, состоящей из 30 % глицерина и 70 % 1М сахарозы («Серва»). Тонкой пипеткой в эту соломинку переносили эмбрионы, выдерживали при комнатной температуре 1,5 мин и погружали в жидкий азот.

II группа. Соломинку заполняли той же смесью криопротекторов, но после помещения в нее эмбрионов выдерживали при комнатной температуре 3 мин.

III группа. Эмбрионы переносили в 10 %-ный раствор глицерина и выдерживали при комнатной температуре 10 мин. Затем эмбрионы переносили в соломинку, содержащую такую же смесь глицерина и сахарозы, как и в предыдущих группах. После выдерживания при комнатной температуре 1,5 мин соломинку погружали в жидкий азот. Эмбрионы во второй серии опытов криоконсервировали [4] с 10-минутной эквilibрацией в растворе, состоящем из 10 % глицерина и 20 % пропандиола, последующим переносом в витрифицируемый раствор (25 % глицерина + 25 % пропандиола) и немедленным погружением в жидкий азот.

После сверхбыстрого замораживания в первых двух сериях опытов соломинки оттаивали в водяной бане при 37 °С. После извлечения из соломинок эмбрионы помещали в 0,5 М сахарозу на 10 мин, а затем отмывали в четырех сменах фосфатно-солевого раствора Дюльбекко с 20 % ФКС и ставили на культивирование.

После замораживания путем витрификации эмбрионы оттаивали в водяной бане при 20 °С. Выдерживали в 1М растворе сахарозы 5 мин, отмывали в четырех сменах раствора Дюльбекко с 20 % ФКС и культивировали.

Эмбрионы культивировали в среде Хэма F-10 («Серва») с 20 % ФКС в атмосфере 5 % CO₂; 5 % O₂ и 90 % N₂ в течение 48 ч. Развивавшимися считали только эмбрионы, достигшие стадии поздней вылупляющейся или вылупившейся бластоцисты.

Сто одиннадцать обычно овулировавших крыс линии Вистар забили вечером четвертого дня (первый — день спаривания). Рога матки были промыты фосфатно-солевым буфером, ФСБ СССР) с помощью инъекционного шприца. Было получено 852 эмбриона в стадии морула или компактная морула. В конце опыта остался 741 эмбрион, остальные эмбрионы были утеряны при манипуляциях с ними, особенно на первых стадиях работы. После обнаружения эмбрионы до замораживания поместили в чашку Петри (производство СССР) с 20% сывороткой новорожденного теленка (СНТ, «Серва») на ФБС и разделили на 5 групп. Эмбрионы I группы ($n = 218$) криоконсервировали [4] следующим образом. Эмбрионы с минимально возможным объемом питательной среды переносили в каплю эквilibрирующего раствора, состоящего из 10 % глицерина («Серва») и 20 % пропиленгликоля («Сигма») на ФСБ + 20 % СНТ, выдержали в этом растворе при комнатной температуре 10 мин. После эквilibрации эмбрионы с помощью пипетки, конец которой был истончен до размеров внутреннего диаметра 90—100 мкм, с минимально возможным объемом эквilibрирующего рас-

твора поместили в пластиковую соломинку (0,25 мл, Канада), содержащую предварительно охлажденную до 4 °С витрифицируемую среду (25 % глицерина и 25 % пропиленгликоля на ФСБ + 20 % СНТ). Соломки закрыли полимерными пробками и погрузили в жидкий азот. От момента введения эмбриона в витрифицируемую среду до погружения в жидкий азот прошло не более 10 с. Оттаивание витрифицированных эмбрионов I группы проводилось в водяной бане при 20 °С в течение 5 с. Во избежание «выстреливания» полимерной пробки от закипания азота, попавшего в соломинку, полимерная пробка извлекалась из соломинки непосредственно в момент опускания последней в водяную баню. После этого в течение 3—4 с с поверхности соломинки удалялась влага, ножницами отсекалась поливинило-воспиртовая пробка и эмбрионы выдувались в чашку Петри с 0,75 М сахарозой на ФСБ + 20 % СНТ. После 10-минутной экспозиции в этом растворе эмбрионы переносились в питательную среду (ФСБ + 20 % СНТ), будучи предварительно 5 раз отмытыми в ней.

Витрификацию эмбрионов II группы ($n = 94$) проводили в соответствии с вышеописанным режимом за исключением того, что оттаивание проводили при 4 °С.

Эмбрионы III группы ($n = 76$) были заморожены [9] следующим образом. Эмбрионы с минимально возможным объемом питательной среды перенесли на 10 мин в каплю эквilibрирующего раствора, состоящего из 10 % глицерина на ФСБ + 20 % СНТ, затем поместили с использованием описанного выше приема на 1,5 мин в соломинку с замораживаемой средой (30 % глицерина + 50 % 2М сахарозы («Серва») + 20 % СНТ) и погрузили в жидкий азот. Оттаивание таких замороженных сверхбыстрым способом эмбрионов проводили в водяной бане при 37 °С в течение 5 с. После осушения соломинки салфеткой и отсечения пробки эмбрионы выдували в чашку Петри с 0,5 М сахарозой на ФСБ с 20% СНТ, где в течение 10 мин проходило выведение криопротектора. Затем эмбрионы переносились в питательную среду (ФСБ + 20 % СНТ), будучи предварительно 5 раз отмытыми в ней.

При криоконсервации эмбрионов сверхбыстрым замораживанием все манипуляции с эмбрионами проводили при комнатной температуре.

Криоконсервация сверхбыстрым методом эмбрионов IV группы ($n = 321$) отличается от описанной выше криоконсервации сверхбыстрым методом эмбрионов III группы тем, что вторая (замораживаемая) среда содержала 30 % глицерина и 70 % 1М сахарозы на ФСБ + 20 % СНТ. Свежие эмбрионы V группы ($n = 32$) служили контролем.

Все деконсервированные (опытные) и свежие (контрольные) эмбрионы в чашках Петри (ФСБ + 20 % СНТ + антибиотик) поместили на 20—24 ч при 37 °С во влажную камеру.

Параллельно с описываемыми экспериментами был проведен опыт по изучению влияния лактозы на эмбрионы с целью изучения возможности замены ею сахарозы в составе замораживаемой среды. Полученные свежие эмбрионы выдержали в 0,5 М сахарозе (СССР, $n = 18$) и 0,5 М лактозе ($n = 51$) на протяжении 15 мин, отмыли 5 раз в питательной среде (ФСБ + 20 % СНТ + антибиотик) и поставили на культивирование во влажную камеру при 37 °С.

Во всех экспериментах развившимися считали эмбрионы, достигшие стадии экспандированной бластоцисты.

От 5 суперовулировавших доноров молочных пород был получен 41 эмбрион. Первую часть эмбрионов ($n = 27$) криоконсервировали [4] в соответствии с режимом крысиных эмбрионов I группы.

Вторую часть эмбрионов ($n = 14$) заморозили по [9] в соответствии с вышеописанным режимом для крысиных эмбрионов III группы.

Оттаивание витрифицированных и замороженных эмбрионов, выведение криопротектора также проводили в соответствии с вышеописанными аналогичными режимами для крысиных эмбрионов I и III групп.

Пересадки всех опытных эмбрионов осуществили телкам-реципиентам на протяжении 3-х дней с соблюдением принципа групп-аналогов. Приживляемость эмбрионов определялась после установления 2-месячной стельности реципиентов.

Отмечаем практически полную морфологическую сохранность как витрифицированных, так и замороженных эмбрионов мыши, крысы и крупного рогатого скота после деконсервации.

Низкую эффективность, неприемлемую для практического животноводства, продемонстрировал метод витрификации эмбрионов с использованием проникающих криопротекторов (табл. 1).

После деконсервации и культивирования мышинных эмбрионов, криоконсервированных с использованием витрификации, установлено, что из 79 деконсервированных эмбрионов продолжили свое развитие лишь 3 (3,8 %).

Наилучшие результаты получены при сверхбыстром замораживании мышинных и крысиных эмбрионов с использованием смеси проникающих и непроникающих криопротекторов, в частности 30 % глицерина с 0,7 М сахарозой (табл. 1, 2).

Таблица 1

Развитие витрифицированных и замороженных сверхбыстрым методом эмбрионов крыс после деконсервации

Группа	Количество замороженных эмбрионов, шт.	Количество развивающихся после оттаивания эмбрионов	
		шт.	%, $M \pm m$
I	218	16	$7,3 \pm 2,0^1$
II	94	11	$11,7 \pm 1,2^2$
III	76	43	$56,6 \pm 5,7^3$
IV	321	273	$85,0 \pm 2,1^4$
V	32	30	$93,8 \pm 3,2^5$

$P_{4-5} < 0,05$; $P_{1-2} < 0,01$; $P_{3-4} < 0,001$.

Таблица 2

Сверхбыстрое замораживание 8-клеточных мышинных эмбрионов в смеси с 30 % глицерина и 0,7 М сахарозы

Проводка в криопротекторе	Время в концентрированном растворе, мин	Количество эмбрионов, шт.	Количество blastocyst, шт.	Развившихся эмбрионов, %, $M \pm m$
—	1,5	20	4/20	$20 \pm 9,1$
—	3	23	7/23	$30,4 \pm 9,8^1$
10 мин в 10 % глицерине	1,5	58	51/58	$87,9 \pm 4,3^2$
Контроль		47	40/47	$85,1 \pm 5,2^3$

$P_{1-2} < 0,001$; $P_{2-3} > 0,1$.

Необходимо отметить, что у 52 % витрифицированных эмбрионов крысы, не достигших стадии экспандированной blastocyst, после деконсервации наблюдалось проявление жизнедеятельности: дробление отдельных blastomeres.

После экспозиции крысиных эмбрионов в растворах лактозы и сахарозы было выявлено, что после пребывания в сахарозе продолжили свое развитие практически все эмбрионы (94,4 %), а после пребывания в лактозе лишь 62,7 %. Это является косвенным подтверждением выводов некоторых исследователей об эффективности использования в качестве непроникающих криопротекторов из дисахаров лишь сахарозы и трегалозы.

Приживляемость витрифицированных коровьих эмбрионов составила 0 шт., приживляемость эмбрионов, замороженных сверхбыстрым способом, составила 4 шт. ($21,4 \pm 12,7$ %), $P < 0,1$.

Таким образом, считаем целесообразным на данном этапе изучения вопроса криоконсервации эмбрионов путем прямого погружения в жидкий азот усилия сосредоточить на использовании криопротективных сред, состоящих из комплекса проникающих и непроникающих криопротекторов.

