КРИОБИОЛОГИЯ И КРИОМЕДИЦИНА

ISSN 0130-2663



14

1984

Матеріал, захищений авторським правом



Матеріал захищений авторським правом

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ И КРИОМЕДИЦИНЫ

КРИОБИОЛОГИЯ И КРИОМЕДИЦИНА

РЕСПУБЛИКАНСКИЙ МЕЖВЕДОМСТВЕННЫЙ СБОРНИК
НАУЧНЫХ ТРУДОВ

Основан в 1975 г.

ВЫПУСК
14

КИЕВ НАУКОВА ДУМКА 1984

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043

Приведены результаты экспериментальных исследований водных растворов белков и криопротекторов, подвергаемых замораживанию. Показано влияние низкотемпературного консервирования на электрические параметры суспензий эритроцитов, ультраструктуру ткани печени, связывания гормона трийодтиронина с соответствующими рецепторами клеток печени, положительное влияние криотерапии ожогов на коагуляционный потенциал крови при ожоговой травме. Даны новые методические подходы к решению теоретических вопросов криобиологии.

Для биологов и медиков, а также специалистов, разрабатывающих теоретические и прикладные вопросы низкотемпературного консервирования биологических объектов.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Н. С. Пушкарь (ответственный редактор), А. М. Белоус (зам. ответственного редактора), Ю. А. Иткин, Г. С. Лобынцева (ответственный секретарь), В. И. Луговой, В. А. Моисеев, Ю. М. Рудько, Б. П. Сандомирский, А. А. Цуцаева, М. Г. Шенберг, М. И. Шраго (зам. ответственного редактора)

Адрес редколлегии

310015 Харьков 15, ул. Переяславская, 23
Институт проблем криобиологии и криомедицины АН УССР
Тел. 72 41 43

Редакция межведомственных сборников

К $\frac{4106000000\text{-}502}{M221(04)\text{-}84}$ 384-84

© Издательство «Наукова думка», 1984

Матеріал, захищений авторським правом

I. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 539.143.43:(577.112:54—145.2)

В. В. Родин, Ф. Ш. Исангалин, В. Я. Волков

СТРУКТУРА ВОДНЫХ РАСТВОРОВ БЕЛКОВ В ПРИСУТСТВИИ КЛАТРАТОВ КСЕНОНА

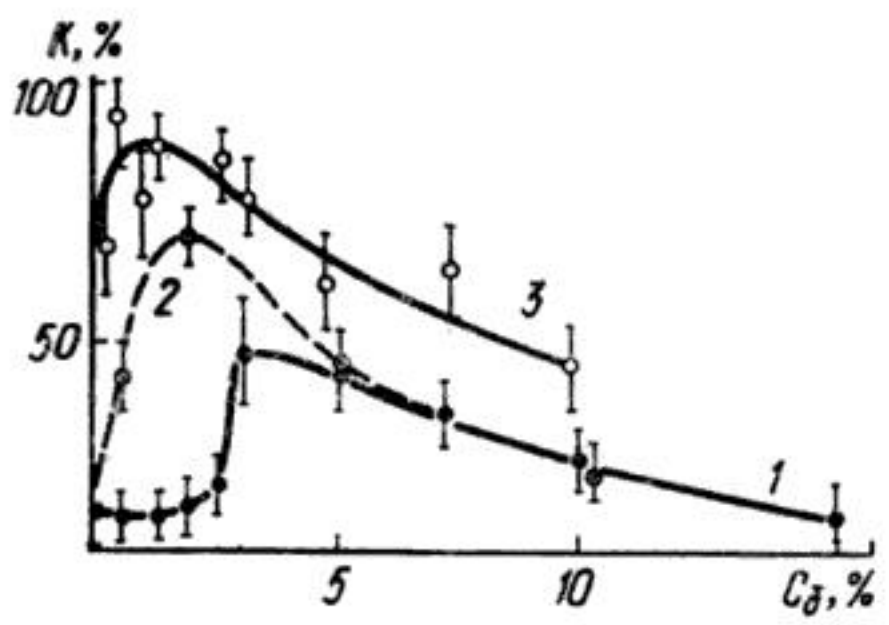
Известно, что сохранение жизнеспособности организмов достигается путем перевода их в состояние обратимого анабиоза с помощью процессов замораживания, высушивания или осмотического обезвоживания [3]. В криобиологических исследованиях, связанных с изучением процессов замораживания—оттаивания клеточных структур, возникает ряд проблем, обусловленных губительным влиянием обезвоживания на структурную целостность и функциональную активность клеточных компонентов (мембран, ДНК, белков-ферментов и т. д.). В связи с этим необходим поиск новых методов обезвоживания или связывания молекул воды. Одним из эффективных, но малоизученных в плане биологических применений способов снижения подвижности молекул воды в растворах и суспензиях является образование клатратов [1]. В качестве клатратообразующих веществ наибольший интерес представляют инертные газы, так как в первом приближении они не оказывают токсического действия на биологические системы и химически инертны по отношению к компонентам раствора. Клатраты инертных газов, в частности ксенона, образуются при положительных температурах и сравнительно невысоких давлениях [1]. В растворе происходят явления, во многом сходные с процессами, наблюдаемыми при замораживании: появляется твердая фаза, а растворенные вещества вытесняются в жидкую, при этом подвижность молекул воды снижается [4]. В то же время структура и физические свойства клатратных кристаллов и льда существенно различаются [1]. Это указывает на то, что действие клатратов на биологические структуры может быть совсем иным, чем льда при замораживании.

В настоящей статье поставлена задача исследования особенностей образования клатратов ксенона в растворах белков, определения влияния природы белка на стабильность клатратов и изучения изменения подвижности молекул при клатратообразовании.

Методика исследования. В работе использовали ксенон высокой чистоты (ГОСТ 10219—77), яичный альбумин (ЯА), фирмы «Реанал», сывороточный альбумин быка (САБ) фирмы ICN, рибонуклеазу А фирмы SIGMA без дополнительной очистки. Растворы белков готовили в бидистиллированной и тяжелой воде $Д_2О$ с изотопным обогащением 99,8 %. Для удаления растворенных газов растворы белков перед использованием продували ксеноном. Получение клатратов ксенона и их регистрирование проводили по методике, данной в работе [5]. Измерение ЯМР-параметров протонов образцов проводили на частотах резонанса $f=20$ и 90 МГц. Время продольной релаксации T_1 определяли с помощью импульсной последовательности 90°-τ-90°, а время поперечной релаксации T_2 — с помощью последовательности 90°-τ-—180°-τ-эхо. В некоторых экспериментах величину T_2 устанавливали с помощью серии Карра—Парселла—Мейбума—Гилла (КПМГ). Коэффициент самодиффузии Д измеряли методом постоянного градиента магнитного поля [5]. Температура образцов поддерживалась с точностью 1 °С.

Матеріал, захищений авторським правом

Результаты и их обсуждение. На кривых *1—3* (рис. 1) в области малых концентраций (0,5—4 %) показаны максимумы, положение и величина которых несколько различаются для разных белков. Согласно Полингу [8], молекулы воды вблизи некоторых боковых групп молекул белков могут быть стабилизированы в структурах, близких к структуре клатратов. Позднее подчеркивалось, что неполярные группы и гидрофобные участки поверхности молекул белков могут являться зароды-



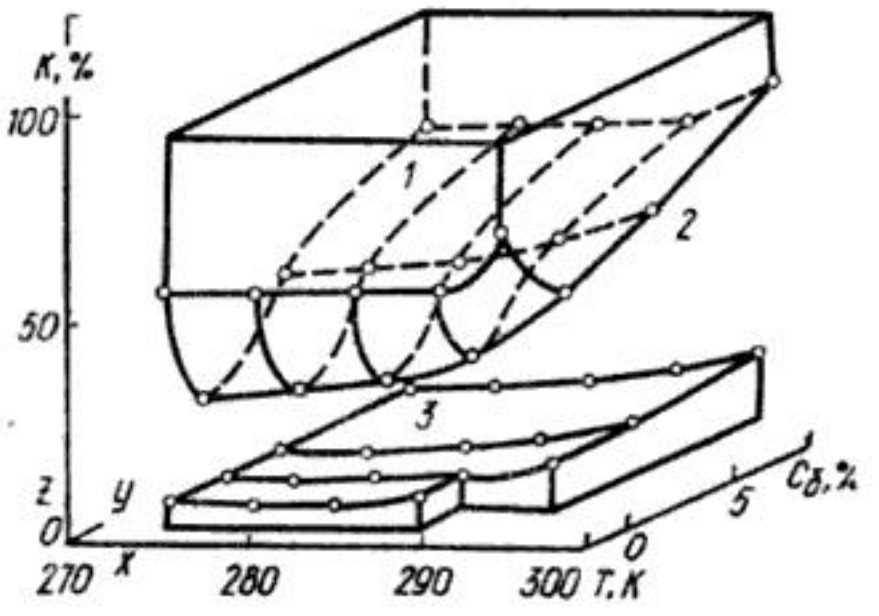


Рис. 1. Зависимости количества воды в твердой фазе клатратов ксенона (К) от концентрации белка в исходном растворе при температуре 280 К.

1 — бычий сывороточный альбумин; *2* — яичный альбумин; *3* — рибонуклеаза.

Рис. 2. Фазовая диаграмма состояния воды в растворах яичного альбумина различной концентрации с клатратами ксенона:

1 — твердая фаза воды в клатратах ксенона со временем ССИ протонов ~ 10 мкс: *2* — фаза жидкой воды со временем продольной релаксации $T_1 \simeq 300$ мс; *3* — фаза воды, прочно связанной с белком, и протоны белковой глобулы со временем релаксации $T_1 \simeq 40$ мс.

шами образования клатратоподобных структур [7]. На основании этих данных можно предположить, что процесс образования клатратов ксенона в водных растворах белков начинается в районе неполярных участков белковых молекул. В зонах гидрофобных участков поверхности молекул белков могут образовываться клатраты ксенона в виде небольших доменов, слияние которых приводит затем к образованию более крупных кристаллов клатратов. По-видимому, этот процесс агрегирования доменов и роста количества клатратов определяется количеством белка в растворе. При небольшом повышении концентрации белка число гидрофобных участков возрастает; значит, увеличиваются количество клатратных доменов и общее количество клатратов в растворе. Однако, когда белка много и значительное количество воды будет израсходовано на гидратацию белка связыванием водородными связями с полярными участками биомакромолекул, процесс образования клатратов будет затруднен и количество образующихся клатратов уменьшится. На рис. 1 видно, что существенное снижение количества клатратов происходит уже с концентрации белка 7—10 %. Возможно, что соотношение числа полярных и неполярных групп на поверхности белковых молекул определяет положение и величину максимумов для трех исследованных растворов белков.

При исследовании процесса продольной релаксации протонов в водных растворах ЯА с клатратами ксенона был обнаружен неэкспоненциальный характер восстановления продольной намагниченности, для которой выделены две компоненты времени спин-решеточной релаксации T_1. В диапазоне температур 275—290 К время релаксации медленной компоненты при частоте резонанса 20 МГц равнялось 300—400 мс, а быстрой — 20—40 мс. На рис. 2 по оси x обозначена температура, по оси y — концентрация альбумина, по оси z — относительная доля воды в разных фазах, определенная методом ЯМР. Диаграмма получена по данным ЯМР следующим образом. Долю фазы *1*, соответствующую воде в твердых клатратных структурах, определяли по методике работы [5]. Количественное соотношение фаз *2* и *3* вычисляли

Матеріал, захищений авторським правом

по амплитудам медленной и быстрой компонент времени продольной релаксации T_1.

Для водных растворов САБ с клатратами ксенона спад сигнала спинового эха на частоте резонанса 20 МГц разлагался на две экспоненциальные кривые, характеризующиеся медленным и быстрым временем поперечной релаксации T_2. Быстрая компонента в исследованном интервале концентраций белка 0—10 % составляла 0,5—2 мс, а медленная изменялась от 10 до 100 мс в зависимости от количества клатратов и была снижена по сравнению с ее величиной в растворе без клатратов (300—900 мс). Кроме того, при образовании клатратов в растворах САБ снижалась и величина T_1 протонов водной компоненты. Когда в растворе белка образуются клатраты ксенона, количество жидкой воды уменьшается. В результате возрастает концентрация белка относительно жидкой фазы и монотонно растет скорость продольной релаксации протонов воды в растворах САБ с клатратами ксенона (рис. 3). На рис. 3 видно, что ход зависимости роста скорости продольной релаксации $1/T_1$ для растворов САБ с клатратами ксенона повторяет концентрационную зависимость $1/T_1$ для растворов без клатратов. Такое поведение говорит о том, что на образование клатратов идет свободная вода, а подвижность оставшейся жидкой воды снижается. Об уменьшении подвижности воды при образовании клатратов свидетельствует также поведение величин энергий активации E_a движений молекул воды, определенных по линейным участкам зависимости $\ln T_1$ для растворов ЯА с клатратами ксенона. При температурах 275—287 К в растворах ЯА величина E_a была близка к значению для чистой воды и составляла 16,8 кДж/моль. При образовании клатратов ксенона величина E_a возрастала в пределах 20,9—22,6 кДж/моль.

По сравнению с поведением $1/T_1$ (см. рис. 3) характер поведения зависимости скорости поперечной релаксации $1/T_2$ протонов воды от концентрации белка в жидкой фазе образцов с клатратами отличается от аналогичной зависимости в растворах без клатратов (рис. 4). При анализе этих кривых можно заметить, что при образовании клатратов на T_2, кроме уменьшения количества свободной воды, возможно, влияет еще ряд факторов, в частности гетерогенность образцов. Поскольку наличие области клатратов с жесткой решеткой из молекул воды должны приводить к появлению магнитной неоднородности образцов, можно предположить, что это повлияет на измеряемую величину T_2. Известно, что применение последовательности КПМГ при измерении T_2 в гетерогенных системах позволяет однозначно выделить вклад в релаксационный распад ядерной намагниченности, обусловленный диффузией частиц в неоднородном магнитном поле, и оценить величину неоднородности поля в объеме образца [2]. Однако исследование скорости поперечной релаксации $1/T_2$ от времени разделения импульсов τ в последовательности КПМГ для водных растворов САБ с клатратами ксенона и без них показало, что клатратные неоднородности, по крайней мере с размерами $x \geqslant 0{,}1$—1 мкм, не могут определять поведение $1/T_2$. В то же время вполне возможна мелкодисперсная структура образцов с клатратами характерных размеров — менее 0,1 мкм. Дисперсные частицы связывают свободную воду и влияют на измеряемую величину T_2. По-видимому, при повышении количества клатратов мелкие кристаллы могут сливаться в большие клатратные домены. При этом увеличиваются структурные препятствия для движения молекул жидкости, из-за чего измеряемый коэффициент самодиффузии $Д$ при 40—50 % клатратов в растворе САБ снижается на порядок по сравнению с величиной $Д_{воды}$ ($Д \simeq 0{,}085\, Д_{воды}$).

Другим фактором, определяющим поведение $1/T_2$ (см. рис. 4), может быть снижение подвижности белковых молекул при образовании клатратов ксенона. Для проверки этого предположения были исследованы продольная и поперечная релаксации протонов в растворах САБ в тяжелой воде при наличии и отсутствии клатратов ксенона на частоте

Матеріал, захищений авторським правом

резонанса 90 МГц. В исследованных образцах кривая восстановления продольной намагниченности разлагалась на две компоненты с временами релаксации T_1' и T_1'' (от протонов белка T_1'' и протонов НДО T_1'), в то время как спад сигнала спинового эха разлагался на три экспоненциальные кривые, характеризующиеся временами спин-спиновой релаксации T_2', T_2'' и T_2^* (две компоненты от протонов белка и од-

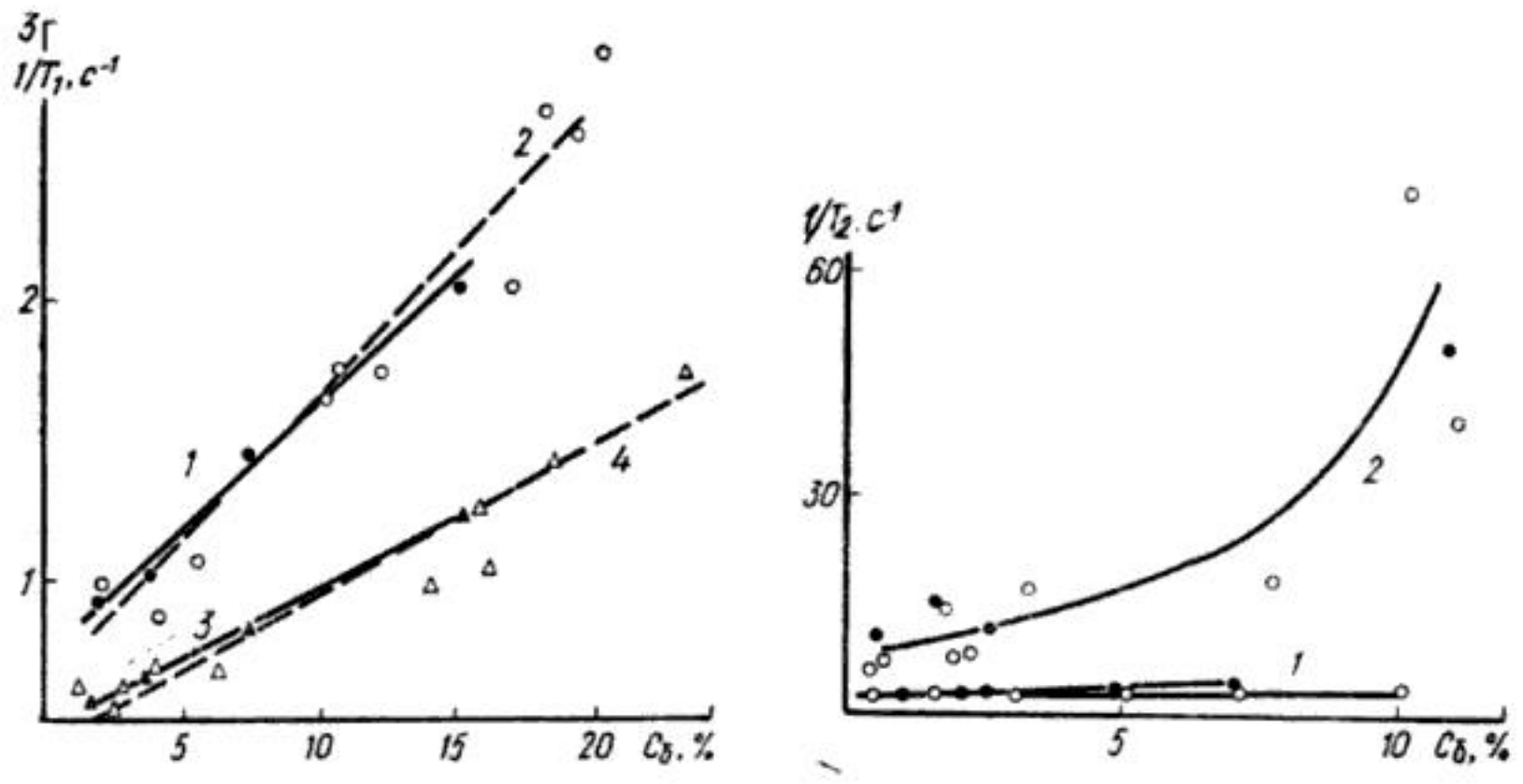


Рис. 3. Зависимости скорости продольной релаксации протонов воды от концентрации белка в жидкой фазе водных растворов САБ (*1, 3*) и растворах САБ с клатратами ксенона (*2, 4*) на частотах резонанса 20 (*1, 2*) и 90 МГц (*3, 4*) при температуре 280 К.

Рис. 4. Зависимости скорости поперечной релаксации протонов воды от концентрации белка в жидкой фазе в водных растворах САБ в отсутствие (*1*) и при наличии клатратов ксенона (*2*).

Светлыми кружками отмечены измерения на частоте резонанса 20 МГц, темными — на частоте 90 МГц при температуре 280 К.

на — от протонов воды). Отнесение компонент T_1 и T_2 к протонам молекул воды НДО и белка производилось путем сравнения зависимостей амплитуд этих компонент от концентрации белка и H_2O в растворе. Значения величин указанных выше компонент представлены в таблице. Величины T_1' и T_2' водной компоненты при образовании клатратов заметно уменьшались с повышением концентрации белка и количества клатратов ксенона. Такое поведение еще раз подтверждает снижение подвижности молекул воды. Времена компонент T_2'' — от протонов боковых групп молекул белка — и T_2'' — от протонов подвижных частей белковой глобулы и их амплитуды при образовании клатратов несколько уменьшаются. Это говорит прежде всего о том, что замедляются вращательные движения боковых групп молекул белка и подвижность белковых глобул в целом. По-видимому, происходит это частично из-за чисто стерических эффектов присутствия клатратов ксенона, а также из-за жесткой связи клатратов с гидрофобными участками молекул белков. В то же время величина компоненты времени продольной релаксации T_1'' протонов молекул белка не изменяется при образовании клатратов ксенона. Такое поведение свидетельствует о том, что даже при снижении подвижности белковых молекул в объеме всего раствора внутренние движения глобул, за которые ответственна компонента T_1'', сохраняются. Поскольку молекула сывороточного альбумина имеет доменную структуру [6], такими внутренними движениями могут быть колебания доменов белковой глобулы относительно одна другой.

На основании изложенных результатов можно сделать выводы.

Метод ЯМР-релаксации применим для определения доли воды, входящей в твердые клатратные структуры в растворах белков. На основе данных этого метода построена фазовая диаграмма состояния воды в растворе белка с клатратами ксенона.

Матеріал, захищений авторським правом

Времена спин-решеточной и спин-спиновой релаксации протонов растворов САБ в тяжелой воде при наличии и отсутствии клатратов ксенона (температура 280 К; $f=90$ МГц)

Время	Концентрация САБ в растворе, %					
	3		6		12	
	Количество воды в клатратах по данным ЯМР, %					
	0	37,6	0	38,0	0	15,4
T_1', с	4,36	1,47	2,28	1,85	1,56	1,28
T_1'', с	0,50	0,48	0,42	0,45	0,38	0,40
T_2', мс	252,40	20,30	235,20	22,80	131,10	27,50
T_2'', мс	3,76	1,72	3,78	2,00	2,71	1,42
T_2''', мс	0,83	0,23	0,35	0,28	0,44	0,17

Получена зависимость количества образующихся клатратов от концентрации белка в растворе, выявлен максимум в диапазоне концентраций белка 0,5—4 % и обнаружена зависимость его величины и положения от природы белка. Высказано предположение, что это явление обусловлено соотношением полярных и неполярных групп на поверхности молекул белков.

Показано, что наличие «барьеров» и структурных препятствий, возникающих при образовании клатратов ксенона, существенно снижает измеряемый коэффициент самодиффузии молекул воды в растворах белка. В действительности трансляционная подвижность молекул воды в жидкой фазе, по-видимому, снижается в значительно меньшей степени.

Из данных ЯМР-релаксации следует, что при образовании клатратов ксенона, как и при медленном замораживании растворов, происходит вытеснение молекул белка в объем жидкой воды.

Анализ зависимостей скоростей релаксации $1/T_1$ и $1/T_2$ от количества белка в жидкой фазе растворов САБ с клатратами показал, что в образовании клатратов принимает участие в основном свободная вода, при этом снижается подвижность не только молекул воды, но и молекул белка.

1. *Бык С. Ш., Макогон Ю. Ф., Фомина В. И.* Газовые гидраты. — М.: Химия, 1980. — 296 с.
2. *Волков В. Я., Даутов Р. А., Непримеров Н. Н.* Стимулированное эхо и трансляционное движение ядер в гетерогенных системах. — В кн.: Радиоспектроскопия. Пермь, 1980, с. 189—193.
3. *Голдовский А. М.* О состоянии организмов на стадиях анабиоза. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 7, с. 6—10.
4. *Родин В. В., Архангельский А. Н., Исангалин Ф. Ш., Волков В. Я.* Исследование гидратов ксенона в водных растворах белков методом ЯМР-релаксации. — В кн.: Тез. докл. Всесоюз. симпоз. «Магнит. резонанс в биологии и медицине». М.; Черноголовка, 1981, с. 115—116.
5. *Фаррар Т., Беккер Э.* Импульсная и Фурье-спектроскопия ЯМР. — М.: Мир, 1973. — 164 с.
6. *Geisow M.* Serum albumin structure and function. — Nature, 1977, **270**, N 5637, p. 476—477.
7. *Klotz I. M.* Role of water structure in macromolecules. — Fed. Proc., 1965, **24**, suppl. 15, 24 through, p. 33.
8. *Pauling L.* A molecular theory of general anaesthesia. — Science, 1961, **134**, p. 15—21.

ВНИИ прикл. микробиологии, Серпухов

Получено 10.02.82

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043.539.143:(546.295:546.212)+53.092:(546.295:546.212)

В. В. Родин, А. Н. Архангельский, Ф. Ш. Исангалин, В. Я. Волков

ПОЛУЧЕНИЕ КЛАТРАТОВ КСЕНОНА В ВОДЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ СВОЙСТВ ИМПУЛЬСНЫМ МЕТОДОМ ЯМР

В настоящее время принято считать, что механизм защитного действия криопротекторов во многом обусловлен их влиянием на процессы кристаллизации воды, гидратации биомембран и макромолекул [5, 7]. Анализ литературных данных показывает, что, кроме традиционных криопротекторов (глицерин, ДМСО, ПВП, ПЭГ и др.), имеется ряд соединений, способных влиять на указанные параметры. Установлено, что некоторые анестетики, в том числе инертные газы, изменяют структуру биологических соединений в водной среде [3, 10], влияя на состояние и количество связанной с биополимерами воды. В частности, в литературе есть сведения, что присутствие инертного газа ксенона в водных растворах гемоглобина повышает количество связанной с белком воды [11].

Замораживание водных растворов в присутствии инертных газов приводит к образованию кристаллической решетки, отличной по свойствам от решетки обычного льда [1]. Более того, повышенное давление инертных газов при положительных температурах приводит к образованию в растворах клатратных соединений, представляющих собой кристаллические структуры из молекул газа и воды [1]. Например, клатраты ксенона стабильны при 275 К и давлении не менее 0,15 МПа [1]. При замораживании эти клатраты могут способствовать образованию мелкокристаллических структур, являясь зародышами льдообразования. Исследование влияния ксенона и его клатратов на состояние воды в растворах будет способствовать выбору условий для его возможного применения в криобиологических целях.

Для изучения подвижности молекул воды и «гостя» в клатратных структурах использовался метод ЯМР [4, 8], однако для определения количества образующихся клатратов он еще не применялся. В данной статье методом импульсного ЯМР исследованы образование в воде клатратов ксенона и их молекулярная динамика в присутствии жидкой фазы.

Методика исследования. В работе использовали ксенон высокой чистоты (ГОСТ 1029—77). Бидистиллированную воду перед использованием продували ксеноном. Для проведения ЯМР-исследований клатратов ксенона были разработаны специальные стеклянные ампулы из пирекса с толщиной стенки 1—1,5 мм (рис. 1). Ампулы закрывали зажимным устройством из латуни, с помощью которого к стеклянному фланцу прижимается толстая прокладка из мягкой резины. Газ из баллона через редуктор подавался в ампулу с помощью медицинской иглы путем прокола резиновой прокладки. Для более надежной герметизации прокладку смазывали с обеих сторон силиконовой вакуумной смазкой, в которой резина не набухает. При введении и выведении иглы последняя смазывает канал прокола, улучшая герметизацию. В качестве материала прокладки использовали мягкую листовую вакуумную резину или резиновые пробки от пенициллиновых флаконов. Величину безопасного рабочего давления для ампул из пирекса рассчитывали по формуле $P_{раб} — 14{,}1$ Т/Д (МПа), где Т — толщина стенки ампулы; Д — диаметр внешней части, даны в миллиметрах [9]. При контрольных испытаниях ампулы разрушались при давлении 5—7 МПа. Клатраты ксенона получали статическим методом [1]. Для этого 0,1—0,2 мл воды в описанной ампуле помещали в термостат с температурой 274—278 К. Образцы выдерживали под давлением газа 0,2—1,2 МПа до образования однородной снегообразной

Матеріал, захищений авторським правом

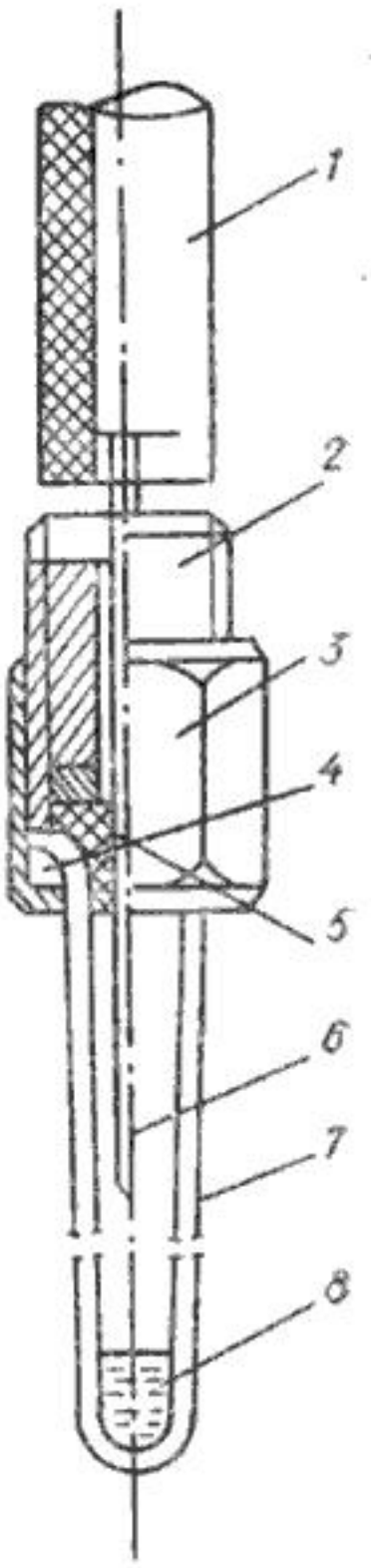


Рис. 1. Ампула для получения клатратов инертных газов:
1 — армированный полипропиленовый шланг; *2* — бронзовая втулка; *3* — бронзовая накидная гайка; *4* — силиконовая прокладка; *5* — резиновая пробка; *6* — игла от шприца «Рекорд» (ГОСТ 64—1—102—73); *7* — пирексная ампула с внешним диаметром 9,5 мм, внутренним — 6,5 мм и длиной 80 мм; *8* — раствор образца с клатратами.

массы. Для ускорения процесса клатратообразования в некоторых случаях проводили инициацию путем механического встряхивания или кратковременного охлаждения стенок ампулы сухим льдом. При этих условиях клатраты образовывались за время от 1—2 суток до 1 часа.

Время спин-решеточной релаксации T_1 измеряли с помощью последовательности импульсов $180°=\tau=90°$, а спин-спиновой T_2 — с помощью серии Карра—Парселла—Мейбума—Гилла [6]. Температура в датчике ЯМР-релаксометра поддерживалась с точностью 1 °С. «Мертвое время» приемника релаксометра ~15 мкс, рабочая частота для протонов — 20 МГц.

Результаты и их обсуждение. Определение количества клатратов в образцах проводили по уменьшению спада свободной индукции (ССИ) после 90°-ного импульса. В результате исследования релаксационных характеристик образцов с клатратами было показано, что ССИ имеет две компоненты, которые можно отнести к клатратам и жидкой воде. Время релаксации короткой компоненты менее 25 мкс. Это свидетельствует о том, что подвижность молекул воды в клатратных структурах примерно на пять порядков ниже, чем в жидкой воде ($T_2 \simeq 2{,}6$ с). Поскольку короткая компонента ССИ, обусловленная наличием клатратов, не регистрируется через 25 мкс после 90°-ного импульса, фиксирование измерительной точки на расстоянии 30 мкс и более позволяло измерять только ССИ протонов молекул жидкой воды. Процент молекул воды K, образовавших клатраты, рассчитывали по формуле

$$K = \frac{A_0 - A_к}{A_0} 100\ \%,$$

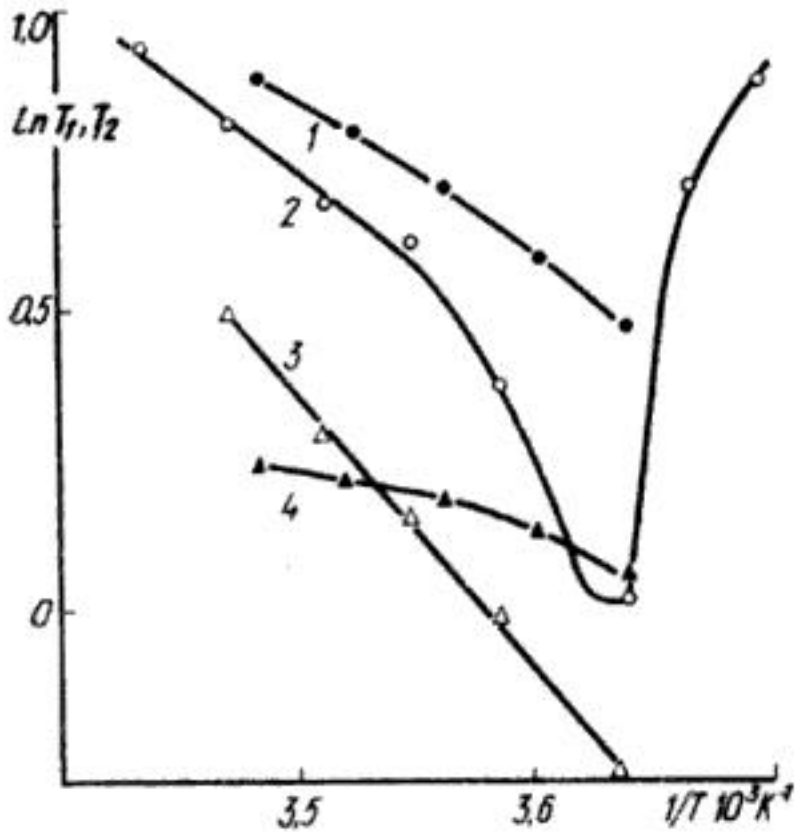
где A_0 и $A_к$ — амплитуда ССИ собственно до и после образования клатратов в образце.

При описанных выше условиях эксперимента типичная доля воды, идущей на образование клатратов, составляла 15—30 % общего количества воды в исходном образце.

На рис. 2 в полулогарифмическом масштабе приведены зависимости времен продольной и поперечной релаксации протонов воды. В одном образце (рис. 2, кривые *2, 3*) после образования клатратов при 275 К температуру понижали до 269 К (при этой температуре оставалось 10 % молекул жидкой воды общего количества воды в образце), а затем постепенно нагревали до 290 К, измеряя его релаксационные характеристики по мере нагрева. Другие образцы (рис. 2, кривые *1, 4*) после образования клатратов не замораживали, а нагревали от 274 до 288 К. Для предварительно замороженного образца величины времен релаксации T_1 и T_2 в области температур 274—281 К оказываются несколько ниже по сравнению с величинами T_1 и T_2 для незамороженного образца. По-видимому, это различие обусловлено дополнительным образованием клатратов ксенона при охлаждении, которые в отличие от обычного льда при отогреве плавятся в более широком интервале температур. Когда температура образцов с клатратами ксе-

Матеріал, захищений авторським правом

нона превышает 283 К, измеряемые величины T_1 становятся близкими к значениям T_1 для чистой воды, но все же остаются меньше их на 8—10 %. Если по линейным участкам температурных зависимостей $\ln T_1$ на рис. 2 в области 280—290 К определить энергии активации E_a — движения молекул жидкой воды, то для предварительно замороженного образца величина $E_a = 26{,}4 \pm 3{,}3$ кДж/моль, а для незамороженного образца величина $E_a = 20{,}9 \pm 2{,}5$ кДж/моль близка к значе-



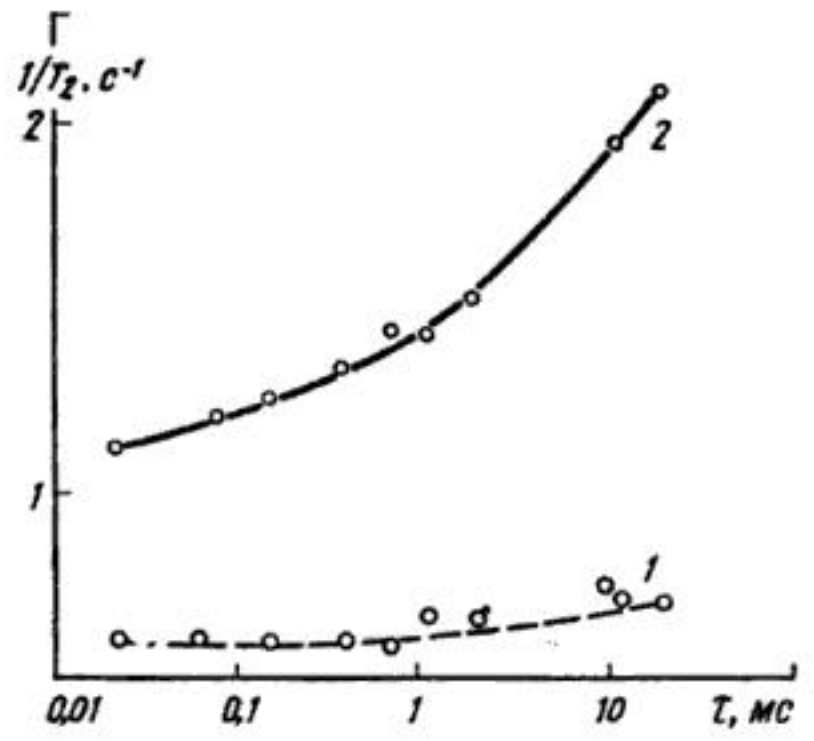


Рис. 2. Температурная зависимость логарифма времени продольной T_1 (*1*, *2*) и поперечной T_2 (*3*, *4*) релаксации протонов воды в образцах с содержанием клатратов 25 % (*2*, *3*) и 16 % (*1*, *4*).

Рис. 3. Зависимости скорости поперечной релаксации протонов $1/T_2$ для чистой воды (*1*) и воды в присутствии клатратов ксенона (*2*) от времени разделения импульсов в серии Карра — Парселла — Мейбума — Гилла при температуре 280 К.

нию энергии активации для чистой воды. В то же время в работе [8] по температурной зависимости ширины линии ЯМР в клатратах ксенона выше 277 К получили величину $E_a = 24{,}7 \pm 3{,}3$ кДж/моль. Авторы работы считают, что эта энергия активации характеризует подвижность молекул в ячейках клатратов, так как используемый метод получения клатратов основывается на длительном выдерживании сильно измельченных кусочков льда при отрицательных температурах под высоким давлением ксенона и якобы исключает наличие какого-либо количества жидкой воды. Однако узкая линия ЯМР-поглощения, наблюдаемая на фоне широкой линии от протонов твердой фазы клатратов, скорее всего обусловлена жидкой водой, присутствующей на поверхности крупинок льда и не связанной в клатраты. Поэтому величина энергии активации, полученная в работе [8], близка к величине E_a для жидкости, полученной в настоящей работе, и не может отражать состояние молекул в жестких клатратных структурах. Заметим, что определение энергии активации по таким графикам, когда при изменении температуры меняются не только подвижность молекул воды, но и соотношение жидкой и твердой фаз, представляется недостаточно корректным.

Как отмечалось, исследуемые образцы представляли собой смесь клатратного льда и значительного количества жидкой воды (70—80 % молекул в образце). При этом жидкая вода при перевертывании ампул не выливалась, что указывает на ее распределение в капиллярах между жесткими клатратными структурами. На существование микрогетерогенности указывает и снижение измеряемой величины T_2 протонов воды при образовании клатратов ксенона (см. рис. 2). В работе [2] отмечалось, что в гетерогенных системах из-за разницы в магнитных восприимчивостях жидкости и твердого тела на границе раздела фаз в магнитном поле возникает градиент намагниченности. В результате

Матеріал, захищений авторським правом

движение протонов молекул жидкой фазы в пограничном слое приводит к быстрому распаду ядерной намагниченности и снижению измеряемой величины T_2. Авторы работы [2] считают, что применение последовательности Карра—Парселла—Мейбума—Гилла при измерении T_2 позволяет однозначно выделить вклад в релаксационный распад ядерной намагниченности, обусловленный диффузией частиц в неоднородном магнитном поле, и оценить величину неоднородности поля в объеме образца. Поэтому для оценки степени неоднородности раствора в настоящей работе было проведено исследование зависимости скорости поперечной релаксации $1/T_2$ от интервала τ между импульсами в серии Карра—Парселла для воды с клатратами и без них (рис. 3). Скорость поперечной релаксации протонов молекул жидкой воды при изменении τ в диапазоне от 0,01 до 10 мс изменяется слабо, тогда как в присутствии клатратов $1/T_2$ заметно увеличивается с возрастанием τ, когда величина τ превышает 1 мс. Используя известное соотношение для зависимости длины свободного пробега молекул от коэффициента самодиффузии $x^2=2\,Д\tau$, можно оценить характерный размер неоднородной области, в которой диффузионное движение молекул влияет на спад сигнала спинового эха. Эта оценка дает величину неоднородностей $x\gtrsim 1$ мкм, что свидетельствует о том, что характерные размеры кристаллов клатратов ксенона, образующихся в чистой воде, — порядка 1 мкм. На основании изложенных результатов можно сделать такие выводы. Разработана методика получения клатратов газов в ампулах для ЯМР-исследований под давлением.

По данным ЯМР-релаксации подвижность молекул воды в клатратных структурах, стабилизированных ксеноном, примерно на пять порядков ниже по сравнению с подвижностью молекул жидкой воды.

Предложен способ определения количества клатратов газа по амплитуде медленной компоненты спада свободной индукции сигнала протонов методом ЯМР.

Установлено, что при образовании клатратов ксенона в растворах возникает жесткая разветвленная решетка из взаимосвязанных клатратных структур с характерным размером ячеек ~ 1 мкм. В ячейках между кристаллами клатратов находится жидкая вода. Снижение подвижности молекул воды в ячейках, по-видимому, обусловлено влиянием растворенного газа и кристаллов клатратов.

1. *Бык С. Ш., Макогон Ю. Ф., Фомина В. И.* Газовые гидраты. — М.: Химия, 1980. — 296 с.
2. *Волков В. Я., Даутов Р. А., Непримеров Н. Н.* Стимулированное эхо и трансляционное движение ядер в гетерогенных системах. — В кн.: Радиоспектроскопия. Пермь, 1980, с. 189—193.
3. *Родин В. В., Архангельский А. Н., Исангалин Ф. Ш., Волков В. Я.* Исследование гидратов ксенона в водных растворах белков методом ЯМР-релаксации. — В кн.: Тез. докл. Всесоюз. симпоз. «Магнит. резонанс в биологии и медицине». М.: Черноголовка, 1981, с. 115—116.
4. *Родин В. В., Исангалин Ф. Ш., Волков В. Я.* ЯМР-релаксация в смеси вода—третичный бутиловый спирт. — Химия и технология воды, 1980, 2, № 6, с. 505—508.
5. *Скорняков Б. А., Вишневский В. И.* Особенности механизма криопротекции глицерином. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 6, с. 59—62.
6. *Фаррар Т., Беккер Э.* Импульсная и Фурье-спектроскопия ЯМР. — М.: Мир, 1973. — 164 с.
7. *Шраго М. И.* Биологические антифризы и криопротекторы. — Криобиология и криомедицина, 1977, вып. 3, с. 81—83.
8. *Bottomley P. A.* A proton magnetic resonance study of the motion of cage water molecules in the clathrate hydrate of xenon. — Mol. Phys., 1976, **31**, p. 1277—1281.
9. *Corning* limited laboratory division, stone, Staffordshire, ST150BG. — England: Catalog and technical data, 1976. — 22 p.
10. *Machanghtan W., Macdonald A. G.* Effect of gaseous anaesthetics and inert gases on the phase transition in smectic mesophases of dipalmitoyl phosphatidylcholine. — Biochem. et biophys. acta, 1980, **597**, N 2, p. 193—198.
11. *Schoenborn B. P.* Binding of xenon to horse haemoglobin. — Nature, 1965, **208**, N 5012, p. 760—762.

ВНИИ прикл. микробиологии, Серпухов

Получено 10.02.82

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043:578.088

Ю. И. Пичугин, А. Н. Новиков, С. Т. Олейник

ЛИОТРОПНЫЙ РЯД КРИОПРОТЕКТОРОВ

При изучении физико-химических свойств криопротекторов было проведено исследование лиотропности 15-ти распространенных криопротекторов. Лиотропность вещества — это сродство его к неполярным системам, в частности к липидам, характеризующееся величиной растворимости в них. Количественно лиотропность вещества характеризуется величиной коэффициента распределения этого вещества между водой и несмешивающимся с ней растворителем, например системой хлороформ—вода. Для наших исследований выбрана именно такая система, так как хлороформ — лучший растворитель липидов и, значит, величина растворимости вещества в хлороформе будет пропорциональна растворимости его в липидах.

От лиотропности криопротектора зависит проникновение его в билипидный слой биологической мембраны. Чем больше лиотропность криопротектора, тем в большей степени этот криопротектор проникает в клетку путем пассивной диффузии через билипидный слой мембраны [1]. Сосредоточение криопротектора в бидипидном слое мембраны влияет на фазовые переходы липидов. Данных о лиотропности исследуемых криопротекторов в специальной литературе нет [2].

Криопротекторы использовались с чистотой, обычно применяемой при низкотемпературной консервации. Очистка хлороформа от этанола производилась промывкой водой, при этом он насыщался ею. В 25-миллилитровой пробирке с притертой пробкой к 10 мл 10%-ного водного раствора криопротектора приливали 10 мл хлороформа, насыщенного водой. Для достижения равновесия распределения эта смесь выдерживалась в течение 24 ч при периодическом встряхивании при комнатной температуре. После разделения фаз отбирали аликвотную часть хлороформного слоя и сушили безводным сульфатом натрия в течение 1 суток. Концентрацию криопротектора в хлороформе определяли обычными методами количественного весового анализа.

Константу распределения вычисляли по формуле

$$K = \frac{[c]_{хл}}{[c]_{вод}} = \frac{[c]_{хл}}{c_0 - [c]_{хл}},$$

где $[c]_{хл}$ — равновесная концентрация криопротектора в хлороформном слое, вес. %; $[c]_{вод}$ — равновесная концентрация криопротектора в водном слое, вес. %; c_0 — начальная концентрация криопротектора в водном слое, вес. %.

Приведем полученные данные по коэффициенту распределения криопротекторов в системе хлороформ—вода.

Криопротектор	Коэффициент распределения	Криопротектор	Коэффициент распределения
ПЭО 1000	4,9	ПЭО 100	0,03
ПЭО 1500	3,5	Поливинилпирролидон	0,004
ПЭО 3000	3,5	Ацетамид	0,003
Диметилацетамид	0,64	α-Пропиленгликоль	0,002
Диэтилсульфоксид	0,45	Формамид	0,001
Диметилформамид	0,37	Этиленгликоль	0,0001
ПЭО 400	0,27	Глицерин	0,00001
Диметилсульфоксид	0,05		

Константа, или коэффициент, распределения вещества между водой и малополярным растворителем определяется результатом взаимодействий гидрофильной части молекул этого вещества с водой и его гидрофобных групп с молекулами растворителя. Чем более гидрофобно

Матеріал, захищений авторським правом

вещество, тем больше его коэффициент распределения. Так увеличение гидрофобных групп в молекулах пропиленгликоля, диметилформамида, диметилацетамида по сравнению с соответствующими сходными веществами — этиленгликолем, формамидом, ацетамидом — в несколько десятков раз повышает коэффициент распределения. Наращивание гидрофобной цепи, например, при переходе от диметил- к диэтилсульфоксиду увеличивает коэффициент распределения всего в девять раз.

В ряду полиэтиленоксида (ПЭО) с ростом молекулярного веса увеличивается коэффициент распределения. Это можно объяснить, предположив, что происходит частичная вне- и внутримолекулярная ассоциация молекул ПЭО по кислородным группам. Тем самым происходят конформационные перестройки с экранированием гидрофильных групп гидрофобными.

ПЭО с молекулярным весом выше 400 считаются непроникающими криопротекторами [3], но благодаря значительной поверхностной активности и лиотропности по сравнению с другими криопротекторами они могут сосредоточиваться на поверхности клетки и проникать внутрь биомембраны, внедряясь в ее билипидный слой, и тем самым, возможно, значительно модифицировать биологическую мембрану.

1. *Действие* физиологически активных соединений на биологические мембраны. — М. : Наука, 1974. — 387 с.
2. *Коренман И. М.* Константы распределения органических веществ между двумя жидкими фазами. — Горький : Изд-во Горьк. ун-та, 1975—1979. — Вып. 1—5.
3. *Пушкарь Н. С., Шраго М. И., Белоус А. М. и др.* Криопротекторы. — Киев : Наук. думка, 1978. — 204 с.

Ин-т пробл. криобиологии и криомедицины
АН УССР, Харьков

Получено 02.11.82

УДК 57.043.547.422:618

В. Ф. Карташов

К ИССЛЕДОВАНИЮ ЭМБРИОТРОПНЫХ СВОЙСТВ КРИОПРОТЕКТОРА ПЭО-1500. ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОГО АНТЕНАТАЛЬНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА РАЗВИТИЕ ПОТОМСТВА

При широком клиническом использовании криоконсервированных под защитой полиэтиленоксида мол. массы 1500 (ПЭО-1500) эритроцитов человека ставится задача глубокого и всестороннего исследования токсико-фармакологических свойств этого полимера, поскольку методом переливания деконсервированной эритроцитной массы предусматривается поступление криопротектора в организм реципиента [3]. В последнее время в исследовании эмбриотропных свойств фармакологических агентов, являющемся обязательным в доклиническом изучении препарата, все более важное место отводится исследованию развития потомства, позволяющему выявить скрытое повреждающее действие химических веществ при их антенатальном воздействии [5, 6].

В данной работе, представляющей собой один из этапов исследования эмбриотропного действия ПЭО, изучалось влияние ПЭО-1500 как препарата для парентерального введения на развитие потомства белых крыс при его длительном воздействии при беременности.

