

13.07.1977

КРИОБИОЛОГИЯ И КРИОМЕДИЦИНА



3

1977

Справ -

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ И КРИОМЕДИЦИНЫ

КРИОБИОЛОГИЯ И КРИОМЕДИЦИНА

РЕСПУБЛИКАНСКИЙ МЕЖВЕДОМСТВЕННЫЙ СБОРНИК

Основан в 1975 г.

ВЫПУСК

3

КИЕВ «НАУКОВА ДУМКА» 1977

57.04+61

К 82

УДК 57:536.48.047

В сборнике представлены материалы исследований по фундаментальным и прикладным аспектам криобиологии и криомедицины. Освещены различные стороны процессов криповреждений и криозащиты на клеточном, субклеточном уровнях и в модельных системах.

Ряд статей посвящен изучению действия некоторых физических факторов в сочетании с низкими температурами на этапах низкотемпературного консервирования биологических объектов.

Представляет интерес для биологов, медиков и других специалистов, работающих в области криобиологии и криомедицины.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Н. С. Пушкарь (ответственный редактор), А. М. Белоус (зам. ответственного редактора), В. И. Вишневский, Г. С. Лобынцева (ответственный секретарь), В. И. Луговой, В. И. Митасов, В. А. Моисеев, Е. Я. Панков, М. Г. Шенберг, М. И. Шраго (зам. ответственного редактора), Т. Н. Юрченко

Редакция республиканских межведомственных сборников

К $\frac{50500-443}{M221(04)-77}$ 362—77

© Издательство «Наукова думка», 1977

Н. С. Пушкарь

НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЕ КОНСЕРВИРОВАНИЕ ТКАНЕЙ (Итоги и перспективы развития)

В настоящее время можно осуществить долгосрочное консервирование в условиях глубокого холода биологических объектов, образующих суспензии (клеток крови, костного мозга, микроорганизмов, сперматозоидов и пр.), и некоторых плотных тканей (роговица). Применяемые методы низкотемпературного консервирования в значительной мере являются следствием эмпирических подходов. Возможности последних оказались весьма ограниченными и недостаточными для дальнейшего развития теории и практики криобиологии. Так, например, выработанные подходы несостоятельны при низкотемпературном консервировании изолированных органов и систем, состоящих из элементов различной морфологической структуры и функциональной специализации. Указанные проблемы требуют проведения комплексных исследований, как фундаментальных, так и прикладных, обеспечивающих получение и переработку необходимой информации.

Задачей первостепенной важности в области фундаментальных исследований криобиологии является раскрытие механизмов криоповреждений и криозащиты на различных уровнях биологической организации и на их основе разработка методов, обеспечивающих длительное сохранение биологического материала. Одним из эффективных подходов при раскрытии механизмов криоповреждений является изучение корреляции между физико-химическими изменениями во время низкотемпературного консервирования и показателями сохранности биологических свойств деконсервированного материала. С этой же целью целесообразно использование математического аппарата для анализа процессов, протекающих в консервируемом объекте. В криобиологии накопился большой экспериментальный материал о состоянии клеток на определенных этапах низкотемпературного консервирования, что позволило выявить наиболее неблагоприятные факторы, участвующие в развитии криоповреждений структур клетки. Однако описание механизмов нарушения морфологических и функциональных свойств клеток как внутриклеточными кристаллами льда, так и другими факторами носит во многом случайный характер, поскольку данные получены на различных объектах и нуждаются в дальнейшем изучении, уточнении, обобщении. Весьма ограничено изучены криоповреждения, наступающие при рекристаллизации льда при температурах порядка -130°C . Представляет значительный интерес изучение особенностей и природы разрушения клеток в период отогрева. Известные гипотезы механизма криоповреждения основаны на изучении отдельных сторон процесса. Наиболее обоснованной можно считать двухфакторную гипотезу криоповреждений, согласно которой в зависимости от условий консервирования проявляются различные факторы повреждения клеток.

Уровень разработки этого вопроса показывает, что имеется экспериментальная основа для обобщения и более детального анализа ме-

ханизмов криповреждений на клеточном уровне, которая может основываться на физико-математическом описании кинетических процессов, сопровождающих низкотемпературное консервирование. Аппарат неравновесной термодинамики прерывных и непрерывных систем может оказаться полезным и перспективным в построении приближенных адекватных моделей на клетках.

Следовательно, создание практических способов обратимой остановки жизни должно основываться на результатах глубокого изучения процессов, сопутствующих замораживанию, отогреву и другим этапам низкотемпературного консервирования.

С этой целью в нашем институте изучаются механизмы криповреждений на разных уровнях: молекулярном, субклеточном, тканевом и органном. Исследования на уровне индивидуальных каталитических белков с привлечением методов спектроскопии и аналитической биохимии показали, что их повреждаемость во многом зависит от структуры макромолекулы и ее активных центров. Например, глобулярные белки, стабилизированные дисульфидными связями (РНКаза), меньше повреждаются при замораживании, чем белки, имеющие четвертичную структуру (лактатдегидрогеназа).

Замораживание ферментов с четвертичной структурой (особенно в присутствии криопротектора) вызывает распад их молекулы на субъединицы, способные реассоциировать. По современным представлениям наиболее чувствительными структурами к действию низких температур являются биомембраны клеток и клеточных органелл. Компоненты мембран и белки не только определяют структурную устойчивость клетки, но и формируют сложно организованные функциональные системы, активность которых в свою очередь зависит от целостности мембран.

Исследования изолированных мембран, подвергнутых действию низких температур, показали, что в первую очередь изменяется состояние их липидных компонентов, что значительно влияет на сохранение некоторых важных функций клетки. Так, в мембранах эритроцитов понижается содержание некоторых важных фосфолипидов — лецитина и фосфатидиэтаноламина.

Изменения в мембранах эритроцитов обуславливают активацию натрий—калий и магниевых АТФаз — ферментов, гидролизующих АТФ и обеспечивающих поддержание электролитного градиента клетки. Методом сверхслабого свечения установлено, что в мембранах митохондрий ядродержащих клеток крови, подвергнутых действию глубокого замораживания, происходит интенсивное перекисное окисление липидов, вызывающее снижение их количества и приводящее к накоплению различных токсичных продуктов. Перечисленные процессы повышают проницаемость мембран, изменяют активность ферментов и влияют на взаимосвязь элементов функциональных ансамблей. Так, нарушение протонной проводимости мембраны митохондрий разобщает дыхание и окислительное фосфорилирование. Электронномикроскопическое изучение показывает, что замораживание изолированных митохондрий —196°C без криопротектора увеличивает количество митохондрий с лабильно сопряженным матриксом на 2 и с полностью изолированным внутренним содержимым — на 92%.

При нарушении целостности лизосомальных мембран происходит выход в клетку активных гидролитических ферментов, интенсивно разрушающих клеточные компоненты. Показано, что замораживание без криопротекторов вызывает значительные разрушения не только мембран субклеточных структур, но и компонентов белоксинтезирующей системы клеток. Радиоизотопным методом установлено значительное подавление в них синтеза белков и нуклеиновых кислот после замораживания и отогрева.

Теоретические исследования, проведенные в модельных опытах и отражающие лишь отдельные черты реакции сложной и многогранной биологической системы, подвергаются в настоящее время дальнейшей всесторонней экспериментальной проверке. В частности, установлено, что реакция клетки на экстремальные воздействия определяется такими параметрами, как поверхностно-объемное отношение, коэффициент диффузии проницаемости мембраны для растворенных веществ, модуль ее упругости и т. д. Характер взаимодействия клетки и окружающей среды определяется также видом и концентрацией криопротектора, продолжительностью экспозиции клеток в защитной среде до начала охлаждения, скоростью охлаждения до начала кристаллизации, интенсивностью теплоотвода в период фазового превращения, скоростью охлаждения от точки эвтектики до температуры хранения, а также скоростью отогрева.

Теплофизические исследования позволили установить точки фазовых переходов, теплоты кристаллизации, величины переохлаждения, теплопроводности растворов и клеточных суспензий в зависимости от концентрации защитного вещества и скорости охлаждения. Полученные данные использованы при составлении программы низкотемпературного консервирования клеток крови и костного мозга.

Проведено аналитическое описание процесса обезвоживания клеток при замораживании. Получено кинетическое уравнение — линейное дифференциальное уравнение 1-го порядка, которое в отличие от уравнения Мазура может быть исследовано аналитически и позволяет легко оценить переохлаждение протоплазмы клеток как функцию скорости охлаждения и параметров клетки. Кроме того, полученное уравнение справедливо в области реальных концентраций в отличие от уравнения Мазура, которое может быть получено из него в пределах малых концентраций.

Проведенное изучение позволило объяснить несоответствие между результатами теории Мазура и экспериментальными данными по внутриклеточной кристаллизации в эритроцитах. Показано, что применяемые в работе Мазура предположения о незначительности градиентов внутри клетки по сравнению с разностью концентраций по обе стороны мембраны для эритроцитов не выполняются.

Описание обезвоживания эритроцитов с учетом переохлаждения протоплазмы и изменений объема клетки согласуется с литературными данными и подтверждается проведенными нами электронно-микроскопическими исследованиями внутриклеточной кристаллизации в эритроцитах.

Изучение температурного шока и осмотического лизиса позволило впервые построить аналитическую модель указанных выше явлений. Экспериментально доказано влияние на сохранность клеток крови и костного мозга таких параметров, характеризующих условия низкотемпературного консервирования, как концентрация криопротектора (ПЭО-400), продолжительность экспозиции клеток в ограждающей среде до начала охлаждения, скорость охлаждения до начала кристаллизации и после эвтектической области, продолжительность кристаллизации, скорость отогрева в области фазового превращения.

На основании проведенных опытов предложены общие подходы для разработки эффективных методов низкотемпературного консервирования ядросодержащих клеток крови. В нашем институте выполнены оригинальные исследования по созданию криопротекторов на основе полимеров окиси этилена. Эти работы направлены на создание криопротекторов с заданными свойствами и изучение механизма их действия. Прикладные исследования предусматривали разработку эффективных методов низкотемпературного консервирования биологических объектов и внедрение их в практическую медицину и другие области биологии.

Установлено, что полимеры окиси этилена — полиэтиленоксиды (ПЭО) — криопротекторы широкого диапазона защитного действия, проявляющегося на различных биологических объектах (ядросодержащих клетках крови и костного мозга, эритроцитах человека, сперматозоидах ценных пород рыб, микроорганизмах, штаммах опухолей, роговой оболочке, коже, эндокринных железах и других объектах).

В настоящее время изучаются возможности применения ПЭО при низкотемпературном консервировании органов. Эффект криозащиты клеток зависит от природы, физико-химических свойств и молекулярного веса полимера.

ПЭО низкого молекулярного веса (100—300) проникают в клетки, по характеру криозащиты близки к глицерину и другим эндоцеллюлярным криопротекторам. ПЭО-400 проявляет свойства эндо- и экзоцеллюлярного криопротекторов, ПЭО более высокого молекулярного веса следует отнести к группе экзоцеллюлярных. Выяснено, что ПЭО-400 обеспечивает высокую криозащиту ядросодержащих клеток крови и костного мозга, сохраняя высокий уровень жизнеспособных элементов (до 90% клеток); ПЭО более высокого молекулярного веса оказывает хороший защитный эффект при замораживании эритроцитов человека (обеспечивают сохранность свыше 85% клеток).

При взаимодействии ПЭО-400 с ядросодержащими клетками установлено его ингибирующее действие на потребление кислорода и активность ряда окислительно-восстановительных ферментов. Полная обратимость ингибирующего действия видна при удалении криопротектора из клеточной взвеси.

Таким образом, установлено, что полиэтиленоксид с молекулярным весом 400 обладает криопротекторной активностью в отношении ядросодержащих клеток крови и костного мозга. Для обеспечения высокого уровня жизнеспособности клеток в его присутствии необходим щадящий многоступенчатый режим охлаждения, в то время как полиэтиленоксид более высокого молекулярного веса проявляет выраженное криозащитное действие при замораживании эритроцитов человека с более высокой скоростью.

Раскрытие особенностей механизма криозащитного действия полиэтиленоксида — предмет фундаментальных исследований. Изучение процессов, происходящих в сложных системах биологический объект — криопротектор — вода, ионы, белки, пребывающих в состоянии обмена, представляет значительные трудности, а трактовка обнаруженных феноменов сложна и обычно неоднозначна. Некоторые закономерности удается выявить на более доступных системах, другие требуют моделирования.

Полиэтиленоксид оказывает влияние на состояние наружных плазматических мембран клеток, содержание в них воды и другие свойства, а также на физико-химические параметры окружающей среды. Показано, что полиэтиленоксид изменяет характер кристаллизации воды, примерно на два порядка уменьшая размеры кристаллов льда при замораживании, что подтверждается данными рентгено-, кристалло- и термографического анализов. Особенности процесса кристаллизации следует считать следствием влияния ПЭО на структуру водных растворов, о чем свидетельствуют результаты изучения гидратации криопротектора, степень которой в свою очередь зависит от молекулярного веса полимергомолога. При этом возможно связывание воды, свободно проходящей через клеточную мембрану, что может приводить к частичной дегидратации клеток и повышению вязкости внутриклеточного содержимого и, таким образом, возможно, к повышению криоустойчивости клетки. Электронограммы показали, что замораживание таких наиболее осмолаллильных органоидов, как митохондрии, до температуры —196°C под защитой 10%-ного раствора ПЭО-400 позволяет

сохранить их без существенных повреждений. Методами ЯМР и ЭПР показана способность ПЭО образовывать обратимые комплексы с некоторыми металлами, что, по-видимому, может предупредить повреждающее действие гиперконцентрации солей в процессе замораживания. Опыт, накопленный при изучении криозащитного действия ПЭО, позволил подойти к созданию новых криопротекторов. Ведя направленный синтез, удалось создать оригинальные, прежде неизвестные, весьма эффективные криопротекторы, экспериментальное изучение которых в настоящее время завершается.

Успех пересадки свежих криоконсервированных аллогенных тканей в большой степени зависит от решения проблем трансплантационного иммунитета. К ним относятся в первую очередь обеспечение максимального совпадения антигенов тканей донора и реципиента по основным локусам гистосовместимости и преодоление тканевой несовместимости оптимальными методами иммунодепрессии. Самостоятельный интерес представляет изучение вопроса о возможном изменении антигенного спектра клеток под влиянием низких температур.

Не менее важно исследование иммунобиологических перестроек криоконсервированных аллотрансплантатов и механизма их взаимодействия с организмом реципиента. В экспериментах на моделях кожных криоконсервированных аллотрансплантатов обнаружены изменения иммуногенных свойств, а также динамики иммунных реакций реципиента на трансплантаты. Предстоит выяснить причины изменения иммунобиологических свойств реконсервированных тканей, глубину возможных антигенных перестроек и степень их обратимости. Выявлена разная степень криочувствительности иммунокомпетентных и родоначальных клеток крови, установлены приживление в организме стволовых клеток и сохранение функциональных свойств лимфоцитов реципиента после реконсервации.

Необходима разработка наиболее эффективных способов низкотемпературной консервации стволовых клеток, тканевых и периферических лимфоцитов, столь важных для лечения иммунодефицитных состояний различного генеза, лучевой болезни, применения цитостатиков и др.

Одно из основных наших достижений — разработка методов криоконсервирования ядродержащих клеток крови и костного мозга и хранение их при температуре -196°C под защитой ПЭО-400. Не меньшее значение для практического здравоохранения имеет проблема криоконсервирования других тканей (роговицы, кожи и т. д.). Не прекращаются поиски средств и методов, позволяющих сохранять ткань роговой оболочки в течение длительного времени в жизнеспособном состоянии. Это вызвано постоянно расширяющимися показаниями для кератопластики, а также необходимостью создания запасов для нужд практической медицины. Нами установлена сохранность ткани роговой оболочки при криоконсервировании под защитой криопротектора ПЭО-400, а также выбраны адекватные критерии оценки качества консервируемой ткани на этапах эксперимента и выяснены характеристики криоповреждений указанной ткани.

На тотальных препаратах роговой оболочки установлена активность ряда ферментов (сукцинатдегидрогеназы, глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы, НАД-диафотазы), что позволяет оценивать качество деконсервированного материала и более эффективно проводить последующую трансплантацию ткани.

Обнаружено, что интенсивность потребления кислорода роговицей под защитой ПЭО-400 сохраняется на 83,6% после завершения цикла «замораживание—отогрев». Электронномикроскопические исследования клеток роговой оболочки подтвердили сохранность внутриклеточных образований. Проводятся исследования по низкотемпературному

консервированию кожи человека для последующей аутотрансплантации больным с ожогами. Полученные данные указывают на реальность создания способов низкотемпературной консервации кожи человека под защитой ПЭО-400, применение которого повысит уровень и качество лечения больных с распространенными глубокими ожогами. Низкотемпературное консервирование кожи человека позволит также создать запасы ее, что важно при оказании медицинской помощи в случаях массовых поражений.

Изучается низкотемпературное консервирование органов под защитой ПЭО-400 на щитовидной железе, а также разрабатываются некоторые подходы к решению проблемы долгосрочного консервирования сердца и почек животных.

Эффективность научных исследований и внедрение медико-биологических разработок в практику в решающей мере зависят от уровня технических средств криоконсервирования. Физико-техническим институтом низких температур АН УССР совместно с нами созданы три комплекса оборудования. Последняя модель биоконкомплекса (УКМ-72) утверждена МЗ СССР к серийному производству. Характерной особенностью комплекса является то, что он состоит из самостоятельных аппаратов и оборудования, обеспечивающих выполнение технологических процессов криоконсервирования: замораживания, хранения и оттаивания биологических объектов как при научно-исследовательской работе, так и при практическом применении материала. Биоконкомплекс УКМ-72 используется для криоконсервирования различных биологических объектов. Конструкторское бюро нашего института проводит его модернизацию с целью улучшения технических параметров. В институте ведется также разработка новой аппаратуры для исследовательских целей. Создана криоприставка к микроскопу для наблюдения процесса кристаллизации при замораживании и оттаивании клеточных суспензий в прямом и отраженном свете.

Таким образом, подводя итоги проводимым в институте исследованиям, можно считать, что основными задачами в области фундаментальных разработок являются всестороннее изучение физико-химических и морфофункциональных основ механизмов криоповреждений и криозащиты на различных уровнях биологической организации, а также создание научных основ и методов криоконсервирования биологических объектов с целью их долгосрочного хранения в низкотемпературном состоянии.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
12. XII 1975 г.

N. S. Pushkar'

LOW-TEMPERATURE CONSERVATION OF TISSUES (RESULTS AND PROSPECTS OF DEVELOPMENT)

Summary

The present-day state of cryobiological studies is analyzed and the problems are stated which must be solved in the nearest future.

АУТОРЕГУЛЯЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ НА ТЕМПЕРАТУРНОЙ ШКАЛЕ

Проявление жизненных свойств наблюдается в сравнительно узком температурном интервале, но границы способности сохранять жизненные свойства широко раздвинуты, особенно в сторону низких и сверхнизких температур. Это не два взаимоисключающих определения, а констатация единства противоречивых свойств живого, его жизнедеятельности и жизнеспособности, термолабильности основных биоматериалов и удивительной пластичности системы в целом, способной адаптироваться к самым различным воздействиям и неблагоприятным условиям.

Основные биоматериалы (белки, нуклеиновые кислоты) мало устойчивы к действию высоких температур и, претерпевая необратимые конформационные изменения, сравнительно легко переносят сильное охлаждение. Существенную роль в изменении биоматериалов под влиянием термических факторов играют вода, ее связь с биомакромолекулами, гидратация и дегидратация их — процессы, в значительной степени определяющие верхние и нижние температурные границы жизни. Если верхние температурные границы в основном определяются термолабильностью макромолекулярных носителей жизни, то нижние не могут быть однозначно связаны с холодовой денатурацией биополимеров, поскольку они значительно «терпимее» к низким температурам, чем к высоким. Основным фактором холодового повреждения биологической системы, согласно мнению большинства криобиологов, является льдообразование, способствующее дегидратации, осмотическому шоку клетки и разрушению ее морфофункциональных структур. Вода и ее фазовые переходы играют исключительно большую роль во всех явлениях криоповреждений биообъектов, поэтому криозащита направлена в основном на создание препятствий для внутри- и внеклеточного образования льда и на обеспечение условий для витрификации воды, профилактики или устранения осмотического шока и т. д. Вода рассматривается, конечно, в тесной связи с состоянием биомакромолекул, и хотя последние, как указывалось выше, не обнаруживают при криовоздействиях таких отчетливых денатурационных изменений, как при нагревании, но система белок—вода, соответствующая основному строительному материалу биологической системы, претерпевает те сдвиги, глубина, обратимость или необратимость которых могут оказаться решающими для сохранения или утраты системой жизнеспособности.

Современные представления о температурных границах жизни базируются на характеристике термической выносливости биоматериалов (биомакромолекулы—вода) и являются до известной степени своеобразным «биологическим материаловедением» в условиях различных температурных режимов. Однако жизнедеятельность и жизнеспособность не совпадают с надежностью биоматериала; не менее существенна для них надежность организации, причем организации не только морфофункциональной, но и метаболической, включающей обмен веществ и энергообмен, биокатализ, регуляцию и ауторегуляцию. Живое — это открытая система (ассимилирующая вещество, энергию и информацию), самовоспроизводящаяся и саморегулирующаяся. Температурный интервал жизнедеятельности указанной системы определяется не только и не столько надежностью структурных элементов и даже их микроархитектуры, сколько надежностью ее ауторегуляции, способностью оставаться или возвращаться в состояние саморегулирующейся, самонастраивающейся, самоорганизующейся системы.

Следует помнить, что между свойствами биоматериалов, обменом, биокатализом и регуляцией существуют глубокая связь и единство. Современная биохимия при всем многообразии ее задач и достижений может быть сведена к четырем узловым взаимосвязанным проблемам: структуре живого вещества; обмену веществ, энергии и информации; биологическому катализу; регуляции и ауторегуляции. Химия живого вещества, включающая его молекулярные и надмолекулярные структуры, находится в неравновесном состоянии, которое может сохраняться только с помощью непрерывного обмена веществ и энергии. Этот обмен, интегрирующийся из множества отдельных химических реакций, не может происходить при температурах, при которых могут существовать основные компоненты живого. Указанное противоречие разрешается в изотермическом ускорении реакций с помощью биокатализаторов (ферментов). Наличие в клетке многих сотен биокатализаторов обуславливает возможность почти бесконечного числа вариантов реакций превращения субстратов и метаболитов самыми разнообразными путями. Однако сквозь неисчерпаемое количество возможностей проявляется та упорядоченная необходимость, которая превращает множество возможных реакций в биологический обмен. Это осуществляется в процессах регуляции и ауторегуляции, в которых принимают участие и свойства компонентов живого (макромолекул, мембран и др.), и особенности обмена (общие субстраты и косубстраты, метаболиты), и свойства биокатализаторов (специфичность, отношение к активаторам и ингибиторам, аллостерические эффекты), и, наконец, непосредственные факторы регуляции (аутокатализаторы и аутогормоны, гормоны и медиаторы).

Изучение биообъектов осуществляется на различных уровнях: субмолекулярном, молекулярном, субклеточном, клеточном, органно-тканевом, организменном, экологическом. Для каждого из них характерны определенные факторы ауторегуляции, формирующие некоторый этаж организации биологической системы. Каждый уровень более высокого порядка включает ряд других и оказывает на них влияние, причем его ауторегуляция становится для них регуляцией. Ауторегуляция более высокого уровня, обеспечивающая его динамический гомеостаз, как бы вмешивается в ауторегуляцию подчиненных уровней, сдвигая их ауторегуляторные процессы. Соотношение таких ауторегуляций является регуляцией в одном направлении и обратными связями — в другом. Происходит как бы проекция одного уровня ауторегуляции на другой.

Ряд ферментных процессов, регулируемых с помощью аллостерических эффектов, встречается в клетке с ауторегуляцией более высокого порядка — ауторегуляцией не ряда, а сетки химических процессов. Регулирующими факторами становятся общие для нескольких рядов химических реакций метаболиты, например ацетил и ацетил-КоА, а также такие вещества, как НАД и НАД·Н; НАДФ и НАДФ·Н; АДФ и АТФ.

Накопление НАД способствует интенсификации катаболических процессов, НАД·Н — усилению анаболизма. Аналогично АМФ и АДФ стимулируют экзо-, а АТФ — эндогенные реакции. Эти факторы в тесном взаимодействии с функцией аллостерических ферментов и конформационными изменениями биомакромолекул осуществляют элементарные процессы ауторегуляции внутриклеточного обмена. Указанная ауторегуляция одновременно является регуляцией по отношению к ауторегуляциям отдельных биохимических и биофизических актов и регулируется системой более высокого порядка (гисто- и нейрогормональной).

Криобиохимия располагает большим фактическим материалом, позволяющим судить о влиянии низких и сверхнизких температур на структурные, функциональные и биокаталитические макромолекулы,

на мембраны и клетки. В то же время «белым пятном» остается проблема влияния криогенных факторов и криопротекторов не на отдельные уровни биологической организации, а на межуровневые связи, на проекции одного уровня на другой. Поскольку эта проекция осуществляется взаимосвязью ауторегуляторных процессов, заслуживает внимания вопрос о влиянии низких и сверхнизких температур, охлаждения и последующего отогрева на способность ауторегуляторных факторов одного уровня взаимодействовать с факторами другого, например, вопрос о взаимодействии гормонов и медиаторов нервной системы с ферментами (непосредственно или через геном, или через циклические нуклеотиды), с рецепторами, а последних, в свою очередь, со вторыми медиаторами гормонального действия и далее с каталитическими белками.

При изменении условий одно соотношение ауторегуляций нарушается, но сейчас же формируется другое, адаптирующее систему к новым условиям. Регуляция и ауторегуляция чувствительны к температурным сдвигам, они в значительной степени определяют узкий температурный интервал жизнедеятельности и одновременно широкие температурные границы адаптации и возможного сохранения жизнеспособности.

Из рассмотренного выше вытекает необходимость исследования влияния криогенных факторов и криопротекторов на процессы регуляции и ауторегуляции биологической системы и на способность полноценной реституции этих процессов после отогрева.

Проблема низкотемпературной консервации отдельных органов, тканей или клеток базируется на поиске условий и факторов сохранения некоторой основной функции, на попытках достижения монофункциональной реституции, такой, например, как накопление меченого иода в ткани криоконсервированной щитовидной железы, экскреторная функция почки, систола и диастола сердца, связывание и перенос кислорода эритроцитами и т. д. Однако существенное значение имеют состояние и реституция факторов, играющих роль в регулировании так называемой основной функции, например отношение к тиреотропному гормону в случае криоконсервированной щитовидной железы, к вазопрессину и альдостерону в случае исследования почки, к адренергическим и холинергическим воздействиям в случае изучения сердца и т. д.

В отношении изолированных клеточных элементов, функция которых не обнаруживает отчетливо выраженных связей с нейрогуморальными регуляторными механизмами, возможны иные аспекты их полифункциональной реституции, например, для эритроцита — степень восстановления кооперативных эффектов четвертичной структуры, способность ко всему ряду взаимосвязанных процессов, обуславливающих превращение системы гемоглобин эритроцита — карбонатный буфер плазмы из физико-химического в физиологический буфер.

Сохранение способности подвергнутых криовоздействиям биообъектов к полифункциональной реституции связано с устойчивостью ауторегуляционных связей, с обратимостью наступающего после адаптационных перестроек рассогласования регуляции и ауторегуляции. Для полноценной реституции криоконсервированных биообъектов, для реинтеграции биологической системы существенное значение может иметь установление на температурной шкале граничных точек способности клеток и субклеточных структур регулировать и быть регулируемы, сохранять или восстанавливать свойственную им регуляцию и ауторегуляцию.

AUTOREGULATION OF A BIOLOGICAL SYSTEM ON A TEMPERATURE SCALE

Summary

A problem is considered on significance of regulation and autoregulation processes of a biological system for maintaining its viability at low and superlow temperatures. Some main problems of cryobiology are analyzed theoretically on the basis of the author's conception on the processes and functions as a relation of autoregulation mechanisms of different levels and «projection» of one level of biological organization to the other.

УДК 57:536.48.047

Джон Фарант

ПЕРЕСМОТР НЕКОТОРЫХ КРИОБИОЛОГИЧЕСКИХ КОНЦЕПЦИИ

У большинства биологов и медицинских работников, применяющих низкие температуры для сохранения или разрушения клеток, зачастую нет ни времени, ни склонности к изучению механизма повреждения клеток либо к исследованию механизмов, посредством которых различные факторы влияют на выживаемость клеток. Часто для проведения некоторых биологических или клинических анализов для сокращения времени вместо свежего материала используют деконсервированные клетки.

Вследствие того что число постоянных исследований в области криобиологии невелико, они оказываются оторванными от работников практической сферы, таким образом возникает проблема связи теории с практикой. Вместе с тем на том лишь основании, что какой-либо метод успешно срабатывает в одной клеточной системе, возникают понятия и представления, которые затем неоправданно переносятся на новые, или другие, объекты.

Представляется целесообразным обсудить вкратце ряд общих вопросов, касающихся механизмов повреждения и защиты в криобиологии на клеточном уровне, попытаться осветить различные стороны одного и того же вопроса, предположив тем самым, что правильный ответ на него кроется не в том, что считается очевидным и является наиболее общепринятым. В настоящее время предельно ясно, что дальнейшие практические достижения исследований в области хранения и разрушения клеток при замораживании и оттаивании зависят от глубины познания основных физических и биологических процессов, происходящих при этом.

Является ли «минимальный объем» причиной или следствием повреждения клетки? При замораживании удаление воды в виде льда вызывает увеличение концентрации внеклеточных растворенных веществ. В течение многих лет исследователи в области криобиологии пытались выяснить, какой из факторов, участвующих в этом физическом явлении, вызывает повреждение клетки при замораживании. Вначале считалось, что сами кристаллы льда, проникая в клетку, повреждают клеточную мембрану. Позже мнения исследователей разделились. Одни считали повреждение результатом действия на клетки растворов высокой ионной силы, в то время как другие связывали повреждение клеток со сморщиванием под действием высокой осмолярности среды.

Меримен на основании данных, полученных при замораживании

клеток и в экспериментах на моделях, в которых воспроизводится повышенная концентрация внутриклеточных веществ, предположил, что причина повреждения клеток кроется в непосредственно наблюдаемом уменьшении их объема [21]. Суть этой идеи заключается в том, что при дегидратации клеточная мембрана спадается в направлении внутриклеточных высокомолекулярных растворенных веществ (для эритроцитов это гемоглобин). Когда весь внутриклеточный объем занимает молекулами гемоглобина, силы, управляющие удалением воды, все еще продолжая действовать, вызывают на мембране градиент гидростатического давления, который и повреждает ее. Поскольку мембрана повреждена, объем клетки может снова увеличиваться за счет включения растворенных веществ, поглощающих воду. Так, Меримен использовал точку на шкале осмолярности, в которой клетка уменьшается до минимального объема, не только для определения времени повреждения клеточной мембраны, но и для определения механизма его развития. Ясно, что хотя минимальный объем может выражаться точкой, при которой повреждается клеточная мембрана, механизм указанного повреждения может быть не связан с градиентом гидростатического давления. Объяснением, исключающим первое, по крайней мере для клеток млекопитающих, является то, что само по себе гидростатическое давление может не существовать и даже в случае высокой степени сморщивания клетки клеточная вода может оставаться в равновесии с внешней средой за счет концентрационнозависимых изменений осмотического коэффициента внутриклеточных коллоидов. Данное явление известно для гемоглобина [1], и результатом его является то, что вблизи минимального объема потеря небольших количеств воды сопровождается значительными изменениями коэффициента осмолярности гемоглобина, что существенно влияет на активность воды-растворителя. Указанное предположение убеждает в том, что для объяснения причин повреждения клеток не обязательно привлекать понятие градиента гидростатического давления [8]. Следовательно, повреждение клеточной мембраны может происходить за счет какого-то другого механизма, а раз оно произошло, проницаемость мембраны нарушается и клетка может увеличиваться в объеме за счет включения воды и растворенных веществ. Таким образом, явление минимального объема определяет момент, когда происходит повреждение клетки, но не объясняет механизма указанного повреждения.

Являются ли полимерные криопротекторы «буферами» концентрации солей? Много лет тому назад Лавлок [12] показал, что низкомолекулярные криозащитные агенты типа ДМСО и глицерина изменяют концентрационные взаимоотношения растворенных веществ в системе процесса замораживания. Известным подтверждением сказанного выше является наблюдаемое повышение концентраций хлористого натрия при замораживании физиологического раствора без криозащитного агента с образованием льда. Очень резкое увеличение концентрации хлористого натрия отмечается при достижении эвтектической точки. Замещение воды небольшими количествами криозащитных агентов типа ДМСО перед замораживанием физиологического раствора хлористого натрия уменьшает количество образующегося льда при всех температурах. В результате, поскольку при замораживании увеличивается не только концентрация поваренной соли, но и концентрация добавленного криозащитного агента, увеличение концентрации соли менее заметно, чем в отсутствие ДМСО. В течение многих лет считалось, что это свойство криозащитных агентов обусловлено их низким молекулярным весом и поэтому его относили к коллигативным свойствам, т. е. связанным с числом молекул в растворе и, следовательно, с их способностью снижать первоначальную температуру замерзания раствора. Отсюда следовало, что высокомолекулярные соединения, такие как

бычий сывороточный альбумин (БСА), гидроксипропилированный крахмал и поливинилпирролидон (ПВП), не могут оказывать такого же действия, поскольку они незначительно понижают начальную температуру замерзания. При замораживании обычного физиологического раствора NaCl концентрация соли увеличивается более чем в 30 раз. Не следует ожидать подобного при замораживании раствора, содержащего 10% ПВП, поскольку в этом случае концентрация полимера должна была бы превысить 100%.

Свойства полимеров при замораживании в водных растворах известны в течение многих лет, и их можно описать следующим образом. Первоначально они действуют как высокомолекулярные соединения, вызывая лишь незначительное понижение точки замерзания, но с началом замораживания концентрация полимеров увеличивается, слой воды между соседними молекулами становится все тоньше и молекула полимера начинает вести себя как молекула с небольшим молекулярным весом. Это вызывает резкое уменьшение количества образующегося при замораживании льда. Не проникающие в клетку полимеры оказываются такими же эффективными криопротекторами, как и соединения с низким молекулярным весом (такие как ДМСО и глицерин), становясь «буфером» поваренной соли при медленном вымораживании льда клеток [4].

Связан ли термический шок с повреждением при замораживании? Всегда трудно определить относительное влияние различных факторов, действующих при медленном замораживании, на конечную сохранность клеток. Теперь ясно, что при увеличении концентрации растворенных веществ в процессе замораживания действие различных факторов происходит одновременно. Эксперименты на модельных системах показали, что при постоянных температурах выше 0°C высокие концентрации непроникающих соединений типа поваренной соли и сахарозы вызывают повреждение, непосредственно коррелируемое с избыточным сморщиванием клетки. Подобное повреждение не наблюдается при такой же осмолярности, если концентрированным раствором является подобное ДМСО вещество, которое может проникать в клетку [5]. Однако при более низких концентрациях на шкале осмолярности клетка прямо не повреждается, но погибает, если впоследствии возникают стрессовые явления [13, 22]. Указанное явление хорошо продемонстрировано на эритроцитах человека. Чувствительность клеток к повреждению при возникновении стрессовой ситуации наблюдается чаще всего тогда, когда растворенное вещество находится в ионизированном состоянии. Примерами стрессовых ситуаций, повреждающих клетку в таких условиях, являются снижение температуры (термальный шок) или возвращение в изотоническую внешнюю среду. Хотя перечисленные факты установили в опытах с использованием моделей без замораживания, выяснилось, что в повреждении при медленном замораживании действуют все указанные механизмы.

Например, при замораживании клетка подвергается действию увеличивающейся ионной силы, при этом могут возникнуть напряжения в результате перепада температур. При более низких температурах в процессе замораживания на клетку воздействуют повышающиеся концентрации веществ, что может вызвать ее сморщивание и непосредственное повреждение. При оттаивании в процессе плавления льда происходит возвращение к изотоническим условиям, тем самым снова создается стрессовая ситуация, к которой клетка может быть чувствительной. В прошлом роль термического шока в повреждении замораживанием недооценивали по той простой причине, что многие типы клеток можно охлаждать до 0°C без повреждения холодным шоком. Однако теперь ясно, что сенсибилизирующие факторы часто могут иметь место до термического шока.

Для эритроцитов таким фактором является высокая ионная сила. Недавно мы показали, что полиморфноядерные лейкоциты человека подвергаются термическому шоку в средах, содержащих ДМСО, и без повышения ионной силы, но это явление наблюдается только в диапазоне температур ниже -10°C [9]. Поэтому нельзя сбрасывать со счета возможность сенсibilизации к повреждению термическим шоком при замораживании, когда клетки находятся в другой температурной зоне и в условиях иных концентраций, основываясь на отсутствии влияния термального шока при температурах выше 0°C .

Интересно отметить, что в объектах, в которых термический шок наблюдается при температуре выше 0°C (у эритроцитов человека в растворах высоких концентраций хлористого натрия), криозащитные агенты типа ДМСО снижают или полностью предотвращают сенсibilизацию к повреждению. Предположение о том, что термический шок и шок разбавления могут быть факторами, влияющими на повреждения замораживанием, впервые высказано Лавлоком [11], хотя он считал, что они имеют минимальное значение. Однако недавно высказано предположение о том, что эти два фактора играют ведущую роль в механизме повреждения [7].

Представление о том, что повреждение в результате термального шока связано с повреждением при замораживании, привело хотя бы к частичному объяснению механизма воздействия различных скоростей охлаждения в обеих системах. Когда эритроциты человека оставляют в гипертонических растворах хлористого натрия при $+25^{\circ}\text{C}$ на различные периоды времени, клетки прежде всего становятся чувствительными к повреждению термическим шоком, о чем свидетельствует гемолиз после быстрого охлаждения до 0°C . Однако при более длительном пребывании в гипертоническом солевом растворе при 25°C клетки не повреждаются при охлаждении до 0°C , что указывает на то, что они становятся десенсibilизированными [22]. Указанное явление может объяснить, почему клетки, медленно охлаждаемые при температуре от 25 до 0°C , повреждаются меньше, чем быстро охлажденные клетки [14]. При медленном охлаждении клетки имеют достаточно времени для перехода через стадию сенсibilизации к стадии десенсibilизации, прежде чем возникает какая-нибудь существенная стрессовая ситуация (которой является снижение температуры). Это свидетельствует о том, что в случае термального шока у эритроцитов человека критическое воздействие скорости охлаждения на их выживаемость определяется не первичной природой скорости охлаждения, а влиянием времени пребывания клеток при различных температурах, обусловленного режимом охлаждения. Этот анализ привел нас к новому исследованию методики двухэтапного замораживания, в которой была пересмотрена первичная роль скорости охлаждения.

Является ли скорость охлаждения определяющим фактором в криоповреждении? Известно, что большинство типов клеток сильно повреждается при быстром охлаждении до очень низких температур. Некоторые клетки выживают после замораживания даже без криозащитных агентов, если охлаждение проводить медленно; скорости охлаждения, дающие лучшую выживаемость, изменяются в зависимости от типа клеток. Однако большинству клеток для выживания необходимо добавление проникающего или непроникающего криозащитного агента.

Хорошо известно, что для каждого типа клеток существует своя концентрация криозащитного агента и скорость охлаждения, обеспечивающая самую лучшую выживаемость. При более медленных и более быстрых скоростях повреждение увеличивается. Общий вид кривой выживаемости как функции от скорости охлаждения привел исследователей к выводу о том, что существуют по крайней мере два механизма повреждения клеток: один является доминирующим при медленных

скоростях, а другой — при более быстрых [15, 19]. Обычно кривая выживаемости смещается в сторону более медленных скоростей охлаждения, если увеличивается концентрация любого криозащитного агента. Это дает основание предположить, что указанные вещества эффективнее защищают клетки от повреждения при медленном охлаждении, чем при быстром.

Согласно общепринятому мнению, высказанному впервые Лавлоком, повреждение при медленном охлаждении обусловлено продолжительной экспозицией клеток в условиях повышенных концентраций растворенных веществ, вызванных образованием внеклеточного льда. Такое изменение концентраций может повреждать клетку либо непосредственно, либо вызывая осмотическое сморщивание, либо, как мы показали выше, сенсибилизируя клетку к повреждению при появлении таких стрессовых ситуаций, как перепад температур. В противоположность этому на основании теоретических и практических данных можно предположить, что при более быстрых скоростях охлаждения у клеток оказывается недостаточно времени для сморщивания и их внутренняя вода замерзает, вместо того чтобы быть удаленной из клетки вследствие осмотического градиента.

Из изложенного выше следует, что существует взаимосвязь между типом клетки, концентрацией и природой криозащитного агента, определяющей скорость охлаждения, обеспечивающую лучшую выживаемость. Данная взаимозависимость хорошо описана в литературе для некоторых типов клеток [10, 20]. Она обусловлена совместным действием различной проницаемости клеток для воды (влияющей в основном на образование внутриклеточного льда при быстром охлаждении) и относительной эффективностью криозащитных агентов в зависимости от модификации физических факторов, таких как ионная сила, при любой температуре в процессе замораживания (что влияет преимущественно на повреждение при медленном охлаждении).

Из-за простоты использования переменной скорости охлаждения в экспериментах и общей природы кривой выживаемости как функции скорости охлаждения для различных типов клеток возникло мнение, что скорость охлаждения является ведущей переменной, влияющей на конечную выживаемость клеток.

Поскольку, как уже упоминалось, влияние скорости охлаждения на выживаемость можно объяснить временем пребывания объекта при определенной температуре, логично задать вопрос: если скорости охлаждения не являются определяющими переменными, нельзя ли их объяснить влиянием продолжительности пребывания клеток при различных температурах и одновременным возникновением стрессовых ситуаций?

Необходимо помнить, что повреждение осуществляется с помощью двух механизмов, оба из которых не зависят от времени. Один заключается в повреждающем действии на клетки высоких концентраций растворенного вещества независимо от того, осуществляется это действие непосредственно или с помощью описанного явления сенсибилизации. Второй заключается в регулировании окончательного количества внутриклеточного льда, зависящего от времени, в течение которого происходит сморщивание клетки в данных осмотических условиях. Ясно, что в случае первого механизма увеличение времени кажется более повреждающим, в то время как для второго увеличение времени приведет к уменьшению количества образующегося льда. Интересно было рассмотреть простую систему замораживания клеток до постоянной субнулевой температуры, например -25°C , прежде чем оставлять их в изотермических условиях при этой температуре для развития защитного механизма перед вторым быстрым охлаждением до температуры жидкого азота. Механизм защитного действия будет за-

ключаться либо в подготовке клетки к переходу через стадию сенсibilизации к стадии десенсibilизации в результате некоторого изменения в их мембранах, либо в обеспечении времени для сморщивания, что снижает образование внутриклеточного льда на втором этапе охлаждения. В литературе было несколько сообщений о том, что период пребывания клеток в замороженном состоянии при определенной температуре оказывает защитное действие при последующем охлаждении до очень низких, субнулевых, температур [2, 16, 23]. Мы еще раз проанализировали указанное явление на примере лимфоцитов и клеток культур ткани и обнаружили, что в изотермический период происходят два основных процесса [6].

Первый — ожидаемое явление защиты клеток против замораживания при последующем охлаждении. Второй — то, что клетки сами повреждаются при указанной температуре. Это повреждение легко определяется оттаиванием образцов от температуры выдержки через различные периоды времени. Между данной двухэтапной системой замораживания и системой с регулируемой скоростью охлаждения существует почти полная аналогия, которая позволяет сделать вывод, что скорость охлаждения не является первичной переменной клеточной выживаемости. Для подтверждения справедливости высказанных предположений можно привести следующие примеры.

1. Очень медленные скорости охлаждения повреждают клетку. Это повреждение снижается при применении криозащитных агентов. Подобные нарушения могут наблюдаться в образцах, размороженных непосредственно от температуры охлаждения при двухэтапной программе через более длительные периоды времени. Это повреждение также заметно уменьшается при использовании криозащитных агентов.

2. Эффект защиты от последующего охлаждения при температурах выдержки — «holding temperature» — хорошо коррелирует со способностью клеток к сморщиванию. Например, очевидно, что клетки, содержащие внутриклеточный лед, при первом снижении температуры до температуры хранения не смогут сморщиться при этой температуре. Однако электронномикроскопические исследования замещенных в замороженном состоянии клеток показали, что при достаточном времени при температуре выдержки клетки сморщивались [26]. Как и в случае повреждения клеток при быстром охлаждении, присутствие криозащитных агентов практически не влияет на защиту клеток выдержкой при определенной температуре при двухэтапном охлаждении.

Двухэтапное охлаждение не только дает основную аналитическую информацию о механизмах повреждения при замораживании, но также обеспечивает более высокую степень сохранности в данной криозащитной среде по сравнению с охлаждением с оптимальной скоростью [6]. Это может быть обусловлено тем, что при двухэтапном охлаждении клетки после сморщивания при температуре выдержки с минимальным повреждением затем быстро проходят через зону возможного повреждения при более низких температурах до температуры хранения. В этом заключается отличие указанного метода от такового оптимальной скорости охлаждения, которая уменьшает повреждение клеток при высоких температурах и позволяет им сморщиваться до пределов, достаточных для избежания образования внутриклеточного льда. Однако скорость охлаждения затем приводит, возможно, к большему повреждению за счет влияния очень высоких концентраций растворенных веществ, возникающих при охлаждении клеток до температуры хранения. Данный анализ подтверждает логическое объяснение действия традиционной методики охлаждения, при которой скорость охлаждения увеличивают в 5—10 раз при снижении температуры объекта ниже -30°C .

Всегда ли внутриклеточный лед оказывает повреждающее действие? Со времени появления первых сообщений о замораживании от-

дельных клеток в суспензиях повреждение всегда связывали с наличием внутриклеточного льда. Снижение выживаемости при более быстрых скоростях охлаждения, чем оптимальная, объяснялось тем, что у клеток было недостаточно времени для сморщивания и, следовательно, они достигали низких температур при большом количестве замороженной внутриклеточной воды. Мазур и другие на основании термодинамических исследований показали, что снижение выживаемости начинается при критической скорости охлаждения, сводящей до минимума сморщивание клеток [18].

Непосредственные микроскопические наблюдения процесса образования внутриклеточного льда в быстро охлажденных клетках показали, что оно коррелирует с низкой выживаемостью клеток [17]. Считалось, что механизм повреждения клеток внутриклеточным льдом может заключаться в механическом разрыве клеточных мембран. Это аналогично ранним предположениям о том, что внеклеточный лед повреждает клетки при замораживании скорее непосредственным воздействием на клеточную мембрану, чем косвенным действием повышенных концентраций растворенных веществ, наблюдающихся вне клетки.

Если внутриклеточный лед всегда оказывает повреждающее воздействие и его следует избегать предварительным сморщиванием клеток перед охлаждением, то вся методика охлаждения должна заключаться в достижении указанной цели. Однако в литературе имеются единичные сообщения о том, что клетки могут выживать даже при наличии внутриклеточного льда. Результаты исследований Азахины представляют особый интерес, показывая, при каких условиях лед оказывает повреждающее действие. Азахина установил, что у клеток асцитных опухолей быстрое охлаждение вызывает внутриклеточное замораживание в виде очень мелких кристаллов льда. Если размораживание проводится очень быстро, некоторые из этих клеток выживают, что подтверждается способностью суспензии вызывать образование опухоли при пересадке. И наоборот, при медленном отогреве при температурах немного выше -30°C мелкие кристаллы льда внутри клеток в процессе рекристаллизации вырастают в большие, о чем свидетельствуют микроскопические наблюдения. Все клетки после оттаивания были мертвыми. Таким образом, доказано, что по крайней мере для этой системы летальным оказывается не просто наличие внутриклеточного льда, а размер кристаллов.

Каким образом внутриклеточный лед повреждает клетку? Как было показано, наличие внутриклеточного льда не всегда вызывает повреждение клетки. Имеющиеся результаты дают основание предположить, что более важным фактором может оказаться рекристаллизация при отогреве, сопровождающаяся образованием крупных кристаллов льда из мелких.

В настоящее время выполнено очень мало работ по выяснению специфического механизма повреждения. Общепринятым положением является то, что кристаллы льда в клетке могут непосредственно разрывать внутриклеточные мембраны. Однако мы считаем, что может быть другое объяснение, учитывающее общий перенос воды на клеточных мембранах при оттаивании. Из различных экспериментов известно, что быстро охлажденные клетки, содержащие внутриклеточный лед, повреждаются скорее на этапе отогрева, чем на этапе охлаждения. Быстро охлажденные клетки намного чувствительнее к повреждению, возникающему при медленном отогреве, чем медленно охлажденные клетки; в дополнение при использовании методики двухэтапного замораживания более низкие температуры выдержки (эквивалентные, возможно, удалению большего количества воды из клетки) оказываются эффективнее в обеспечении восстановления при медленном оттаивании.

Если клетки, содержащие внутриклеточный лед, повреждаются при отогреве, то каким образом это происходит? Является ли лед причиной повреждения или случайно сопутствующим явлением? Одной из положительных сторон наличия как внутриклеточного, так и внеклеточного льда является то, что сила, заставляющая клетку сморщиваться, практически перестает действовать. Когда охлаждение продолжается до более низких температур, чем те, при которых впервые появляется внутриклеточный лед, внутри и вне клетки образуется больше льда и возможно, что удаление жидкой воды при этом будет более быстрым, чем любое движение воды на клеточных мембранах. Значит, клетки фактически закрыты для движения воды и дальнейшее образование льда (при продолжении охлаждения) может происходить только за счет воды, которая уже находилась в клетке, когда впервые появился внутриклеточный лед. Это относится также к явлениям, происходящим при отогреве, когда рост больших кристаллов в процессе рекристаллизации может происходить только за счет льда или, возможно, воды, уже имеющихся в клетке. Однако эти рассуждения оказываются несправедливыми в случае перепада температур между внутренней и наружной частями клетки. При отогреве объектов, содержащих различные количества льда и кристаллы разных размеров, поглощение тепла льдом локально замедляет повышение температуры вблизи более крупных кристаллов льда и тем самым вызывает температурные градиенты во всем объекте.

Как указанные начальные температурные градиенты, так и различная кривизна поверхностей больших и мелких кристаллов льда вызывают перепады в химическом потенциале воды, которые в свою очередь порождают массовые перемещения воды через клеточные мембраны, если позволяет время. Очевидно, природа и размеры внутриклеточного льда — факторы, управляющие трансмембранным движением воды, которое, возможно, имеет отношение к конечной выживаемости клеток. Такая гипотеза может оказаться полезной при планировании будущих экспериментов, направленных на получение дополнительной информации о природе повреждения клетки внутриклеточным льдом при отогреве.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучением механизмов, определяющих жизнь и смерть клеток в процессе замораживания и оттаивания, не должен заниматься только ограниченный круг исследователей в области криобиологии. Анализ этих вопросов (подчеркиваем, именно вопросов, ибо исчерпывающие ответы в данной области в большинстве случаев не получены) может привести к совершенствованию практических методов криоконсервирования, выяснению причин разрушения замораживанием—оттаиванием. Примером этому может служить использование метода двухэтапного охлаждения в исследованиях, направленных на выяснение влияния скоростей охлаждения на выживаемость клеток.

Перевод З. Б. Каминецкой

ЛИТЕРАТУРА

1. *Adair G. S.* A theory of partial osmotic pressures and membrane equilibria with special reference to the application of Dalton's Law to haemoglobin solutions in the presence of salts. — *Proc. Roy. Soc., A*, 1928, 120, p. 573—603.
2. *Asahina E.* Prefreezing as a method enabling animals to survive freezing at an extremely low temperature. — *Nature*, 1959, 184, p. 1003—1004.
3. *Asahina E., Hisada Y., Emura M.* Microscopic observations of innocuous intracellular freezing in very rapidly cooled tumor cells. — *Contributions from the Institute of Low Temperature Science, Ser. B*, 1968, N 15, p. 35—50.
4. *Farrant J.* Is there a common mechanism of protection of living cells by polyvinylpyrrolidone and glycerol during freezing? — *Nature*, 1969, 222, p. 1175—1176.

5. *Farrant J.* Human red cells under hypertonic conditions: a model system for investigating freezing damage. 3. Dimethyl sulphoxide. — *Cryobiology*, 1972, 9, p. 131—136.
6. *Farrant J., Knight S. C., McGann L. E., O'Brien J.* Optimal recovery of lymphocytes and tissue culture cells following rapid cooling. — *Nature*, 1974, 249, p. 452—453.
7. *Farrant J., Morris G. J.* Thermal shock and dilution shock as the causes of freezing injury. — *Cryobiology*, 1973, 10, p. 134—140.
8. *Farrant J., Woolgar A. E.* Possible relationships between the physical properties of solutions and cell damage during freezing. — *The Frozen Cell. A Ciba Foundation Symposium* (Wolstenholme, G. E. W., O'Connor, M. Eds). Churchill, London, 1970.
9. *Knight S. C., Farrant J., O'Brien J.* In defence of granulocyte preservers. — *Lancet*, 1975, 1, p. 929.
10. *Leibo S. P., Farrant J., Mazur P., Hanna M. G., Smith L. H.* Effects of freezing on marrow stem cell suspensions: interactions of cooling and warming rates in the presence of PVP, sucrose or glycerol. — *Cryobiology*, 1970, 6, p. 315—332.
11. *Lovelock J. E.* The haemolysis of human red blood cells by freezing and thawing. — *Biochim. et biophys. acta*, 1953, 10, p. 414—426.
12. *Lovelock J. E.* The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. — *Biochim. et biophys. acta*, 1953, 11, p. 28—36.
13. *Lovelock J. E.* Physical instability and thermal shock in red cells. — *Nature*, 1954, 173, p. 659—664.
14. *Lovelock J. E.* Haemolysis by thermal shock. — *Brit. J. Haematol.*, 1955, 1, p. 117—129.
15. *Luyet B. J.* Attempt at correlating some of the extant data on low temperature preservation of various cells. — *Fed. Proc., Supplement*, 1965, 15, p. 315—322.
16. *Luyet B., Keane J.* A critical temperature range apparently characterized by sensitivity of bull semen to high freezing velocity. — *Biodynamica*, 1955, 7, p. 281—292.
17. *McGrath J. J., Cravalho E. G., Huggins C. E.* An experimental comparison of intracellular ice formation and freeze-thaw survival of HeLa S-3 cells. — *Cryobiology*, 1975, 12, p. 540—550.
18. *Mazur P.* Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. — *J. Gen. Physiol.*, 1963, 47, p. 347—369.
19. *Mazur P., Leibo S. P., Chu E. H. Y.* A two-factor hypothesis of freezing injury. — *Exp. Cell Res.*, 1972, 71, p. 345—355.
20. *Mazur P., Farrant J., Leibo S. P., Chu E. H. Y.* Survival of hamster tissue culture cells after freezing and thawing. Interactions between protective solutes and cooling and warming rates. — *Cryobiology*, 1969, 6, p. 1—9.
21. *Meryman H. T.* Modified model for the mechanism of freezing injury in erythrocytes. — *Nature*, 1968, 218, p. 333—336.
22. *Morris G. J., Farrant J.* Effects of cooling rate on thermal shock hemolysis. — *Cryobiology*, 1973, 10, p. 119—125.
23. *Polge C.* Low temperature storage of mammalian spermatozoa. — *Proc. Roy. Soc., B*, 1957, 147, p. 498—508.
24. *Sherman J. K.* Survival of higher animal cells after the formation and dissolution of intracellular ice. — *Anat. Rec.*, 1962, 144, p. 171—190.
25. *Shimada K., Asahina E.* Visualization of intracellular ice crystals formed in very rapidly frozen cells at -27°C . — *Cryobiology*, 1975, 12, p. 209—218.
26. *Walter C. A., Knight S. C., Farrant J.* Ultrastructural appearance of freeze-substituted lymphocytes frozen by interrupting rapid cooling with a period at -26°C . — *Cryobiology*, 1975, 12, p. 103—109.