Поскольку при криоконсервации эмбрионов прямым погружением в жидкий азот с использованием проникающих и непроникающих кристаллообразующих и других криопротекторов в оптимальных концентрациях

не образуются кристаллы, а содержимое контейнера переходит из жидкого в твердое состояние и наоборот, без изменения прозрачности, мы такую криоконсервацию назвали «витрификацией». При образовании кристаллов в процессе криоконсервации (например, при деконсервации) нами использован термин «сверхбыстрое замораживание». Необходимо отметить, что такое деление методов криоконсервации эмбрионов на витрификацию и сверхбыстрое замораживание весьма условно по двум причинам. Во-первых, ультраструктурный анализ строения застывшего раствора кристалл-необразующих криопротекторов демонстрирует наличие частично упорядоченного расположения атомов, характер которого свойственен кристаллам [7]. Во-вторых, при погружении в жидкий азот контейнера со смесью растворов проникающих и непроникающих криопротекторов переход смеси из жидкого в твердое состояние происходит без визуально определяемого изменения прозрачности; при оттаивании среды образуются кристаллы. В описываемых нами экспериментах эти мелкие кристаллы придавали образцу интенсивный молочно-белый цвет. Именно с учетом визуально наблюдаемого изменения прозрачности оттаиваемой среды методы криоконсервации эмбрионов путем прямого погружения в жидкий азот были нами разделены на «витрификацию» и «сверхбыстрое замораживание».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kasai M., Komi J. H., Takakamo A. et al. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability // J. Reprod. Fert.—1990.—89, N 1.—P. 91—97.
2. Kasai M., Niwa K., Iritani A. Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly // J. Reprod. Fert.—1980.—59, N 1.—P. 51—56.
3. Kobayashi K., Nagashima H., Yamakawa H. et al. The survival of whole and bisected rabbit morulae after cryopreservation by the vitrification method // Theriogenology.—1990.—33, N 4.—P. 777—788.
4. Massip A., Van der Zwalm P., Ectors F. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos // Theriogenology.—1987.—27, N 1.—P. 69—70.
5. Massip A., Van der Zwalm P., Scheffen B., Ectors F. Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification // Cryo-Lett.—1986.—7.—P. 270—273.
6. Miyamoto H., Ishibashi T. Liquid nitrogen vapor freezing of mouse embryo // J. Reprod. Fert.—1986.—78, N 2.—P. 471—478.
7. Rall W. F. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification // Cryobiology.—1987.—24, N 3.—P. 387—402.
8. Rall W. F., Fahy G. M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification // Nature (London).—1985.—313.—P. 573—575.
9. Riha J., Landa V. Postury vitrificace embryi skotu a jejich prezivani po kultivaci in vitro / Zivoc. vyroba.—1989.—34, N 6.—P. 1057—1062.
10. Scheffen B., Van der Zwalm P., Massip A. A simple and efficient procedure for preservation of mouse embryos by vitrification // Cryo-Lett.—1986.—7.—P. 260—269.
11. Smorag Z., Gajda B., Wiczorek B., Jura J. Stage-dependent viability of vitrified rabbit embryos // Theriogenology.—1989.—31, N 6.—P. 1227—1231.
12. Szell A., Shelton J. N. Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos // J. Reprod. Fert.—1986.—78, N 2.—P. 699—703.
13. Szell A., Shelton J. N. Sucrose dilution of glycerol from mouse embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapor // J. Reprod. Fert.—1986.—76, N 2.—P. 401—408.
14. Trounson A., Peura A., Kirby C. Ultrarapid freezing: a new low-cost and effective method of embryo cryopreservation // Fert. Steril.—1987.—48, N 3.—P. 843—850.
15. Whittingham D. G., Leibo S. P., Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C // Science.—1972.—178, N 27.—P. 411—414.
16. Wood M. J., Farrant J. Preservation of mouse embryos by two-step freezing // Cryobiology.—1980.—17, N 2.—P. 178—180.
17. Wood M. J., Whittingham D. G., Rall W. F. The low temperature preservation of mouse oocytes and embryos // Mammalian Development — A Practical Approach.—Ed. M. Monk.—Oxford: IRL Press, 1987.—P. 255—280.

Ин-т проблем криобиологии и
криомедицины АН Украины,
г. Харьков;
Укр. НИИ животноводства, г. Харьков;
ВНИИ физиологии, биохимии и
питания сельскохозяйственных
животных, г. Боровск

Поступила 09.07.91

V. I. GRISHCHENKO, F. I. OSTASHKO, V. V. ISACHENKO, E. F. ISACHENKO,
A. S. KRIVOKHARCHENKO, V. P. RYABYKH, A. B. SUSHKO, I. A. FEDO-
TOVA

VITRIFICATION, ULTRARAPID FREEZING OF MOUSE, RAT AND CATTLE EMBRYOS

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the Ukrainian
Academy of Sciences, Kharkov;

Ukrainian Research Institute For Animal Breeding, Kharkov;

All-Union Research Institute for Physiology, Biochemistry and Nutrition
of Farm Animals, Borovsk

Mouse, rat and cattle embryos were subject to cryopreservation with permeable cryoprotectants (glycerol, 1,2-propane diol) or with a' glycerol-sucrose mixture. The best viability was observed in embryos frozen under protection of the glycerol-sucrose mixture.

УДК 57.043

В. И. Кирпатовский, Ю. В. Кудрявцев, В. Н. Буров

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ ПОЧКИ КРОЛИКА

В опытах на 21 кролике производили криоконсервацию почки при -20 или -70°C под защитой 15 % ДМСО. После пересадки почек, консервированных при -70°C , кровоток в них не восстанавливался вследствие блока микроциркуляции, а после замораживания до -20°C отмечали удовлетворительное восстановление кровоснабжения с отдельными участками неадекватной перфузии. Гистологически через 1 ч после пересадки выявляли умеренное повреждение клубочков и канальцев и выраженные нарушения микроциркуляции. В опытах с добавлением α -токоферола в перфузат изменения были менее значительными. Делается вывод о высокой криочувствительности микроциркуляторного русла почек, что может быть одним из главных факторов потери жизнеспособности пересаженной криоконсервированной почки.

Несмотря на существенные успехи в области криоконсервации клеточных суспензий и некоторых тканей человека и млекопитающих, криоконсервация органов до настоящего времени остается лишь заманчивой перспективой [3, 10]. Основные трудности криобиологического плана связаны с гетерогенностью строения органов и высоким отношением массы к поверхности. В связи с этим возникают проблемы подбора режима криоконсервации, оптимального для разных клеток, входящих в состав органа, адекватности доставки криопротектора ко всем клеткам и его удаления, обеспечения равномерности замораживания и отогрева всего объема органа в оптимальном режиме и др. [11, 17].

В ранее проведенных исследованиях на почках крыс [2, 4] нами были подобраны оптимальные условия криоконсервации, способствующие сохранению жизнеспособности клеток органа, подвергнутого криоконсервации при -50°C . Целью данного исследования явилась оценка приемлемости выбранных условий и режимов криоконсервации применительно к более крупному по размерам органу — почке кролика, а также оценка состояния криоконсервированной почки после ее пересадки реципиенту.

Опыты проведены на 21 половозрелом кролике породы «Шиншилла» массой 3—4 кг. Стандартная схема эксперимента заключалась в следующем. Под гексеналовым наркозом обнажали левую почку. После новокаиновой блокады выделяли почечную артерию, вену и мочеточник. Внутривенно вводили 10 мл 15 % маннитола и 10 мг лазикса. На фоне форсированного диуреза удаляли почку, промывали ее охлажденным до $8 \div 10^{\circ}\text{C}$ раствором Евроколлинза и подключали к перфузионной установке. Перфузию проводили под постоянным давлением 50—55 мм рт. ст., создаваемого стол-

бом перфузата высотой ~ 70 см, при непрерывной рециркуляции перфузата для тщательного перемешивания добавляемого в перфузат криопротектора. Схема установки представлена на рис. 1.

Почку перфузировали раствором НИИТиО-2 с добавлением 2 % альбумина (состав представлен в табл. 1) при температуре $8 \div 10^\circ\text{C}$ и постоянной оксигенацией перфузата ($p\text{O}_2$ — 450—550 мм рт. ст.). В раствор постепенно добавляли криопротектор диметилсульфоксид (ДМСО), повышая его концентрацию в течение 35—40 мин до 15 %, после чего перфузию продолжали еще 30 мин. Затем почку помещали в полиэтиленовый пакет и охлаждали в камере программного замораживателя ЗПБ 01 со скоростью $1 \div 2^\circ\text{C}/\text{мин}$ до -20 или -70°C . После хранения в течение 1—4 дней почку отогревали на установке для микроволнового нагрева «Электроника-502», адаптированной для СВЧ-нагрева замороженных биологических объектов. Частота генерируемого электромагнитного поля — 2450 МГц. Время нагрева от -20°C до $0 \div 5^\circ\text{C}$ составляло 1—1,5 мин, а от -70°C — 3—4 мин. После отогрева почку вновь подключали к стендовой установке и перфузировали раствором для отмывания криопротектора (таблица) при $8 \div 10^\circ\text{C}$, постепенно замещая этот раствор раствором НИИТиО-2 в течение 60—70 мин. Этим раствором перфузировали еще 30 мин для практически полного удаления ДМСО, что контролировали по осмолярности оттекающего от почки перфузата.

Для повышения эффективности криозащиты использовали 2 варианта дополнительного фармакологического воздействия. В 1-й серии животным за 24 и 3 ч до опыта внутримышечно вводили α -токоферола ацетат в виде 30 %-ного масляного раствора в дозе соответственно 200 и 50 мг/кг. Во 2-й серии α -токоферола ацетат добавляли в виде эмульсии в перфузионный раствор в процессе насыщения почки криопротектором до концентрации 200—225 мг % и в раствор для отмывания почки от ДМСО в концентрации 75—80 мг %.

Состояние почек в процессе перфузии до и после криоконсервации оценивали по динамике объемной скорости перфузии, диурезу и потреблению почкой кислорода, которое рассчитывали по артерио-венозной разнице $p\text{O}_2$ перфузата и объемной скорости перфузии.