Методы исследования. Опыты проводили на нелинейных белых крысах-самках массой 200—250 г с датированной беременностью. Каждая группа состояла из 10 рэндемически подобранных крыс с нормальным эстральным циклом. Животным опытной группы ежедневно с первого по двадцатый день беременности внутрибрюшинно вводили ПЭО-1500 в дозе 60 мг/100 г массы (1/20 ЛД-50) [1] в виде 20%-ного раствора с pH 7,2—7,4, приготовленного на 0,9%-ном растворе хлористого натрия. Контрольным крысам в том же режиме вводили соответствующие объемы физиологического раствора. Для многократного введения нами

Матеріал, захищений авторським правом

была выбрана доза ПЭО-1500, приблизительно соответствующая вводимой реципиенту при однократном переливании 250 мл деконсервированной эритроцитной взвеси [3]. Самки содержались по одной в клетке на усиленной диете с увеличенным количеством жидкости в рационе. В течение всей беременности животных систематически взвешивали и наблюдали за их общим состоянием. Во время родов учитывали их срок, а также число и состояние крысят в пометах. Новорожденных крысят взвешивали. В дальнейшем изучали динамику массы тела в течение первых двух месяцев жизни с учетом постнатальной смертности. В качестве показателей развития потомства определяли сроки отлипания ушей, появления шерсти и открытия глаз. По достижении крысятами половозрелого возраста (4 мес) исследовали функциональное состояние печени. Общий белок сыворотки крови определяли рефрактометрически, фракционный состав белков сыворотки крови — с помощью электрофореза на бумаге, активность аланин- и аспарагинтрансаминаз — по Рейтману и Франкелю [7]. Проводили БСФ-тест. Определяли длительность гексеналового наркоза.

Таблица 1. Динамика массы беременных крыс при введении ПЭО-1500, % начальной массы

Серия опытов	День беременности		
	7-й	14-й	20-й
I	115,3 (109,6—119,2)	129,6 (119,1—144,2)	148,1 (140,0—173,1)
II	117,1 (107,5—126,4)	127,0 (115,1—140,6)	145,4 (129,7— 162,1)

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3: I — ежедневное введение 1/20 ЛД-50 ПЭО-1500 в течение всей беременности, II — введение 0,9%-ного раствора NaCl в том же режиме.

При статистической оценке полученных данных пользовались t-критерием Фишера — Стьюдента, U-критерием Уилкоксона — Манна — Уитни и методом анализа таблиц 2×2 [2].

Результаты и их обсуждение. По динамике живой массы (табл. 1) и общему состоянию животные опытной группы не отличались от контрольных, что может свидетельствовать об отсутствии выраженного токсического действия ПЭО-1500 при его введении беременным крысам в данном режиме. Известно, что длительное введение ПЭО-1500 в данной дозе не приводит к морфофункциональным изменениям в организме животных [1]. Это дает основание предположить, что беременные животные не обладают чувствительностью к такому роду воздействия.

Введение ПЭО не повлияло на сроки наступления родов у самок, которые приходились на 22—23-й день беременности. Среднее число новорожденных крысят в пометах обеих групп статистически не различалось (табл. 2), что свидетельствует об отсутствии фетолетального эффекта при длительном введении ПЭО-1500 в изученной дозе. В общем состоянии крысят различий также не наблюдалось. Исключение составили крысята двух самок опытной группы, масса которых была ниже по сравнению с другими пометами обеих групп приблизительно на 30 %, что явилось причиной статистически достоверного снижения среднего показателя для опытной группы (табл. 3). Следует, однако, отметить, что, несмотря на явно сниженную жизнеспособность, у этих крысят не наблюдалось каких-либо внешних аномалий развития. Учитывая наличие указанных отклонений только у потомства двух животных и полное их отсутствие у крысят восьми остальных крыс опытной группы, причиной данного эффекта следует считать скорее повышенную индивидуальную чувствительность этих животных, чем специфическое действие ПЭО. К пятому дню жизни средняя масса крысят опытной группы достигла контрольных значений, что, очевидно, вызвано гибелью упомянутых выше пометов, наступившей в течение первых пяти дней жизни. В дальнейшем наблюдалось временное превышение живой массы крысят опытной группы к контролю с последующим выравниванием этого показателя к концу второго месяца жизни (табл. 3).

Матеріал, захищений авторським правом

Таблица 2. Характеристика постнатальной гибели потомства крыс, подвергавшихся воздействию ПЭО-1500 при беременности

Серия опытов	Среднее число крысят в помете по дням жизни									
	1-й	2-й	5-й	15-й	20-й	30-й	60-й	60-й ♂	60-й ♀	60-й ♂/♀
I	8,8 (5—14)	7,6 (0—14)	7,0 (0—14)	7,0 (0—14)	7,0 (0—14)	7,0 (0—14)	7,0 (0—14)	4,3 (2—7)	4,5 (3—7)	0,96
II	9,3 (4—14)	9,1 (4—14)	9,0 (4—14)	9,0 (4—14)	8,9 (4—14)	8,9 (4—14)	8,9 (4—14)	4,5 (3—7)	4,4 (1—10)	1,02

По показателям морфологического созревания в развитии крысят опытной группы отставания не отмечалось. У крысят всех пометов отлипание ушей наблюдалось на 3—4-й день жизни, появление шерсти — на 8—9-й, открытие глаз — на 16—18-й день.

Оценка динамики численности крысят в пометах (табл. 2) показала, что введение ПЭО-1500 в период беременности крыс не приводило к достоверному повышению постнатальной гибели. Как видно, наблюдавшаяся гибель крысят не сопровождалась изменением соотношения полов в пометах.

Известно, что нарушения, вызываемые антенатальным воздействием ксенобиотиков, могут реализоваться у потомства в виде функциональных отклонений, причем, как правило, нарушения у потомства наблюдаются в тех органах, которые наиболее избирательно поражаются

Таблица 3. Динамика массы крысят после антенатального воздействия ПЭО-1500, г

Серия опытов	День жизни						
	1-й	5-й	10-й	15-й	20-й	30-й	60-й
I	6,0• ±0,1	10,4 ±0,2	18,6• ±0,4	26,7• ±0,5	33,9* ±0,9	64,9* ±1,5	149,6 ±3,9
II	6,5 ±0,1	10,3 ±0,1	17,1 ±0,2	24,0 ±0,4	29,5 ±0,7	59,1 ±1,0	147,9 ±4,6

* Статистически достоверное отличие от контроля.

у матери [4]. Поскольку при воздействии ПЭО-1500 на организм в высоких дозах в основном страдают паренхиматозные органы [1], нами было предпринято исследование функционального состояния печени.

Отсутствие различий между животными обеих групп по таким показателям, как содержание общего белка и его фракционный состав в сыворотке крови, активность аланин- и аспарагинтрансаминаз, скорость выведения бромсульфалеина и длительность гексаналового наркоза, указывает на то, что длительное введение ПЭО-1500 в данной дозе при беременности не вызывало отклонений в формировании у потомства таких основных функций печени, как белоксинтезирующая, экскреторная и детоксицирующая.

Итак, сделаем следующие выводы.

Длительное введение ПЭО-1500 крысам при беременности не приводит к гибели плодов или появлению внешних аномалий развития в постнатальном онтогенезе. У животных, подвергнутых антенатальному воздействию ПЭО-1500, не наблюдается задержки роста и морфогенеза. Введение криопротектора беременным крысам не вызывает нарушения основных функций печени у потомства.

Таким образом, ежедневное (с 1 по 20-й день) парентеральное введение беременным крысам ПЭО-1500 в дозе, рекомендованной для его использования в качестве криопротектора при низкотемпературном консервировании эритроцитов человека, не приводит к существенным нарушениям постнатального развития потомства.

Матеріал, захищений авторським правом

1. *Гучок М. М., Верховский Б. А., Козлова В. Ф. и др.* О токсичности полиэтиленоксида-1500. — В кн.: Тез. докл. 3-го съезда фармакологов УССР. Винница, 1977, с. 52—54.
2. *Закс Л.* Статистическое оценивание. — М.: Статистика, 1976. — 598 с.
3. *Пушкарь Н. С., Шраго М. И., Белоус А. М., Калугин Ю. В.* Криопротекторы. — Киев: Наук. думка, 1978. — 201 с.
4. *Саноцкий И. В., Фоменко В. Н.* Отдаленные последствия влияния химических соединений на организм. — М.: Медицина, 1979. — 230 с.
5. *Смольникова Н. М.* Методические подходы к изучению антенатального воздействия лекарственных средств на развитие потомства. — Фармакология и токсикология, 1982, № 1, с. 100—104.
6. *Смольникова Н. М., Голованова И. В., Пройнова В. А. и др.* Изучение эмбриотоксических свойств лекарственных веществ. — Там же, № 4, с. 115—119.
7. *Reitman S., Frankel S.* A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. — Amer. J. Clin. Pathol., 1957, **28**, N 1, p. 56—63.

Ин-т пробл. криобиологии и криомедицины
АН УССР, Харьков

Получено 14.09.82

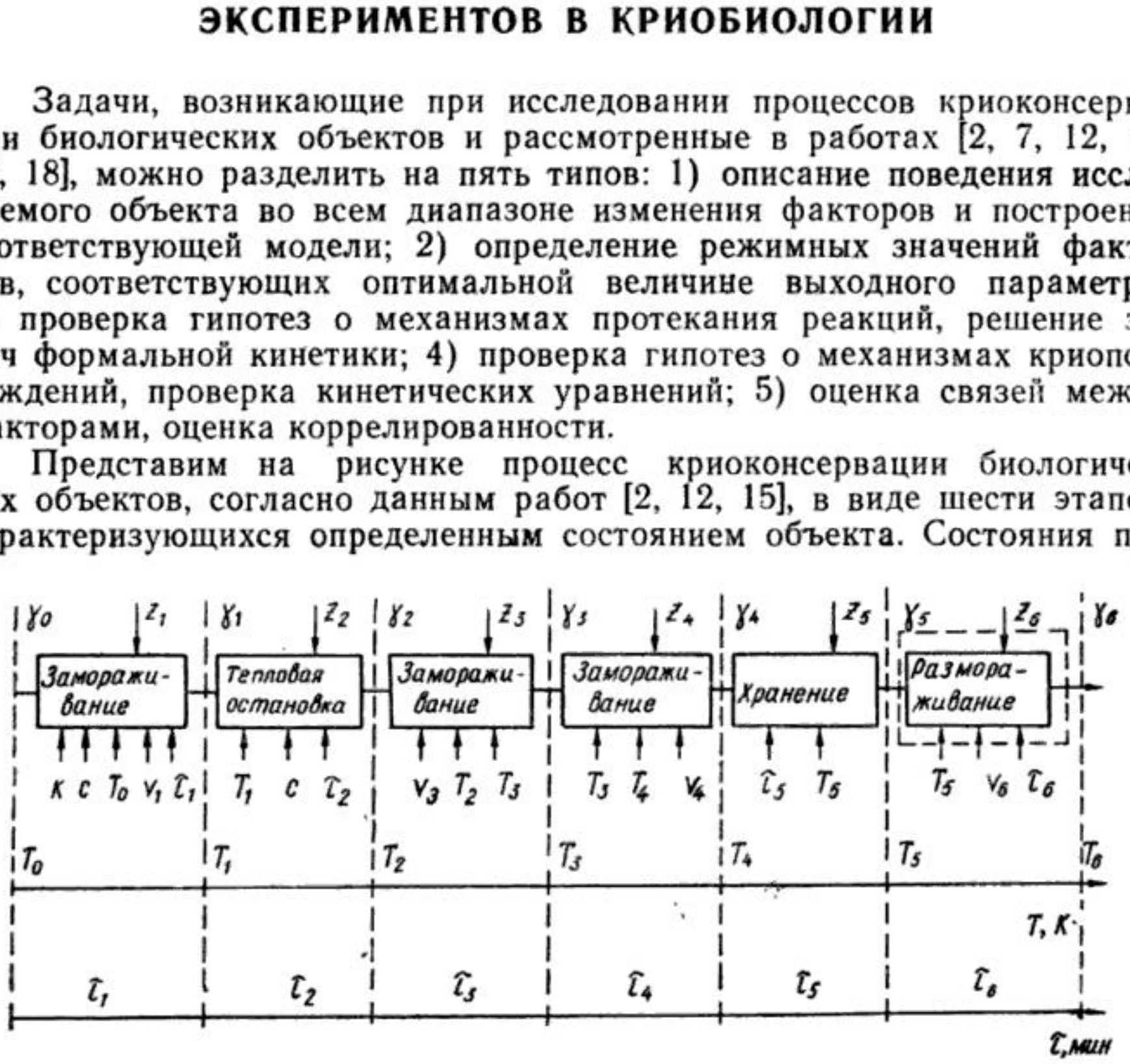
УДК 57.043

Б. В. Шамша, В. И. Саенко

К ВОПРОСУ О МЕТОДОЛОГИЧЕСКИХ ОСНОВАХ ПРИМЕНЕНИЯ МАТЕМАТИЧЕСКОЙ ТЕОРИИ ЭКСПЕРИМЕНТОВ В КРИОБИОЛОГИИ

Задачи, возникающие при исследовании процессов криоконсервации биологических объектов и рассмотренные в работах [2, 7, 12, 13, 17, 18], можно разделить на пять типов: 1) описание поведения исследуемого объекта во всем диапазоне изменения факторов и построение соответствующей модели; 2) определение режимных значений факторов, соответствующих оптимальной величине выходного параметра; 3) проверка гипотез о механизмах протекания реакций, решение задач формальной кинетики; 4) проверка гипотез о механизмах криоповреждений, проверка кинетических уравнений; 5) оценка связей между факторами, оценка коррелированности.

Представим на рисунке процесс криоконсервации биологических объектов, согласно данным работ [2, 12, 15], в виде шести этапов, характеризующихся определенным состоянием объекта. Состояния при



Параметрическая схема процесса криоконсервации биообъектов.

размораживании сведены в один этап. Каждому этапу соответствует определенная температура T_i и время τ_i, за которое объект переходит из одного состояния в другое. В качестве параметра оптимизации рассматривается сохранность γ, %. На каждом i-м этапе на объект дей-

Матеріал, захищений авторським правом

ствуют криоповреждающие силы $\vec{z}_i$. Процесс на отдельном этапе представим в виде $\gamma_i = f_i(\vec{x}_i)$ и $\vec{z}_i = \varphi_i(\vec{x}_i)$, где $\vec{x}_i$ — набор регулируемых факторов. Таким образом, задачи сводятся к следующему: *1* — определение $\gamma_6 = f(\vec{x}_i)$, $i = \overline{1,6}$, при $x_{ij} \in X_{ij}$, где X_{ij} — область допустимых значений для каждого фактора; *2* — определение

$$\begin{cases} \vec{x}^0 = \arg\max\limits_{x_{ij} \in X_{ij}} \gamma(\vec{x}), \\ \vec{x}^0 = \arg\min\limits_{x_{ij} \in X_{ij}} \vec{z}(\vec{x}); \end{cases}$$

3 — определение структуры модели $\gamma_i = f_i(x_i, \theta_i)$ и коэффициентов θ_i; *4* — определение структуры $\vec{z}_i = \varphi_i(\vec{x}_i, \vec{g}_i)$ и коэффициентов $\vec{g}_i$; *5* — определение cov $\{x_{ij}, x_{kl}\}$, $j, l = \overline{1,6}$, θ_{ij}, θ_{ijk},...

Рассмотрим возможности применения методов математической теории эксперимента (МТЭ) для решения сформулированных задач. При этом остановимся на наиболее трудноформализуемых этапах исследования: выбор интервалов варьирования, выбор модели и критерия оптимальности.

Процедура использования методов МТЭ (табл. 1) условно делится на четыре этапа: I — решение предэкспериментальных задач; II — собственно эксперименты и связанные с ними работы; III — анализ апостериорной информации; IV — принятие решений на основании математических выводов.

Рассмотрим подробнее круг задач, решаемых на каждом этапе. На первом этапе формализуется цель исследования с позиции МТЭ; проводится анализ априорной информации; выявляются выходные параметры (отклики) и все факторы, влияющие на исследуемый процесс, и их интервалы варьирования; формулируется критерий оптимальности и выбирается оптимальный план эксперимента.

Обычно при решении задач *1, 2, 4, 5* в качестве отклика выбирают сохранность биологического объекта. В задаче *2* необходимо дополнительно учитывать экономические показатели: стоимость одного эксперимента, длительность его проведения, технические трудности реализации и т. п. Если каждый из параметров представить в виде функции $S_i = f_i(x_j)$, $j = \overline{1, k}$, $i = \overline{1, n}$, где k — количество факторов, n — количество параметров, то при условии $S_i \to S_i^*$ (S_i^* — оптимальное значение параметра S_i) критерий оптимальности запишется в виде

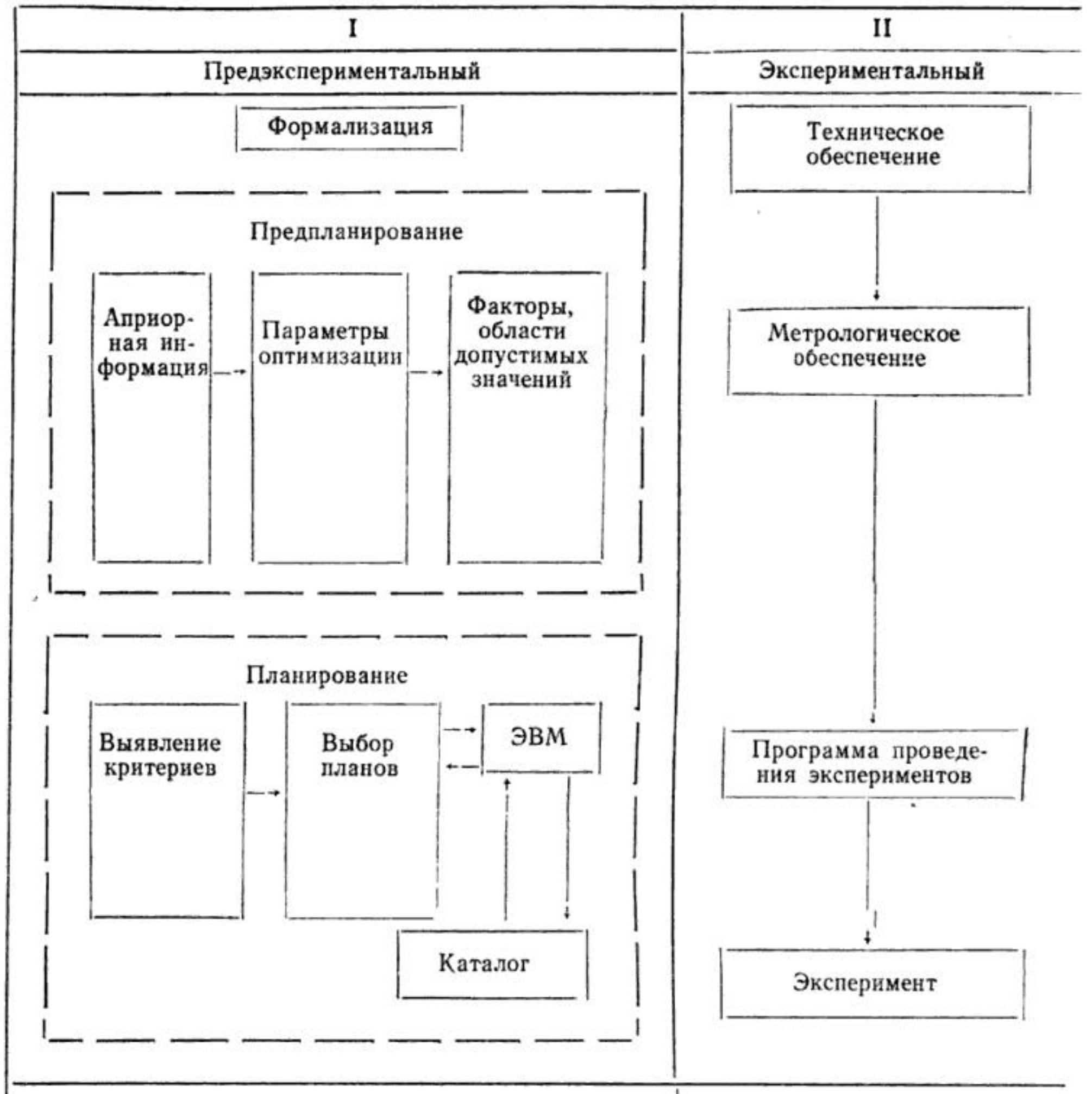
$$I = \operatorname{optim}_{x \in X} \{S_1, S_2, \cdots, S_n\} = \{S_1^*, S_2^*, \cdots, S_n^*\}.$$

Для задач *1* и *3* (особенно *1*) необходимо рассматривать и включать в модель максимальное число факторов, а для задачи *2* рассмотрению подлежат только существенные (значимые) факторы. Значимость факторов можно определять, основываясь на анализе априорной информации или проводя эксперименты по планам (например, случайного баланса [8, 11, 14]). Для задач *3—5* факторы должны быть разделены во времени, чтобы действие их ощущалось на непересекающихся отрезках τ_i. Например, x_1 — на первом этапе замораживания, x_2 — на этапе размораживания, x_3 — на этапе хранения и т. д.

Основной уровень в задаче *2* определяется точкой $\{V_i^A\}$, $i = \overline{1, k}$, где V^A — абсолютная величина, соответствующая наилучшему априори известному значению выходного параметра; интервалы варьирования выбираются узкими. Для задачи *1* центр эксперимента (основной уро-

Матеріал, захищений авторським правом

Таблица 1. Структурная схема процедуры использования



Примечание к табл. 2. РЦКП — рототабельный центральный композиционный план;

вень) располагается в середине факторного пространства, т. е. в середине интервалов допустимых изменений всех факторов. Интервалы варьирования $\Delta V = \frac{(V_{min} - V_{max})}{2}$, $x = \frac{V - V^A}{\Delta^v}$ выбирают в зависимости от принятой стратегии: либо узкие, с постепенным расширением границ эксперимента, либо широкие, с постепенным сужением. Первая стратегия позволяет построить модель для локальной области, а потом усложнить, для этого можно увеличить порядок полинома или представить модель кусочной функцией — используются экстраполяционные модели.

Вторая стратегия дает возможность построить модель всей области с последующим усложнением ее за счет уменьшения интервалов варьирования — используются модели интерполяции. Обе модели могут в конечном счете быть различными, являясь адекватными на одном и том же множестве значений факторов. Отметим, что в данной ситуации эффективно использовать «веер» моделей, каждая из которых может удовлетворять только частному критерию. Окончательный выбор

Матеріал, захищений авторським правом

III	IV		
Анализ	Интерпретация		
Статистический анализ экспериментальных результатов	1 задача	Критерий интерполяции	
		Критерий экстраполяции	
		Проверка достаточности критериев	
Определение коэффициентов регрессии «веера» моделей	2 задача	Экспериментальная проверка локальных экстремумов	
		Выбор оптимальной области	
Определение статистических характеристик моделей	3. 4 задачи	Оценка экстраполяционных и интерполяционных свойств моделей	
		Проверка согласия модели с теоретическими предпосылками	
		Окончательный выбор модели	
Многофакторная оптимизация	5 задача	Проверка правильности выбора интервалов варьирования	
		Определение влияния возмущающих факторов	
		Определение физического смысла статистически значимых коэффициентов	
Проверка оптимальности процедуры проведения исследований			
Проблемный программист	Математик и экспериментатор		

ОЦКП — ортогональный центральный композиционный план.

стратегии зависит от степени нелинейности объекта и трудоемкости проведения эксперимента.

Для задач *3—5* можно воспользоваться процедурами выбора основного уровня и интервалов варьирования предложениями [1, 14]. Здесь справедливо следующее: чем меньше влияние фактора, тем шире должен быть интервал варьирования.

Для выбора интервала варьирования полезно при преобразовании $V \to x$, где $x \in [-1, 1]$, проверить гипотезу о необходимости промежуточного преобразования $V — V' \to x$. Преобразование $V \to V'$ используется при априори известных из уравнений кинетики нелинейных зависимостях $\gamma_i = f(\vec{x})$. Например, скорость замораживания входит в уравнение как $V' = \lg V$ [16, 18].

Рассматриваемым задачам можно поставить в соответствие определенные группы планов эксперимента согласно табл. 1. Первой группе соответствуют планы, обеспечивающие невысокие значения обобщенной дисперсии, т. е. хорошее описание оптимальной области регрессионной моделью, второй — планы, обеспечивающие хорошие предсказательные

Матеріал, захищений авторським правом

свойства, третьей — планы, обеспечивающие наилучшие оценки коэффициентов регрессии, близкие к независимым, четвертой — планы, позволяющие определять дисперсионный вклад каждого фактора. Выбор конкретного плана в группе зависит от априорной информации о структуре модели, ограничениях на факторы и отклик, критериях оптимальности.

Из линейных планов используются дробный и полный факторные эксперименты (ДФЭ и ПФЭ). Эти планы удовлетворяют многим критериям одновременно. ДФЭ целесообразно использовать, если известно, что модель линейна или незначимы коэффициенты при членах высокого взаимодействия ($x_i x_j x_k$, $x_i x_j$, x_k, x_l,...). План ПФЭ удобен в предположении, что истинная структура модели нелинейна, а область оптимума не определена. ПФЭ может быть использован в качестве ядра для построения в дальнейшем нелинейных композиционных планов.

Нелинейные планы применяются, когда известно, что структура модели не линейна относительно факторов либо имеются такие предположения, но при этом воспроизводимость результатов низкая.

В качестве моделей в задачах *1—5* рекомендуется пользоваться полиномами вида

$$\gamma = b_0 + \sum_i b_i x_i + \sum_{i<j} \sum b_{ij} x_i x_j + \sum_{i<j<k} \sum \sum x_i x_j x_k b_{ij} k + \cdots + \\ + \sum_i b_{ii} x_i^2 + \sum_i b_{iii} x_i^3,$$

где b_i, b_{ij}, b_{ijk}, b_{ii}, b_{iii} — МНК оценки коэффициентов регрессии, т. е. оцененные по методу наименьших квадратов.

Практические исследования показали, что модели процессов криоконсервации, преимущественно линейные по параметрам, нелинейны относительно факторов (или линейны в очень малых областях). Часто оказываются значимыми коэффициенты b_{ijkl}, b_{ii}, b_{iii}.

Относительно особенностей применения моделей, то, если в задаче *2* возникает необходимость для адекватного описания перейти к полиномиальным моделям высокой степени, рекомендуется воспользоваться кусочными функциями. В задаче *3* возможны переход к моделям, нелинейным по параметрам, и применение принципов дискриминации моделей [3, 5].

Рассматривая влияние имеющихся ограничений, математических критериев на выбор планов эксперимента, следует обратиться к работам [1, 6, 10], где представлены сравнительные характеристики наиболее часто используемых планов и предложена соответствующая процедура выбора оптимального плана.

Комбинаторные и дисперсионные планы образуют особую группу, условно отнесенную к нелинейным. Их применяют для предварительных экспериментов или при наличии качественных и дискретных факторов.

В целях повышения оперативности проводимых исследований каталог используемых планов удобно хранить в памяти ЭВМ. Вся процедура тогда может быть алгоритмизирована и реализована в диалоговом режиме. Решение задач II этапа зависит только от технических возможностей экспериментатора, поэтому рассматривать их подробно не будем. Решение задач III этапа целиком проводится на ЭВМ. Особенности их решения зависят от типа используемого математического обеспечения. Один из возможных вариантов пакета прикладных программ математического обеспечения представлен в табл. 2. Отметим, что при решении задачи *1* поиск оптимальных областей (модель, как правило, многоэкстремальная) может осуществляться одним из методов: а) крутого восхождения [1, 11, 14]; б) покоординатного поиска [1, 11, 14]; в) диссоциативно-шагового [4]. При этом для методов а) и в) принятие решений осуществляется на этапе IV. Окрестность найденного экстремума интерпретируется в виде линий равного уровня.

Матеріал, захищений авторським правом

Таблица 2. Структура пакета прикладных программ



Матеріал, захищений авторським правом

Интерпретация результатов исследований (IV этап). Анализ принимаемых решений проведем для каждой задачи (табл. 3).

В задаче 1 необходимо определять интер- и экстраполяционные возможности моделей, т. е. значения R_1 и R_2, где $R_i = |\gamma_э - \gamma_м|$, $i = 1, 2$; $\gamma_м$ — предсказываемое по модели значение отклика; $\gamma_э$ — экспериментальное значение. Учитывая, что процесс получения адекватной модели итерационный, необходимо на каждой итерации проверять достаточность критериев R_1 и R_2. Ее определяют, сравнивая с критическими значениями R_1^*, R_2^*, которые могут быть выбраны из учета величины σ_6 (ошибки воспроизводимости). Для задачи *2* в найденных аналитических областях локальных экстремумов необходимо провести контрольные эксперименты. Затем выделяют область того экстремума, который обеспечивает $J \to \text{extr}$ в смысле (1). В задаче *3* для «веера» моделей кинетики необходимо оценить экстра- и интерполяционные свойства, так как они наиболее важны. Проверяется согласие моделей с фундаментальными основами теории и затем выбираются рабочие модели. Решение задачи *4* осуществляется аналогично *3*. Однако может быть использован дополнительно следующий подход для выяснения моментов действия возмущений в технологическом процессе, интенсивности и их характере.

Таблица 3. Планы оптимальных экспериментов

Задача	Группа	Планы	
		линейные	нелинейные
1	1	ПФЭ, ДФЭ	РЦКП, $В_к$, Д, С, О — оптимальные
2	2	ПФЭ, ДФЭ	РЦКП, $З^к$, $В_к$, Д — оптимальный
3,4	3	ПФЭ, ДФЭ	ОЦКП, А, Е — оптимальные, последовательные
5	4	ПФЭ, ДФЭ	Дисперсионные, комбинаторные

Рассматриваются две модели, построенные по результатам экспериментов. Каждой точке плана должны соответствовать минимум два экспериментальных результата. Учитывая гипотезу, что любое возмущение не может улучшить результат, а только ухудшает его, формируем две выборки. Первая объединяет лучшие результаты, вторая — худшие. Тогда модель на первой выборке соответствует протеканию процесса без возмущений (или при очень слабых), на второй — при действии возмущений. Сравнение моделей позволяет определить криоповреждения (момент начала действия, степень и т. д.). Но поскольку возмущения случайны, а в допущениях содержится элемент неопределенности, выводы имеют вероятностный характер.

Значимость факторов (задача *5*) определяется величиной коэффициентов регрессии и их дисперсионным вкладом. Необходимо учитывать, что незначимость коэффициента регрессии в линейной модели означает: либо незначимость влияния этого фактора в выбранном интервале измерения (очень узкий интервал), либо действие случайных возмущений, компенсирующих его влияние, либо высокий уровень шума на входе и выходе процесса. Незначимость коэффициента при члене $x_i x_j$ ($x_i x_j x_k$, $x_i x_j$, x_k, x_l) означает в дополнение к сказанному независимость действия на процесс одного фактора от другого.

Таким образом, применение методов планирования экспериментов позволяет не только сократить сроки при поиске оптимальных программ консервации биологических объектов, но и способствует развитию фундаментальных исследований в этой области. Однако ввиду нелинейности моделей относительно факторов для решения каждой из пяти задач целесообразно рассматривать вопрос оптимальности процедуры итерационного использования методов МТЭ. Широко используемые линейные планы ПФЭ и ДФЭ — не эффективны. Для статистической обработки результатов исследований рекомендуется использовать разработанные пакеты прикладных программ. Отметим, что задачи применения методов МТЭ для поиска моделей кинетики криоповреждений остаются

Матеріал, захищений авторським правом

нерешенными. Новые аспекты применения методов МТЭ повысят их эффективность для исследования процессов криоконсервации.

1. *Адлер Ю. П., Маркова Е. В., Грановский Ю. В.* Планирование эксперимента при поиске оптимальных условий. — М. : Наука, 1976. — 256 с.
2. *Актуальные* проблемы криобиологии / Под общ. ред. Н. С. Пушкаря, А. М. Белоуса. — Киев : Наук. думка, 1981. — 608 с.
3. *Бард И.* Нелинейное оценивание параметров. — М. : Статистика, 1979. — 349 с.
4. *Вознесенский В. А., Ковальчук А. Ф.* Принятие решений по статистическим моделям. — М. : Статистика, 1978. — 192 с.
5. *Горский В. Г., Равер А. Е.* Планирование кинетических экспериментов. — Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева, 1980, **25**, № 1, с. 13—27.
6. *Египко В. М.* Организация и проектирование систем автоматизации научно-технических экспериментов. — Киев : Наук. думка, 1978. — 232 с.
7. *Лозина-Лозинский Л. К.* Мультифакторная теория криоповреждений. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 7, с. 3—6.
8. *Малютов М. Б.* Математические модели и результаты в теории оценивающих экспериментов. — В кн.: Теоретические проблемы планирования эксперимента. М. : Сов. радио, 1977, с. 5—69.
9. *Маркова Е. В., Лисенков А. Н.* Комбинаторные планы в задачах многофакторного эксперимента. — М. : Наука, 1979. — 348 с.
10. *Налимов В. В., Голикова Т. И.* Логические основания планирования экспериментов. — М. : Металлургия, 1981. — 152 с.
11. *Налимов В. В., Чернова Н. А.* Статистические методы планирования экстремальных экспериментов. — М. : Наука, 1965. — 340 с.
12. *Пушкарь Н. С., Белоус А. М.* Введение в криобиологию. — Киев : Наук. думка, 1975. — 325 с.
13. *Пушкарь Н. С., Белоус А. М., Цуцаева А. А. и др.* Актуальные проблемы криоконсервирования костного мозга. — Криобиология и криомедицина, 1976, вып. 2, с. 3—16.
14. *Хартман К. и др.* Планирование эксперимента в исследовании технологических процессов. — М. : Мир, 1977. — 552 с.
15. *Черепнев А. С., Хайкин Р. К., Ткаченко С. И., Руденко С. В.* Принципы построения кибернетических систем в области криобиологии. — Криобиология и криомедицина, 1979, вып. 5, с. 70—76.
16. *Akhtar T., Pegg D. F., Foreman J.* The effect of cooling and warming rates on the survival of cryopreserved L-cells. — Cryobiology, 1979, **16**, N 5, p. 424—429.
17. *Mazur P.* The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. — Ibid., 1977, **14**, N 3, p. 251—272.
18. *Miller R. H., Mazur P.* Survival of frozen-thawad humen red cells as a function of cooling and warming velocities. — Ibid., 1976, **13**, N 5, p. 404—416.

Харьк. ин-т радиоэлектрон.

Получено 02.06.82

УДК 57.043

В. И. Саенко, Г. С. Лобынцева, И. А. Вотякова, Ю. П. Тимошенко

О ПОИСКЕ ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ ПРОЦЕССА КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ ЛЕЙКОМАССЫ

В настоящей статье приведены результаты экспериментальных исследований процесса криоконсервирования ядросодержащих клеток крови, полученных с применением методов планирования экспериментов согласно схеме, данной в работе [8].

Предэкспериментальный этап. Теоретически задача состояла в том, чтобы получить представление о поверхности отклика в пространстве факторов, подлежащих варьированию, и найти область, в которой процесс криоконсервирования протекает оптимально.

На основании полученных данных, а также с учетом теоретических представлений о механизмах повреждения клетки в данных исследованиях были выбраны следующие варьируемые факторы: X_1 — концентрация криопротектора — полиэтиленоксида с молекулярной массой 400 (ПЭО-400) в клеточной суспензии; X_2 — скорость охлаждения образца до начала процесса кристаллизации; X_3 — скорость охлаждения на II этапе от температуры кристаллизации до температуры полного затвердевания образца (—80 °С); X_4 — скорость повышения температуры в наиболее опасном для клеток интервале температур (от —40 до 0 °С) (табл. 1).

Матеріал, захищений авторським правом

Таблица 1. Факторы процесса криоконсервирования лейкомассы

№ п/п	Относительная величина	Параметр	Единица измерения	Название
1	X_1	c	%	Концентрация криопротектора
2	X_2	V_1	°С/мин	Скорость замораживания I этапа
3	X_3	V_2	°С/мин	Скорость замораживания II этапа
4	X_4	t	°С	Скорость отогрева (температура водяной бани, СВЧ)

Не будем подробно анализировать механизмы криоповреждения и криозащиты клеток при замораживании, они изложены в работе [5]. Выбранные четыре главных фактора отвечают основным требованиям и охватывают все физико-химические процессы, происходящие в системе при охлаждении.

В качестве отклика использовали показатель жизнеспособности по устойчивости к витальным красителям и подсчет клеток в камере Горяева [7]. Лейкомасса представляет собой популяцию ядерных клеток, выполняющих в организме человека различные функции, поэтому общим дискретным показателем, отражающим состояние мембран всех клеток, является отсутствие проницаемости для молекул красящего вещества, пересчитанное на количестве клеток в популяции [6] — процент жизнеспособных клеток. Этот обобщенный показатель оптимизации, выбранный нами, выражается количественно, одним числом, эффективен, универсален, легко и быстро вычисляется.

При определении модели эксперимента мы исходили из априорной информации, полученной в работах [1—4, 9—11] и на основании собственных двух- и трехфакторных экспериментов, проведенных ранее, которые дали некоторое представление о параметрах оптимизации и границах изменений значений факторов. В качестве оптимального плана был выбран двойной линейный композиционный план типа «полный факторный эксперимент» ($2\times$ПФЭ 2^3). Модель была задана в виде множественной полиномиальной регрессии:

$$\gamma = b_0 + \sum_{i=1}^{3} b_i x_i + \sum_{i=1}^{2} \sum_{j=2}^{3} b_{ij} x_i x_j + b_{1,2,3} x_1 x_2 x_3 .$$

Коэффициенты регрессии определялись по методу наименьших квадратов (МНК). При выборе интервалов варьирования для каждого фактора мы исходили из следующих положений: 1) согласно требованиям построения математической модели интервал не должен быть очень узким, чтобы изменения каждого фактора были значимы, и в то же время — не очень широким, так как используется линейный план; 2) в областях интервалов варьирования вклад каждого фактора должен быть сравним с другими (или одинаковым); 3) исходя из механизмов криоповреждения, концентрация криопротектора, согласно работам [1—3], не должна выходить за пределы 5—30%; 4) скорость замораживания на первом этапе не должна быть ниже 0,5 °С/мин при высокой концентрации криопротектора, так как будут вступать в действие новые факторы повреждения (длительная экспозиция с криопротектором до температуры замерзания образца или тепловая денатурация белков при увеличении скорости отогрева за счет повышения температуры водяной бани). Значения интервалов варьирования приведены в табл. 2.

Экспериментальный этап. Лейкомассу готовили из донорской крови путем спонтанного осаждения. Криопротектором служил полиэтиленоксид с молекулярной массой 400 (ПЭО-400) 50%-ной объемной концентрации, который добавляли к клеточным суспензиям в соотношении 1 : 9 и 1 : 4 до получения 5- и 10%-ной конечной концентрации. Экспозиция с криопротектором составляла 30 мин. Отогревали по методу работы [4].

Матеріал, захищений авторським правом

Таблица 2. Уровни варьирования факторов

Уровень	Относительная величина	Абсолютное значение			
		X_1	X_2	X_3	X_4
		%	°С/мин	°С/мин	°С
Основной	0	7,5	3	20	40
Верхний	+	10	5	30	СВЧ
Нижний	—	5	1	10	20
Интервал варьирования	Δ	2,5	2	10	20

Образцы замораживали в 2-миллилитровых полиэтиленовых ампулах, скорость охлаждения определяли с помощью термопары, помещенной внутрь ампулы с лейкомассой, и фиксировали на самописце КСП-4. Воспроизводимость экспериментов была выбрана равной 3. В результате проведенных экспериментов получено среднеквадратичное отклонение, равное 15% нулевого уровня (табл. 3).

Таблица 3. Матрица планирования

№ п/п	Значения факторов в каждом опыте																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	0
2	—	—	+	+	—	—	+	+	—	—	+	+	—	—	+	+	0
3	—	—	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—	+	+	+	+	0
4	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	0
5	45	68	70	82	61	80	65	77	55	81	82	82	74	88	67	80	68

Анализ апостериорной информации (интерпретация). Приведем МНК-оценки коэффициентов регрессионных моделей при размораживании в водяной бане

b'_0	b'_1	b'_2	b'_3	$b'_{1,2}$	$b'_{1,3}$	$b'_{2,3}$	$b'_{1,2,3}$
69,63	6,56	6,13	1,12	—3,40	0,128	—5,08	1,63

и поле СВЧ

b''_0	b''_1	b''_2	b''_3	$b''_{1,2}$	$b''_{1,3}$	$b''_{2,3}$	$b''_{1,2,3}$
76,13	7,06	1,63	1,12	—3,36	0,632	—5,38	3,13

Такое разделение обусловлено качественно различными способами отогрева.

Интерпретация — наиболее трудоемкий этап. Трудоемкость его обусловлена не только количеством анализируемой информации, но и неоднозначностью выводов. Полученные в модели коэффициенты не зависят от вида преобразования факторов, так как план линейный. Если осуществлять экстраполяцию значений или перейти к модели более высокого порядка, то способ преобразования может оказать существенное влияние. Возникает либо неоднозначность оценки влияния факторов при построении модели более высокого порядка, либо неоднозначность определения аргументов при поиске оптимальных областей.

В рассматриваемом случае приемлемы три вида преобразований для скорости замораживания: линейное $A)$ $V \xrightarrow{s} X$, нелинейные: $Б)$ $V \xrightarrow{-1/v} X$ и $B)$ $V \xrightarrow{lgv} V_{lv} \xrightarrow{s} X$.

S — линейный оператор, осуществляющий преобразование величины $Z \in [Z_1 Z_2]$ (Z_1 — нижняя граница, Z_2 — верхняя) в величину

Матеріал, захищений авторським правом

Таблица 4. Значение скоростей замораживания с учетом преобразований

№ п/п	Относительная величина	Преобразование *Б*				Преобразование *В*			
		$X_3\{V_1\}$		$X_3\{V_2\}$		$X_3\{V_1\}$		$X_3\{V_2\}$	
		$-1/V$	V	$-1/V$	V	lg V	V	lg V	V
		мин/°С	°С/мин	мин/°С	°С/мин	—	°С/мин	—	°С/мин
1	1	—0,2	+5	—0,033	30	0,699	5	1,477	30
2	—1	—12	1	—0,100	10	0	1	1	10
3	0	—0,6	1,65	—0,066	15	0,3495	2,237	1,239	17,3
4	Δ	0,4	—	+0,033	—	0,3495	—	0,2386	—
5	+2	—	—	—	—	1,049	11,2	1,716	52
6	—2	—1,4	+0,71	—0,130	7,5	—0.35	0,447	0,761	5,78
7	+1,3	—0,08	10,50	—0,022	46,3	0,804	6,7	1,548	35,3
8	—1,3	—1,12	0,89	—0,109	9,2	—0,105	0,79	0,928	8,5
9	—1,75	—1,3	0,77	—0,124	8,008	—0,262	0,55	0,821	6,62
10	+1,75	—	—	—0,0095	100	0.961	9,15	1,656	45,3

Примечание. Здесь и в табл. 5 прочерк означает, что при данном преобразовании для указанной относительной величины абсолютное значение не определимо.

$X \in [-1; 1]$ по следующему закону: $X = \frac{Z - Z_0}{\Delta Z}$, где $Z_0 = {}^1/_2|Z_1 - Z_2|$; $\Delta Z = |Z_1 - Z_0| = |Z_2 - Z_0|$.

В преобразовании *Б* взят знак минус для приведения к единым относительным величинам. Преобразование *В* получается логарифмированием значений скорости V.

Относительные и абсолютные значения факторов приведены в табл. 4. Анализ типов преобразований *А*—*В* показал, что преобразования *А* и *Б* приемлемы только в узких областях изменения значений факторов и не подходят для экстраполяции. Преобразование *В* таких ограничений не имеет.

Приведем пример. При значении относительной величины $X_2 < -1{,}5$ (или $X_3 < -1{,}5$) абсолютные значения V_1 (или V_2) не определены для преобразования *А*, хотя теоретическое значение γ можно предсказать по модели. Соответственно для преобразования *Б* при значениях относительной величины $X_2 > 1{,}5$ (или $X_3 > 1{,}5$) абсолютные значения V_1 (или V_2) также не определимы (см. табл. 6). Для преобразования *В* абсолютные значения $V_1(V_2)$ определены на всей области $X_i \in [-2{,}2]$. Из табл. 3 (строка 3) видно, что выбранный нулевой уровень для различных типов преобразований будет также различен.

На рисунке приведены линии равного уровня поверхностей, описываемых моделью для двух различных способов замораживания, как видим, существуют две области, соответствующие высоким значениям показателя (отклика): $V_1 < -1$, $V_2 > 1$ и $V_1 > 1$, $V_2 < -1$. Значения отклика и факторов с учетом вида преобразований для этих областей сведены в табл. 5, где видно, что для преобразований *А* и *Б* не определены некоторые значения скоростей. Однако преобразование *Б* можно считать правомочным, если изменить интервалы варьирования.

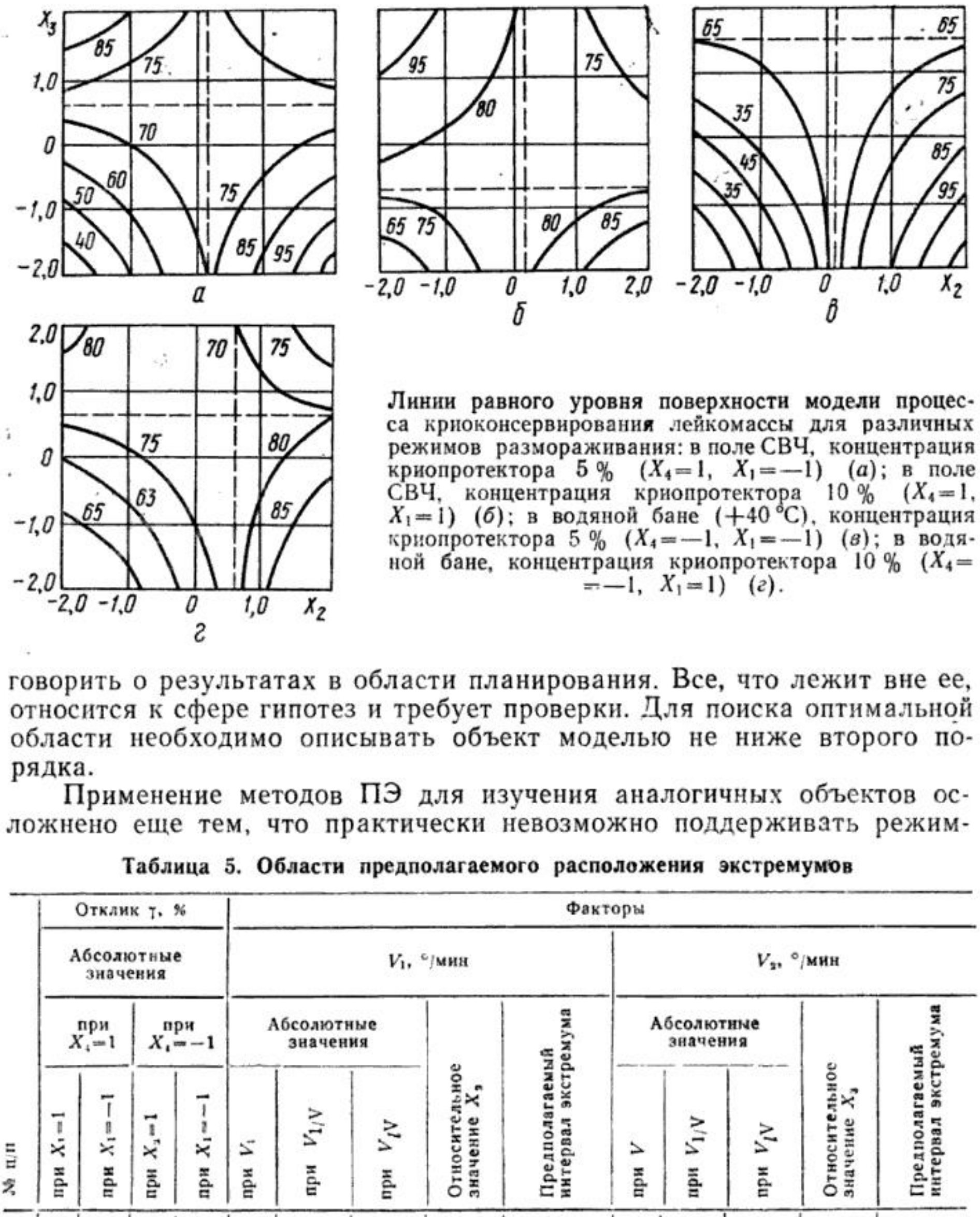
К наиболее вероятным областям нахождения экстремума следует отнести следующие области: I $V_1 < V_1^n = [0{,}3; 0{,}7]$, °С/мин, $V_2 > V_2^n = [35; 60]$, °С/мин; II $V_1 > V_1^n = [5; 13]$, °С/мин, $V_2 < V_2^n = [7; 10]$, °С/мин, обеспечивающие значение показателей жизнеспособности $\gamma \approx 80$ %.

Анализ моделей показал, что выбор способа размораживания оказывает существенное влияние на показатель γ. Так, при СВЧ отогреве наблюдаются более высокие значения γ (средний уровень на рисунке, *а, б*), чем при отогреве в водяной бане. Кроме того, повышение концентрации криопротектора ослабляет влияние скоростей замораживания (о чем можно судить по плотности линий на рисунке *б, г*), одновременно увеличивая средний уровень жизнеспособности. Необходимо отметить, что в модели оказались значимыми коэффициенты при членах X_1X_2, X_2X_3, X_3X_4, $X_1 \; X_2X_3$. Интересно, что в значимые коэффициенты

Матеріал, захищений авторським правом

включен фактор X_2. Это позволяет сформулировать гипотезу о том, что на 1 этапе происходят такие изменения, которые целиком зависят от скорости этого этапа и в дальнейшем играют определяющую роль. В целом модель описывает область, лежащую в стороне от оптимальной.

На рисунке показаны области планирования $X_i \in [-1, +1]$ и области экстраполяции $X_i \in [-2, +2]$. При этом с достоверностью можно



Линии равного уровня поверхности модели процесса криоконсервирования лейкомассы для различных режимов размораживания: в поле СВЧ, концентрация криопротектора 5 % ($X_4=1$, $X_1=-1$) (*а*); в поле СВЧ, концентрация криопротектора 10 % ($X_4=1$, $X_1=1$) (*б*); в водяной бане (+40 °С), концентрация криопротектора 5 % ($X_4=-1$, $X_1=-1$) (*в*); в водяной бане, концентрация криопротектора 10 % ($X_4=-1$, $X_1=1$) (*г*).