Отделение криобиологии Клинического
научно-исследовательского центра в Харроу,
Великобритания

Поступила в редколлегию
12. XII 1975 г.

John Farrant

REVISION OF SOME CRYOBIOLOGICAL CONCEPTIONS

Summary

Studies in the mechanisms determining life and death in the process of freezing and defrosting must not be the priority of a limited circle of scientists in the field of cryobiology. The analysis of the mentioned problems may result in improvement of practical methods of cryoconservation, in elucidation of the reasons of destructions by freezing-defrosting. This may be exemplified by using the method of two-stage cooling in researches aimed at finding out the effect of cooling rates on the cells survival rate.

АНАЛИТИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ ПРОЦЕССОВ ПЕРЕНОСА ТЕПЛА В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

Развитие исследований в области консервирования с помощью холода объектов биологического происхождения выдвигает множество задач, связанных с определением температурного поля биообъектов. Известно, что аналитическая теория теплопроводности позволяет решать некоторые из этих задач в строгой постановке [1], однако для большинства практически интересных случаев результат решения не может быть получен в аналитическом виде. Это приводит к необходимости применять ЦВМ для нахождения численного решения.

Совершенно очевидно, что численное решение обладает гораздо меньшей ценностью, чем аналитическое, и, по существу, эквивалентно частному эксперименту. Строгая постановка задач теории теплопроводности для нахождения температурного поля вряд ли имеет смысл еще и потому, что краевые условия при охлаждательном консервировании биообъектов принципиально не могут быть точно заданы. Это связано с индивидуальной природой объекта консервирования, которая проявляется в весьма существенном разбросе теплофизических характеристик. Так, по данным, приводимым Г. Б. Чижевским [3], колебание содержания влаги в мышцах коров одного возраста и одного стада доходит до 10%. Поэтому теплофизические характеристики биообъектов следует рассматривать как усредненные величины. В этом случае результат каждого эксперимента, связанного с охлаждением, замораживанием или отеплением объекта, следует рассма-

тривать как отдельную реализацию случайного явления. Описывая указанные процессы методами механики сплошной среды, ставим в соответствие случайному явлению неслучайную математическую зависимость, которая может обладать удовлетворительной точностью лишь как среднее большого числа реализаций. В то же время при холодильном консервировании биообъектов важна не средняя точность значительного числа опытов, а соответствие между вычисленным и экспериментальным результатами для каждого индивидуального случая.

Изложенное выше оправдывает постановку следующих общих проблем, связанных с аналитическим описанием процесса переноса тепла в биологических системах: 1) создание специализированного аппарата, позволяющего в аналитической форме приближенно описывать процессы переноса тепла при консервировании биообъектов; 2) определение степени точности и области применения методов, основанных на механике сплошных сред, при описании процессов холодильного консервирования биообъектов.

В настоящей статье рассмотрим только один из возможных путей разработки специализированного аппарата для описания процессов переноса тепла в биообъектах. Будем считать, что вследствие значительного термического сопротивления биообъектов в процессе подвода (отвода) тепла возникает «температурный фронт», который с конечной скоростью распространяется от периферийных слоев к центральным.

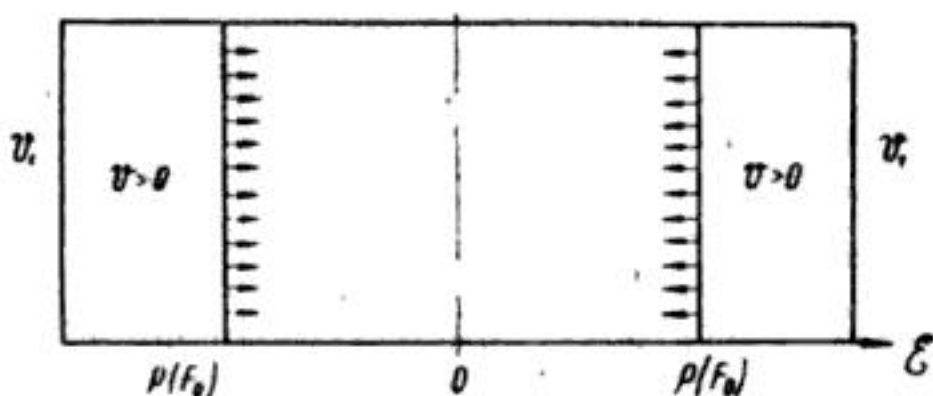


Схема для приближенного решения уравнения теплопроводности.

Приближенное решение задачи о нагревании пластины с использованием гипотезы «температурного фронта» получено нами ранее [4]. Остановимся подробнее на физическом смысле вводимой гипотезы. «Температурный фронт» можно представить как поверхность раздела между возмущенной и невозмущенной в тепловом отношении областями исследуемого объекта, которая перемещается симметрично относительно геометрического центра (рисунок). Процесс распространения тепла заключается в себе две фазы. Первая из них охватывает период времени, в течение которого «температурный фронт» распространяется от граничной плоскости до центра. Вторая фаза отсчитывается с того момента времени, когда «температурный фронт» достигает центра. Рассмотрим, как в данном случае может измениться постановка задачи о распространении тепла.

Строгая постановка задачи (нагревание пластины при граничных условиях третьего рода) имеет вид [1]

$$\frac{\partial U}{\partial F_0} = \frac{\partial^2 U}{\partial \varepsilon^2}, \quad (1a)$$

$$U(\varepsilon; 0) = 0, \quad (1б)$$

$$\left. \frac{\partial U}{\partial \varepsilon} \right|_{\varepsilon=0} = 0, \quad (1в)$$

$$\left. \frac{\partial U}{\partial \varepsilon} + B_l U \right|_{\varepsilon=1} = B_l, \quad (1г)$$

$$U = \frac{U - U_0}{U_1 - U_0}; \quad \varepsilon = \frac{x}{L}; \quad \frac{at}{L^2} = F_0; \quad \frac{\alpha}{\lambda} L = B_l, \quad (1д)$$

где U , U_0 , U_1 — значение температуры соответственно текущей, начальной и среды; L — характерный размер; x — текущая координата; a — коэффициент температуропроводности; t — время; α — коэффициент теплоотдачи; λ — коэффициент теплопроводности.

Для начальной стадии развития процесса распространения тепла можно считать («температурный фронт», координату которого мы обозначим через ρ , не «дошел» до центра), что распределение температуры при $|\varepsilon| > |\rho|$ параболическое, а при $|\varepsilon| < |\rho|$ — линейное. В точке $|\varepsilon| = |\rho|$ парабола плавно переходит в прямую. Тогда точная задача (1a—1д) заменяется следующими приближенными:

$$\frac{\partial^2 U^{(k)}}{\partial \varepsilon^2} = 2 \varphi^{(k)}(F_0), \quad (2a)$$

$$U^{(k)}(\rho_{k1}^0; F_0^k) = 0, \quad (2б)$$

$$\left. \frac{\partial U^{(k)}}{\partial \varepsilon} \right|_{\varepsilon=\rho_{k1}^0} = 0, \quad (2в)$$

$$\left. \frac{\partial U^{(k)}}{\partial \varepsilon} + B_l V^{(k)} \right|_{\varepsilon=1} = B_l, \quad (2г)$$

$$2 \varphi^{(k)}(F_0) = \frac{1}{1 - \rho_{k1}^0} \int_0^1 \frac{\partial V^{(k)}}{\partial F_0} d\varepsilon, \quad (2д)$$

где $V = \frac{U - U_0}{U_1 - U_0}$ — безразмерная температура, U — текущее значение

температуры, U_0 — значение температуры в начальный момент, U_1 — температура среды; $F_0 = at/L^2$ — критерий Фурье (безразмерное время), L — характерный размер тела; k — коэффициент температуропроводности; t — время; $\varepsilon = \kappa/L$ — безразмерная координата, κ — текущее значение координаты; $\beta_i = \alpha/\lambda L$ — критерий Био, α — коэффициент теплоотдачи, λ — коэффициент теплопроводности; e — текущее значение координаты «температурного фронта»; $\rho = e/L$ — безразмерное значение координаты «температурного фронта»; $\theta_1 = \frac{U - U_1}{U_0 - U_1}$ — безразмерная температура; C — теплоемкость; γ — плотность; λ_0 — фиксированное значение коэффициента теплопроводности; $\theta = \frac{U_0 - U}{U_0 - U_1}$ — безразмерная температура, $k = 1, 2$ и соответствует первой и второй фазам; $F_0^{(2)}$ — значения параметра Фурье, соответствующие продолжительности первой фазы; δ_{ki} — индекс Кронекера.

Результат решения (2) для случая охлаждения пластины

$$\theta_1^{(1)} = 1 - \frac{Bi(\varepsilon - \rho)^2}{Bi(1 - \rho)^2 + 2(1 - \rho)},$$

$$\theta_1^{(2)} = \frac{Bi}{Bi+2} \left(\frac{Bi+2}{Bi} - \varepsilon^2 \right) \exp \left[-\frac{3Bi}{Bi+3} (F_0 - F_0^{(0)}) \right],$$

где $\theta_1 = U - U_1 / U_0 - U_1$.

Зависимость между безразмерным временем F_0 и подвижной границей «температурного фронта» ρ имеет следующий вид:

$$F_0 = \frac{(1 - \rho)^2}{12} + \frac{1 - \rho}{3Bi} - \frac{2}{3Bi^2} \ln [1 + 0,5 Bi(1 - \rho)].$$

Продолжительность первой фазы $F_0^{(0)}$ определяется из последнего выражения при $\rho = 0$.

Рассмотрим теперь возможность применения гипотезы о наличии «температурного фронта» для решения двух нелинейных задач теплопроводности, особенно характерных при охлаждении биообъектов. Известно, что биообъекты обладают неоднородной структурой, а их теплофизические характеристики зависят от температуры. Поэтому интересно решение задач, когда теплопроводность есть функция координаты и температуры. Остановимся на задаче об охлаждении пластины, когда теплопроводность есть функция координаты, т. е. при граничных условиях первого рода.

В безразмерных переменных ε ; F_0 ; $\frac{U_0 - U}{U_0 - U_1} = \theta$; $a = \frac{\lambda_0}{c\gamma}$; $\frac{e}{L} = \rho$, где e — граница «температурного фронта», постановка задачи сводится к следующему:

$$\frac{\partial \theta}{\partial F_0} = \frac{\partial}{\partial \varepsilon} \left[f(\varepsilon) \frac{\partial \theta}{\partial \varepsilon} \right], \quad (3a)$$

$$\theta(\varepsilon; 0) = 0, \quad (3б)$$

$$\theta(1; F_0) = 1, \quad (3в)$$

$$\left. \frac{\partial \theta}{\partial \varepsilon} \right|_{\varepsilon=0} = 0. \quad (3г)$$

В соответствии с методологией Л. С. Лейбензона [5] усредняем левую и правую части уравнения (3а) по координате при малых чис-

лах, т. е. в той зоне объекта, куда распространился «температурный фронт». Тогда получим:

$$\int_{\rho}^1 \frac{\partial \theta}{\partial F_0} d\varepsilon = \int_{\rho}^1 \frac{\partial}{\partial \varepsilon} \left[\varphi(\varepsilon) \frac{\partial \theta}{\partial \varepsilon} \right] d\varepsilon = \varphi(1) \left(\frac{\partial \theta}{\partial \varepsilon} \right)_{\varepsilon=1} - \varphi(\rho) \left(\frac{\partial \theta}{\partial \varepsilon} \right)_{\varepsilon=\rho}. \quad (4)$$

Согласно введенной гипотезе параболическое распределение температуры на границе температурного фронта плавно переходит в линейное, следовательно, $\left. \frac{\partial \theta}{\partial \varepsilon} \right|_{\varepsilon=\rho} = 0$.

Тогда из (4)

$$\int_{\rho}^1 \frac{\partial \theta}{\partial F_0} d\varepsilon = \varphi(1) \left(\frac{\partial \theta}{\partial \varepsilon} \right)_{\varepsilon=1}. \quad (5)$$

Отсюда идея приближенного решения задачи (3) сводится к представлению искомой функции в виде многочлена второй степени с коэффициентами, зависящими от времени, нахождению этих коэффициентов в функции ρ через краевые условия задачи (3) и условия на границе «температурного фронта» и, наконец, к использованию условий (5) для определения закона перемещения границы температурного фронта во времени.

Температурное распределение для первой фазы находим в следующей форме:

$$\theta(\varepsilon i, Fo) = A\varepsilon^2 + B\varepsilon + C. \quad (6)$$

При таком распределении легко найти решение системы уравнений (2б), (2в), (3в):

$$A = \frac{1}{(1-\rho)^2}; \quad B = -\frac{2\rho}{(1-\rho)^2}; \quad C = -\frac{\rho^2}{(1-\rho)^2}.$$

В соответствии с принятой формой функции $\theta(\varepsilon i, Fo)$ (6), получим

$$\theta(\varepsilon i, Fo) = (\varepsilon - \rho)^2 / (1 - \rho)^2. \quad (7)$$

Подставляя в интегральное соотношение (5) и учитывая, что в начальный момент времени $\rho=1$, находим распределение температуры в первой фазе охлаждения

$$\theta = \left[\frac{\varepsilon - 1 + \sqrt{12 \varphi(1) F_0}}{\sqrt{12 \varphi(1) F_0}} \right]^2 = \left[1 - \frac{1 - \varepsilon}{\sqrt{12 \varphi(1) F_0}} \right]^2. \quad (8)$$

Для второй фазы соотношение (5) существенно упрощается:

$$\int_0^1 \frac{\partial \theta}{\partial F_0} d\varepsilon = \varphi(1) \left(\frac{\partial \theta}{\partial \varepsilon} \right)_{\varepsilon=1}. \quad (9)$$

Принимая, как и выше, распределение температуры параболическим, получим

$$\theta(\varepsilon, Fo) = F\varepsilon^2 + M\varepsilon + N. \quad (10)$$

Коэффициенты F , M , N полагаются независимыми от координаты ε , но зависимыми от времени Fo .

В соответствии с условием симметрии (3)

$$\partial\theta/\partial\varepsilon|_{\varepsilon_0}=0; \quad M=0,$$

тогда $\theta(\varepsilon; Fo) = F\varepsilon^2 + N$.

Последнее соотношение совместно с (9) определяет температурное распределение в период второй фазы охлаждения пластины

$$\theta = 1 - (1 - \varepsilon^2) e^{-3\Phi(1)} [Fo - Fo^{(0)}]. \quad (11)$$

При этом в качестве начального условия $\theta(Fo^{(2)}, \varepsilon=0) = 0$, так как в момент окончания первой фазы температура на срединной плоскости равна U_0 . Таким образом, температурное поле в случае охлаждения пластины при граничных условиях первого рода при $\lambda = \lambda_0 \cdot f(\kappa/L)$ описывается выражением (8) при $F_o \leq F_o^{(0)}$ и (11) в случае, если $F_o > F_o^{(0)}$. Рассмотрим теперь задачу об охлаждении пластины, когда коэффициент теплопроводности есть функция температуры, т. е. задача сводится к решению уравнения

$$c\gamma \frac{\partial U}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} \left[\lambda_0 \Psi(U) \frac{\partial U}{\partial x} \right] \quad (12)$$

с прежними краевыми условиями (3) или в безразмерном виде (3):

$$\frac{\partial\theta}{\partial F_o} = \frac{\partial}{\partial\varepsilon} [\Psi(\theta) \partial\theta/\partial\varepsilon]. \quad (13)$$

Таким образом, задача нахождения температурного поля при $\lambda = \lambda_0 \Psi(U)$ аналогична рассмотренной ранее. Решением этой задачи будут выражения типа (8) и (11), в которые вместо функции φ следует подставить функцию Ψ . Необходимо отметить, что структура и физическая природа функции φ коренным образом отличны от структуры функции Ψ и аналогия здесь лишь чисто формальная.

ВЫВОДЫ

1. Рассмотрена гипотеза о наличии «температурного фронта» при распространении тепла в объектах биологического происхождения. Введение гипотезы оправдано относительно высоким сопротивлением биообъектов теплопереносу.

2. На основании введенной гипотезы найдено приближенное решение двух нелинейных задач (коэффициент теплопроводности зависит от координаты и температуры объекта), типичных для практики холодильного консервирования объектов биологического происхождения. Решение получено в форме многочлена.

3. Авторы считают, что разрабатываемый метод аналитического описания может оказаться полезным при решении задач, связанных с определением температурного поля биообъектов в процессе холодильного консервирования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лыков А. В. Теория теплопроводности. М., «Выш. школа», 1967, с. 599—600.
2. Гухман А. А. Введение в теорию подобия. М., «Выш. школа», 1973, с. 295—308.
3. Чижов Г. Б. Теплофизический процесс в охлаждающей технологии пищевых продуктов. М., «Пищевая пром.», 1971. 201 с.
4. Бражников А. М., Карпичев В. А., Лыкова А. В. Об одном инженерном методе расчета процесса теплопроводности. — Инж.-физ. журн., 1975, № 4, с. 677—679.
5. Лейбензон Л. С. К вопросу о затвердевании земного шара из расплавленного состояния. — Труды АН СССР, 1965, 4, с. 317—321.

Московский технологический институт
мясной и молочной промышленности

Поступила в редколлегию
12. XII 1975 г.

ANALYTICAL DESCRIPTION OF HEAT TRANSFER PROCESSES
IN BIOLOGICAL SYSTEMS

Summary

The paper deals with nonlinear problems of heat conduction typical in the practice of cryoconservation of biological objects. An approximate solution of the problems is obtained on the basis of hypothesis on the presence of a «temperature front» which in the processes of heat addition (extraction) propagates with a finite speed from the peripheral layers of the object to the central ones. A relatively high resistance of bioobjects to the heat transfer is assumed as a basis for the hypothesis introduction.

УДК 57:536.48.047:551.321.1:577.3:523.73:536.48:611—018.46

В. Л. Бронштейн, Л. Ф. Розанов

**НАЧАЛЬНОЕ ПЕРЕОХЛАЖДЕНИЕ
КАК ФАКТОР ПОВРЕЖДЕНИЯ
ПРИ ЗАМОРАЖИВАНИИ КЛЕТОЧНЫХ СУСПЕНЗИЙ**

Переохлаждение — необходимое условие зарождения кристаллов при замораживании биологических объектов. Величина его вследствие вероятностной природы зародышеобразования обычно варьирует от опыта к опыту и не определяется однозначно контролируруемыми параметрами замораживания. Контроль величины начального переохлаждения в интересующей исследователя точке образца (области, размеры которой малы по сравнению с размерами образца) можно осуществить введением в систему датчика температуры малых размеров.

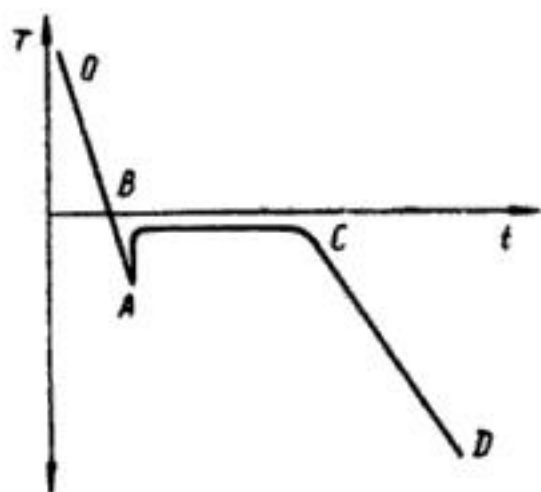


Рис. 1. Характерный вид зависимости температуры от времени при замораживании клеточных суспензий.

На рис. 1 приведена характерная зависимость температуры в изучаемой точке образца от времени в процессе замораживания. Результаты термографических исследований указывают на следующие характерные участки кривой температура—время: 1) ОА соответствует охлаждению до момента образования в образце кристаллов льда; 2) АВ характеризует переход системы из сильно переохлажденного жидкого состояния в состояние, близкое к равновесному, с образованием кристаллов; 3) ВСД отражает развитие образовавшейся кристаллической структуры вплоть до полного замерзания образца.

Участок кривой ВСД (см. рис. 1) в свою очередь можно разбить на две характерные части: 1) ВС — «тепловая остановка». Ее продолжительность зависит от величины теплоотвода и расположения термодатчика в образце; с увеличением теплоотвода время «тепловой остановки» уменьшается; приближение датчика к охлаждающей поверхности приводит к подобному эффекту; 2) СД соответствует дальнейшему снижению температуры и росту кристаллов льда.

Представляется разумным разбить процесс кристаллизации при замораживании клеточных суспензий на два этапа: I — образование кристаллов льда (участок АВ); II — развитие кристаллической структуры (участок ВСД).

Отсутствие в доступной нам литературе данных о влиянии начального переохлаждения и особенностей протекания первого этапа кри-

сталлизации на кинетику основных повреждающих процессов, таких как обезвоживание и внутриклеточная кристаллизация, послужило основанием для проведения данного исследования.

Криомикроскопическое изучение замораживания суспензий эритроцитов. Криомикроскопическое изучение обезвоживания незащищенных эритроцитов человека при замораживании показало, что при скоростях

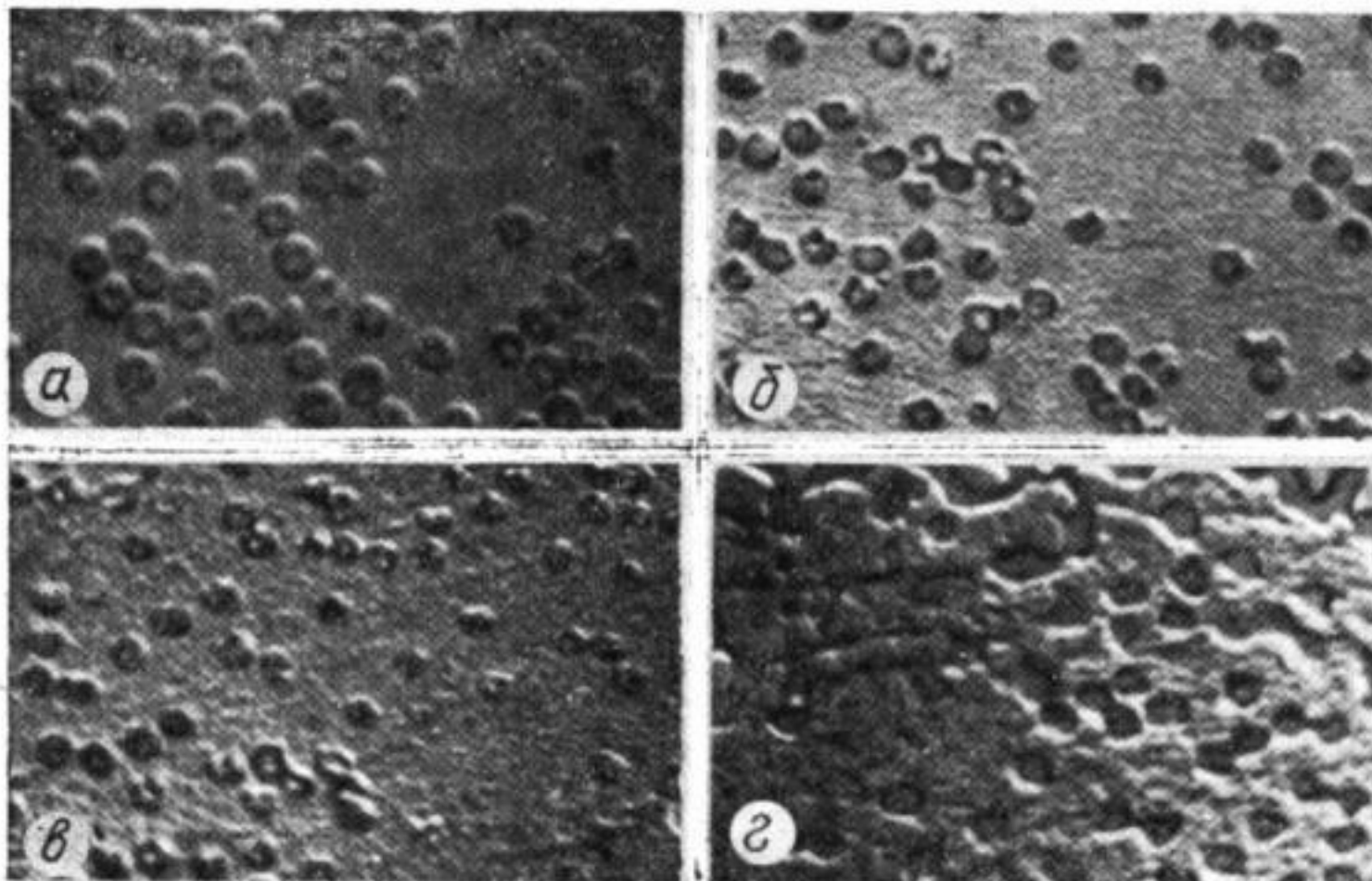


Рис. 2. Изменение размеров эритроцитов человека при замораживании суспензии со скоростью $60^{\circ}\text{C}/1$ мин.

(а, б, в, г — температура соответственно: -5 ; -15 ; -10 ; -6°C); $\times 400$.

охлаждения от $0,3$ до 10° в 1 мин их размеры уменьшались примерно на $1/3$. При больших величинах теплоотвода, когда скорость охлаждения составляла примерно $60^{\circ}/1$ мин, обезвоживание эритроцитов при замораживании практически не выражено. В этом случае оно наблюдалось во время отогрева (рис. 2) и сопровождалось рекристаллизацией структуры внеклеточного льда.

Замораживание производили до температуры -20° ; время замораживания составляло около $10-15$ с. Предположение о том, что за указанное время эритроциты не успевают обезводиться, не может быть принято, поскольку вследствие высокой проницаемости их мембран для молекул воды характерное время выравнивания химических потенциалов воды вне и внутри эритроцитов не должно превышать $0,1$ с [1]. Кроме того, мы наблюдали уменьшение размеров эритроцитов сразу после возникновения внеклеточных кристаллов при охлаждении со скоростью $60^{\circ}/1$ мин в присутствии 20% -ного глицерина. Поэтому единственной причиной, препятствующей обезвоживанию эритроцитов в рассмотренном случае, может быть присутствие внутриклеточных кристаллов льда.

Как следует из оценок, полученных в работе [1], скорость охлаждения $60^{\circ}/1$ мин явно недостаточна для возникновения кристаллов льда внутри эритроцитов на втором этапе кристаллизации, поскольку температура переохлаждения протоплазмы в этом случае не превышает $0,1^{\circ}$. Следовательно, кристаллы внутри эритроцитов как результат начального переохлаждения образца должны были возникнуть на первом этапе кристаллизации.

Теоретическое изучение влияния начального переохлаждения на процесс обезвоживания. В работе [2] проведено теоретическое изучение процесса обезвоживания при замораживании клеточных суспензий

на основе предположения о том, что движущей силой выхода воды из клетки является разность между химическими потенциалами воды вне и внутри клетки. Если вне клетки образуются достаточно крупные кристаллы льда, то можно считать, что химический потенциал воды вне клетки равен таковому льда, поверхность которого является плоской. В этом случае разность химических потенциалов воды вне и внутри клетки совпадает с полным переохлаждением внутриклеточного раствора. Когда внеклеточный лед обладает мелкокристаллической структурой, необходимо учитывать вклад переохлаждения внеклеточного раствора в полное переохлаждение протоплазмы клеток. Таким образом, полное переохлаждение внутриклеточного раствора ΔT в температурных единицах является суммой:

$$\Delta T = \Delta T_H + \Delta T_\tau, \quad (1)$$

где ΔT_H — переохлаждение внеклеточного раствора, связанное со средней кривизной поверхности внеклеточных кристаллов льда выражением

$$\Delta T_H = \frac{T 2 \sigma H_e v_e}{q}, \quad (2)$$

где T — температура; q — теплота фазового перехода; σ — коэффициент поверхностного натяжения границы раздела лед—вода; H_e — средняя кривизна кристаллов вне клетки; v_e — объем, приходящийся на молекулу льда; ΔT_τ — переохлаждение, связанное с разностью химических потенциалов воды вне и внутри клетки.

Как следует из работы [2], величина ΔT_τ определяется скоростью охлаждения и значениями клеточных параметров и может быть оценена следующим образом:

$$\Delta T_\tau \sim \frac{\tau v_0 10^2}{\gamma 3 K T}, \quad (3)$$

где τ — скорость охлаждения; γ — поверхностно-объемное отношение для клетки; K — константа проницаемости клеточной мембраны для молекул воды; v_0 — объем, приходящийся на одну молекулу воды.

Допустим, что начальное переохлаждение образца привело к появлению внутриклеточных кристаллов на первом этапе кристаллизации. Как следует из выражения (3), во время тепловой остановки, когда $\tau=0$, вкладом величины ΔT_τ в общее переохлаждение внутриклеточного раствора можно пренебречь. Разность химических потенциалов воды вне и внутри клетки $\Delta \mu$ в этом случае определяется средней кривизной вне- и внутриклеточных кристаллов льда:

$$\Delta \mu = 2 \sigma v_s (H_i - H_e), \quad (4)$$

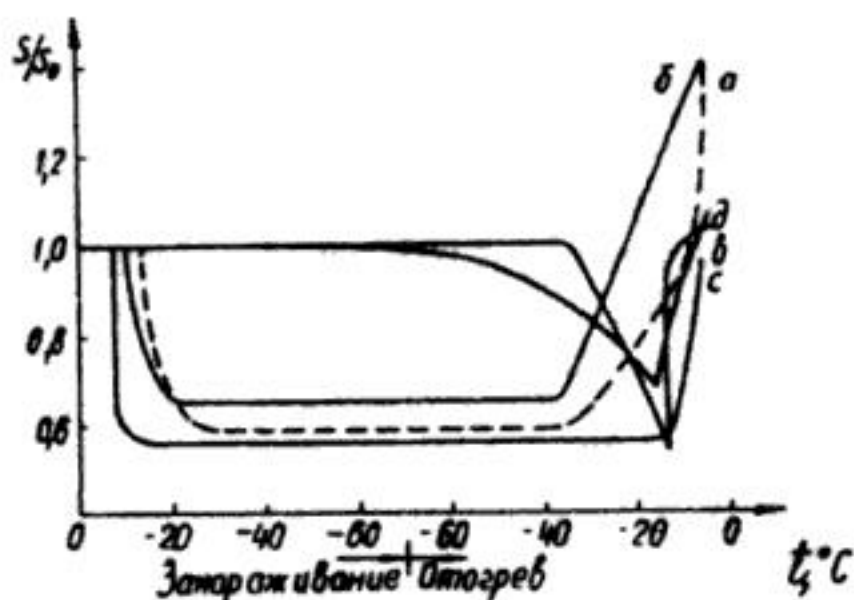
где H_i — средняя кривизна внутриклеточных кристаллов льда. Рекристаллизация льда вне и внутри клетки изменит величину $\Delta \mu$ так, что внутриклеточные кристаллы начнут таять, а клетка — обезвоживаться, поскольку размеры внутриклеточных кристаллов ограничены величиной клетки. Поэтому при небольших скоростях замораживания, когда велико время тепловой остановки и в ходе замораживания происходят заметные рекристаллизационные изменения, внутриклеточные кристаллы, образовавшиеся на первом этапе кристаллизации, должны растаять еще в начале второго этапа кристаллизации и дальнейшее обезвоживание клеток происходит так, как будто они и не возникали. Однако при больших скоростях замораживания, когда мало время тепловой остановки, вне клеток образуются мелкокристаллические структуры и рекристаллизационные изменения при замораживании слабо выражены; возникшие на первом этапе кристаллизации внутриклеточные кристаллы сохраняются и начинают расти после тепловой остановки, ко-

гда происходит дополнительное переохлаждение протоплазмы ΔT_r в результате увеличения скорости охлаждения.

Таяние внутриклеточного льда и обезвоживание клеток в данном случае должны наблюдаться во время отогрева при рекристаллизации внеклеточного льда из-за различия в средней кривизне кристаллов вне

Рис. 3. Изменение средней относительной площади клеток перитонеального экссудата мыши при замораживании суспензии, содержащей 5% глицерин при следующих скоростях охлаждения и отогрева:

а — $1^\circ/1$ мин и $-1^\circ/1$ мин; б — $1^\circ/1$ мин и $-50^\circ/1$ мин; в — $10^\circ/1$ мин и $-1^\circ/1$ мин; г — $10^\circ/1$ мин и $-50^\circ/1$ мин; д — $60^\circ/1$ мин и $-1^\circ/1$ мин.



и внутри клетки. Это согласуется с нашими наблюдениями процесса обезвоживания при замораживании не только эритроцитов, но и других клеточных суспензий (рис. 3).

Таким образом, при быстром замораживании небольших объемов биоматериала величина начального переохлаждения может влиять на кинетику основных повреждающих процессов и должна учитываться как один из факторов повреждения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гордиенко Е. А., Бронштейн В. Л., Козьмин Ю. В. Особенности внутриклеточной кристаллизации в эритроцитах. — В кн.: Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины. К., «Наук. думка», 1974, с. 10—12.
2. Иткин Ю. А., Бронштейн В. Л., Гордиенко Е. А. Анализ процесса обезвоживания при замораживании клеточных суспензий. — В кн.: Криобиология и криомедицина, 1975, вып. 2, с. 40—42.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
12. XII 1975 г.

V. L. Bronshtein, L. F. Rozanov

INITIAL SUPERCOOLING AS A DAMAGING FACTOR IN FREEZING CELL SUSPENSIONS

Summary

Intracellular crystals in erythrocytes are shown to appear at the first stage of crystallization due to the initial supercooling of a sample. The mechanism of mutual influence of the cooling rate and the initial supercooling value on formation of ice stable crystals in cells is discussed.

УДК 57:536.48.047

Е. А. Гордиенко, Г. С. Ишков, Л. Ф. Розанов

ОБЕЗВОЖИВАНИЕ И НЕКОТОРЫЕ МЕХАНИЗМЫ КРИОПОВРЕЖДЕНИЯ КЛЕТОК ПРИ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОМ КОНСЕРВИРОВАНИИ СУСПЕНЗИИ

Краткий анализ существующих представлений. Повреждение биологической суспензии в процессе низкотемпературной консервации является, в частности, результатом возрастания гипертоничности меж-

клеточной среды при замораживании и чрезмерного обезвоживания клеток. На основании экспериментов, в которых гемолиз эритроцитов наблюдался, когда концентрация внеклеточного NaCl достигала значения 0,8М, Лавлок предположил [5], что повреждение клеток вызывается увеличением концентрации электролитов. Он [6] объяснил повреждающее действие солей их лиотропным эффектом на липоидные компоненты мембран. На неубедительность предположения об этом специфическом механизме повреждения указал Мэйзур [8], выяснив, что для проявления лиотропного эффекта необходимо очень долго экспонировать клетки в солевом растворе.

Мэриман [10] обнаружил, что клетки повреждаются также и не-солевыми растворами, осмотичность которых эквивалентна водному раствору хлористого натрия с концентрацией соли 0,8М. Так, гемолиз эритроцитов всегда начинался при одной и той же осмотичности — около 1800 мосм — в разных растворах, хотя содержание электролитов в них в момент повреждения было небольшим [10]. Для изучения возможности повреждения эритроцитов за счет увеличения концентрации электролитов только внутри клеток предприняты эксперименты с нормальными эритроцитами и эритроцитами с пониженным содержанием внутриклеточных электролитов. Нормальные клетки начинали гемолизироваться при осмотическом давлении внеклеточного раствора около 1800 мосм. В начале гемолиза объем эритроцитов составлял 55% исходного, при этом терялось около 65% клеточной воды. Эритроциты, лишенные калия, уступающие нормальным в размере, в физиологическом растворе начинали гемолизироваться при 700 мосм, но почти при том же объеме, при котором начинается гемолиз нормальных клеток. Поскольку при гемолитическом объеме в указанных двух группах значительно различались концентрации внутриклеточных солей, Мэриман [10] пришел к выводу, что и концентрирование внутриклеточной соли не может иметь решающего значения в повреждении клетки в процессе ее обезвоживания.

Тот факт, что эритроциты, в которых клеточная вода на 50% замещена глицерином, повреждаются при таком же относительном объеме, как и незащищенные, свидетельствует о том, что к повреждению приводит не удаление воды, а уменьшение клеточного объема [9]. Результаты всех экспериментов [10] указывают на то, что причиной повреждения является скорее всего уменьшение объема клетки до критического значения.

Гипотеза минимального объема [9] позволила указать некоторые механизмы устойчивости клеток к замораживанию. Так, хорошо проникающие в клетку криопротекторы, увеличивая неводный объем клетки, тем самым защищают ее от повреждения, поскольку в результате больше воды должно быть удалено из клетки прежде, чем общий объем ее уменьшится до критического. Еще один способ самозащиты клеток — способность допускать поступление внутрь клетки внеклеточного раствора, когда клеточный объем приближается к критическому. Гранулы хлоропластов листьев зимостойкого шпината при замораживании, когда осмотическое давление внеклеточного раствора превышало некоторое определенное значение (около 800 мосм), становились проницаемыми для растворенных веществ, предупреждая дальнейшее уменьшение объема клетки и ее повреждение [11]. Объем эритроцитов, взвешенных в концентрированных растворах хлористого натрия, уменьшался с увеличением осмотичности внеклеточной среды до 1100 мосм, затем оставался примерно постоянным при дальнейшем увеличении осмотичности до 1300 мосм, после чего без видимого гемолиза объем возрастал [9], что сопровождалось втеканием внутриклеточной среды в клетку. Возвращение клеток в изотонический раствор приводило к немедленному лизису эритроцитов.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Нами производились замораживание суспензий клеток перитонеального экссудата мышей и костного мозга крыс (соответственно в растворе Хэнкса и в среде ЦОЛИПК-3) до температуры -20°C со скоростью 0,3; 1; 10 и 60° в 1 мин и последующее отогревание со скоростью 1 или 50°C в 1 мин. Образцы охлаждались в сконструированной нами криоприставке к световому интерференционно-поляризационному микроскопу PSO-5. Изучаемые процессы фиксировались на фотопленке с покадровой регистрацией температуры.

В качестве датчика температуры использовалась медь — константановая термопара.

При охлаждении препаратов кристаллы льда вначале образовывались вне клеток. Дальнейшее охлаждение приводило к увеличению количества льда в образце, к сужению каналов между кристаллами и, следовательно, к нарастанию концентрации растворенных веществ в жидкой фазе. Подавляющее количество клеток, как правило, вытеснялось в каналы между кристаллами льда, а незначительная часть захватывалась льдом. По мере увеличения количества льда клетки обезвоживались. Объем тех из них, которые не контактировали с кристаллами, уменьшался в среднем без отклонения

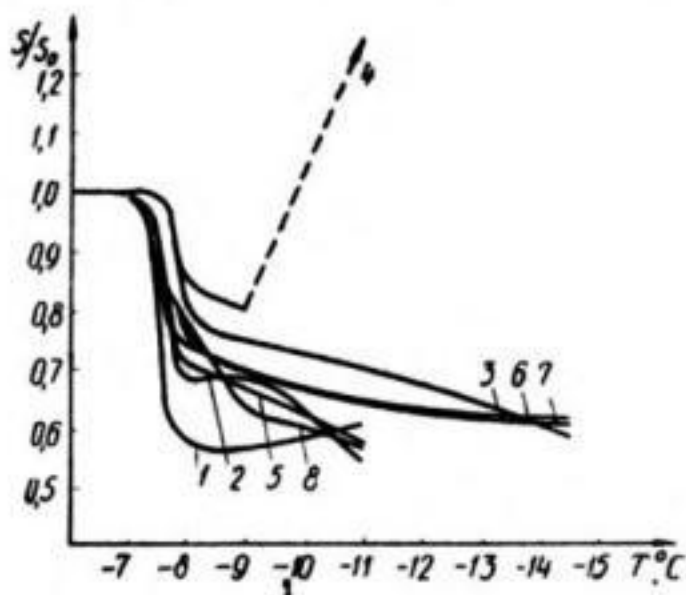


Рис. 1. Изменение относительной площади клеток перитонеального экссудата мыши при замораживании незащищенной суспензии:

1 — 4 и 8 — клетки с исходным размером около 7,5 мкм; 5—7 — клетки с исходным размером 10—11,5 мкм; 4 — клетка разрушается при -11°C ; 1—3, 5 и 8 — при -14° ; 3, 6 и 7 — при -16°C .

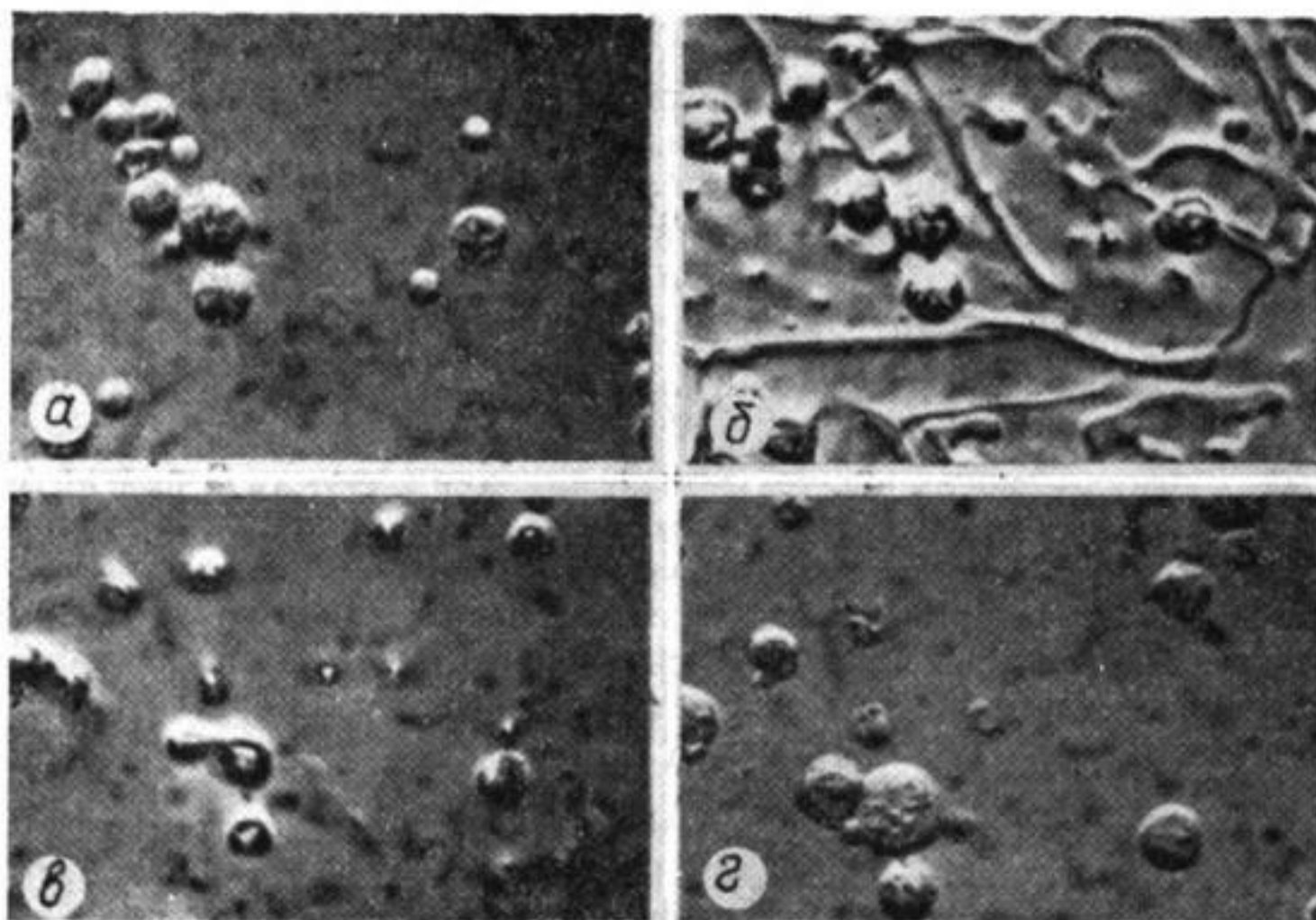


Рис. 2. Деформация клеток перитонеального экссудата мыши при замораживании и при отогреве незащищенной суспензии. Скорость охлаждения составляет $1^{\circ}\text{C}/1$ мин, скорость отогрева 50° в 1 мин; $\times 600$.

формы от сферической. Как видно из рис. 1, с понижением температуры размеры клеток, свободно расположенных в каналах, вначале уменьшаются, а затем клетки набухают и обесцвечиваются. Набухание происхо-

дит преимущественно после достижения ими определенного минимального размера, характеризующегося уменьшением площади клеток до 50—60% исходной площади в физиологической среде для перитонеального экссудата и 50—70 для костного мозга. Следует обратить внимание на неодновременное достижение минимального размера разными клетками.

Вследствие сужения каналов в процессе замораживания большинство клеток вступало в тесный контакт с кристаллами льда, изменяя и размеры, и форму (рис. 2). С увеличением скорости охлаждения до $10^{\circ}\text{C}/1$ мин явление набухания непосредственно в процессе замораживания не наблюдалось, так как клетки уже через небольшой промежуток времени после начала кристаллизации оказывались окруженными льдом, что исключало возможность их набухания. В первую очередь начинали контактировать со льдом более крупные клетки. Плавление льда при последующем отогревании, однако, сопровождалось набуханием и обесцвечиванием клеток. Так, в процессе отогревания суспензий, замороженных со скоростью $0,3^{\circ}\text{C}/1$ мин, набухали и обесцвечивались все клетки. Размер клеток перитонеального экссудата мыши, замороженных со скоростью $1^{\circ}\text{C}/1$ мин, значительно превышал исходный (см. рис. 2). Если тот же образец охлаждался со скоростью $60^{\circ}\text{C}/1$ мин, размер клеток в течение замораживания уменьшался незначительно. В процессе последующего медленного отогревания ($1^{\circ}/1$ мин) он продолжал уменьшаться, но затем клетки также набухали и обесцвечивались.

И быстрый, и медленный отогревы после охлаждения клеток костного мозга со скоростью 0,3 или $1^{\circ}/1$ мин полностью разрушали клетки. Полная сохранность клеток костного мозга при скорости охлаждения $60^{\circ}\text{C}/1$ мин достигалась быстрым отогревом ($50^{\circ}/1$ мин). При медленном отогревании клетки набухали и обесцвечивались.

ОБСУЖДЕНИЕ

При изменении тоничности внеклеточной среды в системе «клетка—окружающая среда» стимулируются процессы, ведущие к выравниванию значений химических потенциалов вне и внутри клетки. Поскольку процессу проникновения через мембрану растворенных веществ соответствует значительно большее время релаксации τ_2 , чем соответствующее проникновению воды τ_1 [1], то в первом приближении можно считать клеточную мембрану проницаемой лишь для растворителя. В меру выполнения неравенства

$$\tau_1 \ll T_k \ll \tau_2, \quad (1)$$

где T_k — продолжительность кристаллизации, клетка реагирует на увеличение тоничности среды обезвоживанием, поскольку указанный процесс является более быстрым, чем процесс проникновения в клетку внеклеточных растворенных веществ.

Кинетическое уравнение, описывающее обезвоживание клетки, в рассматриваемом случае имеет вид [1]

$$I_v = SL_P(\Delta P - \sigma \Delta \pi), \quad (2)$$

где I_v — объемный поток; ΔP и $\Delta \pi$ — перепад гидростатического и осмотического давлений на мембране клетки; σ и L_P — соответственно коэффициенты избирательности и фильтрации, а S — площадь клеточной мембраны. В соответствии с (1) в процессе замораживания $I_v = 0$ и $\Delta P = \sigma \Delta \pi$, т. е. заданному перепаду осмотического давления соответствуют определенные объем и деформация клетки.

Напряжения, возникающие при растяжении тонкой сферической оболочки толщины h под действием перепада гидростатического давления ΔP , соответственно равны:

$$\sigma_{rr} = \Delta P/2; \quad \sigma_{\theta\theta} = \sigma_{\phi\phi} = \Delta P \cdot R/h, \quad (3)$$

где R — радиус кривизны оболочки; r , θ и φ — сферические координаты с началом в центре кривизны [3]. Учитывая, что избирательная проницаемость клеточной мембраны может быть связана с наличием в ней пор, рассмотрим напряжения, возникающие в тонкой сферической оболочке с круговым отверстием радиуса $a \ll R$ и с центром в точке $\rho = R$; $\theta = 0$:

$$U_0/R_0 = \Delta P (1 - 2\sigma_1 + a^2/R^2\theta^2)/2hE, \quad (4)$$

где E — модуль Юнга; σ_1 — коэффициент Пуассона для клеточной мембраны; $U_0 = \theta$ -я компонента вектора деформации. Анализ этого выражения показывает [4], что вследствие концентрации напряжений около поры даже небольшое растяжение клеточной оболочки значительно увеличивает сечение мембранных пор. Естественно, что данное явление должно сказываться на транспортных параметрах мембраны, в частности на коэффициенте избирательности для различных растворенных веществ. По мере увеличения сечения пор мембрана становится хорошо проницаемой для все больших молекул, в том числе и для макромолекул, таких как белки или молекулы высокомолекулярного криопротектора. Это приводит, во-первых, к частичной потере клеткой содержимого (выражением чего, по-видимому, является их обесцвечивание), во-вторых, к выравниванию состава сред вне и внутри клетки (что эквивалентно выпуску внутриклеточного раствора клеткой по Мэриману [9, 10]), в-третьих, к исчезновению перепадов давления на мембране, в силу чего мембрана стремится к восстановлению исходной (равновесной) формы.

Иногда предполагают [7], что мембрана растягивается только при оводнении клетки в гипотонической среде, а при обезвоживании сжимается, не изменяя формы. Однако данное представление ошибочно. При обезвоживании клеточная мембрана стремится деформироваться за счет изгиба при минимальном общем увеличении площади мембраны, поскольку упругая энергия растяжения в $(H/h)^2$ раз превышает энергию чистого изгиба (H — средний радиус кривизны в рассматриваемой точке). Она растягивается в области впадин и сжимается в области выступов, хотя общее изменение площади мембраны по отношению к площади, соответствующей равновесной форме, минимально при заданном перепаде давлений на ней. Поэтому чрезмерное обезвоживание вызывает такие же эффекты, как и оводнение. Конечно, когда деформации становятся достаточно большими, соотношения линейной теории упругости, в частности закон Гука, нарушаются. В нелинейной области для возникновения в мембране больших напряжений требуются небольшие деформации. Этим и объясняется существование минимально допустимого объема клетки: оно отражает тот факт, что для компенсации увеличения перепада давлений при сильном обезвоживании клетки требуется уже незначительное растяжение ее мембраны. По-видимому, механические свойства мембран гранул хлоропластов зимостойкого шпината таковы, что нарушение избирательности происходит раньше, чем достигается ее критическая деформация (т. е. разрыв) и предотвращается повреждение мембраны.

Очевидно, в области очень больших деформаций следует учитывать и возможность проявления пластических свойств плазматических мембран клеток. Можно предположить, что набухание клеток, в частности, связано с наличием остаточной пластической деформации, вызванной значительным растяжением мембраны в период обезвоживания: размер клеток, восстанавливающихся после втекания внеклеточного раствора, превосходит исходный. Поскольку величина остаточной пластической деформации возрастает с увеличением продолжительности пребывания клеток в сильно напряженном состоянии, то уменьшение продолжитель-

ности кристаллизации должно приводить к менее выраженному обесцвечиванию или набуханию клеток.

В изотермическом случае продолжительность пребывания клеток в сильно напряженном состоянии зависит от проницаемости мембраны клетки для растворенного вещества [2]. При хорошей проницаемости для растворенных веществ сильно напряженное состояние мембраны в гипотонических или гипертонических средах достигается лишь на короткий промежуток времени. По мере увеличения τ_2 (например, за счет увеличения молекулярного веса криопротектора) опасность возникновения необратимой деформации и потери исходных избирательных свойств клеточной мембраны возрастает.

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что повреждение части клеток может быть объяснено на основании представлений, близких к гипотезе минимального объема, а выдвинутые новые предположения, очевидно, позволяют с единой точки зрения объяснить не только полученные нами результаты, но и ряд фактов, установленных другими исследователями.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гордиенко Е. А., Бронштейн В. Л. К механизму лизиса. I. Математическая модель. — В кн.: Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины. К., «Наук. думка», 1974, с. 13—15.
2. Гордиенко Е. А., Бронштейн В. Л. К механизму лизиса. II. Приложение к криобиологии. — В кн.: Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины. К., «Наук. думка», 1974, с. 15—18.
3. Ландау Л. Д., Лифшиц Е. М. Теория упругости. М., «Наука», 1965. 431 с.
4. Burton A. C. The stretching of «pores» in a membrane. — In: Permeability and function biological membranes. Amsterdam—London, 1970, p. 1—19.
5. Lovelock I. E. The haemolysis of human red blood cells by freezing and thawing. — Biochim. Biophys. Acta, 1953, 10, p. 414.
6. Lovelock I. E. Haemolysis by thermal shock. — Brit. J. Haematol., 1955, 1, p. 117—129.
7. Mansoori I. A. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures. — Cryobiology, 1975, 12, p. 34—45.
8. Mazur P. Theoretical and experimental effects of cooling and warming velocity on the survival of frozen and thawed cells. — Cryobiology, 1966, 2, p. 181—192.
9. Meryman H. T. The exceeding of a minimum tolerable cell volume in hypertonic suspension as a cause of freezing injury. — In: The frozen cell. A Ciba Foundation Symposium. London, 1970, 51, p. 10—67.
10. Meryman H. T. Freezing injury and its prevention in living cells. — Ann. Rev. Biophys. and Bioeng., 1974, 3, p. 341—363.
11. Meryman H. T. Cryoprotective agents. — Cryobiology, 1971, 8, p. 173—183.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
12. XII 1975 г.