После завершения перфузии в 6 экспериментах произвели аутотрансплантацию почки кролику-реципиенту. В 1-й серии пересадили 2 почки, криоконсервированные при -70°C , и 2 почки, криоконсервированные при -20°C , а во 2-й серии — 2 поч-

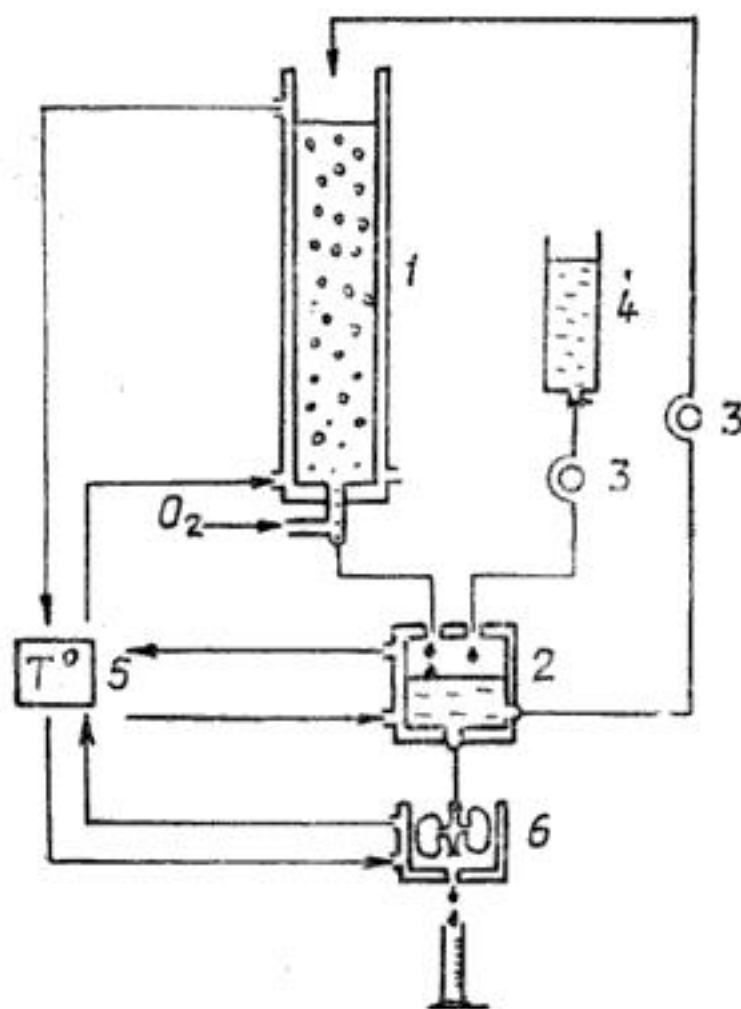


Рис. 1. Схема установки для перфузии почки кролика. Условные обозначения: 1 — оксигенатор с перфузатом; 2 — камера для смешивания перфузата с криопротектором; 3 — насос; 4 — резервуар для криопротектора; 5 — термостатирующая система; 6 — камера с перфузируемой почкой

Состав растворов, используемых при криоконсервации почек (г/л)

Ингредиенты	Раствор НИИТиО-2	Криозащитный раствор	Отмывочный раствор
Фосфат калия однозамещенный	3,80	3,80	3,80
Фосфат калия двухзамещенный	1,02	1,02	1,02
Натрия бикарбонат	0,84	0,84	0,84
Натрия цитрат	0,30	0,30	0,30
Натрия сукцинат	0,50	0,50	0,50
Маннит	38,0	38,0	88,0
Альбумин сыворотки крови человека	—	20,0	—
Диметилсульфоксид	—	150,0	50,0

ки, замороженные до -20°C . Пересадку производили в ортотопическую позицию с наложением анастомозов артерии, вены и мочеточника по типу «конец-в-конец». Анастомозы выполняли с использованием оптического увеличения (операционный микроскоп «Оптон ОРМ-1») и микрохирургической техники атрауматической нитью 8/0—9/0 «Пролен» или «Этилон». После завершения пересадки отмечали характер восстановления кровотока в органе и через 1 ч почку удаляли для гистологического исследования, которое выполняли по стандартной методике с окрашиванием срезов гематоксилином — эозином.

Статистическую обработку результатов проводили по методу Стьюдента.

Из данных, представленных на рис. 2, А, видно, что в 1-й серии опытов в период насыщения почки ДМСО объемная скорость перфузии остается на повышенных значениях. После криоконсервации при -20 или -70°C

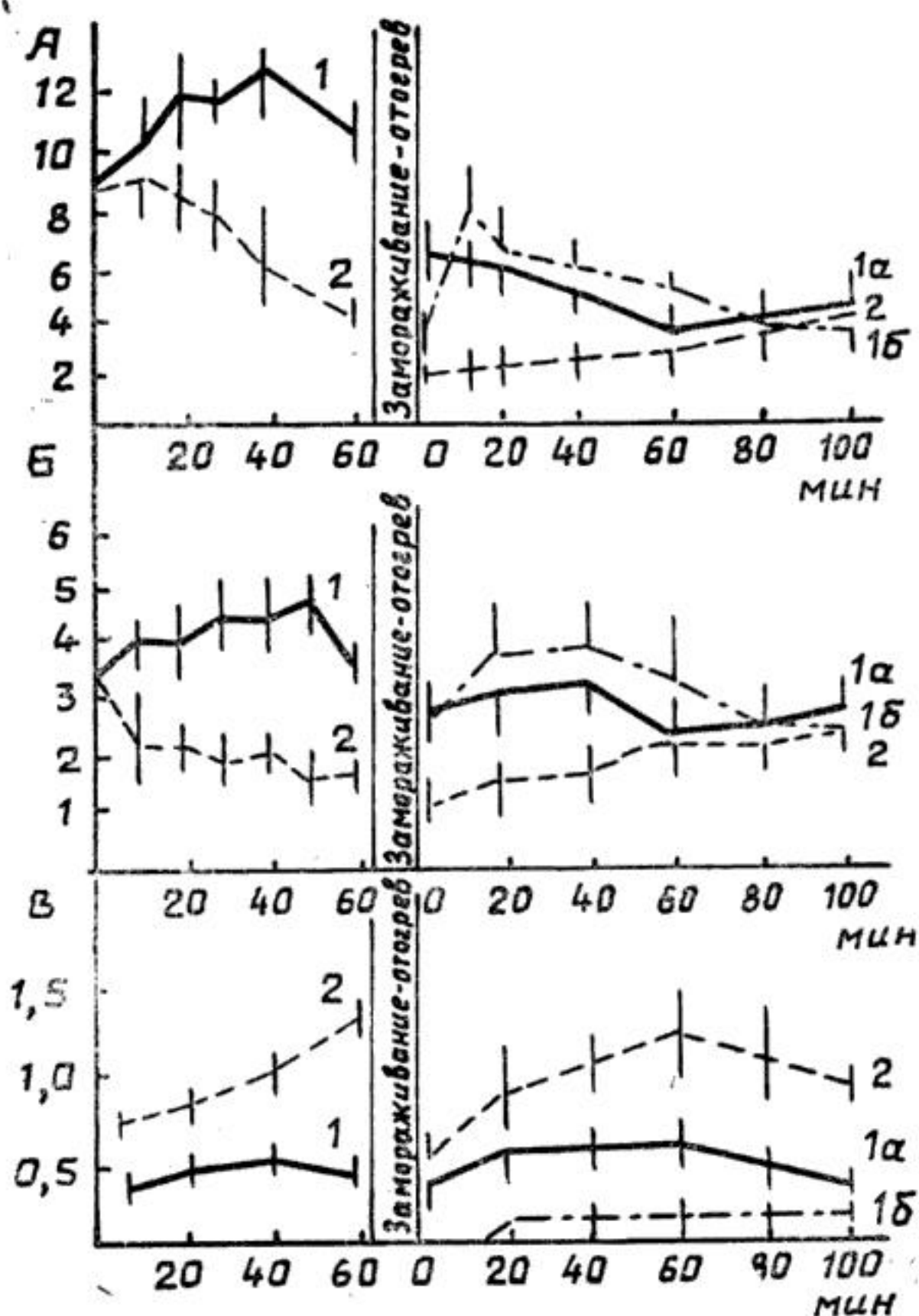


Рис. 2. Динамика объемной скорости перфузии (А), потребления кислорода (Б) и диуреза (В) при подготовке почки к замораживанию и после криоконсервации. Условные обозначения: 1 — серия опытов с предварительным введением α -токоферола; 2 — серия опытов с введением α -токоферола в перфузат; α — замораживание до -20°C ; β — замораживание до -70°C

динамика объемной скорости перфузата была примерно одинаковой: поток перфузии прогрессивно снижался, достигая к концу периода отмывания 50—55 % от нормальных значений, и 32—37 % от значений до замораживания. Во 2-й серии в период насыщения ДМСО объемная скорость перфузии постепенно снижалась. Сразу после отогрева она была исходно низкой, но к концу периода отмывания от криопротектора повышалась до 52 % от нормы и 98 % от значений до консервации.

Потребление почкой кислорода в период насыщения криопротектором в 1-й серии прогрессивно возрастало, а во 2-й серии быстро снижалось почти в 2 раза и оставалось стабильным на этом уровне (рис. 2, Б). После криоконсервации в 1-й серии в начальный период отмывания от ДМСО потребле-

ние кислорода было достоверно выше, чем во 2-й серии, но к концу этого периода разница между группами исчезала. В 1-й серии значения потребления кислорода консервированной почкой в конце опыта составили 82—88 % по сравнению с значениями, характерными для интактных почек, и 72—77 % по сравнению со значениями до замораживания. Во 2-й серии эти цифры составили соответственно 62 и 131 %. Глубина замораживания существенно не влияла на динамику потребления кислорода криоконсервированным органом.

Величина диуреза в опытах 1-й серии была достоверно ниже, чем во 2-й серии как до, так и после криоконсервации (рис. 2, В). При этом в 1-й серии после замораживания до -70°C диурез практически отсутствовал, а после замораживания до -20°C был такой же, как и до замораживания. Во 2-й серии диурез после отогрева почки постепенно возрастал по мере выведения криопротектора, а затем стабилизировался на уровне контрольных значений.

Анализ этих результатов позволил сделать следующие выводы.

1. Использование в качестве криопротектора ДМСО позволяет решить проблему резкого повышения сосудистого сопротивления почки, подвергнутой криоконсервации под защитой глицерина, что отмечалось в других работах [11, 12, 13]. В наших опытах поток перфузии после замораживания — отогрева снижался не более, чем в 2 раза, находясь при этом в пределах физиологически допустимых значений и обеспечивая достаточно адекватную перфузию для удаления ДМСО и доставки клеткам кислорода и субстратов окисления.

Резкого повышения сосудистого сопротивления криоконсервированной почки можно избежать, используя в качестве криопротектора пропиленгликоль [15]. Однако, по имеющимся данным [7], он менее эффективен для защиты клеток почки от криоповреждения, чем ДМСО.

2. После криоконсервации сохраняется достаточно высокая метаболическая активность в ткани почки. Потребление кислорода, хотя и сниженное по сравнению со значениями, полученными сразу после удаления почки из организма, находилось в пределах, определенных многими авторами при гипотермической консервации почек в аналогичных температурных условиях ($6 \div 10^{\circ}\text{C}$): полученные этими авторами значения колебались от 1,01 до 2,6 мкл/мин/г [1, 5, 8, 14], а в наших опытах они составляли 2,9—3,1 мкл/мин/г в 1-й серии и 2,3 мкл/мин/г во 2-й серии. То есть, значения потребления кислорода криоконсервированной почкой в 1-й и 2-й сериях не выходят за пределы нормальных значений для той температуры, при которой проводилась перфузия органа.

3. Более глубокое замораживание, не влияя на объемную скорость перфузии и потребление кислорода, неблагоприятно действовало на фильтрационный аппарат почки, значительно уменьшая диурез.

4. Дополнительная антиоксидантная защита от низкотемпературного повреждения, проводимая в виде добавления α -токоферола непосредственно в перфузат в виде эмульсии, видимо, более эффективна, чем заблаговременное введение α -токоферола в организм животного, что проявлялось в прогрессивном восстановлении показателей объемной скорости перфузии и потребления кислорода, а также достоверно более высоким диурезом в опытах 2-й серии.

Поскольку окончательное заключение о состоянии криоконсервированного органа можно сделать лишь после восстановления нормотермических условий и кровообращения в органе, произвели пересадку криоконсервированных почек реципиенту.