говорить о результатах в области планирования. Все, что лежит вне ее, относится к сфере гипотез и требует проверки. Для поиска оптимальной области необходимо описывать объект моделью не ниже второго порядка.

Применение методов ПЭ для изучения аналогичных объектов осложнено еще тем, что практически невозможно поддерживать режим-

Таблица 5. Области предполагаемого расположения экстремумов

№ п/п	Отклик y, %				Факторы										
	Абсолютные значения				V_1, °/мин					V_2, °/мин					
	при $X_1=1$	при $X_1=-1$	при $X_2=1$	при $X_2=-1$	Абсолютные значения при V_1	Абсолютные значения при V_1/V	Абсолютные значения при V_2/V	Относительное значение X_3	Предполагаемый интервал экстремума	Абсолютные значения при V	Абсолютные значения при V_1/V	Абсолютные значения при V_2/V	Относительное значение X_3	Предполагаемый интервал экстремума
1	90	73	77	60	1	1	1	1	1	30	30	30	1	30
2	95	82	78	65	0	0,833	0,669	−1,5	0,6 :0,83	35	60	30,95	1,5	25:60
3	99	90	81	65	—	0,714	0,447	−2	0,45:0,71	40	—	52	2	40:52
4	80	83	81	80	5	5	5	+1	5	10	10	10	−1	10
5	85	93	86	86	6	—	7,496	+1,5	6:7,5	5	8,57	7,598	−1,5	5:8,6
6	88	100	89	100	7	—	11,2	+2	7:11,2	—	7,5	5,78	−2	5,8:7,5

ные значения некоторых факторов X_i на постоянном уровне. Тогда в результате реализации экспериментов получится не план ε, а план ε^1, в котором X_i принимают значения не ± 1, а $\pm l$, где $|l| \neq 1$. Происходит изменение эффективности планов. Следовательно, модель получается

Матеріал, захищений авторським правом

с искаженными коэффициентами. К сожалению, обеспечить неискажение плана удается не всегда. Это обстоятельство необходимо учитывать при интерпретации результатов по моделям.

В результате проведенных экспериментов определены возможные области расположения оптимумов, т. е. области, в которых режимные значения факторов обеспечивают получение высоких показателей жизнеспособности лейкоцитов. При этом предполагаются два способа размораживания: в водяной бане и поле СВЧ.

Выяснено, что для адекватного описания объекта в широком диапазоне факторов, необходимо использовать нелинейные (квадратичные или кубические) модели с обязательным преобразованием переменных вида $\lg V$. В качестве планов эксперимента должны быть использованы планы второго порядка.

1. *Абезгауз Н. Н., Леонтович В. А.* Замораживание белых клеток периферической крови для их длительного хранения при ультранизких температурах. — Пробл. гематологии и переливания крови, 1966, № 9, с. 24—29.
2. *Леонтович В. А., Трошина В. М., Новичков В. Т. и др.* Испытание эффективности режимов с постоянной скоростью охлаждения для замораживания гранулоцитов человека. — Там же, 1975, № 9, с. 23—25.
3. *Лобынцева Г. С., Щербак Г. М., Полякова А. И.* Низкотемпературная консервация ядросодержащих клеток крови под защитой полиэтиленоксида различного молекулярного веса. — В кн.: Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины. Киев : Наук. думка, 1974, с. 69—70.
4. *Лобынцева Г. С., Тимошенко Ю. П.* Влияние скорости отогрева на выживаемость клеток крови. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 8, с. 15—18.
5. *Пушкарь Н. С., Белоус А. М.* Введение в криобиологию. — Киев : Наук. думка, 1975. — 343 с.
6. *Пушкарь Н С., Лобынцева Г. С., Полякова А. И. и др.* Консервация клеток лейкоконцентрата периферической крови человека при низких температурах (—196 °С) с применением полиэтиленоксида м.м. 400 : (Метод. рекомендации). — Харьков, 1979. — 6 с.
7. *Справочник* по клиническим и лабораторным методам исследования. — М. : Медицина, 1975. — 384 с.
8. *Шамша Б. В., Саенко В. И.* К вопросу о методологических основах применения математической теории экспериментов в криобиологии. — Криобиология и криомедицина, 1984, вып. 14. с. 22.
9. *Crowley J. R., Rene A., Valeri C. R.* The recovery, structure and function of human blood leucocytes after freeze-preservation. — Cryobiology, 1974. **11**, N 5, p. 395—409.
10. *Farrant J., Knight S. C., Morris G. J.* Use of different cooling rate during freezing to separate populations of human peripheral blood lymphocytes. — Ibid., 1972, **9**, p. 516—525.
11. *Malinin T. I.* Injury of human polymorphonuclear granulocytes frozen in the presence of cryoprotective agents. — Ibid., N 2, p. 123—130.

Харьк. ин-т радиоэлектроники
Ин-т пробл. криобиологии и криомедицины
АН УССР, Харьков

Получено 29.10.82

УДК 57.043.547.422.426.1:547.963.4

А. Ю. Семенченко, В. А. Бондаренко, А. М. Белоус

ВЛИЯНИЕ ДИФИЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА ДИФФУЗИЮ БЕЛКОВ В РАСТВОРЕ

Дифильные вещества из класса спиртов (глицерин, этиленгликоль и др.) либо диполярные апротонные растворители (ДМСО, диметилформамид) и неионные ПАВ (ПЭО, ПЭГ) широко используются в биологии и медицине как лекарственные препараты [1] и в качестве криопротекторов при криоконсервации клеток и тканей [4]. Эти соединения при замораживании клеток и тканей влияют на характер кристаллизации воды и, взаимодействуя с клеткой, оказывают стабилизирующее воздействие на плазматическую мембрану [6]. Однако механизм такого влияния на мембрану до настоящего времени остается во многом неясным. Можно предположить, что важное значение в этих условиях имеет способность криопротекторов влиять на прочность водородных

Матеріал, захищений авторським правом

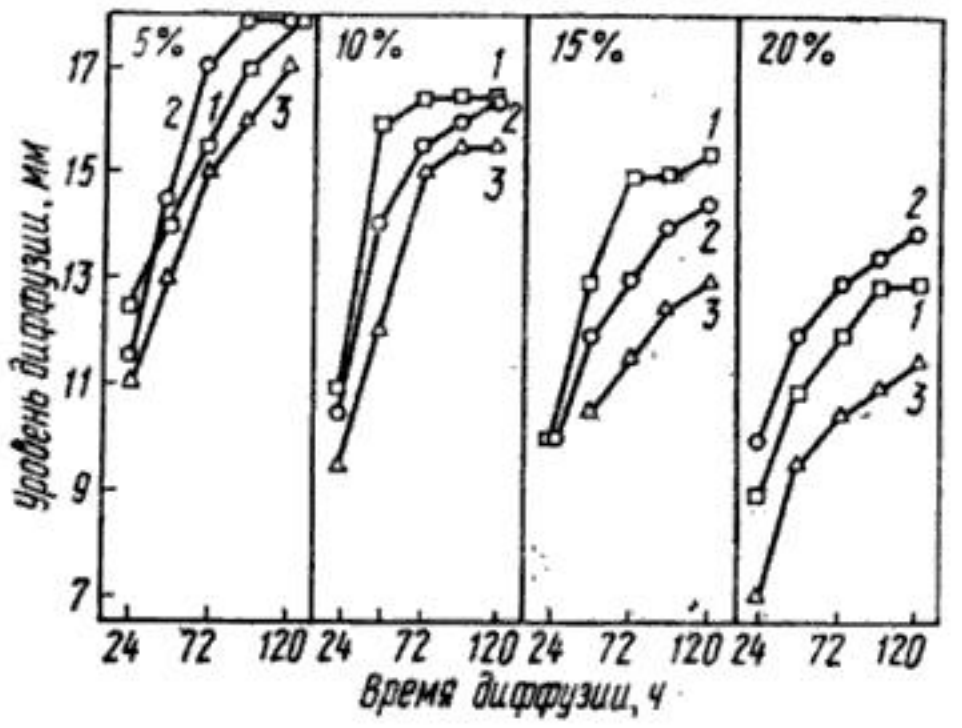
связей, силу гидрофобных взаимодействий, уровень мембранного потенциала и проницаемость мембран. Причем эффективность криопротекторов во многом определяется его способностью проникать либо не проникать через мембрану клеток. Поскольку нарушения структуры мембраны под влиянием замораживания и отогрева проявляются прежде всего в изменении ее проницаемости для ионов и растворимых ферментов, это является существенным фактором, снижающим репаративные возможности клетки после охлаждения и замораживания — отогрева.

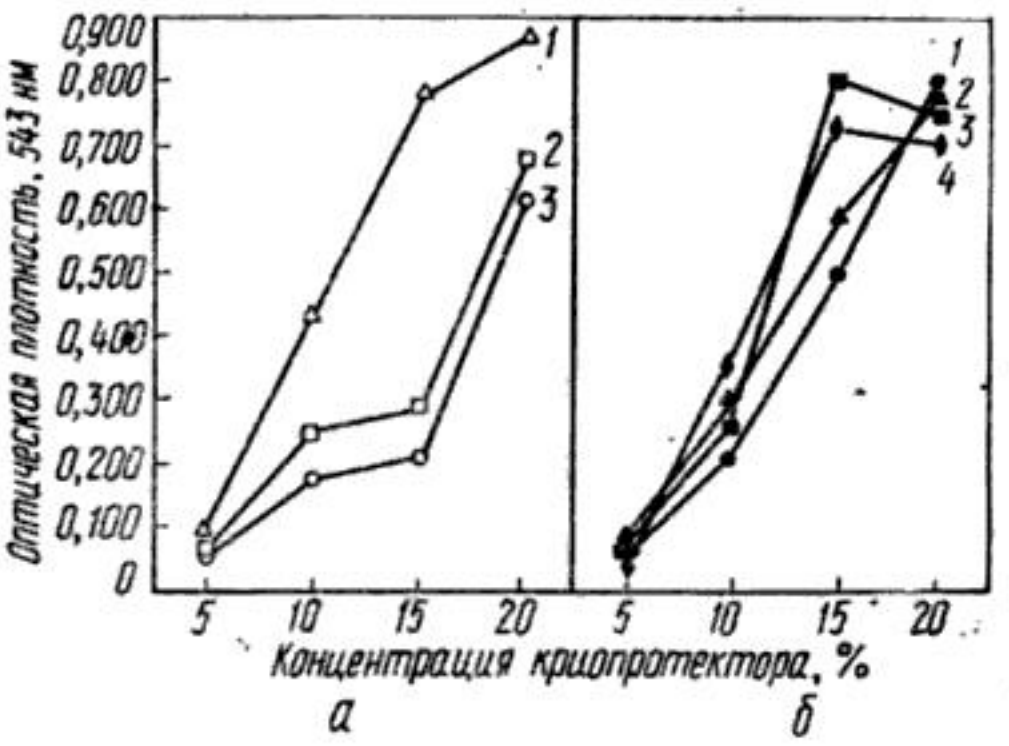
В этой связи интересно выяснить: способны ли криопротекторы влиять на скорость и объем диффузии биомолекул из клеток после их замораживания — отогрева. Очевидно, предотвращение элиминации содержимого клетки (биомолекул, ионов) после отогрева повышает вероятность восстановления ее структуры и функции при физиологических температурах. В данной статье изучены параметры диффузии гемоглобина в водных растворах низкомолекулярных соединений, хорошо проникающих через мембрану (глицерин, ДМСО и этиленгликоль), и полимерных веществ, сравнительно слабо проникающих в клетку.

Методы исследования. Изучение диффузии гемоглобина в растворы криопротекторов различной концентрации проводили по методу, описанному в работе [7]. 20 мл цельной крови трижды отмывали четырехкратным объемом 0,85%-ного NaCl, осаждая эритромассу центрифугированием 10 мин при 1500 об/мин. Осадок эритроцитов суспендировали в 0,85%-ном NaCl, приготовленном на фосфатном буфере (pH 7,4). Гематокрит суспензии составлял 35—40%. Эритроциты гемолизировали замораживанием в жидком азоте и последующим отогревом при 37 °С на водяной бане. Гемолизат отделяется от мембран центрифугированием 20000 об/мин в течение 30 мин. Порции по 0,3 мл гемолизата смешивали с равными объемами растворов криопротекторов, приготовленных на фосфатном буфере (pH 7,4) с 0,85-ным NaCl. Концентрация криопротекторов после смешивания с гемолизатом соответствовала концентрации криопротекторов в растворах, которые наслаивались на раствор гемоглобина. В следующей серии экспериментов среда, на которую наслаивались растворы криопротекторов, не содержала последних. Во всех опытах в пробирки (0,7×10 см), содержащие 0,2 мл раствора гемоглобина, наслаивали по 3 мл растворов криопротекторов различной концентрации (5, 10, 15 и 20%). В первом случае измеряли уровень диффузии гемоглобина в миллиметрах через каждые 24 ч, во втором через 12 ч отбирали из верхней фазы 2 мл, разводили в четыре раза фосфатным буфером и спектрофотометрировали при 543 нм против 5%-ных растворов криопротекторов.

Результаты и их обсуждение. На рис. 1 приведены данные о характере диффузии гемоглобина в растворах глицерина, этиленгликоля и ДМСО. Известно, что эти вещества способны проникать через клеточную мембрану и заполнять определенный объем внутри клетки [4]. Исходная концентрация криопротектора, применяемая для консервации биообъекта, как правило, составляет 10—15%, однако в зоне низких температур при вымерзании свободной воды она повышается. При сравнении параметров диффузии гемоглобина в растворах более низкой (5%) и более высокой (20%) концентраций криопротектора выявлено (см. рис. 1), что наиболее низкие показатели диффузии характерны для глицерина во всем ряду концентраций (5, 10, 15 и 20%), причем по мере роста концентраций криопротектора различия в показателях диффузии становятся более выраженными. Наиболее отчетливое снижение диффузии гемоглобина наблюдается в растворе 20%-ного глицерина. Подобный характер влияния глицерина на диффузию биомолекул, по-видимому, связан с изменением вязкости раствора. В криобиологической литературе [4] указывалось, что вязкость глицерина может играть важную роль в реализации его криозащитных свойств. В водно-глицериновых растворах с повышением концентрации глицерина вязкость среды

Матеріал, захищений авторським правом





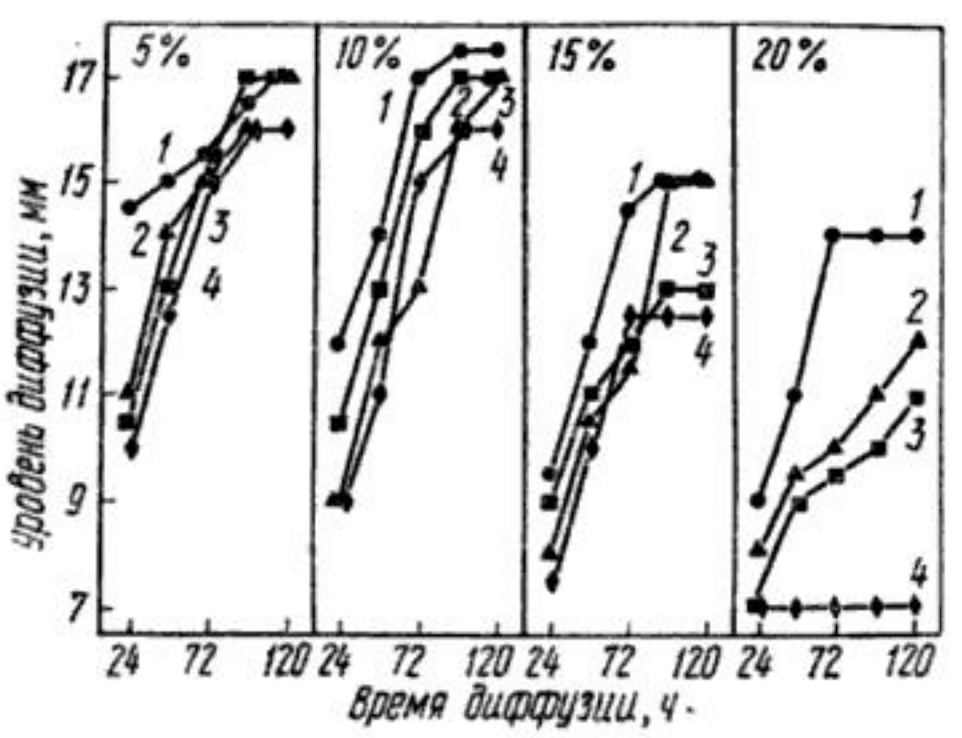


Рис. 1. Диффузия гемоглобина в растворы различных концентраций этиленгликоля (*1*), ДМСО (*2*) и глицерина (*3*).

Рис. 2. Перераспределение гемоглобина в водные растворы криопротекторов:

а — перераспределение в глицерин (*1*), этиленгликоль (*2*) и ДМСО (*3*); *б* — перераспределение гемоглобина в водные растворы ПЭО-100 (*1*), ПЭО-400 (*2*), ПЭО-1000 (*3*) и ПЭО-1500 (*4*).

Рис. 3. Диффузия гемоглобина в растворы различных концентраций ПЭО: ПЭО-100 (*1*), ПЭО-400 (*2*), ПЭО-1000 (*3*) и ПЭО-1500 (*4*).

увеличивается, что приводит к падению электропроводности, т. е. к уменьшению скорости движения ионов и молекул растворенного вещества и снижению их кинетической энергии [4]. Важно отметить, что при переохлаждении глицерина вязкость его возрастает адекватно уменьшению температуры. Предполагается, что именно это свойство — увеличение вязкости растворов глицерина в зоне низких температур — приводит к замедлению осмотических и диффузионных процессов, а следовательно, — к снижению скорости физико-химических процессов, способствующих разрушению клеточных мембран. Поэтому можно в известной мере говорить о «репаративных» способностях (свойствах) глицерина. В то же время важное значение в оценке параметров диффузии белков в растворе могут иметь и другие факторы, такие, как изменение гидратационных свойств, уровень агрегации, заряд и др. В этой связи следует отметить, что данные рис. 1 отражают показатели диффузии гемоглобина, подвергнутого предварительной инкубации с глицерином в каждой из указанных концентраций. Поэтому эти результаты не дают представления о возможном влиянии на диффузию таких параметров, как различия в показателях поверхностного натяжения водно-глицериновой и чисто водной фаз, а также изменения гидратации белка. Из рис. 2 видно, что для распределения гемоглобина в водные растворы криопротекторов без предварительной инкубации белка (т. е. из водной фазы) характерна картина, обратная приведенной на рис. 1. Для фиксированного объема раствора криопротектора увеличение оптической плотности при 543 нм отражает более высокий уровень перераспределения гемоглобина. При этом менее выраженный эффект наблюдается в растворах ДМСО, а максимальный — в растворах глицерина. Каковы причины подобных различий, остается неясным. Известно, что поверхностное натяжение глицерина меньше, чем воды. При 20%-ной концентрации глицерина поверхностное натяжение равно 70,9 дин/см [4]. Поэтому считают, что в этой или близких к ней кон-

Матеріал, захищений авторським правом

центрациях глицерин не изменяет поверхностное натяжение области раздела фаз: раствор глицерина — клеточная мембрана, так как поверхностное натяжение воды при температуре 20 °С достигает 72,7 дин/см [4]. Возможно, более существенное значение в распределении гемоглобина имеют параметры гидратации криопротекторов и конкуренция за связанную воду. Имеющиеся данные по сравнительной оценке гидратационных свойств ряда криопротекторов, таких, как глицерин, ПЭО молекулярной массы 100 и ДМСО, указывают на то, что гидратационные свойства этих соединений снижаются в указанной выше последовательности. При сравнении показателей распределения гемоглобина в растворах изученных криопротекторов (см. рис. 2) видно, что влияние криопротекторов на параметры распределения белка снижается в ряду: глицерин>ПЭО-100>ДМСО. Возможно, подобная взаимосвязь отражает преимущественное значение процессов гидратации глицерина в распределении гемоглобина в конечном объеме раствора.

На рис. 3 приведены показатели диффузии гемоглобина в растворах ПЭО различной молекулярной массы в различных концентрациях. Видно, что по мере увеличения молекулярной массы полимера происходит понижение диффузии белка: диффузия белка была наибольшей в растворе ПЭО-100 и наименьшей — в растворе ПЭО с молекулярной массой 1500. Более сложная картина наблюдалась в растворах ПЭО с молекулярной массой 400. В интервале концентраций 10—15% способность ПЭО с молекулярной массой 400 замедлять начальную диффузию гемоглобина была даже выше, чем ПЭО с молекулярной массой 1500. Ранее на модельных и природных мембранах [2] мы наблюдали более выраженное действие ПЭО-400 по сравнению с ПЭО-1000-1500 и ПЭО-100-300. Известно, что вязкость полимеров одного и того же ряда имеет прямолинейную зависимость от молекулярной массы. Поэтому маловероятно, что обнаруженные свойства ПЭО-400 связаны преимущественно именно с этим парамегром (хотя имеются данные об аномальных областях изменения характеристической вязкости в растворах ПЭО [1]). Возможно, более важную роль играют другие особенности растворов ПЭО, к которым относится способность концевых групп макромолекул с короткой цепью взаимодействовать не только между собой, но и с молекулами растворителя, что влияет на форму и размеры клубка, а также на его проницаемость. Кроме того, следует указать на наличие переходной области конформаций — от формы клубка к палочкообразной — при переходе от низкомолекулярных веществ к полимерам. К настоящему времени данных о характере взаимовлияния различных компонентов водных растворов ПЭО на диффузию макромолекул еще недостаточно, однако объяснение особенностей влияния ПЭО-400 на эти процессы следует, по-видимому, искать в связи с указанными выше факторами.

При сравнении данных, приведенных на рис. 1, 3, следует, что во всем ряду концентраций глицерин оказывает на диффузию такое же влияние, как и ПЭО с молекулярной массой 1000 и 1500. В связи с этим следует упомянуть, что по сравнению с вязкостью глицерина (1,14 сП для 10%-ных растворов при 25 °С) вязкость 10%-ных растворов ПЭО с молекулярной массой 400, 1000 и 2000 при той же температуре составляет соответственно 1,48; 1,54 и 1,85 сП [4].

В отличие от других соединений растворы ПЭО весьма сходным образом влияют на диффузию гемоглобина из водного раствора (см. рис. 2, *б*). Характерной особенностью действия ПЭО в этом случае является достижение максимума влияния на диффузию при повышении концентрации ПЭО с молекулярной массой 1000 и 1500 до 15% (см. рис. 2, *б*). Более высокие концентрации этих соединений фактически не изменяют показателей диффузии гемоглобина. Весьма важно, что при указанных концентрациях (15—20%) эффект ПЭО с молекулярной массой 1000 более выражен по сравнению с ПЭО с молекулярной массой 1500. Мы предполагаем, что эти различия связаны с особенностями

Матеріал, захищений авторським правом

поверхностного натяжения в растворах ПЭО разной молекулярной массы. Изменение этого показателя зависит от действия сил, возникающих в области раздела фаз при диффузии белков из воды в раствор ПЭО. Согласно данным работы [4], поверхностная активность водных растворов ПЭО с увеличением молекулярной массы повышается, причем его 2—30%-ные растворы способны понизить поверхностное натяжение воды на 3—16%. Представляет интерес также то, что в ряду ПЭО с молекулярной массой 100, 400, 1000 и 4000 поверхностное натяжение 15%-ных растворов составляет соответственно 62,0; 63,8; 50,1; 64,6 дин/см, т. е. для ПЭО-1000 отклонение величины поверхностного натяжения от этого показателя воды (72,7 дин/см) в указанном ряду является наиболее высоким.

Кроме того, достижение максимума диффузии белков при 15%-ных концентрациях ПЭО-1000 и ПЭО-1500 (см. рис. 2, *б*), по-видимому, связано с изменениями структуры раствора вблизи критической концентрации мицеллообразования (ККМ). Как известно, зависимость поверхностного натяжения растворов неионогенных поверхностно-активных веществ (ПАВ) выражается кривыми, имеющими прямолинейный участок с постоянным наклоном, который далее резко уменьшается. Выше ККМ поверхностное натяжение остается почти постоянным, т. е. горизонтальный участок кривой характеризует область концентраций, где бóльшая часть ПАВ выше ККМ находится в мицеллярной форме [5]. Специфический характер мицеллообразования в растворах ПЭО мы обнаружили ранее с применением флуоресцентных зондов [3].

Таким образом, полученные результаты о влиянии веществ, обладающих криопротекторными свойствами, на диффузию белков, по-видимому, отражают реальные процессы, происходящие в растворах, являющихся частью криобиологической системы. Сложная структурная организация биообъектов, очевидно, отличается разноплановым характером взаимодействия компонентов биосистемы и исследованных выше соединений, однако в этих процессах существенную роль играет такое свойство криопротекторов, как регулирование перемещения макромолекул. В этом, наверное, может проявляться своеобразная защитная («репаративная») роль дифильных соединений при глубоком замораживании биообъекта.

1. *Белоус А. М., Шраго М. И., Пушкарь Н. С.* Криоконсерванты. — Киев : Наук. думка, 1979. — 200 с.
2. *Бондаренко В. А., Бондаренко Т. П., Белоус А. М.* Взаимодействие полиэтиленоксидов с искусственными фосфолипидами и митохондриальными мембранами. — Криобиология и криомедицина, 1978, вып. 4, с. 7—9.
3. *Добрецов Г. Е., Бондаренко В. А., Белоус А. М.* Влияние криопротекторов на свойства растворителя и фосфолипидного бислоя в водных суспензиях мембран. — Докл. АН УССР, 1978, № 1, с. 58—61.
4. *Пушкарь Н. С., Шраго М. И., Белоус А. М., Калугин Ю. В.* Криопротекторы. — Киев : Наук. думка, 1978. — 204 с.
5. *Тенфорд Ч.* Физическая химия полимеров. — М. : Химия, 1965. — 772 с.
6. *Meryman H. T.* Freezing injury and its prevention in living cells. — Annu. Rev. Biophys. and Bioeng., 1974, **3**, p. 341—363.
7. *Ogiso T., Matsuda H., Oue S.* Effect of drugs on human erythrocytes. 4. Protective effect of dextran on drug-induced hemolysis. — Biochem. Pharmacol., 1978, **27**, N 8, p. 1263—1268.

Ин-т пробл. криобиологии и криомедицины
АН УССР, Харьков

Получено 29.10.82

Матеріал, захищений авторським правом

II. КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

УДК 57.043.577.15.576.347

А. М. Утевский, В. А. Чуйко, Л. Г. Карпенко

ВЛИЯНИЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ ПЕЧЕНИ ДО —196 °С НА СВЯЗЫВАНИЕ^{125} *I*-ТРИЙОДТИРОНИНА ЯДРАМИ И ЕГО АДРЕНЕРГИЧЕСКУЮ РЕГУЛЯЦИЮ

Важным звеном процесса нейрогуморальной регуляции является взаимодействие гормона со специфическими рецепторами, представляющее собой пусковой, инициирующий этап в реализации гормонального сигнала на клетку. Активность указанного процесса определяется физиологическим состоянием организма и зависит от изменений его внутренней среды, вызываемых действием различных «возмущающих» факторов.

Учитывая физиологическую значимость и высокую чувствительность систем нейрогуморальной регуляции клетки, мы поставили задачу — изучить состояние гормонрецепторных взаимодействий в криобиологическом эксперименте для выяснения действия низких температур и установления их участия в механизмах криоповреждения клетки.

В данной статье исследовалось связывание одного из гормонов щитовидной железы — трийодтиронина — с соответствующими рецепторами органа—мишени йодтиронинов печени. В отличие от большинства гормонов (катехоламины, полипептидные и белковые гормоны), рецепторы которых локализованы на плазматической мембране клетки, участки связывания йодтиронинов находятся внутри клетки — в ядре и цитоплазме [5, 8]. Наряду со связыванием трийодтиронина с его рецептором предполагалось исследовать влияние на этот процесс норадреналина (НА) — медиатора симпатической нервной системы, участвующего в регуляции разнообразных процессов и функций организма и до сих пор не изученного в отношении связывания трийодтиронина рецепторами.

Материалы и методы. В работе использовалась печень быка, замораживание срезов (50—60 мг) которой производилось в специальном полиэтиленовом цилиндрическом контейнере с начальной скоростью 300—400 °С/мин. Срезы помещались в среду Хэнкса, не содержащую криопротектора. Размораживание производилось на водяной бане при температуре +40 °С. Для получения ядер ткань измельчалась и гомогенизировалась в растворе, содержащем 0,25 М сахарозу, 0,05 М KCl, 0,01 M_gCl_2, 0,005 М трис-HCl буфера (pH 7,6). Гомогенат центрифугировался при 800_g. Для очистки ядер в среду выделения добавлялся 0,1%-ный раствор тритона *X*-100 и полученный осадок ядер ресуспендировался в холодной бане. Суспензия наслаивалась на 1 М раствора сахарозы с добавлением 0,01 М M_gCl_2 и 0,005 М трис-HCl буфера (pH 7,8) и центрифугировалась при 6000 об/мин. Полученный осадок ресуспендировался в среде, содержащей 0,25 М сахарозу, 0,02 М трис-HCl буфера (pH 7,5), 0,1 М дитиотрейтола, 0,001 М M_gCl_2, 0,05 М NaCl, 0,002 М ЭДТА, 5 % глицерина. Процесс связывания ^{125}I-трийодтиронина рецепторами ядер исследовался методом сатурационного анализа [2], время инкубации ядер с изотопом составляло 30 мин. В пробы добавлялось 2,8 нМ ^{125}I-трийодтиронина. Для удаления свободного и адсорбированного трийодтиронина использовался 0,1%-ный раствор тритона *X*-100. Активность осадков подсчитывалась на гамма-

Матеріал, захищений авторським правом

счетчике. Поправка на неспецифическое связывание производилась путем исследования процесса в условиях добавления высокой концентрации ($1 \cdot 10^{-4}$ М) немеченого трийодтиронина и использования инкубации образцов печени с ^{125}I-трийодтиронином при 0 °С [9]. Определение белка производилось методом Лоури [4].

Результаты и их обсуждение. Проведенные нами исследования инкубации ядер, выделенных из клеток печени быка с ^{125}I-трийодтирони-

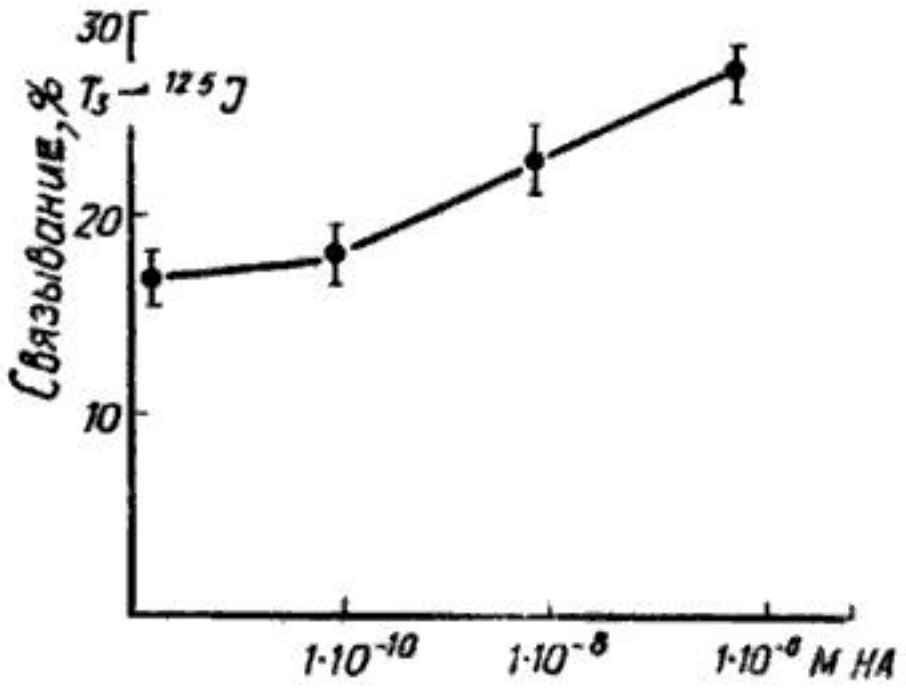


Рис. 1. Влияние норадреналина на связывание ^{125}I-трийодтиронина ядрами печени быка.

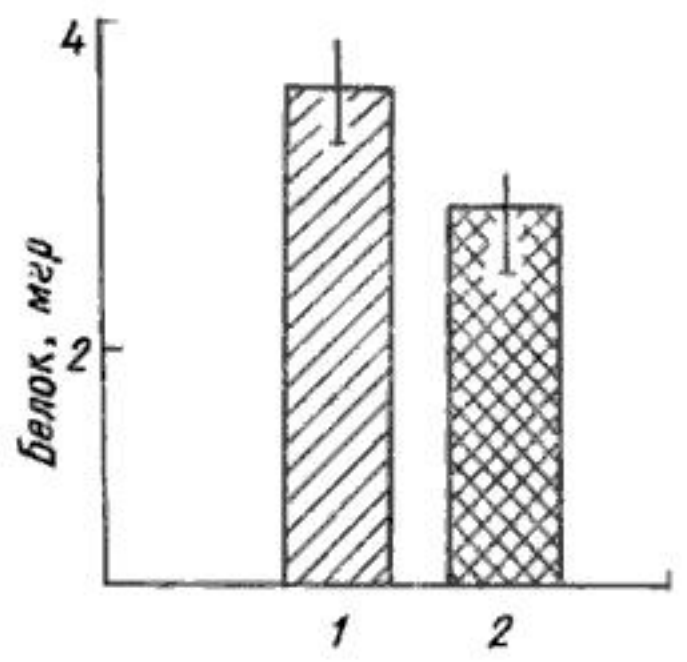


Рис. 2. Содержание белка в ядрах печени быка:
1 — нативная печень; *2* — замораживание при 300—400 °С/мин.

ном, показали, что в этих условиях действительно связывается часть добавленного меченого гормона, что соответствует литературным данным. Средняя величина такого связывания — 17,10±2,30 % от добавленного стандартного раствора. Добавление в ту же среду норадреналина в различных концентрациях показало зависимость интенсивности связывания трийодтиронина от концентрации добавленного адренергического медиатора (рис. 1). На рис. 1 видно, что процесс связывания трийодтиронина заметно активируется при добавлении норадреналина в концентрациях $1 \cdot 10^{-6}$ и $1 \cdot 10^{-8}$ М и фактически не изменяется при концентрации $1 \cdot 10^{-10}$ М. Близкие данные получены в исследованиях А. М. Утевского и С. О. Тапбергенова на печени крыс [1].

В другой серии опытов была исследована способность ядер печени связывать трийодтиронин после предварительного ее замораживания со скоростью 300—400 °С/мин до —196 °С. Установлено, что ядра, выделенные из печени после ее замораживания — оттаивания, сохраняют способность связывать меченый гормон (табл. 1). Однако добавление норадреналина ($1 \cdot 10^{-6}$ М) к ядрам, выделенным из печени, подвергнутой замораживанию до —196 °С, не приводит к увеличению связывания ^{125}I-трийодтиронина, как в опытах с ядрами, полученными из нативной печени (см. рис. 1). Процент связывания ^{125}I-T_3 виден из таких данных ($p > 0{,}05$).

Контроль	Замораживание 300—400 °С/мин	Замораживание $1 \cdot 10^{-6}$ М НА
17,10±2,30	15,73±2,17	19,18±3,16

Таким образом, существует прямая зависимость стимулирующего эффекта норадреналина от его концентрации; этот стимулирующий эффект не обнаруживается после замораживания — оттаивания. Это обстоятельство и тот факт, что стимулирующий эффект вызывают незначительные концентрации вещества, отражающие по существу его содержание в организме, позволяют сделать заключение о том, что одним из факторов регуляции процесса взаимодействия трийодтиронин — ядерный рецептор клеток печени является норадреналин.

Матеріал, захищений авторським правом

Сложившиеся к настоящему времени представления о механизмах регуляции взаимодействия тиреоидных гормонов с ядерными рецепторами основываются на единичных исследованиях и касаются главным образом взаимоотношений процесса связывания йодтиронинов с уровнем тиреоидных гормонов в крови [3, 9]. Участию же адренергических механизмов в регуляции данного процесса посвящена единственная работа — [1]. При введении крысам адренергических веществ установлены факты норадренергической стимуляции связывания ^{125}J-трийодтиронина ядрами печени и отсутствие влияния на процесс адреналина [1].

Полученный факт может быть истолкован как доказательство участия норадреналина в регуляции изучаемых гормонрецепторных взаимодействий в печени, и в этом отношении наши данные вполне согласуются с указанными результатами. Однако в связи с тем, что в данной работе опыты проводились только в условиях in vivo, нельзя исключить возможность не непосредственного эффекта норадреналина, а той чрезвычайной ситуации, которая создается в организме в результате введения высоких его концентраций.

Замораживание срезов печени до —196 °С ($V_{нач}$=300—400 °С/мин) практически не изменяет уровень связывания ^{125}J-трийодтиронина с ядрами, однако существенно снижает способность норадреналина стимулировать данный процесс. Факт сохранения ядрами, выделенными из замороженной печеночной паренхимы, способности к связыванию с ^{125}J-трийодтиронином свидетельствует о наличии в них рецепторов, чувствительных к используемому гормону. Известно, что ядерными рецепторами для трийодтиронина являются белки с молекулярной массой 45—50 тысяч дальтон [6, 8]. Вполне вероятно, что указанные белки вследствие структурно-функциональных особенностей криостабильны. Замораживание — оттаивание не оказывает существенного влияния ни на активный центр молекулы белка, ни на конформационное состояние.

Заключение о криостабильности ядерных рецепторов можно сделать на основании работ Смита и соавт. [7], в которой на ядрах печени свиньи было показано сохранение в ранние сроки инкубации (15—90 мин) одинакового с контрольным уровнем связывания трийодтиронина с ядрами, выделенными из замороженной ткани. Обнаруженное же авторами уменьшение связывающей способности ядер, полученных из замороженной ткани, в более длительные сроки инкубации (до 4 ч) вряд ли может быть результатом потери белка ядрами, хотя этот факт действительно имеет место, о чем свидетельствуют данные указанных авторов и результаты наших исследований (рис. 2). Это снижение, очевидно, не вызвано потерей рецепторных белков, так как на ранних сроках инкубации уровень связывания трийодтиронина с ядрами, полученными из замороженной печени, имеет тот же характер, что и при связывании с ядрами, полученными из нативной печени. Факт уменьшения связывающей способности ядер проявляется при более длительных сроках инкубации и обнаружен только при использовании ядер, полученных из замороженной ткани. Он может быть объяснен вызванным низкими температурами ускорением процесса диссоциации гормонрецепторного комплекса. Заслуживает внимания факт уменьшения при замораживании — оттаивании стимулирующего эффекта норадреналина. Учитывая возможный механизм действия норадреналина через β-адренергические рецепторы, локализованные на плазматической мембране клетки, путем активации аденилатциклазного комплекса и запуска соответствующего каскада биохимических реакций, следует предположить, что исчезновение влияния норадреналина на исследуемый процесс может быть обусловлено изменениями структурно-функционального состояния β-адренергических рецепторов, их взаимосвязи с соответствующими регуляторными механизмами.

Вполне вероятно, что различная криоустойчивость процессов гормонрецепторного взаимодействия и их адренергической регуляции оп-

Матеріал, захищений авторським правом

ределяется неодинаковой локализацией и структурно-функциональной организацией указанных процессов. Рецепторами трийодтиронина в ядрах клеток являются среднемолекулярные негистовые белки, способные к функционированию и связыванию с гормоном, находясь даже в солюбилизированном состоянии, что указывает на их независимость от структурной организации биохимического (липидного) окружения. Указанные рецепторы располагаются внутри клетки и, очевидно, ядра. В то же время рецепторы адренореактивных систем находятся на внешней стороне плазматической мембраны и их функциональная активность определяется конкретными фосфолипидами. Для передачи возбуждения с адренорецепторами и систему вторых посредников — аденилатциклазного комплекса — необходим целый ряд условий: соответствующее значение pH, определенный ионный состав и т. д.

Совершенно очевидно, что замораживание — оттаивание будет вызывать неодинаковые изменения в указанных процессах (связывание трийодтиронина и его адренергическую регуляцию). Более чувствительной окажется сложнее организованная система, находящаяся на поверхности клетки. Экспериментальные данные подтверждают это предположение.

Таким образом, установлены характер связывания *L*-трийодтиронина ядерными рецепторами печени быка и участие норадреналина в регуляции этого процесса.

Показана устойчивость процесса связывания *L*-трийодтиронина с ядрами печени быка, подвергнутой быстрому ($V_{нач}$=300—400 °С/мин) замораживанию без криопротектора, в то время как адренергическая регуляция процесса в этих условиях нарушается.

1. *Утевский А. М., Тапбергенов С. О.* Связывание трийодтиронина и захват норадреналина в тканях сердца и печени. — Укр. биохим. журн., 1982, **54**, № 3, с. 307—310.
2. *Чард Т.* Радиоиммунологические методы. — М.: Мир, 1981. — 246 с.
3. *Hamada S., Nakamura H., Nanno M., Imura H.* Tri-iodothyroineinduced increase in rat liver nuclear thyroid hormone receptors associated with increased mitochondrial α-glycerophosphate dehydrogenase activity. — Biochem J., 1979. **182**, p. 371—375.
4. *Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. — J. Biol. Chem., 1951, **193**, p. 265—275.
5. *Oppenheimer J. H., Koerner D., Schwartz H. L., Surks M. I.* Specific nuclear triiodthyroine binding sites in rat liver and kidneys. — J. Clin. Endocrinol. and Metabol., 1972, **35**, p. 330—333.
6. *Oppenheimer J. H., Dillman W. H., Schwartz H. L., Tiwie H. C.* Nuclear receptors and thyroid hormone action: a progress report. — Fed. Proc., 1979, **38**, p. 2154—2159.
7. *Smith H. C., Robinson S. E., Eastman C. S.* Binding of endogenous iodothyroines to isolated liver cell nuclei. — Endocrinology, 1980, **106**, p. 1133—1136.
8. *Tata J. R.* Cellular Receptors for Hormone Action. — New Jork: Acad. press, 1980, **3**, p. 1—33.
9. *Torresani J., Gharbi J., Lissitzky S., et al.* Autoradiographic detection of triiodthyronine in nuclei from normal and hypothyroid rat liver. — Biochem. and Biophys. Res. Communs, 1979, **86**, p. 371—374.

Ин-т пробл. криобиологии и криомедицины
АН УССР, Харьков

Получено 29.10.82

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043:611—018.26:612.349.8

Н. Ю. Евдокимова, Ю. В. Бездробный

ВЛИЯНИЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ ЖИРОВОЙ ТКАНИ НА ИНСУЛИНРЕЦЕПТОРНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ В ЕЕ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАНАХ

Мембранные структуры клетки являются криолабильными [3], и повреждение клеток при охлаждении, по-видимому, в значительной степени определяется повреждениями этих структур, обеспечивающих пространственную и функциональную организации клетки. Вместе с тем при исследовании мембранных структур клеток возникает необходимость в криоконсервировании клеток и тканей, особенно в случае использования клинического материала. Частным примером такой ситуации может служить изучение состояния инсулиновых рецепторов жировой ткани, замораживание которой необходимо с целью транспортировки и накопления достаточного количества проб для исследования.

В настоящей работе сравнивали параметры взаимодействия инсулина с его рецепторами в плазматических мембранах, выделенных из свежеполученной и замороженной жировой ткани. Из свежеполученной или хранившейся в течение 1—1,5 месяцев при температуре 20 °С жировой ткани (после размораживания) без применения коллагеназы [1], выделяли плазматические мембраны, которые использовались для изучения параметров содержащихся в них инсулиновых рецепторов сатурационным методом с использованием ^{125}J-инсулина (ПНР, *MJ*-49) и немеченого коммерческого инсулина, как описано ранее [4]. В опытах использовали жировую ткань шести собак (самцов) и четырех женщин. У четырех собак был индуцирован хлодитановый гипокортицизм, двое животных были контрольными. Из четырех исследовавшихся пациенток две страдали болезнью Иценко — Кушинга, одна — феохромоцитомой, одна была без эндокринной патологии. У собак жировую ткань брали после забоя, у людей — во время операции (у больной без эндокринной патологии — во время операции по поводу острого аппендицита). Каждую пробу ткани разделяли на равные части, одну из которых замораживали, а другую сразу же использовали для выделения мембран. Концентрацию связывающих инсулин мест определяли с помощью графического анализа Скэтчарда [8] (по пересечению с осью абсцисс), а сродство рецепторов к гормону — с помощью графического анализа Хилла [6] (по пересечению с осью абсцисс). Из последнего определяли и степень отрицательного кооперативного взаимодействия рецепторов (коэффициент Хилла) — по углу наклона прямой зависимости Хилла.

На рис. 1, *а* показана сатурационная кривая, т. е. кривая вытеснения ^{125}J-инсулина из комплекса с рецепторами возрастающими количествами немеченого инсулина, для плазматических мембран, выделенных из незамороженной и замороженной жировой ткани одной больной. Видно, что связывание меченого гормона выше в случае свежевыделенной ткани при всех концентрациях немеченого инсулина. Графическая зависимость Хилла для этих данных (см. рис. 1, *б*) показывает, что сродство к инсулину и отрицательная кооперативность рецепторов в результате замораживания не изменяются -- кривые, выражающие зависимость Хилла для мембран из незамороженной и замороженной ткани, совпадают. Зависимость Скэтчарда (см. рис. 1, *в*), однако, свидетельствует о снижении количества связывающих инсулин мест в мембранах, выделенных из замороженной ткани: соответствующая им кривая пересечет ось абсцисс раньше, чем кривая для мембран, выделенных из незамороженной ткани. Количество связывающих инсулин мест для этих мембран выражалось соответственно величинами

Матеріал, захищений авторським правом

0,73 и 1,10 нмолей/мг белка. Константа ассоциации комплекса инсулин — рецептор, характеризующая сродство к гормону, была $2{,}13 \times \times 10^8$ м$^{-1}$, а коэффициент Хилла — 0,88 для мембран из замороженной и незамороженной ткани.

В табл. 1 представлены результаты статистической обработки полученных данных по максимальному специфическому связыванию ^{125}J-

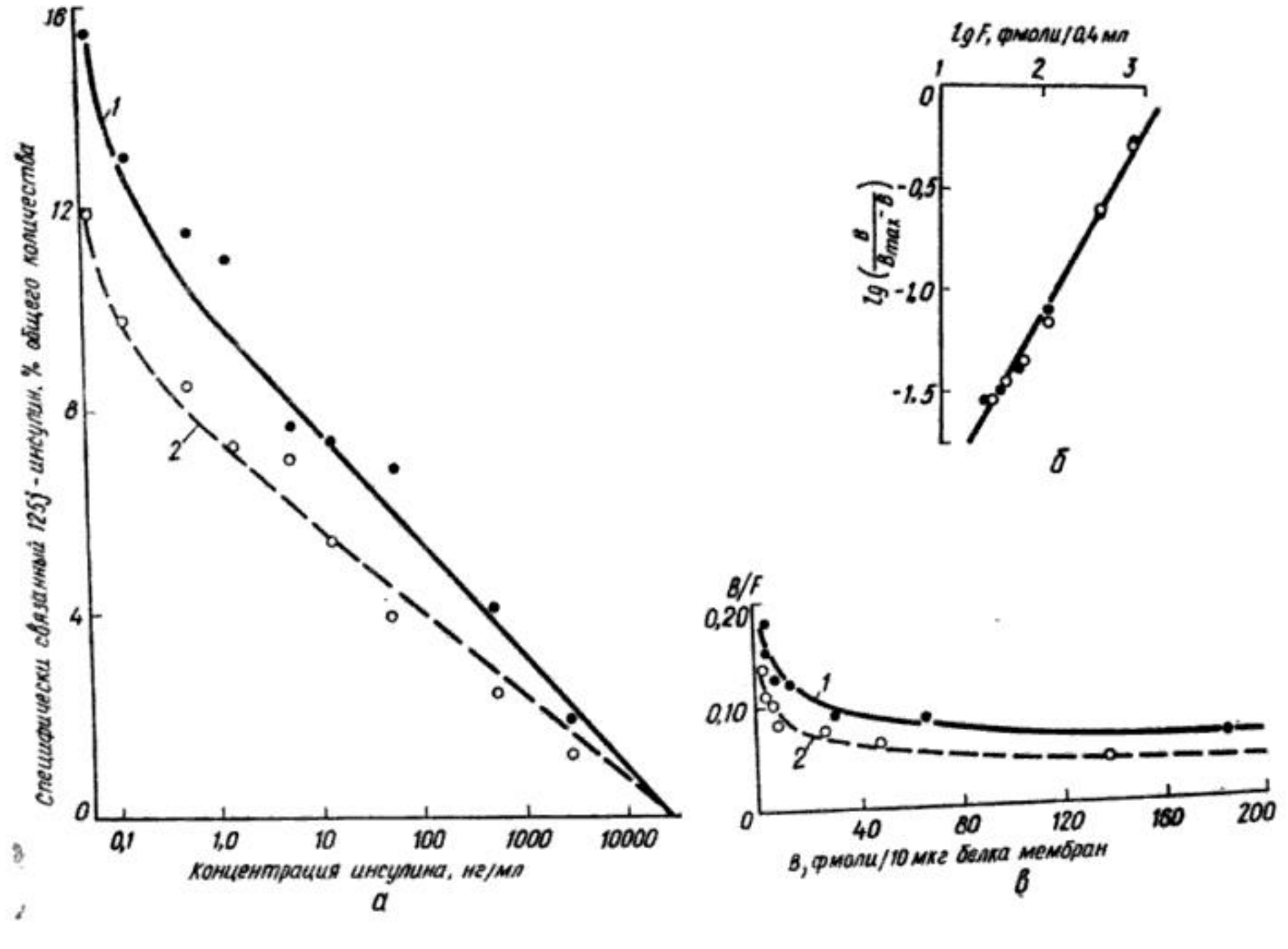


Рис. 1. Инсулинрецепторное взаимодействие в плазматических мембранах больной, выделенных из незамороженной (*1*) и замороженной (*2*) жировой ткани:

а — вытеснение ^{215}J-инсулина из комплекса с рецепторами возрастающими количествами немеченого гормона; *б* — зависимость Хилла; *в* — зависимость Скэтчарда (*B* — связанный инсулин, *F* — свободный инсулин, B_{max} — максимальное связывание инсулина).