E. A. Gordienko, G. S. Ishkov, L. F. Rozanov

DEHYDRATION AND SOME MECHANISMS OF CELL CRYOINJURY AT LOW-TEMPERATURE CONSERVATION OF SUSPENSION

Summary

The behaviour of the cell volume of mice peritoneal exudate and rat bone marrow was studied at the suspensions freezing down to -20°C , the rates being 0.3; 1; 10 and 60° per 1 min, and subsequent warming, the rate being 1° per 1 min or 50° per 1 min by means of a low-temperature attachment to the light microscope. In the process of the freezing-warming cycle the cell dimensions first decrease and then the cells swell and become decoloured. The agreement of the results obtained with the known in cryobiology hypothesis of the minimum volume and other hypotheses of cryoinjuries is discussed.

Ю. А. Иткин, В. Л. Бронштейн, Л. Ф. Розанов

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СТРУКТУРЫ ЛЬДА НА ПРОЦЕСС ОБЕЗВОЖИВАНИЯ И ВНУТРИКЛЕТОЧНУЮ КРИСТАЛЛИЗАЦИЮ ПРИ ЗАМОРАЖИВАНИИ КЛЕТОЧНОЙ СУСПЕНЗИИ

Изучение кинетики замерзания клеточных суспензий методом криомикроскопии показало, что в зависимости от условий охлаждения клетки либо оттесняются кристаллами льда в каналы, образующиеся при их росте, либо захватываются кристаллами (рисунок). (Изучение механизма отодвижения и захвата клеток льдом при замораживании клеточных суспензий будет проведено отдельно).

Процесс обезвоживания клеток, находящихся в каналах между кристаллами льда и захваченных кристаллами, должен происходить по-разному, поскольку при замерзании вакуоли, в которой находится захваченная льдом клетка, должно повышаться давление, величина которого может быть достаточно большой (достигать значений порядка 10^3 атм).

Рассмотрим процесс обезвоживания клеток, захваченных растущими кристаллами льда. Для аналитического описания процесса примем упрощающие предположения, подобные принятым в работах [1, 6].

I. В период замораживания цитоплазматическая мембрана является интактной.

II. Мембрана проницаема только для молекул воды.

III. Пространственные градиенты температуры и давления малы.

IV. Химический потенциал воды вне клетки равен химическому потенциалу льда на границе раздела фаз.

V. Перепад химического потенциала воды во внутриклеточной среде и внеклеточном растворе намного меньше разности химических потенциалов воды между вне- и внутриклеточной средой.

Построение кинетического уравнения. Поскольку мембрана клетки предполагается проницаемой только для молекул воды и коэффициент захвата примеси при росте кристалла льда является величиной очень малой, при описании процесса обезвоживания захваченных льдом клеток можно считать, что количество растворенных молекул внутри клетки n_i и вне клетки n_e практически не меняется. Тогда химический потенциал воды внутри и вне клетки является функцией только температуры, давления и количества молекул воды N_i и N_e (e и i — индексы для вне- и внутриклеточных растворов).

В качестве независимой переменной удобно рассматривать не количество молекул воды, а суммарную концентрацию

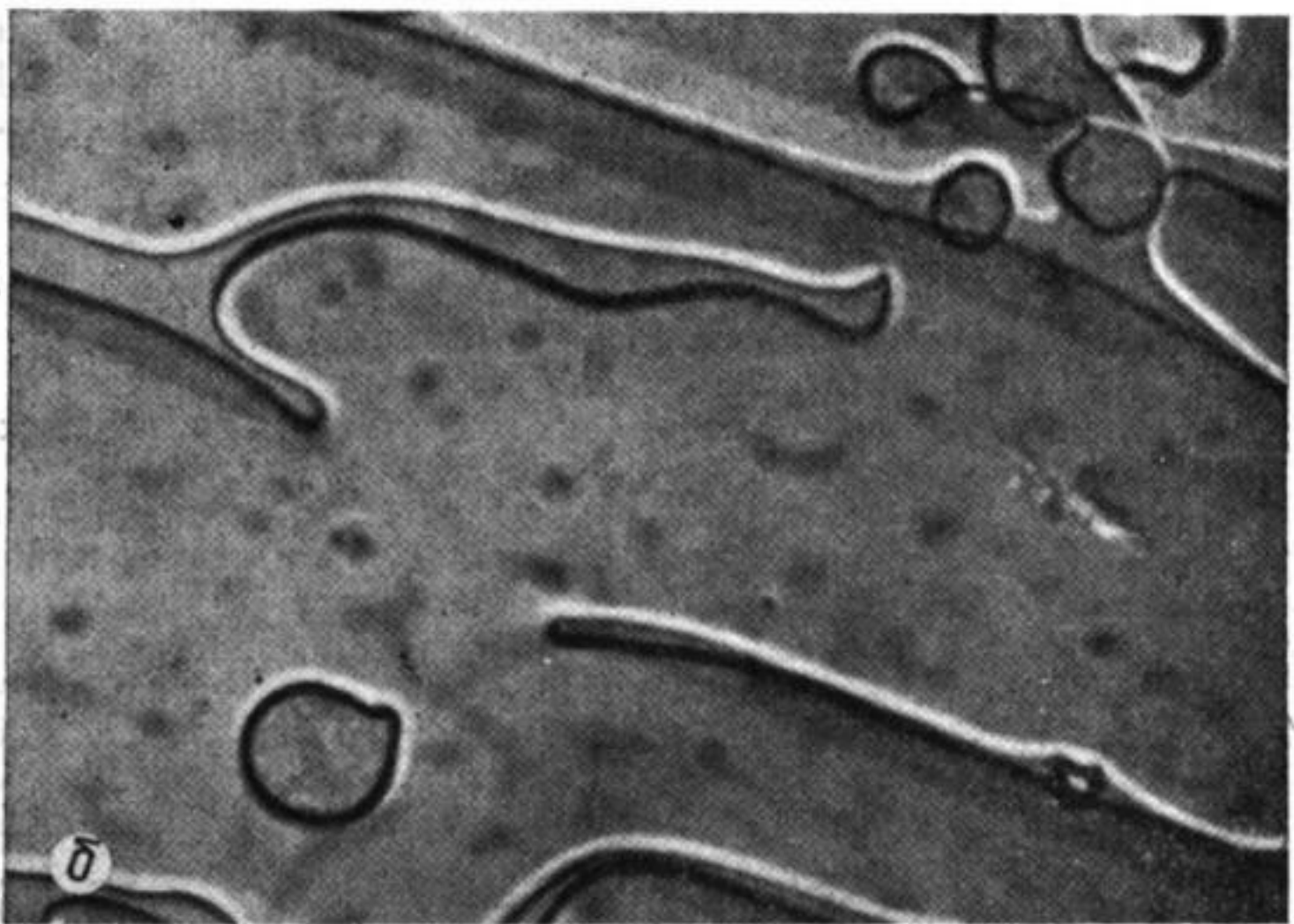
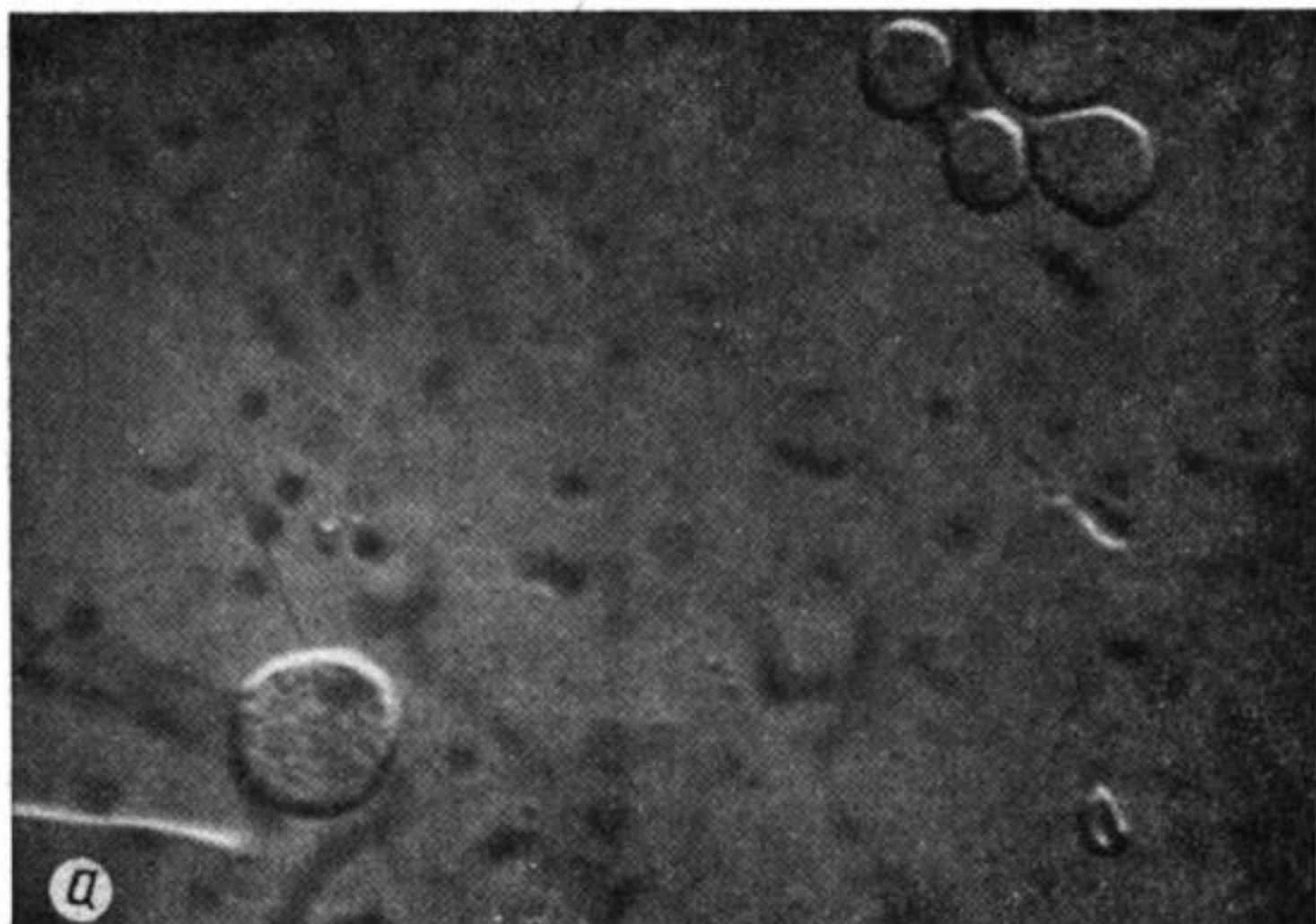
$$c_{i,e} = \frac{n_{i,e}}{N_{i,e} + n_{i,e}} \quad (1)$$

В силу предположения (IV) концентрация внеклеточного раствора может быть получена из уравнения

$$\mu_e(P, T, c_e) = \mu_s \quad (2)$$

где P и T — давление и температура в жидкой фазе; μ_e и μ_s — химический потенциал воды во внеклеточном растворе и во льду.

Рассмотрим случай, когда количество клеток в единице объема суспензии невелико, т. е. когда среднее расстояние между клетками на-



много больше размеров клетки. Тогда приближенно можно считать, что имеется клетка, захваченная бесконечным кристаллом льда.

С учетом энергии деформации химический потенциал льда на поверхности вакуоли может быть представлен в виде

$$\mu_s = \mu_s(P, T) - \frac{Ev_s}{2(1+\sigma)} \left(u_{ik} - \frac{1}{3} \delta_{ik} u_{ee} \right)^2, \quad (3)$$

где $\mu_s(P, T)$ — химический потенциал недеформированного льда при температуре T и давлении P ; E — модуль Юнга; σ — коэффициент Пуассона; u_{ik} — тензор деформации льда на поверхности; v_s — объем на одну молекулу льда.

Для нахождения u_{ik} необходимо рассмотреть задачу теории упругости льда для бесконечного кристалла со сферической полостью, вну-



Захват клеток костного мозга растущими кристаллами льда при замораживании клеточной суспензии со скоростью $10^{\circ}\text{C}/1$ мин при температуре: $a - \approx 2,5^{\circ}\text{C}$; $b - \approx -3^{\circ}\text{C}$; $в - \approx -5^{\circ}\text{C}$; $\times 600$.

три которой давление P , а P_a — атмосферное давление. Воспользуемся решением этой задачи, приведенным в работе (2), и получим

$$\mu_s = \mu_s(P, T) - \frac{(1 + \sigma)}{8E} v_s (P - P_a)^2. \quad (4)$$

Практически для всех реальных тел коэффициент Пуассона и модуль Юнга для льда $E \sim 3 \cdot 10^4$ атм, поэтому отношение

$$\frac{(1 + \sigma) v_s (P - P_a)^2}{8E (\mu_s(P, T) - \mu_s(P_a(T)))} \sim \frac{P - P_a}{8E} \sim 4 \cdot 10^{-3} \quad (5)$$

для $P \sim 10^3$ атм. В нашем случае вкладом деформации в химический потенциал льда можно пренебречь.

Предполагая линейную связь между потоком воды из клетки и силой, вызывающей его (5), имеем

$$\frac{\partial N_i}{\partial t} = - \frac{KS}{v_0^2} (\mu_i - \mu_s), \quad (6)$$

где t — время; S — площадь поверхности мембраны; v_0 — объем, приходящийся на одну молекулу воды в жидкой фазе; K — константа проницаемости мембраны для молекулы воды.

Подставив (2) в (5), получим

$$\frac{\partial N_i}{\partial t} = - \frac{KS}{v_0^2} (\mu_i - \mu_s) = - \frac{KS \partial \mu_i(P, T, \bar{c}_i)}{v_0^2 \partial c_i} c_i, \quad (7)$$

где $c_i = c_i - \bar{c}_i$; $\bar{c}_i$ определяется из уравнения

$$\mu_i(P, T, \bar{c}_i) = \mu_s. \quad (8)$$

Из формулы (1) следует, что

$$\frac{\partial \bar{c}_i}{\partial t} = - \frac{c_i^2}{n_i} \frac{\partial N_i}{\partial t}. \quad (9)$$

Подставляя уравнение (9) в (7), с точностью до членов порядка c_1 получаем

$$\frac{\partial c_1}{\partial t} = -\frac{\partial \bar{c}_1}{\partial t} + \frac{KS \bar{c}_1^2}{v_0^2 n_1} \frac{\partial \mu_1}{\partial c_1} c_1. \quad (10)$$

Для нахождения величины $\frac{\partial \bar{c}_1}{\partial t}$ продифференцируем уравнение (8):

$$\frac{\partial \bar{c}_1}{\partial t} = \frac{1}{\partial \mu_1 / \partial c_1} \left[(v_s - v_0) \frac{\partial P}{\partial t} + \frac{q}{T} \frac{\partial T}{\partial t} \right], \quad (11)$$

где $q = T \left(\frac{\partial \mu_s}{\partial T} - \frac{\partial \mu_l}{\partial T} \right)$ — теплота фазового перехода.

Величина давления в вакуоли будет зависеть от изменения объема жидкой фазы и степени деформации льда:

$$\frac{\partial P}{\partial t} = \frac{(\rho_e - \rho_s)}{\rho_e \gamma V} \left(\frac{\partial V}{\partial t} - \frac{\partial \mu_p}{\partial t} S_s \right), \quad (12)$$

где $V = V_i + V_e$ — объем вакуоли; ρ_s и ρ_e — соответственно плотность льда и внеклеточного раствора; S_s — площадь поверхности вакуоли; μ_p — составляющая вектора деформации вдоль оси в сферических координатах (ρ, φ, θ); γ — коэффициент сжимаемости раствора.

В силу предположения II

$$\begin{aligned} \frac{\partial V_i}{\partial t} &= v_0 \frac{\partial N_i}{\partial t} = -\frac{KS}{v_0} \frac{\partial \mu_1}{\partial c_1} c_1, \\ \frac{\partial V_e}{\partial t} &= v_0 \frac{\partial N_e}{\partial t} = -\frac{\partial c_e}{\partial t} \frac{n_e v_0}{c_e^2}. \end{aligned} \quad (13)$$

Поскольку

$$\begin{aligned} c_e &= \frac{n_e}{N_e + n_e}, \\ n_e v_0 &= \frac{N_e^0 v_0}{1 - c_e^0}, \end{aligned} \quad (14)$$

где c_e^0 и N_e^0 — начальная концентрация и количество молекул воды во внеклеточном растворе, то

$$\frac{\partial N_e}{\partial t} = -\frac{N_e^0 v_0}{(1 - c_e^0) c_e^2} \frac{\partial c_e}{\partial t}. \quad (15)$$

Величина $\partial \mu_p / \partial t$ может быть найдена из решения (2) обсуждавшейся задачи теории упругости

$$\frac{\partial \mu_p}{\partial t} = \frac{\partial R}{\partial t} \frac{[3 \sigma P_a - (1 + \sigma) P]}{E}, \quad (16)$$

где R — радиус вакуоли. Поскольку $\frac{\partial R}{\partial t} S_s = \frac{\partial V}{\partial t}$, отношение $\frac{\partial \mu_p S_s}{\partial t} / \frac{\partial V}{\partial t} \sim \frac{P}{E} \sim 3 \cdot 10^{-2}$ при $P \sim 10^3$ атм, т. е. при вычислении величины

давления в вакуоли можно не учитывать деформации кристалла льда. Подставляя выражения (13) и (15) в (12), получаем

$$\frac{\partial P}{\partial t} = \frac{\rho_e - \rho_s}{\rho_e \gamma} \left[-\frac{KS}{v_0} \frac{\partial \mu_i}{\partial c_i} c_1 - \frac{N_e^0 v_0}{(1 - c_e^0) c_e^2} \frac{\partial c_e}{\partial t} \right]. \quad (17)$$

Для определения величины переохлаждения протоплазмы захваченных льдом клеток и давления в вакуоли необходимо решить систему уравнений (10), (11), (17). При захвате клеток растущими кристаллами льда начальный объем внеклеточного раствора в вакуоли обычно мал, поэтому член $\frac{N_e^0 v_0}{c_e^2 (1 - c_e^0)} \frac{\partial c_e}{\partial t}$ в выражении (17) часто можно не учитывать, что значительно упрощает задачу.

Оценим величину переохлаждения протоплазмы клеток. Для этого в формуле (10) положим $\frac{\partial c_1}{\partial t} \sim 0$ и получим

$$c_1 \sim \frac{-\frac{\partial T}{\partial t} R \frac{q}{T}}{3K \left[\frac{(v_s - v_0)(\rho_e - \rho_s)}{v_0 \rho_e \gamma} - \frac{\bar{c}_i}{v_0} \frac{\partial \mu_i}{\partial c_i} \right] \frac{\partial \mu_i}{\partial c_i}}, \quad (18)$$

где учтено, что $\frac{V_i}{S} \sim \frac{R}{3}$.

Полагая $\frac{\partial \mu_i}{\partial c_i} \sim -T$, $v_0 \sim 4 \cdot 10^{-23} \text{ см}^3$, получим

$$\frac{1}{v_0} \frac{\partial \mu_i}{\partial c_i} \sim 10^4 \text{ атм}. \quad (19)$$

Поскольку $1/\gamma \sim 3 \cdot 10^4 \text{ атм}$,

$$\frac{\bar{c}_i \partial \mu_i / \partial c_i \gamma v_0 \rho_e}{v_0 (v_s - v_0)(\rho_e - \rho_s)} \sim \frac{\bar{c}_i v_0 \rho_e}{(v_s - v_0)(\rho_e - \rho_s)}. \quad (20)$$

Величина переохлаждения протоплазмы клеток, находящихся в каналах между кристаллами льда, согласно уравнению (1) определяется выражением

$$c_1 \sim \frac{-q/T \cdot R v_0 \partial T / \partial t}{3K \bar{c}_i (\partial \mu_i / \partial c_i)^2}. \quad (21)$$

Из сравнения выражений (20) и (21) видно, что переохлаждение протоплазмы клеток, захваченных растущими кристаллами льда, меньше, чем клеток, располагающихся в каналах.

Вероятность внутриклеточной кристаллизации. Согласно общей теории термодинамических флуктуаций [3], вероятность w флуктуационного возникновения зародыша новой фазы пропорциональна $\exp(-R_{\min}/T)$, где $R_{\min}$ — наименьшая работа, которую необходимо затратить для его возникновения. Если при этом температура и внешнее давление на систему не меняются, то $R_{\min} = \Delta\Phi$, где Φ — термодинамический потенциал. При вычислении $\Delta\Phi$ для клеток, находящихся в вакуоли, необходимо учитывать, как в работе [4], изменение потенциала за счет деформации окружающей среды при образовании зародыша. Поэтому вероятность внутриклеточной кристаллизации при одинаковой величине переохлаждения протоплазмы зависит от того, где находится клетка.

Изменение термодинамического потенциала $\Delta\Phi$ при образовании зародыша льда из n молекул внутри вакуоли

$$\Delta\Phi = n\mu_s(P', T) - n\mu_l(P, T, c_l) + \Delta\Phi_{\text{def}} + 4\pi r^2\alpha, \quad (22)$$

где P' — давление в зародыше, $P' = P + \frac{2\alpha}{r}$ в приближении сферического зародыша; $4\pi r^2$ — площадь поверхности зародыша, r — радиус зародыша; $\Delta\Phi_{\text{def}}$ — изменение Φ за счет деформации твердой фазы.

Так как основной вклад в $\Delta\Phi_{\text{def}}$ зависит от давления в жидкой фазе при образовании зародыша, то для изменения термодинамического потенциала за счет деформации получаем

$$\Delta\Phi_{\text{def}} = \frac{(v_s - v_0) n v_s P V \gamma}{v_0 \gamma V} = n v_s P \left(\frac{v_s - v_0}{v_0} \right). \quad (23)$$

Следовательно, вероятность образования зародыша из n молекул

$$w_n \sim \exp \left\{ \frac{-v_s n \left[(\mu_s - \mu_l)/v_s + P \left(\frac{v_s - v_0}{v_0} \right) \right] + 3 \frac{\alpha}{r}}{T} \right\}. \quad (24)$$

Как известно [3, 4], величина равновесного зародыша определяется из условия минимума показателя экспоненты в выражении (23), т. е.

$$\frac{\mu_s - \mu_l}{v_s} + P \left(\frac{v_s - v_0}{v_0} \right) + \frac{2\alpha}{r_{\text{max}}} = 0, \quad (25)$$

откуда

$$r_{\text{max}} = \frac{-2\alpha}{\left[\frac{\mu_s - \mu_l}{v_s} + P \left(\frac{v_s - v_0}{v_0} \right) \right]}. \quad (26)$$

Таким образом, вероятность возникновения равновесного зародыша

$$w_{\text{max}} \approx \exp \left\{ - \frac{16 \alpha^3 \pi}{3 T \left[\frac{\mu_s - \mu_l}{v_s} + P \left(\frac{v_s - v_0}{v_0} \right) \right]^2} \right\}. \quad (27)$$

Из выражения (27) видно, что с ростом давления в вакуоли вероятность внутриклеточной кристаллизации уменьшается. Если рассматривать величину $\frac{\mu_s - \mu_l}{v_s} + P \left(\frac{v_s - v_0}{v_0} \right)$ как эффективное переохлаждение, то при давлении $P \sim 10^3$ атм в температурных единицах оно снижается на величину порядка 1°C .

Таким образом, из проведенного исследования следует, что для внутриклеточной кристаллизации захваченных льдом клеток необходимы скорости охлаждения, превышающие те, при которых происходит замерзание клеток, расположенных в каналах между кристаллами льда.

ЛИТЕРАТУРА

1. Иткин Ю. А., Бронштейн В. Л., Гордиенко Е. А. Анализ процесса обезвоживания при замораживании клеточных суспензий. — Криобиология и криомедицина, 1975, вып. 2, с. 40—42.
2. Ландау Л. Д., Лифшиц Е. М. Теория упругости. М., «Наука», 1964. 431 с.
3. Ландау Л. Д., Лифшиц Е. М. Статистическая физика. М., «Наука», 1965. 563 с.

4. Лифшиц И. М., Гулида Л. С. О развитии зародышей локального плавления. — ДАН СССР, 1952, 87, с. 523—528.
5. De Groot S. R., Mazur P. Non-Equilibrium Thermodynamics. Amsterdam, North-Holland publishing Company, 1962, 234 p.
6. Mazur P. Kinetics of water loss from cell at subzero temperatures and likelihood of intracellular freezing. — J. Gen. Physiol., 1963, 47, N 2, p. 123—127.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
12. XII 1975 г.

Iu. A. Itkin, V. L. Bronshtein, L. F. Rozanov

STUDIES IN THE ICE STRUCTURE EFFECT ON THE PROCESS OF DEHYDRATION AND INTRACELLULAR CRYSTALLIZATION IN FREEZING CELLULAR SUSPENSIONS

Summary

The cells spatial arrangement in the ice structure at the cells suspensions freezing was studied by the method of low-temperature conservation. By means of the nonequilibrium thermodynamics apparatus the process of the cell dehydration is studied and a possibility is evaluated for appearance of intracellular crystals depending on the forming ice structure.

УДК 57:536.48.047:576.347

В. А. Бондаренко, В. В. Лемешко, А. М. Белоус

НАРУШЕНИЕ СТРУКТУРЫ МЕМБРАН МИТОХОНДРИИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЗАМОРАЖИВАНИЯ—ОТТАИВАНИЯ

Как известно, перекисное окисление липидов в биологических мембранах связано с окислением ненасыщенных жирных кислот (НЖК). Митохондрии печени крысы отличаются высоким содержанием НЖК, в частности линолевой, линоленовой и арахидоновой, которые подвержены особенно интенсивному перекислению. Этот процесс в мембранах митохондрий катализируется ионами двухвалентных металлов, в особенности геминным и негеминным железом [3]. В норме развитию указанных процессов препятствует так называемый структурный антиоксидант — строго упорядоченная упаковка молекул в составе мембран, ограничивающая взаимодействие субстрата и катализаторов перекисления [5]. Нарушение структуры при воздействии различных физико-химических факторов — ультрафиолетового УФ и радиоактивного облучений, так называемых хаотропных агентов (мочевина, гуанидин-НСI) — приводит к развитию перекисных процессов, что связано с ослаблением или прекращением действия структурного антиоксиданта. Показано, что замораживание — оттаивание также приводит к развитию перекисления в митохондриальных мембранах [1]. При этом

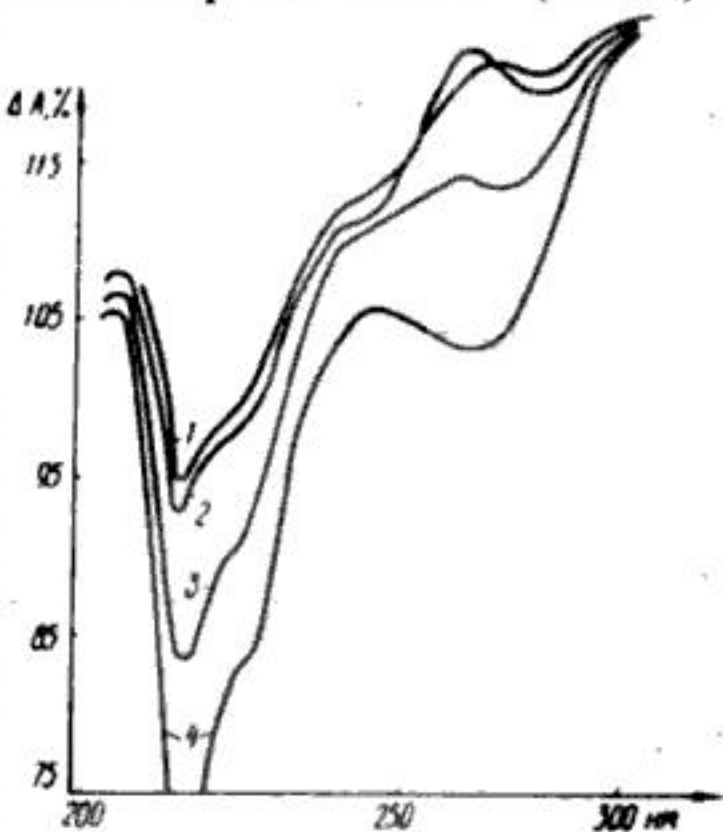


Рис. 1. Дифференциальные спектры для каждой из четырех точек опытного и контрольного рядов: 1 — неинкубированные пробы; 2—4 — соответственно 3; 15 и 35 мин инкубации при температуре 37°C.

интенсивность переокисления существенно зависит от режима замораживания—оттаивания [2].

В данной работе изучалось состояние НЖК в мембранах митохондрий, подвергнутых замораживанию—оттаиванию, по появлению в системе сопряженных двойных связей, образуемых жирными кислотами дие-

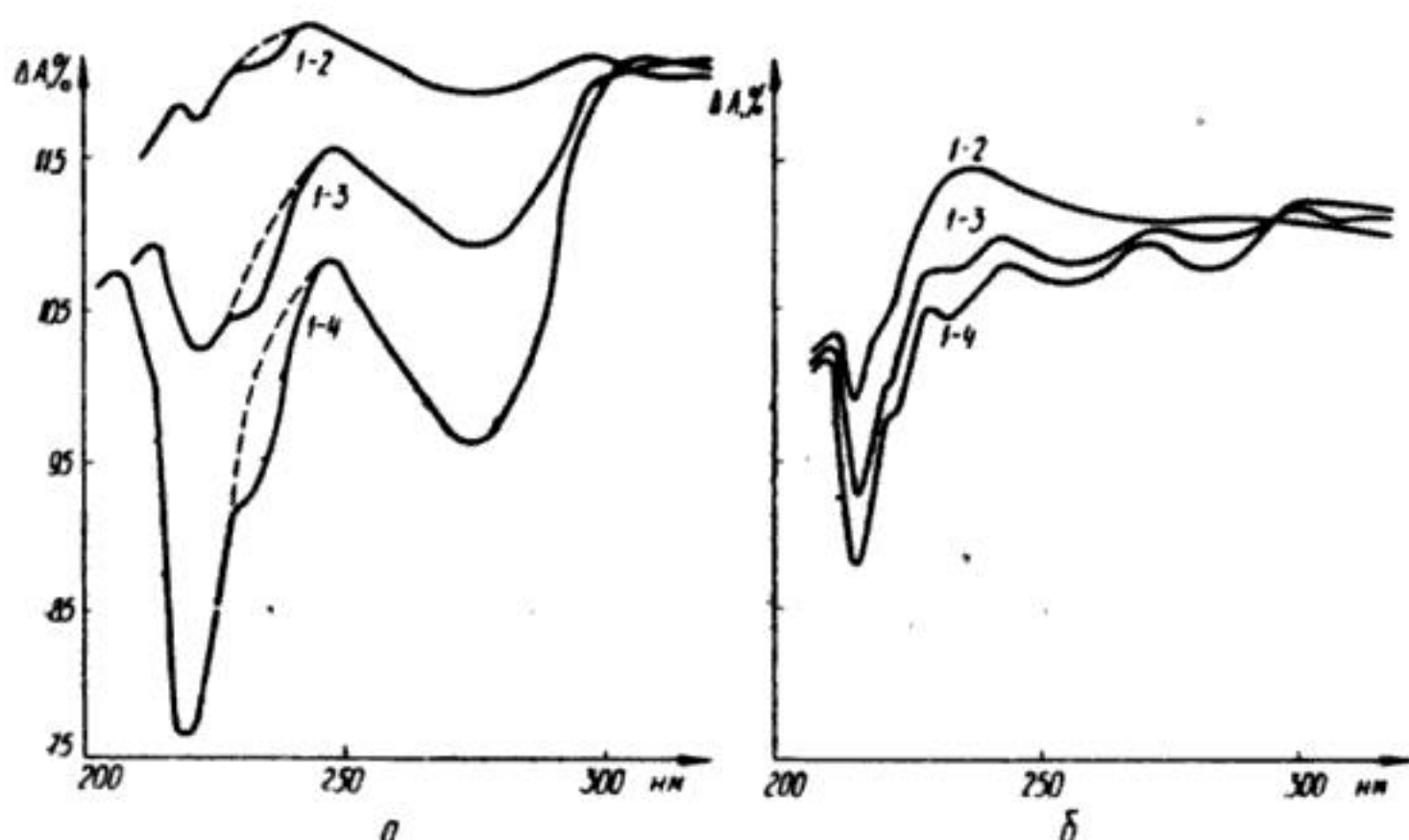


Рис. 2. Дифференциальные спектры в пределах опытного (а) и контрольного (б) рядов относительно неинкубированной пробы: 1—2, 1—3, 1—4 — соответственно 3, 15, и 35 мин инкубации при 37°C.

новых конъюгатов (ДК) — промежуточных продуктов переокисления липидов, а также по идентификации конечного продукта переокисления — малонового диальдегида (МДА).

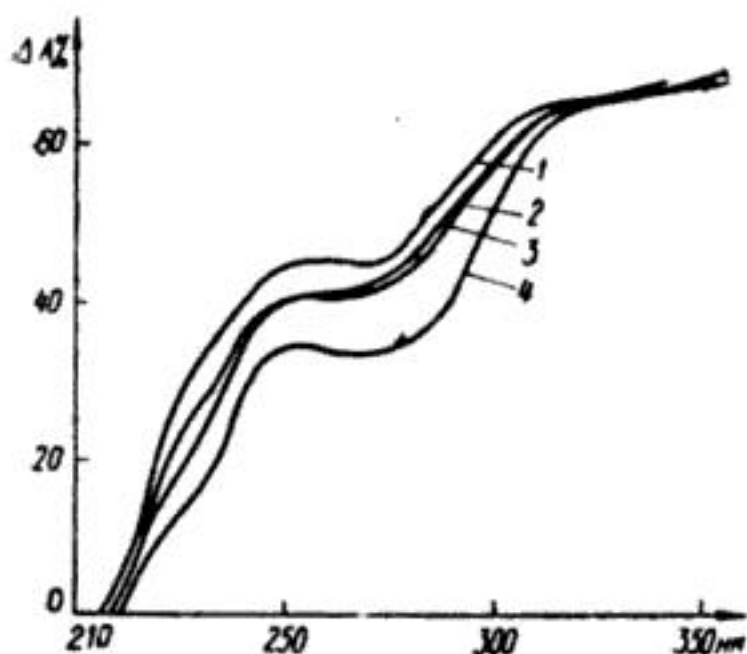


Рис. 3. Абсолютное (0—100%) поглощение для контрольных и опытных проб:

1 — неинкубированный контроль; 2 — контроль, 36 мин инкубации; 3 — неинкубированный опыт; 4 — опыт, 35 мин инкубации.

На рис. 1 представлены дифференциальные спектры (на шкале спектрофотометра 75—125% светопропускания) для каждой из четырех проб «опыт — контроль». Следует отметить более высокое общее поглощение опытного ряда по всей спектральной области 200—300 нм. Это свидетельствует о переокислении в опытном ряду значительных количеств субстрата (липидов).

На рис. 2 приведены дифференциальные спектры в пределах как контрольного, так и опытного ряда для каждого из трех интервалов времени инкубации при температуре +37° относительно неинкубированной пробы. Отмечается особенно высокий прирост поглощения в зависимости от времени инкубации в ряду замороженных — оттаянных митохондрий.

На рис. 3 представлены спектры абсолютного поглощения на шкале спектрофотометра со светопропусканием 0—100% в опыте и контроле для неинкубированных проб и для точки, соответствующей 35 мин инкубации при температуре 37°, в которой отражены степень и глубина развития перекисных процессов как на стадии диеновой конъюгации,

так и на стадии накопления МДА. Можно отметить схожесть полученных спектров со спектрами фосфолипидов при УФ-облучении [4].

Таким образом, можно предположить, что при замораживании—оттаивании происходит деградация митохондриальных фосфолипидов, обусловленная как разрыхлением их связей с белками в составе мембраны, так и последующим окислением их НЖК. Повышение поглощения в области 216 нм, полученное нами для опытного ряда, отражает нарушение гидрофобных взаимодействий в мембране митохондрий, проявляющееся в увеличении экстрактивности фосфолипидов системой растворителей изопропиловый спирт—гептан.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белоус А. М., Лемешко В. В., Бондаренко В. А. Влияние замораживания—оттаивания на кинетику хемилюминесценции митохондрий печени крыс. — В кн.: Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины. К., «Наук. думка», 1974, с. 38—39.
2. Бондаренко В. А., Лемешко В. В., Белоус А. М. Вплив заморожування—відтавання у різних режимах на хемилюмінесценцію мітохондрій печінки щурів. — Укр. біохім. журн., 1975, 47, № 6, с. 743—747.
3. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., «Наука», 1972, 272 с.
4. Потапенко А. Я., Рошупкин Д. М., Коган Е. А., Владимиров Ю. А. Исследование действия УФ-света на биологические мембраны. Изменение электропроводности биомолекулярных фосфолипидных мембран. — ДАН СССР, 1972, 202, № 4, с. 882—885.
5. Hatefi Y., Hanstein W. G. Lipid oxidation in biological membranes. 1. Lipid oxidation in submitochondrial particles and microsomes induced by chaotropic agents. — Arch. Biochem. Biophys., 1970, 138, p. 73—81.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
12. XII 1975 г.

V. A. Bondarenko, V. V. Lemesko, A. M. Belous

LESION OF THE MITOCHONDRIA MEMBRANES STRUCTURE UNDER EFFECT OF FREEZING-DEFROSTING

Summary

The effect of freezing-defrosting on the state of the rat liver mitochondria membranes was studied by means of UV-absorption of the corresponding heptane extracts. After freezing-defrosting both the total absorption within a band of 200—300 nm and absorption in ranges characteristic of diene conjugates and malonic dialdehyde increase. Long-term incubation at a temperature of 37° C results in a much more absorption of the frozen samples relative to control. A conclusion is made that the change in the mitochondria membranes state is determined by both the loosening of phospholipids bonds in the membrane composition and the further development of the reactions of lipids peroxide oxidation, that is explained by hyperconcentration and recrystallization phenomena in the process of freezing-defrosting.

УДК 57:536.48.047:576.347:587

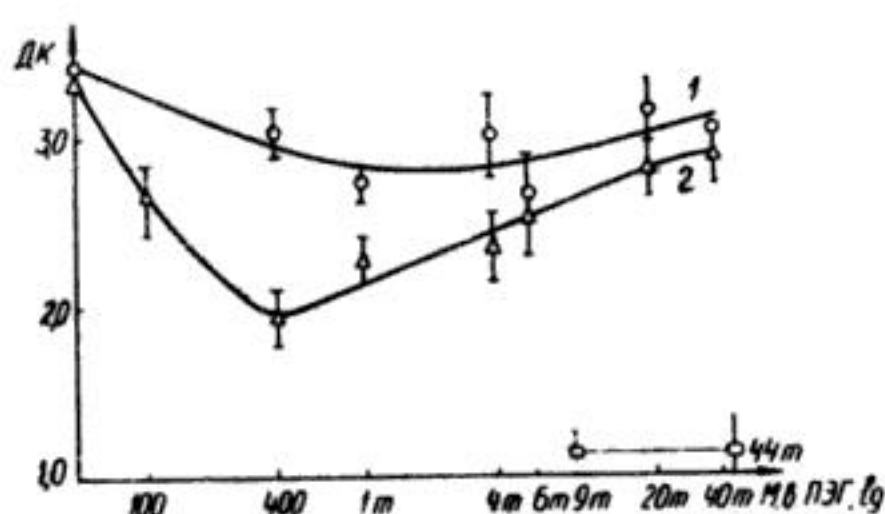
Л. Г. Мишнева, А. М. Белоус

ВЛИЯНИЕ ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЕЙ РАЗЛИЧНОГО МОЛЕКУЛЯРНОГО ВЕСА НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МИТОХОНДРИЙ

Митохондрия как криобиологическая модель является удобной для изучения влияния различных криопротекторов на ее структурно-функциональное состояние. В настоящей работе исследовали влияние полиэтиленгликолей (ПЭГ) молекулярного веса 100; 400; 1000; 4000; 6000;

Влияние 15%-ных растворов ПЭГ и ПВП различных молекулярных весов

Субстрат	Состояние	Контроль	ПЭГ-100	ПЭГ-400	ПЭГ-1000
На сукцинате	4	$20,5 \pm 1,48$	—	$25,5 \pm 3,00$ $p < 0,1$	$25,3 \pm 3,24$ $p < 0,1$
	3	$15,0 \pm 1,24$	$14,3 \pm 2,68$ $p > 0,1$	$16,5 \pm 2,76$ $p < 0,01$	$15,8 \pm 2,56$ $p < 0,05$
На α -кетоглутарате	4	$70,4 \pm 12,4$	—	$67,6 \pm 10,0$ $p > 0,1$	$64,0 \pm 8,09$ $p < 0,05$
	3	$47,4 \pm 3,83$	$34,2 \pm 5,20$ $p < 0,02$	$32,0 \pm 4,90$ $p < 0,02$	$33,8 \pm 5,76$ $p < 0,001$



Влияние криопротекторов группы ПЭГ (1 и 2) и ПВП (внизу) различных молекулярных весов на дыхательный контроль митохондрий печени белых крыс:

1 — на сукцинате; 2 — на α -кетоглутарате.

но (рисунок). Как видно из рисунка, отмечается угнетение дыхательного контроля (ДК) в области молекулярных весов ПЭГ 1000—6000. Более выраженное влияние ПЭГ оказывают на скорость окисления митохондриями α -кетоглутарата в 3-м метаболическом состоянии и на величину ДК (таблица). Как следует из рисунка и таблицы, максимальное угнетение V_3 наблюдается в области молекулярных весов 100—1000. Снижение угнетающего действия ПЭГ с увеличением молекулярного веса может быть связано с уменьшением их способности проникать через внутреннюю и, возможно, внешнюю мембраны митохондрий. ПВП с молекулярным весом 9000 и 44000 резко тормозит дыхание митохондрий, снижая их ДК до единицы, т. е. дыхательная активность митохондрий практически отсутствовала.

Таким образом, при окислении митохондриями α -кетоглутарата влияние ПЭГ проявляется в значительно большей степени, чем при окислении сукцината. Наиболее выраженное торможение дыхания в состоянии 3 и уменьшение ДК наблюдаются в присутствии ПЭГ-400, а ПВП в изученных концентрациях полностью блокирует функцию этих оргanelл.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
12. XII 1975 г.

L. G. Mishneva, A. M. Belous

EFFECT OF POLYETHYLENE GLYCOLS OF DIFFERENT MOLECULAR WEIGHT ON THE FUNCTIONAL STATE OF MITOCHONDRIA

Summary

The effect of different cryoprotectors was studied as applied to respiration activity of isolated mitochondria from the rat liver. It is established that in oxidation of α -ketoglutarate with mitochondria the effect of polyethylene glycol is much more pro-

на дыхательную активность митохондрий

ПЭГ-4000	ПЭГ-6000	ПЭГ-20000	ПЭГ-40000	ПВП-9000	ПВП-44000
25,0±3,41 p<0,1	23,2±2,58 p>0,1	23,5±5,22 p>0,1	24,1±1,32 p>0,1	28,4±4,10 p>0,1	— —
16,8±2,67 p<0,05	16,5±3,09 p<0,1	16,1±1,72 p>0,1	16,5±4,9 p>0,1	14,6±5,00 p>0,1	13,4±3,30 p>0,1
65,8±10,3 p>0,1	59,0±8,84 p<0,05	64,9±12,1 p>0,1	73,2±4,25 p>0,1	44,0±12,0 p<0,02	— —
33,0±2,43 p<0,1	37,2±6,12 p<0,001	38,6±5,87 p>0,1	39,7±6,41 p>0,1	19,6±8,00 p<0,05	13,7±3,50 p>0,001

nounced than in succinate oxidation. The most pronounced inhibition of respiration at state 3 and a drop in the respiration control are observed with the presence of PEO-400, and PVP in the studied concentrations blocks completely the function of these organelles.

УКД 57:536.48.047:576.363

Г. С. Лобынцева

ВЛИЯНИЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ—ОТТАИВАНИЯ НА ЭЛЕКТРОКИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

При изучении влияния низкотемпературного консервирования на клетки крови затрагивается несколько аспектов функционирования: морфологический, биохимический и цитологический. В последнее время все чаще применяются биофизические методы, с помощью которых удастся уловить некоторые закономерности биохимических реакций, происходящих на мембранах клеток в физиологических условиях, без боязни повредить мембраны живой интактной клетки.

По словам А. Поликара, «...проблема мембран, как наружных, так и внутренних, представляется важнейшей проблемой физиологии клетки и по значимости стоит в одном ряду с проблемой репликации ДНК и синтеза белка». В данной работе с помощью метода микроэлектрофореза изучали действие криопротекторных добавок и замораживания—оттаивания на мембраны эритроцитов. Измерения скорости смещения клеток проводили в плоской стеклянной камере при постоянном напряжении 100В. Электрокинетическую подвижность определяли по формуле

$$U = \frac{IS\lambda}{It},$$

где S — поперечное сечение камеры ($0,47 \cdot 1,4 \text{ см}^2$); $\frac{l}{t}$ — скорость смещения клеток в камере, мкм/сек; I — сила тока мА; λ — электропроводность раствора, Ом⁻¹.

Подвижность клеток измеряли в плазме и после: 1) двукратного отмывания физиологическим раствором (рН 7,2); 2) добавления криопротектора; 3) отмывания от криопротектора; 4) замораживания—оттаивания и отмывания от криопротектора; 5) в плазме после замораживания—оттаивания.

Добавление криопротектора к клеточной взвеси производят обычно во избежание осмотического лизиса в концентрациях от 20 до 60%. Возникает вопрос: какие растворы нужно использовать в качестве разбавителя? То ли это будут сложные буферные системы, то ли дистиллированная вода? Каких-то определенных рекомендаций по данному вопросу в литературе мало, зачастую об этом даже не упоминается в публикуемых работах.

Влияние низкотемпературного консервирования на электрофоретическую подвижность эритроцитов

Среда	Электрофоретическая подвижность, $\text{мк/сек}^{-1} \cdot \text{В} \cdot \text{см}^{-1}$		
	до	после	в плазме после отогрева и отмывания
	отмывания физиологическим раствором рН 7,0		
Плазма	$1,24 \pm 0,005$ (80)	$1,50 \pm 0,003$ (51)	—
Полиэтиленоксид низкомолекулярный, 15% Физиологический раствор	$0,99 \pm 0,002$ (31)	$\frac{1,92 \pm 0,005}{1,60 \pm 0,004}$ (57) (84)	$1,50 \pm 0,006$ (23)
H ₂ O	$1,24 \pm 0,004$ (16)	$\frac{1,90 \pm 0,003}{2,19 \pm 0,002}$ (31) (52)	$1,16 \pm 0,007$ (34)
Полиэтиленоксид высокомолекулярный, 10% Физиологический раствор	$0,96 \pm 0,003$ (36)	$\frac{1,67 \pm 0,004}{1,74 \pm 0,005}$ (64) (89)	$1,42 \pm 0,014$ (29)
H ₂ O	$1,03 \pm 0,002$ (18)	$\frac{1,45 \pm 0,003}{1,63 \pm 0,002}$ (50) (64)	$1,18 \pm 0,004$ (27)
Физиологический раствор + плазма (1 : 1)	$1,15 \pm 0,001$ (30)	$\frac{1,33 \pm 0,001}{1,84 \pm 0,001}$ (40) (35)	$1,41 \pm 0,005$ (19)

Примечание. В числителе даны значения электрофоретической подвижности до, а в знаменателе — после замораживания — оттаивания. В скобках — количество клеток.

Изучено влияние различных разбавителей криопротекторов (раствор ЦОЛИПК-76, физиологический раствор и дистиллированная вода) и установлено, что криопротекторные свойства полиэтиленоксида, разведенного на растворе ЦОЛИПК-76, значительно снижаются, после оттаивания количество клеток уменьшалось почти на 50%.

В таблице приведены сравнительные данные, полученные при замораживании эритроцитов с полиэтиленоксидами различных молекулярных весов, разведенными до 20- и 30%-ной концентрации физиологическим раствором и дистиллированной водой и добавленными к клеточной суспензии в отношении 1 : 1.

Установлено, что по действию на клеточную мембрану эти два раствора различаются между собой: первый — значительно снижает электрофоретическую подвижность, второй — увеличивает ее. После оттаивания и отмывания криопротектора эритроциты, консервированные с полиэтиленоксидом, разведенным дистиллированной водой, восстанавливают в плазме исходную электрофоретическую подвижность, что свидетельствует о сохранности их мембран. Эритроциты, консервированные с полиэтиленоксидами на физиологическом растворе, имеют подвижность на 18% выше, чем исходные.

Кровь является системой, равновесное состояние которой зависит от электрических характеристик отдельных ее компонентов, поэтому можно сказать, что эритроциты, замороженные под защитой криопро-

тектора на дистиллированной воде, будут лучше входить в систему, не нарушая установившихся взаимоотношений.

В таблице приведены данные по консервации эритроцитов с низко- и высокомолекулярными криопротекторами. В обоих случаях лучшие результаты получены для клеток, замороженных с криопротекторами на дистиллированной воде. Если говорить о механизме указанного явления, то можно предположить, что, во-первых, криопротекторные свойства полиэтиленоксидов снижаются, по-видимому, за счет образования комплексов с ионами Na^+ . В литературе имеются данные, свидетельствующие о том, что методами ЯМР и ЭПР установлено образование комплексов между полиэтиленоксидом и ионами «биологических» металлов.

Во-вторых, наиболее активными ионами в электролите, которым является плазма, будут ионы Na^+ и Cl^- . Они участвуют в образовании адсорбционного и диффузного слоев вокруг эритроцитов. Уменьшение концентрации данных ионов в среде увеличит толщину, но уменьшит плотность двойного слоя, что будет способствовать лучшему контакту криопротектора с мембраной клетки.

Следовательно, можно сделать вывод, что мембраны эритроцитов, замороженных в присутствии криопротектора, разведенного дистиллированной водой, сохраняются лучше и по своим свойствам ближе к нативной клетке, чем с криопротектором, разведенным физиологическим раствором.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
12. XII 1975 г.

G. S. Lobyntseva

EFFECT OF FREEZING-DEFROSTING ON ELECTROKINETIC PROPERTIES OF ERYTHROCYTES

Summary

The effect of different diluents of cryoprotectors (ЦОЛИПК 76) physiologic solution, distilled water and low-temperature conservation was studied as applied to the electrophoretic mobility of erythrocytes. It is established that the membranes of erythrocytes frozen in the presence of a cryoprotector diluted in distilled water are preserved better and by the properties they are closer to the native cell than those frozen with cryoprotector diluted in physiologic solution.

УДК 57:536.48.047:576.851.252.576.851.51:536.48

**Н. С. Пушкарь, Г. С. Лобынцева, А. И. Вайсфлог,
В. А. Моисеев, Л. Ф. Розанов, А. Л. Марковский,
Г. М. Щербак, Л. Г. Кулешова**

НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЕ КОНСЕРВИРОВАНИЕ ЯДЕРНЫХ КЛЕТОК КРОВИ ПОД ЗАЩИТОЙ ПЭО-400, ДМСО И ПЭГ-2000

Работы, проведенные и опубликованные нами ранее, были посвящены изучению действия полиэтиленоксидов различных молекулярных весов на ядерные клетки крови в процессе их низкотемпературной консервации [1—5]. В результате этих исследований разработана программа низкотемпературной консервации лимфоцитов и лейкоконцентрата донорской крови человека под защитой ПЭО с молекулярным весом 400 (ПЭО-400) [3, 6].

Целью настоящего исследования было изучение сравнительного действия трех различных криофилактических веществ, широко применяемых для консервации клеток крови и костного мозга и отличающихся характером взаимодействия с клетками: диметилсульфоксида (ДМСО), ПЭО-400 и полиэтиленгликоля с молекулярным весом 2000 (ПЭГ-2000). Эти вещества предохраняют клетки от гиперконцентрированного действия солей при смене жидкой фазы на твердую кристаллическую. Такие криофилактики, как глицерин и ДМСО, широко применялись многими зарубежными учеными при консервации крови и костного мозга [8—10].

В работе использовали следующие методы исследования: количественное определение ядерных клеток крови по общепринятой методике в камере Горяева, определение процента живых клеток по суправитальному окрашиванию эозином [10], измерение значения рН среды, электропроводности, электрофоретической подвижности клеток, вязкости, потребления кислорода, диэлектрической проницаемости. Для изучения процессов кристаллообразования в клеточных суспензиях применяли методы низкотемпературной рентгенографии и низкотемпературной кристаллографии.

Материалом для исследования служила лейкомаасса, выделенная из донорской крови человека осаждением без коллоидных осадителей. В качестве криопротекторных добавок использовали ПЭО-400 10%-ной концентрации, ПЭГ-2000 5- и 10%-ный и 5%-ный ДМСО.

При исследовании характера взаимодействия перечисленных веществ с водой в клеточных суспензиях установлено, что 5%-ная концентрация ДМСО и ПЭГ-2000 оказывает незначительный гидратирующий эффект по сравнению с 10%-ной концентрацией ПЭО-400 (табл. 1).

Таблица 1
Диэлектрическая проницаемость лейкомаассы с различными криофилактиками до и после замораживания — оттаивания

Криопротектор	Диэлектрическая проницаемость, отн.ед.	
	до замораживания	после оттаивания
ДМСО 5%-ный	45	42
ПЭО-400 10%-ный	36,5	35
ПЭГ-2000 5%-ный	42	42
Нативная лейкомаасса	47	—
Вода	58	—

Уменьшение диэлектрической проницаемости при добавлении к нативной лейкомаассе криопротектора свидетельствует об уменьшении общего количества свободной воды в суспензии. Сравнивая значения диэлектрической проницаемости нативной лейкомаассы, водного раствора криопротектора и суспензии лейкомаассы с криопротектором, мы предположили, что добавление криопротектора вызывает час-

тичную дегидратацию лейкоцитов, уменьшение слоя гидратно связанной с лейкоцитами воды. После действия низкой температуры общее количество связанной воды в системе увеличивается. Этот эффект наиболее выражен при 10%-ной концентрации ПЭО-400 и в меньшей степени с 5%-ной ДМСО, для ПЭГ-2000 он не наблюдается. При замораживании суспензии клеток, содержащей указанные выше криоконсерванты, по данным низкотемпературной рентгенографии образуется достаточно крупнозернистый поликристаллический лед в гексагональной модификации.