При пересадке почек, консервированных при -70°C , после снятия сосудистых зажимов орган быстро заполнялся кровью, но несмотря на полную проходимость магистральных сосудов почки, она приобретала синюшный цвет. В течение 30 мин наблюдения состояние не изменялось, тургор органа был значительно снижен. Отмечали отслоение почечной капсулы

и скопление крови в субкапсулярном пространстве. При рассечении паренхимы почки кровоточили лишь крупные внутриорганные сосуды.

После пересадки почек, консервированных при -20°C , после снятия сосудистых зажимов орган быстро заполнялся кровью и через 3—5 мин приобретал нормальный розовый цвет почти по всей поверхности. Оставались лишь отдельные участки, имеющие цианотичную окраску.

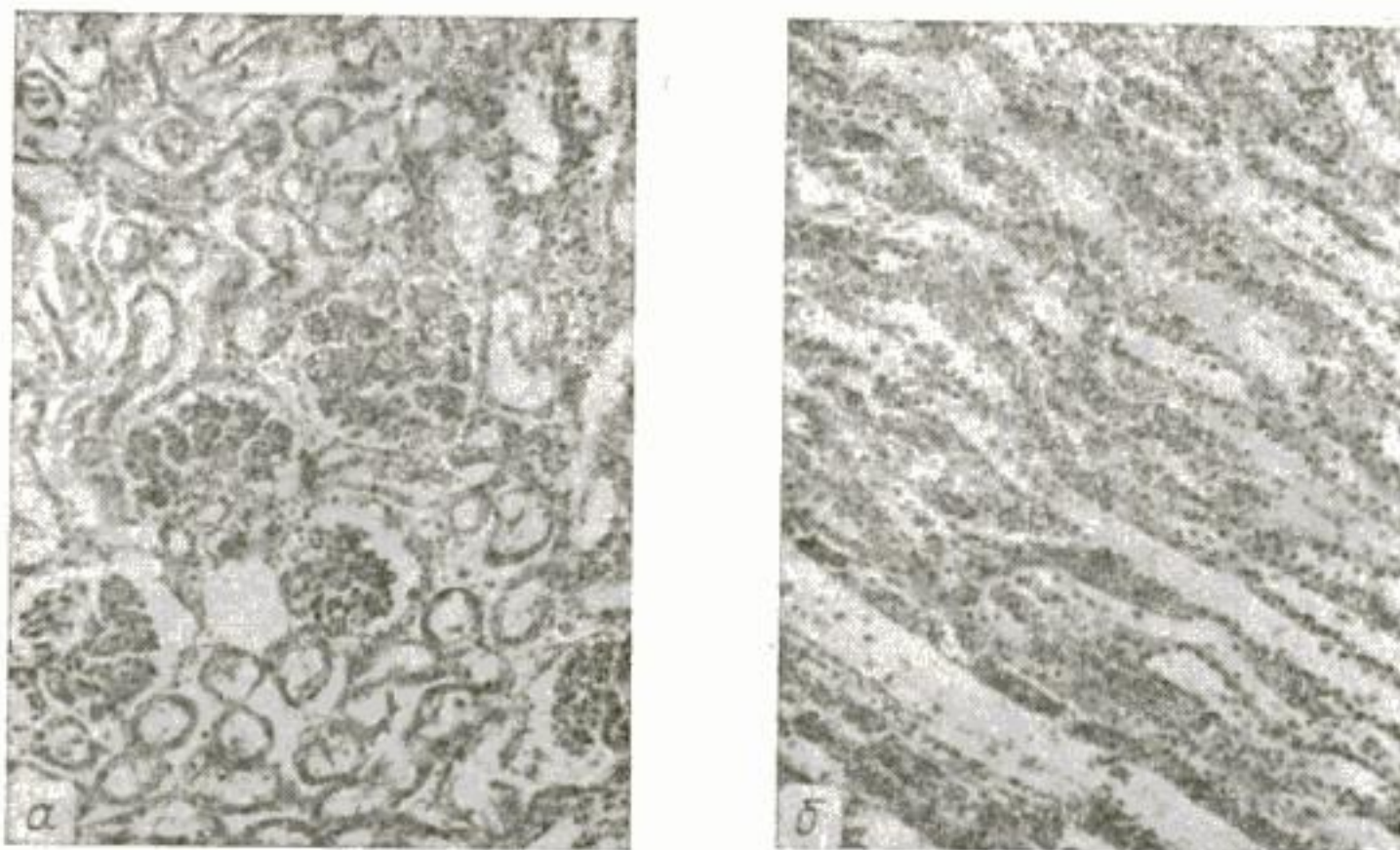


Рис. 3. Гистологические изменения в почках, пересаженных после криоконсервации при -20°C с предварительным введением α -токоферола; а — корковое вещество; б — мозговое вещество. Окраска гематоксилином-эозином. Ув. 200 $\times$

Гистологическое исследование почек 1-й серии, консервированных при -20°C выявило удовлетворительную сохранность канальцевого аппарата почки. Ядра эпителия канальцев хорошо окрашивались и были типично расположены. Выявлялась умеренно выраженная гидропическая дистрофия эпителиоцитов, а также значительный интерстициальный отек. Обращали на себя внимание выраженные нарушения микроциркуляторного русла почек. Капилляры клубочков были резко расширены, также как и перитубулярные капилляры. Их просвет был забит эритроцитами. Во многих клубочках выявлялись эритроциты в полости капсулы Шумлянського — Боумена. Местами выявляли экстравазацию форменных элементов крови и диапедезные кровоизлияния (рис. 3, а, б).

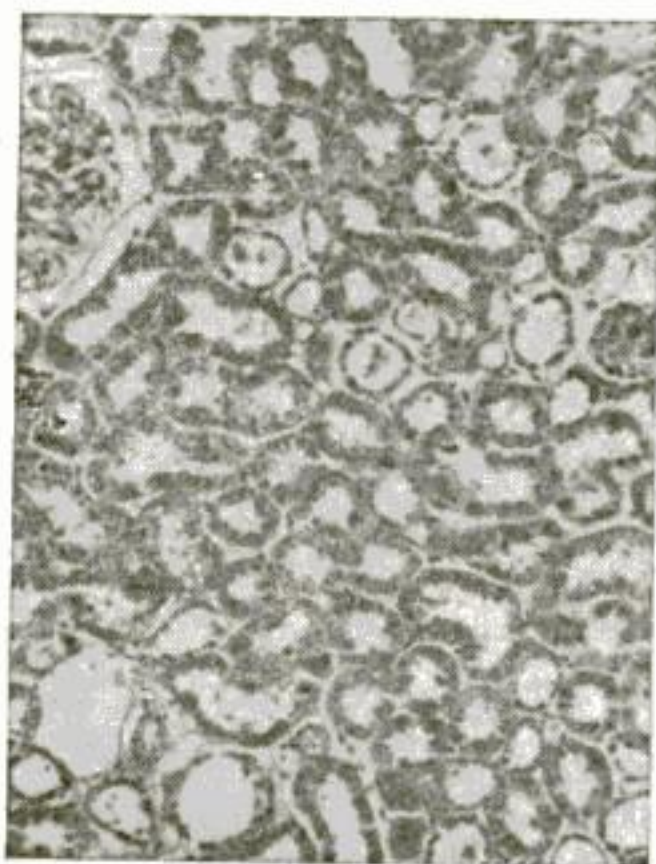


Рис. 4. Гистологическая картина относительно сохранного участка почки, пересаженной после криоконсервации при -20°C с введением α -токоферола в перфузат. Окраска гематоксилином-эозином. Ув. 200 $\times$

Во 2-й серии опытов сохранность эпителия почечных канальцев в целом была примерно такой же, как в опытах 1-й серии, но в отдельных участках канальцы и клубочки выглядели малоизмененными (рис. 4). Выраженность нарушений в микроциркуляторном русле была существенно меньше. Полнокровные клубочки обнаруживались преимущественно в юкстамедуллярной зоне, а большинство клубочков имели нормальное кровенаполнение. Полнокровие перитубулярных капилляров носило очаговый характер. Диапедезные кровоизлияния практически не встречались.

Опыты с пересадкой криоконсервированных почек подтвердили, что использованная схема криоконсервации обеспечивает достаточно надежную защиту нефрона от низкотемпературного повреждения, но слабо защищает

микроциркуляторное сосудистое русло. В соответствии с этим причиной потери функциональной активности криоконсервированных почек, видимо, является не столько деструкция канальцевого или клубочкового аппарата почки, сколько вторичные ишемические расстройства вследствие неадекватного капиллярного кровотока из-за паралитического расширения капилляров и агрегации в них форменных элементов крови. Косвенным подтверждением этого является тот факт, что функциональное состояние почек, перенесших криоконсервацию при $-10 \div 20^\circ\text{C}$ под защитой 3 М ДМСО, оцененное путем нормотермической перфузии на стендовой установке белково-солевым раствором, не содержащим крови, нарушалось незначительно: клиренс креатинина сохранялся на нормальном уровне, а реабсорбция натрия и глюкозы снижалась соответственно на 17—40 % и 13—60 % [9]. Данные, полученные ранее [4], также подтверждают, что после криоконсервации по методике, близкой к той, которую использовали в данной работе, и перфузии солевым раствором показатели клеточного повреждения (выход в перфузат внутриклеточных ферментов, потеря клетками белка, изменение тканевой концентрации калия и натрия) возрастали умеренно и не намного превышали по величине эти показатели после гипотермической консервации. В то же время в тех работах, где оценку состояния криоконсервированных почек проводили путем их пересадки [10, 11, 13], получены неудовлетворительные результаты. Эти авторы также пришли к выводу, что повреждение на уровне микроциркуляторного русла, видимо, является основной причиной гибели криоконсервированной почки после ее пересадки. Они постоянно обнаруживали повреждение базальной мембраны капилляров с кровоизлияниями в капсулу Боумена и в просвет почечных канальцев, слущивание эндотелия в более крупных сосудах. В то же время эпителий канальцев был достаточно хорошо сохранен, хотя степень сохранности зависела от состава криозащитного раствора, и в некоторых сериях выявляли значительные повреждения эпителия дистальных извитых канальцев [13]. Попытки уменьшить повреждение микрососудов за счет удаления из них перфузата продуванием газообразного гелия перед замораживанием, что должно было уменьшить количество образующегося в капиллярах льда, не дали положительных результатов [12].

Причина преимущественного поражения сосудистого русла почек по сравнению с клетками паренхимы пока неясна, хотя недавно опубликованная работа [6] вносит некоторую ясность в этот вопрос. Эти авторы обнаружили, что процесс кристаллизации воды в замораживаемой почке начинается с перитубулярных капилляров. При этом рост образовавшихся кристаллов происходит по сосудистому руслу. За счет этого эпителий канальцев в значительной степени дегидратируется, и в них кристаллообразования не происходит (при условии достаточно медленного охлаждения — порядка нескольких градусов в минуту). Аналогичный механизм зарождения и роста кристаллов выявлен в печени [16].