инсулина. Замораживание жировой ткани собак и людей снижало максимальное связывание ^{125}J-инсулина с ее мембранами более чем 1,5 раза. Для решения вопроса о возможности использования мембран, выделенных из замороженной жировой ткани, необходимо выяснить, с одинаковой ли пропорциональностью снижается способность рецепторов связывать инсулин в разных пробах ткани, иными словами — коррелирует ли инсулинсвязывающая активность рецепторов до замораживания с этой активностью после замораживания. На рис. 2 приведена корреляционная зависимость между максимальным связыванием ^{125}J-инсулина в незамороженной и замороженной ткани людей и собак ($n = =10$).

Полученный коэффициент корреляции значимый ($r = 0{,}769$; $p < <0{,}01$).

Следовательно, замораживание приводит к однозначному снижению связывания инсулина с рецепторами и соотношение инсулинсвязывающей активности проб от разных пациентов или особей в свежеполученной ткани сохраняется после ее замораживания.

Следует отметить, что в настоящей работе намеренно использовалась жировая ткань здорового человека и больных феохромоцитомой и гиперкортицизмом, которые специфически изменяли инсулинсвязывающую активность рецепторов жировой ткани [2]. Сохранение корреляции между данными для замороженных и незамороженных проб ткани в

Матеріал, захищений авторським правом

данном случае говорит о сохранении этих изменений в мембранах из замороженной ткани.

В табл. 2 представлены средние данные для максимального специфического и неспецифического (в присутствии избытка немеченого инсулина) связывания ^{125}I-инсулина и активность фермента — маркера плазматических мембран замороженных и незамороженных проб жировой ткани, определенные как для независимых совокупностей. Приведены также параметры инсулинрецепторного взаимодействия, полученные с помощью указанных графических зависимостей по усредненным для каждой выборки сатурационным кривым. Видно, что величины констант ассоциации и коэффициентов Хилла мало различаются для проб из замороженной и незамороженной ткани, но количество связывающих инсулин мест при замораживании снижается более чем в 1,5 раза, как и максимальное специфическое связывание ^{125}I-инсулина. Замораживание ткани приводит также к значительному снижению активности 5'-нуклеотидазы в выделенных мембранах, но корреляции в ее активности до и после замораживания в отличие от связывания ^{125}I-инсулина не наблюдалось ($r=0{,}326$; $p>0{,}05$).

Таблица 1. Максимальное специфическое связывание ^{125}I-инсулина

Объект	n	Общее количество ^{125}I-инсулина, $\bar{X}$, %		$\bar{\Delta}\pm S\bar{\Delta}$	p
		Незамороженная ткань	Замороженная ткань		
Люди	4	17,3	11,3	6 3±1,3	<0,05
Собаки	6	14,2	8,7	5,6±0,6	0,001

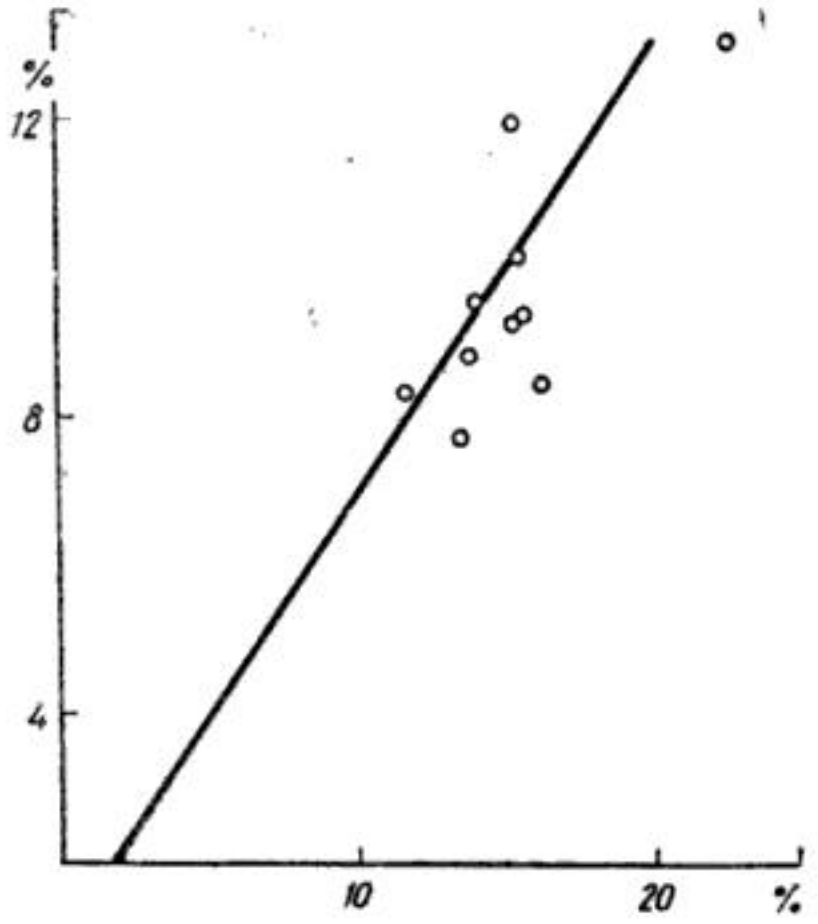


Рис. 2. Корреляционная зависимость между максимальным связыванием ^{125}I-инсулина плазматических мембран в незамороженной (на оси абсцисс) и замороженной (на оси ординат) жировой ткани.

Замораживание клеток приводит к повреждению мембран на термодинамическом, физико-химическом и биохимическом уровнях [3]. Вероятно, эти повреждения обусловливают снижение активности 5'-нуклеотидазы в выделенных из замороженной ткани мембранах. Вместе с тем отсутствие изменений в сродстве инсулиновых рецепторов к инсулину и степени отрицательного кооперативного взаимодействия говорит об отсутствии серьезных нарушений в структуре рецептора. Такая устойчивость инсулиновых рецепторов к криовоздействиям обусловлена, по-видимому, отсутствием в их составе липидов и неучастием гидрофобных взаимодействий в поддержании их структуры. Уменьшение же количества рецепторов в мембране при замораживании клеток, наверное, обусловлено не повреждением плазматической мембраны, а нарушением структур или процессов вне ее. Об этом говорит то, что снижение количества рецепторов в мембране не происходит при замораживании целых клеток (ткани), в то время как замораживание очищенных мембран, согласно литературным [5] и нашим данным, не влияет на концентрацию инсулиновых рецепторов в них. Согласно современным представлениям, инсулиновые рецепторы «циркулируют» в клетке, перемещаясь с поверхности плазматической мембраны внутрь клетки (в комплексе с инсулином) и обратно путем эндо- и экзоцитоза [7]. Вероятно, в результате замораживания клеток какой-то пул рецепторов, ассоциированный с плазматической мембраной, утрачивается ею в результате повреждения, не влияющего на сами рецепторы.

Матеріал, захищений авторським правом

Таблица 2. Слияние замораживания жировой ткани на свойства выделяемых из нее плазматических мембран

Объект	Исследуемая группа	Максимальное специфическое связывание ^{125}J-инсулина, % общего количества	Неспецифическое связывание ^{125}J-инсулина	Константа ассоциации, 10^8 $м^{-1}$	Коэффициент Хилла	Количество связывающих инсулин мест, нмоль/мг белка мембраны	Активность 5'-нуклеотидазы, мкг Р/мг белка/ч
Люди	Незамороженная ткань, n-4	17,3±2,4	2,7±0,9	2,20	0,82	1,22	13,0±2,3
	Замороженная ткань, n-4	11,3±1,9	2,6±0,8	1,89	0,84	0,54	5,6±0,9
Собаки	Незамороженная ткань, n-6	14,2±2,0	2,1±0,7	2,79	0,91	1,02	10,7±1,5
	Замороженная ткань, n-6	8,7±1,3	1,9±0,3	2,83	0,85	0,60	3,8±0,7

1. *Бездробный Ю. В., Евдокимова Н. Ю.* Выделение плазматических мембран жировых клеток без применения коллагеназы. — Вопр. мед. химии, 1979, № 3, с. 354—358.
2. *Бездробный Ю. В., Евдокимова Н. Ю.* Инсулиновые рецепторы и патогенез сахарного диабета. — В кн.: Актуальные вопросы экспериментальной и клинической эндокринологии: Материалы III съезда эндокринологов УССР. 1982. — 100 с.
3. *Белоус А. М., Бондаренко Т. П., Бондаренко В. А.* Молекулярные механизмы криоповреждения мембранных структур. — Криобиология и криомедицина, 1979, вып. 5, с. 3—13.
4. *Комиссаренко В. П., Бездробный Ю. В., Евдокимова Н. Ю. и др.* Характеристика инсулиновых рецепторов плазматических мембран адипоцитов при гипоркортицизме. — Докл. АН СССР, 1979, **244**, № 2, с. 474—478.
5. *Freychet P., Roth J., Neville D. M. Jr.* Insulin receptors in the liver: specific binding of ^{125}J-insulin to the plasma membrane and its relation to insulin bioactivity. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1971, **68**, N 8, p. 1833—1837.
6. *Hill A. V.* The combinations of haemoglobin with oxygen and with carbon monoxide I. — Biochem. J., 1913, **7**, N 2, p. 471—480.
7. *Marshall S., Green A., Olefsky J. M.* Evidence for insulin receptors in isolated rat adipocytes. — J. Biol. Chem., 1981, **256**, N 22, p. 11464—11470.
8. *Scatchard G.* The attractions of proteins for small molecules and ions. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1949, **51**, N 3, p. 85—92.

Киев. НИИ эндокринологии и обмена веществ МЗ УССР Получено 10.05.82

УДК 57:043:57:536.48.047:548.0:661.073.585

А. Н. Новиков, С. Т. Олейник, Е. Н. Черныш, О. В. Пашковская

АДСОРБЦИОННОЕ ПОНИЖЕНИЕ ПРОЧНОСТИ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ХОЛОДОВОМ ВОЗДЕЙСТВИИ ПЭО-1500

Применение полимерных соединений в качестве криопротекторов по сравнению с глицерином при консервации эритроцитов [1—3] имеет то преимущество, что позволяет использовать отогретые эритроциты без их отмывки от консервирующей среды и, следовательно, без применения для этой цели сложной аппаратуры. Результаты криоконсервирования эритроцитов под защитой криопротектора-полиэтиленоксида м.м. 1500 (ПЭО-1500) при концентрации 10 % в контейнерах емкостью до 2 мл показывают вполне удовлетворительные результаты их сохранности [5]. Однако при консервации эритроцитов в контейнерах бóльших объемов (до 500 мл), требуемых условиями практического применения метода, показано значительное ухудшение их сохранности. Причем положение пока ощутимо не улучшило ни применение повышенного содержания ПЭО-1500, ни различные усовершенствования стадий подготовки эри-

Матеріал, захищений авторським правом

тромассы к консервации, замораживанию и отогреву. Условия консервации эритроцитов в одной и той же защитной среде, но в контейнерах различного объема различаются только скоростями замораживания — отогрева.

Следовательно, можно предположить, что при снижении скоростей замораживания — отогрева, наблюдаемых в контейнерах больших объемов, появляются или усиливаются какие-то процессы, способствующие повреждению эритроцитов. Такими процессами могут быть чрезмерное обезвоживание эритроцитов, увеличение времени действия концентрированных растворов солей и других компонентов криозащитной среды, реализация адсорбционных взаимодействий мембрана эритроцита — криопротектор.

Таблица 1. Влияние времени прокачки эритромассы на гемолиз при температуре +37 °С

Среда	Гемолиз, мг%	
	до прокачки	после 300 мин прокачки
10%-ный ПЭО-1500	7	70
Контроль	10	154

Попытка оценить последний из перечисленных возможных повреждающих процессов предпринята нами в этой статье. Конкретной целью было изучение влияния криопротектора ПЭО-1500 на прочность мембран эритроцитов человека после воздействия в различных температурно-временных условиях.

Методы исследования. Прочность мембран эритроцитов оценивалась по данным гемолиза после различного холодового воздействия и прокачки их суспензии по замкнутому контуру перильстатическим насосом со скоростью 9,0 мл/мин при температуре +37 °С по шлангам. Шланги были изготовлены из силиконовой резины с внутренним диаметром 0,15 мм.

Результаты и их обсуждение. В первой серии опытов было изучено влияние ПЭО-1500 в концентрации 10 % на прочность мембран эритроцитов без холодового воздействия в условиях прокачки эритромассы в течение 300 мин при температуре +37 °С. Контролем служила эритромасса без ПЭО-1500, помещенная в аналогичные условия. Полученные зависимости гемолиза от времени прокачки — практически прямые линии, поэтому их можно охарактеризовать парами значений (табл. 1). Данные, приведенные в табл. 1, свидетельствуют о значительном упрочнении мембраны эритроцитов в присутствии ПЭО-1500 без холодового воздействия при подобных условиях механического воздействия на них. Объяснить это можно характером адсорбции молекул ПЭО-1500 на мембране эритроцитов. Так, судя по полученной нами экспериментальной изотерме адсорбции ПЭО-1500 в системе, моделирующей границу раздела клеточная мембрана — внеклеточная среда (раствор липидов крови в гептане — водный раствор ПЭО-1500) (рис. 1), можно считать, что при концентрации криопротектора 0,05—0,10% исследуемая граница раздела фаз полностью заполнена мономолекулярным слоем молекул ПЭО-1500. При дальнейшем увеличении концентрации криопротектора наклон кривой к оси концентраций указывает на тенденцию образования полимолекулярного адсорбционного слоя ПЭО-1500. Такое утолщение мембраны адсорбционными слоями молекул ПЭО-1500 и приводит, по-видимому, к ее упрочению при механических воздействиях.

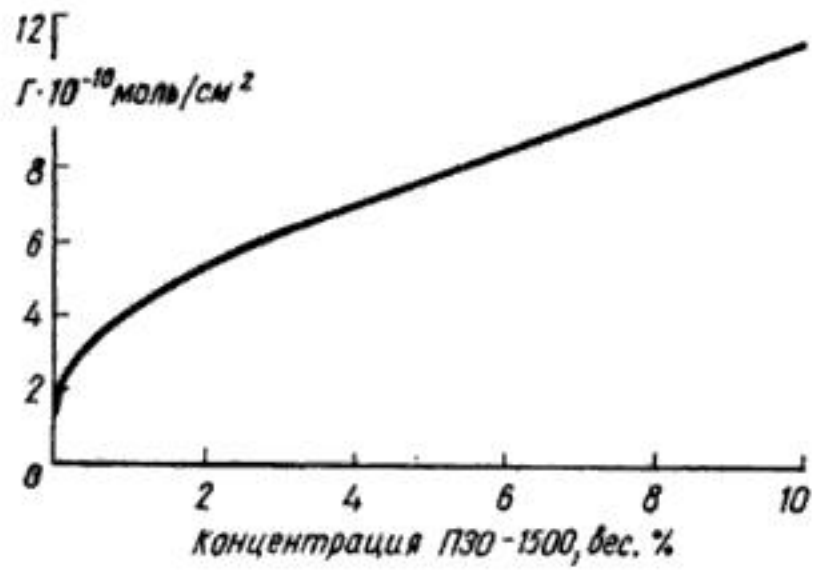


Рис. 1. Зависимость количества адсорбировавшегося ПЭО-1500 ($Г \times 10^{-10}$ моль/см^2) на границе раздела раствор липидов крови в гептане — водный раствор ПЭО-1500 от его содержания.

Матеріал, захищений авторським правом

Во второй серии опытов было изучено влияние ПЭО-1500 в 10%-ной концентрации на прочность мембран эритроцитов, находившихся при пониженных температурах (до —3,6 °С), а также в контакте с растущими кристаллами льда. Холодовое воздействие осуществлялось в бане с температурой —5,5 °С при перемешивании со скоростью вращения мешалки 400 об/мин. Прокачка по контуру осуществлялась также при +37 °С. Результаты этих опытов приведены в табл. 2, где видно, что охлаждение эритромассы с 10%-ным ПЭО-1500 до —3,6 °С без образования льда не приводит к значительному увеличению гемолиза по сравнению с контролем, что свидетельствует об отсутствии повреждения мембран. Охлаждение эритромассы со льдообразованием от —0,5 до —1,0 °С приводит к увеличению гемолиза, причем более значительному в присутствии ПЭО-1500.

Таблица 2. Влияние условий холодового воздействия на гемолиз эритроцитов при экспозиции 12 мин

Условия холодового воздействия	Содержание ПЭО-1500, %	Гемолиз, мг%	
		до прокачки	после 100 мин прокачки
Без холодового воздействия	10	2	18
Экспозиция при —3,6 °С без образования льда	10	2	23
Экспозиция при —1 °С с образованием льда	10	82	118
Экспозиция при —0,5 °С с образованием льда	—	16	46

Если бы взаимодействие ПЭО-1500 с мембраной проявлялось только в образовании его адсорбционных моно- и полислоев, то должно было бы наблюдаться упрочение мембран (как в первой серии). Следовательно, в этих условиях преобладает иной характер взаимодействия ПЭО-1500 и мембраны, приводящий к уменьшению прочности последней. Представить этот повреждающий механизм действия ПЭО-1500 на мембрану можно следующим образом. В условиях контакта эритроцитов с растущими кристаллами льда на их мембраны действует осмотический напор воды, который при соответствующей величине может привести к возникновению микротрещин в мембранах. Молекулы ПЭО-1500, находящиеся в адсорбционном слое мембраны, могут мигрировать в подобные микротрещины, проникать на глубину и этим способствовать их развитию. Образовавшиеся таким образом микротрещины при воздействии деформирующих факторов (например, при прокачке) способствуют разрушению мембран. Прочность мембран может уменьшаться и вследствие экранирования сил сцепления стенок микротрещин молекулами ПЭО-1500, что приводит к затруднению их «залечивания». Механизм подобного влияния поверхностно-активных веществ разработан в трудах П. А. Ребиндера [4] и широко применяется в технике.

В третьей серии экспериментов исследовано влияние условий льдообразования на прочность мембран эритроцитов в присутствии 10%-ного ПЭО-1500. Вариации условий льдообразования осуществлялись различной температурой бани (—2,4; —5,5; —12,5 °С), в которой производили охлаждение эритромассы до температуры кристаллизации системы. Охлаждение и фазовый переход вода—лед происходили в условиях постоянного перемешивания в течение 12 мин. Прокачка суспензии эритроцитов осуществлялась, как и ранее. Полученные результаты приведены в табл. 3.

Можно считать, что температура бани определяет скорость теплоотвода от исследуемого объема эритромассы и, следовательно, влияет на скорость льдообразования. В нашем случае максимальная скорость льдообразования соответствовала бане с температурой —12,5 °С, минимальная — 2,4 °С. Скорость льдообразования, в свою очередь, определяет осмотический напор воды на мембрану эритроцита, величина которого пропорциональна вероятности образования микротрещин на поверхности мембран и, следовательно, снижения их прочности. Полученные данные вполне согласуются с изложенными выше. Так, при

Матеріал, захищений авторським правом

температуре бани —2,4 °С прочность мембран эритроцитов уменьшается незначительно, при —5,5 °С — более значительно, при —12,5 °С прочность достигает минимальной величины.

Теория адсорбционного понижения прочности твердых тел [4] показывает, что эта особенность должна в достаточной мере проявляться при содержании поверхностно-активного вещества, необходимого для заполнения адсорбционного монослоя границы раздела твердое тело — раствор, т. е. при очень низких концентрациях. В нашем случае по данным изотермы адсорбции ПЭО-1500 в модельной системе (см. рис. 1) концентрация ПЭО-1500 в растворе, при которой заметно должен проявляться эффект уменьшения прочности мембран эритроцитов, должна быть ⩽0,05—0,10 вес. %.

Таблица 3. Влияние условий льдообразования на гемолиз эритроцитов в присутствии 10%-ного ПЭО-1500

Температура бани, °С	Гемолиз, мг%	
	до прокачки	после 100 мин прокачки
— 2,4	20	53
— 5,5	52	112
—12,5	650	925

Экспериментальная проверка этого предположения осуществлена в четвертой серии опытов (рис. 2). Содержание ПЭО-1500 в эритромассе варьировалось в пределах 0—0,05 вес. %. Температура бани была —12,5 °С, время выдержки эритромассы при перемешивании на холодовой бане 5 мин.

Результаты этой серии опытов показали, что зависимость прочности мембран от концентрации ПЭО-1500 имеет вид восходящей и пологой ветви с границей между ними при концентрации ПЭО-1500 порядка 0,005 %. Однотипность полученной зависимости и изотермы адсорбции ПЭО-1500 на границе раздела, моделирующей границу мембраны эритроцита — внеклеточной среды, является веским доказательством предложенного нами механизма взаимодействия ПЭО-1500 — мембраны эритроцита, обусловленного адсорбцией молекул ПЭО-1500 на ней.

Эффект понижения прочности мембран эритроцитов ПЭО-1500 и, возможно, другими криопротекторами, обладающими поверхностной активностью, явно не желателен. Поэтому важен выбор условий, уменьшающих или предотвращающих его. Предположительно это можно осуществить следующим образом: предотвратить образование микротрещин в мембране. Это можно достичь небольшими деформирующими и осмотическими нагрузками на мембрану при криоконсервировании; предотвратить или, по крайней мере, замедлить диффузию молекул ПЭО-1500 в микротрещины мембраны. Реализовать это возможно уменьшением времени протекания этого процесса, повышением вязкости среды, адсорбцией на мембране иного криопротектора, обладающего большей поверхностной активностью, чем ПЭО-1500, и значительным размером молекул, не позволяющим ему проникать в микротрещины.

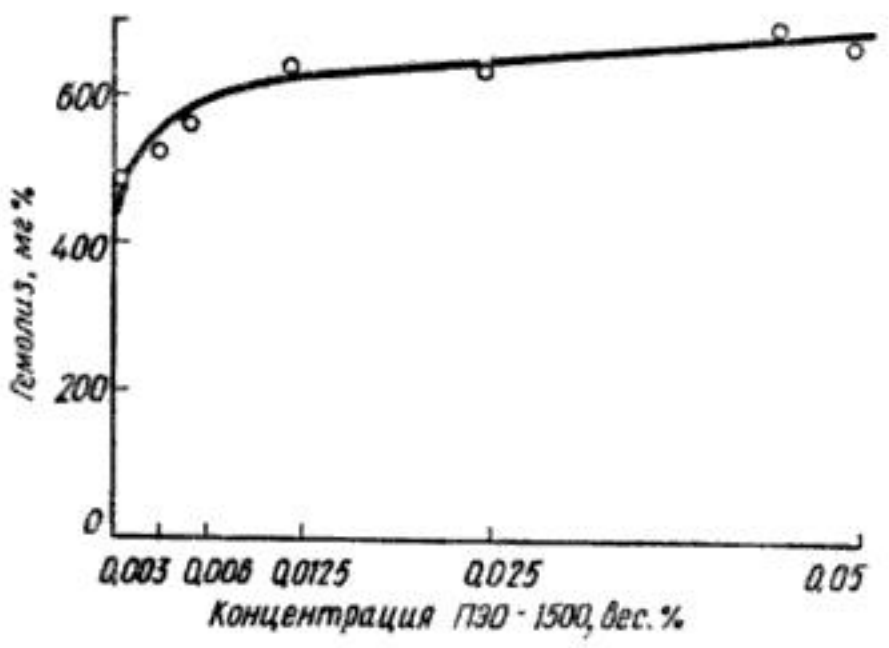


Рис. 2. Зависимость содержания свободного гемоглобина как меры прочности мембран эритроцитов от содержания ПЭО-1500.

1. *Виноград-Финкель Ф. Р., Киселев А. Е.* Криобиологические аспекты долгосрочного хранения крови. — В кн.: Тез. докл. XII Междунар. конгр. по переливанию крови. М., 1969, с. 6—7.
2. *Когут Г. И.* Консервирование лейкоцитов при —196 °С в среде, содержащей поливинилпирролидон (ПВП). — Там же, с. 4—7.
3. *Применение* глубокого холода для длительного консервирования крови в замороженном состоянии. — Пробл. гематологии и переливания крови / Виноград-Финкель Ф. Р., Киселев А. Е., Гинзбург Ф. Г. и др. 1963, № 5, с. 3—16.

Матеріал, захищений авторським правом

4. *Ребиндер П. А., Шрейдер Л. А., Жигач К. Ф.* Понизители твердости в бурении. — М. : Изд-во АН СССР, 1944. — 87 с.
5. *Шраго М. И., Бредихина Л. П., Тимченко В. Г. и др.* Полиэтиленоксиды в низкотемпературном консервировании эритроцитов (некоторые итоги и перспективы). — Криобиология и криомедицина, 1978, вып. 4, с. 38—45.

Ин-т пробл. криобиологии и криомедицины
АН УССР, Харьков

Получено 25.10.82

УДК 57.043:612.111.014.41

И. А. Кочережская

ЭЛЕКТРОСПЕКТРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КРОВИ, ПОДЛЕЖАЩЕЙ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОМУ КОНСЕРВИРОВАНИЮ

Практика показывает, что результат низкотемпературного консервирования клеток крови определяется не только параметрами ограждающей среды и условиями замораживания — отогрева [4], но также состоянием консервируемого материала. В частности, для эритроцитов сила влияния исходных характеристик крови на качество деконсервированной крови сравнима с силой влияния факторов, определяющих режим консервирования, таких, как скорость охлаждения и концентрация криопротекторов [2]. Было показано также [1], что учет индивидуальных особенностей крови доноров путем измерения удельной электропроводности подготовленной к замораживанию суспензии эритроцитов позволяет дифференцированно подойти к выбору концентрации криопротектора (ПЭО-1500).

Удельная электропроводность крови является интегральным показателем, зависящим от электропроводности плазмы, концентрации клеток крови, в основном эритроцитов, их морфологических и биофизических особенностей: целостности и толщины мембраны, проводимости мембраны и других.

Цель настоящего исследования — выяснить, какие из перечисленных параметров вносят наибольший вклад в общую электропроводность крови и, следовательно, оказывают влияние на исход низкотемпературного консервирования крови отдельных доноров.

Методика эксперимента. Материалом исследования служили эритроциты (естественный отстой) и плазма донорской крови, заготовленной на гемоконсерванте № 7б Харьковской областной станцией переливания крови, в течение первых двух суток хранения. Удельная электропроводность суспензии эритроцитов и плазмы измерялась на частоте 300 кГц. Состояние мембраны эритроцитов оценивали по ее поляризационным свойствам. Коэффициент поляризации мембран определялся отношением $K_п = \frac{\varkappa_{10^6}}{\varkappa_{10^4}}$, где $\varkappa_{10^6}$, $\varkappa_{10^4}$ — удельная электропроводность суспензии эритроцитов соответственно на частоте 10^6 и 10^4 Гц. Значения $K_п$ соответствуют концентрации эритроцитов в суспензии 70 %.

Удельная электропроводность цитоплазмы эритроцитов определялась по формуле (5) $\varkappa_ц = \varkappa_с \frac{\varkappa_{вч} - \varkappa_{нч}}{\varkappa_{пл} - \varkappa_{нч}}$, где $\varkappa_ц$, $\varkappa_с$, $\varkappa_{вч}$, $\varkappa_{нч}$ — удельные электропроводности цитоплазмы, суспензионной среды на частоте 10 кГц и суспензии на высокой (30 МГц) и низкой (10 кГц) частотах.

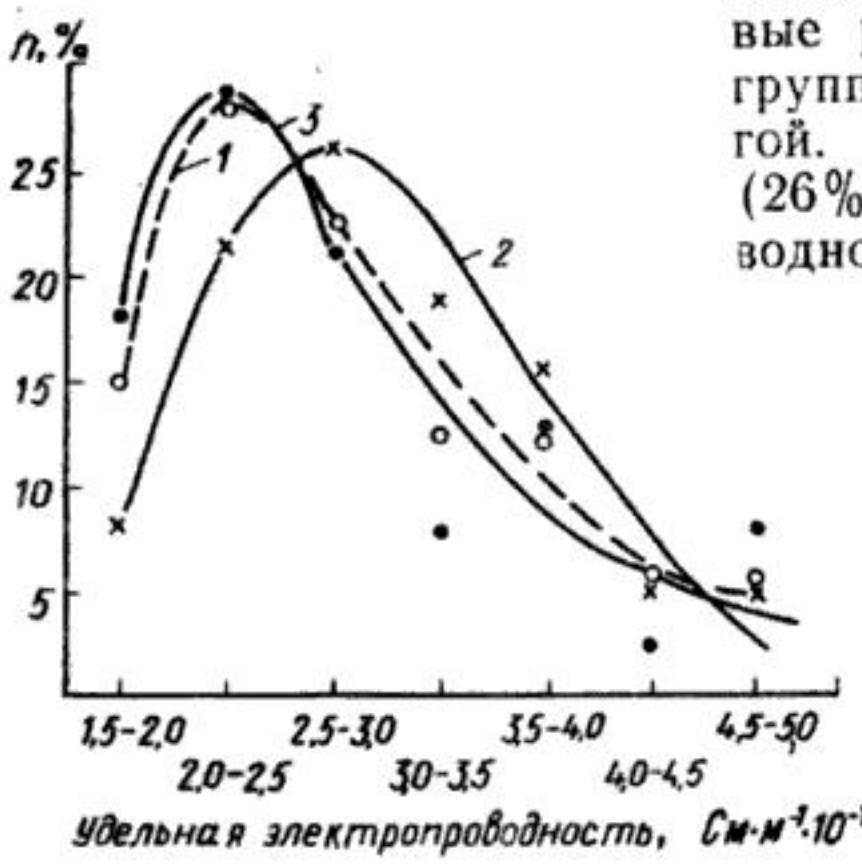
Более подробное описание методики и установки для измерения электрических параметров эритроцитов в диапазоне частот 30 Гц—30 МГц можно найти в других наших работах. Исследуемые суспензии термостатировались при $+25 \pm 0{,}1$ °С.

Концентрацию эритроцитов в суспензии оценивали по величине их гематокрита $\rho_г$.

Матеріал, захищений авторським правом

Результаты и их обсуждение. Электропроводность эритроцитарной массы (естественный отстой), стабилизированной глюкозоцитратной средой № 7б, для разных доноров принимает значения (1,5—5,0) $\times$ $\times 10^{-1}$ См·м$^{-1}$ (рис. 1). Наибольшее количество доноров (50 % общего числа) имеют удельную электропроводность эритромассы в пределах (2—3)·10^{-1} См·м$^{-1}$.

Внутри каждой из групп крови распределение доноров по значениям электропроводности эритроцитарной массы аналогично распределению для всех 90 доноров, однако кривые распределения для доноров I и II групп сдвинуты относительно одна другой. Наибольшее количество доноров (26%) для I группы имеют электропроводность эритромассы (2,5—3,0) $\times$ $\times 10^{-1}$ См·м$^{-1}$, а для II группы 29 % доноров имеют электропроводность эритромассы (2,0—2,5)·10^{-1} См·м$^{-1}$. Функция распределения для доноров II группы крови имеет более острый максимум.



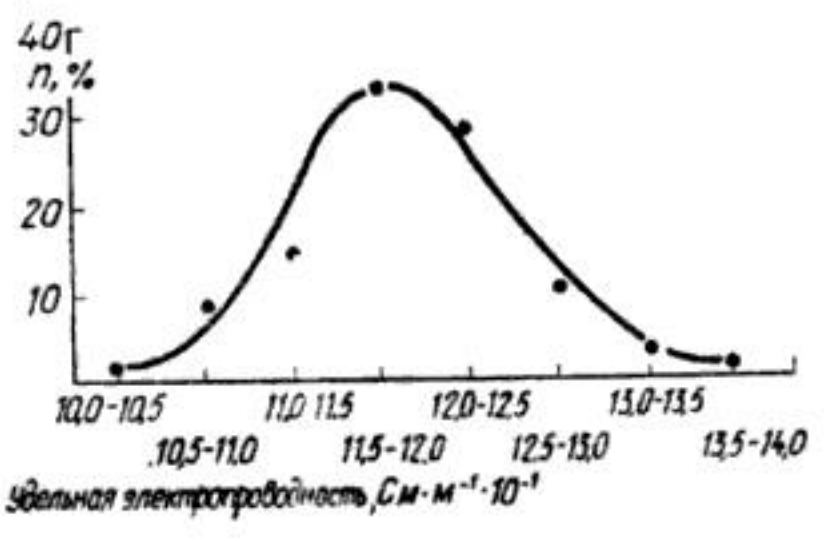


Рис. 1. Функция распределения доноров по значениям удельной электропроводности эритроцитарной массы:

1, 2 — для доноров I и II групп крови соответственно (n=38); *3* — общее распределение (n=90).

Рис. 2. Функция распределения доноров по значениям удельной электропроводности плазмы (n=61).

Исследование электропроводности плазмы 61 донора показало, что плазма принимает значения (10—14)·10^{-1} См·м$^{-1}$. 60 % доноров имеют плазму в диапазоне проводимостей (11,5—12,5)·10^{-1} См·м$^{-1}$. Различие функций распределения для доноров I и II групп крови по значениям удельной электропроводности плазмы недостоверно (рис. 2).

Коэффициент корреляции электропроводности эритромассы и плазмы незначителен, r=0,29 ($p<0,05$). Это можно объяснить тем, что при больших концентрациях эритроцитов изменение электропроводности плазмы незначительно изменит электропроводность суспензии. Более заметным оказывается изменение концентрации клеток в суспензии. Об этом свидетельствует и существенное повышение частного коэффициента корреляции при ρ_r=const — r=0,78 ($p<0,05$).

Изучение дисперсионных характеристик клеточных суспензий дает новые критерии оценки поляризуемых структур клеток — поверхностных мембран. Величина коэффициента поляризации мембран эритроцитов, стабилизированных средой № 7б, колеблется в пределах 1,38—1,77, причем наибольшее количество доноров имеют $K_п$=1,4—1,5. Среднее значение $K_п$ для исследованных доноров 1,53±0,02. Функция распределения доноров (n=36) по значениям $K_п$ показана на рис. 3. Групповая принадлежность крови доноров не приводит к достоверному различию в функциях распределения для доноров I и II групп, что, возможно, связано с недостаточностью статистики.

Существует достоверная ($p<0,05$) отрицательная корреляционная связь между $K_п$ мембран эритроцитов и удельной электропроводностью плазмы, в которой они суспендированы, r=—0,611. Коэффициент кор-

Матеріал, захищений авторським правом

реляции между $K_п$ и концентрацией свободного гемоглобина в плазме недостоверен. Однако, поскольку уровень свободного гемоглобина в плазме не превышает физиологически допустимую норму, то отсутствие корреляции свидетельствует о целостности мембран эритроцитов. Отмывание эритроцитов от консерванта физиологическим раствором приводит к снижению $K_п$ в среднем более чем на 20 %. Среднее значение $K_п$ после отмывания $1{,}15 \pm 0{,}01$, причем сужается и диапазон

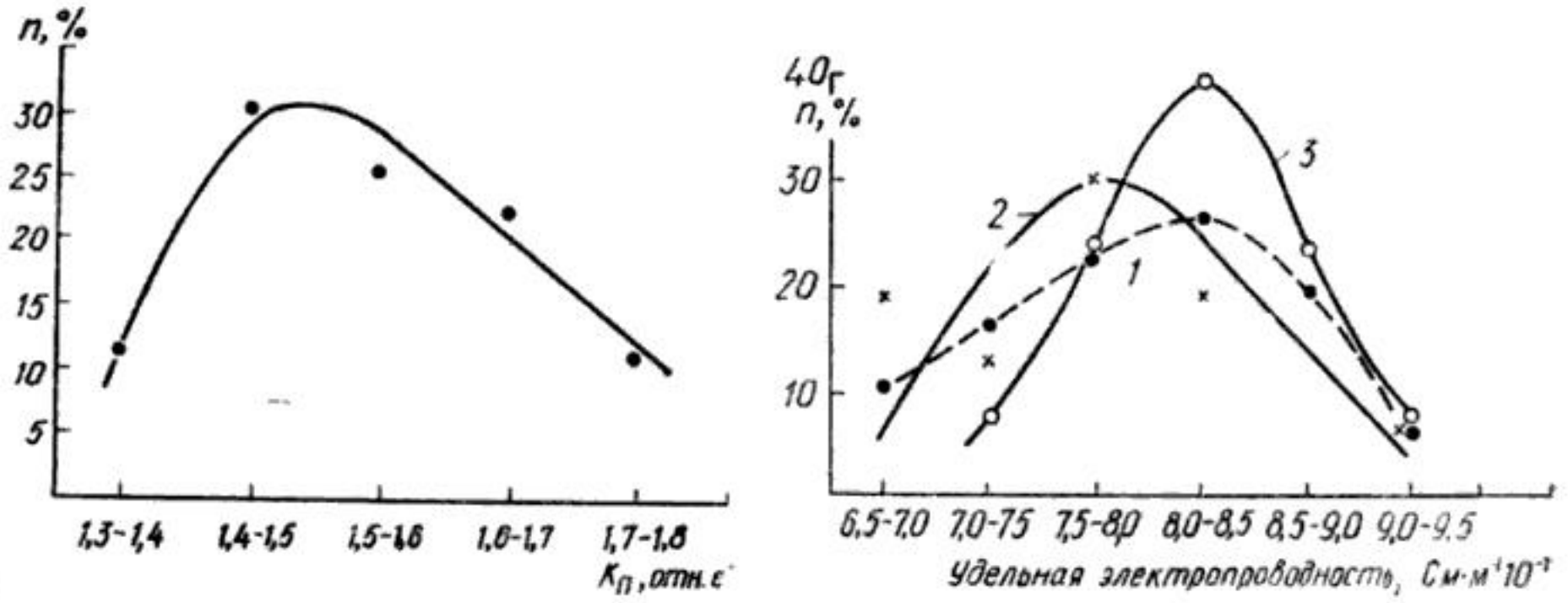


Рис. 3. Функция распределения доноров по значениям $K_п$.

Рис. 4. Функция распределения доноров по значениям удельной электропроводности цитоплазмы эритроцитов:

1 — общее распределение ($n=31$); *2* — для доноров I группы крови ($n=16$); *3* — для доноров II группы крови ($n=13$).

варьирования $K_п$ для разных доноров. Коэффициент корреляции удельной электропроводности суспензии и $K_п$ мембран эритроцитов незначителен, $r=0{,}16$ ($p<0{,}05$).

При оценке электрических свойств клетки нельзя ограничиваться электрическими параметрами мембраны. Важную роль в комплексном поведении клетки могут играть также параметры клеточного содержимого, вклад которых в общую проводимость суспензии становится более существенным с повышением частоты тестирующего поля [4].

Удельная электропроводность цитоплазмы эритроцитов, стабилизированных средой № 7, б, принимает значения $(6{,}6—9{,}14) \cdot 10^{-1}$ См·м$^{-1}$, среднее значение — $(7{,}98 \pm 0{,}12) \cdot 10^{-1}$ См·м$^{-1}$.

Функция распределения доноров по значениям удельной электропроводности цитоплазмы ($\varkappa_ц$) приведена на рис. 4. Групповая принадлежность крови донора сказывается на функции распределения доноров по значениям $\varkappa_ц$. Наиболее характерное значение $\varkappa_ц$ эритроцитов с I группой крови находится в диапазоне $(7{,}5—8{,}0) \cdot 10^{-1}$ См·м$^{-1}$ (25 % общего числа доноров с I группой крови), в то время как для доноров со II группой крови оно составляет $(8{,}0—8{,}5) \cdot 10^{-1}$ См·м$^{-1}$ (38,5 %), причем функция распределения у́же, с более выраженным куполом.

При анализе результатов не удалось найти корреляцию величины удельной электропроводности цитоплазмы эритроцитов ни с величиной удельной проводимости плазмы, ни с целостностью мембраны, оцениваемой по выходу свободного гемоглобина и ионов K^+ в плазму. Поскольку величины указанных параметров находятся в пределах физиологической нормы, можно сделать вывод, что различия в значениях $\varkappa_ц$ эритроцитов отражают индивидуальные особенности крови донора.

Так как при измерениях электропроводности суспензии на частотах до 1 МГц мембрана эритроцита считается изолятором, вклад удельной электропроводности цитоплазмы в общую проводимость суспензии невелик. В исследуемом диапазоне концентраций эритроцитов наиболее существенна коррелятивная связь электропроводности эритромассы и концентрации эритроцитов, $r=—0{,}964$ ($p<0{,}05$). Эта зависимость может быть аппроксимирована линейной функцией вида $y=—9{,}15\ \rho_г+ +9{,}12$.

Матеріал, захищений авторським правом

Коррелятивная связь электропроводности эритромассы и концентрации эритроцитов (при $\varkappa_{\text{плазмы}}=\text{const}$) для I, II и III групп крови может быть аппроксимирована соответственно функциями вида $y_{\text{I}}=-10{,}12\,x+9{,}78=-10{,}12\,(x-0{,}97)=-10{,}12\,X$; $y_{\text{II}}=-9{,}17\,x+9{,}24=-9{,}17\,(x-1{,}01)=-9{,}17\,X$; $y_{\text{III}}=-7{,}61\,x+7{,}76=-7{,}61\,(x-1{,}02)=-7{,}61\,X$.

Коэффициенты в приведенных уравнениях не совпадают, что свидетельствует об отличии электрических свойств эритроцитов разных групп крови. Так как измерения электропроводности в этой серии экспериментов проводились на частоте 300 кГц, можно предположить, что различие в коэффициентах разных групп крови обусловлено различием в электропроводности мембран эритроцитов.

Таким образом, при электроспектроскопическом исследовании крови (естественный отстой эритроцитов), подлежащей замораживанию, обнаружилось несовпадение для разных доноров электрических параметров компонентов суспензий и значений удельной электропроводности суспензий в целом. Разнообразие параметров связано с групповой принадлежностью и индивидуальными особенностями крови донора. Показана зависимость электропроводности мембраны и цитоплазмы эритроцитов от группы крови донора. Наиболее существенна коррелятивная связь электропроводности эритромассы и концентрации эритроцитов.

1. *Вишневский В. И., Скорняков Б. А., Кочережская И. А.* Электропроводность крови и ее связь с выживаемостью эритроцитов после замораживания. — В кн.: Механизмы криоповреждения и криозащиты биологических структур. Киев: Наук. думка, 1977, с. 12—14.
2. *Гордиенко О. И.* Критерии качества консервирования донорской крови человека. II. Влияние исходного состояния крови на результат низкотемпературного консервирования. — Мед. реф. журн., разд. 18, 1980, № 11, публ. 1191.
3. *Марха К., Мусия Я.* Клетка как электрический контур. II. Экспериментальная часть. — Биофизика, 1977, 22, вып. 5, с. 821—823.
4. *Шраго М. И., Бредихина Л. П., Тимченко В. Г. и др.* Полиэтиленоксиды в низкотемпературном консервировании эритроцитов (некоторые итоги и перспективы). — Криобиология и криомедицина, 1978, вып. 4, с. 38—45.
5. *Krupa J., Kalinowski M.* Über den Einfluss der Konservierrungsdauer auf die elektrische Leitfähigkeit der Erythrozytenplasmas. — Folia Haematol. (DDR), 1973, 99, N 2/3, S. 273—278.

Ин-т пробл. криобиологии и криомедицины
АН УССР, Харьков

Получено 29.10.82

УДК 57.043:612.111.014.41

И. А. Кочережская

ЭЛЕКТРОПРОВОДНОСТЬ СУСПЕНЗИИ ЭРИТРОЦИТОВ И ПОВРЕЖДЕНИЕ ПРИ ЗАМОРАЖИВАНИИ

Большинство биологических объектов удается успешно консервировать при азотных температурах только с использованием криозащитных добавок, удаление которых из размороженной суспензии связано с техническими трудностями и потерей жизнеспособности клеток [2]. Широкое исследование внеклеточных криопротекторов, к которым относится и ПЭО-1500, связано с перспективой использования их в клинической практике для консервирования клеток крови по методикам, не требующим предварительного отмывания [3, 5]. Однако перенесение ослабленных замораживанием клеток из гипертонической среды высокомолекулярного криопротектора в изоосмотическую среду приводит к их дополнительному повреждению [1, 4]. Поэтому особое значение приобретает разработка методов консервирования, позволяющих снизить концентрацию криопротектора.

Одним из подходов к решению этой сложной проблемы при консервировании клеток крови может быть учет исходных характеристик

Матеріал, захищений авторським правом

замораживаемых суспензий, поскольку такие параметры, как концентрация клеток в суспензии, предварительная обработка материала, электролитный состав суспензионной среды, влияют на результат низкотемпературного хранения. Эти параметры в той или иной степени сказываются на значении электропроводности суспензии эритроцитов. Поэтому важно проследить зависимость сохранности эритроцитов при консервировании с определенной концентрацией криопротектора от электропроводности нативной эритромассы.

Методика эксперимента. Материалом исследования служили эритроциты донорской крови, заготовленной на гемоконсерванте № 7 б, в течение первых двух суток хранения. К естественному отстою эритроциты донорской крови, заготовленной на гемоконсерванте № 7б, ÷7,2) в соотношении 9 : 1; 3 : 1; 1 : 1, при этом средние концентрации криопротектора в среде составляли 5 (при колебаниях 3,4—8 %), 10 (7,5—14 %) и 15 % (12,9—17 %). Сохранность эритроцитов определялась методом подсчета эритроцитов в камере Горяева, что одновременно моделировало процесс отмывания эритроцитов от криопротектора изотонической средой.

Электропроводность суспензии эритроцитов измерялась на частоте 300 кГц. Установка для измерения электрических параметров биологических объектов состоит из моста полных проводимостей *SWM* 3—2, позволяющего компенсационным методом определять активную и реактивную составляющие импеданса на частотах 30 Гц — 1,5 МГц. Питающее напряжение подается от генераторов Г3-33 и Г3-41. Индикатором баланса служит ламповый вольтметр В3-13. Напряжение на измерительных электродах, выполненных из черненой платины, не превышает 0,03 В.

Результаты и их обсуждение. При анализе экспериментальных данных (см. таблицу) видно, что замораживание эритроцитов с 5%- ПЭО-1500 ни при каких значениях удельной электропроводности нативной эритромассы не дает хороших показателей сохранности. При этом обращает на себя внимание более высокий процент сохранившихся клеток в случае замораживания суспензий эритроцитов с низкими значениями удельной электропроводности $(1{,}6—2{,}5)\cdot10^{-1}$ См·м$^{-1}$.

При низких значениях электропроводности суспензии эритроцитов (до $2{,}7\cdot10^{-1}$ См·м$^{-1}$) сохранность эритроцитов, замороженных с 10 % ПЭО-1500, достоверно выше ($p>0{,}95$), чем эритроцитов, замороженных с 15 % криопротектора. Для суспензий с электропроводностью, большей, чем $2{,}7\cdot10^{-1}$ См·м$^{-1}$, наблюдается обратная зависимость: большее защитное действие оказывает 15 % ПЭО-1500 ($p>0{,}95$). Следовательно, эффективность защитного действия криопротектора данной концентрации зависит от удельной электропроводности нативной эритроцитарной массы.

Коэффициент корреляции сохранности эритроцитов после замораживания — оттаивания и электропроводности нативной эритромассы для замораживания с 10 % ПЭО-1500 равен —0,43 ($t=2{,}18$; $p>0{,}95$), для замораживания с 15 % ПЭО-1500 0,62 ($t=3{,}63$; $p>0{,}99$).

Регрессионный анализ позволяет аппроксимировать полученные зависимости линейными функциями вида $y_1=-5{,}41\,x+80{,}51$ для 10 % ПЭО-1500; $y_2=13{,}71\,x+23{,}18$ для 15 % ПЭО-1500, где y_1, y_2 — сохранность эритроцитов, определяемая как $\frac{N_э \text{ после зам.}}{N_э \text{ до зам.}}$ (в %), x—удельная электропроводность эритромассы (См·м$^{-1}\cdot10^{-1}$). Таким образом, существует некоторое значение удельной электропроводности эритроцитарной суспензии ($3{,}0\cdot10^{-1}$ См·м$^{-1}$), при котором одинаковая сохранность эритроцитов после замораживания получается в результате применения 10 и 15 % ПЭО-1500 (см. рисунок), т. е., выбирая определенное разведение суспензии эритроцитов плазмой, определяем оптимальную концентрацию криопротектора. Электропроводность суспензии эритроцитов определяется электрическими свойствами ее отдельных фаз —

Матеріал, захищений авторським правом

эритроцитов и плазмы — и их объемному соотношению, причем в области используемых концентраций эритроцитов последний фактор имеет решающее значение. Поэтому разумно было бы предположить, что наблюдаемые различия в степени сохранности эритроцитов определяются объемной концентрацией клеток в замораживаемой суспензии и реальной концентрацией криопротектора, которая зависит от объемного соотношения плазмы и эритроцитов в нативной суспензии и степени разведения криопротектором.

Удельная электропроводность нативной суспензии эритроцитов и сохранность эритроцитов, замороженных с различными концентрациями ПЭО-1500, приготовленного на дистиллированной воде

№ п/п	Параметры нативной суспензии эритроцитов		Сохранность эритроцитов, % при концентрации ПЭО-1500, %		
	Удельная электропроводность, $См \cdot м^{-1} \cdot 10^{-1}$	Объемная концентрация, эритроцитов, $\rho_г$	5	10	15
1	1,63	0,84	27	71	40
2	1,65	0,74	24	72	35
3	1,76	0,69	12	63	48
4	1,92	0,82	—	84	66
5	1,95	0,76	22	82	78
6	1,98	0,78	8	44	40
7	2,15	0,66	19	65	32
8	2,16	0,63	11	74	36
9	2,31	0,70	7	72	49
10	2,33	0,68	15	74	54
11	2,43	0,71	23	80	53
12	2,45	0,59	3	52	36
13	2,49	0,64	17	69	43
14	2,69	0,67	—	80	47
15	2,73	0,59	4	43	74
16	2,94	0,64	6	68	74
17	3,12	0,65	—	63	96
18	3,54	0,63	—	72	99
19	3,84	0,52	2	43	89
20	3,97	0,49	7	65	79
21	4,11	0,49	1	53	80
22	4,83	0,45	2	60	74
23	4,84	0,53	—	58	85

Так, невысокий уровень сохранности эритроцитов при использовании разведения 9 : 1 20 %-ным ПЭО-1500, по-видимому, связан с большой концентрацией клеток в суспензии при замораживании и недостаточной концентрацией криопротектора (3,4—8 %), причем увеличение гибели клеток при повышении удельной электропроводности нативной суспензии связано с уменьшением содержания ПЭО-1500 в среде замораживания.