Характерные размеры кристаллов при замораживании лейкомаассы с различными криофилактиками следующие:

Суспензия	Размер кристаллов, мкм
Нативная лейкомаасса	13,4
Лейкомаасса + 5%-ный ПЭГ-2000	13,2
Лейкомаасса + 5%-ный ДМСО	13,0
Лейкомаасса + 10%-ный ПЭО-400	11,7

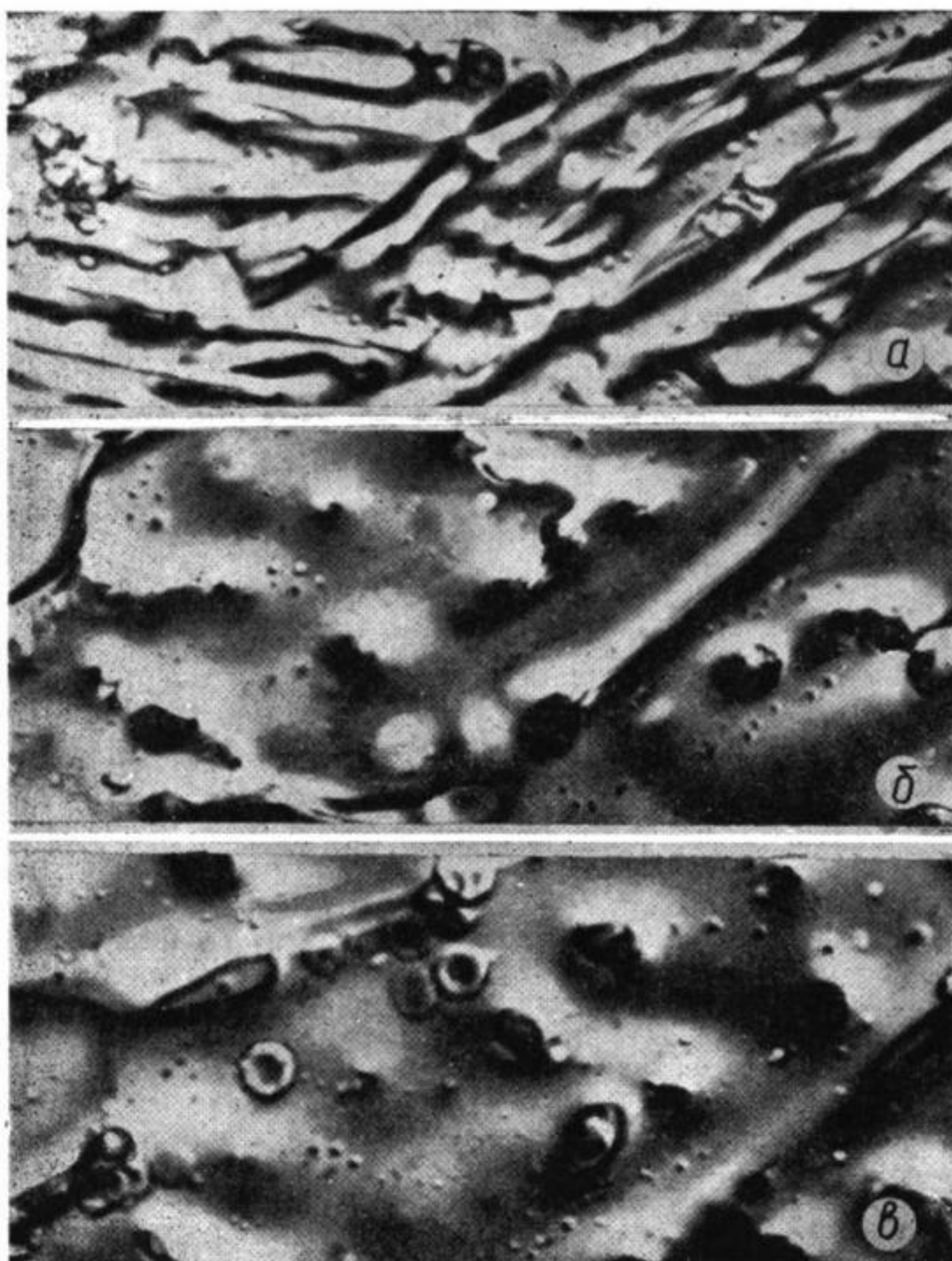


Рис. 1. Структура льда, образующаяся при замораживании лейкомассы без криопротектора до температуры -9°C (а), -10° (б) и -13°C (в)

Замораживание образцов в криоприставке позволило изучить характер кристаллообразования в присутствии криофилактиков различных концентраций и без них. На рис. 1, а представлена первичная структура льда, образующаяся в незащищенной клеточной суспензии при скорости охлаждения 1°C в 1 мин. Эта структура, однако, довольно неустойчива, буквально за 1 мин происходит значительное укрупнение (рис. 1, б), в результате которого большинство клеток попадает в вакуоли, а каналы зарастают (рис. 1, в), что, по-видимому, отрицательно влияет на сохранность клеток.

При добавлении к суспензии клеток ПЭО-400 10%-ной концентрации характер кристаллизации изменялся. Структура льда, появившаяся в начальный момент кристаллизации, в ходе рекристаллизации укрупнялась, но по сравнению с незащищенными суспензиями данное изменение выражено в меньшей степени. После рекристаллизации каналы сохранялись. При отогреве они расширялись, кристаллы приобретали округлые формы и таяли (рис. 2).

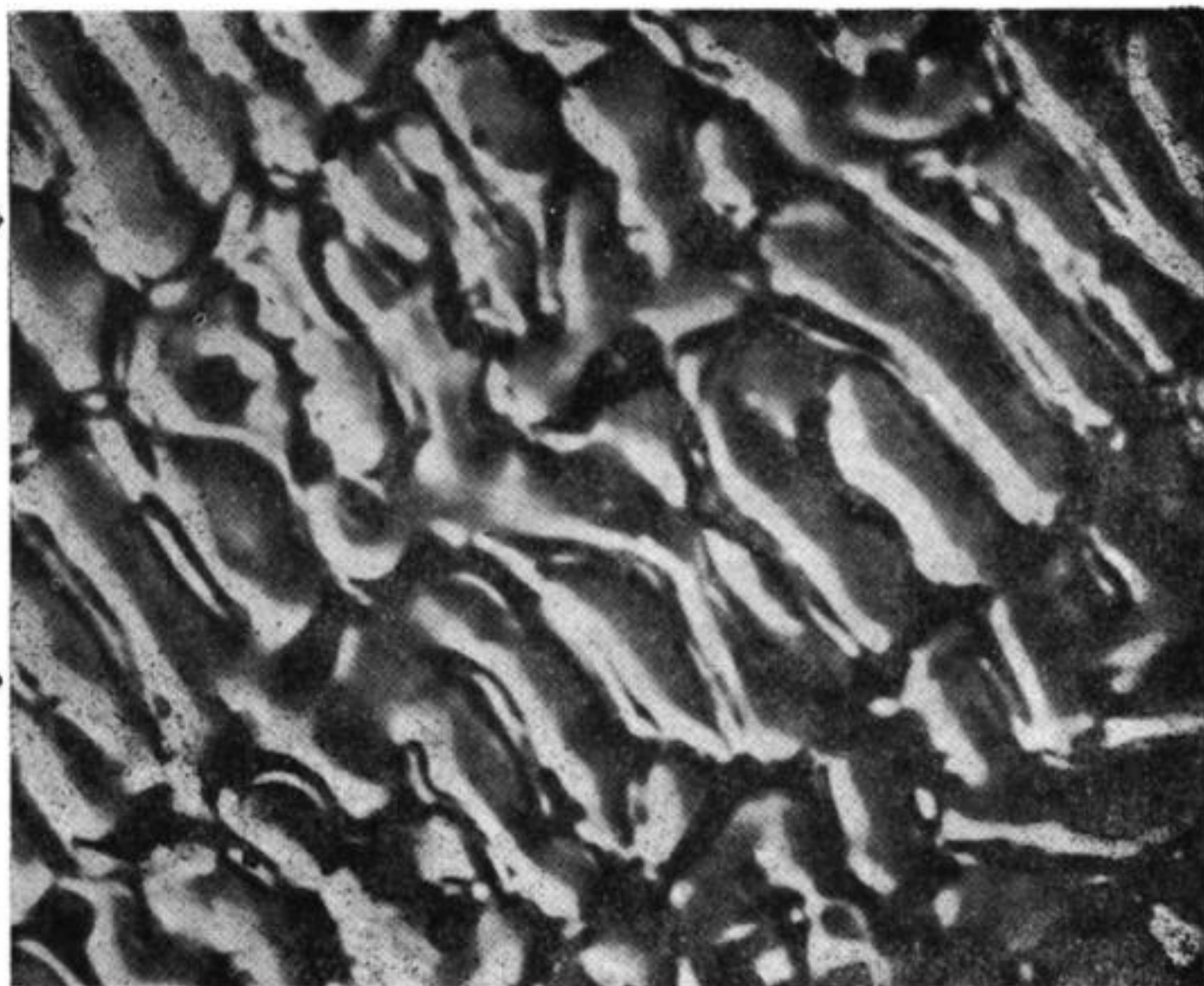


Рис. 2. Структура льда, образующаяся при замораживании лейкомассы с ПЭО-400 10%-ной концентрации до температуры -6°C .

При замораживании клеток лейкоконцентрата с 10%-ным ДМСО кристаллизация происходила без существенного переохлаждения, наблюдался довольно медленный рост крупных дендритов, имеющих размер ветвей $\sim 20-40$ мкм (рис. 3, а). Клетки располагались в каналах и при сужении последних сближались. С понижением температуры до -100°C кристаллы приобретали гранные формы (рис. 3, б). Однако при последующем отогреве их грани снова округлялись.

Охлаждение суспензии клеток с ПЭГ-2000 10%-ной концентрации так же, как с ПЭО-400, приводило к появлению мелкокристаллической структуры, рекристаллизация которой была выражена слабо.

При замораживании клеток по описанной ранее [7] программе установлено, что даже медленное, капельное добавление криофилактиков вызывает разрушение некоторого количества клеток. Погибшие вследствие осмотического шока клетки составляли 5—20%. Особенно сильные изменения в суспензии наблюдались при добавлении ПЭГ-2000; 10%-ная концентрация его вызывает коагуляцию белков плазмы и образование сгустков. Поэтому в дальнейших экспериментах мы пользовались ПЭГ-2000 5%-ной концентрации, при которой подобные изменения почти не наблюдаются.

Добавление криофилактиков в лейкомассу вызывает сдвиг значений рН среды в щелочную сторону; после размораживания количество гидроксильных ионов в суспензии незначительно увеличивается. Происходит также изменение электропроводности среды — небольшое снижение ее при добавлении 5%-ного ДМСО; ПЭГ-2000 и ПЭО-400 как молекулы более крупные снижают электропроводность среды почти на 30% (табл. 2).

При оценке биологической полноценности клеток разными методами оказалось, что потребление кислорода ядерными клетками крови при добавлении всех трех криофилактиков понижается, особенно с ПЭГ-2000 и ДМСО; эта тенденция сохраняется и после замораживания—отогрева (табл. 2).

Электрофоретическая подвижность лимфоцитов снижается в суспензии, содержащей 10%-ный ПЭО-400 и 5%-ный ПЭГ-2000, при использовании ДМСО наблюдалось ее увеличение (см. табл. 2).

Сравнительная оценка данных экспресс-методов, электрофоретической подвижности и дыхания показала, что все три вещества при замораживании лейкоцитов по описанной ранее программе оказывают защитное действие на клетки, однако в случае применения ПЭГ-2000 выход жизнеспособных клеток значительно меньше, чем при использовании ПЭО-400 и ДМСО.

Проанализировав полученные данные, можно сделать ряд выводов.

При замораживании суспензий в растворах ПЭО, ПЭГ и ДМСО клетки располагаются в каналах между кристаллами, размеры которых — порядка 10 мкм — незначительно превышают размеры клеток. В отсутствие криофилактиков клетки попадают в вакуоли и кристаллы льда в этом случае значительно превышают размеры клеток.

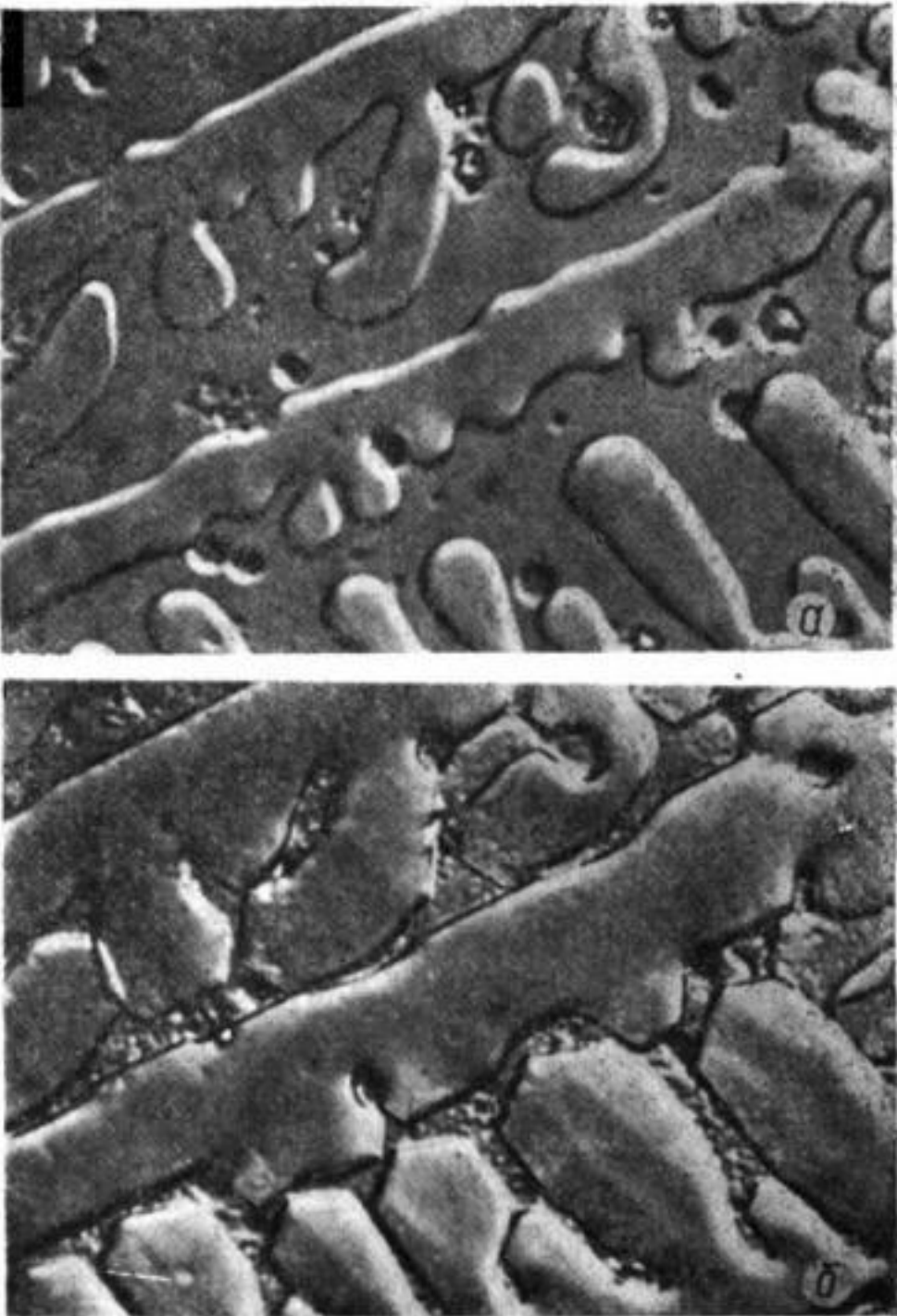


Рис. 3. Структура льда, образующаяся при замораживании лейкомассы с 10%-ным ДМСО до температуры -11°C (а) и -100°C (б).

Таблица 2

Влияние криопротекторов ПЭО-400, ДМСО, ПЭГ-2000 на ядросодержащие клетки крови (ЯКК) в процессе низкотемпературной консервации

Метод оценки	Нативный материал	10%-ный ПЭО-400	5%-ный ДМСО	5%-ный ПЭГ-2000
Значение pH	$7,12 \pm 0,09$	$7,34 \pm 0,14$	$7,24 \pm 1,18$	$7,27 \pm 2,37$
		$7,46 \pm 0,06$	$7,45 \pm 0,02$	$7,36 \pm 0,08$
Электрофоретическая подвижность лимфоцитов, $\text{мкм/с/В} \cdot \text{см}^{-1}$	$1,08 \pm 0,006$	$0,78 \pm 0,009$	$1,18 \pm 0,006$	$0,46 \pm 0,011$
		$0,91 \pm 0,013$	$1,40 \pm 0,38$	не измеряли
Жизнеспособность ЯКК по Шреку, %	$99 \pm 0,7$	$97,5 \pm 0,52$	100	$99,3 \pm 0,34$
		$97,8 \pm 0,44$	$98,3 \pm 0,67$	98
Количество ЯКК, %	100	100	100	100
		$79,25 \pm 8,12$	$77,0 \pm 5,51$	$78,0 \pm 5,57$
Дыхание ЯКК, мкл/ч	$526 \pm 7,2$	$431,5 \pm 7,2$	$303,9 \pm 8,33$	$217,6 \pm 38,06$
		$348,7 \pm 35,54$	$240,8 \pm 20,38$	$159,2 \pm 28,78$

Примечание. В числителе — до замораживания, в знаменателе — после него.

Добавление криофилактиков к суспензии лейкоцитов вызывает снижение дыхания, причем наибольшее угнетение наблюдали при добавлении 5%-ной ПЭГ-2000.

Криофилактики ПЭО-400 и ПЭГ-2000 вследствие взаимодействия с мембранами клеток вызывают понижение электрофоретической подвижности; ДМСО как легко проникающий в клетки криофилактик повышает поверхностный заряд клеток.

При замораживании лейкоконцентрата по двухэтапной программе наиболее целесообразно применять 10%-ную концентрацию ПЭО-400 и 5%-ную ДМСО. Указанные концентрации перечисленных криофилактиков обеспечивают высокий процент сохранности и жизнеспособности клеток, качественный состав лейкоконцентрата остается почти неизменным.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пушкарь Н. С., Веркин Б. И., Даценко Б. М. и др. Программное замораживание до -196°C под защитой полиэтиленоксида как метод консервирования костного мозга человека. — В кн.: XII Международный конгресс по переливанию крови. Тезисы докл. М., 1969, с. 52—56.
2. Пушкарь Н. С., Наконечный А. А., Калугин Ю. В. Некоторые аспекты механизма действия криопротекторов. — В кн.: Актуальные вопросы консервации и трансплантации костного мозга и крови. Харьков, 1972, с. 98—114.
3. Пушкарь Н. С., Полякова А. И., Цуцаева А. А., Иткин Ю. А. Низкотемпературная консервация лимфоцитов. — Проблемы гематол., 1974, № 7, с. 23—26.
4. Полякова А. И., Иткин Ю. А., Гордиенко Е. А., Лобынцева Г. С. Влияние режимов оттаивания на жизнеспособность ядерных клеток крови, консервированных при -196°C под защитой ПЭО-400. — Проблемы гематол., 1974, № 9, с. 26—29.
5. Лобынцева Г. С., Полякова А. И. Электрокинетические особенности лимфоцитов крови, консервированных при -196°C под защитой ПЭО-400. Трансплантация органов и тканей. — Материалы II Респ. конф. Минск, 1974, с. 303—305.
6. Полякова А. И., Цуцаева А. А., Иткин Ю. А. Оценка сохранности клеток лейкоконцентрата при низкотемпературной консервации (-196°C) под защитой ПЭО. — Цитология и генетика, 1974, 3, с. 211—215.
7. Лобынцева Г. С., Щербак Г. М., Полякова А. И. Низкотемпературная консервация ядродержащих клеток крови под защитой полиэтиленоксида различных молекулярных весов. — В кн.: Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины. К., «Наук. думка», 1974, с. 69—70.
8. Valeri C. R., Freingold H., Marchionni L. D. A simple method for freezing human platelets using 6% DMSO and storage at -80°C . — Blood, 1974, 43, N 1, p. 131—136.
9. Jeske A. H., Fonteles M. C., Karov A. M. Functional preservation with Dimethylsulfoxide. — Cryobiology, 1974, 11, N 2, p. 170—175.
10. Schrek R. A method for counting the viable cells in normal and malignant cell suspensions. — Amer. J. Cancer, 1936, 28, p. 389—392.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
12. XII 1975 г.

N. S. Pushkar', G. S. Lobyntseva, A. I. Vaisflog,
V. A. Moiseev, L. F. Rozanov, A. L. Markovskij,
G. M. Shcherbak, L. G. Kuleshova

LOW-TEMPERATURE CONSERVATION OF BLOOD NUCLEAR CELLS UNDER PROTECTION OF PEO-400, DMSO, PEG-2000

Summary

A comparative study was performed for cryoprotective properties of polyethyleneoxide, dimethylsulphoxide, polyethylene glycol at low-temperature conservation of nucleus-containing blood cells. The effect of the mentioned substances was examined as applied to the crystallization processes, dielectric constant, crystals dimension, electrophoretic mobility and safety of cells after low-temperature conservation.

В. И. Строна

ИЗМЕНЕНИЕ АТФазной АКТИВНОСТИ МИЕЛОКАРИОЦИТОВ КРЫС ПРИ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОМ КОНСЕРВИРОВАНИИ ПОД ЗАЩИТОЙ ОКСИЭТИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ МНОГОАТОМНЫХ СПИРТОВ

Целью настоящей работы явилось изучение изменения активности фермента АТФазы миелокариоцитов костного мозга крыс до и после процесса замораживания—оттаивания под защитой оксиэтильных производных некоторых многоатомных спиртов. Костный мозг получен из трубчатых костей беспородных белых крыс вымыванием консервирующим раствором ЦОЛИПК-3. В качестве криопротектора при замораживании костномозговой суспензии использовали полиэтиленоксид молекулярного веса 400 (ПЭО-400) — оксиэтильное производное двухатомного спирта и ОЭПЧС — оксиэтильное производное четырехатомного спирта. Время экспозиции миелокариоцитов с криопротекторами — 30 мин, конечная концентрация ПЭО-400 и ОЭПЧС — 15%. Замораживание осуществлялось по двухэтапной программе: 1°C в 1 мин до точки кристаллизации, 300 — 400° в 1 мин до —196°. Отогрев костномозговой взвеси проводили при температуре 42°C.

Определение активности АТФазы осуществлялось в мазках костного мозга до и после процесса криоконсервирования по методу Падиккула и Герман [2]. Всего проведено 5 серий опытов. Для сравнения полученных данных нами подсчитывался средний гистохимический коэффициент (СГК) по методу Астальди и Верга [1]. Средние результаты опытов приведены в таблице.

**Активность АТФазы миелокариоцитов крыс
(до и после замораживания — оттаивания
под защитой ОЭПЧС и ПЭО-400, количество опытов $n=5$), %**

Условие эксперимента	Степень активности фермента				СГК
	0	1-я	2-я	3-я	
Нативный костный мозг	47±2,73	26±2,94	20±2,73	7±1,26	0,87
Замораживание с ПЭО-400	27±2,97	43±1,47	14±1,89	16±1,89	1,19
Замораживание с ОЭПЧС	37±1,47	32±2,3	21±0,63	10±1,68	1,04

По степени активности фермента клетки распределяли на 4 группы: 1-я — отсутствие выраженной реакции в клетках, 2-я — слабо выраженная активность фермента, 3-я — умеренная активность АТФазы, 4-я — высокая степень активности фермента.

Проведенные исследования показали, что клетки нативного костного мозга имеют довольно высокую активность АТФазы, особенно ярко проявляется реакция в зрелых гранулоцитах. По степени активности фермента клетки нативного костного мозга располагались в основном в 1-ю и 2-ю группы (соответственно 47 и 26%). После деконсервирования клеток костного мозга процент клеток, содержащих неактивную форму АТФазы, снизился и увеличилось число клеток, входящих во 2-ю и 3-ю группы. СГК нативного костного мозга равен 0,87. Процесс замораживания—оттаивания ведет к повышению СГК, особенно в случае использования в качестве криопротектора ПЭО-400 (СГК=1,19). Сле-

дует отметить, что СГК миелокариоцитов, замороженных под защитой ОЭПЧС, несколько ниже (1,04), чем при замораживании с ПЭО-400, и приближается к СГК нативного костного мозга.

При сравнении результатов изменения активности АТФазы клеток костного мозга после процесса замораживания—оттаивания под защитой ОЭПЧС и ПЭО-400 отмечено более значительное повышение активности фермента в миелокариocyтах в случае использования в качестве криопротектора ПЭО-400. Причем происходят достоверное снижение количества клеток с нулевой степенью активности фермента и увеличение числа клеток, входящих во 2, 3 и 4-ю группы ($P < 0,05$). Этот факт свидетельствует о более значительном повреждении клеточных мембран при криоконсервировании миелокариоцитов под защитой ПЭО-400, что в свою очередь вызвало повышение активности фермента.

После процесса замораживания—оттаивания клетки распределялись в основном в группы с 1 и 2 степенями активности АТФазы, что согласуется с данными других авторов [3].

Таким образом, анализируя полученные результаты, можно сделать следующие выводы: 1) процесс замораживания—оттаивания вызывает достоверное повышение активности АТФазы миелокариоцитов крыс, что, согласно исследованиям Такехара и Роуе [4], вызвано изменением полупроницаемости мембраны в результате ее деструкции. Следствием этого является повышение доступа АТФ для действия фермента; 2) повышение активности АТФазы более значительно в случае замораживания клеток костного мозга под защитой ПЭО-400, чем при использовании других оксиметильных производных многоатомных спиртов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Astaldi G., Verga L.* The glycogen content of the cells of lymphatic leukemia. — *Acta Haematol.*, 1957, 17, N 3, p. 129—134.
2. *Кисели Д.* Практическая микротехника и гистохимия. Будапешт, Изд-во АН Венгрии, 1962, с. 278—279.
3. *Schubert J. C. F., Rinneberg H.* Der zytochemische Nachweis von Adenosintriphosphat spaltenden Fermenten bei pH 7,2 in menschlichen Knochenmarkausstrichen. — *Blut*, 1962, 8, N 5, p. 282—293.
4. *Takehara I., Rowe A. W.* Increase in ATPase activity in red cell membranes as a function of freezing regiment. — *Cryobiology*, 1971, 8, N 6, p. 559—569.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
12. XII 1975 г.

V. I. Strona

CHANGE IN ATPase ACTIVITY OF RAT MYELOCARYOCYTES AT LOW-TEMPERATURE CONSERVATION UNDER PROTECTION OF OXIETHYL DERIVATIVES OF POLYHYDRIC ALCOHOLS

Summary

Changes were studied in the activity of the marker enzyme of cytoplasmatic membranes (ATPase) resulted from low-temperature conservation under protection of oxie-thyl derivative four-atom alcohol OEDFA and two-atom alcohol, polyethylene oxide with a molecular weight of 400 (PEO-400). The performed investigations established that low-temperature conservation of myelocaryocytes involves an increase in ATPase activity, a more considerable increase in the enzyme activity being observed in case of using PEO-400 as a cryoprotector.

А. А. Цуцаева, Т. С. Сафонова, Ю. Е. Микулинский,
И. И. Воробьева, В. П. Мануильский

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМОВ ЗАМОРАЖИВАНИЯ— ОТТАИВАНИЯ НА НЕКОТОРЫЕ ВИДЫ БАКТЕРИЙ

Для решения задач, связанных с разработкой метода низкотемпературной консервации микроорганизмов, необходимо всестороннее изучение механизмов действия на них низких температур. Литературные данные [2—4] свидетельствуют о том, что выживаемость бактерий при низкотемпературной консервации в значительной степени определяется скоростью замораживания и отогрева.

Цель настоящей работы — изучение влияния различных режимов охлаждения—оттаивания на жизнеспособность, синтез белка и морфофункциональные свойства бактерий при замораживании до температуры -196°C .

Объектом исследования служили бактерии *E. coli*, *B. prodigiosum*, *Staphylococcus aureus* 209. Культуры бактерий выращивали на мясопептонном агаре (МПА) в течение 18 ч при температуре $+37^{\circ}\text{C}$, затем смывали 0,14М раствором NaCl и нефелометрически (ФЭК-56, светофильтр № 9, красный) устанавливали концентрацию клеток. Бактериальную суспензию в концентрации $1 \cdot 10^9$ клеток в 1 мл замораживали в полиэтиленовых ампулах объемом 1,5 мл.

После кратковременного пребывания в жидком азоте выживаемость бактерий и их способность к дальнейшему размножению определяли методом рассева исходных и деконсервированных клеток на МПА. Интенсивность синтеза белка в суспензии бактерий определяли по методу Д. Кеннела [1] и выражали в количестве импульсов в 1 мин на $1 \cdot 10^9$ клеток. Тинкториальные, морфологические, культуральные, ферментативные свойства бактерий, а также гемолитическую, лецитиназную, плазмокоагулазную активность и фагоустойчивость у стафилококка изучали общепринятыми методами. Контролем служили культуры, хранившиеся при температуре $+4^{\circ}\text{C}$. Статистическую обработку проводили по Фишеру—Стьюденту.

В первой серии опытов изучено влияние различных скоростей охлаждения на жизнеспособность, синтез белка и морфофункциональные свойства бактерий. Замораживание бактериальной суспензии осуществляли по следующим программам: I — одноэтапная, со скоростью охлаждения 1°C в 1 мин; II — одноэтапная, со скоростью охлаждения 400°C в 1 мин; III — двухэтапная, со скоростью охлаждения 1°C в 1 мин на первом этапе (от $+4$ до -13°C) и 400°C в 1 мин на втором этапе.

Как показали результаты исследования, использование медленной скорости охлаждения (1°C в 1 мин) как при одноэтапной, так и при двухэтапной программе значительно снижает выживаемость и интенсивность синтеза белка у бактерий (табл. 1).

Таблица 1

Влияние режимов охлаждения на выживаемость и уровень синтеза белка бактерий

Программа	<i>E. coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i> 209		<i>B. prodigiosum</i>	
	Число колоний	Уровень синтеза белка	Число колоний	Уровень синтеза белка	Число колоний	Уровень синтеза белка
I	$13,7 \pm 2,1$	$25,5 \pm 3,2$	$50,2 \pm 4,9$	$80,3 \pm 7,2$	$37,4 \pm 4,8$	$12,0 \pm 1,8$
II	$36,1 \pm 4,8$	$51,1 \pm 6,0$	$94,4 \pm 8,1$	$93,2 \pm 8,8$	$40,9 \pm 5,3$	$44,8 \pm 5,1$
III	$6,1 \pm 1,8$	$18,6 \pm 2,3$	$25,6 \pm 2,6$	$73,7 \pm 6,5$	$24,8 \pm 3,2$	$28,7 \pm 3,5$

Примечание. Число колоний и уровень синтеза белка здесь и в табл. 2 даны в процентах к контролю.

Наиболее чувствительна к фактору скорости охлаждения кишечная палочка. Замораживание по программам I и III резко снижало выживаемость и уровень синтеза белка у *E. coli*. Криповреждение других видов бактерий (*B. prodigiosum*, *Staphylococcus aureus* 209) также более выражено в случае применения этих программ. Наиболее высокие показатели выживаемости и уровня синтеза белка у *E. coli*, *B. prodigiosum*, *Staphylococcus aureus* 209 наблюдались, когда суспензии бактерий охлаждались со скоростью 400°C в 1 мин.

Тинкториальные, морфологические, культуральные и ферментативные свойства изученных бактерий, а также гемолитическая, лецитиназная, плазмокоагулазная активность и фагоустойчивость стафилококка не изменялись при охлаждении по указанным программам.

Во второй серии опытов было изучено влияние режимов деконсервации на выживаемость, синтез белка и морфофункциональные свойства бактерий. Оттаивание проводили с использованием следующих режимов отогрева: медленное оттаивание на воздухе при температуре +22 и +37° и быстрое оттаивание на водяной бане при +41°. Замораживание осуществляли по оптимальной программе со скоростью 400°C в 1 мин.

Повреждающее действие низких температур более выражено для всех видов бактерий в условиях медленного оттаивания при +22 и +37°C (табл. 2).

Таблица 2

Влияние режимов деконсервации на выживаемость и уровень синтеза белка бактерий

Температура оттаивания, °C	<i>E. coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i> 209		<i>B. prodigiosum</i>	
	Число колоний	Уровень синтеза белка	Число колоний	Уровень синтеза белка	Число колоний	Уровень синтеза белка
+22	24,6±2,8	19,9±2,5	69,2±5,8	32,8±2,9	36,2±4,1	12,8±1,9
+37	24,6±3,1	25,9±6,1	68,8±7,3	43,7±5,1	38,1±4,5	13,6±2,1
+41	56,1±4,7	51,1±5,2	94,4±8,6	93,2±8,6	40,9±3,9	44,8±5,4

Как и в первой серии опытов, наиболее чувствительны к скорости оттаивания *E. coli* и *B. prodigiosum*, а наименее чувствителен *Staphylococcus aureus* 209. Самые высокие выживаемость и уровень метаболической активности деконсервированных бактерий *E. coli*, *B. prodigiosum* и *Staphylococcus aureus* 209 наблюдались в случае быстрого отогрева при +41°. Морфофункциональные свойства бактерий, оттаиваемых при различных режимах, не отличались от контроля.

Таким образом, при сравнительной оценке разных режимов замораживания и деконсервации бактерий выявлено, что режим одноэтапного охлаждения со скоростью 400°C в 1 мин и быстрого оттаивания на водяной бане при +41°C способствует сохранности высокого процента жизнеспособных бактерий с достаточно активным течением обменных процессов. Бактерии, подвергнутые замораживанию в жидком азоте, проявляют различную степень чувствительности к действию низких температур. Наиболее устойчивыми как при неблагоприятных, так и при оптимальных режимах замораживания—оттаивания были бактерии *Staphylococcus aureus* 209 (грамположительные), менее устойчивыми — *E. coli* и *B. prodigiosum* (грамотрицательные).

ЛИТЕРАТУРА

1. Кеннед Д. Использование фильтров для разделения радиоактивных РНК, ДНК и белка. — В кн.: Методы исследования нуклеиновых кислот. М., «Мир», 1970, с. 138—145.
2. Albrecht R. M., Orndorff G. R., MacKenzie A. P. Survival of certain microorganisms subjected to rapid and very rapid freezing on membrane filters. — Cryobiology, 1973,

10, N 3, p. 233—239.

3. *Calcott Peter H., McLeod Roberty O.* Survival of *Escherichia coli* from freeze-thaw damage: a theoretical and practical study. — *Can. J. Microbiol.*, 1974, 20, N 5, p. 671—681.
4. *Smittle R. B., Gilliland S. E., Speck M. L., Walter W. H.* Relationship of cellular fatty acid composition to survival of *Lactobacillus bulgaricus* in liquid nitrogen. — *Appl. Microbiol.*, 1974, 27, N 4, p. 738—743.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
12. XII 1975 г.

*A. A. Tsutsaeva, T. S. Safonova, Ju. E. Mikulinskij,
I. I. Vorobjeva, V. P. Manuil'skij*

EFFECT OF DIFFERENT FREEZING-DEFROSTING REGIMES ON SOME BACTERIA SPECIES

Summary

The paper deals with the effect of different regimes of freezing-defrosting on the viability, protein synthesis and morphofunctional properties of the bacteria *E. coli*, *B. prodigiosum*, *Staphylococcus aureus* 209 at freezing down to -196° . It is shown that the optimal regime of freezing is cooling (400° per 1 min) and defrosting.

УДК 57:536.48.047.615.387:612.112.94:536:48

*А. А. Цуцаева, Н. Н. Попов, Т. В. Воскобойникова,
Л. В. Останкова*

ВЛИЯНИЕ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО КОНСЕРВИРОВАНИЯ НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ТКАНЕВЫХ ЛИМФОЦИТОВ

Лимфоидная ткань может широко и успешно применяться при лечении заболеваний различного генеза. Однако до настоящего времени она ограничено используется в практике, поскольку нет оптимальных способов ее консервирования.

Наиболее эффективным способом консервирования различных органов и тканей является метод глубокого замораживания [1, 2]. Деконсервированные лимфоциты, по-видимому, могут быть с успехом использованы при лечении иммунодефицитных состояний, при проведении антигенного типирования пар донор—реципиент, при изучении кариотипов клеток, для создания толерантности к гомотрансплантатам. Клетки селезенки могут быть также использованы как источник гемопоэтических клеток при лечении лучевой болезни. Поэтому целью настоящей работы явилось изучение влияния низких температур (-196°C) и криопротектора на морфофункциональные свойства лимфоидных клеток селезенки. Нами исследованы клеточный состав лимфоидного ростка селезенки до и после консервации и способность деконсервированных клеток секретировать специфические иммуноглобулины.

Опыты проведены на инбредной линии мышей С57В1/с трехмесячного возраста весом 18—21 г. Иммунизацию мышей проводили внутрибрюшинно введением 0,5 мл 5%-ной взвеси эритроцитов барана.

На пятый день после иммунизации мышей забивали, извлекали селезенки и готовили суспензии клеток на буферном растворе (трис-НСI 0,035 М; NaCl 0,15 М; рН 7,1—7,2). Клетки отмывали двукратным центрифугированием на холоду (температура $+4^{\circ}$) при 1000 об/мин в течение 10 мин.

Клетки замораживали по двухэтапной программе до температуры -196°C под защитой отечественного криопротектора ПЭО-400 (полиэтиленоксида с молекулярным весом 400) в 10%-ной концентрации. Оттаивание проводили на водяной бане при температуре 41° . Жизнеспособность клеток определяли после их отмывки от криопротектора методом суправитального окрашивания 0,2%-ным раствором трипановой сини.

О функциональной активности деконсервированных клеток и их способности секретировать специфические иммуноглобулины судили по гемолизу эритроцитов в геле (по Ерне) [3]. Полученные данные пересчитывали на 10^6 жизнеспособных клеток.

Для исследования клеточного состава лимфоидного ростка селезенки до и после консервирования из суспензии клеток, полученных из иммунных селезенки, приготавливали мазки, которые фиксировали 5 мин в абсолютном метиловом спирте, а затем окрашивали азур II-эозином по Гимза. Изучение мазков проводили в световом микроскопе при увеличении, равном 900. Статистическую обработку всех полученных данных производили по критерию Стьюдента.

Изучение мазков, приготовленных из деконсервированных и нативных суспензий клеток селезенки, показало относительное увеличение после консервирования процента малых лимфоцитов с $29,7 \pm 2,28$ до $54,07 \pm 4,16$ и снижение процента средних лимфоцитов с $48,93 \pm 3,76$ до $36,17 \pm 2,78$, больших лимфоцитов — с $12,2 \pm 0,94$ до $5,33 \pm 0,41$, лимфобластов — с $3,67 \pm 0,28$ до $1,27 \pm 0,098$.

В мазках клетки можно было свободно дифференцировать, они обнаруживались четкими, сохранившими форму. Однако в мазках, приготовленных из деконсервированных суспензий клеток, видны голые ядра клеток, а также клетки, имеющие частично разрушенную цитоплазму.

Влияние низкотемпературного консервирования на гемолизинпродуцирующую способность клеток селезенки

Номер опыта	Количество плакообразующих единиц в иммунной селезенке (на 10^6 ядерных клеток)		Сохранность после низкотемпературного консервирования, %
	в нативных образцах	в деконсервированных образцах	
1	$391,8 \pm 11,54$	$244,1 \pm 12,47$	62,30
2	$384,3 \pm 33,50$	$238,5 \pm 6,72$	62,06
3	$380,7 \pm 10,65$	$221,1 \pm 9,41$	58,07
4	$405,2 \pm 22,70$	$222,8 \pm 9,50$	54,90
5	$377,3 \pm 11,87$	$251,2 \pm 14,31$	66,57

Приведенные данные свидетельствуют о том, что в процессе глубокого замораживания происходит некоторое изменение в процентном соотношении лимфоидных клеток. Более резистентными к криповреждению при замораживании оказались малые лимфоциты по сравнению с другими типами лимфоидных клеток.

Число плакообразующих клеток, выявленных в селезенке до иммунизации, составило в среднем 0,58 на 10^6 , после иммунизации — 387,3 на 10^6 ядерных клеток. Количество плаков, образуемых деконсервированными клетками, оказалось равным 235,5 на 10^6 ядерных клеток (таблица). Установлено также, что гемолитические плаки не могут быть образованы за счет пассивной диффузии специфических иммуноглобулинов из поврежденных замораживанием — оттаиванием клеток.

Таким образом, полученные нами предварительные данные позволяют считать, что лимфоидные клетки селезенки после низкотемпературной консервации остаются функционально активными, способными к специфическим реакциям.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пушкарь Н. С., Даценко Б. М., Блох М. Я. и др. Глубокое охлаждение как метод консервирования костного мозга. — В кн.: Трансплантация органов и тканей. М., 1966, с. 517—519.
2. Федотенко А. Г., Шишкина И. Д., Данилова Л. А. и др. Опыт консервирования костного мозга в растворах и при низких температурах. — Материалы итоговой науч. конф. К., «Здоров'я», 1965, с. 115—116.
3. Jerne K. N., Nordin A. K. Plaque forming in agar by single antibody producing cells. — Science, 1963, 140, p. 405—408.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
12. XII 1975 г.

A. A. Tsutsaeva, N. N. Popov, T. V. Voskoboynikova,
• L. V. Ostankova

EFFECT OF LOW-TEMPERATURE CONSERVATION ON MORPHOFUNCTIONAL PROPERTIES OF LYMPHOID CELLS

Summary

The effect of low-temperature conservation was studied as applied to morphofunctional properties of lymphoid cells obtained from the spleen of the immune mice (line C57B1/C) and frozen according to two-stage program down to -196° under protection of 10% PEO-400. When studying smears prepared of the cell suspension before and after conservation it is established that in the process of deep freezing there occur changes in the percentage of lymphoid cells: small lymphocytes proved to be more resistant to cryoinjury. Deconserved cells retained their functional activity.

УДК 57:536.48.047:611—018.46

А. Н. Гольцев, А. А. Цуцаева, Л. В. Останкова,
Ю. Е. Микулинский, О. А. Дроздова,
Е. Е. Чеботарев, З. З. Рябова

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭКЗОГЕННОЙ ДНК С ЦЕЛЬЮ УСКОРЕНИЯ РЕПАРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ В ДЕКОНСЕРВИРОВАННЫХ МИЕЛОКАРИОЦИТАХ, ИМПЛАНТИРОВАННЫХ ОБЛУЧЕННЫМ РЕЦИПИЕНТАМ

При лечении депрессий гемопоэза широкое распространение в клинике получил метод трансплантации миелоидной ткани, как свежезаготовленной, так и консервированной при низких температурах [2]. Однако после низкотемпературной консервации отмечается снижение процессов пролиферации и дифференцировки деконсервированных клеток [5]. Поэтому возникает необходимость поиска эффективных стимуляторов, способствующих более раннему и полному восстановлению биологической активности деконсервированных клеток.

Цель настоящего исследования — изучение влияния препаратов экзогенной ДНК на колониеобразующую активность деконсервированных миелокариоцитов в организме облученного реципиента.

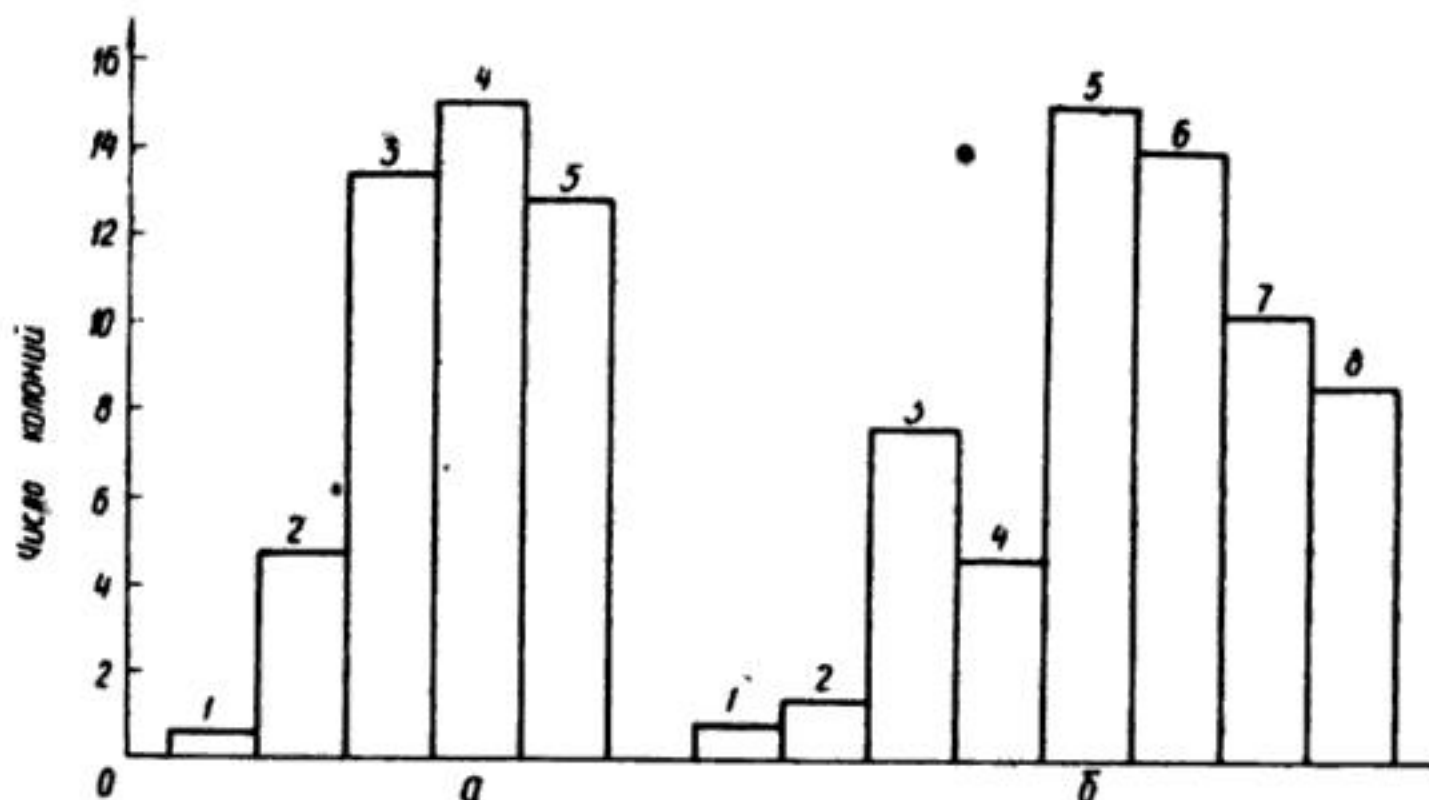
Опыты проведены на линейных мышах. Получение и консервацию костного мозга проводили по ранее описанной методике [3]. В качестве биостимулятора использован препарат ДНК, выделенной из спермы лососевых рыб. Облученным летальной дозой мышам-гибридам (СВАХ × С57В1) вводили 0,3 мл деконсервированной клеточной суспензии костного мозга, содержащей $3,0 \cdot 10^6$ жизнеспособных ядерных клеток.

Препарат ДНК вводили в дозе 500; 800 и 1500 γ одновременно с имплантацией костного мозга. Оптимальную дозу ДНК, оказывающую наибольший стимулирующий эффект, вводили одновременно, на 2, 3, 5-е сутки после трансплантации миелокариоцитов. Определение количе-

ства колониеобразующих единиц (КОЕ) в селезенке реципиентов проводили по методу Тилла и Мак-Куллоха [12].

Известно, что при трансплантации деконсервированного костного мозга на 8-е сутки в селезенках облученных реципиентов образуются единичные мелкие колонии, большинство которых состоит из недифференцированных клеточных элементов [5].

Результаты наших экспериментов показали, что экзогенная ДНК оказывала стимулирующее действие на репопуляционные свойства деконсервированных миелокариоцитов, имплантированных облученным



Влияние дозы ДНК (а) и срока введения (б) на колониеобразующую способность деконсервированных миелокариоцитов:

а — 1 — облучение; 2 — деконсервированный костный мозг; 3—5 — деконсервированный костный мозг + соответственно 500; 800; 1500y ДНК.
б — 1 — облучение; 2 — облучение + 800y ДНК (5-е сутки); 3 — облучение + 800y ДНК (одновременно); 4 — деконсервированный костный мозг; 5—8 — деконсервированный костный мозг + 800y ДНК, введенной одновременно на 2, 3, 5-е сутки.

реципиентам, что выражалось в увеличении веса селезенки и числа колоний в них по сравнению с аналогичными показателями при трансплантации деконсервированного костного мозга *per se*. Наиболее выраженным стимулирующим действием обладал препарат ДНК при введении в дозе 800 y (15,7; 13,3; 13,0 колоний) (рисунок). Гистологическое исследование показало, что в селезенках животных данной группы увеличивалось количество микроколоний (39,2—800 y ДНК + деконсервированный костный мозг; 7,2 — деконсервированный костный мозг *per se*). Большинство колоний представлено зрелыми клеточными элементами (93,8%); соотношение эритроидно-гранулоцитарных колоний составляло 2,1:1, т. е. приближалось к соотношению колоний данного типа при трансплантации нативных миелокариоцитов [5].

При определении зависимости между сроком введения препарата и интенсивностью стимулирующего действия установлено, что наибольшее увеличение веса селезенки и количества колоний в них отмечалось при введении препаратов ДНК одновременно с костным мозгом.

По мере увеличения срока между имплантацией костного мозга и введением ДНК эти показатели снижались. Однако даже при введении препарата на 5-е сутки после имплантации деконсервированного костного мозга количество колоний в селезенках реципиентов данной группы достоверно превышало число колоний у реципиентов, которым вводили деконсервированный костный мозг *per se* (см. рисунок).

При гистологическом исследовании колоний отмечено, что процент дифференцированных колоний был наибольшим (93,2) при одновременном введении ДНК и костного мозга, причем соотношение колоний эри-

троидно-гранулоцитарного типа было таким же, как при трансплантации нативных миелокариоцитов (2,1 : 1).

Если препарат ДНК вводили на следующий день после трансфузии миелокариоцитов, число макро- и микроколоний достоверно не отличалось от аналогичных показателей у реципиентов, которым одновременно вводили ДНК и костный мозг.

При введении препарата спустя двое и четверо суток достоверно снижалось количество микроколоний в селезенках обеих групп животных (35,2 — одновременное введение; 12,2 — на 3-ьи и 10,6 — на 5-е сутки).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что препараты экзогенной ДНК оказывают стимулирующее действие на пролиферативную активность и скорость созревания деконсервированных миелокариоцитов, имплантированных облученному реципиенту. Степень стимулирующего действия ДНК зависит от срока и дозы введенного препарата. Максимальный стимулирующий эффект наблюдается при одновременном введении препарата в дозе 800 γ.

При обсуждении возможных механизмов стимулирующего действия нуклеиновых кислот необходимо учитывать и возможные механизмы криповреждений. Мозиман и соавт. [9] показали, что после низкотемпературной консервации в суспензии деконсервированных миелокариоцитов снижается уровень синтеза ДНК, зависящий не только от уменьшения количества жизнеспособных клеток, а наблюдаемый в оставшихся живых клетках [10]. Учитывая тот факт, что в облученном организме синтез предшественников нуклеинового обмена значительно снижен [4], а способность клеток костного мозга синтезировать пуриновые нуклеотиды *in vitro* весьма ограничена [8], можно предположить, что введение препаратов нуклеиновых кислот будет способствовать нормализации нуклеинового обмена в трансплантированных миелокариоцитах. В пользу этого предположения свидетельствуют результаты работы [6] о более быстром созревании экзогенных колоний в селезенках облученных реципиентов при трансплантации костного мозга вместе с препаратами нуклеиновых кислот.

Рассматривая другие возможные механизмы стимулирующего действия нуклеиновых кислот, нельзя не учитывать то обстоятельство, что при лучевом поражении организма, в ранние сроки после облучения, глубоко нарушаются процессы, связанные с нуклеиновым обменом, в частности значительно возрастает активность ДНКаз [1].

По мнению Бакга и соавт. [7], освободившийся фермент проникает в ядро и деполимеризует клеточную ДНК. При трансплантации деконсервированных миелокариоцитов облученным реципиентам нуклеиновый обмен в имплантированных клетках, кроме воздействия внеклеточных ДНКаз, подвергается дополнительному воздействию со стороны ДНКаз, освободившихся из лизосом, поврежденных в процессе низкотемпературной консервации [11].

Не исключено, что при введении препарата облученным реципиентам с трансплантатом деконсервированного костного мозга экзогенная ДНК может нагружать фермент субстратом и таким образом предупреждать разрушение ДНК жизнеспособных миелокариоцитов.

Таким образом, констатируя факт стимулирующего действия препарата, по-видимому, нельзя представить себе какой-нибудь универсальный механизм этого действия. Возможно, каждый в той или иной степени принимает участие в стимуляции процессов клеточной пролиферации и дифференцировки деконсервированных миелокариоцитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Либикзон Р. Е. Биохимические изменения при действии больших доз ионизирующей радиации. — Биофизика, 1959, 4, № 1, с. 89—94.

2. Пушкарь Н. С., Симонова Л. И. Трансплантация консервированной (-196°) мие-
лоидной ткани при лечении депрессий гемопоэза лучевого генеза. — В кн.: Транс-
плантация органов и тканей. Горький, 1970, с. 226—227.
3. Пушкарь Н. С., Даценко Б. М., Блох М. Я. и др. Глубокое охлаждение как метод
консервирования костного мозга. — В кн.: Трансплантация органов и тканей. Ма-
териалы IV Всесоюз. конф. М., 1966, с. 517—519.
4. Русинова Г. Г. Особенности усвоения экзогенной ДНК и ее низкомолекулярных
предшественников в организме животных. — Биохимия, 1971, 36, № 5, с. 889—897.
5. Федотенков А. Г., Данилова Л. А., Алексеева Л. П. Влияние различных режимов
замораживания на пролиферативную активность и дифференцировку родоначаль-
ных клеток костного мозга. — Проблемы гематол., 1971, 16, № 8, с. 21—25.
6. Цыганков А. П. Влияние рибонуклеиновой кислоты на образование экзогенных
колоний в селезенке облученных мышей. — Тезисы докл. VI Всесоюз. науч. конф.
Л., 1973, с. 83—87.
7. Bacq L. M., Errera M. Rep. Radiat. Committee U. N. Document A/AC-821210, 1956.
8. Lajtha L. G., Vane L. R. Dependence of bone marrow cells on the liver for purine
supply. — Nature, 1958, 182, p. 191—192.
9. Mosimann W., Furlan M., Beck E. A., Bucher V. Zellkonservierung durch Tiefkuh-
lung. — Schweiz. Med. Wschr., 1972, 102, N 44, S. 1600—1602.
10. Pegg D. E. — Cryobiology, 1966, L.—N. Y., p. 114—118.
11. Persidsky M. D. Lysosomes and cell cryoinjury. — Cryobiology, 1971, 8, N 4,
p. 345—349.
12. Till I. E., McCulloch E. A. A direct measurement of the irradiation of normal mouse
bone marrow cells. — Radiat. Res., 1961, 14, p. 213—222.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
12. XII 1975 г.