Таким образом, в проблеме криоконсервации почки на данном этапе удалось решить проблему защиты паренхимы от низкотемпературного повреждения. Основным препятствием успешного сохранения органов является проблема защиты микрососудистого русла от повреждения. Раскрытие причин и механизмов этого повреждения позволит целенаправленно разрабатывать специфические меры защиты системы микроциркуляции с перспективой получения жизнеспособного криоконсервированного органа после его трансплантации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биленко М. В., Перекрест П. В., Угрюмов А. И. Сравнительная оценка ряда перфузионных методов консервации почки // Вестн. АМН СССР. — 1975. — № 7. — С. 61—70.
2. Кирпатовский В. И. Повышение эффективности защитного действия криопротекторов на криоконсервированную почку с помощью предварительного введения фармакологических средств // Криобиология. — 1987. — № 3. — с. 25—31.

3. Кирпатовский В. И., Фролова Е. В. Организационные и биологические проблемы функционирования банка органов.—М.: ВНИИМИ, 1988.—Серия «Хирургия». Вып. 4.—С. 35—51.
4. Кирпатовский В. И. Защитное действие α -токоферола при криоконсервации почки крысы // Криобиология.—1991.—№ 3.—С. 29—36.
5. Шумаков В. И., Штенгольд Е. Ш., Онищенко Н. А. Консервация органов. М.: Медицина.—1975.
6. Bishof J., Hunt C. J., Rubinsky B. et al. Effects of cooling rate and glycerol concentration on the structure of the frozen kidney: assessment by cryoscanning electron microscopy // Cryobiology.—1990.—27, N 3.—P. 301—310.
7. Clark P., Hawkins H. E., Karrow A. M. et al. The influence of temperature on the function of renal cortical slices, frozen in various cryoprotectants // Cryobiology.—1985.—22.—P. 156—160.
8. Fisher J. H., Isselhard W. Free fatty acid and glucose metabolism hypothetically perfused canine kidneys // Eur. Surg. Res.—1979.—11, N 2.—P. 107—121.
9. Guttman F. M., Milhomme G., Gibbons L., Leemayer T. A. Variation of cooling rate and concentration of dimethyl sulfoxide on rabbit kidney function // Cryobiology.—1986.—23.—P. 495—499.
10. Jacobsen I. A., Pegg D. E. Cryopreservation of organs: A review // Cryobiology.—1984.—21.—P. 377—384.
11. Jacobsen I. A., Pegg D. E., Starklint H. et al. Effect of cooling and warming rate on glycerolized rabbit kidneys // Cryobiology.—1984.—21.—P. 637—653.
12. Jacobsen I. A., Pegg D. E., Starklint H. et al. Attempts to reduce vascular injury to kidneys during freezing and thawing // Cryo-Lett.—1985.—6.—P. 227—232.
13. Jacobsen I. A., Pegg D. E., Starklint H. et al. Introduction and removal of cryoprotective agents with rabbit kidneys: Assessment by transplantation // Cryobiology.—1988.—25.—P. 285—299.
14. Iwai M., Yamada N. Long-term preservation of canine kidneys, perfused with perfluorochemical emulsion // Proc. of IV Intern. Symp. on Perfluorochem. Blood Subst., Kyoto.—1978.—P. 225—236.
15. Pegg D. E., Jacobsen I. A., Diaper M. P., Foreman J. Perfusion of rabbit kidneys with solutions, containing diol propane 1,2 // Cryobiology.—1987.—24.—P. 420—428.
16. Rubinsky B., Lee C. Y. The mechanism of freezing in biological tissue: The liver // Cryo-Lett.—1987.—8.—P. 370—381.
17. Toledo-Pereyra L. H., Gordon D. A., MacKenzie G. H. Organ freezing // J. Surg. Res.—1982.—32.—P. 75—84.

НИИ урологии МЗ СССР,
г. Москва

Поступила 26.03.91

V. I. KIRPATOVSKY, Yu. V. KUDRIAVTSEV, V. N. BUROV CRYOPRESERVATION OF THE RABBIT KIDNEY

Research Institute of Urology, Moscow

Kidneys of 21 rabbits were preserved at -20 or -70°C under protection of 15 % DMSO. The blood flow was not restored after transplantation of kidneys preserved at -70°C due to the blockage of microcirculation, while a satisfactory blood supply with inadequate perfusion sites was noted after freezing to -20°C . The histologic examination 1 hr after transplantation demonstrated a mild damage of glomerula and tubules. The changes were lesser in experiments with α -tocopherol added to the perfusate. It has been concluded that the renal microcirculation bed is highly sensitive to cold and this may be responsible for the loss of viability of cryopreserved kidney after transplantation

УДК 57.043:598.6:591.463.1:577.121.7

С. И. Очкур, Е. Ф. Конейка

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ НА ДЫХАНИЕ И ПОДВИЖНОСТЬ СПЕРМИЕВ ПЕТУХОВ

Изучено влияние резкого охлаждения от 41 до 0°C , перепада осмотического давления, криоконсервирования (которое рассматривается как сумма факторов) под защитой этиленгликоля и без криопротектора на ряд параметров дыхания, характеризующих энергетический статус клеток; активность и сохранность двигательного аппарата сперматозоидов. Обсуждается характер повреждающего действия экспериментальных условий и возможные причины снижения жизнеспособности спермиев петухов.

Криоконсервирование спермиев птиц находит все большее применение в селекционных работах и в практике птицеводства. Собственно криоконсервирование — это многоэтапный процесс, в ходе которого осуществляется помещение спермиев в защитную среду, эквilibрация, программное замораживание до низких температур и отогрев. Во время этого процесса на сперматозоиды действует сложная комбинация факторов, и жизнеспособность после криоконсервирования определяется устойчивостью клеток по отношению к ним. Так, при добавке криопротекторов, замораживании и отогреве спермиальные клетки подвергаются сильным осмотическим и температурным воздействиям [1]. При этом наблюдаются значительные повреждения. Для сперматозоидов петуха эти вопросы изучены недостаточно: имеются единичные работы, касающиеся только их морфологии и состава [4, 7]. Влияние данных факторов на метаболизм этих клеток не исследовалось.

В настоящей работе предпринята попытка оценить влияние температурного, осмотического шоков, криоконсервирования под защитой этиленгликоля (которое рассматривается как сумма влияния факторов, действующих на спермии петухов при обычно применяемых методиках криоконсервирования) и без криопротектора (выбрано нами как наиболее жесткое воздействие) на некоторые особенности энергетического метаболизма спермиев петухов. С этой целью были исследованы некоторые параметры дыхания, активность и сохранность жгутиков сперматозоидов.

Сперматозоиды получали по методу Бурроус и Квин [5] от 10—12 птиц для каждого повтора. Объединенные эякуляты разбавляли 1 : 5 средой инкубации, содержащей 68 мМ глутамата Na, 9 мМ $MgSO_4$, 10 мМ глюкозы, 10 мМ фруктозы, 159 мМ сахарозы, 10 мМ NaH_2PO_4 ; pH 7,5; осмотическое давление 332 мосмоль/кг.

Температурный шок (ТШ) вызывали помещением спермы, инкубированной при 41 °С, на стекло, термостатированное при 0 °С, на 5 мин. Осмотический шок (ОШ) вызывали 5-кратным разбавлением водой и 5-минутной выдержкой в условиях гипотонии. О наличии температурного и осмотического шоков судили по падению подвижности. При этом пытались подобрать силу воздействий, достаточную для выявления характера реакции клеток, но не приводящую их к гибели.

Криоконсервирование (К (ЭГ)) проводили следующим образом: сперму, разбавленную средой инкубации, содержащей 8 % этиленгликоля (в конечной концентрации), охлаждали со скоростью 2÷3 °С/мин до температуры —25 °С с остановкой на плато кристаллизации и далее с возрастающей скоростью по экспоненте до —196 °С; оттаивали 5 мин на водяной бане при 0 °С и 5 мин при 25 °С.

Аналогичным образом проводили криоконсервирование в среде, не содержащей криопротектора (З (—)).

Дыхание измеряли полярографическим методом при помощи кислородного электрода типа Кларка и полярографа LP—7e (ЧССР)). При этом оценивали следующие параметры (последовательно внося добавки): дыхание в присутствии глюкозы и фруктозы (V_r), разобщенное дыхание после добавки 100 мкМ 2,4-динитрофенола, ($V_{днф}$), разобщенное дыхание после добавки 1 мкМ ротенона ($V_{рот}$), дыхание после добавки 10 мМ сукцината на фоне 2,4-динитрофенола и ротенона ($V_{сукц}$), а также показатель стимуляции дыхания динитрофенолом ($V_{днф}/V_r$). Концентрации 2,4-динитрофенола и ротенона определялись титрованием.

Активность оценивали как отношение поступательно движущихся сперматозоидов к общему их количеству, видимых в поле зрения микроскопа, выраженное в процентах.

Биение жгутиков оценивали как отношение количества клеток с движущимися аксонемами (это и активные спермии, и движущиеся по кругу, и колеблющиеся на месте) к общему количеству клеток, видимых в поле зрения микроскопа, выраженное в процентах.

Сохранность жгутиков определяли с помощью разработанной нами методики, включающей: выдерживание сперматозоидов в среде, содержащей 154 мМ сахарозы, 70 мМ глутамата Na, 10 мМ NaHPO_4 , 4 мМ дитиотреитола и 0,07 % тритона X-100 (pH 7,5) в течение 2 мин (после чего жгутики становятся неподвижными), активацию подвижности добавкой 5 мМ АТФ, определение активности и биений жгутиков до и после данной обработки. После добавки АТФ аксонемы оказываются в условиях избытка АТФ и их работа не зависит от степени обеспеченности эндогенной энергией.

Все измерения проводили при температуре 25 °С, так как в этих условиях исключена температурная инактивация подвижности [9].

Все результаты представлены как среднее ± 95 % доверительный интервал.

В настоящей работе были использованы 2,4-динитрофенол, ротенон и сукцинат фирмы «Серва» (ФРГ), дитиотреитол фирмы «Реанал» (ВНР), остальные реактивы фирмы «Реахим» (СССР) квалификации «ХЧ».

Сначала кратко рассмотрим полученные данные в сравнительном плане для клеток подвергнутых ТШ, ОШ, К(ЭГ) и К(—), а затем обсудим влияние каждого из исследованных воздействий на спермии петухов.

Результаты экспериментов представлены в таблице. Видно, что после ТШ дыхание V_r не отличается от контроля, а после ОШ и обоих видов криоконсервирования V_r достоверно ниже, чем в контроле и после температурного шока. Почти также распределяются скорости разобщенного дыхания за исключением того, что после криоконсервирования под защитой этиленгликоля $V_{\text{диф}}$ достоверно выше, чем после ОШ и криоконсервирования без криопротектора.

Добавка ротенона, который ингибирует дыхательную цепь перед Q-циклом, приводит к сильному угнетению дыхания во всех случаях, что, возможно, говорит о преимущественном окислении в митохондриях НАД-зависимых субстратов [2]. По этому показателю достоверные, хотя и небольшие различия обнаружены только между сперматозоидами, подвергнутыми ТШ, и контролем. Возможно, в данном случае можно говорить о некоторой активации путей, обходящих I дыхательный комплекс.