Повышение концентрации криопротектора в среде в среднем до 10% существенно повышает общий уровень сохранности эритроцитов, при этом концентрация ПЭО-1500 для суспензий с электропроводностью до $2{,}7 \cdot 10^{-1}$ См$\times$ $\times м^{-1}$ соответствует области изотонии для эритроцитов с учетом остающейся в межклеточном пространстве плазмы. Уменьшение концентрации криопротектора при значениях удельной электропроводности суспензии эритроцитов выше $2{,}7 \cdot 10^{-1}$ См$\cdot м^{-1}$ приводит к снижению выживаемости эритроцитов в среднем на 10 %, что свидетельствует о том, что для обеспечения хорошей сохранности клеток концентрация криопротектора должна быть не ниже 10%. Снижение концентрации клеток в среде замораживания в этом случае сопровождается уменьшением концентрации ПЭО-1500 и, следовательно, не приводит к увеличению степени сохранности эритроцитов.

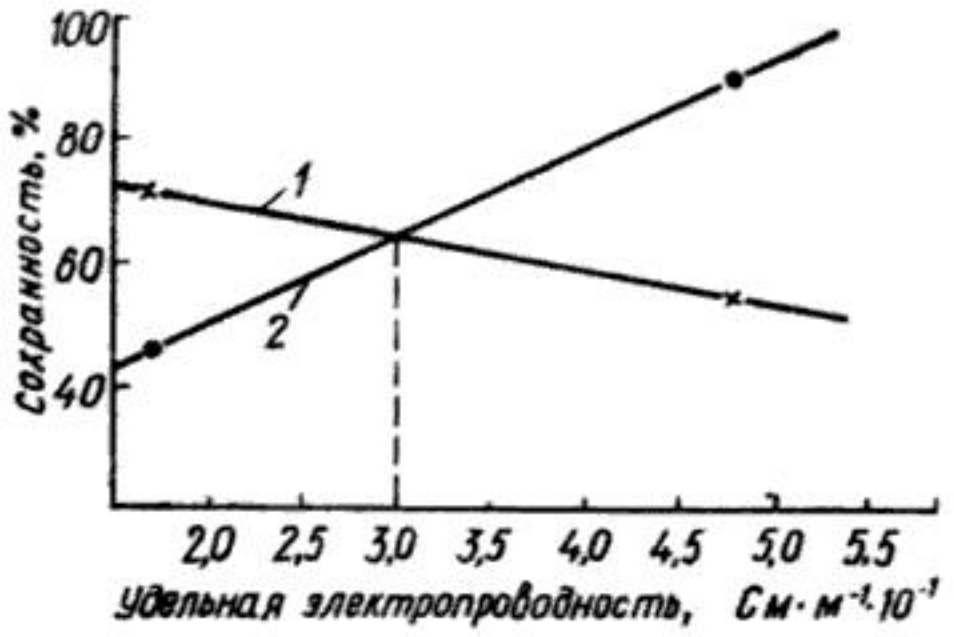
При разведении эритромассы криопротектором в соотношении 1 : 1 (средняя концентрация ПЭО-1500 15 %) все исследуемые суспензии можно также разделить на две зоны по значениям удельной электропроводности в соответствии с сохранностью эритроцитов после замораживания.

Для суспензий с небольшим значением электропроводности и соответственно высокой концентрацией ПЭО-1500 (15—17 %) характерен невысокий общий уровень сохранности эритроцитов, а повышение электропроводности нативной суспензии сопровождается увеличением степени сохранности эритроцитов, при этом концентрация криопротектора снижается в пределах 13—15 %.

Поскольку сохранность эритроцитов оценивалась подсчетом клеток в камере Горяева, что связано с перенесением эритроцитов из раствора криопротектора в изотоническую среду, такая зависимость выживаемости эритроцитов от концентрации ПЭО-1500, по-видимому, связана

Матеріал, захищений авторським правом

с осмотическим стрессом при разбавлении ослабленных замораживанием клеток. Перенесение клеток из среды, близкой к изотонической, приводит к меньшим повреждениям эритроцитов. К тому же концентрация клеток в среде замораживания в случае суспензий с большой удельной электропроводностью уменьшается, что также вносит вклад в обеспечение лучшей выживаемости.



Зависимость сохранности эритроцитов после замораживания под защитой ПЭО-1500 от электропроводности нативной эритроцитарной массы:
1 — 10 % ПЭО-1500; *2* — 15 % ПЭО-1500.

Таким образом, измерение удельной электропроводности суспензии нативных эритроцитов позволяет дифференцированно подойти к выбору концентрации криопротектора, что обеспечивает оптимальные условия осмотичности среды замораживания, концентрации криопротектора и клеток при низкотемпературном консервировании.

Для суспензий с удельной электропроводностью не выше $2{,}7 \cdot 10^{-1}$ См·м$^{-1}$ лучший результат консервирования получается при использовании 20 %-ного ПЭО-1500 в разведении 3 : 1, для суспензий с более высокой удельной электропроводностью — в разведении 1 : 1.

1. *Мартыненко А. А., Луговой В. И.* Влияние ПЭО-1500 и низких температур на изоосмотическую резистентность эритроцитов человека. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 8, с. 22—24.
2. *Пушкарь Н. С., Шраго М. И., Белоус А. М., Калугин Ю. В.* Криопротекторы. — Киев : Наук. думка, 1978. — 201 с.
3. *Шраго М. И., Бредихина Л. П., Лубяный В. Г.* О повышении устойчивости клеток к повреждению под влиянием криопротекторов. — В кн.: Общие механизмы клеточных реакций на повреждающие воздействия. — Л.: Ин-т цитологии, 1977, с. 175—176.
4. *Шраго М. И., Карева Л. В., Бредихина Л. П.* О гемолизирующем и противогемолитическом действии криопротекторов. — В кн.: Механизмы криоповреждения и криопротекции биологических структур. Киев : Наук. думка, 1976, с. 95—99.
5. *Шраго М. И., Бредихина Л. П., Тимченко В. Г. и др.* Полиэтиленоксиды в низкотемпературном консервировании эритроцитов (некоторые итоги и перспективы). — Криобиология и криомедицина, 1978, вып. 4, с. 38—45.

Ин-т пробл. криобиологии и криомедицины
АН УССР, Харьков

Получено 29.10.82

УДК 57.043:611—013.12

В. И. Грищенко, Ю. С. Паращук, А. С. Капрельянц

УЛЬТРАСТРУКТУРА СПЕРМАТОЗОИДОВ ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

При изучении причин бесплодия установлено, что на долю мужского бесплодия приходится от 28 до 45 % случаев [12, 13, 15], поэтому при обследовании супружеской пары необходимо изучать спермограммы мужа [5, 7]. Основное внимание обращают на количество сперматозоидов, процент подвижных форм, наличие агглютинатов, лейкоцитов, микрофлоры, патологически измененных сперматозоидов [1 4, 6, 8].

В настоящее время при некоторых формах бесплодия, обусловленных нарушением процесса сперматогенеза, используется метод искусственной инсеминации донорской спермой. Целесообразно создать банк человеческой спермы, который облегчил бы подбор донора, производство инсеминации в дни вероятной овуляции у женщин.

Матеріал, захищений авторським правом

Наиболее перспективным путем создания банка человеческой спермы является использование метода низкотемпературного консервирования. При этом сперматозоиды должны максимально сохранять жизнеспособность с тем, чтобы после деконсервирования их можно было использовать для искусственного осеменения. Важный показатель сохранения функциональных свойств, полноценности сперматозоидов — наличие не измененной после криоконсервации морфологии сперматозоидов, позволяющей рассчитывать на доставку к яйцеклетке нормального генетического материала и на наступление беременности.

Исследование спермограммы с помощью светового микроскопа не может дать полный ответ, насколько существенные морфологические изменения произошли в сперматозоидах. Эти вопросы в определенной мере могут быть решены при использовании методов электронной микроскопии для исследования ультраструктурной характеристики криоконсервированных сперматозоидов. Эффективность использования электронной микроскопии в криобиологических исследованиях была показана во многих работах [9, 10, 16]. Цель данного исследования — изучение ультраструктуры сперматозоидов человека после криоконсервации под защитой криопротектора — глицерина, который наиболее часто применяют в таких случаях.

Материалом для электронно-микроскопического исследования в настоящей работе явились сперматозоиды здоровых мужчин. Количество сперматозоидов в 1 мл превышало 60 млн., подвижных было более 60 %.

Было поставлено три серии опытов. В первой исследовали нативные сперматозоиды перед криоконсервацией, во второй — криоконсервированные по разработанной нами методике. Суть ее сводится к следующему: сперму смешивают с глицерином (количество глицерина составляет 10 %) и охлаждают в несколько этапов. I этап — со скоростью 1 °С в 1 мин до +5 °С. Затем в течение 30—60 мин температура стабилизировалась на уровне +5 °С. II этап — охлаждение со скоростью 20—25 °С в 1 мин до —120 °С. После достижения температуры —120 °С образцы переносились в жидкий азот (—196 °С).

В третьей серии опытов криоконсервация осуществлялась по методике, описанной Шерманом. Сперматозоиды после смешивания с глицерином охлаждались со скоростью 16—25 °С в 1 мин до температуры жидкого азота.

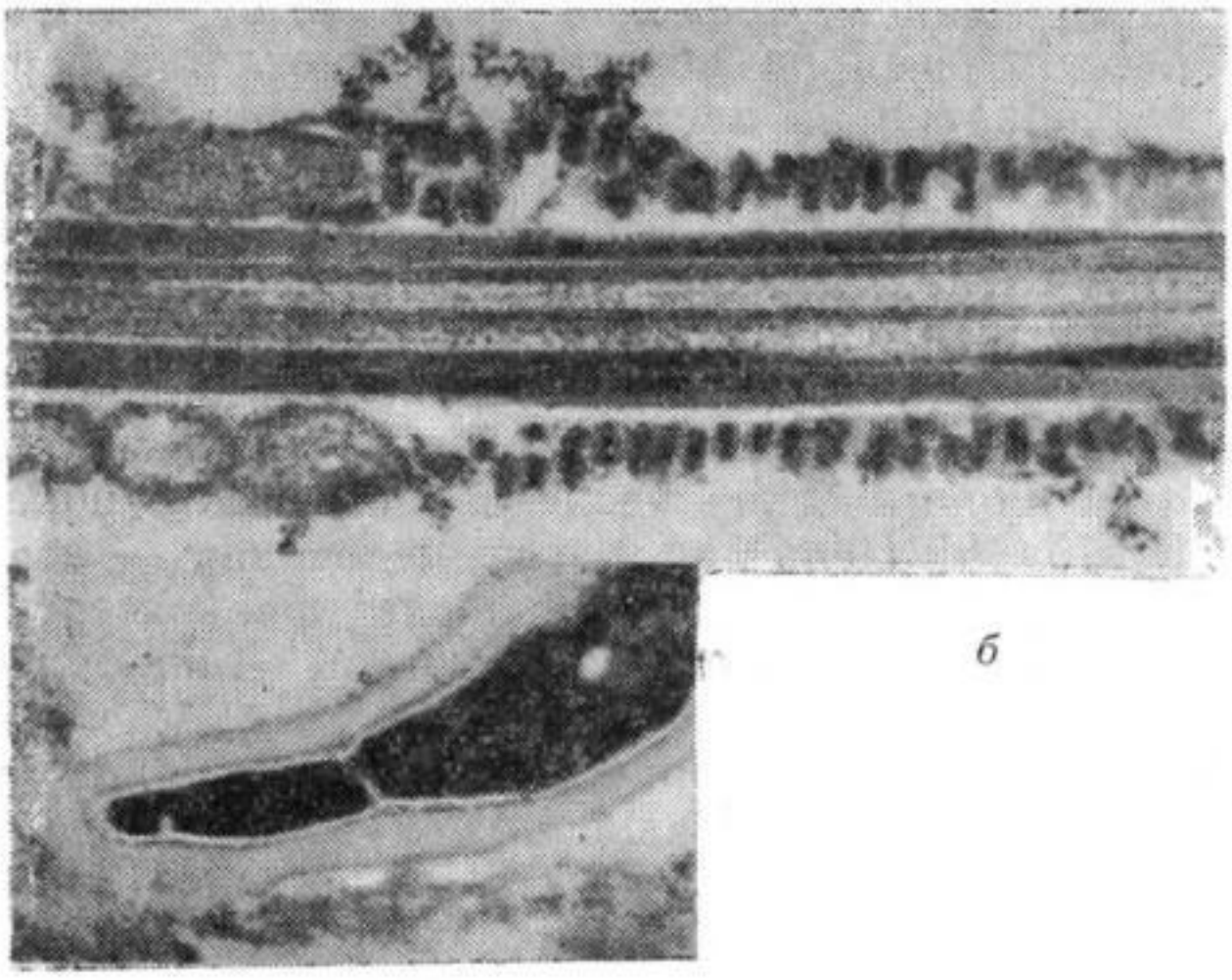
Материал во всех сериях опытов для электронной микроскопии фиксировался в 2%-ном растворе глутар-альдегида на буфере Миллонига и дофиксировался в 1%-ном растворе OsO_4. Образцы обезвоживали в ацетоне и заливали в смесь эпоксидных смол (эпон-аралдит). Ультратонкие срезы изготавливали на ультрамикротоме УМТП-4, контрастировали цитратом свинца и уранилацетатом, а затем анализировали на электронных микроскопах ЭВМ-100А и ЭВМ-100БР при ускоряющем напряжении 75 кв.

Электронно-микроскопическое исследование нативных сперматозоидов человека свидетельствует о том, что головка сперматозоида состоит из ядра, акросомы и снаружи окружена плазматической мембраной. Хроматин ядра высококонденсирован и представлен плотным электронно-оптическим материалом (рис. 1, *а*). В ядре часто встречаются вакуоли, имеющие вид просветленных округлых полостей в хроматине. Ядро головки сперматозоида окружено ядерной мембраной, толщина которой соизмерима с толщиной плазматической мембраны клетки. В передней части головки сперматозоида расположена акросома, окружающая переднюю часть ядра и состоящая из умеренно плотного электронно-оптического материала (см. рис. 1, *а*). Акросома снаружи окружена плазматической мембраной.

Средняя часть сперматозоида при электронно-микроскопическом исследовании представлена шейкой и «связующим отделом». Рядом с задней частью ядерной мембраны располагаются центриоль и девять

Матеріал, захищений авторським правом

исчерченных тяжей, начинающихся от базальной мембраны и соединяющихся с другими плотными фибриллами среднего участка хвоста. Средний участок имеет центральные флагеллярные фибриллы, вокруг которых расположены девять плотных фибрилл (осевые нити). В области «связующего отдела» вокруг комплекса фибрилл спирально располагаются митохондрии (рис. 1, *б*). На рис. 1, *б* показан продольный



а *б*

Рис. 1. Ультраструктура сперматозоида человека перед криоконсервацией:

а — головка сперматозоида человека с акросомой, ядром и вакуолями (определяются ядерная и плазматическая мембраны); *б* — продольный срез «связующего отдела» сперматозоидов и средней части хвоста (вокруг фибриллярного комплекса расположены митохондрии с трехслойной наружной мембраной). Здесь и на рис. 2, 3 масштабная полоска 1 мк.

срез «связующего отдела» хвоста сперматозоида с расположенными вокруг фибриллярного комплекса митохондриями. Концевой отдел сперматозоида представлен хвостиком, состоящим из продолжения фибриллярного комплекса, окруженного фиброзной капсулой. Полученные результаты согласуются с литературными данными об ультраструктурной характеристике сперматозоидов [2, 3, 11].

Электронно-микроскопическое исследование криоконсервированных сперматозоидов по двухэтапной программе показало отсутствие существенных изменений основных структурных элементов сперматозоидов — головки, средней части и концевого отдела. На рис. 2 показан поперечный срез этих отделов криоконсервированного сперматозоида. Плазматическая мембрана имеет обычную форму и строение (рис. 2, *а*). Между плазматической мембраной и ядром определяется ядерная мембрана. Хроматин ядра высококонденсированный. В некоторых местах ядра имеется просветление плотного электронно-оптического материала. На рис. 2, *а* показан также поперечный срез среднего и концевого отделов сперматозоида, ультраструктура которых — без существенных изменений. В то же время у отдельных сперматозоидов имеются повреждения шейки и связующего отдела. На рис. 2, *в* при большом увеличении виден участок криоконсервированного сперматозоида с четко определяемой трехслойной базальной мембраной и осевыми нитями, имеющими обычное строение. Однако митохондрии имеют нарушения структуры, проявляющиеся в лизисе части крист, некотором увеличении размеров, разрыве наружных митохондриальных мембран. Плазматическая мембрана сперматозоидов на этом участке также теряет целостность. Ультраструктура хвоста криоконсервированного сперматозоида — без видимых изменений (рис. 2, *б*).

При охлаждении сперматозоидов до —196 °С со скоростью 16—25 °С в 1 мин было обнаружено, что ультраструктура большинства клеток претерпевает значительные повреждения. Хроматин ядра меняет структуру и представлен плотными электронно-оптическими гранулами, расположенными рядом или на некотором расстоянии одна от другой (рис. 3). Ядерная мембрана не определяется. Плазматическая мембрана на большом участке теряет свою целостность. Обычная структура

Матеріал, захищений авторським правом

связующего отдела нарушена. На рис. 3 показано наличие митохондрий связующего отдела, вышедших за пределы сперматозоида в результате нарушения целостности плазматической мембраны. В данной серии опытов встречаются отдельные сперматозоиды с менее выраженными изменениями связующего отдела средней части и хвоста. Таким образом, в результате криоконсервирования по методу, предложенному Шерманом, происходят значительные изменения в ультраструктурной характеристике сперматозоидов. Криоконсервация сперматозоидов человека по двухэтапной программе характеризуется сохранением основных ультраструктурных элементов. Это положение можно объяснить следующим образом. Во время замораживания большинство повреждений клеток происходит в пределах тепловой диффузии и связано с образованием кристаллов льда. При малой скорости охлаждения вода успевает покидать клетки в количестве, необходимом для того, чтобы в каждый момент времени между клеткой и средой успевало установиться термодинамическое равновесие, т. е. нулевое пересыщение клетки по отношению к внеклеточной среде. В этом предельном режиме охлаждения обезвоживание максимально, а пересыщение протоплазмы и вероятность внутриклеточного льдообразования — ничтожно малы. Исходя из этих соображений, в предлагаемой нами методике охлаждение проводилось медленно до температуры +5 °С, затем с целью холодовой адаптации образцы выдерживались при этой температуре не менее 30 мин.

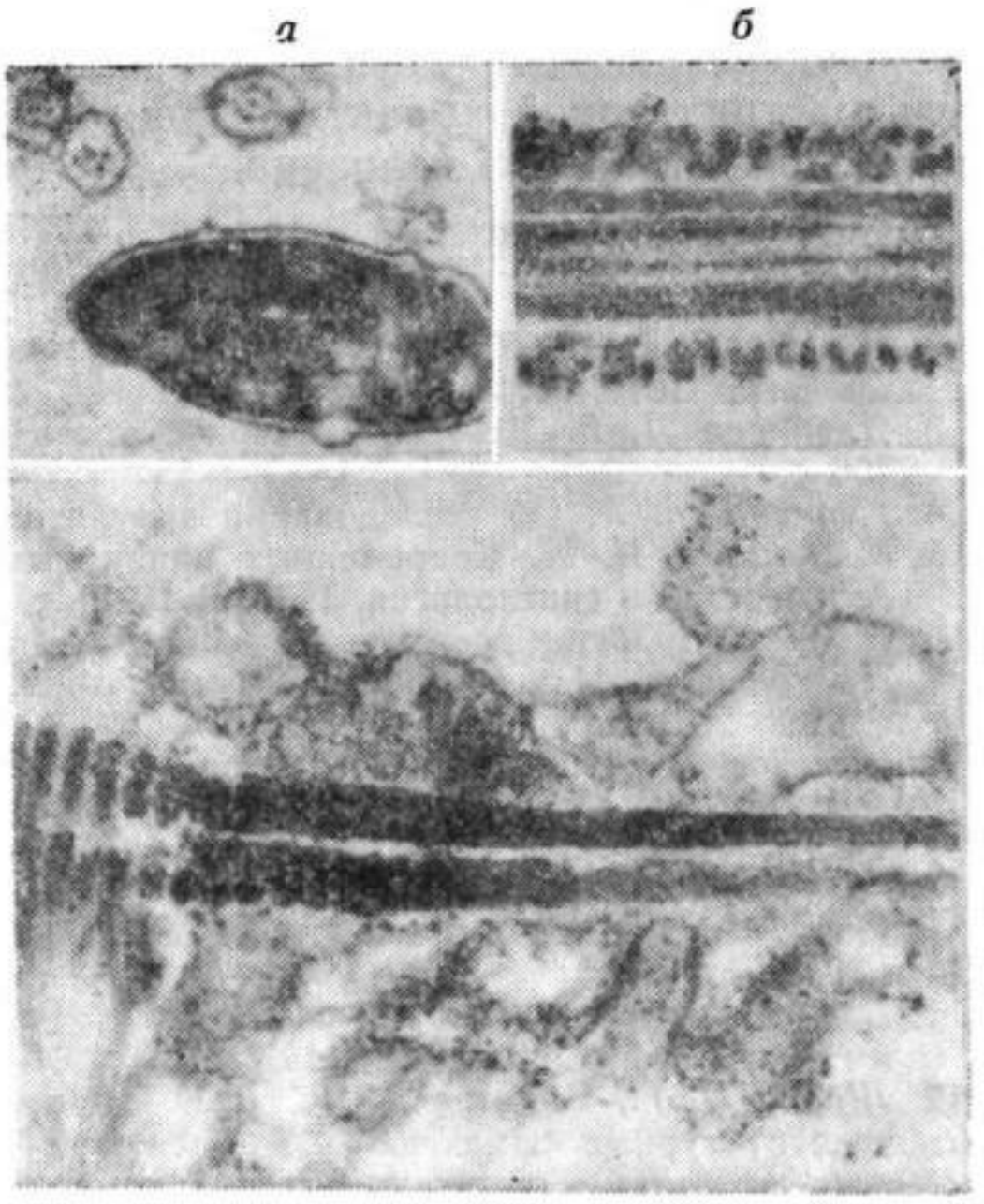


Рис. 2. Поперечный срез криоконсервированного сперматозоида по двухэтапной программе. Структура ядра, среднего и концевого отделов — без существенных изменений и повреждений:

а — поперечный срез головки и среднего отдела; *б* — продольный срез хвоста; *в* — продольный срез шейки и части связующего отдела сперматозоида при большом увеличении.

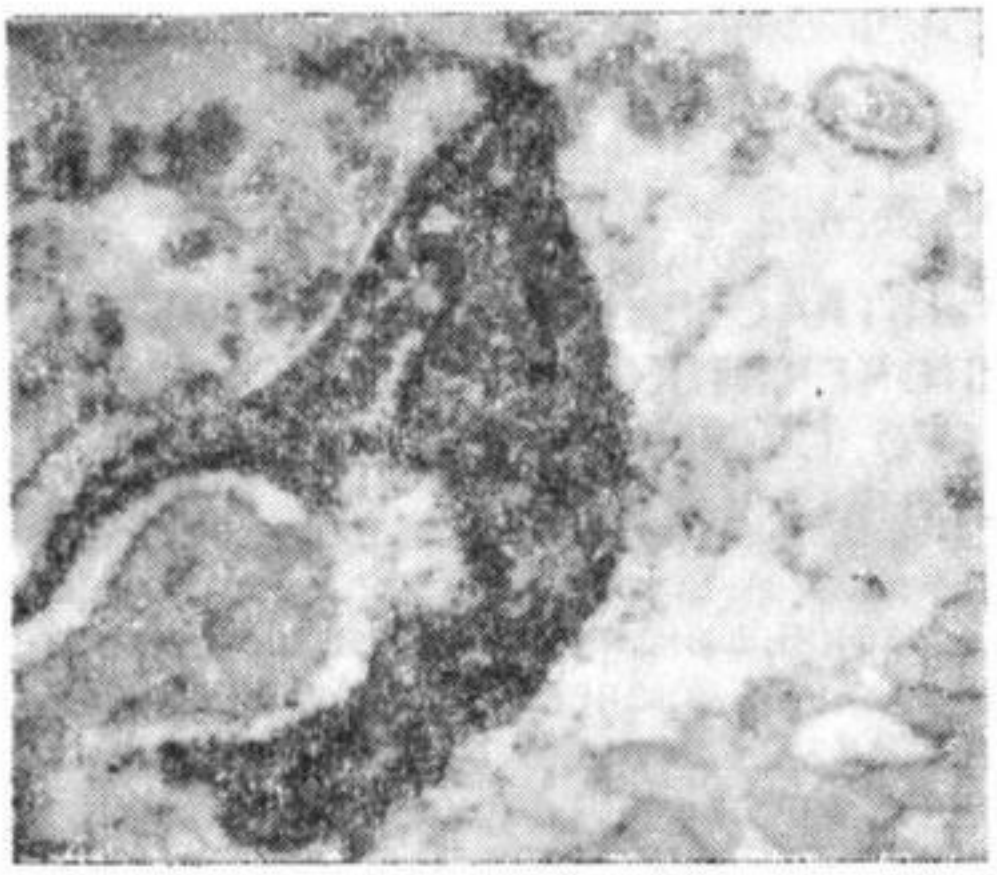


Рис. 3. Ультраструктура сперматозоида, охлажденного по методике Шермана с выраженными повреждениями ядра и средней части.

Следовательно, проведенное электронно-микроскопическое исследование ультраструктуры сперматозоидов человека, позволяет сделать вывод, что степень внутриклеточных повреждений во многом зависит от скорости охлаждения. При охлаждении по методике Шермана происходят значительные ультраструктурные изменения хроматина ядра головки сперматозоида, повреждения ядерной и плазматической мембран, а также митохондрий связующего отдела большинства сперматозоидов. Двухэтапная программа замораживания

Матеріал, захищений авторським правом

ния до —196 °С вызывает незначительные изменения ультраструктуры «связующего отдела» отдельных сперматозоидов с сохранением обычной ультраструктурной характеристики основной части криоконсервированных сперматозоидов человека.

1. *Акунц А. Б.* Актуальные вопросы бесплодия в браке. — Ереван : Айастан, 1978. — 184 с.
2. *Данилова Л. В.* Ультраструктура жгутиков сперматозоидов. — Успехи соврем. биологии, 1973, **76**, № 2, с. 246—263.
3. *Данилова Л. В.* Ультраструктурное исследование сперматогенеза. — М., 1978. — 206 с.
4. *Куклина М. А.* Об исследовании эякулята. — Лаб. дело, 1976, 12, с. 744—747.
5. *Манцилова И. А.* Современные принципы диагностики бесплодия у женщин. — Акушерство и гинекология, 1978, вып. 10, с. 5—9.
6. *Молнар Е.* Общая сперматология. — Будапешт, 1969. — 294 с.
7. *Насури И. Б.* Изменения спермы у мужчин. — Вопр. клин. медицины, 1970, вып. 1, с. 199—201.
8. *Николов Н., Папазов Б.* Бесплодие в семье. — София, 1971. — 260 с.
9. *Пушкарь Н. С., Капрельянц А. С., Панков Е. Я.* Ультраструктура клетки при низких температурах. — Киев : Наук. думка, 1978. — 142 с.
10. *Пушкарь Н. С., Капрельянц А. С.* Введение в электронно-микроскопическую технику для медико-биологических исследований. — Киев : Наук. думка, 1982. — 191 с.
11. *Станиславов Р., Налбански Б., Протич М.* Спермален анализ. — Акушерство и гинекология, София, 1980, **19**, № 3, с. 261—267.
12. *Шройт И. Г., Василос А. Ф., Богомольный Н. Г. и др.* Кариометрические и ультраструктурные изменения спермиев у больных различными формами хронического простатита. — В кн.: Тез. докл. I Респ. конф. урологов МССР. Кишинев, 1976. — 128 с.
13. *Dor I., Homburg R., Rabau E.* An evaluation of etiologic factors and therapy in 665 infectile couples. — Fertil. and Steril., 1977, **28**, N 7, p. 718—722.
14. *Sherman J. K.* Cryobanking of human semen. — Acta med. pol., 1978, **19**, N 1/2, p. 147—156.
15. *Soutoul I. H., Berger C., Homasson N. et al.* La sterilite conjudall : Etudé étiologique et résultats therapeutigues. A propos de 200 obseruations. — Rev. branc. gynecol., 1976, **71**, N 2, p. 79—90.
16. *Schill W.-B., Wolff H. H.* Acrosin activity and acrosome ultrastructure of human spermatozoa after freeze preservation. — Naturwissenschaften, 1974, **61**, p. 172.

Ин-т пробл. криобиологии и криомедицины АН УССР, Харьков
Харьк. мед. ин-т МЗ СССР

Получено 29.10.82

УДК 591.543.42:576.31

Е. Н. Ильясова

СЕЗОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ КЛЕТОК КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ У ЗИМОСПЯЩЕГО СУСЛИКА (CITELLUS SUSLICUS)

Для механизмов вхождения в состояние зимней спячки, поддержания и выхода из него, несомненно, большое значение имеет эндокринная система [14, 20—22, 27, 28]. Коре надпочечников принадлежит значительная роль в регуляции этих процессов. Установлено, что надпочечники являются эндокринными органами, без которых невозможно успешное протекание спячки [17, 18, 27, 30, 31].

Сезонные изменения продукции 11-оксикортикостероидов у зимоспящего суслика исследованы рядом авторов [1—3], которые показали, что в период глубокой спячки (январь — февраль) продукция кортикостероидов минимальна, при подготовке к пробуждению (март) происходит активация стероидогенеза, а при окончательном пробуждении от спячки (апрель — май) отмечается максимальное напряжение функции коры надпочечников.

Матеріал, захищений авторським правом

Правомочно ожидать отражения этих процессов на морфологии клеток коры надпочечников у зимоспящих животных с учетом того, что у изучаемого нами более южного вида суслика период глубокой спячки приходится на январь, подготовки к пробуждению — на февраль, а окончательное пробуждение наступает в середине марта. Морфология адренокортикальных клеток у зимоспящих практически не изучена [32].

Задача данной статьи — исследование изменений ультраструктуры клеток клубочковой и внешней пучковой зон коры надпочечников у крапчатого суслика (Citellus suslicus) на протяжении периода зимней спячки (январь—февраль) и при окончательном пробуждении (середина марта).

Методика исследования. Электронно-микроскопические исследования проводили на крапчатых сусликах, отловленных в Молдавской ССР в летнее время. В активный период животные находились в помещении с естественным освещением при температуре около +20 °С, получая корм в достаточном количестве. В период спячки содержались в подвальном помещении в индивидуальных клетках при температуре +4 °С. Во время декапитации температура ядра тела спящих животных в январе — феврале составляла от +6 до +8 °С, у активных сусликов (март) +38 °С.

Надпочечники от трех животных в каждый из месяцев немедленно извлекали и фиксировали в 2,5%-ном глутаровом альдегиде в течение двух часов при температуре +4 °С, затем следовала постфиксация в 1%-ном OsO_4 в течение 1 часа при +4 °С. Обе фиксирующие смеси готовили на фосфатном буфере Миллонига (pH 7,2—7,4). Образцы обезвоживали в серии спиртов и ацетоне и заключали в «Эпон 812».

Ультратонкие срезы резали на микротоме LKB-3, окрашивали уранилацетатом и цитратом свинца и просматривали на электронных микроскопах JEM-7A и JEM-100B.

Результаты исследований. Клетки клубочковой зоны в январе у спящих сусликов морфологически однородны, имеют неправильную форму и тесно прилегают одна к другой (рис. 1, *а*). Ядра овальные, но чаще неправильной формы, с одним-двумя ядрышками (см. рис. 1, *а*). Митохондрии, округлые или удлиненные, имеют редкие тубулярные кристы (рис. 1, *б*). Такой вид митохондрий характерен для клеток клубочковой зоны и в другие месяцы.

Гладкий эндоплазматический ретикулум (ГЭР) хорошо развит и представлен в виде везикул (рис. 2, *а*), но в некоторых клетках выявляется в тубуло-везикулярной форме (рис. 2, *б*). Шероховатый эндоплазматический ретикулум (ШЭР) в этот период не обнаруживается, но свободно лежащие в гиалоплазме рибосомы достаточно многочисленны.

Аппарат Гольджи выявляется не во всех клетках и состоит из нескольких слегка расширенных цистерн.

Овальной формы липидные капли с неоднородным по степени осмиофильности содержимым выявляются как отдельные включения (см. рис. 1, *а*) или как группы из 10—15 капель.

Лизосомоподобные гранулы немногочисленны: 3—5 на срез клетки (см. рис. 1, *а*). Они имеют неправильную форму, содержимое их электронно-плотное и негомогенное, часто контактируют с липидными каплями (см. рис. 1, *а*).

В феврале клетки клубочковой зоны коры надпочечников спящего суслика сохраняют те же морфологические черты, что и в январе, но наряду с ними появляются клетки, ядра которых более осмиофильны, ГЭР представлен тубуло-везикулярными образованиями, аппарат Гольджи хорошо развит (рис. 1, *в*). Клетки имеют большее число микроворсинок и липидных включений. Гиалоплазма и матрикс митохондрий в этих клетках более осмиофильны, чем в описанных выше, вследствие чего их можно разделить на «темные» и «светлые» клетки.

Матеріал, захищений авторським правом

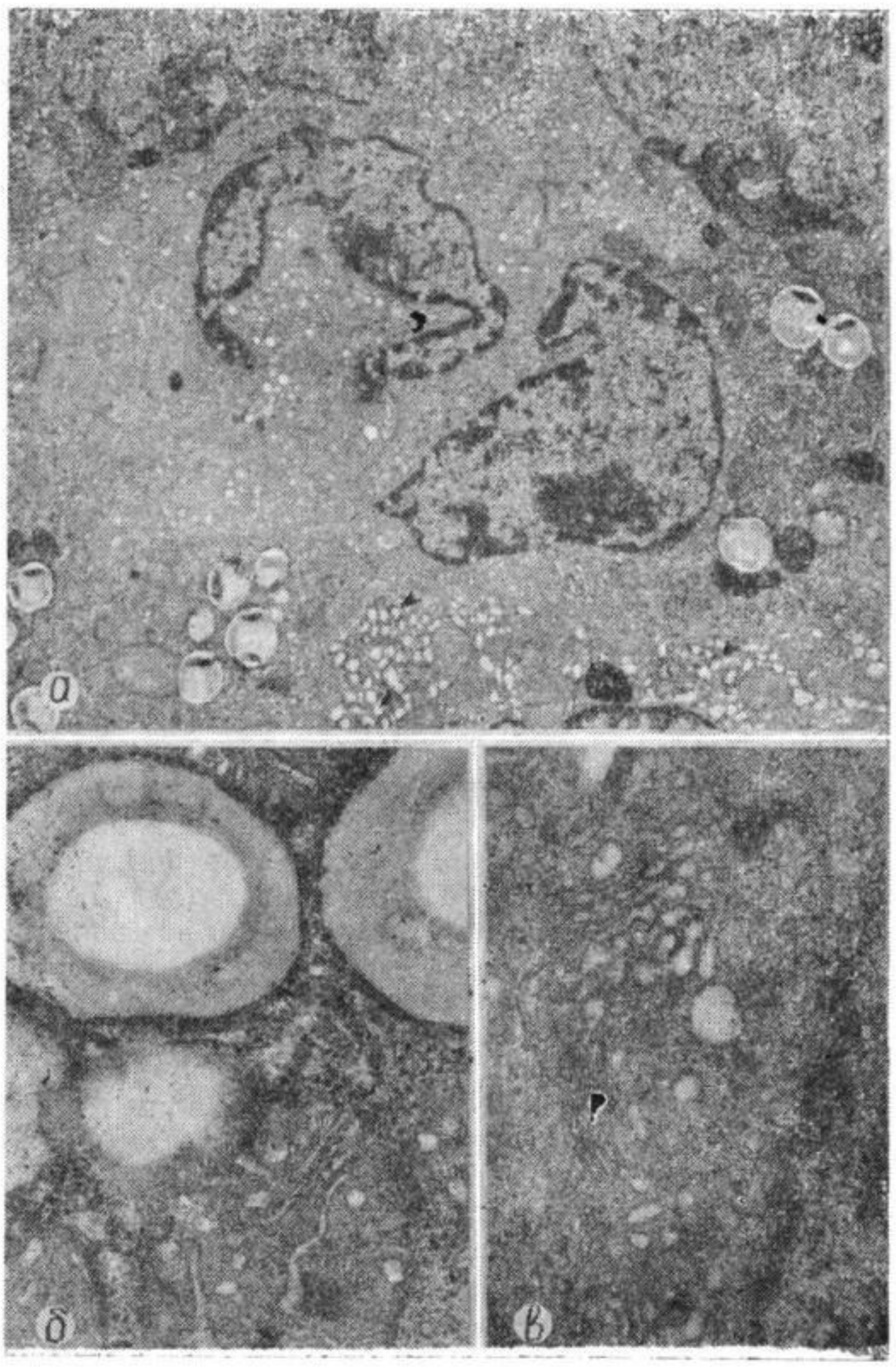


Рис. 1. Клетки клубочковой зоны в январе, ×8000 (*а*); митохондрии с тубулярными кристами и липидные капли в клетках клубочковой зоны, ×50 000 (*б*); аппарат Гольджи в гломерулярных клетках в феврале, ×36 000 (*в*).

Здесь и на рис. 2—5: *Я* — ядро, *ЯК* — ядрышко, *М* — митохондрия, *ЛК* — липидная капля, *Л* — лизосомоподобные включения, стрелки — вакуоли ГЭР, *АГ* — аппарат Гольджи.

В середине марта, через одну-две недели после пробуждения от зимней спячки, клетки клубочковой зоны становятся морфологически гетерогенными и отличаются одна от другой по осмиофильности и виду клеточных органелл (рис. 2, *г*; 3, *а*, *б*). Сохраняется некоторое количество клеток, имеющих те же признаки, что и в феврале, но преобладают клетки, коренным образом отличающиеся от них. Характерная особенность таких клеток — присутствие гладкого эндоплазматического ретикулума тубулярного типа, который обнаруживает в этот период поразительное морфологическое разнообразие. В одних клетках ГЭР представлен в виде длинных трубочек диаметром около 40 нм (рис. 2, *в*); в других — как короткие, рыхло расположенные тубулы диаметром 50—60 нм (см. рис. 2, *г*, слева); в третьих — агранулярный ретикулум имеет вид хорошо структурированных, плотно упакованных трубочек диаметром 40—50 нм (см. рис. 2, *г*, ~~спр~~ава; 3, *б*). Причем в зависимос-

Матеріал, захищений авторським правом

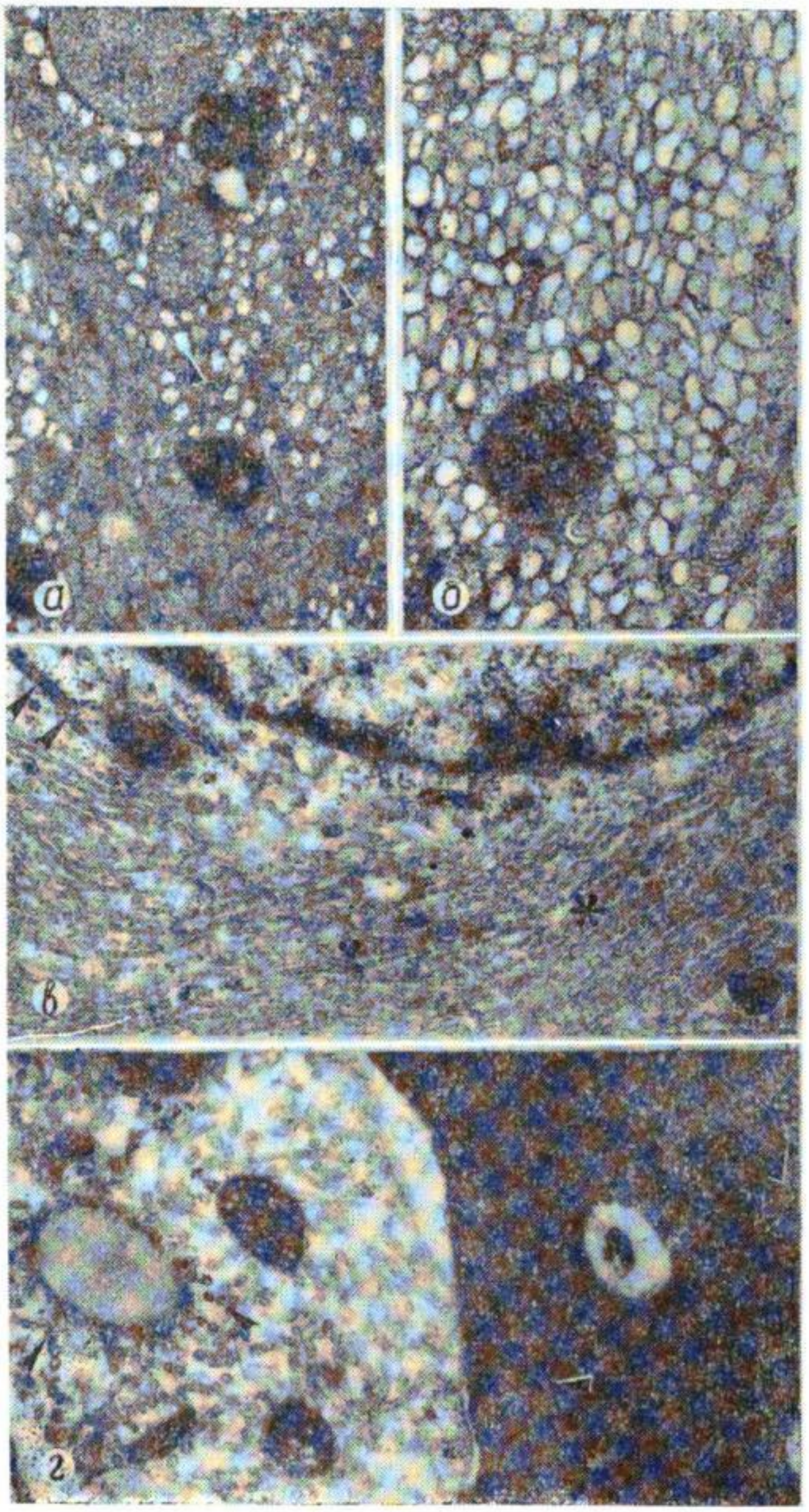


Рис. 2. Везикулярный тип гладкого эндоплазматического ретикулума в клетке пучковой зоны (январь), стрелки — везикулы ГЭР, *Л* — лизосомоподобная гранула с включением липидной природы, *М* — митохондрия с везикулярными кристами, ×36 000 (*а*); тубуло-везикулярный тип ГЭР в адренокортикальных клетках, стрелки — ячейки тубуло-везикул, ×34 800 (*б*); тубулярный ретикулум в клетках коры надпочечников (март) с диаметром трубочек около 40 нм (звездочки), стрелки — участок эндоплазматического ретикулума с прикрепленными рибосомами, ×30 000 (*в*); «светлая» (слева) и «темная» (справа) клетки в марте. Слева — рыхло расположенные короткие трубочки ГЭР диаметром 50—60 нм (стрелки), окружающие *ЛК*. Справа — ГЭР (стрелки), состоящий из плотно упакованных трубочек диаметром 40—50 нм, ×30 000 (*г*).

Матеріал, захищений авторським правом

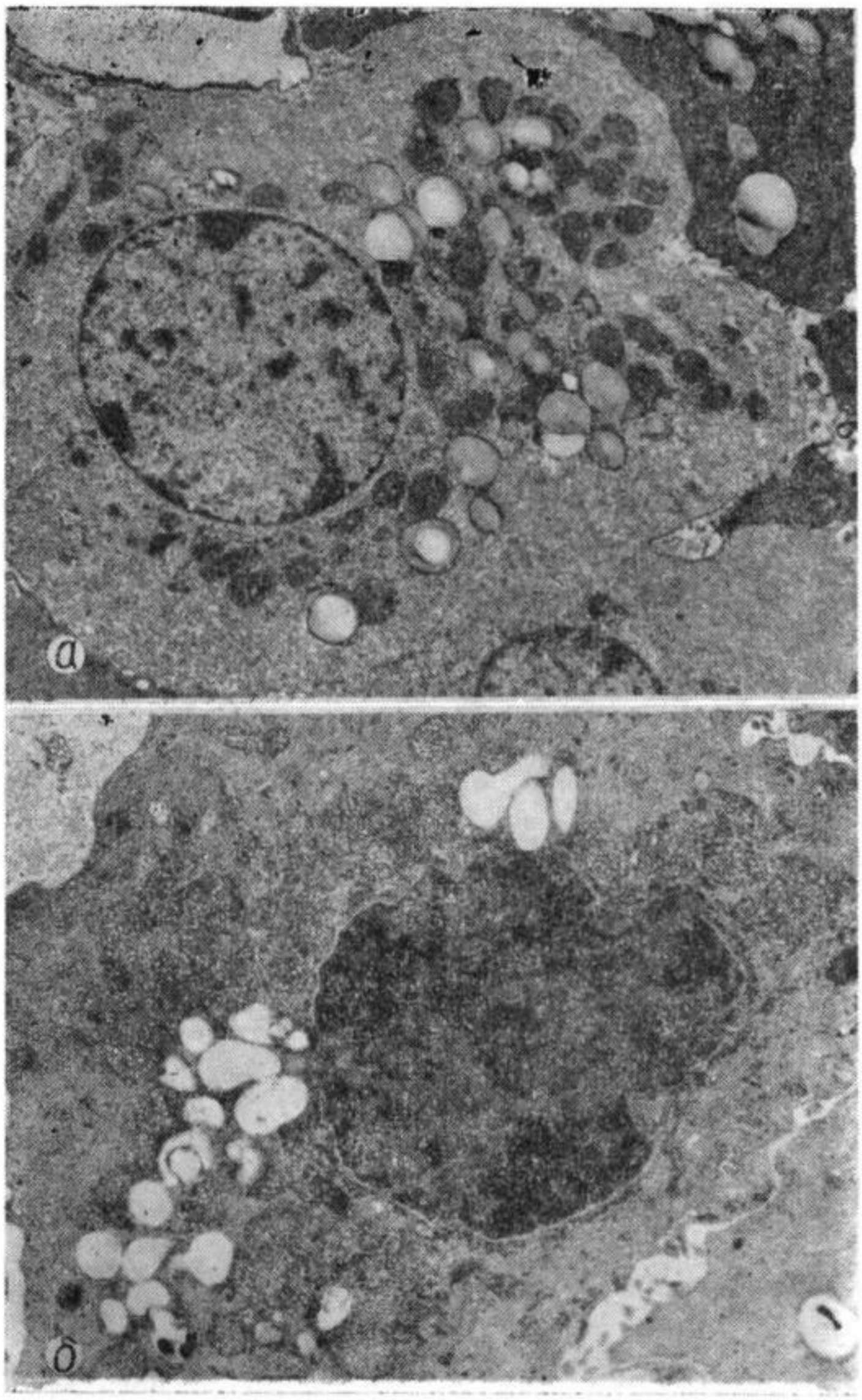


Рис. 3. «Светлая» клетка пучковой зоны в марте в окружении «темных»; ГЭР представлен короткими трубочками диаметром 40—50 нм (см. рис. 2, *г*, слева), ×6 000 (*а*); «темная» клетка клубочковой зоны с плотно упакованным ГЭР (см. рис. 2, *г*, справа), ×10 800 (*б*).

ти от того, насколько плотно упакованы тубулы ГЭР, клетки имеют вид «светлых», «темных» или промежуточных (см. рис. 2, *г*; 3, *а*, *в*).

Ядрышки клеток клубочковой зоны в этот период становятся более выраженными, т. е. их нуклеолонемная часть приобретает отчетливые очертания. Рибосомы образуют полисомные комплексы, состоящие из трех — пяти рибосом, либо оказываются прикрепленными к цистернам эндоплазматического ретикулума (см. рис. 3, *в*).

Все клеточные органеллы равномерно распределены в гиалоплазме (см. рис. 3, *а*, *б*). Липидные капли в это время превышают по размеру липидные включения во время спячки в 2—2,5 раза и часто обнаруживают тесные контакты с митохондриями (см. рис. 3, *а*). Обычно в таких липидных каплях выявляются «пустоты». Липидные включения нередко оказываются в контакте с трубочками ГЭР (см. рис. 2, *г*): в таких случаях они меньше по размеру и не имеют «пустот». Гранулы типа лизо-

Матеріал, захищений авторським правом

сом в марте встречаются редко, обычно находясь в контакте с липидными каплями.

Клетки пучковой зоны в январе имеют следующие особенности: микроворсинки развиты лучше, чем в клетках клубочковой зоны в этот же период; ядра овальные, без инвагинаций; ядрышки выражены хуже и встречаются реже (рис. 4, *а*). Митохондрии округлые, 0,5—1,5 мкм в диаметре, кристы имеют вид везикул (см. рис. 2, *а*, 4, *а*, 5, *в*) — признак, по которому различаются клетки клубочковой и пучковой зон. Аппарат Гольджи и шероховатый ретикулум не обнаруживаются. Липидные капли, как правило, не образуют больших скоплений. Свободных рибосом меньше, чем в клетках клубочковой зоны в январе, лизосомоподобных телец в клетках пучковой зоны больше. На срезах некоторых клеток они образуют скопления из 5—10 электронно-плотных гранул с включениями липидной природы (см. рис. 2, *а*).

В некоторых клетках пучковой зоны в начале февраля можно видеть образования, которые трудно отнести к какому-то определенному классу клеточных органелл: это округлые или сильно вытянутые гранулы с тонко гранулированным содержимым умеренной электронной плотности, окруженные одинарной мембраной (рис. 5, *а*). Скопления гранул оказываются вблизи клеточной мембраны в окружении микротрубочек (см. рис. 5, *а*).