A. N. Gol'tsev, A. A. Tsutsaeva, L. V. Ostankova,
Ju. E. Mikulinskij, O. A. Drozdova, E. E. Chebotarev,
Z. Z. Rjabova

UTILIZATION OF EXOGENOUS DNA AIMED AT ACCELERATING REPARATIVE PROCESSES IN DECONSERVED MYELOCARYOCYTES IMPLANTED TO IRRADIATED RECIPIENTS

Summary

The effect of exogenous DNA preparations on the proliferative activity was studied for deconserved myelocaryocytes implanted to irradiated recipients. It is shown that exogenous DNA exerted an expressed stimulating effect on repopulation properties and differentiation rate of deconserved myelocaryocytes. The stimulation intensity was determined by the time and dose of the administered preparation. The most pronounced stimulating effect of DNA on proliferative activity and maturation rate of deconserved myelocaryocytes was observed at simultaneous introduction of bone marrow and DNA preparation in a dose of 800 γ .

УДК 57:536.48.047:615.387:612.014.424.5

А. М. Воротилин, Ю. П. Тимошенко, С. Д. Корчиков,
А. И. Полякова

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВЫСОКИХ ДАВЛЕНИЙ В ПРОЦЕССЕ РАЗМОРАЖИВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

Наряду с обычными методами размораживания (водяная баня при температуре $+42^{\circ}\text{C}$) для повышения скорости нагрева и равномерного по объему плавления кристаллической фазы используется высокое гидростатическое давление. Вода — обязательный и главный компонент протекающих в биологических объектах физико-химических процессов. Для льда плавление сопровождается сжатием. В соответствии с принципом Ле Шателье, увеличение давления должно способствовать образованию фаз, занимающих меньший объем, т. е. с возрастанием дав-

ления температура плавления льда понижается. Под давлением 2080 атм точка плавления льда опускается до температуры -22°C . Это аномальное свойство воды и лежит в основе метода размораживания биологических объектов.

В патенте [1] предлагается осуществить процесс размораживания биологических объектов (см. фазовую диаграмму воды, кривая 1 на рис. 1) как повышением гидростатического давления на образец при температуре выше -22°C , так и переводом льда II в жидкую фазу сбросом ранее приложенного давления.

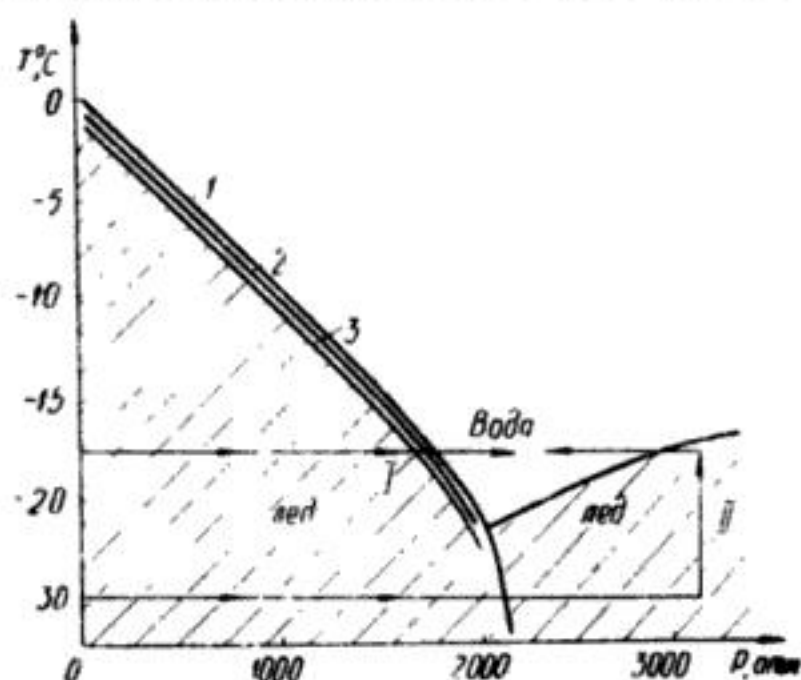


Рис. 1. Диаграмма P — T состояния вещества:

1 — фазовая диаграмма воды; 2, 3 — кривые плавления соответственно 5- и 10%-ного ПЭО-400; 4 — способы перевода льда в жидкую фазу.

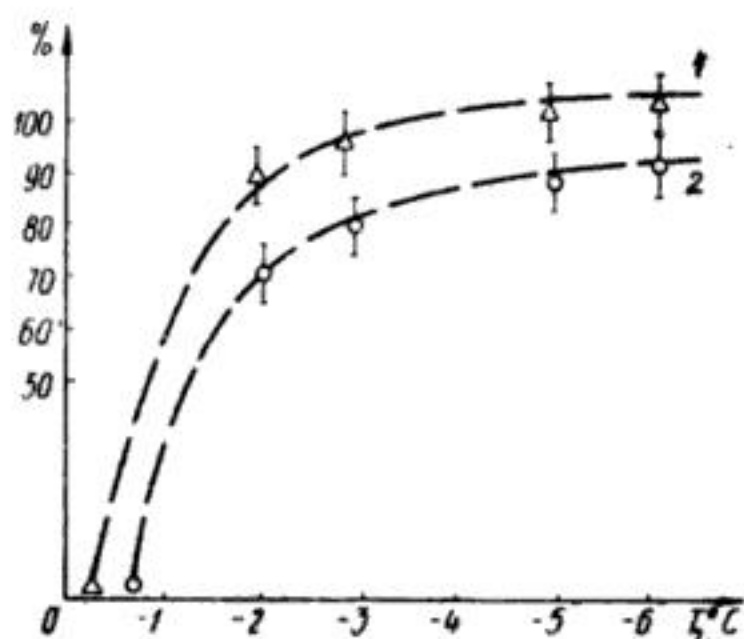


Рис. 2. Зависимость процентного содержания льда от температуры в водных растворах ПЭО-400:

1 — 5%-ный ПЭО-400; 2 — 10%-ный ПЭО-400.

В работе Тейлора [3] автором получено ускорение процесса плавления в несколько раз при приложении давления порядка 2400 атм к образцам, находящимся при температуре -4°C . Результаты по размораживанию клеток кожи цыпленка и слизистой глаза человека не хуже, чем в контроле (водяная баня при температуре $+42^{\circ}\text{C}$), а в некоторых случаях лучше. Благодаря дополнительной энергии высокого давления возможно ускорение процесса плавления в больших объемах, протекающего за счет теплопритока извне.

Карову [2] удалось сократить процесс размораживания почки собаки в несколько раз воздействием на образец давлением при температуре -10°C . По мнению автора, процесс плавления происходит сразу, как только достигнуто требуемое давление.

При размораживании биологических объектов значительное количество тепла необходимо подвести в области температур около 0°C вследствие плавления основной массы льда при этих температурах. Так, из рис. 2 следует, что основная масса льда в суспензии клеток крови с криопротектором ПЭО-400 плавится в области температур от -5 до 0°C . Однако ускорение процесса плавления за счет прилагаемого давления в указанном температурном интервале не позволяет избежать воздействия концентрированных растворов солей и криопротектора на клетки, появляющегося при повышении температуры выше эвтектической.

На рис. 1 (кривые 2, 3) представлены диаграммы плавления 5- и 10%-ных концентраций водных растворов ПЭО-400, из которых следует, что при наложении давления порядка 2100 атм и наличии теплопритока извне перевод объекта из кристаллического состояния в жидкое можно осуществить при температурах ниже -22°C . Поскольку с понижением температуры скорость химических реакций замедляется, то можно ожидать, что размораживание биообъектов, консервированных в присутствии криопротекторов, снизит повреждающий эффект воздей-

ствия концентрированных растворов солей и криопротектора. Следует также ожидать изменений состава раствора в области эвтектики в направлении уменьшения эвтектических концентраций входящих в раствор компонентов.

Экспериментальная проверка выдвигаемого предположения проведена на ядродержащих клетках крови с ПЭО-400 5- и 10%-ной концентраций, замороженных со скоростью 4° в 1 мин до точки кристаллизации и дальнейшим охлаждением до температуры -196°C со скоростью $400^\circ\text{C}/1$ мин. Замораживание осуществлялось в тефлоновых ампулах объемом до 2 см^3 . Предварительно мы установили, что при температуре 4°C клетки не повреждаются от воздействия давлений до 2300 атм при 5 мин экспозиции. Режим подачи и сброса давления существенных изменений в жизнеспособность клеток не вносит.

В ранее проведенных экспериментах показано, что скорость нагрева в кристаллической фазе до температур порядка -40°C незначительно изменяет процент жизнеспособных клеток крови. Это позволяет существенно упростить методику эксперимента. Образцы, охлажденные до температуры -196°C , помещали в ячейку высокого давления при температуре -40°C . После приложения давления 2100 атм за счет создания теплопритока извне производился дальнейший нагрев образца до температуры 4°C . По достижении образцом требуемой температуры давление понижалось до атмосферного, прекращался теплоприток и образец извлекался из ячейки. В качестве контроля служили образцы, размораживаемые подобным способом без подачи высокого давления.

При размораживании с использованием высокого гидростатического давления статистически достоверной разницы между образцами с ПЭО-400 5- и 10%-ными не обнаружено, в то время как при размораживании обычным способом (помещением образцов в водяную баню при температуре $+42^\circ\text{C}$) и в контроле жизнеспособность клеток уменьшалась с понижением концентрацией ПЭО-400. Жизнеспособность в размороженных образцах как для 5-, так и для 10%-ных концентраций на 10% ниже исходной.

Таким образом, проведенные исследования показали, что размораживание с использованием давления дает возможность сократить концентрацию криопротектора в суспензиях клеток крови, что особенно важно для использования консервированного материала в клинике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Segall P. E. Preservation and storage of biologic materials. Пат. США, № 3677024, опубл. 15. 3. 1972.
2. Karow A. M., Liv W. P., Humphries A. L. Survival of dog kidneys subjected to high pressures. Necrosis of kidneys after freezing. — Cryobiology, 1970, 7, p. 122—128.
3. Taylor A. C. The physical state transition in the freezing of living cells. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1960, 85, p. 595—609.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
12. XII 1975 г.

A. M. Vorotilin, Ju. P. Timoshenko, S. D. Korchikov,
A. I. Poljakova

APPLICATION OF HIGH PRESSURES IN THE PROCESS OF BIOLOGICAL OBJECTS DEFROSTING

Summary

A method is considered for defrosting biological objects using high hydrostatic pressure. It is shown that the suggested method permits the effect of concentrated solution of salts and cryoprotector on the cells to be decreased as well as the concentration of cryoprotector in the frozen suspensions to be reduced.

Л. К. Лозина-Лозинский, З. И. Успенская, А. И. Радченко

ВЛИЯНИЕ ГЛУБОКОГО ОХЛАЖДЕНИЯ (-196°C) И УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ОБЛУЧЕНИЯ ПРИ ИХ СОВМЕСТИМ И ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОМ ДЕЙСТВИИ НА ЦИСТЫ ПРОСТЕЙШИХ

Наблюдаемая взаимозависимость температуры и ультрафиолетовой (УФ) радиации при их действии на биологические системы может иметь большое значение в экологических, экзобиологических и медицинских исследованиях. Известно, например, что реакция одноклеточных организмов — инфузорий на УФ-лучи зависит от температуры культивирования, температуры облучения [1], амплитуды колебаний положительных температур [2], от агрегатного состояния клеток, например при замораживании [5, 7]. Механизмы реакций микроорганизмов (бактерий, дрожжей, фагов) и биополимеров на УФ-лучи в условиях отрицательных температур исследованы рядом авторов [3, 7, 8]. Однако вопрос о последовательном действии УФ-облучения и глубокого охлаждения почти не был затронут.

Наши эксперименты проводились с покоящимися цистами инфузорий *Colpoda taupasi*, культивируемыми в среде Лозина-Лозинского, которые переносят во влажном состоянии быстрое охлаждение до температуры жидкого азота. Цисты покоя приобретают высокую устойчивость через 2—3 недели по достижении зрелости, образуя толстую оболочку с волнистой поверхностью. Во всех опытах цисты охлаждались с одинаковой скоростью — 60°C в 1 с. Облучение проводилось дозами 210; 840; 2100; 3360; 4200 и 8400 эрг/мм². При облучении средними дозами результаты опытов не всегда стабильны, так как в этой области резко меняется реакция на облучение в условиях низких температур.

Была поставлена задача выяснить действие температуры -196°C на цисты инфузорий с одновременным облучением (А), с последующим после отогревания облучением (Б) и предварительным облучением (В). Во всех вариантах цисты находились при температуре -196°C 30 мин. Отогревание проводилось при температуре 60° в течение нескольких секунд. Каждый эксперимент включал контроль из трех групп: а) «общий» контроль — цисты исходной культуры при температуре 22°C ; б) цисты, облученные определенной дозой УФ при температуре 22°C ; в) цисты, только замороженные при температуре -196°C . После опыта цисты по одной рассаживали в лунки микроаквариумов по 50 экземпляров. Выживаемость определяли по числу эксцистировавшихся клеток через 2—3 суток по отношению к числу исходных клеток. Каждую серию опытов проводили в нескольких повторностях. Данные обрабатывали статистически: вычисляли среднее значение и доверительные границы интервалов.

Использованный клон Л-2 отличается высокой устойчивостью к УФ-лучам и температуре -196°C . При действии доз 840—4200 эрг/мм² выживаемость колеблется от 80 до 90% по сравнению с «общим» контролем. Только при дозе 210 эрг/мм² выживаемость такая же, как в контроле. Устойчивость влажных цист покоя к быстрому охлаждению до температуры -196°C варьировала у клона Л-2 от 75 до 90%. У клонов, менее устойчивых к глубокому охлаждению, или у менее зрелых цист сильно изменялась реакция на УФ-облучение.

При неповреждающих дозах облучения (210—840 эрг/мм²) устойчивость к глубокому охлаждению почти не менялась от последовательности замораживания и облучения (табл. 1). Только в серии В под действием дозы 840 эрг/мм² наблюдалось достоверное снижение выжи-

ваемости. Это свидетельствует о том, что последовательность действия факторов имеет значение уже тогда, когда воздействие каждого из них в отдельности еще не снижает жизнеспособности данных организмов, судя по эксцистированию инфузорий, подвергнутых различным воздействиям.

Таблица 1

Устойчивость цист покоя инфузорий к температуре -196°C и УФ-радиации

Доза, эрг/мм ²	Выживаемость, % к общему контролю ($\bar{X} \pm x$)				
	Температура -196°C , контроль	УФ-облучение, контроль	Облучение при -196°C	Заморажива- ние—оттаива- ние—облучение	Облучение—замо- раживание— оттаивание
210	$86,4 \pm 8,2$	$100,7 \pm 6,3$	$82,2 \pm 7,1$	$84,2 \pm 6,1$	$77,9 \pm 10,7$
840	$86,5 \pm 5,3$	$89,7 \pm 4,3$	$92,5 \pm 4,2$	$77,6 \pm 5,5$	$70,8 \pm 4,8$
4200	$72,7 \pm 12,1$	$89,6 \pm 12,7$	$48,2 \pm 7,2$	$63,4 \pm 7,2$	$26,1 \pm 7,7$
8400	$78,7 \pm 4,2$	$26,6 \pm 3,2$	$34,7 \pm 4,2$	$12,7 \pm 5,3$	$6,7 \pm 3,4$

При столь высокой для биологических объектов дозе, как 4200 эрг/мм², выживает почти столько же клеток в контроле, но при сочетании с замораживанием происходит резкое снижение устойчивости — действие обоих факторов суммируется. Несколько иначе обстоит дело при вдвое большей дозе облучения, поскольку эта доза сильно снижает выживаемость — до 26%; при облучении же замороженных цист выживаемость несколько ниже, а последовательное действие факторов снижает жизнеспособность до минимума.

В примерах, приведенных выше, сравнивались данные, полученные на генетически однородном материале, устойчивом к температуре -196°C . В культурах менее зрелых цист или у других клонов с меньшей устойчивостью к такой температуре при облучении неповреждающими дозами эффект совместного действия с замораживанием сильно меняется. Как видно из табл. 2, чем меньше устойчивость цист к температуре -196°C , тем больше проявляется влияние УФ-облучения, которое повышает процент инфузорий, эксцистировавшихся после воздействия различных факторов.

Таблица 2

Устойчивость цист инфузорий к совместному
действию замораживания и облучения
(неповреждающие дозы)
при различной чувствительности
к глубокому охлаждению

Выжива- емость хо- лодового ($T = -196^{\circ}\text{C}$) контроля, %	Выживаемость, % к холодovому контролю		
	Облучение при -196°	Заморажива- ние—оттаива- ние—облучение	Облучение— заморажива- ние—оттаива- ние
84,7	107,2	89,7	82,1
72,0	127,0	119,3	125,0
52,0	77,0	162,0	162,0
20,0	220,0	200,0	380,0
12,0	334,0	235,5	366,0

Представленные здесь данные показывают, что неповреждающие органы дозы УФ-лучей повышают жизнеспособность цист как до замораживания, так и после него. Следовательно, невыход инфузорий из цист после замораживания (холодовой контроль) не является показателем гибели клеток от замораживания, а лишь потерей способности к эксцистированию, которая может быть снята в некоторых случаях УФ-облучением.

Эти данные, однако, свидетельствуют и о другом. Когда УФ-лучи действуют на замороженные клетки, то, как известно, происходит взаимодействие обоих факторов, обычно оно выражается в понижении жизнеспособности клетки за счет образования повреждений определенного типа. В предыдущих экспериментах [4, 5, 7, 8] обнаружено положительное влияние слабых доз УФ-облучения на замороженные организмы.

Установлено, что повреждения, возникающие при облучении микроорганизмов и простейших в замороженном состоянии, в гораздо меньшей степени подвержены фотореактивации и действию других нормальных репаративных процессов. Однако при облучении при температуре 22°C эффект фотореактивации может проявляться в повышении выживаемости цист, т. е. в их большем эксцистировании — вплоть до дозы 4200 эрг/мм². В связи с этим вполне объяснимо снижение эксцистирования при облучении в замороженном состоянии. При больших дозах УФ-облучения, когда фотореактивация уже не эффективна, и при облучении в замороженном состоянии большое значение приобретают другие репаративные процессы.

При облучении цист после замораживания и оттаивания жизнеспособность их падает вследствие того, что клетки оказываются потенциально ослабленными. Это почти не отражается на эксцистировании наиболее устойчивых цист. Возможно, что при замораживании в присутствии кислорода в среде (в опытах с *Escherichia coli*) образуются некоторые формы свободных радикалов в дополнение к имеющимся в клетках [9]. В связи с этим происходят изменения в мембранах и транспорте веществ, в частности повышается выход аминокислот. Однако могут быть и другие причины, вызывающие повреждения мембран, например потеря цистами воды при замораживании, ее частичная кристаллизация и альтерация во время отогревания. По данным В. Н. Лысцова [6], при быстром охлаждении при температуре —196°C наблюдаются влияния криолиза ДНК. В наших опытах, когда при температуре —196° около 80% цист сохраняют жизнеспособность, значительных альтераций не происходит, тем не менее после УФ-облучения, при котором возникают новые повреждения, жизнеспособность клеток снижается в большей степени, чем после облучения без замораживания.

Наиболее сильное снижение жизнеспособности, происходящее в том случае, когда цисты облучались до замораживания, можно объяснить следующим. При облучении при комнатной температуре образуются повреждения за счет возникновения фотопродуктов типа димеров пиримидиновых оснований. На бактериях показано, что замораживание снижает способность клеток к репаративным процессам и после замораживания получают преимущество другие репаративные процессы, не удаляющие повреждений данного типа. Поэтому в клетках, облученных при комнатной температуре, образующиеся повреждения при последующем замораживании не исчезают, а добавляются новые повреждения, и гибель клеток достигает наивысшего уровня.

ЛИТЕРАТУРА

1. Александров В. Я. Экспериментальный анализ понятия «чувствительность» (влияние температуры на повреждение клеток ультрафиолетовыми лучами). — Изв. АН СССР. Сер. биол., 1952, № 4, с. 89—119.
2. Заар Э. И. Длительное периодическое облучение ультрафиолетовыми лучами (2537 Å) в меняющихся температурных условиях. — В кн.: Реакция клеток и белковых компонентов на экспериментальные воздействия, 1966, № 12, с. 116—130.
3. Лозина-Лозинский Л. К. Очерки по криобиологии. Л., «Наука», 1972. 120 с.
4. Лозина-Лозинский Л. К., Наматов Т. Н. Устойчивость личинок пшеничной нематоды к коротковолновой ультрафиолетовой радиации при низких и сверхнизких температурах. — Экология, 1972, № 2, с. 5—11.
5. Лозина-Лозинский Л. К., Успенская З. И. Действие ультрафиолетовой радиации при низких и сверхнизких температурах на живые организмы (инфузории и нематоды). — В кн.: Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины. К., 1974, с. 8—12.
6. Лысцов В. Н. Криолиз ДНК. Автореф. канд. дис. М., 1972.
7. Успенская З. И. Действие коротковолновой УФ-радиации на цисты покоя инфузорий *Colpoda Maurasi* при низких температурах. — Цитология, 1971, № 13, с. 1506—1513.
8. Успенская З. И. Влияние высушивания и скорости замораживания на эффект УФ-

облучения цист покоя инфузорий при низких температурах. — Цитология, 1972, № 14, с. 487—494.

9. Swartz H. M. Effect of oxygen on freezing damage. II. Physicochemical effect. — Cryobiology, 1971, 8, p. 255—260.

Институт цитологии
АН СССР

Поступила в редколлегию
12. XII 1975 г.

*L. K. Lozina-Lozinskij, Z. I. Uspenskaja,
A. I. Radchenko*

EFFECT OF DEEP COOLING (-196°C) AND ULTRAVIOLET IRRADIATION AT THEIR COMBINED AND SUCCESSIVE EFFECT ON THE PROTOZOA CYSTS

Summary

The effect of the temperature -196° and different variants of UV-irradiation was studied as applied to the Infusoria cysts. Resistance of the cysts to cooling did not change at noninjurious irradiation doses. Irradiation in a dose of 4200 e/mm^2 does not affect the survival rate but in combination with freezing it results in a sharp decrease of viability. In case of freezing less mature cysts UV-irradiation increases the percentage of excysted Infusoria.

УДК 57:536.48.047:615.771.8

А. П. Осипенко

РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ

Известно, что глубокое замораживание и последующий отогрев — факторы, приводящие к изменению структурно-функциональной целостности клеток и тканей [4]. Применение различных криопротекторов позволяет предохранять ряд объектов при их замораживании [5, 2, 4] до низких и сверхнизких температур. Однако мало исследован вопрос об особенностях состояния биообъектов, охлажденных до низких и сверхнизких температур, в связи с их чувствительностью к другим сильным физическим воздействиям, в частности к действию ионизирующего облучения. В связи с этим представляет интерес выяснение характера реакций биообъектов, подвергнутых сочетанному воздействию низких температур и ионизирующей радиации.

Действительно, защитное действие глубокого охлаждения при облучении ионизирующей радиацией обнаружено на бактериях, дрожжах, спорах низших грибов и на некоторых клетках [1]. Паркес [9] показал, что ткани яичника, получившие 3300 Р в замороженном состоянии при -79°C , способны после отогрева к трансплантации, а облученные при комнатной температуре не приживались. Изучение радиочувствительности спор *Clostridium Botulium* 33A, охлаждаемых в фосфатном буфере, показало, что понижение температуры от -25 до -196°C сопровождается повышением их устойчивости к действию ионизирующей радиации [7]. По данным Пауэрса, радиационная чувствительность спор в зоне от -148 до -268°C ниже, чем при температурах выше 0°C . С повышением температуры она возрастает и при температуре $+30^{\circ}\text{C}$ достигает максимального значения, превышая чувствительность спор при низких температурах на 30% [3].

Однако имеются данные, свидетельствующие об определенной специфичности реакций биообъектов, охлажденных до низких температур,

на воздействие радиации. Так, клетки асцитной карциномы мышей скорее погибали в результате облучения при -79°C , чем при облучении при комнатной температуре [8]. По данным Танака [10], при облучении в диапазоне температур от $+37$ до -20°C радиочувствительность тимомы крыс уменьшалась с понижением температуры и достигала минимума в области от -2 до -7°C . Таким образом, для каждого вида клеток существует определенный температурный интервал, в котором они наиболее чувствительны или устойчивы к воздействию ионизирующей радиации.

Удобной моделью при исследовании воздействия радиации на клетки крови могут служить эритроциты. Нами проведено исследование действия облучения на эритроциты донорской крови человека при 0 и -196°C . В первом случае суспензию эритроцитов готовили на физрастворе. Для облучения при температуре -196°C суспензии замораживали в присутствии криопротектора (15%-ный глицерин) погружением полиэтиленовых ампул (1,5 мл) в жидкий азот. После облучения пробы отогревали в водяной бане при $+42^{\circ}\text{C}$, клетки отмывали от глицерина и хранили при температуре $+4^{\circ}\text{C}$. Контролем в обоих случаях служили необлученные суспензии. Через 24 ч определяли осмотическую резистентность эритроцитов, фотометрируя пробы, помещенные в гипотонический 0,5%-ный раствор NaCl.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что радиочувствительность клеток, облученных в присутствии криопротектора при температуре -196°C , значительно ниже, чем облученных при 0°C . Хранение ($+4^{\circ}\text{C}$) таких эритроцитов не сопровождалось снижением их осмотической резистентности. Это имело место после облучения как однократной, так и трехкратной дозами. В то же время облучение проб при температуре 0°C вызывало последующее снижение осмотической резистентности эритроцитов, причем отмечена прямая зависимость чувствительности от применяемых доз облучения. Одно- и трехкратные дозы облучения приводили к возрастанию оптической плотности соответственно в 1,5 и 2,3 раза выше контрольной пробы (не подвергнутой облучению), что свидетельствует о значительном гемолизе ($P < 0,02$).

Возможным объяснением полученного эффекта является сохранение при температурах жидкого азота фиксированных конформаций макромолекул и их комплексов, что в значительной степени снимает проявление вторичных эффектов облучения. При этом, вероятно, существенное значение имеет присутствие криопротектора. Действительно, согласно современным представлениям [6], основная функция радиопротекторов — жесткая стабилизация специфических конформаций макромолекул, препятствующая их необратимым изменениям и существенно повышающая вероятность репаративных процессов. Следует полагать, что применение оптимальных условий замораживания в присутствии криопротектора до температурных зон порядка от -150 до -196°C позволит существенно уменьшить влияние таких факторов, как ионизирующая радиация или УФ-излучение. Однако остается открытым вопрос о специфичности реакций клеток в зависимости от их организации и характера выполняемых функций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Граевский Э. Я. Защита от излучения и пострadiaционное восстановление. — В кн.: Основы радиационной биологии. М., 1964, с. 283—290.
2. Лозина-Лозинский Л. К. Очерки по криобиологии. Л., «Наука», 1972, 123 с.
3. Пауэрс Е., Эрет К., Смаллер Б. Роль свободных радикалов в летальном действии рентгеновских лучей на сухие споры бактерий. — В кн.: Свободные радикалы в биологических системах. М., 1963, с. 405—412.
4. Пушкарь Н. С., Белоус А. М. Введение в криобиологию. К., «Наук. думка», 1975, с. 149—300.

5. Смит О. Биологическое действие замораживания и переохлаждения. М., Изд-во иностр. лит., 1963, с. 65—95.
6. Эйдус Л. Х. Роль мембран в реакции клеток на внешние воздействия. — В кн.: Биофизика живой клетки. Пушино, 1974, с. 96—108.
7. Grecz N., Upad-Hyay J., Tang T. C. Effect of temperature on radiation resistance of spores of *Clostridium Botulinum* 33A. — *Canad. J. Microbiol.*, 1967, 13, N 3, p. 287—293.
8. Lasnitzki J. The effect of radiation on frozen tumor cells. — *Radiobiol. Simp.*, Liege—New York, 1954, с. 321.
9. Parkes A. S. Radiation sensitivity ovarian tissue at -79° . — *Nature*, 1955, 176, N 4495, p. 1216—1217.
10. Tanaka Y., Rixon R. H. The effects of freezing on the radiation sensitivity of rat thymocytes. — *Internat. J. Radiat. Biol.*, 1965, 9, N 5, p. 503—507.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
12. XII 1975 г.

A. P. Osipenko

RADIOSENSITIVITY OF ERYTHROCYTES AT LOW TEMPERATURE

Summary

Human conserved blood erythrocytes were subjected to X-ray irradiation in doses with a frequency of 1 and 3 at 0° without cryoprotector and at -196° with cryoprotector (15% glycerine). Osmotic resistance of the erythrocytes was studied after the action of the above-mentioned factors. The content of HB in hemolyzed blood was determined photoelectrocalorimetrically. It is established that when erythrocytes are irradiated at 0° , after irradiation they are hemolyzed to a greater extent.

УДК 57:536.48.047:621.3.029

Ю. П. Тимошенко

РАЗМОРАЖИВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ СВЧ-ЭНЕРГИЕЙ.

IV. О ВОЗМОЖНОСТИ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ПРОГРАММНОГО РАЗМОРАЖИВАНИЯ

Благодаря специфическим особенностям, присущим СВЧ-нагреву, таким как безинерционность в управлении и возможность создания больших тепловых потоков, генерируемых непосредственно в веществе, данный вид теплоподвода является наиболее перспективным для осуществления программного размораживания биообъектов. Под словом «программный» подразумевается нагрев с определенной скоростью в заданном интервале температур, причем таких интервалов в ходе всего процесса может быть несколько.

При нагреве объекта от температуры хранения (-196°C) до требуемой ($+36^{\circ}\text{C}$) его структура и физические свойства претерпевают существенные изменения. В связи с этим весь процесс размораживания разбит нами на три зоны, отличающиеся механизмом генерирования и распространения тепла в объекте: зона кристаллического состояния вещества (I), зона фазовых превращений (II) и жидкого состояния (III), причем для последних двух температурный интервал примерно одинаков. В конечном счете, любая программа размораживания может быть сведена к комбинации различных скоростей нагрева в выделенных зонах.

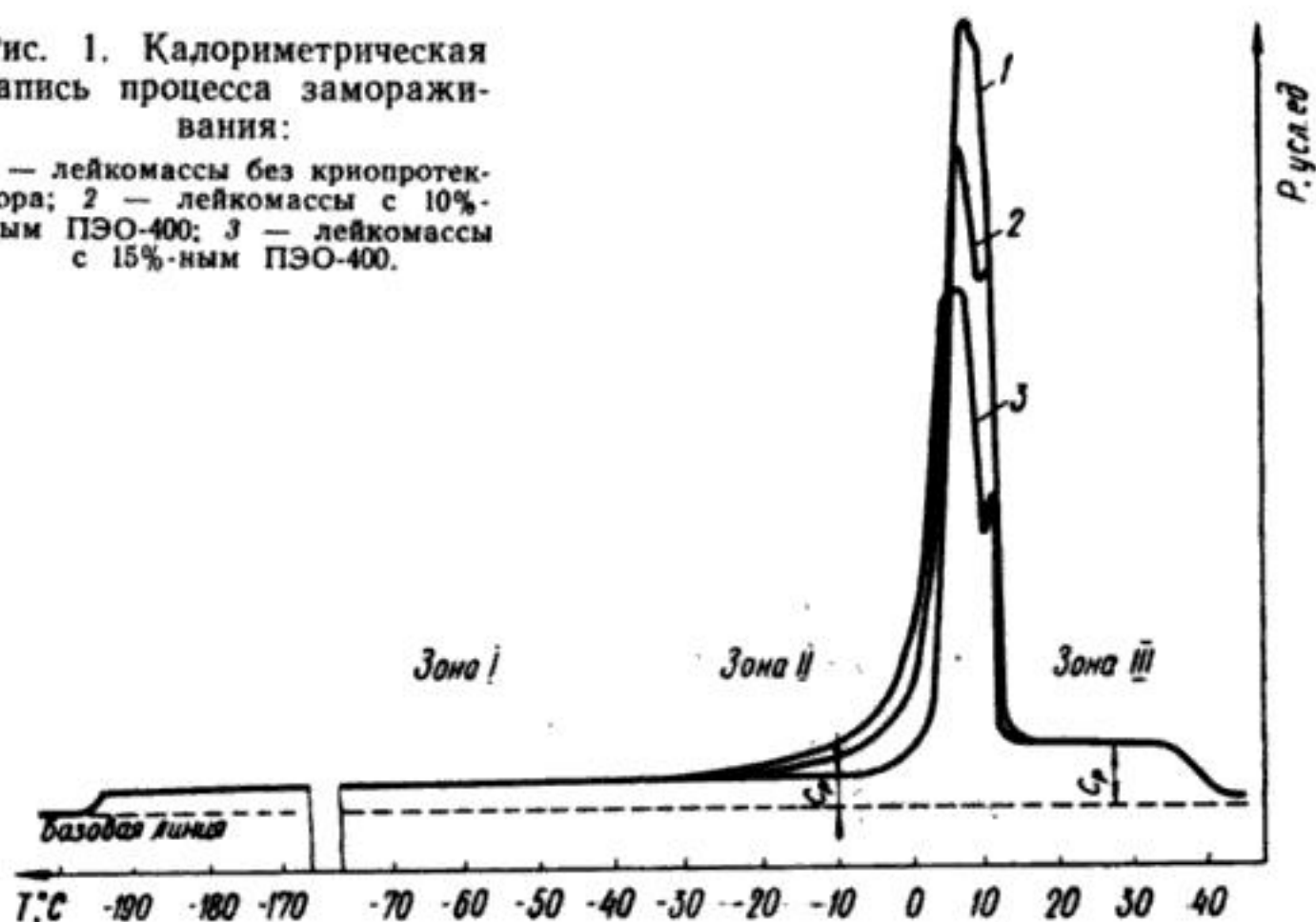
Зная общее количество тепла, а также распределение его в выделенных температурных интервалах, можно оценить возможность выполнения программного размораживания. Исследования проводились на дифференциально-сканирующем калориметре ДМС-2. На рис. 1 пред-

ставлены кривые, характеризующие распределение во времени требуемого количества тепла, подводимого к объекту извне, для получения постоянной скорости нагрева во всем интервале температур. Площадь под кривой пропорциональна общему количеству тепла, необходимого для повышения температуры объекта от -196 до $+36^{\circ}\text{C}$.

Анализ исследований показал, что в кристаллическом состоянии вещества (I), а также в области фазовых превращений (II) необходимо

Рис. 1. Калориметрическая запись процесса замораживания:

1 — лейкомаcсы без криопротектора; 2 — лейкомаcсы с 10%-ным ПЭО-400; 3 — лейкомаcсы с 15%-ным ПЭО-400.



подвести примерно одинаковое количество теплоты. В жидком состоянии требуется в 3—4 раза меньше тепла. Кривая 1 (рис. 1) является типичной для водных растворов биомакромолекул. Наличие криопротектора (см. рис. 1, кривые 2 и 3) приводит к существенному перераспределению тепла лишь в области фазовых превращений. Так, при 15%-ном содержании ПЭО-400 в лейкомаcсе скрытая теплота плавления в интервале от -10 до 0°C уменьшается примерно вдвое. Общий вид кривых остается почти неизменным при различных скоростях нагрева.

Как показали проведенные ранее исследования, в зонах I и II состояния вещества, диэлектрические потери, удельная теплоемкость (C) и теплопроводность имеют слабо выраженную температурную зависимость. Повышение скорости нагрева $\frac{dT}{d\tau} = \frac{P}{\rho C}$ в этих зонах, как пра-

вило, связано лишь с увеличением СВЧ-мощности (P), поглощаемой единицей объема вещества. Вследствие этого в зонах кристаллического и жидкого состояний вещества возможно осуществить расчет процесса размораживания и обеспечить требуемую программу теплопритока, добиться устойчивого равновесия камеры нагрева с генератором.

Существенные изменения физических свойств в зоне фазовых превращений затрудняют выполнение требуемой программы теплопритока. Кроме того, с точки зрения сверхвысокочастотного нагрева выделенная зона опасна возможностью возникновения локального нагрева. Появление неконтролируемого и неравномерного нагрева в ходе процесса размораживания — основной недостаток СВЧ-размораживания биологических объектов, что всегда связано с долей риска потери их жизнеспособности.

Для выявления особенностей нагрева в данной зоне произведен анализ частотной и температурной зависимостей диэлектрических

свойств. Обобщая результаты проведенных исследований по частотной зависимости свойств в СВЧ-диапазоне, необходимо отметить, что для консервируемых суспензий клеток, представляющих собой электролиты с макромолекулярными компонентами и липидами, диэлектрические свойства обусловлены электролитической средой. Дисперсия диэлектрических свойств в основном отражает аналогичное поведение воды и наличие криопротектора (до 15% по объему); существенных

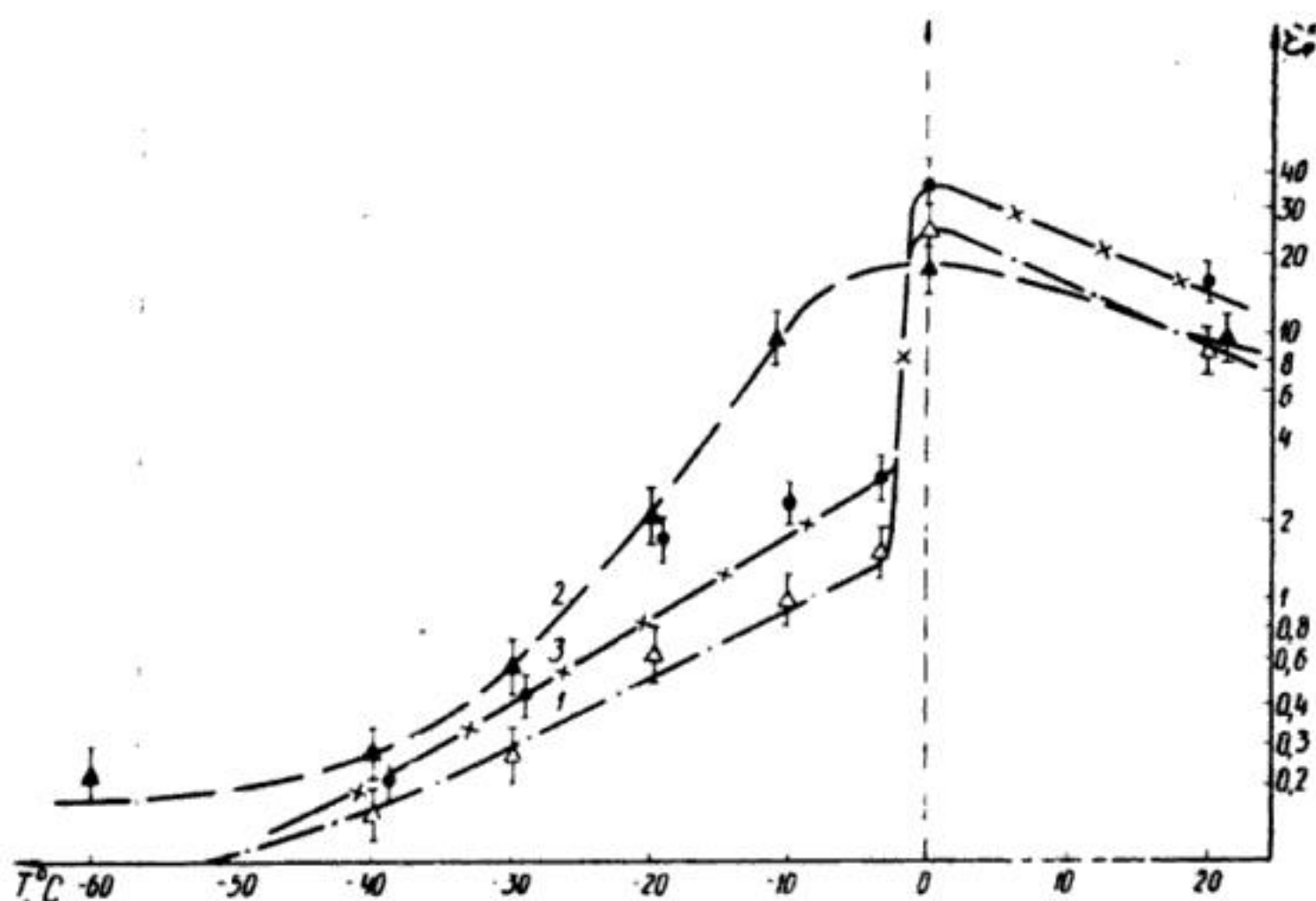


Рис. 2. Температурная зависимость диэлектрических потерь крови:
1 — лейкомасса (частота 2375 мГц); 2 — лейкомасса с 10%-ным ПЗО-400 (частота 2375 мГц); 3 — лейкомасса (частота 415 мГц).

изменений как в жидком ($+20^\circ$), так и в кристаллическом (-30°) состояниях она не вносит. На частотах ниже 500 мГц потери проводимости являются доминирующими.

Как показали проведенные исследования, изменение ионного состава электролитической среды в нижней части СВЧ-диапазона (433 мГц) сказывается сильнее, чем в верхней части (9000 мГц). Таким образом, осуществляя выбор частоты нагрева менее 2375 мГц, можно получить саморегулирующийся процесс. Характерной особенностью такого процесса является снижение поглощаемой мощности появившейся жидкой фазы по мере протекания процесса плавления вследствие уменьшения в ней концентрации солей и криопротектора.

Диэлектрические свойства исследуемых веществ обладают сильно выраженной температурной зависимостью в области температур фазовых превращений. Это наглядно иллюстрирует рис. 2. Изменение характера температурной зависимости коэффициента диэлектрических потерь при прохождении температуры плавления объясняется изменением в структуре вещества.

В интервале температур от начала процесса плавления (-20°) вплоть до -5°C рост коэффициента диэлектрических потерь происходит за счет увеличения «подвижности» молекул криопротектора или их подвижных фрагментов и гидратированной части молекул воды (кривая 1 на рис. 2). Уменьшение диэлектрических потерь в данном диапазоне температур с понижением частоты уравнивается ростом потерь проводимости (кривые 2, 3 на рис. 2).

Сравнительный анализ кривых 1 и 2 на рис. 1 и 2 указывает на тесную взаимосвязь температурных зависимостей теплофизических

и диэлектрических свойств в интересующей нас области фазовых превращений. Обе величины резко возрастают в температурном интервале, где происходит плавление основной массы льда. Учитывая эту особенность, выбором частоты источника нагрева возможно осуществить более равномерное повышение температуры по объему при ее подходе к области плавления основной массы объекта (от -5 до 0°C). Превращение энергии электромагнитного поля в тепло будет осуществляться «незамороженными» диполями воды, гидратированной вокруг белка и криопротектора. Кроме того, возможна ориентация полем полярных боковых цепей белковых молекул и криопротектора. Это предположение основано на том, что по мере повышения температуры появляется вращение молекулярных групп вокруг свободно вращающихся осей связей. При наличии в суспензии консервируемых клеток глицерина и полиэтиленоксида указанные выше соображения выполняются при частоте менее 1000 МГц. В этой области частот также технически проще обеспечить высокую однородность электрического поля в камере нагрева для размораживания контейнеров больших объемов (до 500 см^3).

В процессе СВЧ-нагрева нельзя, как правило, избежать некоторых вариаций в возрастании температуры нагреваемого объекта. Для выравнивания температуры между фазами гетерогенного диэлектрика нагрев осуществляется периодической подачей СВЧ-энергий. Интервал между импульсами, их длительность, а также уровень подводимой от источника мощности выбирают исходя из требуемой неоднородности и скорости нагрева. При этом удается реализовать скорости нагрева до 100°C в 1 мин при неравномерности температурного поля по объему не более $10-15^{\circ}$.

Таким образом, рассматриваемые результаты позволяют предположить, что нагрев на частотах 433 и 915 МГц более предпочтителен в выполнении программного размораживания биологических объектов, чем широко используемая частота 2375 МГц.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
12. XII 1975 г.

Iu. P. Timoshenko

DEFROSTING OF SHF-ENERGY BIOLOGICAL OBJECTS. IV. ON POSSIBILITY TO REALIZE PROGRAM DEFROSTING

Summary

A possibility to realize the program defrosting of cryoconserved bioobjects in SHF-apparatuses is considered. The word «program» implies heating with the preset rate in any temperature interval within a temperature range from -196° to $+37^{\circ}\text{C}$. It is shown that heating at frequencies of 433 and 915 MHz is more preferable for performing the program defrosting.

УДК 57:536.48.047:615.387:612.3.029

Ю. П. Тимошенко, Г. С. Лобынцева, А. И. Полякова, И. С. Пахомова

РАЗМОРАЖИВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ СВЧ-ЭНЕРГИЕЙ.

V. КОМБИНИРОВАННЫЙ СПОСОБ РАЗМОРАЖИВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

Достаточно равномерный и возможно более быстрый нагрев криоконсервированного биологического материала в диапазоне температур от -196 до $+36^{\circ}\text{C}$ представляет значительные технические трудности.

Для размораживания применяются следующие методы: подвод тепла с поверхности контейнера в глубь образца способом теплопроводности и нагрев в СВЧ-поле за счёт генерирования тепла непосредственно в самом веществе. Оба способа в силу специфических особенностей имеют достоинства и недостатки в определенных температурных интервалах вследствие изменения физических свойств вещества.

Скорость нагрева в водяной бане определяется градиентом температуры между баней и объектом, а также размерами, формой и теплофизическими свойствами последнего. Повышение скорости нагрева при данном виде теплоподвода — технически сложная задача.

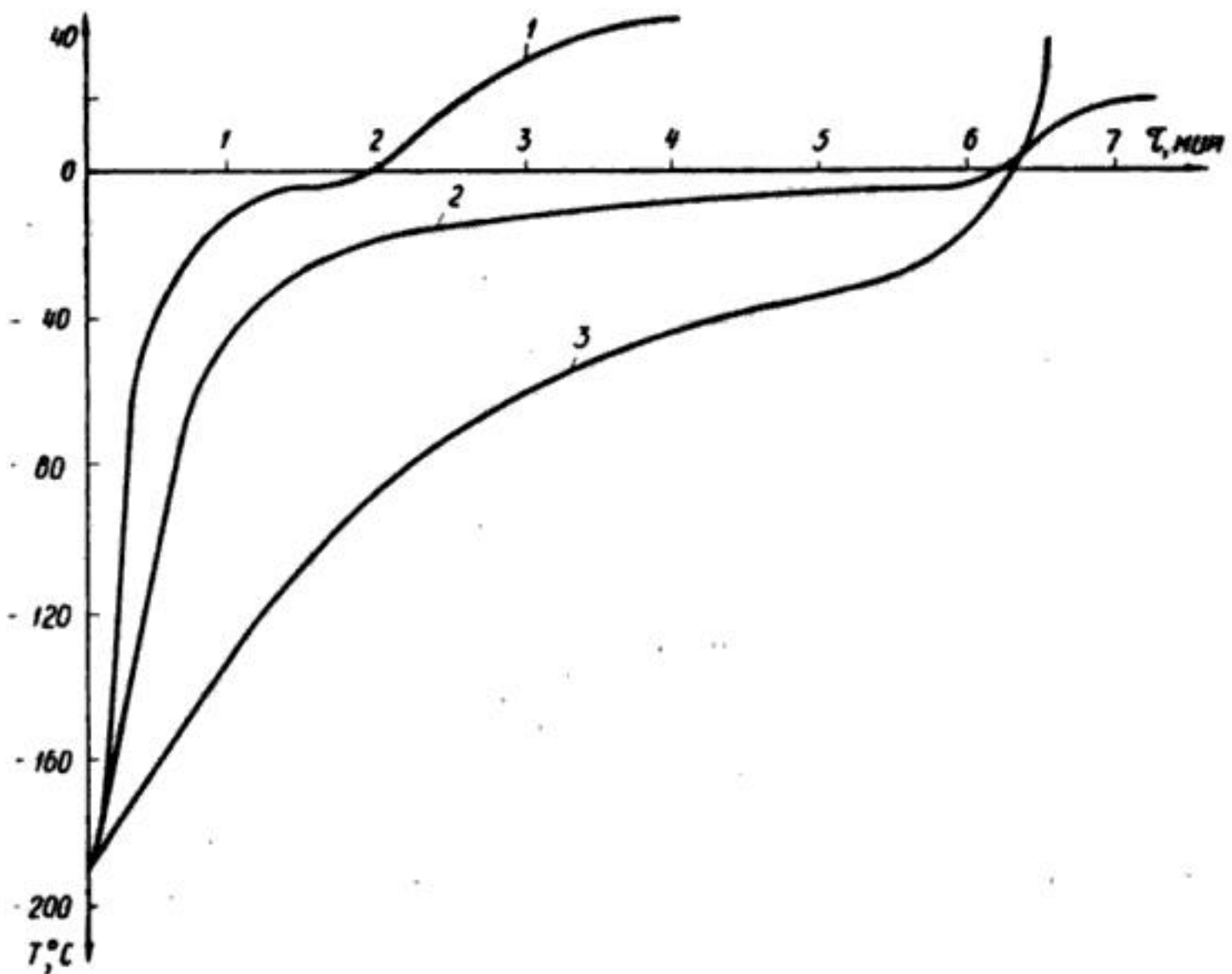


Рис. 1. Изменение температуры в центре цилиндрической ампулы, заполненной лейкомассой с 10%-ным ПЭО-400, при ее отогреве от -196 до $+37^{\circ}\text{C}$:

1 — ампула диаметром 8 мм помещается в водяную баню с температурой $+42^{\circ}\text{C}$; 2 — то же, диаметр ампулы 20 мм; 3 — ампула диаметром 8 мм размораживается в СВЧ-резонаторе.

В процессе размораживания из-за изменения агрегатного состояния биологического объекта скорости нагрева в различных температурных интервалах (рис. 1, кривая 1) значительно отличаются. В зоне кристаллического состояния образца (от -196 до -30°C) высокие градиенты температуры при хорошей теплопроводности объекта обеспечивают скорости нагрева до 300°C в 1 мин. В зоне температур от -30 до 0°C для сохранения высоких скоростей нагрева необходимо подвести большое количество тепла, требуемого для плавления. Однако уменьшающиеся градиенты температуры и появление жидкой фазы на поверхности нагреваемого образца снижают скорость повышения температуры до 20°C в 1 мин. Низкая скорость нагрева в жидкой фазе объясняется постоянно уменьшающимся градиентом температуры.

Таким образом, скорость нагрева биологического объекта в водяной бане неравномерна и существенно уменьшается в зоне фазовых переходов, где наблюдается наибольшая потеря жизнеспособности клеток от воздействия концентрированных растворов солей и криопротектора. Увеличение линейных размеров биологического объекта приво-

дит к весьма значительному повышению времени его пребывания в зоне фазовых превращений при несущественном изменении скорости нагрева в кристаллическом состоянии (рис. 1, кривая 2).

Сверхвысокочастотный нагрев характеризуется равномерным выделением тепла по объему образца, при этом скорость повышения температуры определяется поглощенной СВЧ-мощностью, массой и теплоемкостью образца. Использование частот 915 и 433 мГц является более предпочтительным при размораживании биологических объектов, чем 2375 мГц.

С понижением частоты нагрева, при тех же уровнях мощности, скорость нагрева уменьшается. Повышение скорости нагрева при фиксированной частоте возможно только за счет возрастания напряженности электрического поля. Величину напряженности поля регулировать технически несложно, однако она не может быть увеличена выше предела, зависящего от электрических свойств вещества. В противном случае наблюдается локальное повреждение вещества даже при сравнительно малых уровнях мощности.

На рис. 1 (кривая 3) представлена термограмма размораживания лейкомассы с 10%-ным ПЭО-400 в многомодовом резонаторе на частоте 2375 мГц с мощностью источника колебаний 600 Вт. Температура в центре ампулы измерялась термопарой через определенные интервалы времени при выключенном источнике СВЧ-колебаний.

Небольшая скорость нагрева в кристаллическом состоянии (около 30°C в 1 мин) объясняется малым коэффициентом диэлектрических потерь. По мере возрастания диэлектрических потерь с повышением температуры скорость нагрева в области фазовых превращений достигает 100°C в 1 мин. Скорость нагрева жидкой фазы — более 200°C в 1 мин.

Из изложенного выше следует, что при размораживании биообъектов в СВЧ-поле увеличивается скорость нагрева в тех температурных областях, где при размораживании в водяной бане скорость резко замедляется. Это наглядно иллюстрируется термограммами нагрева, представленными на рис. 1. Отмеченные особенности обоих способов размораживания можно использовать для получения быстрого и сравнительно равномерного нагрева биологических объектов комбинированным методом — механизмом теплопроводности и СВЧ-энергией.

Из рис. 2 видно, что скорость нагрева данным способом во всем диапазоне температур довольно постоянна и составляет около 200°C в 1 мин. Время пребывания биологического объекта в наиболее опасной зоне температур (от -30 до 0°) сокращается для контейнеров диаметром 8 мм почти вдвое. С увеличением диаметра размораживаемого образца до 20 мм распределение температуры по объему образца остается равномерным, хотя общая скорость нагрева несколько снижается.

Экспериментальная проверка предлагаемого способа размораживания проведена на ядросодержащих клетках крови, замороженных по двухэтапной программе (4°C в 1 мин до точки кристаллизации и 400°C в 1 мин до температуры -196°) с 2, 5 и 10%-ным ПЭО-400. Контролем служили образцы, размораживаемые в водяной бане при температуре $+42^{\circ}\text{C}$.

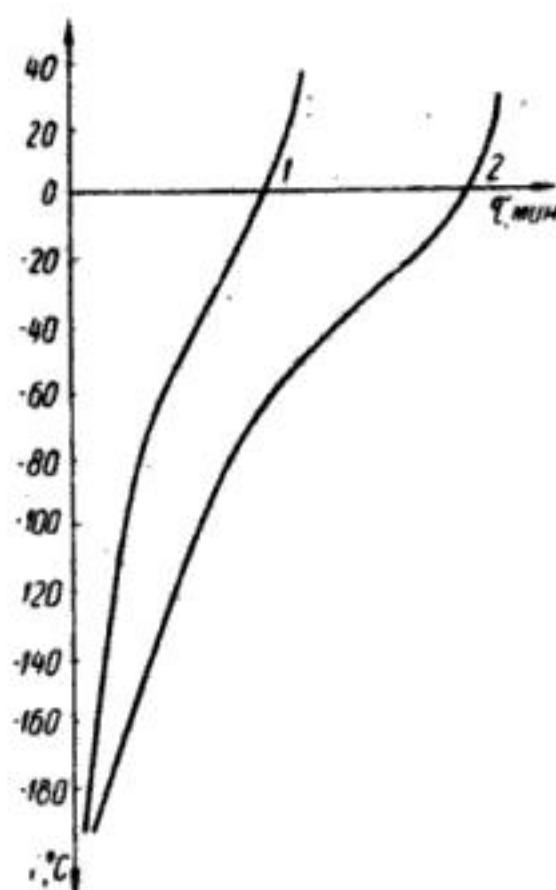


Рис. 2. Изменение температуры в центре цилиндрической ампулы, заполненной лейкомассой с 10%-ным ПЭО-400, при ее отогреве комбинированным способом в термобане с температурой 0° и в СВЧ-резонаторе. Диаметр ампулы: 1 — 8 мм; 2 — 20 мм.