Добавка сукцината не вызывала существенного усиления потребления кислорода в контроле и после ТШ, ОШ и достоверно стимулировала дыхание спермиев петухов после замораживания — оттаивания. В данном случае окисление эндогенных субстратов почти полностью подавлено ротеноном и дыхание обеспечивается только окислением экзогенного сукцината. Отсутствие стимуляции дыхания совпадает с данными Секстона [8] о том, что сперматозоиды петуха могут окислять экзогенный сукцинат лишь в очень малых количествах. Это скорее всего объясняется низкой проницаемостью мембран сперматозоидов для сукцината [1]. Стимуляция дыхания сукцинатом говорит о нарушении целостности плазматических мембран спермиев после криоконсервирования. Приведенные результаты свидетельствуют о сохранности плазмалеммы после ТШ и ОШ. В этих условиях контрольная добавка дигитонина на фоне сукцината резко усиливала дыхание спермиев (данные не показаны).

Считается, что величина стимуляции дыхания 2,4-динитрофенолом ($V_{\text{диф}}/V_r$) отражает степень сопряженности окисления и фосфолирования в спермиях [1]. Согласно представленным результатам, величины $V_{\text{диф}}/V_r$ после ТШ и К(ЭГ) не отличается от таковых в контроле. Данный показатель имеет достоверно более низкие значения после ОШ и К(—). Таким образом, в двух последних случаях можно говорить о снижении сопряженности дыхания с синтезом АТФ в клетках.

Из таблицы видно, что после всех воздействий падает активность сперматозоидов. Количество биений после активации АТФ у спермиев, подвергнутых ОШ и криоконсервированию, достоверно ниже, чем в контроле, что свидетельствует о нарушении двигательного аппарата этих клеток.

Дыхание и подвижность сперматозоидов петухов после температурного шока, осмотического шока (ОШ), криоконсервирования с этиленгликолем и без криопротектора

Параметры	Дыхание, нмоль O_2 /мин·10 ⁸ клеток					Подвижность, %		
	V_r	$V_{ДНФ}$	$V_{РОТ}$	$V_{суц}$	$V_{ДНФ}/V_r$	Без обработки		После обработки средой с триптоном $X = 100$ и АТФ
						А	Б	
Контроль	2,54 ^а ±0,46 $n = 8$	6,30 ^а ±1,01 $n = 8$	0,25 ^а ±0,11 $n = 9$	0,69 ^а ±0,23 $n = 9$	2,54 ^а ±0,40 $n = 8$	4,6 ^а ±7,1 $n = 15$	70,8 ^а ±4,7 $n = 15$	9,4 ^а ±3,5 $n = 26$ 83,7 ^а ±4,7 $n = 26$
Температурный шок	2,38 ^а ±0,41 $n = 9$	5,63 ^а ±0,73 $n = 9$	0,55 ^б ±0,17 $n = 5$	0,67 ^а ±0,31 $n = 5$	2,44 ^а ±0,25 $n = 9$	24,6 ^б ±6,5 $n = 5$	70,0 ^а ±8,4 $n = 5$	5,2 ^{а в} ±2,7 $n = 8$ 83,5 ^а ±7,8 $n = 8$
Осмотический шок	1,61 ^б ±0,25 $n = 9$	2,62 ^б ±0,58 $n = 9$	0,39 ^{а б} ±0,11 $n = 5$	0,96 ^а ±0,62 $n = 5$	1,70 ^б ±0,19 $n = 9$	5,5 ^в ±1,8 $n = 24$	36,0 ^б ±12,6 $n = 24$	1,5 ^б ±0,9 $n = 24$ 44,0 ^б ±10,5 $n = 24$
Криоконсервирование с этилен-гликолем	1,63 ^б ±0,28 $n = 8$	3,69 ^в ±0,69 $n = 8$	0,31 ^{а б} ±0,07 $n = 5$	2,48 ^б ±0,31 $n = 5$	2,20 ^а ±0,32 $n = 8$	25,0 ^б ±9,1 $n = 10$	51,2 ^а ±1,0 $n = 10$	3,6 ^в ±0,6 $n = 10$ 59,8 ^в ±13,6 $n = 10$
Криоконсервирование без крио-протектора	1,37 ^б ±0,16 $n = 10$	2,52 ^б ±0,44 $n = 10$	0,35 ^{а б} ±0,12 $n = 4$	3,11 ^б ±0,44 $n = 4$	1,82 ^б ±0,33 $n = 10$	3,1 ^в ±1,5 $n = 16$	13,3 ^г ±6,3 $n = 16$	0,0 ^г $n = 16$ 43,6 ^б ±6,2 $n = 16$

А — активность сперматозоидов; Б — биеение жгутиков.
 Результаты экспериментов представлены как средние n наблюдений ±95 % доверительный интервал.
 а, б, в, г — в пределах каждого столбца все результаты сравнивали попарно. Средние, не имеющие одинаковых буквенных индексов, различаются достоверно ($P < 0,05$).

Приведенные результаты позволяют охарактеризовать влияние каждого из изученных воздействий на энергетику и подвижность спермиев петухов.

Резкое охлаждение от 41 до 0 °С (вызывающее ТШ) не влияет на скорость дыхания в присутствии глюкозы и фруктозы ни до (V_r) ни после ($V_{\text{диф}}$) добавки разбавителя. Это указывает на то, что после данного воздействия не изменяется сколько-нибудь общий баланс синтеза и гидролиза АТФ, а также способность ферментов дыхательной цепи окислять эндогенные субстраты. Небольшое увеличение скорости потребления кислорода в присутствии ротенона говорит о возможной активации пугей, шунтирующих I пункт сопряжения. ТШ не сопровождается увеличением проницаемости плазматических мембран спермиев для экзогенного сукцината, что указывает на интактность этих структур. После ТШ не изменяется величина показателя $V_{\text{диф}}/V_r$, причем это обусловлено тем, что не изменились величины параметров дыхания, определяющих этот показатель. Все это указывает на высокую сохранность сопряженности процессов окисления субстратов и фосфорилирования АДФ протонной АТФ-синтетазой, а также на низкую проницаемость внутренней мембраны митохондрий для ионов. В результате данного воздействия отмечалось уменьшение количества поступательно движущихся клеток, хотя общее число колеблющихся жгутиков не изменялось. Это свидетельствует о повреждении механизмов, обеспечивающих синхронность движения структурных элементов аксономы. После обработки сперматозоидов средой, содержащей детергент, и последующей активации подвижности добавкой АТФ количество движущихся жгутиков не отличалось от такового в контроле, что говорит о сохранении способности «двигательных ручек», расщепляя АТФ, совершать конформационные изменения, приводящие к скольжению субфибрил, которое обуславливает изгибание аксономы. Таким образом, результаты говорят об относительной устойчивости сперматозоидов петухов к резкому охлаждению. Это согласуется с данными других авторов [7] и объясняется фосфолипидным и жирнокислотным составом их мембран: молярное отношение холестерин/фосфолипиды равно 1, содержание насыщенных жирных кислот ($C_{14:0}$, $C_{16:0}$, $C_{18:0}$) составляет 53 %, а ненасыщенных — 30 % (у спермиев быков, баранов и хряков, характеризующихся низкой устойчивостью к холодовому шоку соотношение холестерин/фосфолипиды меньше 1, а содержание полиненасыщенных жирных кислот с длинной углеродной цепью C_{22} превышает 70 %) [1].

Считается, что осмотический шок является повреждающим фактором при замораживании — оттаивании сперматозоидов петуха и при удалении криопротекторов. На это указывает то обстоятельство, что характер морфологических повреждений после криоконсервирования практически совпадает с особенностями структурных изменений в гипотонических растворах [3]. Судя по литературным данным, пятикратное изменение осмотического давления в сторону повышения [6] и в сторону понижения [4] для сперматозоидов петухов близко к критическому. Дальнейшее увеличение интенсивности осмотического шока приводит к резкому нарастанию гибели клеток. Таким образом, полученные нами результаты характеризуют изменения метаболизма сперматозоидов в предкритической точке.

ОШ, вызванный пятикратным разбавлением спермы петухов, сопровождается значительным снижением скорости дыхания V_r и дыхания в присутствии разбавителя $V_{\text{диф}}$. Причем последний показатель снижается в большей степени чем первый. Следовательно, при ОШ сильно угнетается способность систем катаболизма окислять субстраты, что может быть вызвано оводнением содержимого клеток. При ОШ не происходит разрушения плазматических мембран сперматозоидов, и проницаемость их для сукцината практически не изменяется. Эти результаты согласуются с данными Бакста [4], свидетельствующими о том, что при аналогичном падении осмолярности подавляющее большинство этих клеток имело неповрежденную

плазмалемму, и говорит о способности плазматических мембран сперматозоидов петухов к значительным растяжениям без нарушения их целостности. Скорость дыхания спермиев в присутствии ротенона несколько возрастает и указывает на возможность некоторой (очень небольшой) активации путей, обходящих I комплекс дыхательной цепи, например внешнего пути окисления НАДН. ОШ сопровождается очень сильным угнетением двигательной активности сперматозоидов. При этом количество поступательно движущихся клеток падает примерно в 10 раз, а число колеблющихся жгутиков — в два раза. Это говорит о том, что системы, определяющие согласованное движение структур аксонемы, необходимое для поступательного движения, в большей степени повреждаются при ОШ, чем элементы, обеспечивающие биение жгутиков. Это подтверждается и тем, что добавка АТФ к обработанным детергентам спермиям вызывает биение примерно половины аксоном. Величина стимуляции дыхания разобщителем в результате ОШ снижается и указывает на разобщение процессов дыхания и фосфорилирования. Если принять, что величина энерготрат суспензии спермиев в связи с повреждением динеиновой АТФазы уменьшается в два раза, и учесть, что величина дыхания V_r падает примерно на 30 %, то можно прийти к предположению о том, что часть дыхания не связана с расходом энергии. Это также предполагает разобщение дыхания и фосфорилирования и увеличение ионной проводимости внутренних мембран митохондрий спермиев.

Криоконсервирование под защитой этиленгликоля вызывает достоверное уменьшение интенсивности дыхания V_r и дыхания в присутствии разобщителя $V_{\text{диф}}$, что говорит о снижении максимально возможного потока электронов в дыхательной цепи при окислении субстратов. Судя по показателю стимуляции дыхания $V_{\text{диф}}/V_o$, после криоконсервирования не происходит существенного нарушения сопряженности окисления и фосфорилирования. Плазматические мембраны спермиев петухов после замораживания — оттаивания получают явно выраженные повреждения, что позволяет экзогенному сукцинату свободно проникать в клетки. Падение скорости разобщенного дыхания может объясняться выходом эндогенных субстратов из клеток. После криоконсервирования активность падает примерно наполовину, а количество подвижных жгутиков на 28 %. Такое снижение подвижности может быть связано с 30 %-ным снижением дыхания при условии того, что эффективность окислительного фосфорилирования остается примерно на уровне контроля. Вместе с тем, снижение подвижности может отчасти объясняться и повреждением двигательного аппарата клеток в результате криоповреждений, что выражается в снижении процента движущихся жгутиков после активации.