В большинстве случаев в феврале клетки пучковой зоны имеют те же признаки, что и в январе, но встречаются клетки с более осмиофильным ядром (рис. 4, *б*), вокруг которого группируются митохондрии, липидные включения, ГЭР везикулярного типа, но значительную часть периферии клетки занимает ГЭР тубулярного типа, состоящий из извитых трубочек диаметром около 60 нм (см. рис. 4, *б*). Иногда трубочки выявляют явную гексагональную упаковку (рис. 4, *в*). В тесном контакте с трубочками ГЭР часто обнаруживаются липидные включения умеренной электронной плотности. Клетки с аналогичным эндоплазматическим ретикулумом можно отнести к «темным». В них можно видеть удлиненные митохондрии (4 мкм в длину, тогда как обычно митохондрии имеют 1,5 мкм), между которыми находятся уплощенные цистерны эндоплазматического ретикулума с прикрепленными к их мембранам рибосомами (рис. 5, *б*).

В марте среди клеток пучковой зоны встречаются те же типы, что и в клубочковой зоне в этот период (см. рис. 2, *в*, *г*; 3, *а*, *б*), однако часто можно видеть клетки, имеющие хорошо развитый аппарат Гольджи и электронно-плотные лизосомоподобные гранулы вблизи него (см. рис. 5, *в*). Подобные органеллы оказываются и около клеточных мембран в юкстасинусоидальном полюсе клетки.

Обсуждение результатов. Морфология адренокортикальных клеток во время глубокой спячки крапчатого суслика (январь) свидетельствует о значительной репрессии синтеза кортикостероидов: ядрышки уменьшены в размерах и количестве, отсутствуют полисомные комплексы, ГЭР представлен отдельными везикулами, число митохондрий снижено по сравнению с летним периодом на 30 %, уменьшено и количество крист в них. Известно, что в синтезе кортикостероидов попеременно принимают участие митохондрии и гладкий ретикулум [15, 23, 24, 26]. Исходя из этого, можно заключить, что уменьшение количества митохондрий и крист в них, а также везикулярная форма ретикулума свидетельствуют о сниженной кортикостероидной активности коры надпочечников суслика в период глубокой спячки.

Согласно литературным данным [1, 14, 19—22, 27, 28], гибернаторы, к числу которых относится крапчатый суслик, выявляют четкий годовой цикл функционирования эндокринной системы, характеризующийся низким уровнем активности в период спячки, что согласуется с нашими наблюдениями о репрессии адренокортикальных клеток крапчатого суслика во время глубокой спячки (январь).

Необходимо отметить, однако, что морфология клеток клубочковой

Матеріал, захищений авторським правом

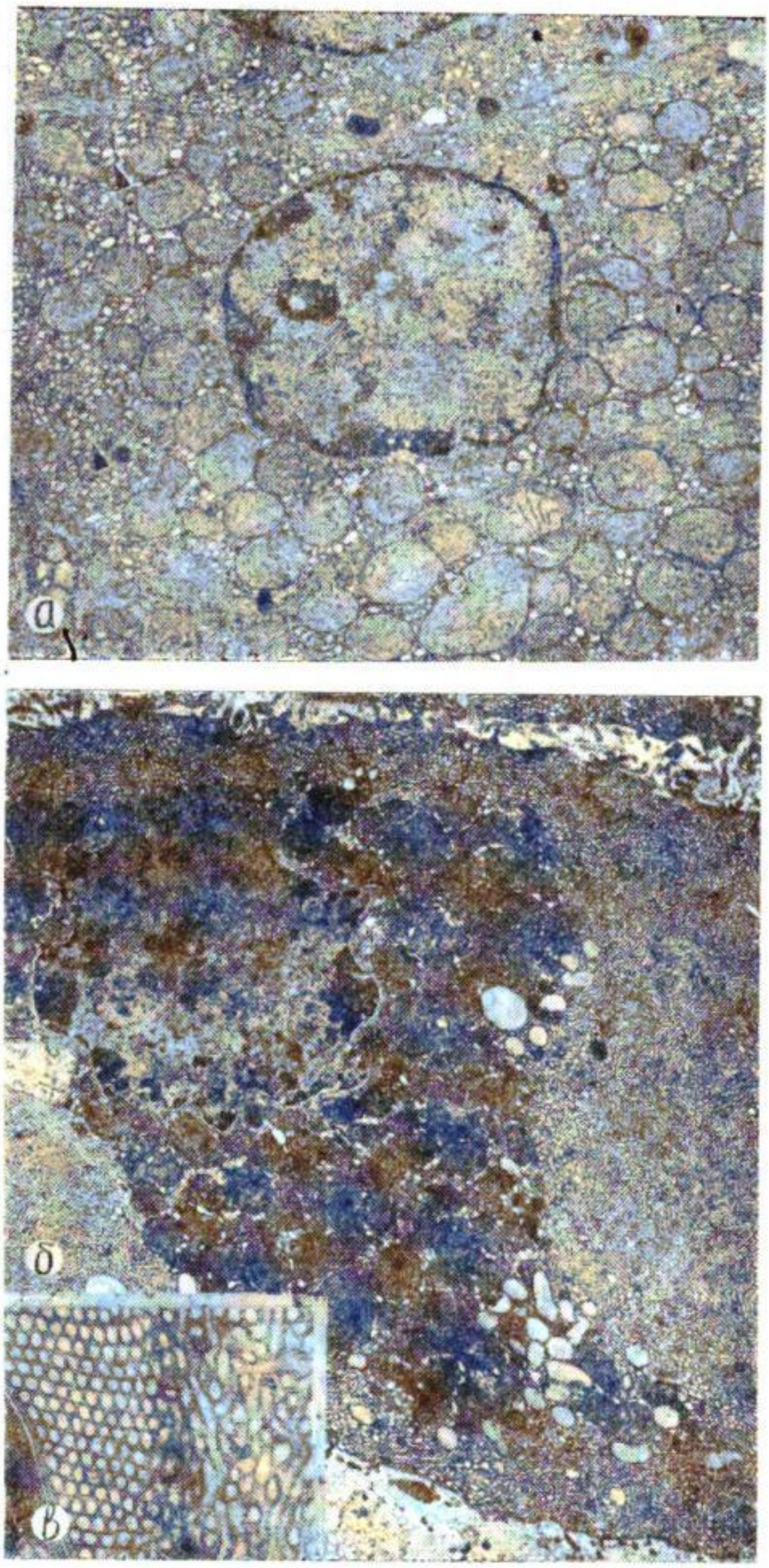


Рис. 4. Клетка пучковой зоны в январе с везикулярным ретикулумом (стрелки), ×9 600 (*а*); «темная» клетка пучковой зоны в феврале со структурированным тубулярным ГЭР на периферии; *Я* — ядро, вокруг которого расположены митохондрии, липидные капли, везикулярный эндоплазматический ретикулум и лизосомоподобные включения, ×7 500 (*б*); участок гексагонального упакованного ГЭР с диаметром трубочек 60 нм, ×37 500 (*в*).

и пучковой зон в этот период несколько различна. Так, если в клетках пучковой зоны в зимний период не обнаруживается аппарат Гольджи, то в гломерулярных клетках он присутствует, хотя и в несколько редуцированной форме; ядра клеток пучковой зоны не имеют инвагинаций в отличие от ядер клубочковой; ядрышки более выражены в гломерулярных клетках и рибосомы в них более многочисленны по сравнению

Матеріал, захищений авторським правом

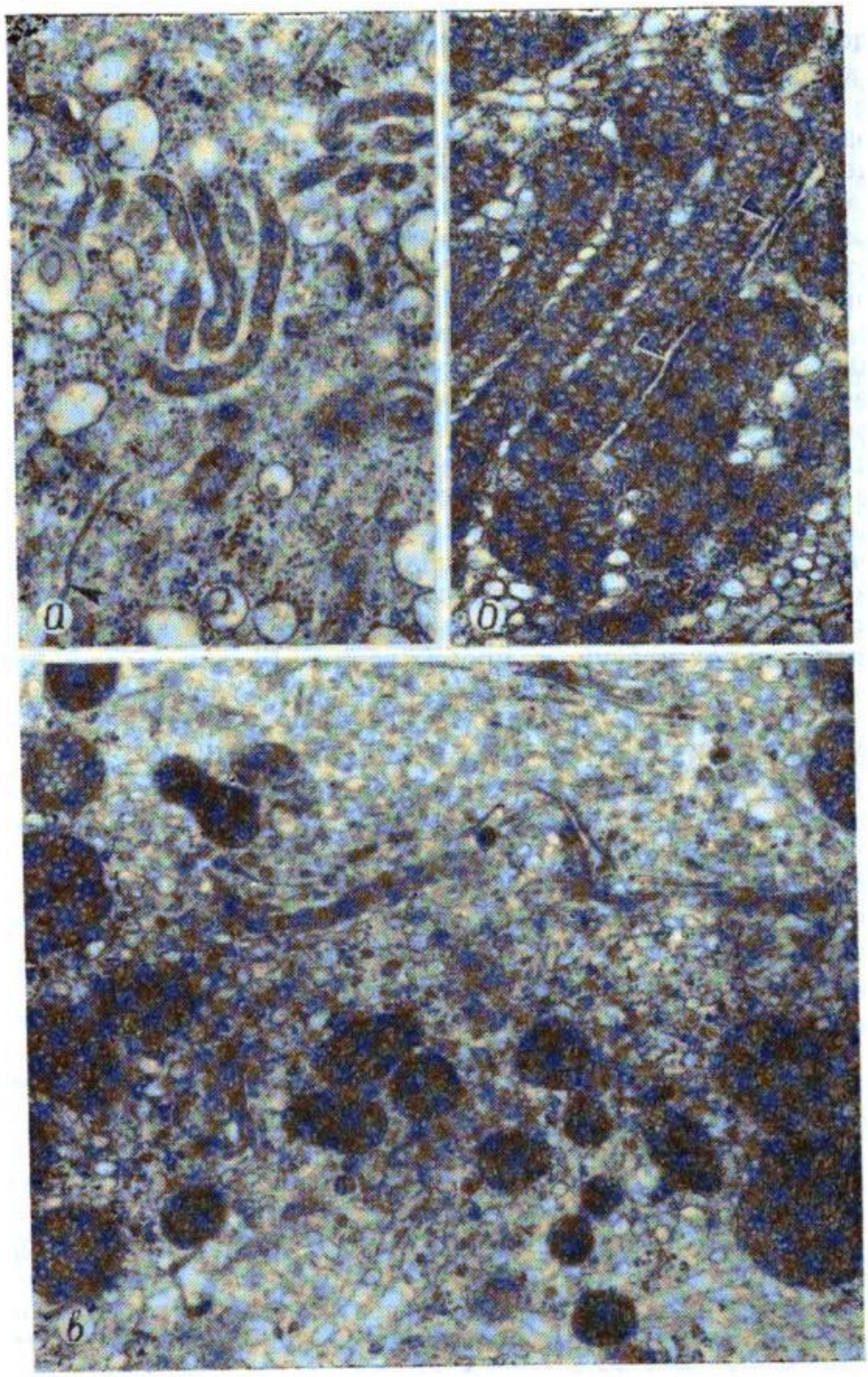


Рис. 5. Органеллы в адренокортикальных клетках в феврале (О) в окружении микротрубочек (стрелки), *В* — везикулы ГЭР, ×45 000 (*а*); удлиненные митохондрии в клетках пучковой зоны (февраль), между которыми расположены уплощенные цистерны эндоплазматического ретикулума с прикрепленными к ним рибосомами (стрелки), ×37 500 (*б*); аппарат Гольджи в клетке пучковой зоны в марте, ×37 500 (*в*).

с таковыми в клетках пучковой зоны. Все эти морфологические данные свидетельствуют о большей активности клеток клубочковой зоны, производящей минералокортикоиды, по сравнению с клетками пучковой зоны, продуцирующей глюкокортикоиды, что коррелирует с результатами, полученными М. Г. Колпаковым и соавт. [1], о более высокой потенциальной способности клеток клубочковой зоны к синтезу альдостерона по сравнению с продукцией глюкокортикоидов клетками пучковой зоны у краснощекого суслика в период глубокой спячки. Имеющий период активности гипоталамо-гипофизарного пути [6, 13], управляющего работой пучковой зоны, и о сравнительно высокой активности

Матеріал, захищений авторським правом

юкстагломерулярного аппарата почки (ЮГА), контролирующего работу клеток клубочковой зоны [9, 32], чем, по-видимому, и объясняются различия в морфологии клеток пучковой и клубочковой зон коры надпочечников у крапчатого суслика во время глубокой спячки.

В период подготовки к пробуждению крапчатого суслика (февраль) в клетках пучковой зоны наблюдаются некоторые признаки, свидетельствующие об активации стероидогенеза: появление цистерн шероховатого ретикулума, удлиненных митохондрий, сложно организованного тубулярного ГЭР. В клетках клубочковой зоны отмечены присутствие более развитого аппарата Гольджи, большее число микроворсинок по сравнению с клетками в январе, тубуло-везикулярный ГЭР, что также указывает на увеличение секреции этими клетками.

Через одну-две недели после окончательного пробуждения (середина марта) наиболее характерными особенностями обеих зон являются наличие большого количества клеток со сложными формами агранулярного ретикулума, появление рибосом в виде полисомных комплексов, увеличение размеров липидных капель и тесный контакт между липидными включениями, митохондриями и цистернами ГЭР, что служит морфологическим выражением усиленного стероидогенеза [15].

В период подготовки к пробуждению (февраль для крапчатых сусликов, март — для краснощеких) наблюдаются активация гипоталамо-гипофизарного пути [5, 6, 13] и увеличение содержания в периферической крови АКТГ [4] и кортикостероидов [2, 4]. При окончательном пробуждении сусликов отмечается максимальная активность коры надпочечников [1—6]. Таким образом, полученные нами морфологические данные, свидетельствующие о репрессированной активности адренокортикальных клеток у крапчатого суслика в период глубокой спячки, активации стероидогенеза при подготовке к пробуждению и максимальной активности клеток обеих зон коры надпочечников при окончательном пробуждении, хорошо согласуются с данными по продукции кортикостероидов на протяжении спячки и в активный сезон у краснощекого суслика [1—5].

На протяжении исследуемого периода (январь — март) адренокортикальные клетки крапчатого суслика обнаруживают амфихроизм, обусловленный разной степенью осмиофильности гиалоплазмы и матрикса митохондрий, а также различной ультраструктурной организацией клеток, прежде всего разными формами ГЭР в них. Во время глубокой спячки, когда кора надпочечников наименее активна [1—3, 19], в клетках обеих зон преобладает агранулярный ретикулум везикулярного типа. В процессе подготовки к пробуждению, если отмечается некоторое повышение продукции 11-оксикортикостероидов [1—3], в клетках пучковой зоны у крапчатого суслика выявляется сложно организованный ГЭР тубулярного типа, а в клетках клубочковой преобладание клеток с тубуло-везикулярным ретикулумом. При окончательном пробуждении (кора надпочечников наиболее активна [1—6]) клетки обеих зон обнаруживают сложные образования тубулярного ретикулума различного типа. Везикулярно-тубулярный ГЭР описывается как наиболее характерный тип гладкого ретикулума, начиная от интерреналовых клеток низших позвоночных и кончая адренокортикальными клетками высших [15, 23, 24]. По-видимому, сложные тубулярные образования ГЭР — достаточно редкий феномен для надпочечниковой ткани, однако для других стероидсекретирующих клеток [8, 10] описан сложно организованный агранулярный ретикулум. Полагают, что большое количество структурированного эндоплазматического ретикулума находится в клетках, способных к синтезу холестерина [7, 10, 16] и различные формы ГЭР взаимопревращаемы в зависимости от стадии активности стероидсекретирующих клеток [7, 8]. Наверное, появление в коре надпочечников крапчатого суслика большого числа клеток со сложно организованным ретикулумом является отражением увеличения синтеза холестерина — предшественника кортикостероидов. В адренокортикальных

Матеріал, захищений авторським правом

клетках суслика в период подготовки к пробуждению вблизи клеточной мембраны в окружении микротрубочек выявлены скопления гранул, которые трудно отнести к определенному классу клеточных органелл. Подобные гранулы в юкстасинусоидальном полюсе клеток клубочковой зоны надпочечников крысы с реноваскулярной гипертонией наблюдал Нассдорфер и соавт. [23], который предположил, что эти гранулы секреторные, а механизм выведения гормонов из адренокортикальных клеток — экзоцитоз. При окончательном пробуждении сусликов в пучковой зоне обнаружены клетки с хорошо развитым аппаратом Гольджи и лизосомоподобными включениями возле него. Аналогичные картины были получены некоторыми авторами [12, 25], которые отождествляют лизосомоподобные гранулы с секреторными. До сих пор не установлено, каким образом и в каком виде кортикостероиды выводятся из клеток [15, 23, 24]. Исследование ультраструктуры адренокортикальных клеток зимоспящих в сочетании с цитохимией и радиоиммунными методами анализа позволит выяснить этот вопрос, так как зимоспящие имеют четкий ритм функционирования коры надпочечников, который характеризуется низкой продукцией кортикостероидов в период глубокой спячки и высоким уровнем в весенний период, при окончательном пробуждении от нее.

1. *Колпаков М. Г., Колаева С. Г., Красс П. М. и др.* Механизмы сезонных ритмов кортикостероидной регуляции зимоспящих. — Новосибирск : Наука, 1974. — 160 с.
2. *Корякина Л. А.* Сезонные изменения в реакции гипофизарно-надпочечниковой системы на действие адреномиметиков у суслика Cytellus erythrogenys. — Журн. эволюц. биохимии и физиологии, 1976, **12**, № 5, с. 444—447.
3. *Корякина Л. А.* Реактивность гипофизарно-адреналовой системы сусликов Cytellus erythrogenis, пробуждающихся от зимней спячки. — Там же, 1979, **15**, № 2, с. 147—251.
4. *Красс П. М., Хабибов В.* Сезонные ритмы функциональной активности адренокортикотропной функции гипофиза у краснощекого суслика. — Докл. АН СССР, 1975, **225**, № 2, с. 474—476.
5. *Хабибов В., Красс П. М.* Сезонная динамика абсолютного и относительного веса надпочечников и уровня 11-гидроксикортикостероидов в периферической крови краснощекого суслика, Citellus erythrogenys. — Там же, 1974, **216**, № 6, с. 1433—1435.
6. *Юрисова М. Н.* Изменения гипоталамо-гипофизарной нейросекреторной системы во время спячки краснощекого суслика, Cytellus erythrogenys. — Журн. эволюц. биохимии и физиологии, 1970, **6**, № 5, с. 516—522.
7. *Black V. H.* Development of smooth-surfaced endoplasmic reticulum in adrenal cortical cells of fetal guinea pigs. — Amer. J. Anat., 1972, **135**, p. 381—417.
8. *Blanchette E. J.* Ovarian steroid cells: 1. Differentiation of the lutein cells from the granulosa follicle cell during the preovalutary stage. 2. The lutein cell. — J. Cell Biol., 1966, **31**, p. 501—542.
9. *Canquilhem B., Bloch R.* Evolution saisonnière de l'elimination des hormones surrènaliennes chez un hivernant, Cricetus cricetus. — Arch. Sci. Physiol., 1967, **21**, p. 27—44.
10. *Christensen A. K.* The fine structure of testicular interstitial cells in quinea pigs. — J. Cell Biol.. 1965, **26**, p. 911—935.
11. *Deane H. W., Lyman C. P.* Body temperature, thyroid and adrenal cortex of hamsters during cold exposure and hibernation, with comparison to rats. — Endocrinology, 1954, **55**, p. 300—315.
12. *Gemell R. T., Laychock S. G., Rubin R. P.* Ultrastructural and biochemical evidence for a steroid — containing secretory organelle in the perfused cat adrenal gland. — J. Cell Biol., 1977, **72**, p. 209—215.
13. *Hoffman R. A., Zarrow M. X.* Seasonal changes in the Basophilic cells of the pituitary gland of the ground squirrel (Citellus tridecemlineatus). — Anat. Record, 1958, **131**, p. 727.
14. *Hudson J. W.* Torpidity in mammals. — In: Comparative physiology of thermoregulation. New York; London : Acad. press, 1973, p. 97—165.
15. *Idelman S.* Ultrastructure of the mammalian adrenal cortex. — Intern. Rev. Cytol., 1970, **27**, p. 181—273.
16. *Jones A. L., Fawcett D. W.* Hipertrophy of the agranular endoplasmic reticulum in hamster liver induced by phenobarbital (with a review on the functions of this organelle in liver). — J. Histochem. and Cytochem., 1966, **14**, p. 215—232.
17. *Kayser Ch.* Le sommeil hivernal et les glandes surrènales. Etude faite sur le hamster ordinaire (cricetus cricetus). — C.r. Soc. biol., 2, 1957, **151**, p. 982—985.
18. *Kayser Ch.* Le sommeil hivernal, probleme de thermoregulation.— Rev. Can. Biol., 1957, **16**, N 3, p. 303—389.

Матеріал, захищений авторським правом

19. *Kayser Ch.* The physiology of natural hibernation. — New York etc.: Pergamon, 1961. — 325 p.
20. *Kayser Ch., Vincendon G., Frank R., Porte A.* Some external (climatic) and internal (endocrine) factors in relation to production of hibernation. — Ann. Acad. Sci. Fenn., Ser. A4, **71/19**, p. 271.
21. *Lyman C. P., Chatfield P. O.* Physiology of hibernation in mammals. — Physiol. Rev., **35**, p. 403—442.
22. *Mann F. C.* The ductless glands in hibernation. — Amer. J. Physiol., 1916, **41**, p. 173—188.
23. *Nussdorfer G. G.* Cytophysiology of the adrenal zona glomerulosa. — Intern. Rev. Cytol., 1980, **64**, p. 307—368.
24. *Nussdorfer G. G., Mazzochhi G., Meneghelli V.* Cytophysiology of the adrenal zona fasciculata. — Ibid., 1978, **55**, p. 291—365.
25. *Nussdorfer G. G., Mazzochhi G., Neri G., Robba C.* Investigations into the mechanism of hormon release by rat adrenocortical cells. — Cell and Tissue Res., 1978, **189**, p. 403—407.
26. *Olson J. A.* The biosynthesis of Cholesterol. — Ergeb. Physiol. Biol. Chem. Exp. und Pharmakol., 1965, **56**, p. 173—215.
27. *Popovic V.* Endocrines in hibernation. — Bull. Mus. Comp. Zool., 1960, **124**, p. 104—130.
28. *Raths R., Kulzer E.* Physiology of hibernation and related lethargic states in mammals and birds. — Bonn. Zool. Monogr., 1976, **9**, p. 1—91.
29. *Stoeckel M. E., Petrovic A., Porte A., Kayser Ch.* Etude ultrastructurale du cortex surrénalien chez un hivernant le hamster ordinaire (Cricetus cricetus), au cours du cycle saisonnier. — J. Physiol., 1964, **56**, p. 442—443.
30. *Vidovic V., Popovic V.* The role of the adrenals and the thyroid during winter-sleep of the ground squirrel. — Arch. Biol. Sci. Serbian, 1953, **5**, p. 171—188.
31. *Vidovic V. L., Popovic V.* Studies on the adrenal and thyroid glands of the ground squirrel during hibernation. — J. Endocrinol., 1954, **11**, p. 125—133.
32. *Zimny M. L., Levi E. D., Jr.* Ultrastructure of mesangial and jux taglomerular cells in the kidney of a hibernator. — Z. Zellforsch., 1971, **118**, p. 326—332.

Ин-т биол. физики АН СССР, Красноярск

Получено 10.05.82

УДК 57.043:(599.322)591.481

Л. И. Муравьева, А. Ю. Буданцев

ГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ И СОДЕРЖАНИЯ БИОГЕННЫХ МОНОАМИНОВ В ГОЛОВНОМ МОЗГУ ДЛИННОХВОСТОГО СУСЛИКА (CITELLUS PARRYI RICH., 1827)

Исследования роли биогенных моноаминов в механизмах гибернации с использованием биохимических методов показали, что цикл спячки сопровождается значительными изменениями в содержании и обороте катехоламинов и серотонина [2, 6, 8—10]. Интересную и важную информацию по этому вопросу могло бы дать гистохимическое изучение биогенных моноаминов в мозгу зимоспящих, позволяющее не только выявить распределение этих веществ на уровне отдельных ядер и клеток, но и количественно оценить их содержание. К сожалению, хотя подобный подход широко и успешно используется при изучении различных видов животных — крыс, кроликов, кошек, он еще не нашел должного применения в исследованиях моноаминергических систем мозга зимоспящих.

В настоящей статье впервые проведено гистохимическое изучение моноаминсодержащих нейронов в головном мозгу сезонного гибернатора.

Материал и метод исследований. Эксперименты проводились на арктических длиннохвостых сусликах, отловленных в конце августа в Магаданской области и перевезенных в г. Пущино, где содержались в темном, холодном помещении. Животные забирались в эксперимент по прошествии не менее трех суток от начала оцепенения (температура тела составляла +4—6 °С); зверьки, находившиеся в идентичных условиях, но пребывавшие в активном состоянии, являлись контрольными.

Матеріал, захищений авторським правом

Было проведено десять опытов. После декапитации мозг извлекался, выделялись необходимые области (кусочки 3×2×2 мм), которые быстро замораживались в жидком азоте. Замороженные образцы лиофилизировались 15—16 ч, после чего обрабатывались по методу Фалька—Овмана [7]. Ткань выдерживалась в парах формальдегидного газа в течение 1 ч при 80 °С, затем кусочки пропитывались парафином при разрежении 100 мм рт. ст. Срезы толщиной 7 мкм монтировались на сухие стекла, парафин убирался вазелиновым маслом. Препараты просматривались под люминесцентным микроскопом МЛ-2Б. Количественное гистохимическое изучение содержания биогенных моноаминов в разных структурах мозга суслика проводилось по методике, описанной ранее [1].

Содержание катехоламинов в мозгу сусликов в состоянии активности и во время спячки

Структура	Состояние животных		
	Активность	Спячка	p
Sub. nigra	23,4±0,6 $n=8$	30,3±0,8 29,5% $n=7$	$p<0{,}001$
Nuc. caudatus	20,8±0,4 $n=8$	20,5±0,3 0 $n=10$	$p>0{,}05$
Область над nuc. interpeduncularis	30,8±0,8 $n=7$	36,5±0,8 18,5% $n=7$	$p<0{,}001$
Nuc. accumbens	24,4±0,8 $n=8$	50,0±2,4 105% $n=10$	$p<0{,}001$
Nuc. interstitialis stria terminalis	29,5±1,2 $n=9$	59,1±2,8 100,3% $n=8$	$p<0{,}001$
Tub. olfactorium	18,5±0,4 $n=7$	39,6±1,5 114,1% $n=6$	$p<0{,}001$
Loc. coeruleus	24,3±2,2 $n=2$	70,6±12,3 190,5% $n=5$	$p<0{,}001$

Примечание. Условные единицы — интенсивность флуоресценции, n — количество животных, M±S, p вычислено по критерию Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. Распределение моноаминергических структур исследовалось в двух разделах мозга, условно названных нами «передний» и «средний» мозг. В области «переднего» мозга изучались стриатум, ядра септума (включая nuc. accumbens, ядро конечной пластинки), обонятельный бугорок и передняя преоптическая область, т. е. те структуры, где, как показано для мозга крыс и кроликов [5, 7], расположены терминали аксонов моноаминергических нейронов. В области «среднего» мозга анализировались черная субстанция, область интерпедункулярного ядра, группа ядер шва, синее пятно, т. е. те структуры, в которых локализуются перикарионы дофамин-, серотонин- и норадреналинсодержащих нейронов.

Наблюдавшееся распределение моноаминсодержащих структур в мозгу арктического длиннохвостого суслика так же, как и в мозгу других изученных видов зимоспящих [4], аналогично морфологической организации таковых у незимоспящих млекопитающих [1, 5, 7].

Количественно-гистохимический анализ содержания биогенных моноаминов проводился для трех моноаминергических систем мозга: двух дофаминергических (нигро-неостриальной и мезолимбической) и норадренергической. Как видно из таблицы, содержание катехоламинов значительно увеличено почти во всех исследованных областях мозга (исключение — хвостатое ядро) гибернирующего суслика по сравнению с активным. Увеличенное содержание дофамина во время спячки было отмечено ранее и на других видах зимоспящих [3, 10].

Наиболее значительное различие (повышение во время спячки) в содержании катехоламинов наблюдалось в области локализации норадреналинсодержащих нейронов — синем пятне, что согласуется с данными Дж. В. Твента и соавт. [9], которые выявили увеличение содержания норадреналина в продолговатом мозгу (с мостом) во время спячки. Расхождение наших результатов с данными других биохимиков [6, 10], возможно, вызвано методическими особенностями экспериментов.

Матеріал, захищений авторським правом

В настоящее время есть мнение о важной роли катехоламинов для пробуждения от спячки [2, 6, 8]. Наблюдавшееся нами увеличение содержания дофамина и норадреналина во время спячки животного, по-видимому, можно рассматривать как депонирование медиаторов, запасы которых могут быть быстро мобилизованы в процессе пробуждения.

1. *Буданцев А. Ю.* Моноаминергические системы мозга. — М. : Наука, 1976. — 193 с.
2. *Попова Н. К., Науменко Е. В., Колпаков В. Г.* Серотонин и поведение. — Новосибирск : Наука, 1978. — 304 с.
3. *Эмирбеков Э. З., Абдуллаев Р. А., Ибрагимов И. И.* Содержание биогенных аминов в головном мозге при искусственном и естественном охлаждении животных. — Укр. биохим. журн., 1980, **52**, № 4, с. 418—422.
4. *Barry J.* Etude en fluorescence U. V. monoamines centrales chez le Lerot (Eliomys quercinus) en hibernation. — C. r. Soc. biol., 1970, **164**, N 3, p. 566—568.
5. *Dahlström A., Fuxe K.* Evidence for the existence of monoamines containing neurons in the central nervous system. 1. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. — Acta physiol. scand., 1965, **62**, suppl. 232, p. 1—55.
6. *Draskoczy P. R., Lyman C. P.* Turnover of catecholamimes in active and hibernation ground squirrels. — J. Pharmacol. and Exp. Ther., 1967, **155**, N 1, p. 101—111.
7. *Falck B., Owman Ch.* A detailed methodological descraption of the fluorescence method for the cellular demonstration of biogenic monoamines. — Acta Univ. lund. Sec. II, 1965, p. 1—33.
8. *Feist D. D., Galster W. A.* Changes in hypothalamic monoamines and serotonin during hibernation and arousal in the arctic ground squirrels. — Comp. Biochim. and Physiol., A, 1974, **48**, p. 623—662.
9. *Twente J. W., Cline W. H., Twente J. A.* Distribution of epinephrine in the brain of Citellus lateralis during the hibernation cycle. — Comp. Gen. Pharmacol., 1970, **1**, p. 47—53.
10. *Uuspaa V. J.* The catetholamine content of the brain and heart of the hedgehog (Erinaceus europaeus) during hibernation and in an active state. — Ann. med. exp. fenn., 1963, **41**, fasc. 3, p. 340—348.

Ин-т биофизики АН СССР, Пущино

Получено 29.10.82

УДК 57.043:611.36.085.1.086.1:537.533.35

А. С. Капрельянц, Л. Н. Марченко, И. П. Матяш

УЛЬТРАСТРУКТУРА ТКАНИ ПЕЧЕНИ IN VIVO ПРИ ЛОКАЛЬНОМ ДЕЙСТВИИ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР. СООБЩЕНИЕ I. ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКИЙ И СТЕРЕОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЕПАТОЦИТОВ ПРИ ОХЛАЖДЕНИИ ДО —30 °С

Использование низких температур в различных областях медицины находит все большее применение [3, 6, 7]. В то же время при использовании криохирургических методов клиницисты сталкиваются с двумя основными трудностями: сложностью управления процессом замораживания ткани и невозможностью точного прогнозирования объема и степени разрушений клеток. Решение этих вопросов тесно связано с раскрытием механизмов действия локального охлаждения тканей и органов. Согласно наиболее распространенным представлениям [3, 12], решающим моментом в формировании «эффекта криовоздействия» является прямой эффект действия низких температур на паренхиму ткани. Некоторые авторы [10, 11] указывают на существование «критической температуры» от 15 до 25 °С, охлаждение которой приводит к гибели паренхиматозных элементов тканей. С другой стороны, появляются данные о ведущей роли микроциркуляторных расстройств в процессе гибели тканей [5, 9]. Электронная микроскопия является единственным методом прямого исследования структуры тонких субклеточных элементов тканей, поэтому целесообразно использовать этот метод при изучении действия низких температур на различные ультраструктурные компоненты тканей. Учитывая потребности практической крио-

Матеріал, захищений авторським правом

медицины [1, 4], а также экспериментальные возможности получения значимых теоретических результатов, в качестве модели исследования была выбрана ткань печени. Целью данной работы является изучение качественной и количественной характеристик ультраструктуры гепатоцитов in vivo при локальном охлаждении до —30 °С.

Методика исследования. Исследования проводились на 20 белых крысах-самцах массой 200—250 г, разделенных на две группы: интактные и с криовоздействием. Животные наркотизировались путем внутримышечного введения тиопентала натрия, после чего производились срединная лапоротомия и криоаппликация печени с помощью специально разработанного, автоматически программируемого криозонда с диаметром наконечника 10 мм. Температура рабочей части криозонда была —30 °С, время криоаппликации — 120 с. Сразу после отогрева ткани, осуществлявшегося естественным путем на воздухе, производилась прижизненная фиксация печени перфузией 2%-ного раствора глутаральдегида на какодилатном буфере через воротную вену. Материал для исследования брался непосредственно из области, находящейся под криоаппликатором, измельчался и дофиксировался в глутаральдегидном и осмиевом фиксаторах на какодилатном буфере. Обезвоживание проводили в ацетонах с заливкой материала в смесь эпоксидных смол эпон-аралдит. Ультратонкие срезы изготавливались на ультрамикротоме УМТП-4. Просмотр и фотографирование проводили в электронных микроскопах ЭМВ-100А и ЭВМ-100БР при ускоряющем напряжении 75 кВ. Стереометрический анализ гепатоцитов проводился на основе использования принципа Делессе [8] и методики Вайбеля [2]. Электронно-микроскопические фотографии срезов, взятых из различных блоков, обрабатывались с помощью тест-системы, содержащей 357 точек и имеющей постоянную длину 160 см. Вычислялись относительный объем и плотность поверхностей основных органоидов клетки: ядер, диффузного и компактного хроматина, митохондрий, эндоплазматического ретикулума, лизосом и вакуолей. При этом к группе «лизосомы» были отнесены также лизосомоподобные тельца и плотные включения, а к группе «вакуоли» дополнительно отнесены лизированные участки цитоплазмы гепатоцита в виде пустот и полостей. Весь цифровой материал обрабатывался статистически по методу Стьюдента для малых выборок на ЭВМ СМ-1.

Результаты и их обсуждение. Электронная микроскопия гепатоцитов интактных животных представлена клетками с округлым ядром, содержащим равномерно расположенный диффузный хроматин в виде мелких электронно-оптических плотных гранул и филламентов. В ядрах гепатоцитов отмечались одно или несколько ядрышек. Компактный хроматин располагался преимущественно по периферии ядра (рис. 1). Ядерная мембрана имеет обычное трехслойное строение. В цитоплазме имеются митохондрии округлой или удлиненной формы и обычного строения, шероховатый эндоплазматический ретикулум, вакуоли и лизосомы (рис. 2). Отдельные рибосомы равномерно располагаются по всей цитоплазме.

При анализе ультраструктуры гепатоцитов, подвергшихся охлаждению до —30 °С, было обнаружено, что структура большинства клеток имела следующий вид. Ядро округлой формы содержит ядрышко, расположенное в центре или на периферии ядра в непосредственной близости с ядерной мембраной (рис. 3). В ядре отчетливо отмечаются рибосомальные комплексы. Компактный хроматин располагается по периферии ядра, образуя каналы, связанные с несколько расширенными ядерными порами. Ядерная мембрана имеет обычное строение. Вокруг ядра располагается шероховатый эндоплазматический ретикулум. Митохондрии — округлой формы, преимущественно нормальной структуры. В то же время отмечается наличие пустот в цитоплазме, очевидно, связанное с очаговым лизисом ее содержимого (рис. 4). Структура отдельных митохондрий подвергается изменениям в виде отсутствия ми-

Матеріал, захищений авторським правом

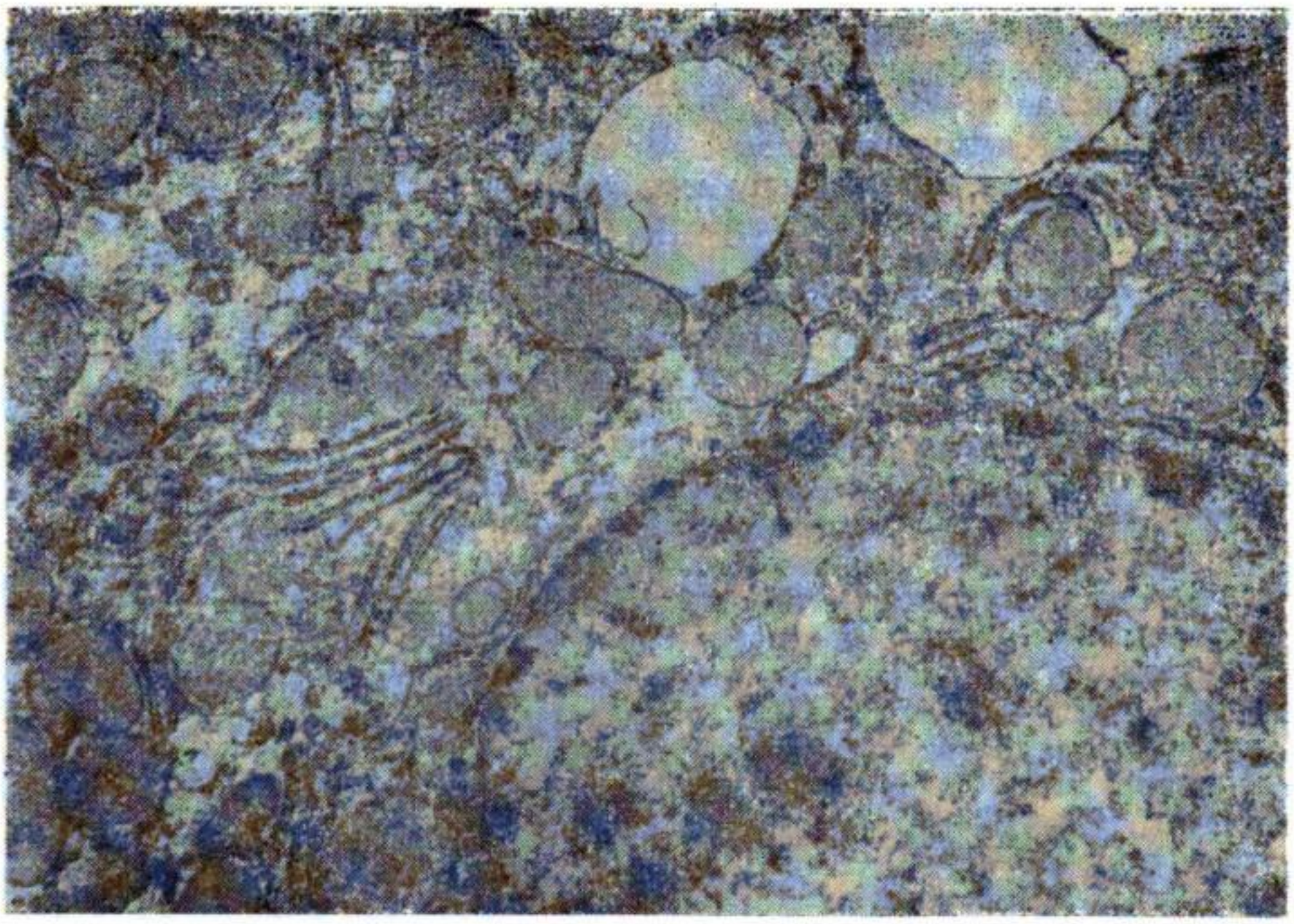


Рис. 1. Ядро и цитоплазма гепатоцита интактной крысы с обычной характеристикой ультраструктуры; ×26 тыс.

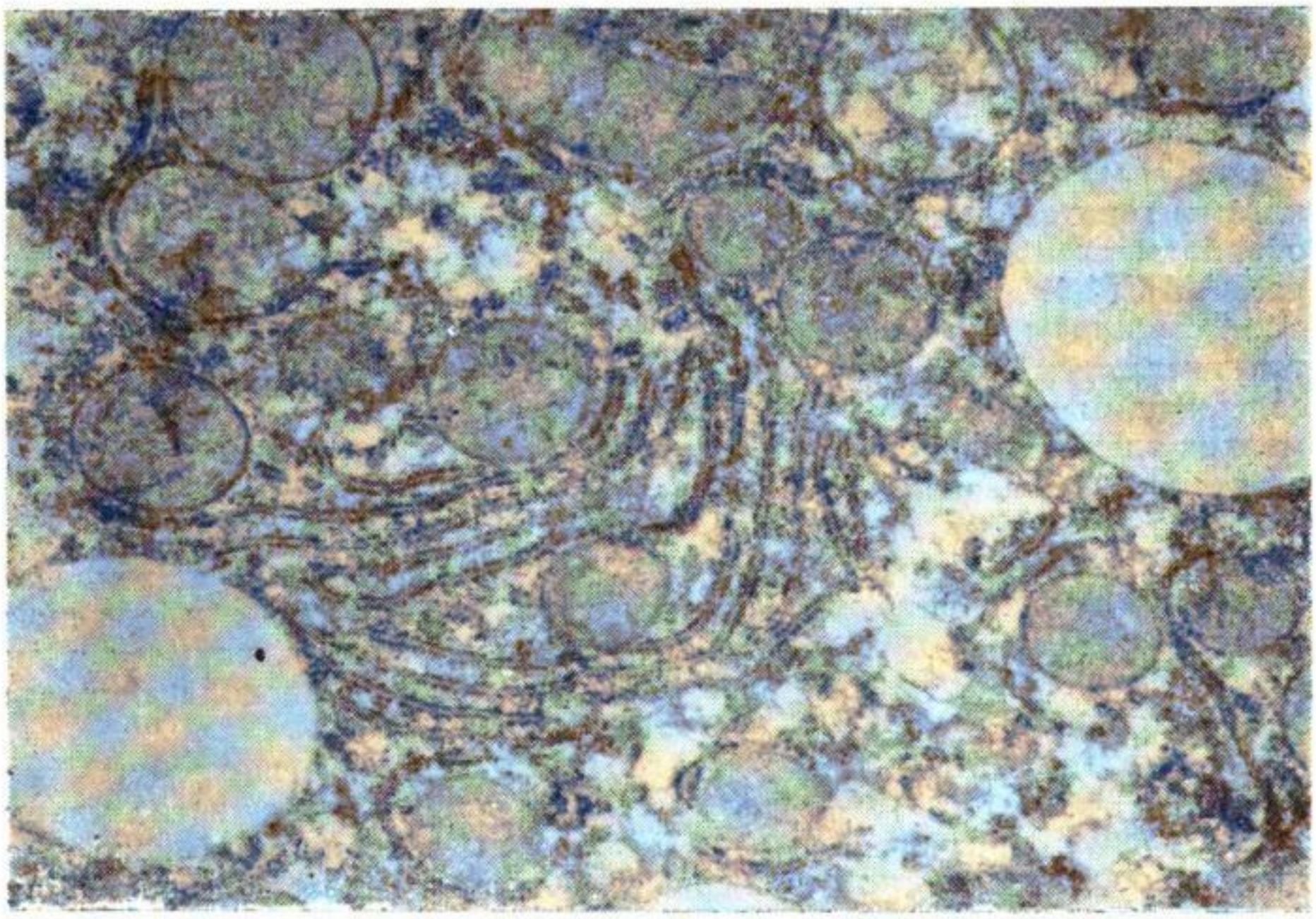


Рис. 2. Участок цитоплазмы интактного гепатоцита с шероховатым ЭПР, митохондриями и вакуолями; ×38 тыс.

тохондриальной мембраны. Цистерны шероховатого эндоплазматического ретикулума в некоторых местах теряют свою целостность (см. рис. 4).

Таким образом, качественный анализ ультраструктуры гепатоцитов сразу после охлаждения свидетельствует о том, что основные функцио-

Матеріал, захищений авторським правом

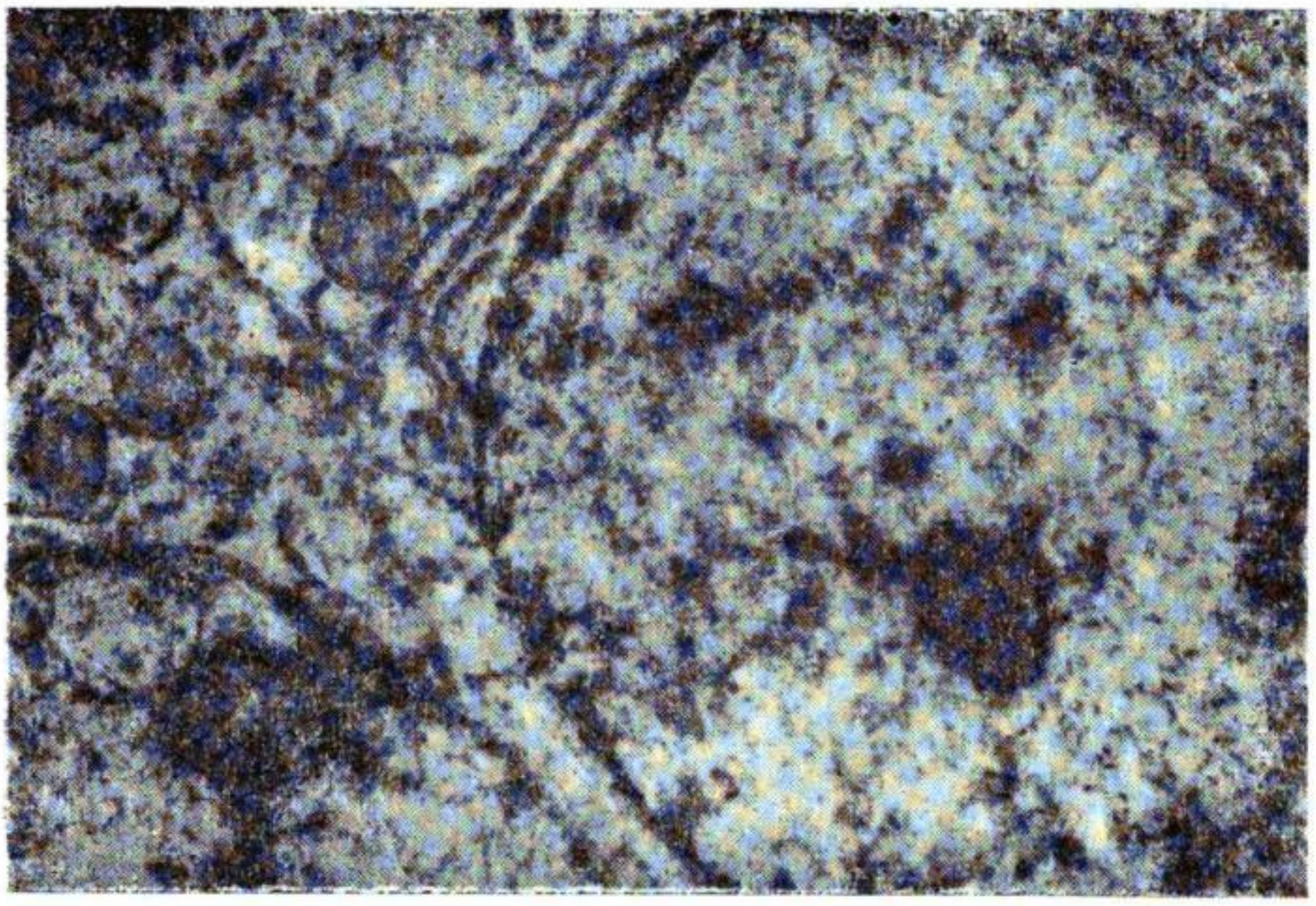


Рис. 3. Гепатоцит после охлаждения до —30 °С; ×26 тыс.

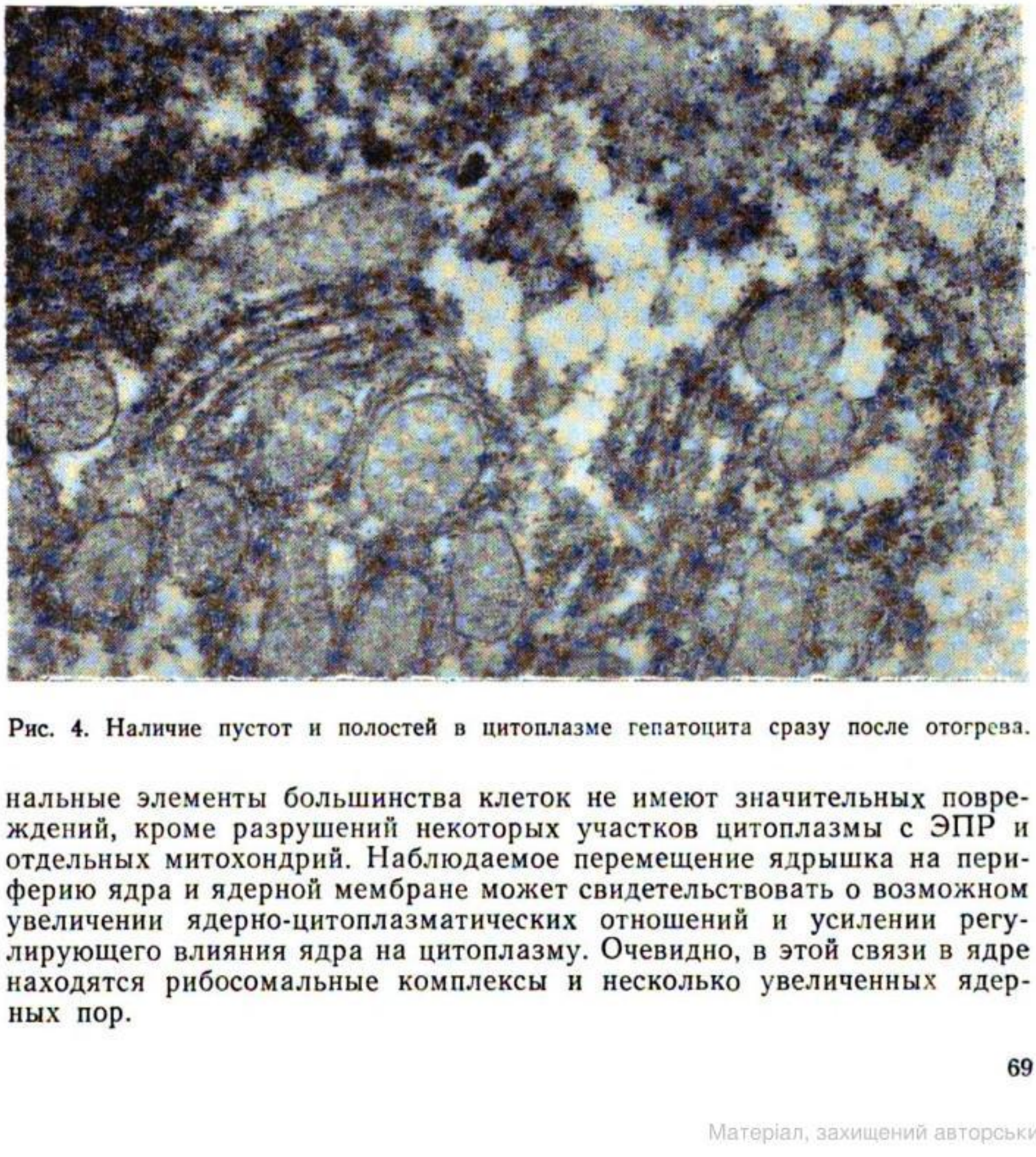


Рис. 4. Наличие пустот и полостей в цитоплазме гепатоцита сразу после отогрева.