Проведенные ранее эксперименты по сверхвысокочастотному размораживанию ядросодержащих клеток крови с 10%-ным ПЭО-400 показали, что количество жизнеспособных клеток на 5% больше, чем при использовании обычного способа нагрева.

При сочетании двух способов теплоподвода для размораживания ядросодержащих клеток крови, замороженной с 5, 10%-ными криопротекторами, сохранялось 83% жизнеспособных клеток, в то время как в аналогичных образцах, размороженных в водяной бане, сохранялось соответственно 42 и 80% клеток. Лучшие результаты получены нами с 2%-ным ПЭО-400, когда после размораживания сохранялось 89% жизнеспособных клеток, что на 70% превышало результаты, полученные в контроле.

Сравнительный анализ проведенных исследований указывает на то, что при размораживании клеток крови скорость нагрева вещества в кристаллическом состоянии не оказывает существенного влияния на жизнеспособность клеток. Однако прохождение зоны фазовых превращений с большей скоростью приводит к существенному повышению количества жизнеспособных клеток. Особенно наглядно это видно в образцах с низкой концентрацией криопротекторов.

Следует предположить, что размораживание, осуществляемое предлагаемым способом, позволит значительно снизить концентрацию криопротектора в консервируемых материалах, что, безусловно, важно при трансплантации его в клинику.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
12. XII 1975 г.

*Ju. P. Timoshenko, G. S. Lobyntseva, A. I. Poljakova,
I. S. Pakhomova*

DEFROSTING OF SHF-ENERGY BIOLOGICAL OBJECTS. V. COMBINED METHODS FOR DEFROSTING BIOLOGICAL OBJECTS

Summary

A comparative analysis is presented for heating biological objects by the mechanism of heat conductivity and SHF-energies. It is shown that the combined application of two methods of heat supply considerably increases the heating rate at all stages of the defrosting process. Passing through a zone of phase transformations with a greater rate (up to 200° per 1 min) makes it possible to weaken the effect of concentrated salt solutions and cryoprotector, thus increasing the number of viable cells in the conserved cell suspensions at low concentration of cryoprotector.

УДК 57:536.48.047:57:536.48.043:678.048

Г. Г. Кочуровская, Н. М. Матвиец, В. Г. Лубяный

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ОКСИЭТИЛИРОВАНИЯ ПОЛИОЛОВ

Продукты полимеризации окиси этилена, в частности оксиэтильные производные двухатомного спирта, так называемые полиэтиленоксиды разного молекулярного веса, находят все более широкое применение в криобиологии. Вместе с тем наиболее прочную позицию в практической биологии (растениеводстве, скотоводстве) продолжает занимать глицерин, обладающий, однако, рядом существенных недостатков. Изучение процесса оксиэтилирования полиолов, возможно, даст некоторые предпосылки для целенаправленного подбора различных защитных веществ в криобиологии.

Нами изучался процесс полимеризации окиси этилена на глицерине при неодинаковых условиях — переменных давлениях, температуре, разных катализаторах, применявшихся в различной концентрации.

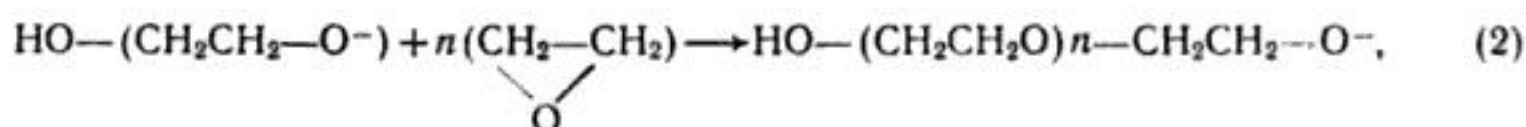
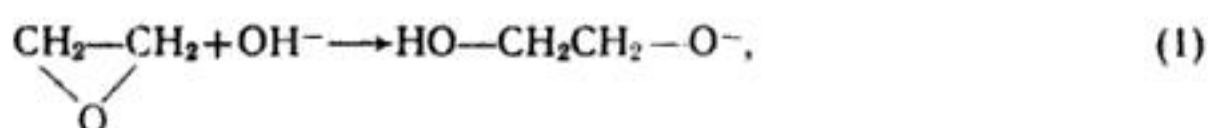
Реакцию оксиэтилирования глицерина окисью этилена проводили двумя методами: 1) при атмосферном давлении в аппарате колонного типа при температуре 150—170°C в присутствии щелочного катализатора и непрерывном барботировании газообразной окиси этилена до заданного привеса; 2) в автоклаве, снабженном медь-константановой термопарой с автоматической записью температурного режима, дозирующим устройством, обеспечивающим дискретную подачу жидкой окиси этилена в необходимых количествах при давлении 4—5 атм, температуре 160—170°C с использованием различных катализаторов — гидроокисей металлов I и II групп периодической системы элементов Д. И. Менделеева и солей этих металлов в количествах 0,5—0,05% веса конечного продукта.

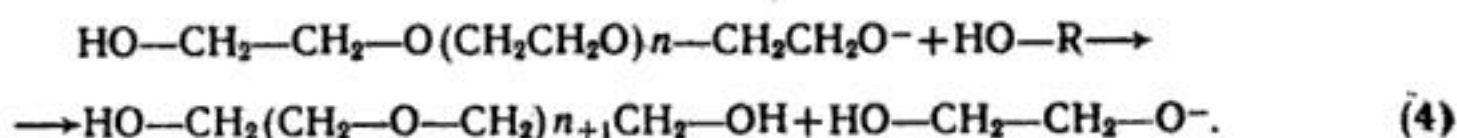
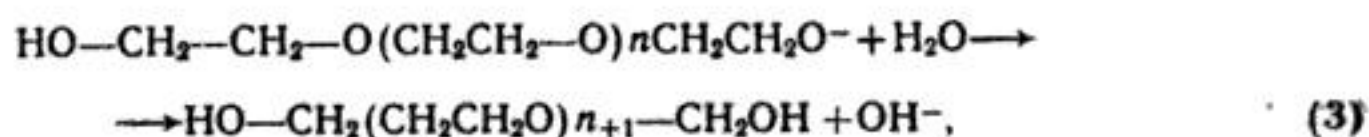
Реакция протекает по следующей схеме:



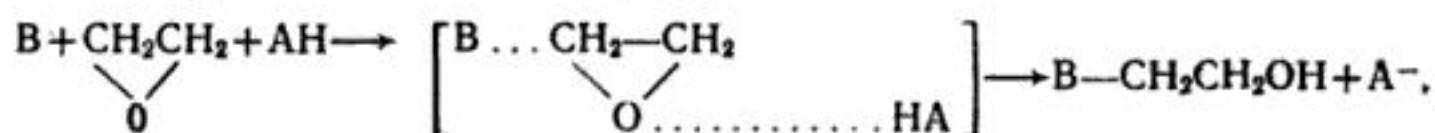
Таким образом синтезированы полимергомологи со степенью полимеризации 10, 20 и 30 оксиэтильных групп. Полученные вещества очищены и идентифицированы по следующим показателям: вязкость относительная и характеристическая в пределах концентрации 1—100%, показатель преломления на рефрактометре ИРФ-22, плотность методом пикнометрии, поверхностное натяжение на тензиометре Дю-Нуи в тех же концентрациях, кристаллография, термография и ИК-спектроскопия.

Вопросы анионной полимеризации окисей олефинов в присутствии щелочного катализатора изучались довольно широко [1, 2]. Анионная полимеризация — ступенчатый безобрывочный процесс, каждый акт которого состоит в нуклеофильном раскрытии окисного кольца алколюлятом полимерного спирта. Существуют различные мнения по поводу механизма оксиэтилирования при основном катализе. Вполне общепринята схема ступенчатого процесса полимеризации окиси этилена, предложенная Гиббертом и Перри. Типичный для окиси этилена характер взаимодействия состоит в том, что в реакцию вступает молекула окиси этилена в виде ненасыщенной группировки двухвалентного радикала $\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—O}^-$. Вначале образуется анион гликоля вследствие взаимодействия между молекулой окиси этилена и гидроксильным ионом [1], при дальнейшем взаимодействии с окисью этилена образуются анионы более высоких полиэтиленгликолей [2]. По мнению авторов, необходимая для начала взаимодействия окиси этилена вода вносится реагирующими веществами и, взаимодействуя с анионом полиэтиленгликоля, приводит к получению полиэтиленгликоля и освобождению гидроксильного иона, дающего начало взаимодействию нового ряда молекул полиэтиленгликоля. Не исключена также возможность взаимодействия между анионом полиэтиленоксида и имеющимися в реакционной среде молекулами полиола:





Дальнейшие, более тщательные исследования механизма анионной полимеризации при основном катализе привели к заключению, что принятая ранее схема оксиэтилирования не вполне отражает суть данного процесса. По мнению некоторых исследователей [1, 2], кинетика реакции окиси этилена с нуклеофильным реагентом в присутствии протонодонорных соединений протекает через тримолекулярное переходное состояние, определяется скоростью его образования и разложения и описывается уравнением 3-го порядка



где В — катализирующий агент (фенолят, алкоголят, гидроксил); HA — соединение с активным атомом водорода.

Проведенные нами реакции оксиэтилирования глицерина с использованием в качестве катализатора KOH, NaOH, LiOH, Ca(OH)₂, Ba(OH)₂, KCl, NaCl, глицерата натрия, полученного взаимодействием метилата натрия и глицерина, показали, что гидроокиси металлов I группы периодической системы элементов вследствие более выраженных металлических свойств являются более активными катализаторами. Основной катализ с Ca(OH)₂ и Ba(OH)₂ проходит приблизительно в 20 раз медленнее, а с KCl и NaCl — только в 4—5 раз. Реакция с глицератом натрия проходит достаточно быстро — за 3,5 ч.

Следовательно, полученные экспериментальные и литературные данные по изучению механизма анионной полимеризации окисей олефинов совпадают и свидетельствуют о прохождении реакции через стадию образования промежуточного алкоголята, скорость образования последнего в процессе оксиэтилирования адекватно зависит от активности солеобразующего металла и его радиуса. Так, в ряду Li, Na, K радиус иона соответственно равен 0,68; 0,98; 1,33 Å, чем определяется последовательность скорости оксиэтилирования с K⁺, Na⁺, Li⁺ (54 мин, 55 мин, 2 ч 10 мин).

Таким образом, изучено влияние катализатора на скорость оксиэтилирования глицерина, подтверждены механизм прохождения этого процесса через стадию образования глицерата с образованием тримолекулярного промежуточного состояния и анионный характер полимеризации оксиэтильной цепочки. Полученные оксиэтилированные глицерины могут быть исследованы в криобиологии как один из компонентов защитной среды.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лебедев Н. Н., Савельянов В. П., Баранов Ю. И. Реакционная способность и роль специфической сольватации в основно-каталитических реакциях окиси этилена. — Журн. теоретич. и эксперим. химии, 1968, 2, с. 203—209.
2. Смирнова М. М., Лебедев Н. Н. Анионная сополимеризация окиси этилена и окиси пропилена. — ВМС, 1971, 13, № 3, с. 636—639.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
12. XII 1975 г.

SOME ASPECTS OF POLYOLS OXIETHYLATION

Summary

The article deals with the results of studies in the process of ethylene oxide polymerization in the glycerine medium under different conditions: variable pressures, temperatures, type and concentration of the catalyst. Optimal parameters of the given process are determined and the catalyst effect on the reaction rate is studied. Hydroxides of metals from the first group of the periodic system of elements are established to be more active catalysts due to their more pronounced metallic properties. Studies in the mechanism of olefine oxides anionic polymerization gives reasons to confirm the data from literature that the reaction passes through a stage of intermediate alcoholate formation. Its formation rate in the process of oxyethylation is in adequate dependence on the activity of co-forming metal and its radius.

УДК 57:536.48.047:578.008.1:547.422:57

Ю. В. Калугин, О. В. Пашковская

**О ВЗАИМОДЕЙСТВИИ
КРИОПРОТЕКТОРА ПОЛИЭТИЛЕНОКСИДА
С ЭРИТРОЦИТАМИ ЧЕЛОВЕКА**

В современной криобиологии одной из актуальных проблем в исследовании механизма криозащиты является изучение взаимодействия криопротекторов с биообъектами, находящимися на различных уровнях организации.

Для оценки количественной стороны указанного процесса нами разработан метод, основанный на измерении длины полуволны ультразвука в рабочей камере автоматического ультразвукового интерферометра, заполненной раствором криопротектора, который ранее находился в контакте с биоструктурами. Использование несерийного интерферометра, снабженного термостатирующим устройством и электронным блоком индикации, регистрирующим значения длины 100 полуволн в течение 1—2 мин, позволяет производить измерения в широкой температурной зоне и с большой точностью. Данный метод применим для изучения взаимодействия криопротекторов различной химической природы с разнообразными биологическими объектами. Нами изучена особенность этого процесса по отношению к эритроцитам, помещенным в 15%-ные растворы полиэтиленоксидов (ПЭО) различного молекулярного веса при температуре 20°C. Изучалась зависимость длины полуволны ультразвука от концентрации (1—20%) ПЭО различных молекулярных весов (100—3000). На основании полученных данных строилась калибровочная кривая, с помощью которой в дальнейшем определяли наличие в среде криопротектора с точностью до 0,2%.

Для экспериментов брали консервированную донорскую кровь человека. Центрифугированием со скоростью 3000 об/мин в течение 30 мин осаждали эритроциты, к равным объемам которых после удаления плазмы добавляли в соотношении 1:1 ПЭО 16,5%-ной концентрации на физиологическом растворе. Учитывалось, что в конечном разведении указанная концентрация криопротектора снизится до 15% за счет плазмы, остающейся в межклеточном пространстве при указанном способе осаждения клеток и составляющей 8—10% ее исходного объема. После экспозиции клеток с криопротектором (в течение 10; 30 и 60 мин) и центрифугирования (3000 об/мин в течение 20 мин) надосадочную жидкость заливали в рабочую камеру ультразвукового ин-

терферометра и измеряли длину полуволны ультразвука. По найденной величине с помощью калибровочной кривой определяли изменение концентрации криопротектора в надосадочной жидкости после контакта с клетками относительно его первоначальной концентрации (15%) в суспензии. Это позволило оценить количество ПЭО, вступившего во взаимодействие с эритроцитами.

Полученные данные (таблица) свидетельствуют о том, что максимальное количество ПЭО независимо от степени его полимеризации связывается с клетками в течение первых 10 мин экспозиции. Мы не оценивали место локализации криопротектора (внутри или вне клетки). При дальнейшей экспозиции (до 1 ч) интенсивность процесса меняется незначительно.

Перераспределение ПЭО различного молекулярного веса в суспензии эритроцитов

Молекулярный вес ПЭО	Количество ПЭО, перешедшего из раствора в эритроциты (в %) за время экспозиции		
	10 мин	30 мин	60 мин
100	24,0±0,86	24,00±0,78	24,40±0,90
200	22,7±0,70	23,00±0,60	23,70±0,70
300	21,7±1,90	22,40±1,60	24,85±0,70
400	16,7±2,00	17,00±1,90	17,35±2,00
600	13,4±2,10	15,00±1,80	15,00±1,90
1000	9,7±1,30	10,35±1,60	13,40±0,60
1500	7,8±1,80	8,35±1,60	9,00±0,80
3000	8,4±1,90	9,00±2,40	10,00±2,10

Более интенсивно осуществляется связывание ПЭО с клетками по мере уменьшения его молекулярного веса. Если в среде с ПЭО-3000 количество криопротектора, вступившего во взаимодействие с эритроцитами, составляет 8—10%, то в случае с ПЭО-100 — 24, что коррелирует с нашими данными, полученными с помощью радиоактивного ПЭО, меченного C^{14} . Эффективность этого процесса в интервале молекулярных весов 100—1000 позволяет выделить ПЭО-400, поглощение которого клетками менее выражено по сравнению с полиэтиленоксидами более низкого молекулярного веса. Связывание ПЭО-1500 и ПЭО-3000 с эритроцитами происходит в равной мере и характеризуется наиболее низким значением (8%). Указанная величина соответствует данным, полученным М. И. Шраго [2], применившей химический метод [3] количественной оценки содержания высокомолекулярного полиэтиленоксида в эритроцитах.

По сложившимся представлениям [1, 4], в зависимости от характера взаимодействия с клетками криопротекторы делят на эндо- и экстрацеллюлярные. В связи с этим следовало бы ожидать резкого изменения интенсивности процесса перераспределения ПЭО между клетками и средой либо в узком интервале молекулярных весов в ряду применяемых соединений, либо в отношении одного из них. По результатам проведенных экспериментов указанный эффект в известной мере относится к ПЭО-400. Однако в целом взаимодействие полиэтиленоксидов различной степени полимеризации с эритроцитами выражается в относительно плавном изменении количества криопротектора, связавшегося с клетками. Это связано с тем, что полиэтиленоксиды представляют собой полимергомологи, содержащие низкомолекулярные и высокомолекулярные фракции указанного соединения, наличие которых и нивелирует наблюдаемый выше процесс.

Полученные данные о значительной интенсивности связывания криопротектора с эритроцитами в течение первых 10 мин не могут служить основанием для определения оптимального эквilibрационного

периода, поскольку данное понятие характеризует не только количественную, но и качественную сторону взаимодействия криопротектора с клетками.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пушкарь Н. С., Наконечный А. А., Калугин Ю. В. Некоторые аспекты механизма действия криопротектантов. — В кн.: Актуальные вопросы консервации и трансплантации костного мозга и крови. Харьков, 1972, с. 98—114.
2. Шраго М. И. О криозащитном действии полимеров окиси этилена на эритроциты человека при глубоком охлаждении. Автореф. докт. дис. Л., 1970.
3. Hyden S. A. turbidimetric method for the determination of higher polyethylene glycols in biological materials. Kgl. Lantbruks-Högskol. Amsterdam, 1956, 22, p. 139—145.
4. Meryman H. T. Cryoprotective agents. — Cryobiology, 1971, 8, p. 171—183.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
12. XII 1975 г.

Iu. V. Kalugin, O. V. Pashkovskaja

ON INTERACTION OF THE CRYOPROTECTOR POLYETHYLENOXIDE WITH HUMAN ERYTHROCYTES

Summary

The paper deals with the results of studies in the binding of the cryoprotector PEO of different polymerization degree with human erythrocytes. It is established that a considerable amount of PEO in 15% concentration at a temperature of 20° is bound with erythrocytes during first 10 min. The mentioned process intensity is in an inverse dependence on the molecular weight of the cryoprotector.

УДК 57:536.48.047:6:57.0.43:0.44

М. И. Шраго

БИОЛОГИЧЕСКИЕ АНТИФРИЗЫ И КРИОПРОТЕКТОРЫ

Криобиология своим возникновением и успешным развитием обязана достижениям физики, повлекшим за собой расцвет различных отраслей науки и техники. Стержневое положение в криобиологии занимает учение об анабиозе как состоянии обратимого угнетения жизнедеятельности. Последнее с давнего времени наблюдалось в природе, а также может быть достигнуто в искусственно создаваемых условиях. Среди воздействий, вызывающих анабиоз, особый интерес представляют низкие температуры, обеспечивающие сохранность в жизнеспособном состоянии изолированных клеток гомеотермных животных, а также микроорганизмов, опухолевых штаммов и прочих объектов. Механизмы криозащиты легли в основу теоретических исследований в криобиологии, а их результаты находят широкое применение в различных областях практической деятельности.

Таким образом, к традиционным представлениям анабиоза в природе присоединились новые понятия, связанные с низкотемпературным консервированием биологических объектов. Современные эффективные методы низкотемпературного консервирования разработаны только для клеточных суспензий и некоторых плотных тканей, причем замораживание производится при обязательном условии — наличии в клеточной взвеси добавок — химических соединений, получивших название криопротекторов. Список активных криопротекторов весьма ограничен, его составляют глицерин, диметилсульфоксид, некоторые углеводы — глюкоза, фруктоза, сахароза, лактоза — и искусственные полимерные сое-

динения — поливинилпирролидон, декстран, полиэтиленоксиды, геко-этиловый крахмал. Из приведенного перечня следует, что криозащиту могут обеспечивать субстанции, чуждые живой материи, — синтетические полимеры — полиэтиленоксид, поливинилпирролидон. Углеводы находят применение в качестве добавок к криопротекторным композициям, поскольку сами по себе не обеспечивают сохранности биологических объектов в условиях глубокого холода. Фактически только глицерин, будучи активным криопротектором, является веществом, присутствующим в жидкостях организма и участвующим в различных звеньях обмена веществ.

Следовательно, при обеспечении условий криозащиты изменяется химический состав микроокружения клеточной среды, а в случае применения эндоцеллюлярных криопротекторов — и внутриклеточных компонентов. Заметим, кстати, что изменение внутриклеточных соотношений и химического состава может сопутствовать и экзоцеллюлярным криопротекторам, будучи как бы вторичными и возникая при отсутствии прямого контакта с криозащитным веществом.

При сопоставлении состояния анабиоза в природе с низкотемпературным консервированием биологических объектов выделим некоторые общие черты и различия. Начнем с последних. Касаясь различий указанных процессов, следует отметить, что они наблюдаются в различных температурных границах. Так, в условиях Земли живые объекты не подвергаются воздействию таких низких температур, как температура сжиженных газов — азота, кислорода, гелия, которая применяется при низкотемпературном консервировании. В природе явления анабиоза можно наблюдать у особей, пребывающих на разных уровнях биологической организации. Различия будут касаться только глубины понижения жизнедеятельности, продолжительности, а также степени восстановления. В то время как в искусственных условиях глубокого холода удается сохранить жизнедеятельность изолированных клеток, образующих суспензии, и некоторых тканей (кожи, роговицы и других объектов). Вопросы низкотемпературного консервирования многих тканей, органов и организмов еще не нашли разрешения, однако есть основания предполагать, что предел возможностей еще не достигнут и совершенствование методов не ограничено [9]. В искусственных условиях глубокого холода достигается, как правило, значительно более глубокое снижение жизнедеятельности, сопровождаемое фазовым переходом. Заметим, что у биологических объектов, замороженных с криопротекторами доступными в настоящее время методами, не удается обнаружить признаков жизни, в то время как после оттаивания отмечается восстановление жизнедеятельности, что дает основание считать указанное состояние «обратимой остановкой жизни» [2, 6]. Причем указанная фаза может намного превышать продолжительность физиологической жизни.

Рассмотрим некоторые общие черты, свойственные состояниям скрытой жизни в природе и в искусственных условиях. В состоянии анабиоза обнаружены различные изменения в обмене веществ. Среди последних особое значение придается накоплению некоторых соединений — глицерина, углеводов [1]. Защитное действие указанных веществ в морозостойкости растений показано еще Н. А. Максимовым [3] и подтвердилось в более поздних работах [4]. Повышение морозостойкости может достигаться при внесении указанных соединений в среду, в которой содержится целое растение либо его ткани. В обстоятельных исследованиях, посвященных изучению холодоустойчивости насекомых, показано накопление в их теле также углеводов и глицерина, содержание которого может достигать 15% [2, 5].

Однако инъекции раствора глицерина в организм насекомого не всегда сопровождаются повышением холодоустойчивости, что предполагает сложные пути реализации защиты от холода.

У некоторых видов рыб, живущих в антарктических морях и адаптированных к холоду, отмечено понижение температуры замерзания сыворотки крови. Де Ври [7, 8] установил, что субстанцией, понижающей температуру замерзания сыворотки, является гликопротеин, содержащий две аминокислоты — аланин и треонин. В последующем установлено, что гликопротеины, обеспечивающие криозащиту, оригинальны по структуре и функции и отличны от всех прежде описанных.

Криозащитные гликопротеины — понятие сборное, объединяющее не менее восьми гликопротеинов. Они различаются по электрофоретической подвижности. Из известных восьми соединений только первые пять обладают криозащитной активностью. Изучались пути синтеза данных соединений, их структурные особенности и пути реализации специфической активности. Последняя проявляется в снижении температуры замерзания воды [10]. Также установлено влияние антифризов — гликопротеинов на образование льда и его структуру при понижении температуры водно-солевых смесей. Таким образом, наряду с изученными криопротекторами, получившими применение в криозащите биологических объектов при низкотемпературном консервировании, стали известны химические соединения биологического происхождения, участвующие в реализации холодового анабиоза в природе, получившие общее название «биологических антифризов». Все известные криозащитные вещества по их принадлежности можно разделить на три группы: 1) криопротекторы — синтетические полимерные соединения, чуждые организмам, получившие применение в низкотемпературном консервировании (поливинилпирролидон, декстран, полиэтиленоксид и др.); 2) соединения, встречающиеся в природе у морозоустойчивых видов и используемые в искусственных условиях хранения в замороженном состоянии. К таким веществам относятся глицерин, углеводы — сахароза, глюкоза и др.; 3) к третьей группе криозащитных веществ можно отнести биологические антифризы — гликопротеины, представляющие собой биополимеры, имеющие в молекуле полярный кислород, способный взаимодействовать водородными связями. Следовательно, известные синтетические полимеры, обладающие высокой криозащитной активностью, с определенной степенью допуска могут служить аналогами биологических антифризов, сближающих различные виды анабиоза, развивающихся при понижении температуры среды как в естественных, так и в искусственных условиях, а также механизмы, с помощью которых реализуются описываемые явления.

ЛИТЕРАТУРА

1. Асахина Е. И. Принципы механизма морозоустойчивости у растительных и животных клеток. — В кн.: Клетка и температура среды. М.—Л., 1968, с. 16—19.
2. Лозина-Лозинский Л. К. Очерки по криобиологии. Л., «Наука», 1972. 268 с.
3. Максимов Н. А. О вымерзании и холодоустойчивости растений. СПб., 1913. 330 с.
4. Самыгин Г. А. Причины вымерзания растений. М., «Наука», 1974. 136 с.
5. Ушатинская Р. С. Основы холодостойкости насекомых. М., Изд-во АН СССР, 1957. 184 с.
6. Шмидт П. Ю. Анабиоз. М.—Л., Изд-во АН СССР, 1955. 430 с.
7. De Vries A. L., Komatsu S. K., Feeney R. E. Chemical and physical properties of freezing point depressing glycoproteins from antarctic fishes. — J. Biol. Chem., 1970, 245, p. 2901—2908.
8. De Vries A. L., Woheschlag D. E. Freezing resistance in some antarctic fishes. — Science, 1969, 163, p. 469—471.
9. Smith A. Twenty five years of research in low temperature biology. — Koeltechnik, 1974, 67, N 7, p. 91—100.
10. Teeney R. E. A biological antifreeze. — J. Amer. Sci., 1974, 62, N 6, p. 612—625.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
12. XII. 1975 г.

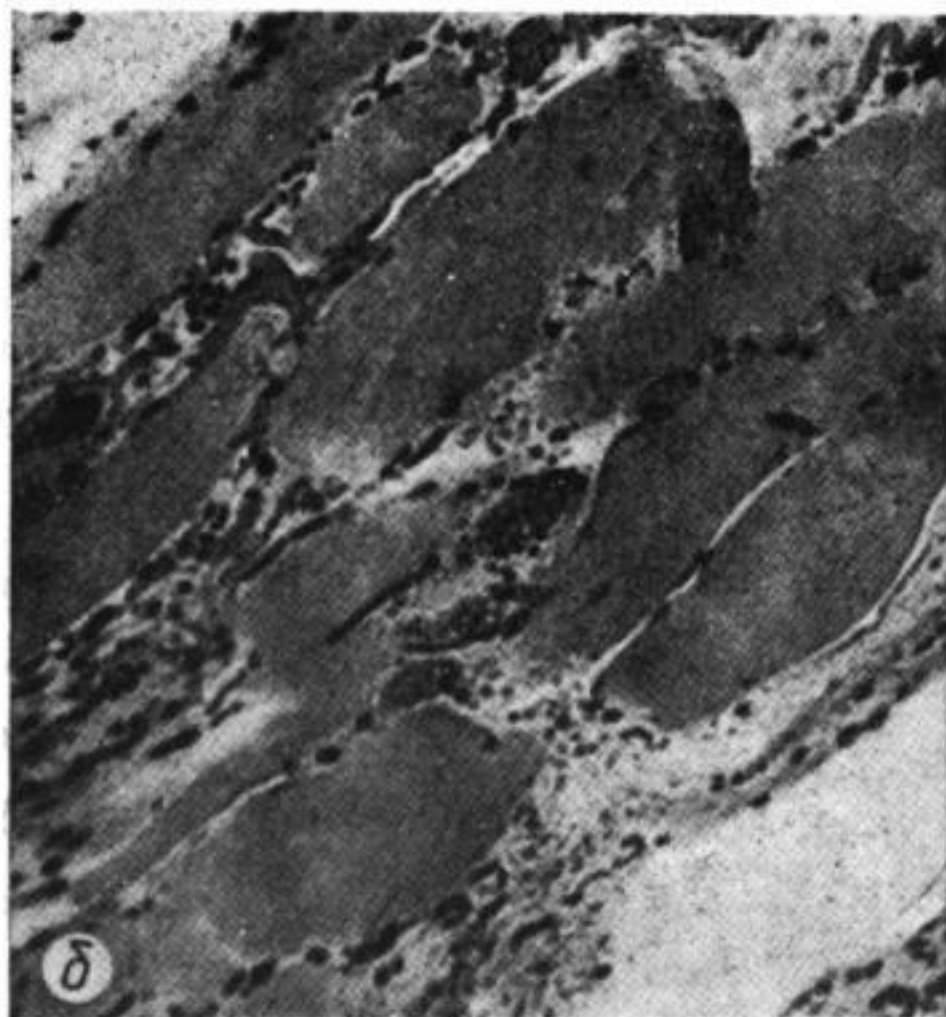
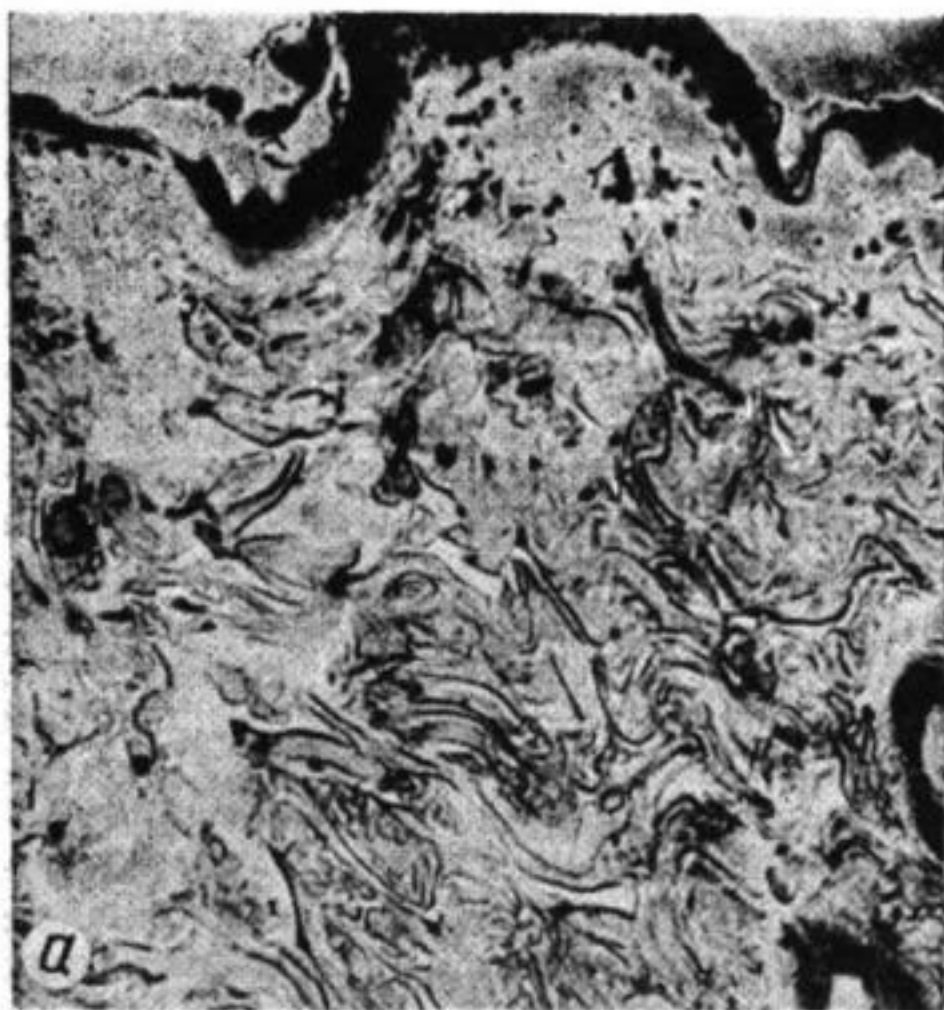
Summary

Some data are compared on the states of a temporary decrease of biological objects viability in nature under the effect of cold as well as under conditions of low temperature conservation. The role of biological antifreezes and cryoprotectors in the mentioned processes is elucidated.

УДК 57:536.48.047:615.832.97

Ю. И. Исаев, Е. Я. Панков, Б. П. Сандомирский

ДИНАМИКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО КРИОНЕКРОЗА КОЖИ



Морфологические перестройки в коже под влиянием значительного повышения температуры изучены достаточно полно применительно к термическим ожогам [1—3,5]. Изменения в структуре кожи при охлаждениях описаны преимущественно после отморожений [4], что не является адекватным быстрому охлаждению при действии азотных температур.

Прогресс криохирургии, использование холода в лечении заболеваний кожи требуют расшифровки состояния «крионекроз». Цель настоящей работы — изучение морфологических изменений в коже экспериментальных животных после воздействия низких температур. Охлаждение производилось орошением парами и брызгами жидкого азота аппаратом АСК-6 в течение 30 с. Гистологические препараты изучались через 1 и 3 ч; 1, 2, 7, 14 и 28 суток после криовоздействия. Иссеченные на всю толщину участки кожи фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине, обезвоживали в

Рис. 1. Препарат кожи через 3 ч после криовоздействия:

а — сохранность 1—2 слоев клеток эпидермиса. Пикноз ядер клеток сетчатого слоя кожи; *б* — фрагментация мышечных волокон с тромбами в заполненных кровью сосудах. Гематоксилин-эозин; $\times 90$.

спиртах и заключали в целлоидин. Целлоидиновые срезы окрашивались гематоксилин-эозином и по Ван-Гизону.

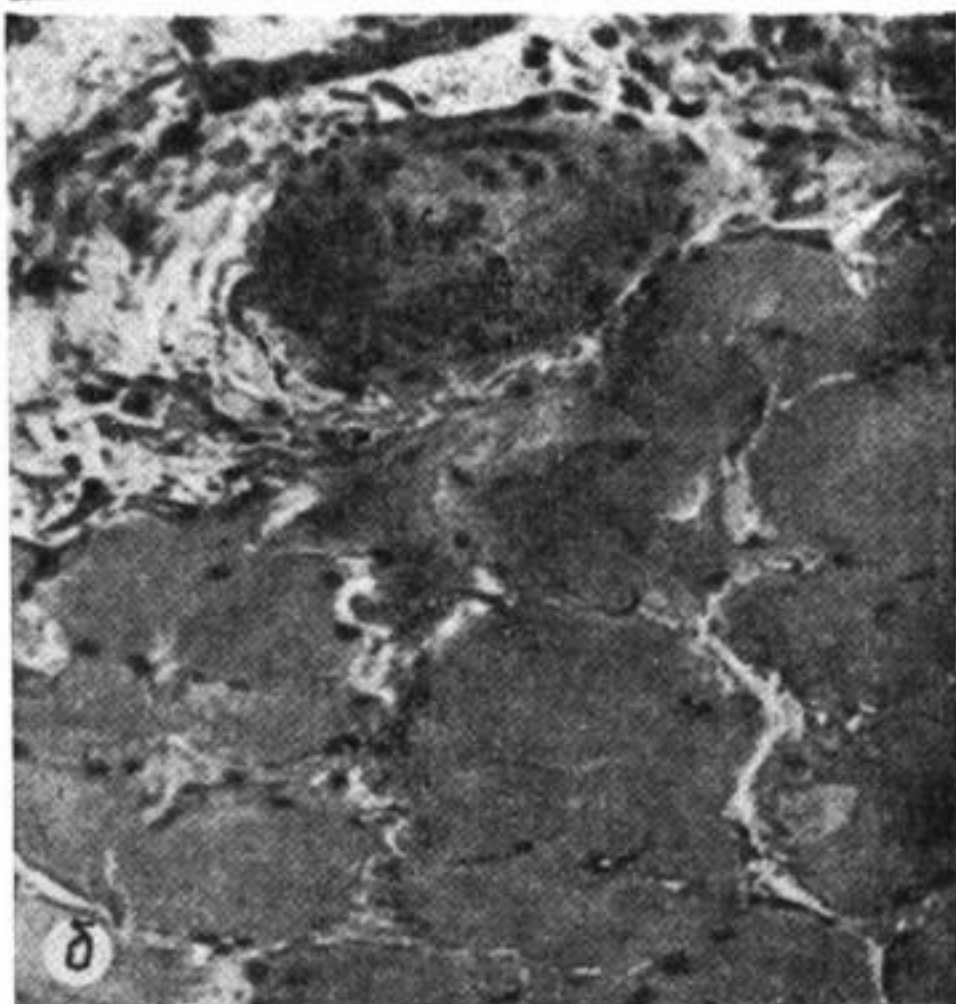
Микроскопически через 1 ч после криовоздействия наблюдаются участки кожи с сохраненным эпидермисом, клетки которого окрашиваются несколько менее интенсивно и более диффузно. Сосочковый и сетчатый слои кожи без патологических изменений. На границе сетчатого слоя и подкожной мышцы расширенные и заполненные кровью сосуды. Мышечные пучки увеличены в диаметре, с участками разрывов, поперечными расслоениями саркоплазмы. На поперечных срезах мышечных пучков определяется преимущественное отсутствие миофибрилл в центре мышечного волокна.

При исследовании участков кожи через 3 ч обнаруживается отторжение поверхностных слоев эпидермиса, который сохраняется в виде 2—3 слоев клеток. Эти эпидермальные клетки с диффузным прокрашиванием, гипохроматией ядер. Эпителиальные клетки стенок волосяных фолликулов имеют такого же характера изменения в верхних участках. Клеточные элементы сосочкового и сетчатого слоев характеризуются уменьшением размеров, пикнотическими ядрами. Волокнистые структуры имеют неизменный вид. Кровеносные сосуды глубоких слоев дермы расширены, заполнены кровью. В просвете большинства сосудов — морфологически сохраненные эритроциты, и только в просвете крупных сосудов обнаруживаются тромбы. Мышечные волокна почти на всем протяжении зоны криовоздействия резко изменены: диаметр их неравномерный, преимущественно увеличенный, саркоплазма с поперечными разрывами. Многие волокна из-за разрывов и распада миофибрилл выражено обесцвечены. Ядра мышечных волокон пикнотичны, гиперхромны (рис. 1, а, б).

При исследовании участков кожи через 1 сутки после криовоздействия обнаруживается сохранившийся эпидермис в виде 1—2 слоев клеток с четко окрашенным ядром и умеренно базофиль-

Рис. 2. Препарат кожи через 7 суток после криовоздействия:

а — восстановление эпидермального слоя до 3—4 слоев клеток. Частичный пикноз клеток сетчатого слоя; б — неравномерная структура мышечных волокон. Мононуклеары и макрофаги в рыхлой клетчатке. Гематоксилин-эозин; $\times 90$.



ной тонкодисперсной цитоплазмой. В сосочковом и сетчатом слоях среди пучков коллагеновых волокон редко расположенные клеточные элементы с пикнотичными и гиперхромными ядрами. Эпителиальные клетки стенок волосяных фолликулов в поверхностных слоях с диффузным и слабым окрашиванием цитоплазмы и ядра, в глубоких слоях — с гиперхромными ядрами. Кровеносные сосуды на границе с мышцей кожи расширены, заполнены эритроцитами. Мышца кожи с большим количеством измененных волокон: утолщенные и обесцвеченные волокна с фрагментированными участками миофибрилл. Ядра мышечных волокон пикнотичны. Среди рыхлой клетчатки обнаруживаются мононуклеары и макрофаги в умеренном количестве.

На 2, 7, и 14-е сутки определяется постепенное утолщение эпидермиса с дифференциацией на слои. Значительно утолщаются стенки волосяных фолликулов, особенно в участках, расположенных в глубине сетчатого слоя. Сосочковый и сетчатый слои кожи с хорошо выраженной волокнистой структурой. Между пучками коллагеновых волокон наряду с клетками с умеренно пикнотизированными ядрами встречаются клетки с крупными ядрами и мелкодисперсным хроматином. Сосуды содержат морфологически неизмененные эритроциты.

Рыхлая соединительная ткань, окружающая мышцу кожи, богата фибробластами и макрофагами, которые частично прорастают между пучками мышечных волокон. Мышечные волокна истончены, содержат значительное количество ядер под сарколеммой (рис. 2, а, б).

Таким образом, проведенное исследование показало, что использование воздействия низкой температуры вызывает дистрофические и некротические изменения в коже, которые характеризуются гибелью и отторжением почти всех слоев эпидермиса, гибелью и отторжением клеток поверхностных слоев волосяных фолликулов, гибелью части клеточных элементов сосочкового и сетчатого слоев кожи, а также мышечных волокон собственной мышцы кожи. Вместе с тем эпидермис сохраняется в виде 1—2 слоев клеток, волокнистые структуры сетчатого и сосочкового слоев остаются без видимых изменений.

На протяжении сроков наблюдения после примененного криовоздействия обнаруживается постепенное восстановление структуры эпидермиса, волосяных фолликулов без выраженной демаркации некробиотически измененных участков, а также без выраженной инфильтрации этих участков мононуклеарами и макрофагами.

Полученные данные позволяют предположить, что вызываемые быстрым охлаждением изменения в коже не сопровождаются качественным изменением белковых молекул. Обнаруживаемые изменения укладываются в картину неспецифического асептического воспаления с диффузным восстановлением всех структур кожи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арьев Т. Я. Термические поражения. Л., «Медицина», 1966. 700 с.
2. Берлин Л. Б. Изменения кожи после термических ожогов. Обзор литературы. — Ортопедия, травматология и протезирование, 1965, № 2, с. 75—82.
3. Пинчук В. М. Морфологические изменения в коже и внутренних органах у погибших в различные периоды ожоговой болезни. — В кн.: Ожоги (Труды ВМА. Т. 114). Л., 1960, с. 20—23.
4. Сердечная А. Г. Динамика патоморфологических изменений в органах и тканях при локальной холодовой травме у белых крыс. — В кн.: Вопросы краевой патологии. Архангельск, 1972, с. 231—232.
5. Allison F. J., Smith M. R., Wood W. B. Studies on the pathogenesis of acute inflammation. 1. The inflammatory reaction to thermal injury as observed in the rabbit ear chamber. — J. Experim. Med., 1955, 102, p. 655—667.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
12. XII 1975 г.

DYNAMICS OF EXPERIMENTAL SKIN CRYONECROSIS

Summary

Morphological changes occurring in the skin of experimental animals are studied at different times after a short-time action of low temperature. Cryoeffect evokes dystrophic and necrobiotic changes in all skin layers which are not accompanied by complete destruction. The processes place during the skin cryonecrosis represent unspecific, aseptic inflammation occurring without demarcation and pronounced infiltration of necrobiotically changed sites with a further diffusive recovery of all skin structures.

УДК 57:536.48.047:576.72:611:615.015

В. Ф. Козлова, М. Г. Шенберг, Е. Я. Панков, Н. П. Суббота

ДЕЙСТВИЕ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР НА СТРУКТУРНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ ПОЧКИ

В настоящее время нет сообщений об успешном криоконсервировании жизненно важных органов, в том числе почек, хотя актуальность этой проблемы несомненна. Подходы к ее решению требуют изучения многих вопросов: изыскания эффективных сред и криопротекторов, отработки режимов перфузии, скоростей замораживания—размораживания, температуры хранения, критериев жизнеспособности тканей почки и др. [2, 4, 6].

Еще не дана биологическая характеристика органов, поврежденных при замораживании. Одна из главных задач поэтому — изучение влияния низких температур на клеточные системы [8]. Определение криолабильных и криостабильных структур почки, а также установление степени обратимости клеточных изменений при воздействии низкотемпературного фактора имеют немаловажное значение.

В настоящем сообщении представлены данные о морфологической оценке действия замораживания—размораживания на структурные элементы целой почки и ее срезов. Материалом для исследования послужили 16 целых почек и срезы коркового вещества 14 почек животных (свиней, кроликов, крыс), подвергнутые замораживанию—размораживанию: медленное замораживание (1° в 1 мин) до -5° ; -20° ; -50° для целого органа; быстрое одноэтапное ($300-400^\circ$ в 1 мин) — до -196° для срезов почки; размораживание — в водяной бане при $37-39^\circ\text{C}$. Предварительно почки подвергали в течение 30 мин пульсирующей гипотермической ($+4^\circ$) перфузии 20%-ным раствором полиэтиленоксида молекулярного веса 400 (ПЭО-400) на среде Хенкса при давлении перфузата 40 мм рт. ст. Срезы коры почек толщиной 0,3—0,5 мм и весом 150—160 мг инкубировали 15—30 мин в 10%-ных растворах криопротекторов (глицерина, диметилсульфоксида, полиэтиленоксида молекулярного веса 100) и без них, приготовленных на растворе Штенгольда и фосфатном растворе Кребса—Рингера, рН 7,4. Отмывание срезов от криопротекторов после размораживания проводили в 0,25 М сахарозе. Для каждой серии опытов ставился свой контроль.

Методы исследования: гистологические (окраска целлоидин-парафиновых срезов гематоксилин-эозином по Ван-Гизону) и гистохимические (альциан+PAS-реакция по Моури на выявление полисахаридных комплексов; суправитальное окрашивание митохондрий клеток коры почек солевым раствором януса зеленого В, а также окраска митохондрий фиксированных срезов фосфорновольфрамовым гематоксилином по Гейденгайну).

Проведенное исследование показало, что примененные методы замораживания — размораживания целой почки независимо от вида животных и ее срезов, инкубированных в средах Штенгольда и Кребса—Рингера без криопротекторов, ведут к развитию тяжелых деструктивных изменений паренхимы — от различных видов дистрофий до паранекроза и некроза, сопровождающихся комплексом патологических изменений митохондрий — от набухания до лизиса, а также к образованию разной величины полостей, расслоений, разрывов и отека стромы. Наиболее чувствительным структурным элементом почки к действию низких температур является эпителий проксимальных и дистальных извитых канальцев, содержащий в контрольных незамороженных срезах большое количество мелких митохондрий, компактно расположенных в базальной части и более свободно — в апикальной части клеток. После замораживания—размораживания в эпителии отмечаются набухание, конгломерация и лизис митохондрий, вакуолизация цитоплазмы, появление в ней оптически более и менее плотных полей, декомпозиция гликопротеидных комплексов, накопление нейтральных полисахаридов в апикальных полюсах клеток, пикноз ядер. Многие извитые канальцы приобретают звездчатые просветы. В других канальцах просветы почти не просматриваются в связи с отеком клеток, заполнением их десквамированным эпителием или гомогенной бесструктурной массой белка. Местами в клетках отмечаются паранекротические изменения, коагуляция цитоплазмы, кое-где коагуляционный некроз. В меньшей степени изменена эпителиальная выстилка прямых канальцев и собирательных трубок — она или умеренно дегидратирована, уплотнена, или отекает. Отмечается незначительное набухание клеток юктагломерулярного комплекса.

Довольно устойчивыми к холоду являются сосудистые клубочки, базальные мембраны, стромальные элементы, содержащие значительное количество полисахаридных соединений. Сосудистые клубочки сохраняют свою гистоархитектонику, однако отмечается компактизация, сжатие одних клубочков и набухание других, сопровождающиеся укрупнением и конгломерацией митохондрий, уменьшением количества кислых и нейтральных мукополисахаридов в мезангиуме. Соединительнотканная основа почки тинкториально активна, но местами наблюдаются отеки, расслоения, разрывы и образование полостей, особенно в мозговом веществе. Стенки кровеносных сосудов без особых изменений, за исключением интимы, где эндотелий разрыхлен, отекает, местами разрушен. Некоторые артерии и вены почти лишены эндотелия, их медиа и адвентиция разрыхлены. Разрыхление стенок крупных кровеносных сосудов и деструкция их эндотелия отмечаются также в перфузированных почках, не подвергнутых низкотемпературному воздействию, в связи с чем их можно считать результатом сочетанного воздействия нескольких факторов.

Развитие патологических процессов в почках находится в прямой зависимости от температуры их замораживания. Отмечено, что наименее изменена структура почек, подвергнутых замораживанию до -5° . По морфологическим показателям эти изменения носят, по-видимому, обратимый характер.

Микроскопическое исследование срезов коры почек, подвергнутых замораживанию—размораживанию под защитой изучаемых растворов криопротекторов, показало, что 10%-ные растворы глицерина и диметилсульфоксида препятствуют развитию в ткани почки необратимых изменений, в то время как около 30% канальцев срезов почек, инкубированных в средах с 10%-ным раствором полиэтиленоксида молекулярного веса 100, находится в состоянии некроза. В большинстве эпителиальных клеток извитых канальцев срезов почки этой группы отмечаются набухание, конгломерация и лизис митохондрий, коррелирующие с

развитием дистрофических, паранекротических и некротических процессов. Наиболее оптимальными инкубационными средами (из исследуемых) при примененных методах замораживания—размораживания срезов коры почек явились 10%-ные растворы глицерина и диметилсульфоксида на среде Штенгольда, поскольку они обеспечили наилучшую морфофункциональную сохранность паренхимы почки.

В результате проведенного исследования установлено, что структурные элементы почки по-разному переносят действие замораживания—размораживания. Наиболее чувствительны к действию низкотемпературного фактора те звенья нефронов (эпителий извитых канальцев), которые обладают напряженным метаболизмом и большими затратами энергии, аккумулированной в митохондриях. Полученные данные согласуются с современными представлениями о криочувствительности мембранных структур, в частности митохондрий [1, 5]. Относительно устойчивыми к действию холода являются структуры (соединительнотканная основа, базальные мембраны, сосудистые клубочки), содержащие большое количество полисахаридных соединений. Между тем сахара, как известно, являются неотъемлемой частью природных криопротекторов [3, 6]. Криостабильность межклеточного вещества представляет интерес в связи с важной ролью его в регуляции клеточного метаболизма [7].

Следует также отметить, что при одинаковых режимах замораживания—размораживания идентичные участки нефронов в пределах одного органа реагируют неоднозначно. Это можно объяснить, по-видимому, тем, что они находятся в различных фазах функционального цикла.

Таким образом, различие условий проведения экспериментов на целой почке и ее срезах позволило выявить одни и те же наиболее криочувствительные и криостабильные структуры органа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белоус А. М., Луговой В. И., Гулевский А. К. Актуальные проблемы современной криобиохимии. — Криобиология и криомедицина, 1975, вып. 1, с. 8—15.
2. Лопухин Ю. М., Коган Э. М. Критерии жизнеспособности органов и тканей перед трансплантацией. М., «Медицина», 1975. 280 с.
3. Самыгин Г. А. Причины вымерзания растений. М., «Наука», 1974. 192 с.
4. Феоктистов П. Л., Блюмкин В. Н., Лохов Х. А. и др. Исследования по консервации почек при отрицательных температурах. — Трансплантация органов и тканей. Материалы VI Всесоюз. науч. конф. по пересадке органов и тканей. Рига, 1972, с. 464—465.
5. Mazur P. The Frozen Cell. A Ciba Foundation Symposium. Ed. by G. E. W. Wolstenhome Malve O'Connor. London, 1970, p. 1—5.
6. Meryman H. T. Cryobiology. Ed. by H. T. Meryman. L.—N. Y., Acad. Press, 1966. 775 p.
7. Поликар А. Поверхность клетки и ее микросреда. М., «Мир», 1975. 108 с.
8. Рапопорт Ф., Доссе Ж. Пересадка органов и тканей у человека. М., «Медицина», 1973. 527 с.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
12. XII 1975 г.

V. Ph. Kozlova, M. G. Shenberg, E. Ja. Pankov, N. P. Subbota

EFFECT OF LOW TEMPERATURES ON THE KIDNEY STRUCTURAL ELEMENTS

Summary

The data are presented on a morphological estimation of the effect of low temperature and cryoprotectors on the whole kidney and its cortical substance slices. Under different conditions of the effect the most cryolabile and cryostable structural elements of the kidney tissue are detected.

*О. П. Маркова, Э. И. Обозная,
Г. А. Бабийчук, В. С. Прошкин*

МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ И ЦИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СТЕРНАЛЬНЫХ ПУНКТАТОВ БОЛЬНЫХ С ГИПОПЛАЗИЕЙ ГЕМОПОЭЗА ДО И ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОГО (-196°) КОСТНОГО МОЗГА

Работа посвящена морфологическому и цитохимическому исследованиям стернальных пунктатов костного мозга 11 больных раком молочной железы II—III степени, у которых в процессе химио- и лучевой терапии нарушался гемопоэз. Работа выполнена на базе Харьковского областного онкологического диспансера.

В процессе лечения наряду с гемостимулирующей терапией больным трансплантировали аллогенный костный мозг, предварительно подвергнутый криоконсервированию (-196°C) под защитой полиэтиленоксида молекулярного веса 400. Реконсервированный костный мозг в объеме, предназначенном для трансплантации, содержал $0,6\text{--}3,6 \cdot 10^9$ миелокариоцитов. Жизнеспособность клеток по данным эозиновой пробы составляла в среднем 69%.

Для характеристики гемопоэтической функции костного мозга больных в период выраженной гипоплазии кроветворения, констатируемой по данным периферической крови, а также состояния гемопоэза после трансплантации аллогенного костного мозга, проводили исследования стернальных пунктатов, полученных у больных пункционной иглой И. А. Кассирского.