После замораживания сперматозоидов петуха в среде, не содержащей криопротекторов, происходит еще более сильное снижение дыхания V_r и разобщенного дыхания $V_{\text{диф}}$, причем последнее снижается сильнее, что сказывается на показателе $V_{\text{диф}}/V_r$. Все это указывает на общее падение уровня окислительных процессов, снижение возможностей клеток окислять субстраты и разобщение процессов окисления и аккумуляции энергии в клетках. Достоверно выявлено нарушение барьерных свойств плазматических мембран для сукцината. Сильно падает количество поступательно движущихся клеток, что может объясняться значительными повреждениями двигательного аппарата.

Представленные результаты говорят о том, что наличие криопротектора в среде замораживания предохраняет клетки от повреждений при криоконсервировании. Это относится и к скорости дыхания сперматозоидов в присутствии 2,4-динитрофенола, коэффициенту стимуляции дыхания $V_{\text{диф}}/V_r$ и к подвижности клеток. Таким образом, при замораживании — оттаивании сперматозоидов петухов в среде, не содержащей криопротекторов, действие факторов, имеющих место при криоконсервировании проявляется наиболее сильно.

На основании полученных результатов можно сделать следующие выводы.

1. В порядке увеличения повреждающего действия факторов криоконсервирования на дыхание и подвижность спермиев петухов экспериментальные воздействия располагаются следующим образом: резкое охлаждение (от 41 до 0 °C), криоконсервирование в среде с этиленгликолем, осмотический шок, криоконсервирование в среде без криопротектора.

2. Сперматозоиды петухов относительно устойчивы к резкому охлаждению до 0 °C, что проявляется в сохранности барьерных свойств плазматических мембран для сукцината, скорости дыхания до и после добавки разобщителя, сопряженности дыхания и фосфорилирования. Возможна некоторая активация путей, шунтирующих I дыхательный комплекс, и повреждение двигательного аппарата.

3. Пятикратное изменение осмолярности среды приводит к серьезным нарушениям в энергетическом метаболизме спермиев: уменьшается скорость окисления субстратов, способность к их окислению, сопряженность дыхания и фосфорилирования. Повреждаются жгутики. Плазматические мембраны способны выдерживать значительные градиенты осмотического давления без существенных нарушений своей целостности.

4. Криоконсервирование под защитой этиленгликоля (и без криопротектора) вызывает нарушение целостности плазматических мембран и повреждение жгутиков. Присутствие криопротектора (этиленгликоля) в среде криоконсервирования обеспечивает более высокую степень сохранности систем окисления субстратов, сопряженности дыхания и фосфорилирования, а также двигательного аппарата сперматозоидов.

Учет особенностей влияния факторов, имеющих место при криоконсервировании, и устойчивости сперматозоидов по отношению к ним необходим при разработке новых способов криоконсервирования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Курбатов А. Д., Платов Е. М., Корбан Н. В. и др. Криоконсервация спермы сельскохозяйственных животных. — Ленинград: Агропромиздат, Ленинград. отделение, 1988. — 256 с.
2. Лукьянова Л. Д., Балмұханов Б. С., Уголев А. Т. Кислородзависимые процессы в клетке и ее функциональное состояние. — М.: Наука, 1982. — С. 302.
3. Bakst M. R., Sexton T. J. Fertilizing capacity and ultrastructure of fowl and turkey spermatozoa before and after freezing // J. Reprod. Fert. — 1979. — 55, N 1. — P. 1—7.
4. Bakst M. R. Fertilizing capacity and morphology of fowl and turkey spermatozoa in hypotonic extender // J. Reprod. Fert. — 1980. — 60, N 1. — P. 121—127.
5. Burrous W. H., Quinn J. P. The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey // Poultry Sci. — 1937. — 16, N 1. — P. 19—24.
6. Maeda T., Terada T. The morphology of fowl spermatozoa stored at 5 °C in diluents in various osmotic pressures // Japan Poultry Sci. — 1982. — 19, N 6. — P. 344—350.
7. Quinn P. J., White I. G. The effect of cold shock and deep freezing on the concentration of major cations in spermatozoa // J. Reprod. Fert. — 1966. — 12, N 1. — P. 263—270.
8. Sexton T. J. A new poultry semen extender. 1. Effect of extension on the fertility of chicken semen // Poultry Sci. — 1977. — 56, N 6. — P. 1443—1446.
9. Takeda A. Studies on reversible inactivation of cock spermatozoa by temperature. 1. Effects of several factors on reversible inactivation // Japan Poultry Sci. — 1982. — 19, N 1. — P. 26—36.

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

Поступила 27.02.90

S. I. OCHKUR, E. F. KOPEIKA

THE INFLUENCE OF CRYOPRESERVATION FACTORS ON THE RESPIRATION AND MOTILITY OF FOWL SPERMATOOZOA

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

The effects of sharp cooling from 41 to 0 °C, shift in osmotic pressure, cryopreservation (considered as a sum of factors) under protection of ethylene glycol and without cryoprotectants on the parameters of respiration reflecting the cell energy state were studied as well as the activity and integrity of the motion apparatus of spermatozoa. The nature of damaging factors under experimental conditions is discussed along with possible causes of decreasing the viability of fowl spermatozoa.

КРИОМЕДИЦИНА

УДК 618.146-006;615.8329

Л. П. Водолажская, Т. Д. Павлова

ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КРИОХИРУРГИИ В КОМБИНИРОВАННОМ ЛЕЧЕНИИ РАННИХ СТАДИЙ РАКА ШЕЙКИ МАТКИ

Обследовано 143 женщины, больных ранним раком шейки матки, после криохирургического воздействия на очаг воспаления. Изучены клинико-эндоскопическая и цитоморфологическая характеристики опухоли, определены глубина некроза и зона промерзания, воспалительная реакция окружающих тканей после действия низких температур. Исследованы показатели клеточного и гуморального иммунитета у больных. Показано, что применение криохирургического лечения способствовало достижению высокой степени медицинской и трудовой реабилитации больных пре-клиническим (83,3 %) и клинически (67,8 %) выраженным раком шейки матки.

Поиск адекватных методов лечения ранних стадий рака шейки матки, которые позволили бы уменьшить травматичность лечения и сократить количество осложнений, привел к созданию криохирургического метода. Клинический опыт его использования, хотя и небольшой, говорит об эффективности криотерапии ранних форм рака шейки матки как самостоятельного метода лечения, так и в комбинации с хирургическим вмешательством.

Проведено обследование 143 женщин, больных ранним раком шейки матки. В процессе обследования изучены клинико-эндоскопическая и цитоморфологическая характеристики опухоли, показатели клеточного и гуморального иммунитета больных. После применения криовоздействия на очаг рака определяли глубину некроза и зону промерзания, а также воспалительную реакцию окружающих тканей на воздействие низких температур.

Иммунологический статус больных исследовали до лечения, в процессе, сразу после окончания, а затем спустя 1, 3, 6 мес., 1, 2, 3 года и 5 лет после лечения. В периферической крови больных определяли абсолютное количество лейкоцитов, лимфоцитов, содержание среди них Т-лимфоцитов [3] и В-лимфоцитов [2]. Функциональную активность Т-лимфоцитов изучали в реакции бластной трансформации на поликлональный митоген фитогемагглютинин, определяли уровень иммуноглобулинов классов А, М и G в сыворотке крови методом радиальной иммунодиффузии [1].

Криовоздействие как самостоятельный метод и в комбинации с другими методами лечения было применено у 105 (74,4 %) человек, в том числе у 37 больных преинвазивным, 24 больных пре-клиническим и 44 больных

клинически выраженным раком шейки матки, 38 (24,6 %) больных получили лечение по общепринятым методикам.

Для замораживания шейки матки использовали криогенную установку «Криоэлектроника-2». Применяли наконечники для отдельного замораживания шейки матки и цервикального канала. Наиболее эффективной методикой проведения криодеструкции является 3—5-кратное замораживание шейки матки циклами по 3 мин с 15—20-минутными интервалами для оттаивания замороженной ткани.

Были изучены непосредственные и отдаленные результаты лечения, трудовая реабилитация больных. При этом проведено сравнение результатов применения криовоздействия и традиционных методов лечения по показателям количества рецидивов, сроков восстановления трудоспособности и состояния иммунных реакций организма больных раком шейки матки.

Гистологические изменения в шейке матки после замораживания проявляются в виде локального некроза пласта раковых клеток и подлежащей ткани на глубину от 1 до 5 мм.

Результаты гистологических исследований свидетельствуют о радикальной деструкции опухолевых клеток при использовании повторных циклов замораживания — оттаивания шейки матки.

Наш опыт подтверждает известные достоинства криотерапии: бескровность, минимальную болезненность манипуляции криовоздействия, благоприятное течение послеоперационного периода. По сравнению с диатермокоагуляцией криовоздействие при интраэпителиальном раке шейки матки позволяет сократить сроки эпителизации от $(6,5 \pm 0,6)$ до $(5,0 \pm 0,7)$ недель при отсутствии рубцовых изменений ткани шейки матки и стенозирования цервикального канала.

Криохирургическое лечение способствовало снижению количества осложнений. Поздние осложнения у наших больных развивались, как правило, при использовании в лечении лучевого компонента.

Криовоздействие способствует снижению средней продолжительности пребывания больных в стационаре: при раке T_{is} на 2,9 дня (47,6 %), при раке T_{1a} на 20,1 дня (51,2 %), при раке T_{1b} на 22 дня (40,1 %).

Результаты изучения иммунного статуса убеждают в том, что ранние стадии рака шейки матки протекают у большинства больных при нормальном уровне иммунологической реактивности организма. Под влиянием лучевой терапии происходит резкая ингибция реакций T -системы иммунитета, причем у больных с исходно сниженной иммунореактивностью организма она угнетается в еще большей степени. Криовоздействие не угнетает защитные реакции организма, а в случаях сниженной иммунореактивности оказывает нормализующий или стимулирующий эффект.

Разработанная нами рациональная схема криохирургии с учетом иммунологической реактивности организма и усовершенствованный метод криодеструкции опухоли позволяют значительно улучшить результаты лечения и трудовую реабилитацию больных ранним раком шейки матки.

Больным преинвазивным раком шейки матки (T_{is}) показано криовоздействие как самостоятельный метод лечения. При сочетании рака с рубцовой деформацией шейки матки целесообразно проводить криовоздействие с последующей электроэксцизией шейки матки (через 1 мес.), которая одновременно является диагностической.

При преклинической карциноме шейки матки (T_{1a}) с глубиной инвазии до 3 мм следует применять криообработку шейки матки в комбинации с хирургическим вмешательством в объеме экстирпации матки с удалением или без удаления придатков матки, при клинически выраженном раке шейки матки (T_{1b}) с глубиной инвазии до 5 мм — криообработку шейки матки в комбинации с экстирпацией матки по методу Вертгейма без дополнительной лучевой терапии.

Разработанная схема криохирургии позволила добиться излечения 98,3 % больных ранними формами рака шейки матки.

Рецидивы заболевания не возникали у 97,3 % больных преинвазивным, 100 % больных преклиническим и 97,7 % больных клинически выраженным раком шейки матки.