нальные элементы большинства клеток не имеют значительных повреждений, кроме разрушений некоторых участков цитоплазмы с ЭПР и отдельных митохондрий. Наблюдаемое перемещение ядрышка на периферию ядра и ядерной мембране может свидетельствовать о возможном увеличении ядерно-цитоплазматических отношений и усилении регулирующего влияния ядра на цитоплазму. Очевидно, в этой связи в ядре находятся рибосомальные комплексы и несколько увеличенных ядерных пор.

Матеріал, захищений авторським правом

Стереометрический анализ ультраструктуры нативных и охлажденных до —30 °С гепатоцитов показал изменение некоторых параметров (рис. 5). Отмечается некоторое уменьшение относительного объема ядра и ЭПР. Несколько увеличивается после охлаждения относительный объем вакуолей и митохондрий. Плотность поверхности ядра и лизосом приблизительно остается на прежнем уровне, в то время как

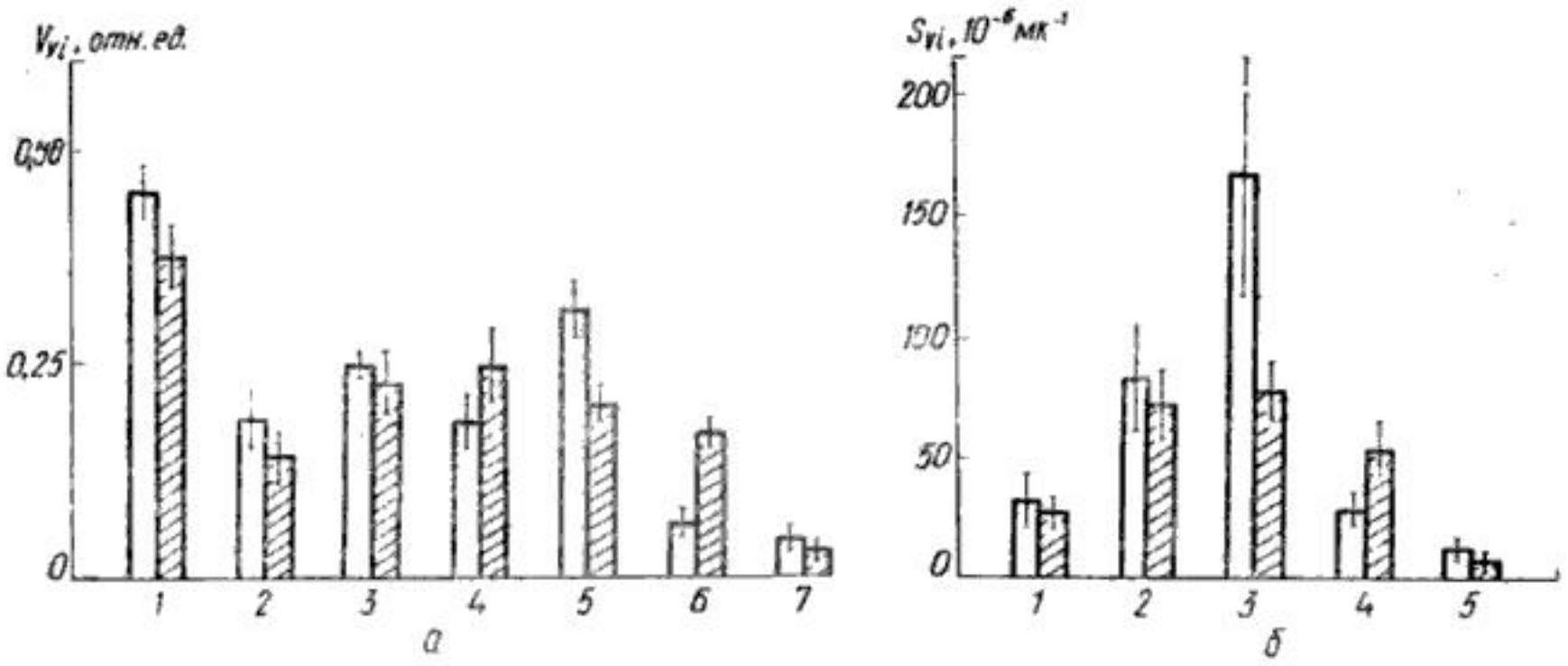


Рис. 5. Стереометрические показатели основных ультраструктурных компонентов гепатоцита в норме (пустые столбики) и после охлаждения (заштрихованные столбики) до —30 °С:

а — относительный объем ядра V_{vn} (*1*), компактного хроматина $V_{vкх}$ (*2*), диффузного хроматина $V_{vдх}$ (*3*), митохондрий V_{vm} (*4*), ЭПР $V_{vэпр}$ (*5*), вакуолей V_{vv} (*6*) и лизосом V_{vl} (*7*); *б* — плотность поверхности ядер S_{vn} (*1*), митохондрий S_{vm} (*2*), ЭПР $S_{vэпр}$ (*3*), вакуолей S_{vv} (*4*), лизосом S_{vl} (*5*).

плотность поверхности ЭПР и митохондрий снижается. Плотность поверхности вакуолей увеличивается.

Полученные количественные данные дополняют и в целом согласуются с качественными ультраструктурными характеристиками гепатоцита. Ряд качественных признаков, таких, как очаговое просветление вещества цитоплазмы, динамика изменений митохондрий и ЭПР, дополняются и подтверждаются соответствующими значениями относительного объема и плотности поверхности (см. рис. 5).

Таким образом, полученные результаты позволяют выяснить некоторые особенности ультраструктурной характеристики гепатоцита при локальном охлаждении печени in vivo до —30 °С.

При электронно-микроскопическом и стереометрическом исследовании ультраструктуры гепатоцитов с использованием метода прижизненной фиксации можно получить объективную информацию о состоянии структуры субклеточных элементов гепатоцита in vivo.

Локальное охлаждение (—30 °С) печени in vivo сопровождается сразу после отогрева образованием пустот и полостей, очевидно, связанных с очаговым лизисом цитоплазмы гепатоцита. Имеющиеся данные позволяют также предположить активизацию ядерно-цитоплазматических отношений в некоторых гепатоцитах. Остальные субклеточные компоненты сохраняют преимущественно неизмененную или незначительно измененную ультраструктуру.

Проведенные исследования свидетельствуют о том, что охлаждение печени до —30 °С не вызывает значительных деструктивных изменений ультраструктуры основной массы гепатоцитов сразу после отогрева.

1. *Альперович Б. И.* Криохирургия некоторых заболеваний печени. — В кн.: Всесоюз. конф. «Развитие и применение криоген. техники в медицине». М., 1980, с. 78—79.
2. ***Вайбель Э.*** **Морфометрия легких человека : Пер. с англ. — М. : Медицина, 1970. —** 175 с.
3. *Криохирургия* / Под ред. Э. И. Канделя. — М. : Медицина, 1974. — 302 с.
4. *Милонов О. Б., Колосс О. Е., Готье С. В., Киневский О. Ф.* Клинические аспекты применения криодеструкции в хирургическом лечении альвеококкоза печени. —

Матеріал, захищений авторським правом

В кн.: Всесоюз. конф. «Развитие и применение криоген. техники в медицине». М., 1980, с. 77—78.
5. *Орлов Г. А.* Хронические поражения холодом. — Л.: Медицина, 1978. — 165 с.
6. *Пачес А. И., Шенталь В. В., Птуха Т. П. и др.* Криогенный метод лечения опухолей головы и шеи. — М.: Медицина, 1978. — 166 с.
7. *Потапов И. И., Рудня П. Г., Тарлычева Л. С., Шеврыгин Б. В.* Криохирургия в отоларингологии. — М.: Медицина, 1975. — 166 с.
8. *Ташкэ К.* Введение в количественную цитогистологическую морфологию. — Изд-во Акад. СРР, 1980. — 191 с.
9. *Cooper I. S.* Some mechanisms of freezing injury. — J. Amer. Geriat. Soc., 1964, 12, p. 812—856.
10. *Frazer J., Gill W.* Observations of ultrafrozen tissue. — Brit. J. Surg., 1967, **54**, p. 770—776.
11. *Gill W., Da Costa J., Frazer J.* The control and predictability of a cryolesion. — Cryobiology, 1970, **6**, p. 347—353.
12. *Mazur P.* Physical-chemical factors underlying cell injury in cryosurgical freezing. — In: Cryosurgery / Eds R. W. Rand, A. P. Rinfert, H. von Leben. Springfield, 1968, p. 32—51.

Ин-т пробл. криобиологии и криомедицины АН УССР, Харьков Получено 15.09.82

УДК 57.043:53.082.7

А. Г. Иванов, М. Е. Унксов, Б. Я. Шпиченецкий, Н. А. Онищенко

ЭЛЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ ИЗМЕНЕНИЙ, ПРОИСХОДЯЩИХ ПРИ КОНСЕРВАЦИИ ОРГАНОВ

Электрометрический метод зондирования органов и тканей на различных частотах является одним из методов нетравмирующего контроля этих биологических объектов, позволяющий по динамике электрических характеристик оценить их функциональное состояние. При зондировании низкочастотными электрическими колебаниями сопротивление тканей биологических объектов велико и при наложении электродов на кожу человека достигает нескольких килоом. Это объясняется тем, что клеточные мембраны, окружающие межклеточную жидкость, для частот 0—1 кГц оказывают большое сопротивление. Поэтому значительная часть тока при этих частотах идет уже не через клетку, а по межклеточной жидкости. При дальнейшем увеличении частоты емкостное сопротивление клеток падает и в общей проводимости тканей все большую роль играет внутриклеточная жидкость. Такое явление — увеличение проводимости с ростом частоты — наблюдается до 1 МГц. Предполагается, что в интервале частот от 0 до 1 МГц рассеяние энергии падающей волны осуществляется за счет ионной проводимости.

При повреждении органов и тканей наступают прежде всего изменение структуры и функции мембран, повышение их проницаемости, изменение объема клеток и внеклеточного пространства, что неизбежно приводит к изменению электрических характеристик тканей. Именно это определило использование зондирования электрическими колебаниями низких частот для определения жизнеспособности органов и тканей [1, 2].

Материалы и методы. Нами было проведено исследование возможностей применения электрометрического метода для оценки изменений, происходящих в изолированных органах в процессе их консервации в консервирующем растворе. Экспериментальная установка для оценки изменений, происходящих в изолированных органах, с помощью высокочувствительных приборов в достаточно широком диапазоне частот в условиях жесткой термостабилизации была создана на базе двух импедансометров ВМ 507 фирмы «Тесла». Она позволяет производить одновременно измерения значений импеданса $\overline{Z}$ и угла диэлектрических потерь φ и осуществлять запись их значений на диаграммной ленте на

Матеріал, захищений авторським правом

фиксированных частотах 5 Гц—500 кГц, а также при автоматическом изменении частоты генератора импедансометров 0—100 кГц за 1 мин. Экспериментальная установка состоит из контейнера с электродами, ультратермостата УТ-15, электромеханического устройства для автоматического изменения частоты генератора импедансометра, смесителя частот, потенциометра КСП-4, частотомера.

Литературные данные о динамике импеданса в органах и тканях вследствие процесса деструкции тканей, носят противоречивый характер, что объясняется сильной зависимостью импеданса от температуры. Для измерения импеданса переживающего органа стабильность температуры должна быть не хуже ±0,05 К. Влияние температуры в данном случае нельзя устранять с помощью дифференциального контейнера с опорной средой, так как в переживающем органе происходят экзо- и эндотермические реакции, приводящие к разбалансу плеч. Для достижения необходимого уровня стабилизации температуры в контейнере использовалась демпфирующая водяная рубашка, разделяющая внутреннюю полость, в которой находится орган с раствором, и, внешнюю, в которой непрерывно циркулирует жидкость от ультратермостата. Благодаря интегрирующему действию демпфирующей рубашки при изменении температуры жидкости в термостате на ±0,5 К колебания температуры раствора во внутреннем объеме контейнера не превышали ±0,05 К, а так как теплоемкость термостатирующей системы велика по сравнению с теплоемкостью исследуемого органа, то режим, в котором он находится, можно считать изотермическим.

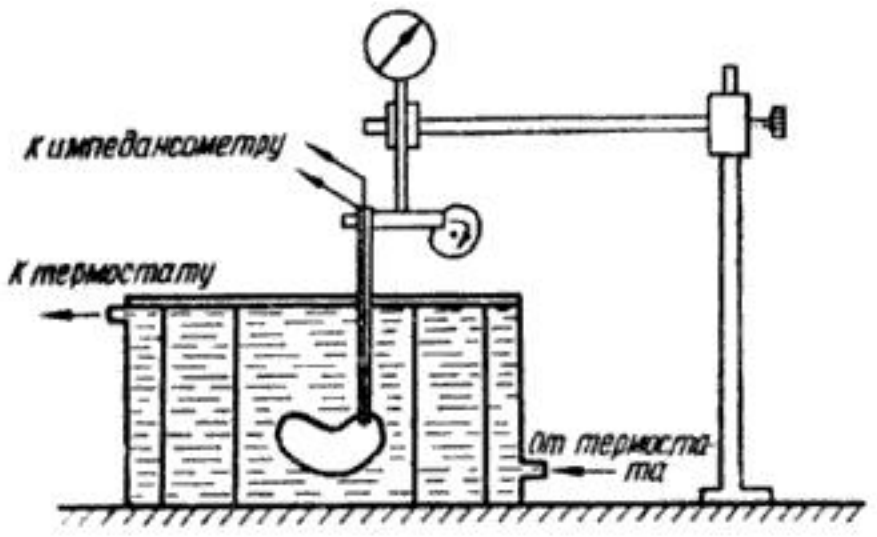


Рис. 1. Схема контейнера с игольчатым коаксиальным электродом.

В связи с тем что для проведения эксперимента применялись электроды двух типов — игольчатые коаксиальные [2] и плоскопараллельные — были разработаны контейнеры двух типов. Для плоских электродов применялся контейнер с полыми стенками, для циркуляции термостатирующей жидкости — соединенный трубками с ультратермостатом УТ-15. Исследуемый орган помещался между двумя плоскими электродами и находился в консервирующем растворе, температура которого поддерживалась с точностью ±0,05 К. Чтобы избежать поляризации электродов, применялись черненые платиновые электроды. Контейнер, в который вводился игольчатый коаксиальный электрод, показан на рис. 1. Для поддержания температуры в контейнерах с точностью ±0,05 К использовался описанный принцип термостабилизации с помощью демпфирующей водяной рубашки. Игольчатый электрод вводился в корковый слой органа с помощью кулачкового механизма. Глубина погружения электрода в корковый слой органа оценивалась с помощью индикатора часового типа с точностью 10^{-5} м.

Результаты и их обсуждение. С помощью описанной экспериментальной установки были проведены исследования на почках белых крыс, помещенных сразу после их изъятия у животного в термостатированный контейнер с консервирующим раствором. Установка позволяла производить исследования одновременно на двух почках. Были сняты зависимости импеданса Z и угла диэлектрических потерь φ на частотах 50 Гц—500 кГц в диапазоне температур консервирующего раствора от 4 до 37 °С от времени умирания *t*. Исследование электрических параметров Z и φ изолированных органов при их консервации в консервирующем растворе при постоянной температуре показало, что наиболее выражена их динамика при измерениях с помощью игольчатого электрода. Изменения Z происходят значительно заметнее, чем φ. На рис. 2 показаны зависимости импеданса Z почек белых крыс от

Матеріал, захищений авторським правом

времени их умирания t на частотах 500 Гц; 5, 50, 500 кГц при помещении почек в консервирующий раствор «Игла» при температурах 4 и 37 °С с помощью игольчатого коаксиального электрода. Кривые на рис. 2 получены усреднением результатов измерений на 20 почках, причем статистический разброс не превышает 4—5 %, что указывает на достижение необходимого уровня термостабилизации и идентичность процессов, приводящих к изменению импеданса и связанных, по-видимому, с перераспределением концентрации ионов в клетках и межклеточном секторе.

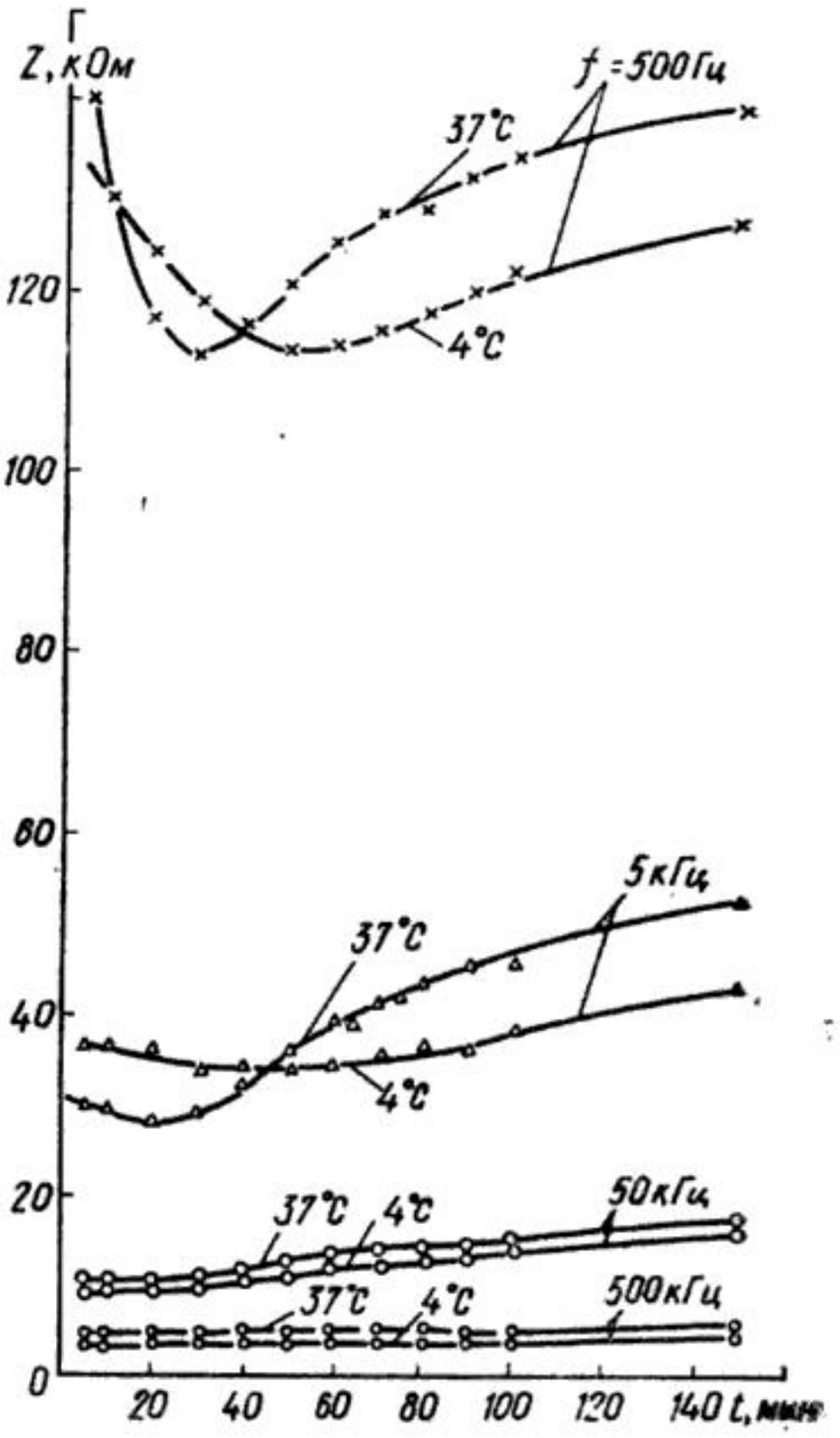


Рис. 2. Зависимости импеданса почек белых крыс от времени консервации.

Во всех случаях наблюдается общая черта в характере кривых: после изменений, обусловленных процессом теплообмена при помещении органа в термостатированный контейнер и изменениями, происходящими при умирании органов, электрические параметры стабилизируются. Через некоторое время электрические параметры вновь изменяются, однако это изменение мало выражено, затем снова наступает их стабилизация. Учитывая, что процессы теплообмена заканчиваются значительно раньше, чем происходит стабилизация электрических параметров, можно заключить, что через 1—3 мин после начала измерений ход кривых отражает структурные изменения, происходящие в изолированных органах при их умирании. Наибольшая динамика кривых отражает изменения, наступающие в первые периоды умирания, а последующая стабилизация электрических параметров свидетельствует о завершении наиболее выраженных структурных изменений, происходящих в первые периоды умирания изолированных органов. На приведенных кривых не наблюдается тенденция сближения высоко- и низкочастотного сопротивлений. Это объясняется тем, что мы исследовали лишь начальную стадию процесса деструкции, причем на этой стадии клеточная мембрана сохраняется, а следовательно, сохраняется и различие между высоко- и низкочастотным сопротивлениями. Последующие процессы, приводящие к разрушению клеточных мембран, действительно уменьшают низкочастотное сопротивление и приближают его к высокочастотному, монотонно возрастающему, однако авторы ставили задачу исследования органов в том состоянии, когда происходит значительное разрушение клеточных мембран. Наиболее интересным в динамике кривых в начальном периоде умирания является ниспадающий участок, причем знак производной может быть некоторым критерием обратимости этого процесса.

Таким образом, с помощью описанной экспериментальной установки были получены сравнительные характеристики изменения электрических параметров (Z и φ) в процессе консервации органа в различных растворах при разных температурах с помощью плоских и игольчатого коаксиального электродов.

Матеріал, захищений авторським правом

По динамике импеданса в низкочастотном диапазоне в процессе консервации органа в консервирующем растворе при постоянной температуре можно оценить наиболее выраженные изменения, происходящие в процессе консервации органа при фиксированной температуре. Наибольшая динамика наблюдается при применении игольчатого коаксиального электрода.

1. *Цыпин А. Б., Донскова Л. П., Гоциридзе О. А. и др.* Соотношение между динамикой электрических параметров и некоторыми функциональными и морфологическими нарушениями ишемизированных почек собак. — В кн.: Актуальные проблемы трансплантологии и искусственных органов. М., 1975, с. 200—204.
2. *Fourcade C., Chighier E. et al.* Application de l'impedance tissulaire à l'étude dela conservation de rein. — In: Unite de Recherche der d'INSERM, 1978, p. 133—138.

Всесоюз. заоч. машиностроит. ин-т, Москва
НИИ трансплантологии и искусств. органов
МЗ СССР, Москва

Получено 06.09.82

УДК 57.043:611.441.361.014.41:537.533.35

Т. П. Говоруха, Б. А. Скорняков, А. Ю. Петренко

УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПОСЛЕ ЭКВИЛИБРАЦИИ С ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДОМ (ДМСО)

Основной целью криоконсервирования щитовидной железы является использование ее для трансплантации, эффективность которой прежде всего связывают с сохранением структурных и функциональных показателей трансплантата [3, 5, 8].

Замораживание кусочков щитовидной железы до —196 °С показало, что в трансплантатах развиваются выраженные дистрофические изменения [2, 7]. В связи с этим использование глубокого охлаждения для долгосрочного хранения щитовидной железы без применения криопротекторов сомнительно. Вместе с тем характер действия криопротекторов на ультраструктуру клеток щитовидной железы изучен недостаточно. В связи с этим цель настоящего исследования — изучить ультраструктуру клеток щитовидной железы человека после эквилибрации с ДМСО различных концентраций на этапе подготовки к низкотемпературному консервированию.

Методика исследования. Материалом служили кусочки щитовидных желез, удаленных у больных тиреотоксикозом. Указанные кусочки щитовидной железы размерами 3×5 мм и массой 500—1000 мг инкубировали с исследуемым криопротектором ДМСО различной концентрации (7,5; 15; 30 %) при 37 °С. После отмывки криопротектора изучали йоднакопительную способность срезов толщиной 0,3—0,5 мм и массой 10—15 мг путем подсчета активности I^{131}, которую выражали в виде отношения захваченного изотопа к общему количеству внесенной метки (0,5 мС) (в процентах). Уровень включения C^{14}-аминокислот в суммарные белки срезов щитовидной железы выражали в импульсах за 1 мин. на 1 $мг^{-1}$ ткани.

Для электронно-микроскопических исследований кусочки щитовидной железы фиксировали в 5%-ном глутаровом альдегиде, постфиксировали в 2%-ном OsO_4, обезвоживали в ацетоне возрастающей концентрации и заливали в эпон-аралдитовую смесь. Полимеризация проводилась при +60 °С. Срезы, изготовленные на микротоме УМТП-3М, контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца по Рейнольдсу. Изучение ультраструктуры клеток проводили на микроскопе ЭМВ-100А при ускоряющем напряжении 75 кВ. Кроме качественной характеристики ультраструктуры тиреоцитов, определяли объемные отношения основных частей клеток и внутриклеточных органоидов (в процентах)

Матеріал, захищений авторським правом

с помощью сетки, имеющей 600 точек, по фотографиям, используя модифицированный метод Вайбеля [1].

Результаты и их обсуждение. В исходном состоянии фолликулярные клетки щитовидной железы образуют пласт эпителия, который характеризуется ядрами округлой формы, окруженными узким перинуклеарным пространством. Хроматин ядра конденсирован преимущественно вдоль внутренней мембраны ядерной оболочки. В центре ядра хроматин разрежен и расположен диффузно. Цитоплазма характеризуется неравномерно разреженной мелкодисперсной гиалоплазмой, в которой располагаются многочисленные узкие канальцы эндоплазматической сети. В некоторых клетках эндоплазматическая сеть представлена цистернами различной величины и пузырьковидными образованиями. Митохондрии — округлой или овальной формы, с гомогенным матриксом, в котором у части клеток обнаруживаются тонкие пластинчатые кристы. Однако у значительной части клеток кристы уголщены, неправильной формы. Отчетливо обнаруживается связь митохондрий с канальцами зернистой эндоплазматической сети. Сетчатый аппарат фолликулярных клеток характеризуется вакуолями и уплощенными цистернами. В цитоплазме обнаруживаются мелкие секреторные пузырьки и гранулы различной электронной плотности (рис. 1).

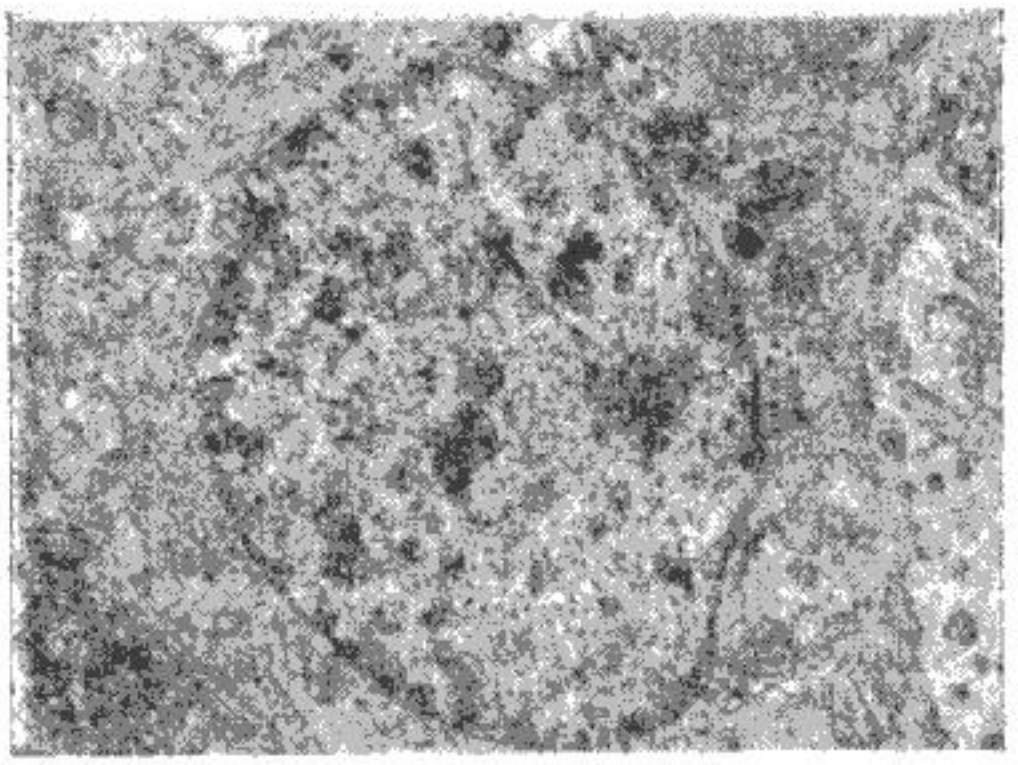


Рис. 1. Электронная микрофотография тиреоцита в исходном состоянии; ×23,5 тыс.

Объемные соотношения основных частей и органелл фолликулярных клеток щитовидной железы (в процентах) представлены в табл. 1,

Таблица 1. Объемные соотношения основных частей и органелл фолликулярных клеток щитовидной железы после инкубации с ДМСО, %, (n-10)

Условия опыта	$V_ц/V_к$	$V_я/V_к$	$V_я/V_ц$	$V_м/V_ц$	$V_э/V_ц$	$V_{пх}/V_я$
Исходное состояние	65,5±6,7	41,4±4,8	0,51±0,09	14,8±2,6	17,6±6,6	13,7±2,8
Инкубация с ДМСО:						
7,5%-ным	73,8±7,2	38,5±4,3	0,47±0,02	10,2±1,3*	11,3±4,8	16,5±5,5*
15%-ным	90,3±8,1*	29,2±3,6*	0,30±0,8*	8,6±0,64*	9,3±3,2*	28,4±6,7*
30%-ным	94,2±7,6*	26,5±4,1*	0,24±0,3*	6,3±0,67*	6,4±2,4*	31,3±7,2*

Примечание: $V_ц$ — объемы цитоплазмы; $V_к$ — клетки; $V_я$ — ядра; $V_м$ — митохондрий; $V_э$ — эндоплазматической сети; $V_{пх}$ — плотного хроматина. Звездочкой обозначены значимые различия ($p<0,005$) в сравнении с контролем.

где видно, что инкубация кусочков щитовидной железы с 7,5%-ным раствором ДМСО вызывает определенные изменения в ряде компонентов ультраструктуры фолликулярных клеток. Так, в ядрах фолликулярных клеток возрастает количество глыбчатых скоплений гетерохроматина, особенно на внутренней поверхности ядерной оболочки. Эта оболочка — с многочисленными выпячиваниями. В ряде клеток обнаруживается неравномерное расширение перинуклеарного пространства. Изменяется характер структуры цитоплазмы, в которой определяется преимущественно глобулярно-фибриллярная гиалоплазма. Эндоплазматическая сеть представлена в виде расширенных в различной сте-

Матеріал, захищений авторським правом

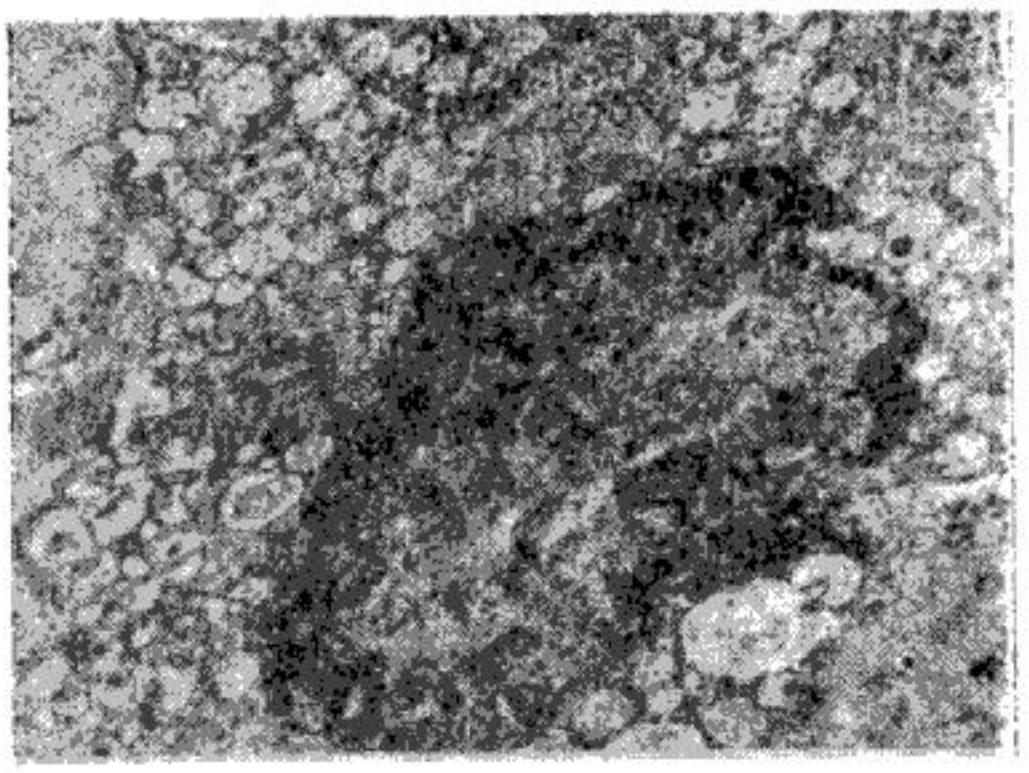


Рис. 2. Тиреоцит, инкубируемый в 7,5%-ном растворе ДМСО; ×23,5 тыс.

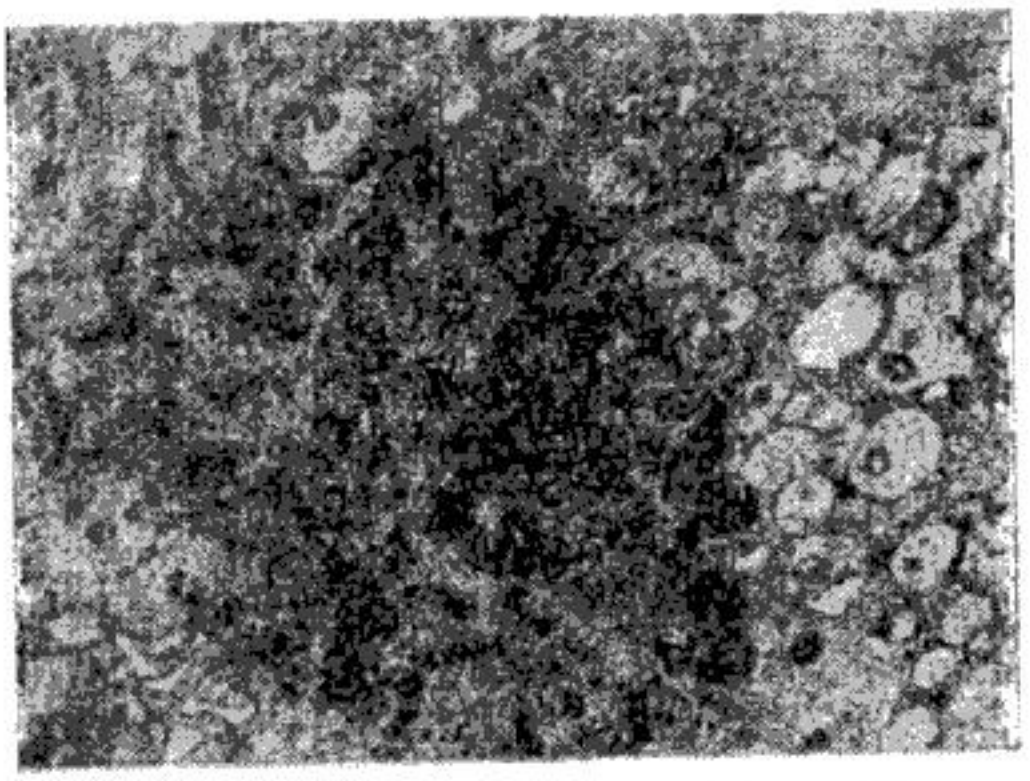


Рис. 3. Тиреоцит, инкубируемый в 15%-ном растворе ДМСО; ×23,5 тыс.

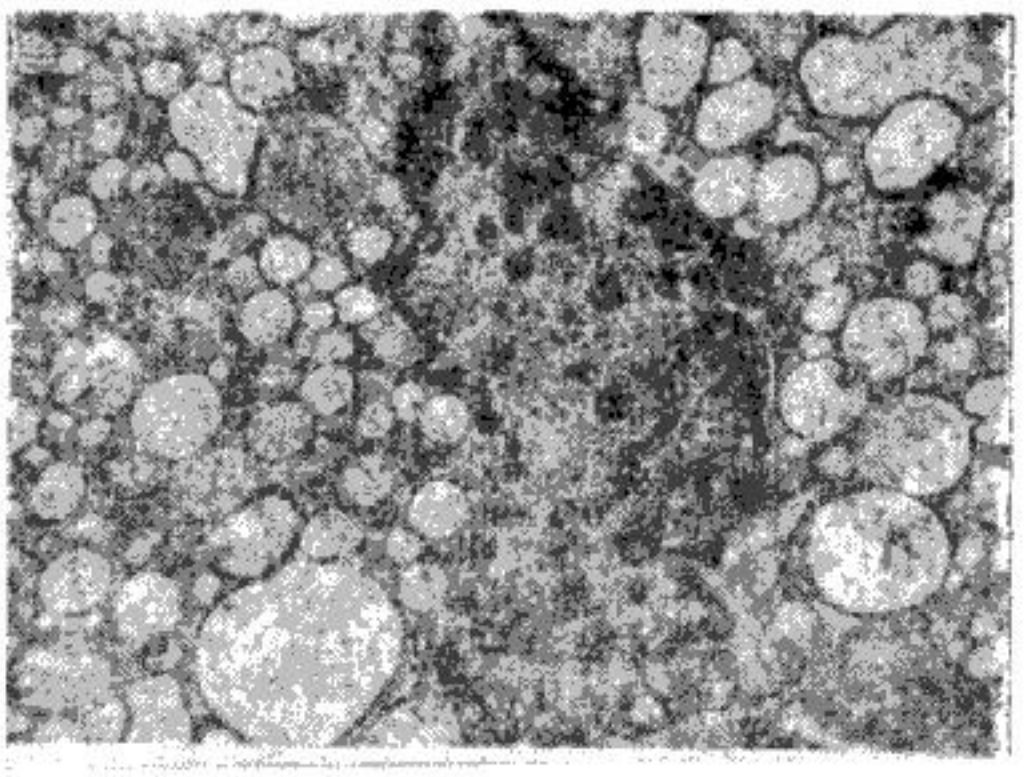


Рис. 4. Тиреоцит, инкубируемый в 30%-ном растворе ДМСО; ×23,5 тыс.

лени цистерн и вакуолей. Отчетливо выражены набухание митохондрий и снижение плотности митохондриального матрикса. У большей части клеток увеличивается количество митохондрий с разрушенными в различной степени кристами. Сетчатый аппарат характеризуется вакуолями с содержимым низкой электронной плотности (рис. 2).

После инкубации кусочков щитовидной железы с 15%-ным раствором ДМСО изменения ультраструктуры тиреоцитов подобны описанным выше, но выявляются в большем проценте клеток. Увеличивается количество плотного хроматина, который в виде скоплений занимает почти весь объем ядра. Ядерная оболочка имеет поверхностные и глубокие впячивания. Перинуклеарное пространство неравномерно расширено. Эндоплазматическая сеть содержит резко суженные канальцы в виде трубочек и расширенные, неправильной формы цистерны и вакуоли. В большинстве клеток наблюдается полная деструкция крист митохондрий (рис. 3).

После инкубации с 30%-ным раствором ДМСО указанные изменения проявляются в еще более выраженной форме. Одновременно с уменьшением объема ядра происходит увеличение количества компактного хроматина. Перинуклеарное пространство неравномерно расширено, причем в отдельных клетках наблюдается образование вакуолеобразных полостей. Набухание митохондрий сопровождается почти полной потерей крист. Обнаруживаются отдельные клетки со значительными повреждениями цитолеммы и выходом фрагментов цитоплазмы в коллоид фолликулов. Вместе с тем межклеточные контакты сохранены (рис. 4).

Анализ йодаккумулирующей активности срезов щитовидной железы как первого этапа внутритиреоидального гормоногенеза и уровень включения C^{14}-аминокислот в суммарные белки, представленный в табл. 2, показал, что ДМСО оказывает ингибирующее действие на йоднакопительную способность срезов щитовидной железы, причем степень ингибирования зависит от концентрации криопротектора и увеличивается по мере роста дозы препарата. Так, при использовании 30%-

Матеріал, захищений авторським правом

ной концентрации ДМСО уровень I^{131}-аккумуляции составил менее 70 % контроля. В то же время ДМСО в 7,5%- и 15%-ной концентрациях не оказывал значительного влияния на белоксинтезирующую способность щитовидной железы человека.

Таким образом, результаты исследования показывают, что изменения ультраструктуры фолликулярных клеток щитовидной железы при инкубации с растворами ДМСО соответствуют изменениям структуры, описанным в литературе по отношению к клеткам других тканей [4, 6]. Наблюдаемые изменения связывают в основном с дегидратирующим действием криопротектора, а также с изменением содержания электролитов в ядре и цитоплазме. Следует отметить, что межклеточные контакты в пласте фолликулярного эпителия и тесный контакт коллоида с апикальной поверхностью тиреоцитов сохраняются. Инкубация щитовидной железы с ДМСО различной концентрации обусловливает однонаправленный характер изменений ультраструктуры тиреоцитов. ДМСО с концентрацией 7,5 % обеспечивает наименьшие изменения в ультраструктуре клеток щитовидной железы.

Таблица 2. Влияние различных концентраций ДМСО на йоднакопительную способность и уровень включения C^{14}-аминокислот в суммарные белки срезов щитовидной железы человека

Концентрация криопротектора, %	Аккумуляция I^{131}, имп/мин$^{-1}$ ткани	Синтез белка, имп/мин$^{-1}$·мг$^{-1}$ ткани
0	0,173±0,020	938,5±12,4
7,5	0,154±0,008	958,4±17,3
15	0,117±0,004*	973,0±11,1
30	0,109±0,015*	—

* Достоверно по отношению к контролю.

1. *Автандилов Г. Г.* Морфометрия в патологии. — М.: Медицина, 1973. — 248 с.
2. *Беличенко Л. И., Яролова П. В.* О жизнеспособности свободных гомотрансплантатов щитовидной железы, консервированной глубоким замораживанием. — Ортопедия, 1969, вып. 5, с. 195—198.
3. *Брук Г. З.* Низкотемпературное консервирование и трансплантация щитовидной железы в эксперименте: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Харьков, 1975. — 12 с.
4. *Пушкарь Н. С., Капрельянц А. С., Панков Е. Я.* Ультраструктура клетки при низких температурах. — Киев: Наук. думка, 1978. — 139 с.
5. *Пушкарь Н. С., Чуйко В. А., Утевский А. М., Цариковская Н. Г.* Консервация и трансплантация эндокринных органов и тканей. — Харьков, 1981. — 36 с.
6. *Пушкарь Н. С., Цариковская Н. Г., Чуйко В. А.* Низкотемпературное консервирование и аутоимплантация щитовидной железы человека. — В кн.: Актуальные проблемы криобиологии. Киев: Наук. думка, 1981, с. 344—404.
7. *Сенников Б. А.* Консервирование и трансплантация щитовидной и паращитовидной желез в эксперименте. — В кн.: XXII науч. сес., посвящ. 50-летию Велик. Окт. соц. революции. Оренбург, 1967, с. 52—55.
8. *Шенберг М. Г.* Морфологическое исследование криоконсервированных трансплантатов щитовидной железы. — Криобиология и криомедицина, 1976, вып. 4, с. 75—77.

Ин-т пробл. криобиологии и криомедицины АН УССР, Харьков Получено 10.09.82

УДК 57.043.616.61.014.41

В. М. Куракса, М. Б. Милешкин, В. К. Дворцевой

СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕХАНИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ОРГАНА В ПРОЦЕССЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

Одними из основных факторов, ответственных за повреждение органа в процессе криоконсервации, являются возникновение и развитие в затвердевшей ткани органа микро- и макротрещин. Такие трещины, как микро- и макроразрывы ткани и сосудов органа, наблюдались чисто визуально [5] и под микроскопом на образцах замороженной ткани [2].

В свою очередь, Рубинский и Кравалхо [6, 7] теоретически доказали, что при замораживании и отогреве, даже если рассматривать ор-

Матеріал, захищений авторським правом

ган в приближении сферы из гомогенного биологического материала и не учитывать изменения объема при фазовом переходе вода — лед, в нем возникают значительные механические напряжения уже только из-за наличия градиента температуры между периферией и центром органа.

Эти термомеханические напряжения тем значительнее, чем больше размеры органа и разность температур на поверхности и в центре. Они ведут к деформации органа, а при превышении предела прочности — к появлению трещин (разрывов) в нем.

Таким образом, теоретически понятен механизм возникновения механических напряжений, приводящих к появлению разрывов в органе. Ясен и путь, по которому нужно идти, чтобы избежать таких повреждений. Это поиск оптимальных режимов замораживания и отогрева органа, позволяющих сохранить его целостность. Подобрать такие режимы, пользуясь чисто морфологическими оценками, затруднительно. Общим и существенным в данном случае недостатком морфологических методов оценки повреждений органа является то, что они могут дать лишь интегральную информацию о повреждении органа после полного цикла замораживания — отогрева. В то же время только детальная информация о температуре и времени возникновения повреждений может указать надежный путь подбора оптимальных режимов криоконсервирования. В данном случае для получения мгновенной информации о повреждении органа может быть использован метод неразрушающего контроля, применяемый в материаловедении, — метод акустической эмиссии (АЭ).

Основной предпосылкой применения этого метода послужил твердо установленный факт: при возникновении и развитии в материалах различной природы микро- и макротрещин происходит динамическая разгрузка напряженного материала, сопровождающаяся звуковым излучением в ультразвуковом, а подчас и слышимом диапазоне волн [1, 3, 4]. При этом по параметрам излучения интенсивности и активности можно судить о степени возникших повреждений. Под активностью понимают общее число импульсов АЭ, зарегистрированных при деформации и разрушении материалов N_Σ, а под интенсивностью — изменение активности АЭ в единицу времени $\dot{N}_\Sigma$. Чем больше энергия первоначальной деформации материала, тем значительнее энергия, выделяемая при динамической разгрузке материала в момент возникновения трещин, и больше интенсивность акустической эмиссии.

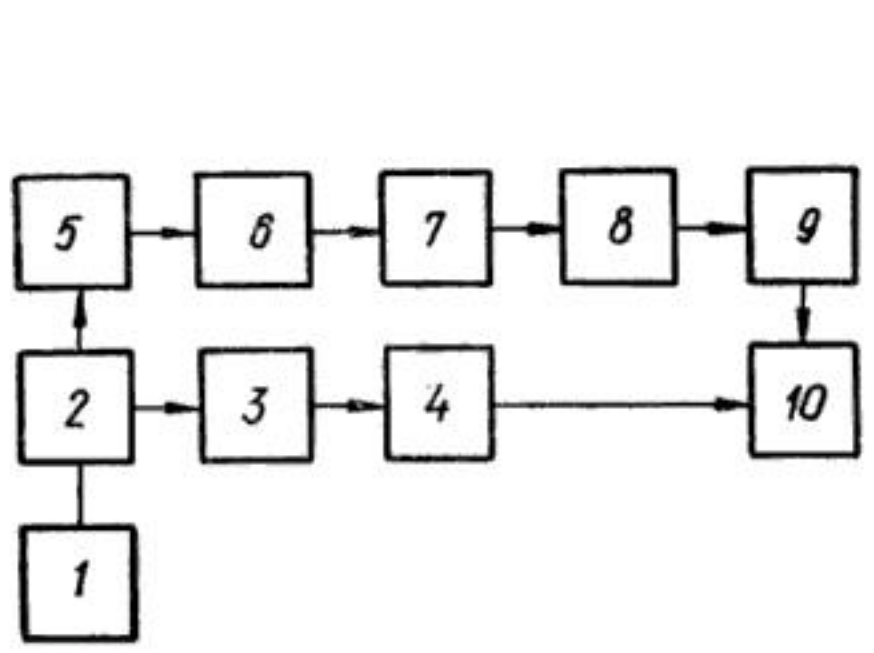
В связи с изложенным выше цель настоящей работы — попытка зарегистрировать сигналы АЭ при возникновении в органе микро- и макроразрывов в процессе криоконсервации.