При исследовании стернальных пунктатов костного мозга больных меланжерно-камерным способом подсчитывали общее количество клеток в 1 мм^3 , изучали миелограмму в мазках, окрашенных по Паппенгейму, и учитывали качественное состояние миелокариоцитов. Для оценки гемопоэза в целом, его направленности в сторону лейко- или эритропоэза определяли лейкоэритробластическое соотношение, а также подсчитывали костномозговой индекс созревания нейтрофилов и эритробластов. Параллельно с морфологическими исследованиями клеточного состава проводили оценку функциональной активности клеток костного мозга с помощью цитохимического определения содержания фосфолипидов. Для количественной оценки содержания фосфолипидов подсчитывали средний гистохимический коэффициент в основных группах клеток (бластных, миелоцитов, зрелых гранулоцитов).

Как показали исследования стернальных пунктатов больных, в процессе химио- и лучевой терапии при наличии в периферической крови признаков гипоплазии гемопоэза количество миелокариоцитов было несколько снижено и составляло 34,3 тыс. в 1 мм^3 . При изучении миелограмм установлено, что соотношение лейко-эритробластических элементов соответствует нормальным показателям (3:1), однако костномозговые индексы созревания нейтрофилов (0,4) и эритробластов (0,3) указывают на замедленную регенерацию клеток соответствующего ряда. В цитоплазме некоторых нейтрофильных гранулоцитов отмечались вакуолизация и токсогенная зернистость, у некоторых лимфоцитов появлялась плазматизация цитоплазмы. Обнаруженные качественные изменения миелокариоцитов могут свидетельствовать об интоксикации организма больных, явившейся следствием как основного заболевания, так и цитостатического эффекта химио- и лучевой терапии.

При цитохимическом определении фосфолипидов обнаружено значительное снижение их содержания во всех группах клеток в среднем

на 66% по сравнению с нормой, что свидетельствует о нарушении обменных процессов в клетках костного мозга больных.

Повторные взятия стернальных пунктатов проводились на 21-е сутки после трансплантации больным аллогенного криоконсервированного костного мозга. В этот период обнаружены также изменения количественного и качественного составов костного мозга больных. Так, число миелокариоцитов увеличилось до 51,4 тыс. в 1 мм³. Анализ миелограмм показал преимущественное увеличение элементов лейкопоза (лейко-эритробластическое соотношение 5,5:1) и нормализацию созревания нейтрофилов (индекс созревания нейтрофилов соответствует 0,6).

Цитохимически установлено значительное увеличение содержания фосфолипидов в среднем на 64% по сравнению с их содержанием в клетках костного мозга в период выраженной гипоплазии гемопоэза.

Улучшение функции костномозгового кроветворения отразилось на составе периферической крови больных: отмечалось увеличение общего количества лейкоцитов и тромбоцитов уже на 3-и сутки, а к 21-м суткам их количество было $4,1 \pm 2,3$ тыс.; $126 \pm 18,9$ тыс. в 1 мм³ ($1,4 \pm 0,3$; $95 \pm 50,7$ соответственно до трансплантации костного мозга).

Таким образом, морфологические и цитохимические исследования стернальных пунктатов больных с гипоплазией гемопоэза, развившейся в результате химио- и лучевой терапии, показали, что трансплантация криоконсервированного аллогенного костного мозга способствует восстановлению костномозгового кроветворения и функционального состояния миелокариоцитов.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
12. XII 1975 г.

O. P. Markova, E. I. Oboznaja, G. A. Babijchuk, V. S. Proshkin

MORPHOLOGICAL AND CYTOCHEMICAL STUDIES IN STERNAL
PUNCTATES OF PATIENTS WITH HEMOPOIESIS HYPOPLASIA BEFORE
AND AFTER CRYOCONSERVED (-196°C)
BONE MARROW TRANSPLANTATION

Summary

Morphological and cytochemical examinations are analyzed for the bone marrow sternal punctates from patients with mammary gland cancer of the II—III stage in whom hemopoiesis disturbances were observed in the process of chemo- and radiotherapy. In the process of treatment, side by side with hemostimulating therapy, the allogenic bone marrow was transplanted to the patients; the bone marrow was preliminarily conserved (-196°) under protection of polyethylenoxide with a molecular weight of 400. Examinations based on the data of myelograms and phospholipid content showed that transplantation of the allogenic bone marrow promotes the regeneration of bone marrow hemopoiesis and functional state of myelocaryocytes.

УДК 57:536.48.047

С. А. Вальтер

УЛЬТРАСТРУКТУРА КЛЕТОК ГЛАДКОЙ МЫШЦЫ
ПРИ ЗАМОРАЖИВАНИИ ДО ТЕМПЕРАТУРЫ -30°C

Наличие внутриклеточного льда и высокая концентрация электролитов считаются основными причинами повреждения животных клеток при замораживании [5, 8]. Однако для того чтобы проанализировать, каким образом возникает повреждение и как оно развивается, прежде

всего необходимо знать, не происходит ли внутриклеточное замораживание при какой-то определенной процедуре охлаждения.

Ранее было показано, что при контролируемом охлаждении продольного мышечного слоя слепой кишки морской свинки в диапазоне температур от 0 до -79°C без криозащитного агента наблюдается постепенное снижение последующего функционального восстановления мышц, замороженных до температуры -30° [17]. В мышцах, охлажденных до температуры -30° , наблюдаются значительные структурные повреждения. Поэтому в данных экспериментах важно было определить, во-первых, можно ли наблюдаемое после размораживания повреждение связать с наличием образований кристаллов льда при замораживании мышечных клеток и, во-вторых, является ли замораживание единственной причиной структурного повреждения.

Исследовали ультраструктуру гладкомышечных клеток, замороженных до температуры -30° , после замещения в замороженном состоянии при температуре -30° [10]. Во избежание неверного истолкования возможных артефактов, связанных с кристаллами льда в мышцах, замещенных в замороженном состоянии, параллельно по той же методике были приготовлены незамороженные мышцы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Растворы. Этиленгликоль (70% объем/объем, Бритиш Драг Хаусиз, Англия) готовили на растворе Кребса, содержащем нормальные солевой и неэлектролитный компоненты [4], с добавлением 2% объем/объем глютаральдегида и без него (TAAB Ltd, Англия).

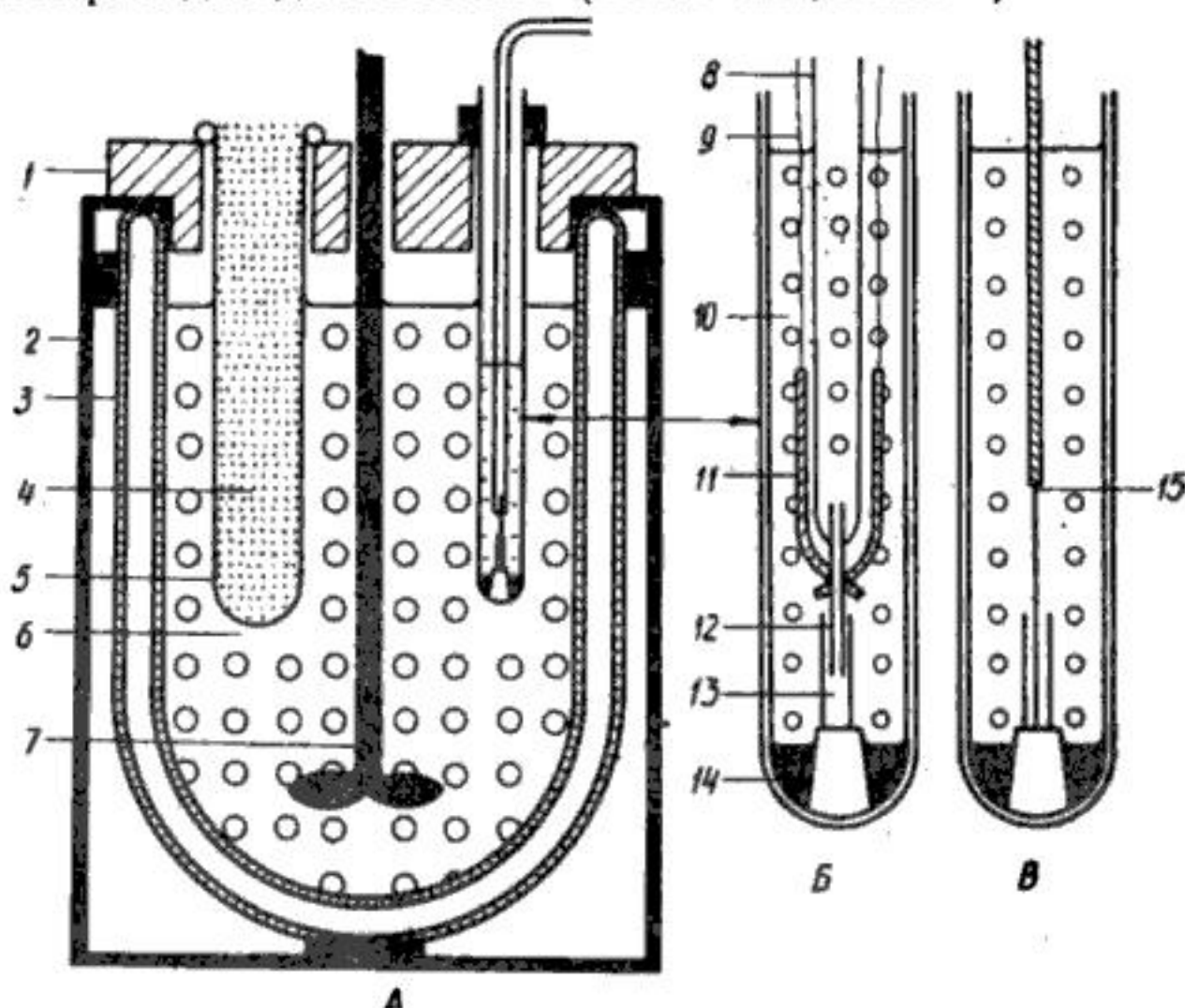


Рис. 1. Схема установки, используемой для охлаждения сегментов гладкой мышцы до -30° .

А: Вертикальный разрез через сосуд Дьюара: 1 — круглый с фланцами деревянный блок, служащий в качестве крышки; 2 — медная обшивка сосуда Дьюара; 3 — двухлитровый сосуд Дьюара; 4 — порошок твердой двуокиси углерода в охлаждающей трубке (5); 6 — 70%-ный этиленгликоль на растворе Кребса; 7 — мешалка. Б: 8 — устройство с мышцами, прикрепленными к платиновому стержню; 9 — териленовая нить, привязанная к свободным концам мышц и закрепленная таким образом, чтобы поддерживать мышцы по длине в состоянии покоя; 10 — 5 мл раствора Кребса; 11 — 2-сантиметровые сегменты мышцы ленты ободочной кишки; 12 — платиновый стержень, введенный в перевернутую иглу для подкожных инъекций 13, чтобы держать мышцы в центре; 14 — крепление перевернутой иглы для подкожных инъекций с помощью зубного воска в центре пробирки. В: 15 — медь-константановая термопара, расположенная по осевой линии таким образом, что ее конец находится в той же средней точке (пункт 13), что и мышцы.

Сегменты мышцы *taenia coli* из слепой кишки морской свинки поместили, как показано на рис. 1 [11], и охладили со средней скоростью 1° в 1 мин до температуры -30° в приборе, схематически изображенном на рис. 2.

2. Охлаждающая баня содержала 70%-ный этиленгликоль на растворе Кребса, который служил также жидкостью для замещения в замороженном состоянии.

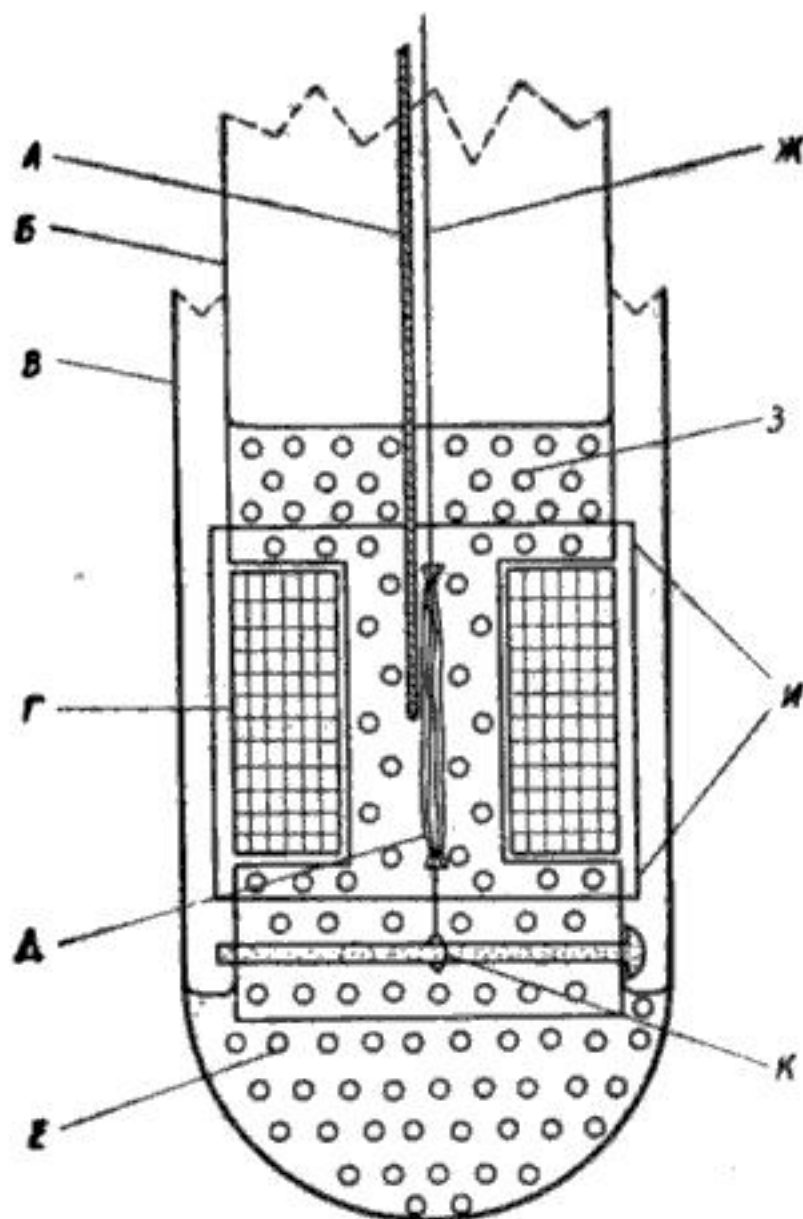


Рис. 2. Схема установки, применяемой для замещения в замороженном состоянии образцов мышц, охлажденных до -30° .

А — медь-константановая термopара; Б — прозрачная пластмассовая трубка с внутренним диаметром 1 см; В — пробирка $1,5 \times 15$ см; Г — съемные окошки, вмонтированные в пластмассовую трубку. Эти окошки открывали доступ замещающей жидкости ко всей поверхности мышц, значительно снижая тем самым время, необходимое для завершения замещения; Д — сегмент мышцы ленты ободочной кишки; Е — раствор Кребса; Ж — терилановая нить, прикрепленная к мышце для удержания ее по длине в состоянии покоя *in vivo*; З — раствор Кребса; И — «селлотейп», временно закрывающий пластмассовые окошки (ленточный затвор); К — удерживающая шпилька, к которой прикреплена мышца для удержания ее в центральном положении. Пробирку вместе с внутренней пластмассовой трубкой помещали в охлаждающую установку, изображенную на рис. 1, и охлаждали до -30° .

Пробирку вместе с внутренней пластмассовой трубкой помещали в охлаждающую установку, изображенную на рис. 1, и охлаждали до -30° .

3. Процедура замещения в замороженном состоянии. Когда температура мышцы достигала -30°C , мешалку охлаждающей бани выключали, внутреннюю трубку с мышцей отделяли от пробирки, погружали в раствор, содержащийся в бане, и закрепляли в погруженном состоянии, чтобы замороженная мышца находилась ниже поверхности среды перед включением мешалки. Водоворотное движение замещающей жидкости вызывало смещение ленточного затвора в съемных окошках и позволяло удалять окошки легким толчком предварительно охлажденного (-30°) металлического шпателя. За исключением небольшой пробки льда над и под мышцами, лед вокруг мышц замещался примерно через 20 мин, но мышцы оставляли в замещающей жидкости при -30° еще в течение 2 ч, после чего температуру бани повышали до 0° . Образцы мышц затем фиксировали в 70%-ном этиленгликоле на растворе Кребса с добавкой глютаральдегида при $+20^\circ$ в течение 60 мин.

4. Приготовление незамороженных мышц. Образцы мышц инкубировали в растворе Кребса при $+37^\circ\text{C}$ в течение 1 ч, а затем закрепляли по длине в состоянии покоя *in vivo* на пластмассовых подставках и зажимали таким образом, чтобы мышцы были полностью погружены в лабораторный стакан, содержащий 60 мл перемешиваемого раствора Кребса. Этиленгликоль (100%-ный) добавляли к раствору Кребса со скоростью 1 мл в 1 с в течение 3 мин до получения конечной 70% объем/объем концентрации гликоля [9]. После 10 мин выдержки в 70%-ном этиленгликоле мышцы перенесли на 1 ч в раствор этиленгликоля Кребса (глютаральдегида) перед обработкой для электронномикроскопического исследования.

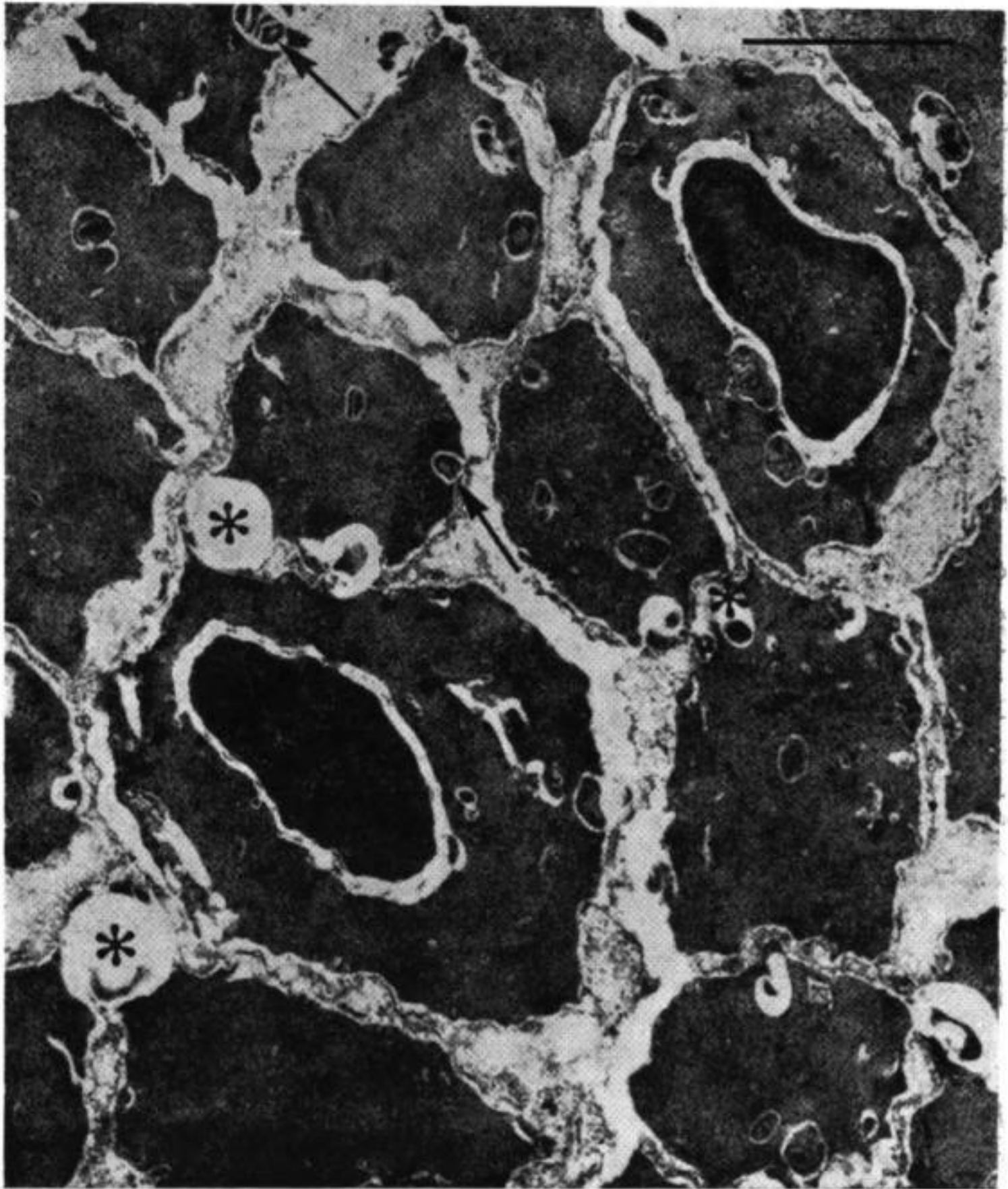


Рис. 3. Электронная микрофотография (малое увеличение) групп клеток гладкой мышцы в 70%-ном этиленгликоле в растворе Кребса.

Клетки сильно сморщены, сжаты. Отмечаются уплотнение ядерного хроматина по периферии ядра, расширение перинуклеарного пространства.

Большие полости наблюдаются как вне, так и внутри клеток (звездочки), их можно было бы ошибочно интерпретировать как полости, оставленные кристаллами льда, в тех случаях, когда использовали метод замещения в замороженном состоянии.

В относительно гомогенном цитоплазматическом матриксе встречаются многочисленные электронноплотные участки различного диаметра. Стрелками указаны две митохондрии. Масштабный отрезок 1 мкм.

5. Подготовка к электронномикроскопическому исследованию. После фиксации как замещенные в замороженном состоянии, так и незамороженные мышцы помещали на 15 мин в 100%-ный этиленгликоль с последующей 5 мин выдержкой в ацетоне. Затем мышцы разрезали на сегменты примерно в 1 мм, в течение 12 ч пропитывали смесью ацетона (1:1) с эпикотовой смолой (Epicote), после чего помещали в Эпикот 812 [7]. Срезы делали на ультратоме ZKB, последовательно окрашивали в уксуснокислом ураниле и лимоннокислом свинце [11] и исследовали с помощью электронного микроскопа Philips EM 300.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 3 представлена группа незамороженных мышечных клеток в поперечном сечении после такой же обработки, как в случае замещения в замороженном состоянии. Эти клетки имеют очень плотный и



Рис. 4. На электронной микрофотографии показаны группы поврежденных мышечных клеток в незамороженной, инертно обезвоженной гладкой мышечной ткани.

Отмеченная звездочкой клетка сравнивается с аналогичными на рис. 3. Эта клетка больше, чем неповрежденные, цитоплазматическая плотность ее снижена, видна отчетливая фибриллярная структура. Данная группа клеток повреждается, по-видимому, в течение подготовительных процедур, еще до инертного обезвоживания мышцы в этиленгликоле. Масштабный отрезок 1 мкм.

сжатый вид, их размер примерно на 50% меньше размера клеток мышечной ткани, обработанной обычным способом. Однако несмотря на сморщивание, вызванное обработкой, легко идентифицируются внутриклеточные органеллы, обычно наблюдаемые в клетках гладких мышц. У ядер типичный неправильный контур с заметной периферической агрегацией ядерного хроматина, наряду с отчетливым расширением околоядерного пространства. Характерно наличие продольно связанных мембран митохондрий в негативном контрасте и случайных пиноцитозных пузырьков, связанных с плазматической мембраной. Возможно, самой отчетливой и характерной морфологической чертой мышечных клеток, приготовленных методом инертного обезвоживания, является множество дискретных плотных образований различного диаметра (от 8 до 25 мкм) в относительно однородном цитоплазматическом матриксе. Однако миофибриллы актинового типа не сохранялись в таком же виде (если вообще сохранялись), как в мышечных клетках, фиксиро-

ванных без обезвоживания в фиксирующих растворах, содержащих либо осмий, либо глутаральдегид.

В ленте ободочной кишки мышечные клетки обычно отделены друг от друга внеклеточным пространством, но удерживаются, однако, вместе межклеточным веществом соединительной ткани, состоящим в основном из коллагена. Четко видно, что в данном материале расположение коллагена нарушено сжатием клеток при образовании льда, в результате чего во внеклеточном пространстве появляются просвечивающие участки, свободные от органелл. Наряду с явным очаговым отделением коллагена от наружной мембраны мышечных клеток, наблюдается много круглых пустых участков, тесно прилегающих к мышечным клеткам.

В зафиксированной обычным способом незамороженной мышечной ткани неизменно наблюдается небольшой процент (1—4) явно поврежденных клеток — с разрывом плазматических мембран и дезорганизацией миофибрилл. Такое повреждение объясняется травмой при отсечении продольного мышечного слоя от стенки слепой кишки.

На рис. 4 представлена группа инертно обезвоженных клеток с отличным от большинства наблюдаемых мышечных клеток структурным видом. Указанное различие, несомненно, относится к небольшой части поврежденных клеток. Поврежденные клетки значительно больше по размеру, и в них отсутствует плотное цитоплазматическое содержимое. Интересно, что цитоплазма имеет фибриллярный вид, наблюдающийся у необработанных клеток, в то время как митохондрии менее четко различимы.

На рис. 5 показан структурный вид группы мышечных клеток после замораживания до -30° и замещения в замороженном состоянии при этой температуре. Как и незамороженные, данные клетки сморщены и почти не отличаются от первых. В замороженных препаратах эффект искажения за счет сильного обезвоживания не так выражен. Кроме того, общая сохранность клеток и различных внутриклеточных органелл намного лучше, чем у инертно обезвоженных мышечных клеток. Единственным существенным морфологическим различием между двумя группами мышечных клеток является то, что в замороженном материале дискретные плотности менее значительны. Нет никаких явных доказательств ни структурного повреждения в фазе охлаждения, ни наличия кристаллов льда внутри замещенных в замороженном состоянии мышечных клеток.

ОБСУЖДЕНИЕ

При замораживании клеток млекопитающих кристаллы льда могут образовываться либо только во внеклеточном пространстве, либо еще дополнительно внутри клетки. Тремя основными факторами, обуславливающими образование льда вне или внутри охлажденных клеток, являются скорость охлаждения, размер клеток и их проницаемость для воды [8]. Обычно в ядерных клетках млекопитающих лед образуется вне клетки при медленных скоростях охлаждения (около $1-10^{\circ}$ в 1 мин) и имеет тенденцию к образованию внутри клетки при намного больших скоростях (около 1000° в 1 мин). Хотя такое заключение вполне применимо по отношению к суспензиям изолированных клеток, в плотных тканях это положение может не подтверждаться. Однако имеются некоторые доказательства того, что образование внутриклеточного льда происходит при замораживании единичных клеток и тканей при относительно медленных скоростях охлаждения [2, 3, 12, 13].

Общепринято также, что наличие внутриклеточного льда, образовавшегося при охлаждении до субнулевых температур, сопровождается последующей гибелью клеток, но вместе с тем имеется ряд примеров,



Рис. 5. Электронная микрофотография нескольких клеток мышц, замороженных до -30° с замещением при этой температуре.

Замороженные клетки сохранились лучше, чем незамороженные при аналогичной подготовке материала. Сморщивание менее выражено как в клетках, так и во внеклеточном пространстве. Отсутствуют структурные изменения, заставляющие предполагать повреждение клеток в процессе замораживания так же, как не видны полости, которые могли быть обусловлены кристаллами льда. Масштабный отрезок 1 мкм.

когда это не подтверждается [1, 14—16]. Еще одно предположение, высказанное Лавлоком [6], говорит о том, что если при образовании внутриклеточного льда впоследствии происходит гибель клеток, это может быть обусловлено некоторым другим фактором, имевшим место до образования кристаллов льда внутри клеток.

В предыдущей работе показано, что ткань гладкой мышцы из слепой кишки морской свинки после оттаивания при замораживании до -30° без криозащитного агента функционально мертва [17]. Продолжая анализ возможных причин повреждения замораживанием с использованием в качестве модели клетки гладкой мышцы, мы занялись вопросом: связано ли каким-либо образом повреждение, наблюдающееся в размороженной мышце, с образованием кристаллов внутриклеточного льда, имеющегося несмотря на медленную (1° в 1 мин) скорость охлаждения? Нас также интересовало, действительно ли структурное повреждение клеток при замораживании обусловлено лишь

только циклом замораживания—оттаивания. Для решения такого типа задач как нельзя больше подходит методика замещения в замороженном состоянии, но используемая при соблюдении определенных условий. С помощью обычного метода замещения в замороженном состоянии невозможно провести непосредственное сравнение между неза мороженным и замороженным материалами. Применение метода инертного обезвоживания, предложенного Пизом [9], делает возможным проведение такого сравнения. Как известно, метод обезвоживания—физическое средство стабилизации макромолекулярных систем. Единственным недостатком его является избыточное сморщивание в результате обезвоживания биологической ткани. Однако при медленном охлаждении клетки также подвергаются условиям чрезмерного обезвоживания, вызванного гипертоничностью электролитных компонентов консервирующей среды при отделении фазы льда и самим льдом. Это оказалось удачным в том смысле, что можно было более критично сравнить две различные группы мышц.

Настоящие результаты показали, что ультраструктурные изменения гладкомышечных клеток, приготовленных как методом инертного обезвоживания, так и замещением в замороженном состоянии, очень сходны. Уже отмечалось, что в инертно обезвоженных мышечных клетках наблюдались повреждающие участки во внеклеточном пространстве и случайная вакуолизация цитоплазмы. Идентичные просвечивающие участки и вакуолизация наблюдались, хотя и реже, в мышцах, замещенных в замороженном состоянии. Без инертного контрольного материала для сравнения эти участки в замещенных в замороженном состоянии мышцах можно было бы объяснить как полости, оставленные кристаллами льда. Из сказанного выше следует, что наблюдаемое после оттаивания структурное повреждение не связано с наличием внутриклеточного льда *per se*; нет также никаких доказательств того, что мышечные клетки структурно повреждались только в результате замораживания.

Таким образом, повреждение клеток гладкой мышцы обусловлено либо степенью обезвоживания, либо дополнительными стрессовыми явлениями, возникающими при отогреве.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hanna C., Sherman J. K. Survival of rabbit corneal cells after the formation and dissolution of intracellular ice. — *Cryobiology*, 1971, 8, p. 46—72.
2. Heard B. E. The histological appearances of some normal tissues at low temperatures. — *Br. J. Surg.*, 1955, 42, p. 430—437.
3. Heard B. E. Nuclear crystals in slowly-frozen tissues at very low temperatures. — *Br. J. Surg.*, 1955, 42, p. 659—663.
4. Kuriyama H. The influence of potassium, sodium and chloride on the membrane potential of the smooth muscle of taenia coli. — *J. Physiol.*, 1963, 166, p. 15—28.
5. Lovelock J. E. The haemolysis of human red blood cells by freezing and thawing. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1953, 10, p. 414—426.
6. Lovelock J. E. Biophysical effects of freezing. — In: *Preservation and Transplantation of Normal Tissues*. Wolstenholme G. E. W., Cameron M. P. Little, Brown and Co. Boston, 1954, p. 131—140.
7. Luft J. H. Improvements in epoxy resin embedding methods. — *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1961, 9, p. 409—414.
8. Mazur P. Physical and chemical basis of injury in single-celled microorganisms subjected to freezing and thawing. — In: *Cryobiology*, Ed. H. T. Meryman. Acad. Press, London—New York, 1966, p. 213—215.
9. Pease D. C. The preservation of unfixed cytological detail by dehydration with 'inert' agents. — *J. Ultrastruct. Res.*, 1966, 14, p. 356—378.
10. Pease D. C. The preservation of tissue fine structure during rapid freezing. — *J. Ultrastruct. Res.*, 1967, 21, p. 98—124.
11. Reynolds E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. — *J. Cell Biol.*, 1963, 17, p. 208—212.
12. Smith A. U., Polge C., Smiles J. Microscopic observation of living cells during freezing and thawing. — *J. Roy. Microsc. Soc.*, 1951, 71, p. 186—195.

13. *Smith A. U., Smiles J.* Microscopic studies of mammalian tissues during cooling and rewarming from -79°C . — *J. Roy. Microsc. Soc.*, 1953, 73, p. 134—139.
14. *Sherman J. K.* Survival of higher animal cells after the formation and dissolution of intracellular ice. — *Anat. Rec.*, 144, p. 171—190.
15. *Sherman J. K.* Effect of size of intracellular ice on consumption of oxygen and nuclear alterations of mouse kidney cells. — *Anat. Rec.*, 1964, 149, p. 591—604.
16. *Sherman J. K.* Intracellular ice as a factor in freeze-thaw survival. — *Bull. Millard Fillmore Hosp.*, 1967, 14, p. 111—117.
17. *Walter C. A.* Ultrastructural and functional changes in smooth muscle associated with freezing and thawing. — In: *The Frozen Cell*. Eds. G. E. M. Wolstenholme, O'Connor M. Churchill. London, 1970, p. 271—293.

Отделение криобиологии Клинического
научно-исследовательского центра
в Харроу, Великобритания

Поступила в редколлегию
12. XII 1975 г.

S. A. Walter

SMOOTH MUSCLE CELL ULTRASTRUCTURE IN FREEZING DOWN TO -30°C

Summary

The tenia of vasa smooth muscle tissue of a guinea pig was slowly frozen (with a rate of 1° per 1 min) down to -30° without a cryoprotective agent and then was replaced in the frozen state at this temperature. It is established that despite of a considerable corrugation of muscle cells resulted from application of the procedure substitution to the unfrozen muscles in the frozen state, their structural type is like that which is observed in the muscles frozen at -30°C . There were no proofs of structural damages in the muscle cells in freezing down to -30° , it was also impossible to establish the previous presence of intracellular ice crystals.

УДК 57:536.48.047

М. Дж. Тейлор, С. А. Вальтер, Б. Эльфорд

ВЛИЯНИЕ pH НА ФУНКЦИЮ И СТРУКТУРУ ГЛАДКОЙ МЫШЦЫ, ОХЛАЖДЕННОЙ ДО -13°C В НЕЗАМОРОЖЕННОЙ СРЕДЕ

В настоящее время получено много доказательств того, что изменение pH во время охлаждения может быть одним из факторов, вызывающих повреждение биологических объектов при их замораживании [4, 5, 10, 11, 13, 14, 18, 21—23]. Подтверждение этому мы находим в последних работах по низкотемпературному консервированию ткани гладкой мышцы [1—3]. В частности, Эльфордом и Вальтером [3] показано, что восстановление мышц, охлажденных в обогащенной калиевой среде, содержащей PIPES (пиперазин-ПП-бис-2-сульфонат этана)-буфер, зависит от уровня pH в растворе: чем меньше pH, тем слабее функциональное восстановление.

Нами проведены более детальные исследования по изучению влияния изменения pH на функциональную и структурную сохранность ткани гладкой мышцы после хранения при относительно высоких субнулевых температурах.

В данной работе обсуждаются функциональное восстановление отрезков ленты ободочной кишки морских свинок после хранения ее при -13° в растворах 13%-ного ДМСО-К-PIPES с различными значениями pH, а также результаты электронномикроскопических исследований для оценки структурной сохранности ткани в процессе охлаждения и после него.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препараты. Отрезки мышц ленты ободочной кишки (2—3 см) морских свинок отсекали от стенки слепой кишки и прикрепляли к полуму стеклянному барботирующему устройству, через которое пропускалась газовая смесь: 5% CO_2 —95% O_2 . Это обеспечивало адекватную подачу кислорода, а также некоторую степень встряхивания омывающей мышцу среды при ее охлаждении.

Растворы. Отрезки мышц помещали в модифицированный раствор Кребса [9] при $+37^\circ\text{C}$. Концентрация кальция, магния, бикарбоната, фосфата и глюкозы в K-PIPERES среде для низкотемпературной консервации мышц и в растворе Кребса были одинаковыми, но среда K-PIPERES содержала еще 59,5 мМ PIPES, 165,5 мМ K^+ , 8,4 мМ Na^+ и 59,9 мМ Cl^- . Для определения влияния pH увеличили концентрацию ионов водорода в растворах K-PIPERES, добавляя к ним по 50 мМ соляной кислоты.

Изменение pH. Изменение pH суспендирующей среды проводили при комнатной ($+20^\circ\text{C}$) температуре с помощью обычного стекляннокаломелевого элемента.

Ход опыта. Определение сократительной функции проводили до и после воздействия субнулевых температур. Каждую мышцу (прикрепленную к барботирующей трубке) помещали в камеру для отогрева объемом 20 cm^3 в термостатически регулируемой водяной бане при $+37^\circ\text{C}$. Запись изометрических сокращений в ответ на введение различных доз гистамина в определенной последовательности (2; 4; 8; 10; 32 и 64 $\text{mg}/20 \text{ cm}^3$) производили с помощью тензометра, соединенного с потенциометрическим самописцем. Во время последовательных добавлений доз гистамина один раз сменили консервирующий раствор. Гистамин добавляли с 2-минутным интервалом с временем контактирования 30 с. Мышцы обрабатывали по очереди, и каждая получала две последовательные серии стандартных доз гистамина. Напряжение мышц после второй серии доз приняли в качестве контрольного значения реакции мышцы. После завершения опытов по определению сократительной функции все мышцы в течение 1 ч выдерживали при $+37^\circ\text{C}$ в растворе Кребса, содержащем 20% (вес/объем) ДМСО, затем еще в течение 1 ч при -7°C в растворе K-PIPERES, содержащем 30% (вес/объем) ДМСО, перед охлаждением до -13°C . Для длительного хранения при -13°C трубки, содержащие кусочки полосок мышц, все еще прикрепленные к барботерам, переносили из охлаждающего устройства в холодильник глубокого замораживания.

Процедура отогрева во всех экспериментах заключалась в переносе мышц в предварительно нагретый раствор Кребса при $+37^\circ\text{C}$ с немедленным возобновлением барботажа газом O_2/CO_2 .

Повторное определение сократительной функции мышц после отогрева до $+37^\circ\text{C}$ выполняли таким же образом, как и контрольное определение.

Электронная микроскопия. Полоски мышц фиксировали по их длине в состоянии покоя *in vivo* в 1%-ном глютаральдегиде в растворе Кребса в течение 3 ч при $+37^\circ\text{C}$ и в течение 8 ч при -13°C . Для фиксации при -13°C первоначальную консервирующую среду заменили идентичной средой, содержащей 1%-ный глютаральдегид. Затем мышцы в течение 15 мин отмывали в растворе Кребса с 300 мМ сахарозы при 37°C с подлежащей заменой на чистый раствор Кребса. Постфиксацию мышц производили в бескальциевом растворе Кребса с тетраоксидом осмия (OsO_4 , 2%) в течение 15 мин, а затем резали на отрезки длиной 1 мм и фиксировали еще в течение 3 ч при комнатной температуре.

Зафиксированную ткань быстро омывали раствором Кребса, обезвоживали многократным отмыванием в эталоне в течение 10 мин, после чего переносили в смесь ацетона с Эпикотом 812 (1:1) (Epikote 812) (50% объем/объем). Инфильтрация производилась всю ночь, после чего кусочки мышцы помещали в Эпикот 812. Полученные на ультратоме ЛКВ срезы дважды окрашивали спиртовым уксуснокислым уранилом, а затем лимоннокислым свинцом [17]. Срезы изучали с помощью цейсовского электронного микроскопа EM9S2.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Функциональные исследования. Значение изометрической сократительной реакции кусочков ленты ободочной кишки использовали для построения кривых реакций на дозу, выражая реакцию в процентах напряжения мышцы, возникающего при контакте с контрольной (64 мг)

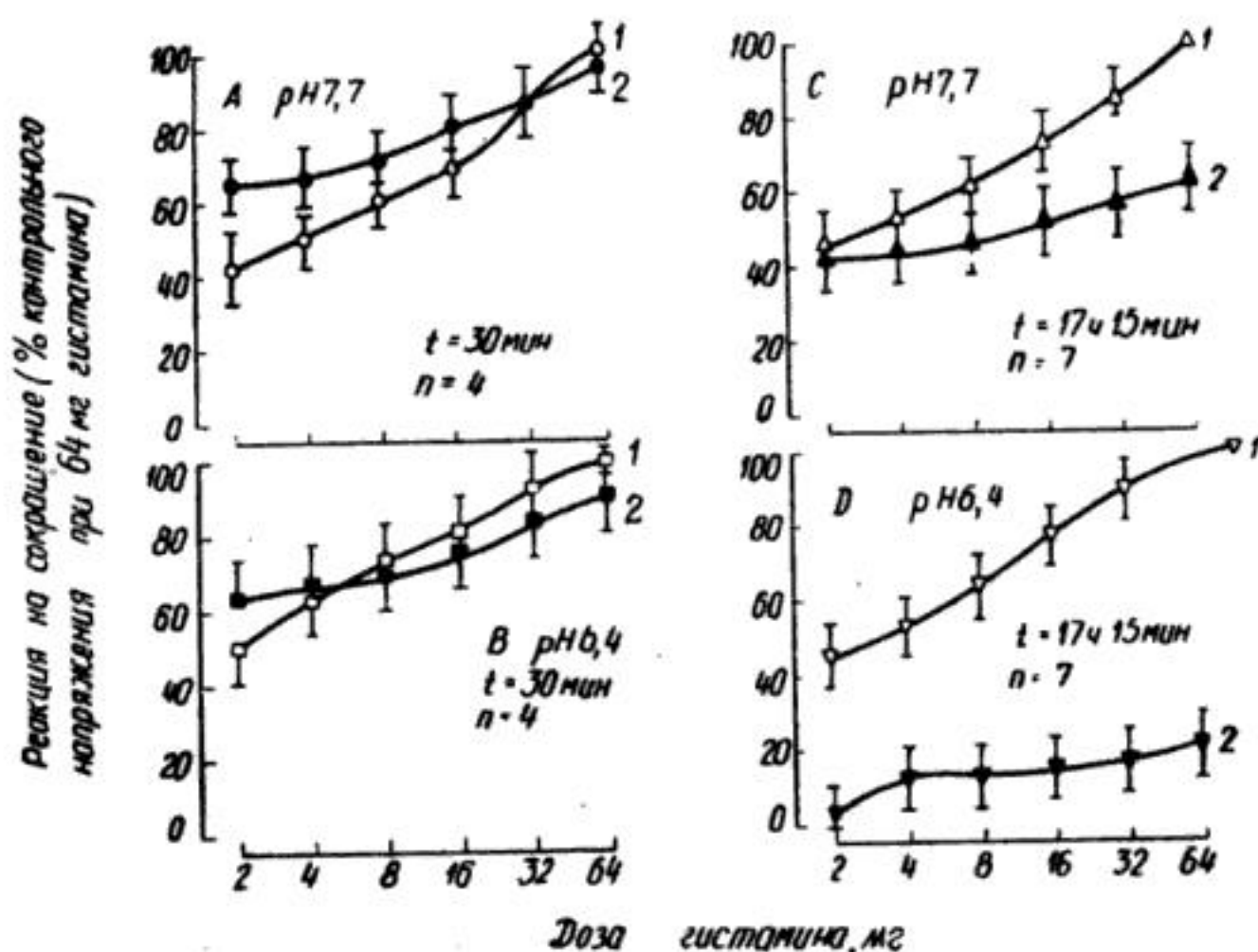


Рис. 1. Усредненные изометрические кривые, отражающие зависимость ответных реакций от дозы для групп гладких мышц, охлажденных до -13°C в 30%-ном ДМСО-К-PIPES с добавлением или без добавления 50 мМ HCl в среде с высоким значением pH (7,7) в течение 30 мин (контроль — 1, отогретые — 2) — A; в среде с низким значением pH (6,4) в течение 30 мин (контроль — 1, отогретые — 2) — B; в среде с высоким значением pH (7,7) в течение 17 ч 15 мин (контроль — 1, отогретые — 2) — C; в среде с низким значением pH (6,4) в течение 17 ч 15 мин (контроль — 1, отогретые — 2) — D.

Все мышцы в этих группах помещали в раствор Кребса при $+37^\circ\text{C}$ (для отогрева); n — число отдельных мышц в группе; вертикальные отрезки представляют $\pm 1\text{CO}$ (стандартная ошибка).

дозой гистамина до охлаждения. Средние значения отдельных «нормализованных» реакций на дозу в каждой экспериментальной группе использовали затем для получения усредненной кривой реакции на дозу для контрольных и деконсервированных мышц. Усредненные изометрические кривые реакции на дозу для групп мышц, охлажденных до -13° в 30% (вес/объем) ДМСО-К-PIPES-растворе, представлены на рис. 1.

В контрольных группах мышц, охлажденных в течение только 30 мин в растворах, содержащих 50 мМ HCl и без него, наблюдалась незначительная потеря функции при возвращении в раствор Кребса при

+37° (рис. 1, A, B). Однако у групп мышц, находившихся на протяжении 17 ч 15 мин в 30%-ном (вес/объем) растворе ДМСО-К-PIPES в таких же средах, наблюдались очень заметные различия ($p < 0,001$) в функциональном восстановлении после оттаивания. На рис. 1, C, D представлены усредненные кривые реакции на дозу для мышц, хранившихся в растворе с высоким (7,7) и низким рН (6,4), дающие средние максимальные значения реакций на дозу $63,4 \pm 6,4\%$ ($n=7$) и $20,8 \pm 4,2$ ($n=7$) контрольного значения для 64 мг дозы гистамина соответственно. У гладкой мышцы, хранившейся при -13°C в течение более длительных периодов времени (примерно 67 ч) в незамерзших растворах с рН от 6,4 до 8,0 не наблюдалось никакой сократительной реакции на гистамин после отогрева; такую ткань считали функционально мертвой.

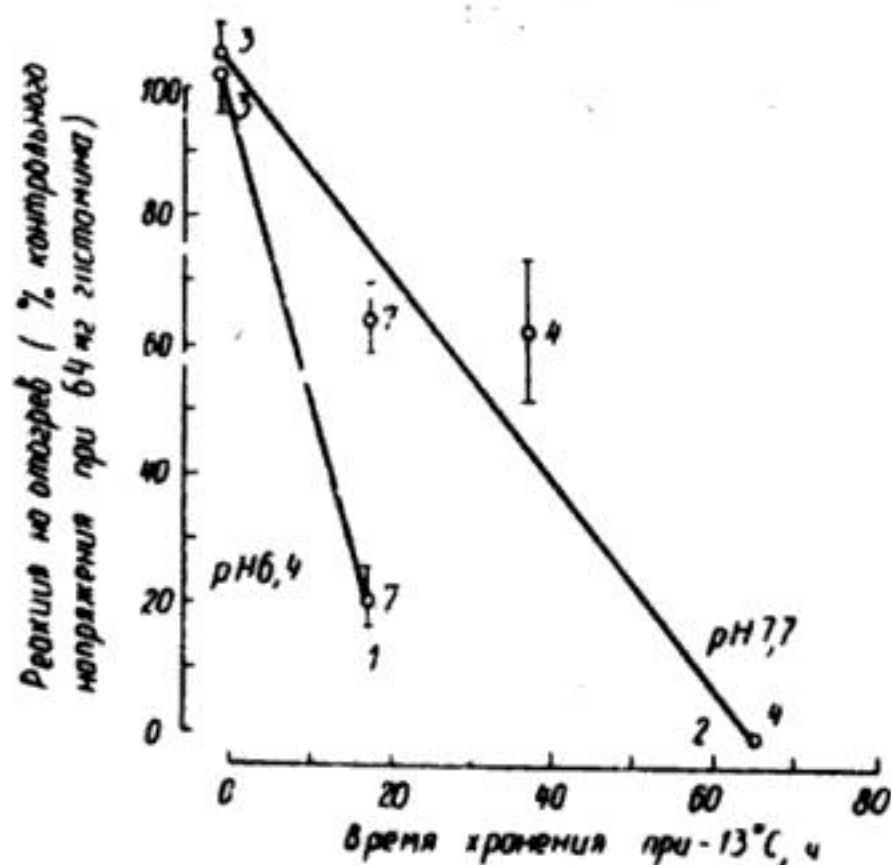


Рис. 2. Влияние времени хранения при температуре -13°C на сократительную реакцию гладких мышц, отогретых в растворах, содержащих 30% (вес/объем) ДМСО-К-PIPES, и ответная реакция мышц после хранения при температуре -13°C в растворах, содержащих 59,5 мМ PIPES и с добавлением 50 мМ HCl — 1, без добавления HCl — 2. Число под каждой точкой представляет собой количество отдельных мышц в каждой группе, а вертикальные отрезки — $\pm 1\text{CO}$.

Влияние времени хранения при -13°C на сократительную реакцию мышц после отогрева в растворах с различными значениями рН показано на рис. 2. Из этого рисунка видно, что для проявления каких-либо заметных различий в восстановлении между группами с разными значениями рН необходим период хранения при -13°C и что это действие ограничено продолжительностью периода хранения, после которого мышцы могут восстановиться с соответствующей степенью сохранности функциональной активности.

Экспериментальная процедура, принятая при структурных исследованиях, включает погружение мышц в раствор Кребса с 300 мМ сахарозы при $+37^\circ\text{C}$ после периода флосации в растворах глутаральдегида. Данную процедуру применяли с целью снижения влияния осмотического дисбаланса при переносе мышц из гипертонического фиксирующего раствора в изотонический раствор Кребса. Во время ультраструктурных исследований определялась функция параллельных групп мышц после хранения при -13°C в растворах, содержащих 30% (вес/объем) ДМСО и различные концентрации ионов водорода. Мышцы, у которых определялась функциональная активность, перед помещением в изотонический раствор Кребса переносили на 15 мин в раствор Кребса с 300 мМ сахарозы и температурой $+37^\circ\text{C}$. Интересно, что степень восстановления ткани, отмытой после 17-часового хранения при -13°C в растворе Кребса с 300 мМ сахарозы, значительно выше, чем ткани, помещенной в чистый раствор Кребса при $+37^\circ\text{C}$ как в группе с высоким рН, так и в группе с низким рН.

Кроме того, в этих группах наблюдалось значительное различие между $86,0 \pm 2,9\%$ -ным восстановлением в группе с высоким рН и $62,8 \pm 8,2\%$ -ным восстановлением в группе с низким рН ($0,05 > p > 0,02$).

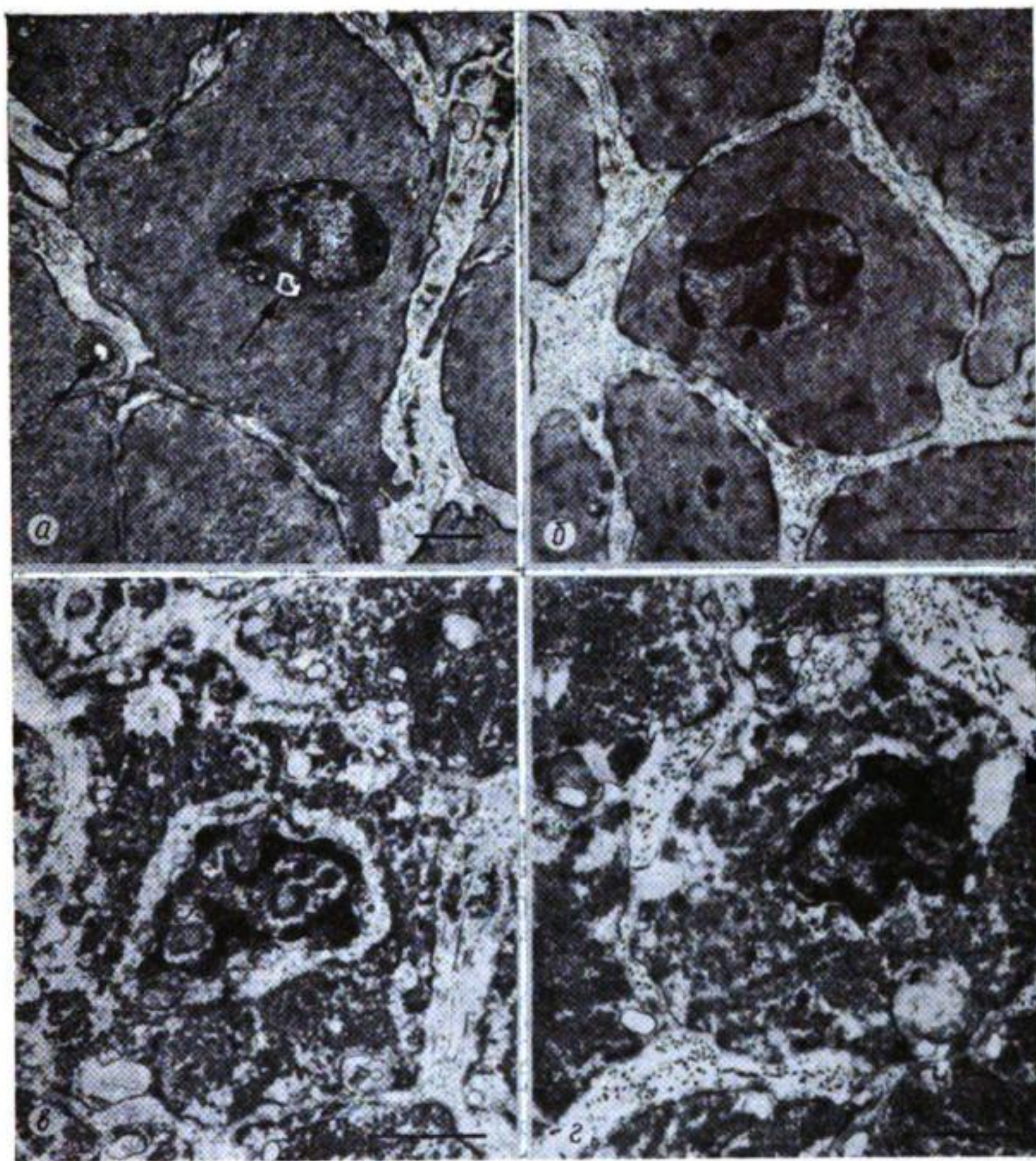


Рис. 3. Электронная микрофотография группы клеток гладкой мышцы (поперечное сечение) — а. Электронная микрофотография участка клеток гладкой мышцы после определения сократительной функции с последующей выдержкой в растворе Кребса, содержащем 20% ДМСО, и охлаждением до -13° в 30%-ном ДМСО-К-PIPES с рН 6,4 — б. Электронная микрофотография типичного участка клеток гладкой мышцы (поперечное сечение) после такой же обработки, как и для снимка б, за исключением того, что эту мышцу фиксировали для электронной микроскопии в охлажденном (-13°C) состоянии — в и электронная микрофотография типичного участка клеток гладкой мышцы, обработанной таким же образом, как и на рис. в, за исключением того, что рН консервирующей среды равно 7,7 — г:

а — после изучения сократительной реакции мышцу инкубировали в растворе Кребса, содержащем 20%-ный (в/о) ДМСО, в течение 1 ч при температуре 37°C . Перед повторным испытанием на сократительную функцию мышцы отмывали от ДМСО в течение 1 ч в растворе Кребса при температуре 38°C . Наблюдались незначительные различия между двумя сериями сократительных реакций. За исключением очевидных признаков повреждения некоторых митохондрий (стрелочки), у препаратов гладких мышц сохранялась морфологическая структура. Масштабный отрезок 1 мкм.