Применение криохирургического лечения способствовало достижению высокой степени медицинской и трудовой реабилитации: работоспособность была восстановлена у 83,3 % больных преклиническим и 67,8 % больных клинически выраженным раком шейки матки.

Результаты проведенного исследования дают основание считать, что внедрение криохирургии как щадящего, эффективного и экономичного метода лечения больных ранним раком шейки матки в широкую практику здравоохранения позволит значительно увеличить возможности медицинской, трудовой и социальной реабилитации женщин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бехм Е. Иммунодиффузия // Иммунологические методы / Под ред. Г. Фримеля. — М. : Медицина, 1987. — с. 73—88.
2. Bianco C., Patrick R., Nussenzweig V. A population of lymphocytes bearing a membrane receptor for antigen — antibody complement complexes. I. Separation and characterization // J. Exp. Med. — 1972. — 123, N 3. — P. 702.
3. Jondal M., Holm G., Wigrell H. Surface markers on human T- and B-lymphocytes. A large population of lymphocytes forming nonimmune rosette with sheep red blood cells // J. Exp. Med. 1972. — 136, N 6. — P. 207—215.

УИУВ, г. Харьков

Поступила 21.03.91

L. P. VODOLAZHSKAYA, T. D. PAVLOVA

AN EXPERIENCE OF USING CRYOSURGERY IN THE COMBINED TREATMENT OF EARLY CANCER OF CERVIX UTERI

Ukrainian Institute for Doctor's Advancement, Kharkov

A total of 143 women suffering from early cancer of cervix uteri were examined after cryosurgical treatment. Clinical, endoscopic and cytomorphologic tumor characteristics were studied. The depth of necrosis and the freezing zone were determined as well as the inflammatory response of environmental tissues after cryoapplication. Parameters of cellular and humoral immunity of the patients were investigated. Cryosurgical treatment has been shown to favor higher medical and labour rehabilitations of patients with preclinical (83.3 %) and clinical (67.8 %) cancer of cervix uteri.

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 611.311-018.33-019-092-5.085

К. В. Скидан, Л. В. Останкова, Р. В. Точилловская

ВЛИЯНИЕ ГЕЛИЙ-НЕОНОВОГО ЛАЗЕРА НА ЦИТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЙ СОСТАВ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЯЗВ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА

В настоящее время криовоздействие на патологически измененную ткань получило широкое применение практически во всех областях медицины, в том числе и стоматологии для лечения хронических язв слизистой оболочки полости рта [1]. Однако наряду с высокой эффективностью отмечаются такие недостатки, как относительно длительные сроки регенерации тканей, а также возможность обострения хронического воспалительного процесса. В настоящее время в стоматологии получает все большее распространение гелий-неоновый лазер (ГНЛ). Из данных литературы известно, что ГНЛ оказывает стимулирующее, противовоспалительное действие [2]. Поэтому для ускорения криодеструкции и последующих процессов эпителизации патологически измененной ткани, очевидно, целесообразно использовать лазерную терапию.

Нами были изучены особенности развития некроза и последующей регенерации ткани при применении изолированного криовоздействия и в сочетании с лазерной

терапией с анализом динамики цитологических показателей у экспериментальных животных с острыми язвами слизистой полости рта.

Эксперимент проводили на 30 кроликах породы шиншилла. Вес животных 2,2—2,6 кг. Все животные были разделены на 5 групп равномерно. Острую травму наносили дерматологическим криоаппликатором, диаметр насадки 0,5 см. Полученные язвы подвергались воздействию ГНЛ начиная с 3-го дня после криовоздействия. Всего 5 сеансов. I группа — в течение 30", II группа — в течении 60", III группа — 90", IV группа — 120", V группа — контрольная, воздействию лазера не подвергались. Использовали ГНЛ «Ягода», мощность излучения не менее 20 мВт. Экспозиция выбрана на основании данных [2], свидетельствующих о том, что стимулирующий эффект при данной плотности мощности достигается при экспозиции 30"—120".

Динамика изменений клеточного состава язв изучалась в мазках, приготовленных в процессе эпителизации язв на 3—7, 12, 15 сут после нанесения холодовой травмы. Препараты фиксировали метанолом и окрашивали азур-2-эозином. Микроскопия проводилась в световом микроскопе МБИ. Объектив — 90, окуляр — 10.

В результате проведенных исследований установлено, что по сравнению с изолированным криовоздействием под влиянием лазерной терапии происходит ускорение процессов регенерации слизистой полости рта. Первые 3 сут цитологическая картина всех язв представлена в основном лейкоцитами, 84—88 %, моноцитами, 3—6 %, ретикулярными макрофагами, 4,8 %, изредка встречались единичные лимфоциты.

На 7 сут содержание лейкоцитов в раневом инфильтрате снижалось (до 5—12 %) во всех опытных группах. Наряду с морфологически сохраненными лейкоцитами встречались и дегенеративно измененные формы с пикнотичными ядрами, а также клетки в состоянии кариорексиса и лизиса. Отмечалось повышение содержания ретикулярных и эпителиальных клеток по сравнению с содержанием таковых в язвах контрольной группы. При воздействии ГНЛ на слизистую полости рта на 11 сут начинается развитие в зоне воздействия грануляционной ткани, и образование молодого эпителия по периферии способствует отторжению струпа. Однако данный процесс зависит от времени экспозиции лазера на раневую поверхность.

Так 30" экспозиция во все сроки наблюдения не отличается от контроля. Очищение раневой поверхности от некротических масс происходит на 13—17 сут. Применение 60" и 90" экспозиции лазера позволяет наблюдать клеточную реакцию на 7—10 сут, что выражается в увеличении содержания эпителиальных клеток (78 %) и резком уменьшении лейкоцитов (до 2—4 %). При использовании 120" экспозиция лазера, с 7-х суток и в последующем происходило заживление раневой поверхности с развитием эпителизации, что характеризовалось 100 %-ным содержанием эпителиальных клеток в цитограммах на 10 сут.

Во всех случаях наблюдения криоиндуцированные язвы слизистой ротовой полости кролей были интенсивно инфицированы микроорганизмами, часть из которых активно поглощалась нейтрофильными гранулоцитами, моноцитами как до, так и в ранние сроки после криовоздействия. В поздние сроки — фагоцитировали преимущественно ретикулярные и эпителиальные клетки.

Таким образом, полученные нами результаты позволяют заключить, что экспозиция 120" является оптимальной и способствует ускорению процессов регенерации ткани. Следовательно, лазерное излучение является эффективным методом лечения криоиндуцированных язв полости рта и может быть рекомендовано в стоматологическую практику.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Катурова Г. Ф., Точилковская Р. В., Щербинина Е. И., Воропаева Л. В. Физические методы лечения в комплексной терапии хронических неспецифических эрозивно-язвенных поражений слизистой оболочки полости рта // Тр. ЦНИИС. — 1985. — Т. 15. — М. 18—19.
2. Прохончуков А. А., Жижина Н. А. Лазеры в стоматологии. — М. : Медицина, 1986. — 174 с.

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

Поступила 26.04.90

ХРОНИКА

28-е ЗАСЕДАНИЕ МЕЖДУНАРОДНОГО ОБЩЕСТВА КРИОБИОЛОГОВ

В г. Левене (Бельгия) с 7 по 12 июля 1991 г. проходило 28-е заседание Международного общества криобиологов, в котором принимала участие делегация Института проблем криобиологии и криомедицины АН Украины. На заседании охвачен широкий круг вопросов, которые были сгруппированы в следующие симпозиумы: техника перфузии и консервации органов; криоконсервирование репродуктивных клеток (ооцитов, эмбрионов, спермы); проблемы стабилизации белков; консервация тканей растений; тканевые банки; криохирургия; проблемы гибернации; витрификация; теоретические основы криобиологии и лиофилизации.

В обсуждении указанных выше проблем принимали участие ведущие криобиологи зарубежных центров США, Великобритании, Японии, ФРГ, Канады, Франции, Бельгии, Италии, Испании, ЧСФР, Болгарии, Польши и др. стран. Было заявлено 250 сообщений, которые докладывались на соответствующих симпозиумах и секциях. Анализ заслушанных материалов позволяет сделать следующие выводы. Выявляется четкая тенденция в решении проблемы гипотермической консервации органов с использованием вязкостного перфузата. Криоконсервация органов рассматривается пока как тупиковая проблема. Широко используются витрифицирующие растворы для криоконсервации различных биологических объектов. Расширяются исследования по стабилизации белков с использованием криосольвентов, биологически активных веществ. Углубляются исследования по гибернации в направлении выяснения роли опиоидных пептидов в реализации зимней спячки.

ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИИ

В диссертационной работе А. Н. Сукача на соискание ученой степени кандидата биологических наук «Действие низких температур на поглощение и биотрансформацию бифенила в гепатоцитах крыс, выделенных неферментативным методом» исследовано влияние низких температур на поглощение липофильного ксенобиотика бифенила изолированными гепатоцитами. Обнаружено, что степень связывания гепатоцитами бифенила не зависит от его концентрации в среде и составляет 75—80 %. Замораживание — отогрев в среде без криопротекторов не влияет на степень связывания бифенила клетками печени в гипотермических условиях, но приводит к ее уменьшению после изотермической инкубации, что обусловлено потерей клеточных мембранных структур, участвующих в поглощении бифенила. В работе также разработан неферментативный метод выделения функционально полноценных гепатоцитов крыс. Обнаружено, что замораживание — отогрев гепатоцитов в среде без криопротекторов приводит к угнетению гидроксилирования и конъюгации бифенила, что обусловлено потерей пиридиновых нуклеотидов и субстратов, участвующих в восстановлении НАДФ⁺. Показано, что сывороточный альбумин снижает эффективную концентрацию бифенила в клетке, что, очевидно, предотвращает угнетение цитохром-Р-450-зависимой монооксигеназной системы.

На основании полученных экспериментальных данных в диссертации даны рекомендации по практическому применению нативных и криоконсервированных гепатоцитов в клинической практике с целью детоксикации биологических жидкостей.

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

1 1992

Проводится подписка на всесоюзный научно-теоретический журнал "Проблемы криобиологии". В журнале публикуются научные работы по всем аспектам действия охлаждения и замораживания в биологии, медицине и пищевой промышленности, по проблемам гипотермии, низкотемпературному консервированию клеток и тканей, криохирургии, по сублимационному высушиванию, о криопротекторных веществах и их фармакологическом действии. Освещаются вопросы гибернации, зимостойкости растений, конструирования приборов и оборудования для низкотемпературного консервирования биологических объектов и криомедицины.

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

Периодичность - 4 номера в год. Подписная цена: на 3 мес. - 1 р. 20 к., на 6 мес. - 2 р. 40 к., на 12 мес. - 4 р. 80 к.

Подписка принимается в агентствах и отделениях "Союзпечати", отделениях связи и общественными распространителями печати.

Our Journal PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY formerly KRIOBIOLOGIYA (CRYOBIOLOGY) is published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the UkrSSR Academy of Sciences. 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.

Наукова думка

ИНДЕКС 70474

ISSN 0233-7673. ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ. 1992. № 1. 1-56