б — мышцу хранили при -13°C в течение 18 ч, отогревали и после отмыкания ДМСО повторно определяли на сократительную функцию. У этой мышцы восстановление сократительной функции составляло 42,8% по сравнению с контрольным значением. Несмотря на снижение восстановления, никаких морфологических доказательств изменений в структуре, которые бы соответствовали снижению мышечной функции, не было. Масштабный отрезок 1 мкм.

в — ультраструктура клеток заметно отличается от наблюдаемой у мышц, оогретых от температуры -13°C . Митохондрии значительно увеличены, с поврежденными мембранами крист, что указывает на неудовлетворительность фиксации при данной температуре. Отличительная черта этих мышц — трансформация некоторых миофибрилл в более крупные единицы, подобные прежде описанным миозиновым компонентам в клетках гладкой мышцы. Масштабный отрезок 1 мкм.

г — эту мышцу фиксировали в охлажденном (температура -13°C) состоянии. Никаких структурных различий между охлажденными и фиксированными при -13°C мышцами в средах с низким и высоким значениями рН нет. Масштабный отрезок 1 мкм.

Ультраструктурные исследования. На рис. 3, а представлена электроннограмма группы клеток мышцы ленты ободочной кишки в поперечном разрезе. Эту мышцу вначале подвергали действию стандартных доз гистамина для определения сократительной реакции, а затем выдерживали в течение 1 ч при $+37^{\circ}\text{C}$ в растворе Кребса, содержащем 20% (вес/объем) ДМСО. Затем из мышцы в течение 1 ч вымывали ДМСО и снова определяли ее сократительную функцию, после чего мышцу подготовили для электронномикроскопического исследования. После пребывания в растворе ДМСО наблюдались незначительные изменения в сократительной реакции. На этом микроснимке представлен типичный морфологический вид клеток гладкой мышцы после первичной фиксации в глютаральдегиде и последующей фиксации в OsO_4 . Хотя общий вид клеток гладкой мышцы показывает хорошую структурную сохранность, имеются доказательства повреждения митохондрий некоторых клеток.

На электроннограмме (рис. 3, б) видны участки мышцы, подвергавшейся испытаниям по определению сократительной функции с последующей выдержкой в растворе Кребса, содержащем 20%-ный ДМСО, а затем охлажденной до -13°C в 30%-ном ДМСО-К-PIPES с рН 6,4. Мышцу содержали при -13°C в течение 18 ч, затем отогревали, вымывали ДМСО и подвергали повторным испытаниям. У этой мышцы после охлаждения в среде с низким рН наблюдалось 42,8%-ное восстановление от контрольного значения сократительной реакции на дозу гистамина 64 мг по сравнению с 90,3%-ным восстановлением у мышцы, обработанной подобным образом, но хранившейся в среде с высоким рН (7,7). Несмотря на большие различия в функциональном восстановлении, в ультраструктуре этих мышц не наблюдали никаких очевидных различий, которые можно было бы объяснить охлаждением в среде с низким и высоким значениями рН.

В обоих случаях сохранялись основные морфологические характеристики, типичные для неохлажденных мышц. Так как разделение двух экспериментальных групп на основании морфологических критериев после охлаждения и отогрева в средах с высоким и низким значениями рН оказалось невозможным, мы посчитали рациональным зафиксировать мышцы в 30%-ном ДМСО-К-PIPES среде при -13°C для последующего ультраструктурного исследования.

На рис. 3, в, г представлены участки мышц, которые фиксировали при -13°C в средах с высоким и низким значениями рН, содержащих 1%-ный глютаральдегид. У обеих мышц наблюдались довольно отчетливые структурные различия по сравнению с неохлажденными и охлажденными, а затем отогретыми мышцами. Указанные изменения, по всей видимости, свидетельствуют о повреждении клеток: митохондрии сохранились плохо, а вокруг явно сжатых ядер наблюдаются большие участки сморщивания. Но даже в этих клетках мембрана плазмы оказывается структурно целостной.

Следует отметить, что сократительные мышечные волокна подвергались довольно заметным реорганизации и агрегации. Кроме того, структура мышечных волокон, по мнению многих исследователей, представляет собой миозиновый фибриллярный компонент клеток гладкой мышцы [8, 18, 19].

ОБСУЖДЕНИЕ

У группы мышц, которые в течение 17 ч 15 мин находились в растворах с 30%-ным (вес/объем) ДМСО при -13°C , наблюдалось заметное влияние рН на их функциональное восстановление. Восстановление ткани мышц в зависимости от рН отчетливо проявлялось после

всего времени хранения. Кроме установленного факта, что для проявления действия рН необходимо некоторое время и что это действие затем ограничивается потерей функционального восстановления, при структурных исследованиях обнаружен дополнительный фактор, влияющий на восстановление. Показано, что у мышц, хранившихся в растворах с высоким и низким рН и отогретых при $+37^{\circ}\text{C}$ после 15 мин отмывания в растворе Кребса, содержащем 300 мМ сахарозы, наблюдается увеличение функционального восстановления. Это влияние, демонстрирующее значительное различие в функциональном восстановлении мышц в двух рН-группах, является важным доказательством того, что на окончательное восстановление ткани заметно влияет и то, каким образом ДМСО удаляется из ткани после отогрева. С помощью ультраструктурных исследований отрезков гладких мышц, хранившихся в указанных условиях, не удалось обнаружить каких-либо морфологических различий между образцами, находившимися в средах с низким и высоким значениями рН. Однако изучение ультраструктуры этих мышц показало, что сократительные мышечные волокна образцов в обеих экспериментальных группах подвергались довольно заметной агрегации и имели такой же вид, как в более ранних исследованиях, имевших целью демонстрацию состояния миозинового компонента в клетках гладкой мышцы [12, 19, 24]. В свете наблюдающегося структурного повреждения у мышц, хранившихся при субнулевых температурах, и отсутствия его в отогретых мышцах сохранность ткани после хранения методом фиксации при -13°C является не совсем удовлетворительной. Это частично объясняет, почему не было явных признаков каких-либо очевидных рН-зависимых структурных изменений в двух различных группах мышц, фиксированных при -13°C .

Несмотря на отсутствие в ультраструктурных исследованиях доказательств очевидного влияния рН на морфологический вид клеток гладких мышц, охлажденных до субнулевых температур, в литературе имеются некоторые доказательства рН-зависимых изменений в сократительных белках. Каминер [7] пришел к выводу, что выделенный из гладкой мышцы миозин подвергается рН-зависимому конформационному изменению, вызывающему изменения в конфигурации и размере миозиновых волокон в суспензиях с неодинаковыми значениями рН и ионной силы. Показано, что миозин как в экстрактах гладкой мышцы, так и в глицериновых препаратах имеет тенденцию агрегироваться при снижении значений рН [6, 8, 21]; продемонстрирована также полная денатурация белков гладкой мышцы после экспозиции при низком значении рН во время глицеринизации при низких температурах [15]. В то время как локализация и вид повреждения гладких мышц, подвергающихся воздействию низких температур в средах с различной концентрацией ионов водорода, еще не ясны, зависимость функционального восстановления мышц от рН очевидна. Однако как в этих, так и в других исследованиях все измерения концентрации ионов водорода производили при комнатной температуре с помощью стеклянного электрода, градуированного по отношению к водным буферам. Поэтому действительное значение рН ткани и раствора, содержащего ДМСО, при субнулевых температурах остается невыясненным.

Дальнейшие исследования повреждающей природы действия изменений рН на сохранность гладкой мышцы в этих условиях требуют точного стандартизированного метода измерения активности ионов водорода в физиологических растворах, содержащих ДМСО, при низких температурах. Заметные различия в сократительной функции между группами мышц ленты ободочной кишки, отогретых от -13° , после хранения в средах с 30%-ным (вес/объем) ДМСО-K-PIPES с неодинаковыми значениями рН, определили условия, в которых могут оказаться полезными изменения рН.

Данные опытов показали, что, когда сложная ткань (типа гладкой мышцы) подвергается воздействию таких неблагоприятных условий, как хранение при низких температурах в растворах, содержащих физиологически чуждые компоненты типа ДМСО, может иметь место взаимодействие многих факторов, влияющих на конечное восстановление ткани.

Данные исследования согласуются с другими работами, которые свидетельствуют о важности регулирования концентраций ионов водорода в консервирующей среде как фактора, влияющего на криоконсервирование биологических материалов типа гладкой мышцы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Elford B. C. Functional recovery of smooth muscle after exposure to dimethyl sulfoxide and low temperatures. — *Cryobiology*, 1970, 7, p. 148—153.
2. Elford B. C. Diffusion and distribution of dimethyl sulfoxide in the isolated guinea pig taenia coli. — *J. Physiol.*, 1970, 209, p. 187—208.
3. Elford B. C., Walter C. A. Effects of electrolyte composition and pH on the structure and function of smooth muscle cooled to -79°C in unfrozen media. — *Cryobiology*, 1972, 9, p. 82—100.
4. Finn D. B. Denaturation of proteins in muscle juice by freezing. — *Proc. Roy. Soc. Ser. B.*, 1932, 111, p. 396—411.
5. Harvey R. B. Hardening process in plants and developments from frost injury. — *J. Agr. Res.*, 1918, 15, p. 83—111.
6. Kaminer B. Synthetic myosin filaments from vertebrate smooth muscle. — *Fed. Proc.*, 1967, 26, p. 728.
7. Kaminer B. Synthetic myosin filaments from vertebrate smooth muscle. — *J. Molec. Biol.*, 1969, 39, p. 257—264.
8. Kelly R. E., Rice R. V. Localisation of myosin filaments in smooth muscle. — *J. Cell Biol.*, 1968, 37, p. 105—116.
9. Kuriyama H. The influence of potassium, sodium and chloride on the membrane potential of the smooth muscle of taenia coli. — *J. Physiol.*, 1963, 166, p. 15—28.
10. Lea C. H., Hawke J. C. Lipovitellin. 2. The influence of water on the stability of lipovitellin and the effects of freezing and of drying. — *Biochem. J.*, 1952, 52, p. 105—114.
11. Lovelock J. E. The denaturation of lipid-protein complexes as a cause of damage by freezing. — *Proc. Roy. Soc. Ser. B.*, 1957, 147, p. 427—433.
12. Lowy J., Small J. V. The organization of myosin and actin in vertebrate smooth muscle. — *Nature*, 1970, 227, p. 46—51.
13. McFarlane V. M. Behaviour of microorganisms at sub-freezing temperatures. I. Freezing redistribution studies. — *Food Res.*, 1940, 5, p. 43—57.
14. McFarlane V. H. Behaviour of microorganisms at sub-freezing temperatures. III. Influence of sucrose and hydrogen-ion concentrations. — *Food Res.*, 1941, 6, p. 481—492.
15. Panner B. J., Honig C. R. Locus and state of myosin in tissue sections of vertebrate smooth muscle. — *J. Cell Biol.*, 1970, 44, p. 52—61.
16. Parkes A. S. Factors affecting the viability of frozen ovarian tissue. — *J. Endocrinol.*, 1958, 17, p. 337—343.
17. Reynolds E. S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. — *J. Cell Biol.*, 1963, 17, p. 208—212.
18. Rice R. V., McManus G. M., Devine C. E., Somlyo A. P. Regular organization of thick filaments in mammalian smooth muscle. — *Nature*, 1971, 231, p. 242—243.
19. Rice R. V., Moses J. A., McManus G. M., Brady A. C., Blasik L. M. The organization of contractile filaments in a mammalian smooth muscle. — *J. Cell Biol.*, 1970, 47, p. 183—196.
20. Ridge J. W. Preservation of corneal endothelium by freezing. — *Nature*, 1956, 178, p. 1404.
21. Shoenberg C. F. An electron microscope study of the influence of divalent ions on myosin filament formation in chicken gizzard extracts and homogenates. — *Tissue Cell*, 1969, 1, p. 83—96.
22. Soliman F. S., Van den Berg L. Factors affecting freezing damage of lactic dehydrogenase. — *Cryobiology*, 1971, 8, p. 73—78.
23. Soliman F. S., Van den Berg L. Factors affecting freeze aggregation of lipoprotein. — *Cryobiology*, 1971, 8, p. 265—270.
24. Somlyo A. P., Somlyo A. V., Devine C. E., Rice R. V. Aggregation of thick filaments into ribbons in mammalian smooth muscle. — *Nature*, 1971, 231, p. 243—246.

Отделение криобиологии Клинического
научно-исследовательского центра
в Харроу, Великобритания

Поступила в редколлегию
12. XII 1975 г.

EFFECT OF pH ON THE FUNCTION AND STRUCTURE
OF THE SMOOTH MUSCLE COOLED DOWN TO -13°C
IN THE FROZEN MEDIUM

Summary

On the basis of isometric contractile reaction for histamine a contractile function of the guinea pig smooth muscle strips was determined before and after keeping at -13°C in the potassium enriched buffer solutions of PIPES containing 30% DMSO and possessing different values of pH. Structural safety of the tissues during and after cooling was determined by means of the electron microscope. A dependence is demonstrated for the tissue recovery on the pH level after keeping for more than 17 h at -13°C . But despite of great differences in the function restoration of the muscles cooled in the media with «low» and «high» values of pH, no differences were observed in the ultrastructure of the mentioned muscles. Morphological features characteristic of the unfrozen muscles were not observed in the muscles of both groups fixed after heating up to 37°C . But examination of the muscle cells fixed at -13°C in 30% DMSO, showed that the contractile fibres of the samples of both groups were subjected to considerable reorganization and aggregation.

УДК 57:536.48.047:615.832.97

Б. П. Сандомирский, Д. Е. Пекарский, Ю. И. Исаев

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ
КРИОГЕННОГО МЕТОДА В ЛЕЧЕНИИ ОЖОГОВ

Основными параметрами, определяющими тяжесть ожоговой болезни, являются глубина и площадь термического поражения кожи. Если на последний фактор после окончания действия термического агента повлиять невозможно, то гибель кожи в результате ожога является динамическим процессом, развивающимся во времени.

Нами, как и многими другими исследователями [3, 6, 9], констатирован факт сохранения послеожоговой гипертермии тканей длительное время после прекращения теплового действия. Так, при ожогах пламенем температуры, пагубно действующие на белковые структуры, держатся в 3—5 раз больше, чем время горения. Это иллюстрирует рис. 1, где представлена термограмма подкожной температуры при ожоге пламенем. Следует заметить, что традиционное измерение температуры термopарами, помещенными в медицинские инъекционные иглы, при ожогах пламенем не может дать верной информации, что связано с высокой теплопроводностью по металлу к месту нахождения спая термopарного провода. В наших исследованиях подкожная температура у экспериментальных животных при ожогах пламенем измерялась интегрально с пластины медной фольги площадью 20 см^2 , толщиной 0,1 мм и подпаянной к ней медь-константовой термopарой, помещенными под кожу зоны опыта так, что языки пламени и горячий воздух не подводили тепла по датчику температуры

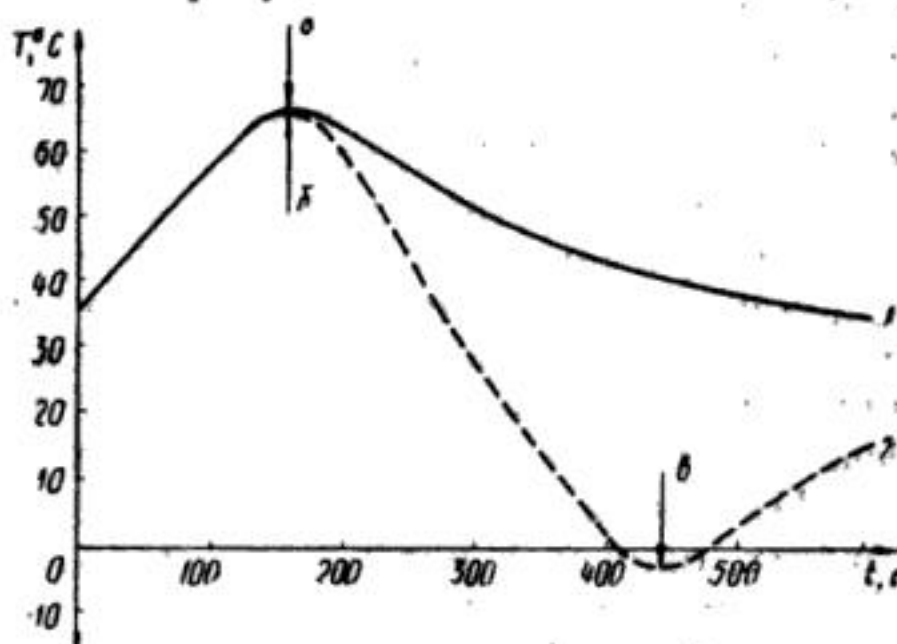


Рис. 1. Подкожная термография:

1 — при ожоге пламенем; 2 — при ожоге с криовоздействием; а — окончание горения; б — окончание горения и начало криовоздействия; в — окончание криовоздействия.

к месту, где она измерялась. Результаты измерений фиксировались на бумаге самописцем типа ПС1-02.

Для снятия послеожогового прогревания тканей используются различные холодагенты: холодная вода, снег и лед [5, 7—9], хлористый этил [2, 4] и жидкий азот [11]. Каждый из них имеет свои преимущества и недостатки, однако сокращение времени послеожогового нагре-

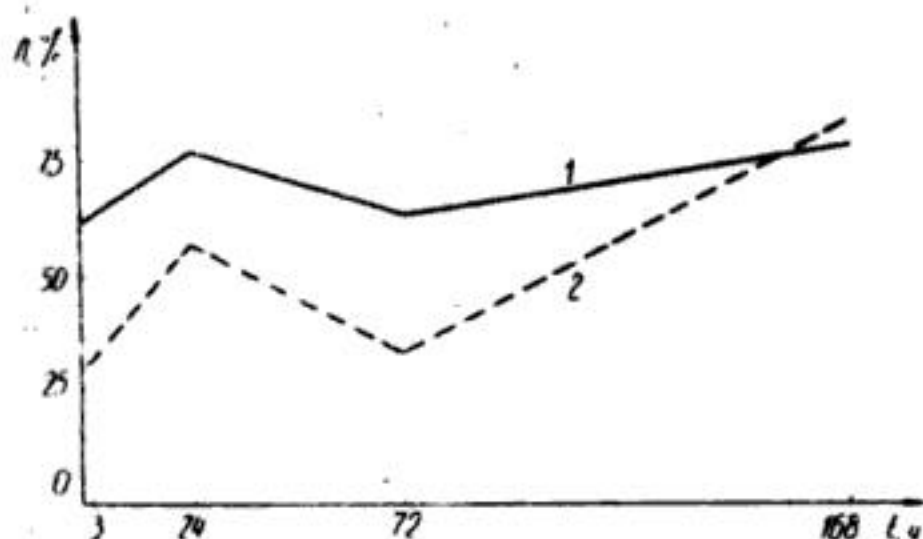


Рис. 2. Токсичность экстрактов кожи по летальности (Л) куриных эмбрионов:

1 — летальность эмбрионов после введения экстрактов из обожженной кожи; 2 — летальность эмбрионов после введения экстрактов из кожи с ожогом и криовоздействием.

Измерение температуры описанным выше способом позволяет избежать ошибочной информации, получаемой при использовании игл с термопарами, которые при попадании на них брызг азота и охлажденного воздуха фиксируют низкие температуры, не наблюдаемые в глубоких слоях, где находятся спай термопар.

Мы изучали влияние криовоздействия на течение ожоговой болезни и раневого процесса после ожогов пламенем у 220 животных различного вида (поросят, белых крыс, мышей). Охлаждение зоны ожога выполнялось парами и брызгами жидкого азота через аппарат АСК-6 ФТИНТ АН УССР (аппарат стоматологический криогенный-6 Физикотехнического института низких температур АН УССР).

Снятие послеожоговой гипертермии в зоне ожога не исчерпывает положительного влияния холодового воздействия, которое выражается в уменьшении степени выраженности признаков воспаления, в тенденции к нормализации проницаемости и микроциркуляции, в уменьшении эффекта токсичности субстратов из обожженной кожи.

На крысах изучалась капиллярная проницаемость при контактных ожогах, ожогах с последующим охлаждением и при криовоздействиях. На спине белой крысы вызывался контактный ожог аппликатором с температурой $+100^{\circ}\text{C}$ на протяжении 2 мин. По окончании ожога вводилась синька Эванса в хвостовую вену из расчета 20 мг на 1 кг веса животного [2]. По ширине окрашивания в синий цвет венчика, измеренного с помощью отсчетного микроскопа МИР-1, через 30 мин его появления судили о проницаемости и времени. Для изучения действия холода на проницаемость после ожога это же место охлаждали аппликатором такого же диаметра с температурой -196°C .

При ожогах окрашивание появлялось через 68 ± 24 с, ширина зоны окрашивания достигала $3,3 \pm 0,45$ мм, при криовоздействии — через 501 ± 49 с, ширина венчика $2,5 \pm 0,5$ мм. В экспериментах с ожогами с последующим криовоздействием окрашивание наступало через 231 ± 48 с, ширина его составляла $2,2 \pm 0,6$ мм.

Полученные данные позволяют говорить о положительном влиянии охлаждения азотными температурами на нарушенную теплом прони-

вания тканей требует мощного тепловода, что может хорошо обеспечить жидкий азот, с использованием которого в значительной мере связаны успехи криохирургии последнего десятилетия. Большая разница между температурой кожи и жидкого азота, несмотря на относительно невысокую теплоемкость последнего, позволяет быстро и на большой площади охладить перегретые ткани.

На рис. 1 представлена термограмма подкожной температуры при охлаждении зоны ожога парами и брызгами жидкого азота.

цаемость. Проведенное сравнительное изучение токсичности субстрата из кожи после ожога пламенем, после холодового воздействия и обожженной кожи с последующим криовоздействием свидетельствует о возможности снижения в коже уровня ожоговых токсинов.

Нами проведено сравнение токсичности экстрактов из обожженной кожи и из кожи с ожогом и последующим охлаждением. Токсичность оценивалась по проценту летальности семидневных куриных эмбрионов [1].

Предварительный анализ полученных результатов позволяет считать, что криовоздействие в первые сутки после термической травмы замедляет образование ожогового токсина (см. рис. 2).

Благоприятное влияние криовоздействия на ожоговую болезнь выражалось в том, что животные с охлаждением зоны термического поражения парами и брызгами жидкого азота теряли в весе 16,2% при 30,8% у животных с ожогами. У них наступают более быстрая демаркация и некролиз (17—20 суток вместо 26—30), отмечается ускоренная эпителизация ран.

Дополнительные данные, полученные при гистологическом исследовании участков кожи, подвергшихся ожогу, криовоздействию и криовоздействию после ожога, подтверждают уменьшение деструкции тканевых структур при криообработке ожоговых ран и положительное действие ее на процессы регенерации.

ВЫВОДЫ

Охлаждение ожоговой поверхности парами и брызгами жидкого азота приводит к снятию послеожоговой гипертермии тканей.

Криовоздействие на ожоговые раны сопровождается снижением капиллярной проницаемости в зоне термического воздействия и уровня токсичности некроза.

Криообработка ожоговых ран защищает ткани от значительной деструкции, облегчая течение ожоговой болезни и местную регенерацию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Александров П. Н., Богданова В. А., Чернух А. М. Тератогенное действие талидамида в опытах на куриных эмбрионах. — Бюл. эксперим. биол. и мед., 1966, № 2, с. 89—91.
2. Бурба Р. Б. Влияние местной гипотермии на местную и общую капиллярную проницаемость при термических ожогах в эксперименте. — Материалы 2-го съезда травматологов-ортопедов республик Прибалтики. Рига, 1972, с. 524—527.
3. Кочетыгов Н. И. Ожоговая болезнь (очерки по патологической физиологии). Л., «Медицина», 1973. 246 с.
4. Лауцевичус Л. Криотерапия хлорэтилом в лечении термических ожогов. — Клинич. мед., 1975, № 5, с. 55—57.
5. Маркелов Р. Л. Лечение холодом больных с ожогами. — Военно-медицинский журнал, 1957, № 8, с. 78—79.
6. Федоров Н. А., Гублер Е. В. Патологическая физиология ожогов. — Патол. физиол. и эксперим. терапия, 1967, № 11, с. 3—13.
7. Шипов А. К. Холодовая терапия при тяжелых формах ожоговой болезни. — Труды III съезда хирургов Российской Федерации. Горький, 1969, с. 156—159.
8. Courtice F. C. The effect of local temperature on fluid loss in thermal burns. — J. Physiol., 1946, N 104, p. 321—345.
9. Ionescu A., Radulescu V., Vasiliu A. Arsurile. Clinica, fiziopatologie, tratament. Bucuresti, «Editura medicala», 1970. 330 p.
10. Mensers P. J., Lautenschläder J., Hermann M., Borst R. Tierexperimentelle untersuchungen zur verbrennungskrankheit, auswirkung lokeler kühlung nach verbrühung. — Res. Exp. Med., 1972, 159, p. 114—123.
11. O'Leary Nolan J. Observations on thermal burns treated with liquid nitrogen. — Int. Surg., 1969, N 52, p. 351—353.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
12. XII 1975 г.

B. P. Sandomirskij, D. E. Pekarskij, Ju. I. Isaev

EXPERIMENTAL SUBSTANTIATION FOR APPLICATION OF CRYOGENIC METHOD TO TREAT BURNS

Summary

Cooling of the burn zone with liquid nitrogen vapours and sprays was applied in the experiments with animals. Each treatment resulted in removal of the postburn tissues hyperthermia decrease in toxicity of the burnt skin substrates and the inflammatory reaction, and normalization of capillary permeability and microcirculation. Histologic examination confirms the protective effect of burns cryotreatment from the essential destruction and its positive effect on regeneration processes.

СОДЕРЖАНИЕ

Пушкарь Н. С. Низкотемпературное консервирование тканей (Итоги и перспективы развития)	3
Утевский А. М. Ауторегуляция биологической системы на температурной шкале	9
Фарант Д. Пересмотр некоторых криобиологических концепций	12
Бражников А. М., Карпичев В. А. Аналитическое описание процессов переноса тепла в биологических системах	21
Бронштейн В. Л., Розанов Л. Ф. Начальное переохлаждение как фактор повреждения при замораживании клеточных суспензий	26
Гордиенко Е. А., Ишков Г. С., Розанов Л. Ф. Обезвоживание и некоторые механизмы криоповреждения клеток при низкотемпературном консервировании суспензии	29
Иткин Ю. А., Бронштейн В. Л., Розанов Л. Ф. Изучение влияния льда на процесс обезвоживания и внутриклеточную кристаллизацию при замораживании клеточной суспензии	35
Бондаренко В. А., Лемешко В. В., Белоус А. М. Нарушение структуры мембран митохондрий при воздействии замораживания — оттаивания	41
Мишневa Л. Г., Белоус А. М. Влияние полиэтиленгликолей различного молекулярного веса на функциональное состояние митохондрий	43
Лобынцева Г. С. Влияние замораживания — оттаивания на электрокинетические свойства эритроцитов человека	45
Пушкарь Н. С., Лобынцева Г. С., Вайсфлог А. И., Моисеев В. А., Розанов Л. Ф., Марковский А. Л., Щербак Г. М., Кулешова Л. Г. Низкотемпературное консервирование ядерных клеток крови под защитой ПЭО-400, ДМСО и ПЭГ-2000	47
Строна В. И. Изменение АТФазной активности миелокариоцитов крыс при низкотемпературном консервировании под защитой оксиэтильных производных многоатомных спиртов	53
Цуцаева А. А., Сафонова Т. С., Микулинский Ю. Е., Воробьева И. И., Мануильский В. П. Влияние различных режимов замораживания — оттаивания на некоторые виды бактерий	55
Цуцаева А. А., Попов Н. Н., Войскобойникова Т. В., Останкова Л. В. Влияние низкотемпературного консервирования на морфофункциональные свойства тканевых лимфоцитов	57
Гольцев А. Н., Цуцаева А. А., Останкова Л. В., Микулинский Ю. Е., Дроздова О. А., Чеботарев Е. Е., Рябова З. З. Использование экзогенной ДНК с целью ускорения репаративных процессов в деконсервированных миелокариоцитах, имплантированных облученным реципиентам	59
Воротилин А. М., Тимошенко Ю. П., Корчиков С. Д., Полякова А. И. Использование высоких давлений в процессе размораживания биологических объектов	62
Лозина-Лозинский Л. К., Успенская З. И., Радченко А. И. Влияние глубокого охлаждения (-196°) и ультрафиолетового облучения при их совместном и последовательном действии на цисты простейших	65
Осипенко А. П. Радиочувствительность эритроцитов при низкой температуре	68
Тимошенко Ю. П. Размораживание биологических объектов СВЧ-энергией. IV. О возможности осуществления программного размораживания	70
Тимошенко Ю. П., Лобынцева Г. С., Полякова А. И., Пахомова И. С. Размораживание биологических объектов СВЧ-энергией. V. Комбинированный способ размораживания биологических объектов	73
Кочуровская Г. Г., Матвеец Н. М., Лубяный В. Г. Некоторые аспекты оксиэтилирования полиолов	76
Калугин Ю. В., Пашковская О. В. О взаимодействии криопротектора полиэтиленоксида с эритроцитами человека	79
	111

<i>Шраго М. И.</i> Биологические антифризы и криопротекторы	81
<i>Исаев Ю. И., Панков Е. Я., Сандомирский Б. П.</i> Динамика экспериментального крионекроза кожи	84
<i>Козлова В. Ф., Шенберг М. Г., Панков Е. Я., Суббота Н. П.</i> Действие низких температур на структурные элементы почки	87
<i>Маркова О. П., Обозная Э. И., Бабийчук Г. А., Прошкин В. С.</i> Морфологическое и цитохимическое исследования стернальных пунктатов больных с гипоплазией гемопоза до и после трансплантации криоконсервированного (-196°) костного мозга	90
<i>Вальтер С. А.</i> Ультраструктура клеток гладкой мышцы при замораживании до температуры -30°C	91
<i>Тейлор М. Дж., Вальтер С. А., Эльфорд Б.</i> Влияние рН на функцию и структуру гладкой мышцы, охлажденной до -13°C в замороженной среде	99
<i>Сандомирский Б. П., Пекарский Д. Е., Исаев Ю. И.</i> Экспериментальное обоснование применения криогенного метода в лечении ожогов	107

КРИОБИОЛОГИЯ И КРИОМЕДИЦИНА. Выпуск 3.

*Печатается по постановлению ученого совета
Института проблем криобиологии и криомедицины АН УССР*

Редактор *Е. Т. Тальнова*. Художественный редактор *Р. И. Калыш*. Технический редактор *В. А. Морозова*. Корректоры *М. Т. Кравчук, Е. А. Михалец*.

Информ. бланк № 1072.

Сдано в набор 15. 03. 1977 г. Подп. в печ. 5. 08. 1977 г. БФ 00306. Формат 70×108^{1/16}. Бумага типогр. № 1. Лит. гарн. Выс. печ. Усл. печ. л. 10,5 Уч.-изд. л. 10,69. Тираж 1000 экз. Заказ 4048.
Цена 1 руб. 60 коп.

Издательство «Наукова думка». 252601, Киев ГСП. Репина, 3.

Областная книжная типография Львовского областного управления по делам издательств, полиграфии и книжной торговли. Львов, Стефаника, 11.

00000-443
К ————— 000-77
М221 (04)-77

© Издательство «Наукова думка», 1977

УДК 57:536.48.047

Низкотемпературное консервирование тканей (Итоги и перспективы развития). Пушкаръ Н. С. — Криобиология и криомедицина, 1977, вып. 3, с. 3—8.

Анализируется современное состояние криобиологических исследований и ставятся задачи, решение которых необходимо осуществить в ближайшее время.

УДК 57:536.48.047

Ауторегуляция биологической системы на температурной шкале. Утевский А. М. — Криобиология и криомедицина, 1977, вып. 3, с. 9—12.

Рассмотрен вопрос о значении процессов регуляции и ауторегуляции биологической системы для сохранения ее жизнеспособности при действии низких и сверхнизких температур. На основе выдвинутой автором концепции о регуляции процессов и функций как соотношения ауторегуляторных механизмов разных уровней и проекции одного уровня биологической организации на другой проведен теоретический анализ некоторых узловых проблем криобиологии.

УДК 57:536.48.047

Пересмотр некоторых криобиологических концепций. Фарант Джон. — Криобиология и криомедицина, 1977, вып. 3, с. 12—20.

Изучением механизмов, определяющих жизнь и смерть в процессе замораживания и оттаивания, не должен заниматься ограниченный круг исследователей в области криобиологии. Анализ указанных вопросов может привести к совершенствованию практических методов криоконсервирования, выяснению причин разрушения замораживанием—оттаиванием.

Примером этому может служить использование метода двухэтапного охлаждения в исследованиях, направленных на выяснение влияния скоростей охлаждения на выживаемость клеток.

Список лит.: 26 назв.

УДК 57:536.48.047

Аналитическое описание процессов переноса тепла в биологических системах. А. М. Бражников, В. А. Карпичев. Криобиология и криомедицина, вып. 3, 1977, с. 21—26.

В работе рассматриваются нелинейные задачи теплопроводности, типичные в практике холодильного консервирования объектов биологического происхождения. Приближенное решение задач получено на основе гипотезы о наличии «температурного фронта», который в процессах подвода (отвода) тепла с конечной скоростью распространяется от периферийных слоев объекта к центральным. Основанием для выведения гипотезы является относительно высокое сопротивление биообъектов переносу тепла.

Ил. 1. Список лит.: 5 назв.

УДК 57:536.48.047:551.321.1:577.3:523.73:536.48:611—018.46

Начальное переохлаждение как фактор повреждения при замораживании клеточных суспензий. Бронштейн В. Л., Розанов Л. Ф. — Криобиология и криомедицина, 1977, вып. 3, с. 26—29.

Проведено теоретическое и экспериментальное изучение влияния начального переохлаждения на процесс обезвоживания и внутриклеточную кристаллизацию при замораживании клеточных суспензий. Показано, что при замораживании небольших объемов биоматериала с большими скоростями начальное переохлаждение и его величина могут сильно влиять на сохранность замораживаемого объекта и должны учитываться как фактор повреждения при постановке криобиологических экспериментов. (

Ил. 3. Список лит.: 2 назв.

УДК 57:536.48.047

Обезвоживание и некоторые механизмы криповреждения клеток при низкотемпературной консервации суспензии. Гордиенко Е. А., Ишков Г. С., Розанов Л. Ф. — Криобиология и криомедицина, 1977, вып. 3, с. 29—34.

Исследовано поведение объема клеток перитонеального экссудата мышей и коркового мозга крыс при замораживании суспензий до -20° со скоростями 0,3; 1; 10 и 60° в 1 мин и последующем отогреве со скоростью 1° в 1 мин или 50° в 1 мин с помощью низкотемпературной приставки к световому микроскопу. В процессе цикла замораживание—отгрев размеры клеток вначале уменьшаются, а затем клетки набухают и обесцвечиваются. Обсуждается согласованность полученных результатов с известной в криобиологии гипотезой минимального объема и другими гипотезами криповреждений.

Ил. 2. Список лит.: 11 назв.

УДК 57:536.48.047:551.321.1:577.3:523.78:536.48:611—018.46

Изучение влияния структуры льда на процесс обезвоживания и внутриклеточную кристаллизацию при замораживании клеточной суспензии. Иткин Ю. А., Бронштейн В. Л., Розанов Л. Ф. — Криобиология и криомедицина, 1977, вып. 3, с. 35—41.

Проведено изучение возможностей пространственного расположения клеток в структуре льда при замораживании клеточных суспензий методом низкотемпературной кристаллографии. С помощью аппарата неравновесной термодинамики изучен процесс обезвоживания клеток и оценена возможность возникновения внутриклеточных кристаллов в зависимости от образующейся структуры льда.

Ил. 1. Список лит.: 6 назв.

УДК 57:536.48.047:576.347

Нарушение структуры мембран митохондрий при воздействии замораживания — оттаивания. Бондаренко В. А., Лемешко В. В., Белоус А. М. — Криобиология и криомедицина, 1977, вып. 3, с. 41—43.

Изучалось состояние ненасыщенных жирных кислот (НЖК) в мембранах митохондрий, подвергнутых замораживанию—оттаиванию, по появлению в системе сопряженных двойных связей, образуемых жирными кислотами, так называемых диеновых конъюгатов (ДК) — промежуточных продуктов перекисления липидов, а также по идентификации конечного продукта перекисления — малонового диальдегида (МДА). Предполагается, что при замораживании—оттаивании происходит деградация митохондриальных фосфолипидов, обусловленная как разрывлением их связей с белками в составе мембраны, так и последующим окислением их НЖК.

Ил. 3. Список лит.: 5 назв.

УДК 57:536.48.047:576.347

Влияние полиэтиленгликолей различного молекулярного веса на функциональное состояние митохондрий. Мишнева Л. Г., Белоус А. М. — Криобиология и криомедицина, 1977, вып. 3, с. 43—45.

Изучены дыхательная активность и дыхательный контроль митохондрий печени крыс в зависимости от молекулярного веса полиэтиленгликолей (ПЭГ) и ПВП (9000 и 44000). Показано, что ПЭГ в концентрации 15% оказывают слабое влияние на окисление сукцината. При окислении α -кетоглутарата влияние ПЭГ проявляется в значительно большей степени, чем при окислении сукцината. Наибольшее торможение дыхания в состоянии 3 и уменьшение ДК наблюдаются в присутствии ПЭГ-400. Указанный эффект уменьшается с увеличением молекулярного веса криопротектора.

Ил. 1. Табл. 1.

УДК 57:536.48.047:537.363

Влияние замораживания—оттаивания на электрокинетические свойства эритроцитов человека. Лобынцева Г. С. — Криобиология и криомедицина, 1977, вып. 3, с. 45—47.

Изучено влияние различных разбавителей криопротекторов (ПОЛИПЕК 76, физиологического раствора, дистиллированной воды) и низкотемпературного консервирования на электрофоретическую подвижность эритроцитов. Установлено, что мембраны эритроцитов, замороженных в присутствии криопротектора, разведенного на дистиллированной воде, сохраняются лучше и по своим свойствам ближе к нативной клетке, чем в случае криопротектора, разведенного физиологическим раствором.

Табл. 1.

УДК 57:536.48.047.53

Низкотемпературное консервирование ядерных клеток крови под защитой ПЭО-400, ДМСО, ПЭГ-2000. Пушкарь Н. С., Лобынцева Г. С., Вайсфлог А. И., Моисеев В. А., Розанов Л. Ф., Марковский А. Л., Щербак Г. М., Кулешова Л. Г. — Криобиология и криомедицина, 1977, вып. 3, с. 47—53.

Проведено сравнительное изучение криофилактических свойств полиэтиленоксида, диметилсульфоксида, полиэтиленгликоля при низкотемпературном консервировании ядродержащих клеток крови. Изучено влияние названных веществ на процессы кристаллизации, диэлектрическую проницаемость, размер кристаллов, электрофоретическую подвижность и сохранность клеток после низкотемпературного консервирования.

Ил. 4. Табл. 2. Список лит.: 10 назв.

УДК 57:536.48.047:615.387:543.5:548.0:543.226

Изменение АТФазной активности миелокариоцитов крыс при низкотемпературном консервировании под защитой оксиэтильных производных многоатомных спиртов. Строна В. И. — Криобиология и криомедицина, 1977, вып. 3, с. 53—55.

Изучалось изменение активности маркерного фермента цитоплазматических мембран (АТФазы) в результате низкотемпературного консервирования под защитой оксиэтильного производного — 4-атомного спирта — ОЭПЧС и 2-атомного спирта — полиэтиленоксида молекулярного веса 400 (ПЭО-400). Установлено, что низкотемпературное консервирование миелокариоцитов влечет за собой повышение активности АТФазы, причем более значительное повышение активности фермента наблюдается в случае использования в качестве криопротектора ПЭО-400.

Табл. 1. Список лит.: 4 назв.

УДК 57:536.48.047:576.851.48:576.851.252:576.851.51:536.48

Влияние различных режимов замораживания—оттаивания на некоторые виды бактерий. Цуцаева А. А., Сафонова Т. С., Микулинский Ю. Е., Воробьева И. И., Мануильский В. П. — Криобиология и криомедицина, 1977, вып. 3, с. 55—57.

Изучалось влияние различных режимов охлаждения—оттаивания на жизнеспособность, синтез белка и морфофункциональные свойства бактерий *E. coli*, *B. prodigiosum*, *Staphylococcus aureus* 209 при замораживании до -196°C . Показано, что оптимальным режимом замораживания является быстрое охлаждение и быстрое оттаивание.

Табл. 2. Список лит.: 4 назв.

УДК 57:536.48.047:615.387:612.112.94:536.48

Влияние низкотемпературного консервирования на морфофункциональные свойства тканевых лимфоцитов. Цуцаева А. А., Попов Н. Н., Воскобойникова Т. В., Останкова Л. В. — Криобиология и криомедицина, 1977, вып. 3, с. 57—59.

Изучалось влияние низкотемпературного консервирования на морфофункциональные свойства лимфоидных клеток, полученных из селезенки иммунных мышей линии С57BL/С. Клетки замораживали по двухэтапной программе до -196° под прикрытием отечественного криопротектора ПЭО-400 10%-ной концентрации. При изучении мазков, приготовленных из суспензии клеток до и после консервирования, установлено, что в процессе глубокого замораживания происходит некоторое изменение в процентном соотношении лимфоидных клеток. Более резистентными к криоповреждению оказались малые лимфоциты, чем лимфоидные клетки больших размеров.

Методом гемолитических плаков в геле выявлено, что деконсервированные клетки являются функционально активными, способными секретировать специфические иммуноглобулины. Процент плаков, формируемых клетками после низкотемпературной консервации, в наших опытах составил 60%.

Табл. 1. Список лит.: 3 назв.

УДК 57:536.48.047:611—018.46

Использование экзогенной ДНК с целью ускорения репаративных процессов в деконсервированных миелокариocyтах, имплантированных облученным реципиентам. Гольцев А. Н., Цуцаева А. А., Останкова Л. В., Микulinский Ю. Е., Дроздова О. А., Чеботарев Е. Е., Рябова З. З. — Криобиология и криомедицина, 1977, вып. 3, с. 59—62.

Изучено влияние препаратов экзогенной ДНК на пролиферативную активность деконсервированных миелокариocyтов, имплантированных облученным реципиентам. Результаты проведенных экспериментов показали, что экзогенная ДНК оказывала выраженное стимулирующее действие на репулационные свойства и скорость дифференцировки деконсервированных миелокариocyтов, что выражалось в увеличении веса селезенки облученных реципиентов и числа колоний в них по сравнению с аналогичными показателями при трансплантации деконсервированного костного мозга. Интенсивность стимуляции определялась дозой вводимого препарата и временем его введения. Наиболее выраженное стимулирующее действие в отношении пролиферативной активности и скорости созревания деконсервированных миелокариocyтов наблюдалось при одновременном введении костного мозга и препарата в дозе 800 γ.

Ил. 1. Список лит.: 12 назв.

УДК 57:536.48.047:615.387:612.014.424.5

Использование высоких давлений в процессе размораживания биологических объектов. Воротилин А. М., Тимошенко Ю. П., Корчиков С. Д., Полякова А. И. — Криобиология и криомедицина. 1977, вып. 3, с. 62—65.

Рассмотрены некоторые методы размораживания биологических объектов с использованием высокого гидростатического давления. Показано, что предлагаемый авторами способ размораживания, в котором плавление происходит при температурах ниже -22°C , позволяет уменьшить воздействие концентрированных растворов солей и криопротектора на клетки. Проведенные эксперименты показали, что размораживание по предлагаемому способу позволяет снизить концентрацию криопротектора в замораживаемых средах.

Ил. 2. Список лит.: 3 назв.

УДК 57:536.48.047:577.391:593.17.044.82

Влияние глубокого охлаждения (-196°C) и ультрафиолетового облучения при их совместном и последовательном действии на цисты простейших. Лозина-Лозинский Л. К., Успенская З. И., Радченко А. И. — Криобиология и криомедицина, 1977, вып. 3, с. 65—68.

Исследовалось влияние температуры -196°C и различных вариантов УФ-облучения на цисты инфузорий. Устойчивость цист к охлаждению не изменялась при неповрежденных дозах облучения. Облучение дозой 4200 эрг/мм^2 не влияло на выживаемость, а в сочетании с замораживанием приводило к резкому снижению жизнеспособности. При замораживании менее зрелых цист УФ-облучение повышает процент эксцистировавшихся инфузорий.

Табл. 2. Список лит.: 9 назв.

УДК 57:536.48.047:615.771.8

Радиочувствительность эритроцитов при низкой температуре. Осипенко А. П. — Криобиология и криомедицина, 1977, вып. 3, с. 68—70.

Эритроциты консервированной крови человека подвергали рентгеновскому облучению в дозах кратностью 1 и 3 при температуре 0°C без криопротектора и при -196°C с криопротектором (15%-ный глицерин). Изучали осмотическую резистентность эритроцитов после воздействия указанных выше факторов. Содержание Нв в гемолизированной крови определяли фотоэлектрокалориметрически. Эритроциты после облучения гемолизуются больше, когда подвергаются облучению при 0°C .

Список лит.: 10 назв.

УДК 57:536.48.047:621.3.029

Размораживание биологических объектов СВЧ-энергией. IV. О возможности осуществления программного размораживания. Тимошенко Ю. П. — Кробиология и криомедицина, 1977, вып. 3, с. 70—73.

Рассмотрена возможность осуществления программного размораживания криоконсервированных биообъектов СВЧ-энергией. Под словом «программный» подразумевается нагрев с заданной скоростью в любом температурном интервале внутри диапазона температур от -196 до $+37^{\circ}\text{C}$. Показано, что нагрев на частотах 433 и 915 мГц более предпочтителен в выполнении программного размораживания.

Ил. 2.

УДК 57:536.48.047:615.387:621.3.029

Размораживание биологических объектов СВЧ-энергией. V. Комбинированный способ размораживания биологических объектов. Тимошенко Ю. П., Лобынцева Г. С., Полякова А. И., Пахомова И. С. — Кробиология и криомедицина, 1977, вып. 3, с. 73—76.

Дан сравнительный анализ нагрева биологических объектов механизмом теплопроводности и СВЧ-энергией. Показано, что совместное использование двух способов теплоподвода существенно повышает скорость нагрева на всех этапах процесса размораживания. Прохождение зоны фазовых превращений с большей скоростью (до 200° в 1 мин) позволяет уменьшить воздействие концентрированных растворов солей и криопротектора, повышая тем самым количество жизнеспособных клеток в консервированных суспензиях клеток при пониженной концентрации криопротектора.

Ил. 2.

УДК 57:536.48.043:678.048

Некоторые аспекты оксигенирования полиолов. Кочуровская Г. Г., Матвиенко Н. М., Лубяный В. Г. — Кробиология и криомедицина, 1977, вып. 3, с. 76—79.

Изложены результаты исследования процесса полимеризации окиси этилена в среде глицерина при различных условиях — переменных давлениях, температурах, виде и концентрации катализатора. Определены оптимальные параметры указанного процесса и изучено влияние катализатора на скорость реакции. Установлено, что гидроокиси металлов I группы периодической системы элементов вследствие более выраженных металлургических свойств являются более активными катализаторами. Изучение механизма анионной полимеризации окисей олефинов дает основание подтвердить литературные данные о прохождении реакции через стадию образования промежуточного алкоголята, скорость образования его в процессе оксигенирования адекватно зависит от активности солеобразующего металла и его ионного радиуса.

Список лит.: 2 назв.

УДК 57:536.48.047:578.088.1:547.422:57

О взаимодействии криопротектора полиэтиленоксида с эритроцитами человека. Калугин Ю. В., Пашковская О. В. — Кробиология и криомедицина, 1977, вып. 3, с. 79—81.

Представлены результаты исследования связывания криопротектора ПЭО различной степени полимеризации с эритроцитами человека. Установлено, что значительное количество ПЭО 15%-ной концентрации при температуре 20°C связывается с эритроцитами в первые 10 мин. Интенсивность данного процесса находится в обратной зависимости от молекулярного веса криопротектора.

Табл. 1. Список лит.: 4 назв.

УДК 57:536.48.047:6:57.0.43:0.44

Биологические антифризы и криопротекторы. Шраго М. И. — Кробиология и криомедицина, 1977, вып. 3, с. 81—84.

Сопоставляются некоторые данные о состояниях временного снижения жизнеспособности в природе под влиянием холода, а также в условиях низкотемпературного консервирования биологических объектов. Освещается роль биологических антифризов и криопротекторов в указанных процессах.

Список лит.: 10 назв.

УДК 57:536.48.047:615.832.97

Динамика экспериментального крионекроза кожи. Исаев Ю. И., Панков Е. Я., Сандмирский Б. П. — Криобиология и криомедицина, 1977, вып. 3, с. 84—87.

В различные сроки после кратковременного действия низкой температуры изучены морфологические изменения, происходящие в коже экспериментальных животных. Криовоздействие вызывает дистрофические и некробиотические изменения во всех слоях кожи, не сопровождающиеся их полной гибелью. Процессы, происходящие при крионекрозе кожи, укладываются в картину неспецифического асептического воспаления, протекающего без демаркации и выраженной инфильтрации некробиотически измененных участков с последующим диффузным восстановлением всех структур кожи.

Ил. 2. Список лит.: 5 назв.

УДК 57:536.48.047:576.72:611:615.015

Действие низких температур на структурные элементы почки. Козлова В. Ф., Шенберг М. Г., Панков Е. Я., Суббота Н. П. — Криобиология и криомедицина, 1977, вып. 3, с. 87—90.

Представлены данные о морфологической оценке влияния низких температур и криопротекторов на целую почку и срезы ее коркового вещества. При различных условиях воздействий выявлены наиболее криолабильные и криостабильные структурные элементы ткани почек.

Список лит.: 8 назв.

УДК 57:536.48.047:612.119:616—089.843:616—006:616—08

Морфологическое и цитохимическое исследования стернальных пунктатов больных с гипоплазией гемопоэза до и после трансплантации криоконсервированного (-196°C) костного мозга. Маркова О. П., Обозная Э. И., Бабийчук Г. А., Прошкин В. С. — Криобиология и криомедицина, 1977, вып. 3, с. 90—91.

Дан анализ морфологических и цитохимических исследований стернальных пунктатов костного мозга больных раком молочной железы II—III степени, у которых в процессе химио- и лучевой терапии имели место нарушения гемопоэза. В процессе лечения наряду с гемостимулирующей терапией больным трансплантировали аллогенный костный мозг, предварительно подвергнутый криоконсервированию (-196°C) под защитой полиэтиленоксида молекулярного веса 400.

По данным миелограмм и содержанию фосфолипидов показано, что трансплантация аллогенного костного мозга способствует восстановлению костно-мозгового кровообращения и функционального состояния миелокариоцитов.

УДК 57:536.48.047

Ультраструктура клеток гладкой мышцы при замораживании до -30°C . Вальтер С. А. — Криобиология и криомедицина, 1977, вып. 3, с. 91—99.

Ткань гладкой мышцы ленты ободочной кишки морской свинки медленно замораживали со скоростью 1° в 1 мин до температуры -30°C без криозащитного агента и замещали в замороженном состоянии при этой температуре. Целью настоящих опытов была попытка выяснить, происходит ли повреждение клеток только при замораживании, а также получение доказательств распределения фазы льда в замороженных таким способом образцах мышц.

Установлено, что несмотря на значительное сморщивание мышечных клеток в результате применения к незамороженным мышцам методики замещения в замороженном состоянии, их структурный вид подобен тому, который наблюдается в мышцах, замороженных при температуре -30°C . Не было никаких доказательств структурного повреждения мышечных клеток при замораживании до температуры -30°C , невозможно также было установить предыдущее наличие кристаллов внутриклеточного льда.

Ил. 5. Список лит.: 17 назв.

УДК 57:536.48.047

Влияние pH на функцию и структуру гладкой мышцы, охлажденной до -13°C в замороженной среде. Тейлор М. Дж., Вальтер С. А., Эльфорд Б. — Криобиология и криомедицина, 1977, вып. 3, с. 99—107.

На основании изометрической сократительной реакции на гистамин определялась сократительная функция отдельных полос гладкой мышцы морской свинки до и после хранения при -13°C в обогащенных калием буферных растворах PIPES, содержащих 30% ДМСО и имеющих различные значения pH. Структурную сохранность тканей во время и после охлаждения определяли с помощью электронного микроскопа.

Зависимость восстановления ткани от уровня pH была четко продемонстрирована после хранения в течение более чем 17 ч при -13°C . Однако, несмотря на большие различия в восстановлении функции мышц, охлажденных в средах с низким и высоким значением pH, никаких явных различий в ультраструктуре мышц не наблюдалось. У мышц обеих групп, зафиксированных после отогрева до температуры 37°C , не наблюдалось морфологических черт, характерных для незамороженных мышц. Но исследование мышечных клеток, зафиксированных при температуре -13°C в 30% ДМСО, показало, что сократительные волокна образцов обеих групп подвергались значительной реорганизации и агрегации.

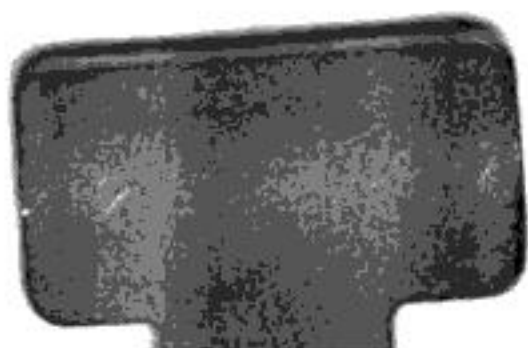
Ил. 3. Список лит.: 24 назв.

УДК 57:536.48.047:615.832.97

Экспериментальное обоснование применения криогенного метода в лечении ожогов. Сандомирский Б. П., Пекарский Д. Е., Исаев Ю. И. — Криобиология и криомедицина, 1977, вып. 3, с. 107—110.

В экспериментах на животных применялось охлаждение зоны ожога парами и брызгами жидкого азота. При этом снималась послеожоговая гипертермия тканей, уменьшалась токсичность субстратов из обожженной кожи, отмечалось снижение воспалительной реакции, наступала нормализация капиллярной проницаемости и микроциркуляции. Гистологическое исследование подтверждает защитное действие криообработки ожоговых ран от значительной деструкции и положительное действие на процессы регенерации.

Ил. 2. Список лит.: 11 назв.



1 руб. 60 коп.

«НАУКОВА ДУМКА»
КРИОБНОЛОГИЯ И КРИОМЕДИЦИНА, 1977,
вып. 3, 1—120