Материалы и методы. Для достижения поставленной цели была создана специальная установка, позволяющая регистрировать ультразвуковое излучение, сопровождающее возникновение в органе микро- и макроразрывов, в динамике процесса криоконсервации. В качестве объекта исследования использовались почки кролика, перфузированные раствором пропиленгликоля на какодилатном буфере в концентрации 10, 30 и 60 %, а также почки, не защищенные криопротектором. Замораживание почек осуществлялось в специальном контейнере в бензиновой бане до конечных температур от —90 до —112 °С. При этом до начала замораживания в почку для обеспечения лучшего теплового контакта на глубину 1—1,5 мм вводили дифференциальную термопару, обеспечивающую измерение температуры, а поверхность приводили в контакт со звуководом, передающим ультразвуковые колебания от органа к измерительному преобразователю. Применение звуковода обеспечивает необходимую развязку между низкой и комнатной температурами и позволяет сохранять температуру датчика не ниже +10 °С при самых длительных измерениях. После этого контейнер с почкой погружают в бензиновую баню при температуре от —100 до —112 °С и регистрируют температуру органа, время от начала замораживания

Матеріал, захищений авторським правом

и ультразвуковые колебания, сопровождающие процесс возникновения и развития микро- и макроразрывов.

На рис. 1 показана схема регистрирующей аппаратуры, с помощью которой фиксируются температура и число входных ультразвуковых импульсов, сопровождающих возникновение и развитие в органе микро- и макротрещин. В устройстве *1* охлаждают орган *2*. Термопара *3* из-



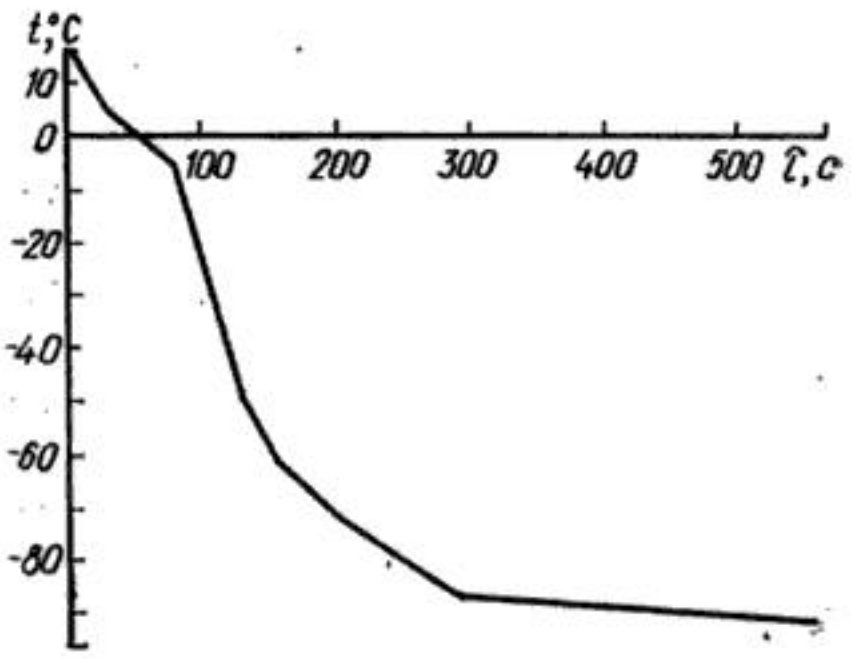


Рис. 1. Функциональная схема регистрирующей аппаратуры.

Рис. 2. Термограмма охлаждения органа.

меряет температуру органа. Сигнал с термопары *3* усиливается в усилителе *4*.

При образовании и развитии в органе разрывов возникает ультразвуковое излучение, которое через звуковод *5* передается измерительному преобразователю *6*, напряжение с преобразователя *6* подается по экранированному кабелю на вход предусилителя *7*, где происходят усиление, фильтрация и детектирование сигнала. Предусилитель *7* обеспечивает усиление сигнала на 60 дБ в полосе частот, соответствующей резонансной частоте измерительного преобразователя. С предусилителя *7* сигнал через усилитель видеоимпульсов *8* подается на блок измерения числа входных сигналов *9*. Блок *9* состоит из последовательно соединенных компаратора с регулируемым порогом срабатывания, формирователя нормированных импульсов, усредняющего усилителя и устройства ограничения. Он обеспечивает преобразование входной последовательности импульсов в меняющееся с постоянной времени $\tau = 0{,}1$ с напряжение, уровень которого пропорционален числу входных сигналов за единицу времени. С блока *9* сигнал подается на самописец *10*, на котором записываются температура органа и число входных ультразвуковых импульсов, сопровождающих возникновение и развитие в органе микро- и макротрещин.

Результаты и их обсуждение. Типичная термограмма охлаждения органа приведена на рис. 2, где видно, что скорость охлаждения поверхности органа непостоянна и зависит от текущей температуры. Пользуясь термограммой и записью изменения суммарного количества входных ультразвуковых сигналов за единицу времени $\dot{N}_\Sigma$ имп/с, полученной на самописце и характеризующей ультразвуковое излучение, сопровождающее повреждение органа, строим зависимость N_Σ от температуры (интенсивность акустической эмиссии).

На рис. 3 показана зависимость интенсивности акустической эмиссии от текущей температуры для почки кролика, замороженной без защиты криопротектора. Конечная температура замораживания органа —95 °С. На рис. 3 видно, что сигналы акустической эмиссии переменной интенсивности возникают вблизи 0 °С и имеют почти непрерывный характер во всей области отрицательных температур вплоть до —86 °С, а затем приобретают устойчивый дискретный характер. На рис. 4 приведена зависимость интенсивности АЭ от температуры для почки кролика, перфузированной 10%-ным раствором пропиленгликоля на ка-

Матеріал, захищений авторським правом

кодилатном буфере. Конечная температура замораживания органа —97 °С.

При сравнении рис. 3 и 4 видно резкое изменение характера зависимости $\dot{N}_\Sigma$ от температуры. При замораживании почки под защитой криопротектора зависимость $\dot{N}_\Sigma$ от температуры приобретает выраженный дискретный характер. Первое повреждение органа под влиянием

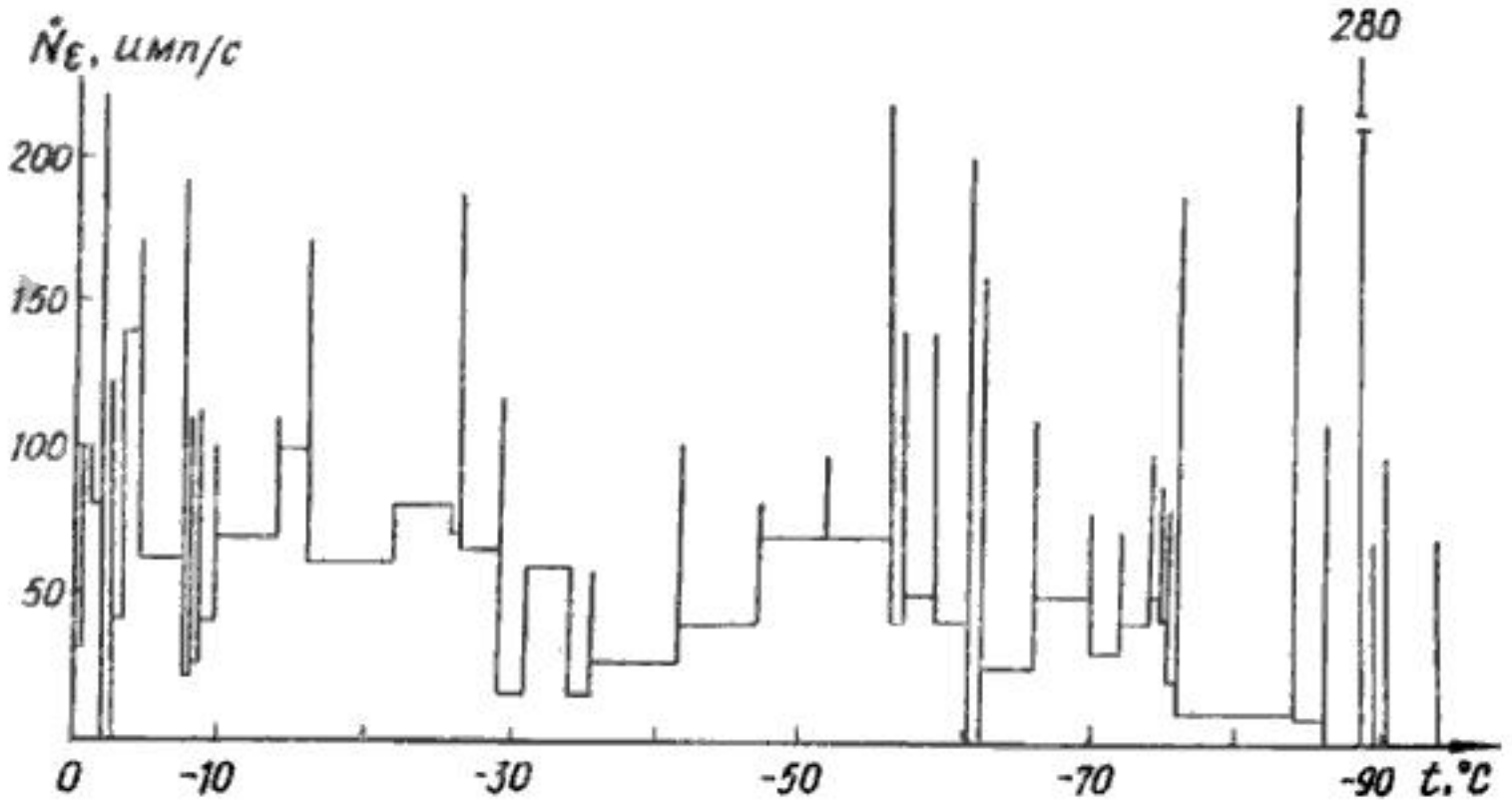


Рис. 3. Зависимость интенсивности АЭ от температуры при охлаждении органа, не защищенного криопротектором.

термомеханических напряжений и отвечающее ему ультразвуковое излучение с $\dot{N}_\Sigma = 30$ имп/с возникают только при температуре —36 °С, что уже указывает на снижение температуры начального повреждения почки почти на 37 °С. Собственно значительное механическое повреждение с $\dot{N}_\Sigma = 240$ имп/с возникает лишь при температуре —69 °С; при температурах от комнатной до —75 °С возникают только отдельные повре-

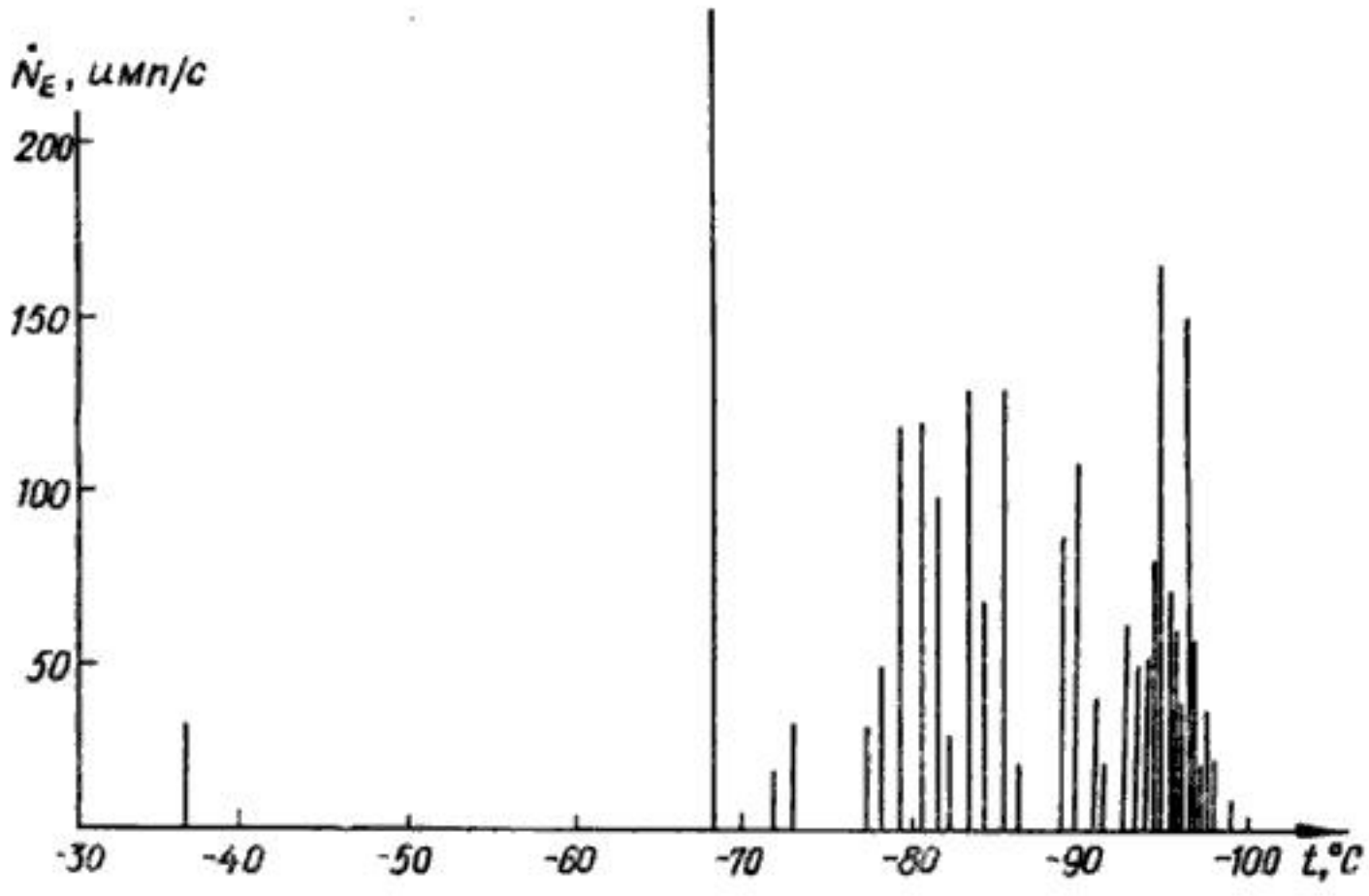


Рис. 4. Зависимость интенсивности АЭ от температуры при охлаждении органа, перфузированного 10%-ным раствором пропиленгликоля.

ждения, разделенные значительным временным и температурным интервалами. Областью наиболее значительных повреждений можно считать область от —78 до —97 °С.

При увеличении концентрации криопротектора, которым перфузировали почку, до 30 % сигналы АЭ не возникали до температуры —87 °С (рис. 5). Интенсивность акустической эмиссии при этом составила всего 10 имп/с и до температуры —100 °С сигналов больше не

Матеріал, захищений авторським правом

возникало. Тогда в ходе эксперимента температура органа была понижена до —112 °С. Только после этого при температурах от 100 до —112 °С появились значительные дискретные импульсы АЭ. Интенсивность АЭ для отдельных импульсов достигала значений 340—360 имп/с в указанном интервале температур. Таким образом, и в этом случае

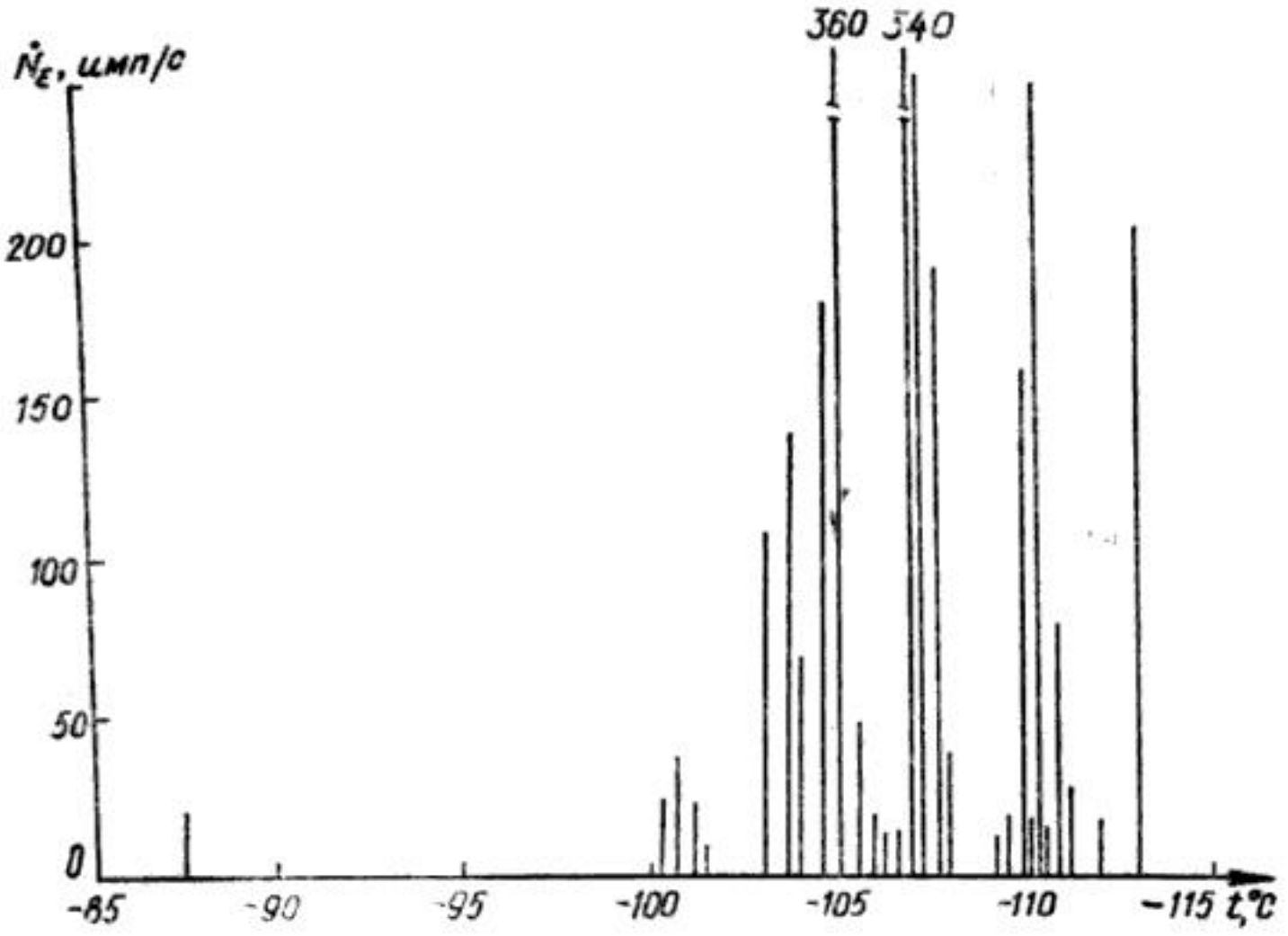


Рис. 5. Зависимость интенсивности АЭ от температуры при охлаждении органа, перфузированного 30%-ным раствором пропиленгликоля.

при повышении концентрации криопротектора температура возникновения механических повреждений сдвигалась в область низких температур.

В следующем опыте, когда концентрация криопротектора, которым перфузировали почку перед замораживанием, была поднята до 60 %, сигналы АЭ не возникали вообще до температуры —112 °С. Таким образом, на основании проделанных экспериментов можно сделать следующие выводы.

1. Впервые при замораживании почки зарегистрированы сигналы АЭ, свидетельствующие о возникновении в органе при замораживании механических повреждений. 2. Наглядным сравнением результатов измерения АЭ при замораживании почки показана роль криопротектора в защите органа от механических повреждений в процессе криоконсервации. 3. Предложен, на наш взгляд, эффективный способ контроля, позволяющий определять температуру возникновения повреждений в органе в динамике процесса криоконсервации. Это в принципе дает возможность разработать оптимальные режимы замораживания.

1. *Авербух И. И., Вайнберг В. Е.* Области применения ультразвуковой эмиссии. — Дефектоскопия, 1972, № 4, с. 49—54.
2. *Берченко О. Г.* Структурно-функциональные исследования ткани печени после замораживания—оттаивания. — В кн.: Вопросы криоконсервирования биологических объектов. Киев : Наук. думка, 1978, с. 6—8.
3. *Грешников В. А., Дробот Ю. Б.* Акустическая эмиссия : Применение для испытаний материалов и изделий. — М. : Изд-во стандартов, 1976. — 272 с.
4. *Финкель В. М., Черный В. В., Головин Ю. И.* Акустическая эмиссия ветвящейся трещины. — В кн.: Вопросы металловедения и физики металлов. Тула : Тул. политехн. ин-т, 1972, с. 140—144.
5. *Carrow G.* Organ preservation for transplantation. — Boston, 1974. — 240 p.
6. *Rubinsky B., Cravalho E. G., Borivoje M.* Thermal stresses in frozen organs. — Cryobiology, 1980, 17, p. 66—77.
7. *Rubinsky B., Cravalho E. G.* Analysis for the temperatures distribution during the thawing and frozen biological organ. — In: Pres. 18th nat. heat tranns. Conf. ASChE, San Diego, Calif., 1979, Aug. 5—8.

Ин-т проблем криобиологии и криомедицины АН УССР, Харьков
Ин-т пробл. машиностроения АН УССР, Харьков

Получено 10.11.82

Матеріал, захищений авторським правом

III. КРИОМЕДИЦИНА

УДК 57.043.616—001.17:615.832.9

В. Г. Тимченко, Л. И. Симонова, В. З. Гертман, Н. В. Чубяк

О ПОЛОЖИТЕЛЬНОМ ВЛИЯНИИ КРИОТЕРАПИИ ОЖОГОВ НА СИСТЕМУ СВЕРТЫВАНИЯ И ПРОТЕОЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ КРОВИ

В патогенезе ожоговой болезни немаловажное значение имеют нарушения микроциркуляции, одной из причин которых является повышение коагуляционного потенциала крови. Последний обусловлен избыточным поступлением в кровоток активатора свертывания крови — тканевого и клеточного тромбопластина, высвобождающегося из пораженных тканей и клеток крови. Вместе с активаторами свертывания крови из тканей, клеток крови и сосудов выходят активаторы фибринолитического процесса, но доминирует всегда тромбопластин, так как он намного устойчивее и сохраняет высокую активность при смешивании и разведении крови.

В современном комплексе лечения ожогов значительное место отводится криотерапии. По последним данным применение этого метода благоприятно сказывается на заживлении ран в результате улучшения сосудисто-тканевой циркуляции в зоне повреждения, сохранения тканевых и клеточных окислительно-восстановительных ферментов и уменьшения степени деструкции подлежащих тканей [1, 2, 4, 5].

В связи с этим задачей проведенной работы было изучение состояния свертывающей системы и протеолитической активности крови при проведении криотерапии ожогов с целью оценки данного терапевтического мероприятия на коагуляционный потенциал крови при ожоговой травме.

Материалы и методы. В эксперименте (200 крыс линии Вистар массой 150—200 г) животным наносили ожог пламенем ЗБ-4 степени на 7—8 % поверхности тела. Криотерапию проводили спустя 2—3 ч после травмы путем охлаждения ожоговой раны жидким азотом на расстоянии 15—20 см от поврежденной поверхности в течение 1—2 мин. Кровь для исследования брали на 1, 3, 7, 14, 21, 30, 45, 60 сут после повреждения и проводимой криотерапии. О состоянии свертывающей системы судили по данным тромбоэластограммы (ТЭГ), полученной на аппарате «Тромб-2». При расшифровке ТЭГ использовали показатели R, K, S, t, T, E, α°, J, ma, а также следующие индексы: $ma/R+k$ — индекс гиперкоагуляции: ИТП — тромбодинамического потенциала. Протеолитическая активность крови изучалась по степени расщепления бензоил-Д-α-аргининпаранитроанилида по В. А. Шатерникову [8].

Результаты исследований. Полученные данные (рис. 1—4) показали, что после ожоговой травмы на протяжении 1—60 сут наблюдалось значительное снижение значений показателей ТЭГ: R, S, T на 91, 49, 75 % соответственно по отношению к исходному уровню. Значения показателей K, t резко колебались в одну и другую сторону от исходного уровня. Показатели E, ma, J, α°, $ma/R+k$ и ИТП в период 3—30 сут повышались на 107, 77, 280, 172, 376, 159 % исходного уровня.

После проведенной криотерапии значения показателя R на протяжении 1—60 сут снижались всего на 72 %, в то время как значения показателей S и T на 16—30 % на 1—3 сут, затем в период 7—21 сут наблюдалось повышение их значений на 28—10 %, после чего вновь

Матеріал, захищений авторським правом

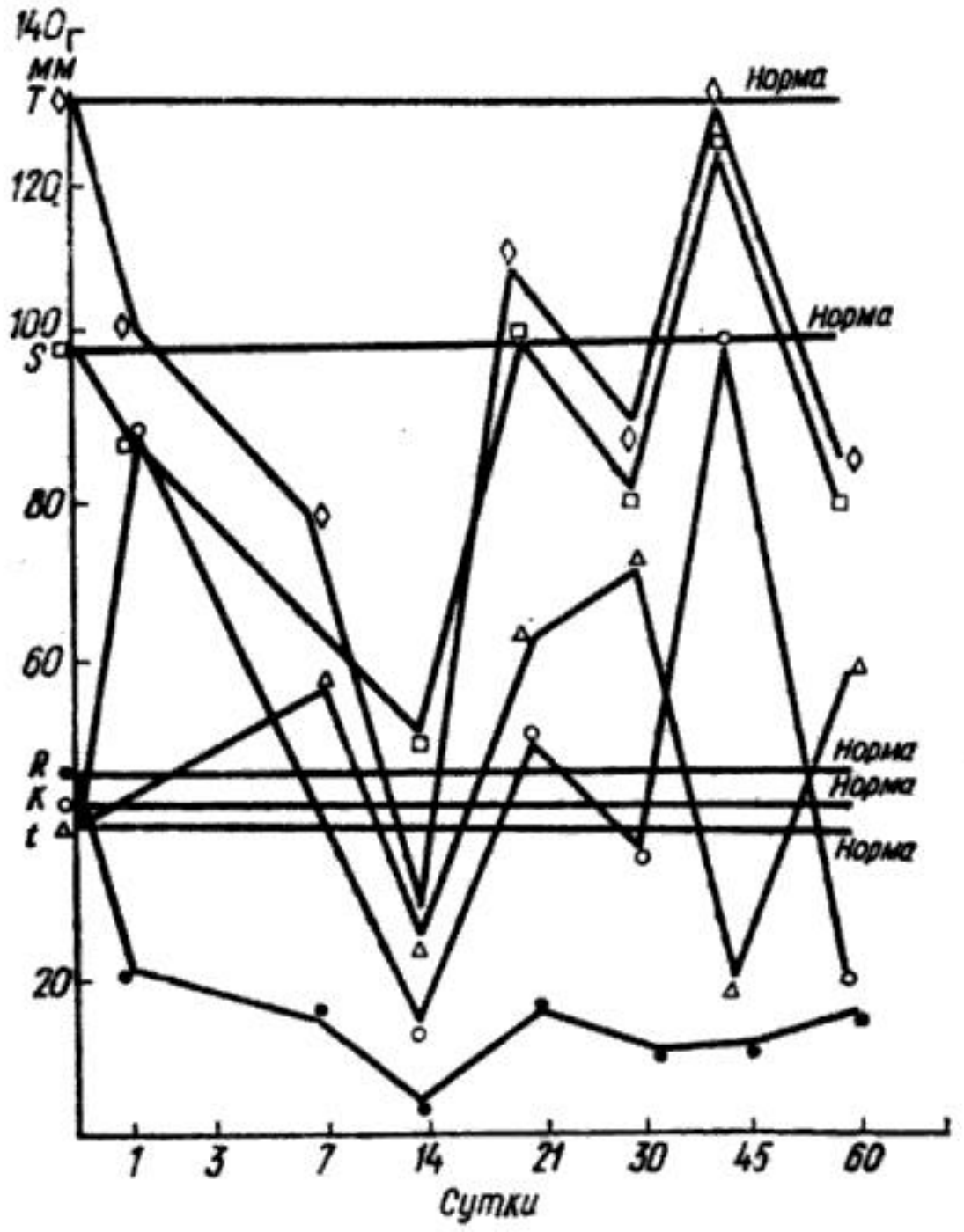


Рис. 1. Показатели (*R*, *K*, *S*, *T*, *t*) тромбоэластограммы у обожженных животных.

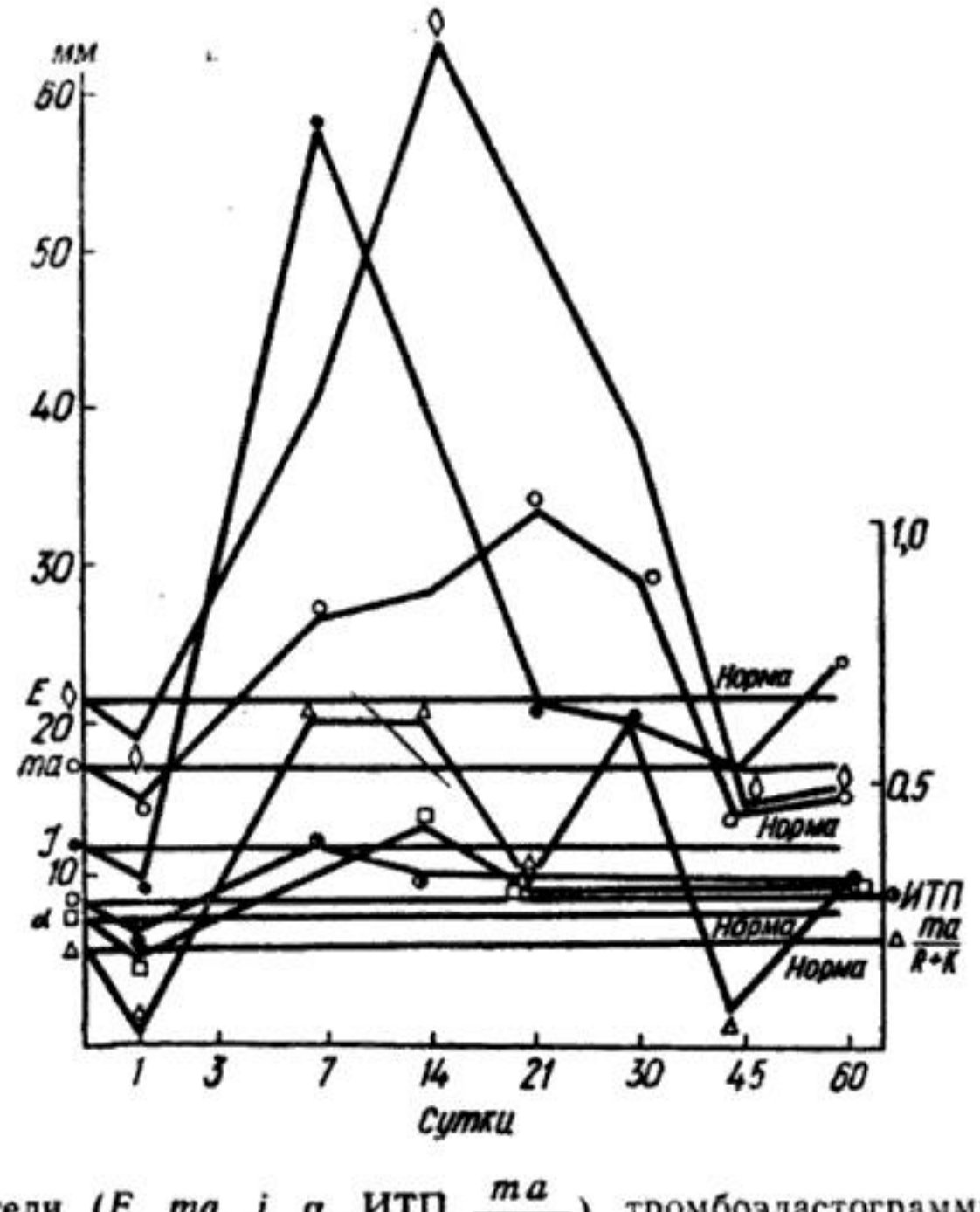


Рис. 2. Показатели (E, ma, j, α, ИТП, $\frac{ma}{R+k}$) тромбоэластограммы у обожженных животных.

наступало их снижение на 29—19 % исходного уровня. Показатели K и t с 1—21 сут устойчиво повышались на 116 и 68 % соответственно по отношению к исходному уровню. Увеличение показателей E, ma, J, $\alpha°$, $ma/R+k$ и ИТП после криовоздействия наблюдалось в меньшей степени, чем при ожоге без лечения.

Матеріал, захищений авторським правом

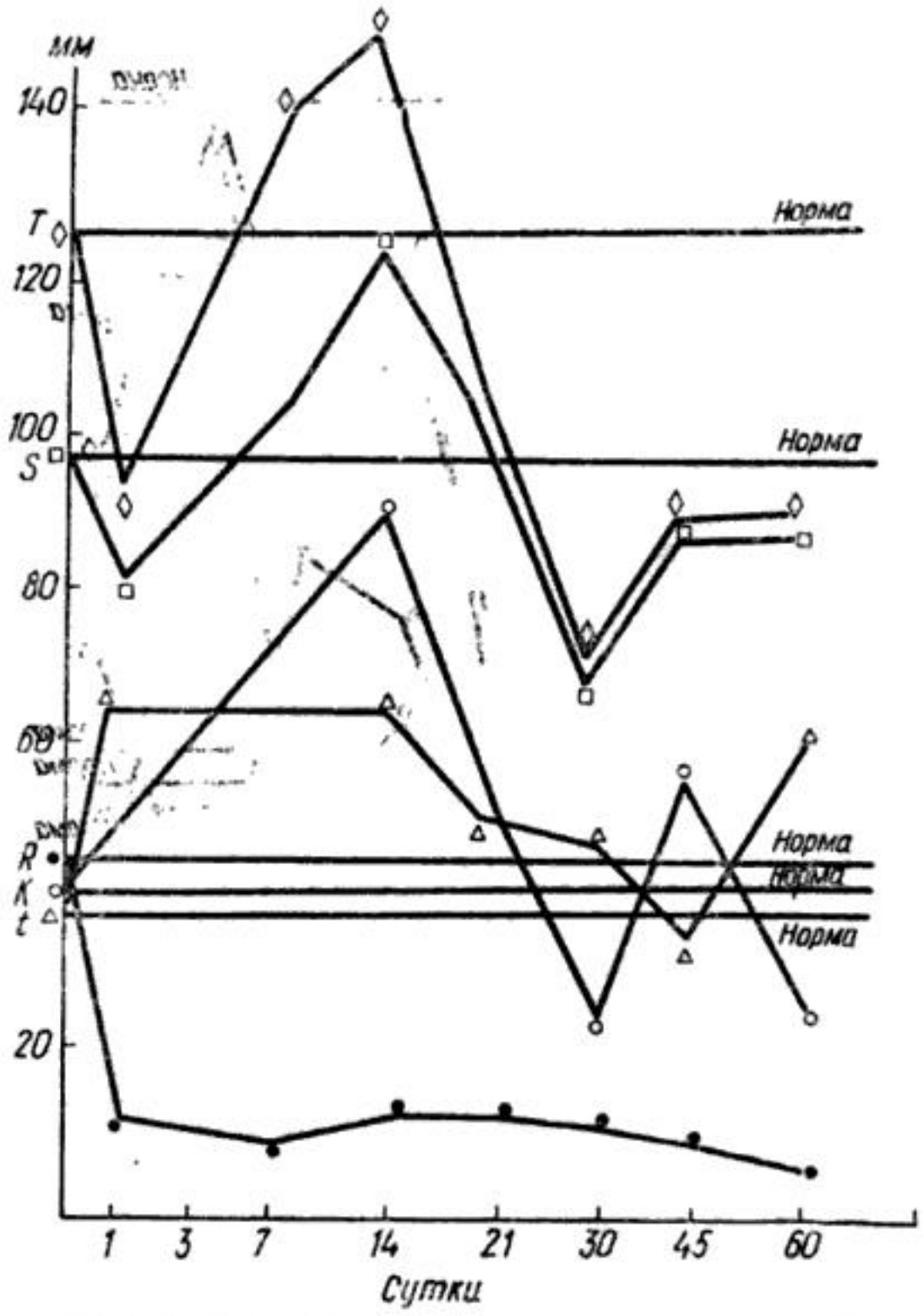


Рис. 3. Показатели (*R*, *K*, *S*, *T*, *t*) тромбоэластограммы у обожженных животных, леченных криовоздействием.

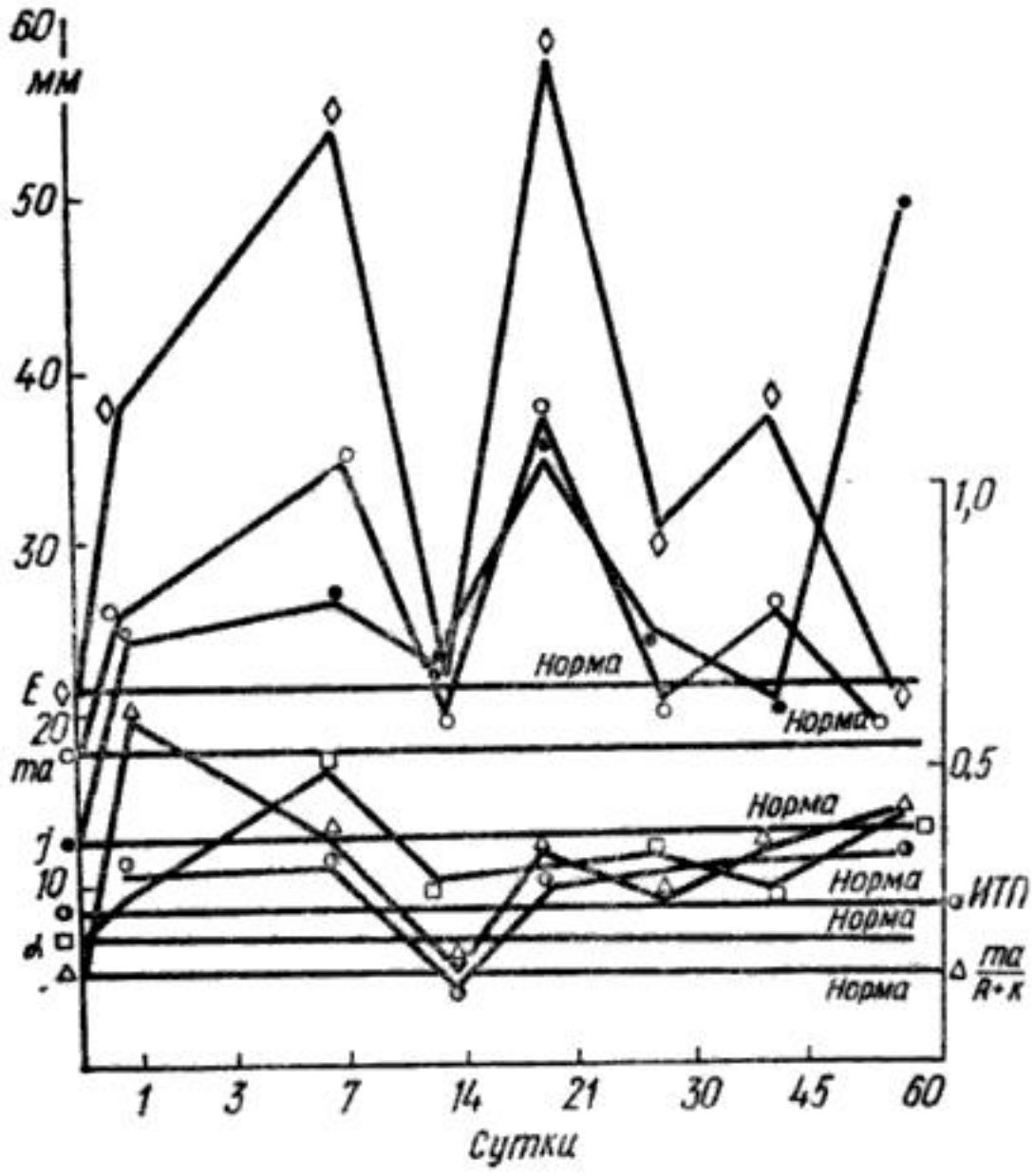


Рис. 4. Показатели (E, ma, j, α, ИТП, $\frac{ma}{R+k}$) тромбоэластограммы у обожженных животных, леченных криовоздействием.

Сравнение показателей ТЭГ в группе животных с нелеченым ожогом и при лечении криовоздействием выявило достоверные различия между значениями большинства основных показателей ТЭГ в период

Матеріал, захищений авторським правом

Динамика протеолитической активности плазмы крови (мЕД активности трипсина) у животных с ожогом при использовании криолечения

Группа	Сутки							
	1	3	7	14	21	30	45	60
Интактная	3,1±0,4							
Ожог 3Б-4 степени 7—8 % тела	2,5±0,5	3,1±0,7	4,35±0,3	4,65±0,4	3,2±0,3	3,8±0,5	4,0±0,9	3,4±0,6
Процент к норме	80	100	140	150	103	122	129	109
Ожог с криолечением	5,6±0,7	5,01±0,4	7,4±0,9	6,0±0,85	6,1±0,4	3,1±0,5	3,7±0,5	2,9±0,6
Процент к норме	181*	161*	240*	193*	197	100	119	94

* $p<0,05$ по отношению к интактной группе и группе «ожог».

7—21 сут. Протеолитическая активность крови после ожоговой травмы (см. таблицу) в первые сутки снижалась на 20 %, после чего наблюдалось ее повышение, максимальное на 40—50 % исходного уровня, в течение второй недели заболевания. Криотерапия вызывала резкий подъем протеолитической активности крови на протяжении 1—21 сут после воздействия — на 80—140 % исходного уровня. К 30-м сут значение показателя резко снижалось, но не достигало исходного уровня.

Обсуждение полученных данных. Результаты проведенных исследований показали, что при ожоге значительно ускорены I, II и III фазы свертывания крови (показатели R и K, индекс ИТП), по-видимому, обусловленные избыточным поступлением тромбопластина и тромбина из разрушенных тканей. Начало III фазы свертывания крови, характеризующееся выпадением нитей фибрина (показатель K — мера скорости образования тромба), у обожженных животных наступает в два раза быстрее, чем у интактных. Кроме того, биологическая константа синерезиса и тотального свертывания тромба (показатели S и T) у опытных животных снижены в два раза в период 1—45 сут, т. е. процессы образования, уплотнения и организации тромба после ожоговой травмы идут в два раза быстрее, чем в норме.

Увеличение в 2,5—4 раза индексов коагуляции (J и $ma/R+k$) свидетельствует о высокой степени гиперкоагуляционных процессов в крови обожженных животных.

Необходимо также отметить, что после ожоговой травмы наступает полнейшая разбалансировка в каскаде ферментных процессов, осуществляющих свертывание крови, на протяжении 1—60 сут после нанесения травмы. Об этом мы судили по динамике показателей ТЭГ. Так, в норме увеличение значений одних показателей ТЭГ компенсируется снижением других, в то время как после ожоговой травмы сопряженность процессов не выражена. Кроме того, за период 1—60 сут после ожога значения показателей ТЭГ резко отклоняются от исходного уровня (увеличиваются или уменьшаются) в 2—3 раза, что может свидетельствовать о тяжелых нарушениях в свертывающей системе крови и плохо переносится организмом, т. е. возможен срыв адаптации в этой системе.

После проведенной криотерапии на протяжении 1—21 сут можно отметить направленность к стабилизации процессов в фазах свертывания крови, компенсаторная разнонаправленность их более выражена, т. е. отмечается тенденция к уравновешиванию процессов в системе гемостаза. Так, с одной стороны, наблюдали уменьшение значения показателя R, а с другой — увеличение значений показателей K и t.

Матеріал, захищений авторським правом

Кроме того, к положительному влиянию криотерапии на свертывающую систему крови надо отнести меньшую степень увеличения индексов коагуляции, чем при ожоге без лечения (индекс гиперкоагуляции $ma/R+k$ увеличен в пять раз, а общий индекс коагуляции I в четыре раза при ожоге без лечения, а при криотерапии они повышены только в 2 и 1,5 раза соответственно). Помимо этого криовоздействие на ожоговую рану снимало зигзагообразность кривых для показателей ТЭГ, не отмечалось резких колебаний их значений, как при ожоге без лечения. После криотерапии ожоговой раны мы наблюдали резкое повышение (на 140 % исходного уровня) протеолитической активности крови на протяжении 1—21 сут после травмы. В данном случае мы допускаем возможность того, что подъем уровня активности протеолитических ферментов в результате криовоздействия мог сыграть положительную роль в изменении коагулологических свойств крови. При использовании в качестве субстрата БАПНА определяется суммарная протеолитическая активность группы ферментов, участвующих в процессах свертывания крови, фибринолиза и активации калликреин-кининовой системы [3, 6, 8].

Полученные нами результаты, очевидно, можно объяснить преимущественными сдвигами в содержании протеолитических ферментов, определяющих коагулолизисный потенциал. Это предположение подтверждается полученной в наших исследованиях положительной динамикой ТЭГ леченых животных, а также данными о нормализации процессов микроциркуляции, уменьшении сосудистой проницаемости и отеков в результате криовоздействия [5], механизм возникновения которых тесно связан с уровнем протеолитических ферментов, относящихся к калликреиновой группе [3].

Таким образом, ожоговая травма вызывает резкие сдвиги в системе гемостаза в сторону гиперкоагуляции на фоне определенного повышения протеолитической активности крови на протяжении 1—60 сут после травмы.

Криотерапия ожоговой раны оказывает положительное влияние на коагулолизисную систему, что проявляется в снижении степени гиперкоагуляции, а также в большей сбалансированности каскада ферментных процессов.

Применение криоаппликаций для лечения ожогов приводит к временной резкой активации протеолитической системы крови, что может быть расценено как непосредственная причина описанных положительных сдвигов в системе гемостаза.

1. *Берлин Л. Б.* Изменения кожи после термических ожогов. — Ортопедия и травматология, 1965, № 2, с. 75—82.
2. *Бурбе Р. Б.* Влияние местной гипотермии на местную и общую капиллярную проницаемость при термических ожогах в эксперименте. — В кн.: Материалы II съезда травматологов-ортопедов респ. Прибалтики. Рига, 1972, с. 524—527.
3. *Гомазков О. А., Шимкович М. В.* Значение калликреин-кининовой системы плазмы крови в регуляции генерализованной гемодинамики. — В кн.: Кинины и кининовая система крови (биохимия, фармакология, патофизиология, методы исследования, роль в патологии). М., 1976, с. 40—42.
4. *Кочетыгов Н. И., Белянин В. Л.* О значении быстрого охлаждения тканей при ожогах. — Сов. медицина, 1964, № 4, с. 112—114.
5. *Сандомирский Б. М., Исаев Б. И., Волина В. В.* Холодовое лечение ожогов. — Киев : Наук. думка, 1981, с. 23—70.
6. *Сушкевич Г. Н.* Функциональное взаимодействие защитных систем крови. — Лаб. дело, 1979, № 12, с. 707—711.
7. *Титова М. И., Долгина М. И., Панова Ю. М.* Влияние ингибиторов протеолитических ферментов на систему гемостаза и показатели гемограммы у больных с обширными ожогами в периоде токсемии. — Пробл. гематологии и переливания крови, 1976, № 2, с. 46—50.
8. *Шатерников В. А.* Протеолитическая активность и содержание ингибитора трипсина в сыворотке крови и соке поджелудочной железы при хроническом панкреатите. — Вопр. мед. химии, 1966, № 1, с. 103—109.

Харьк. НИИ мед. радиологии МЗ УССР

Получено 02.09.82

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043.577.1:612.1:616—001.18:616.5

Л. Ф. Журихина, С. Г. Хвостова,
Н. Е. Гусакова, Б. П. Сандомирский

СОДЕРЖАНИЕ БИОГЕННЫХ АМИНОВ (СЕРОТОНИНА, ГИСТАМИНА) В КРОВИ КРЫС ПОСЛЕ ТЕМПЕРАТУРНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ НА КОЖУ

Биогенные амины играют значительную роль в развитии ранних фаз воспалительного процесса. По мнению некоторых исследователей [2, 8], серотонин усиливает и удлиняет действие эндогенного гистамина при воспалении у крыс, мышей и в меньшей степени, согласно данным работы [12] — у других животных.

В работах [7, 11] показано благоприятное влияние охлаждения на уменьшение глубины ожога и отека тканей при немедленном охлаждении, что снимает боль, обусловленную быстрым развитием послеожогового набухания. Кроме того, холодовая обработка ожоговой поверхности приводит к значительной задержке образования отека в неповрежденной отдаленной ткани [9]. Участие серотонина и гистамина в повышении проницаемости сосудов наряду с прямым воздействием воспалительных раздражителей на сосуды и действием других факторов проницаемости несомненно.

Цель настоящего исследования — изучение динамики серотонина и гистамина цельной крови крыс после экспериментального ожога, криовоздействия и ожога с последующим немедленным охлаждением.

Методика исследования. Работа выполнена на 120 беспородных крысах-самцах массой 160—180 г, на спине которых под эфирным наркозом после эпиляции шерсти выполнялись температурные воздействия. Площадь экспериментальных глубоких ожогов пламенем составляла 20 см² (10—15 % поверхности тела), для чего использовали 2 мл бензина и 100 мг ваты. Криовоздействие производили на такой же площади парожидкостной струей азота с помощью специального устройства до побеления и образования инея. Кровь для исследования собирали в одно и тоже время до кормления животных из сосудов шеи в момент декапитации.

Серотонин в крови крыс определяли флуориметрическим (нингидриновым) методом Снайдер в модификации В. И. Кулинского и Л. С. Костюковской [4] через 5, 15 и 60 мин после травмы, концентрацию гистамина — методом Шора и соавт. [10] в те же сроки. Измерения производили на спектрофлуориметре MPF-2A фирмы «Хитачи»[1]. Полученные цифровые данные обработаны на УВМ СМ-1 с использованием критерия Стьюдента — Фишера.

Результаты и их обсуждение. Проведенное исследование выявило увеличение в 1,3—3 раза концентрации серотонина в ранний срок наблюдения при всех видах температурных повреждений (рис. 1). При тепловом и холодовом воздействиях максимальные концентрации моноамина определялись через 5 мин после нанесения травмы, тогда как при охлаждении обожженной поверхности — через 15 мин. Изучение динамики колебаний содержания гистамина в крови животных показало недостоверные изменения через 5 мин после нанесения травмы по сравнению с контрольными значениями (рис. 2). При этом отмечено более высокое содержание гистамина в крови животных после сочетанного воздействия (ожог с последующим охлаждением) по сравнению с ожогом $p<0{,}05$. В последующие сроки наблюдения достоверных изменений концентрации гистамина в крови не отмечалось.

---

[1] Выражаем благодарность сотрудникам Ин-та проблем криобиологии и криомедицины АН УССР А. М. Греку, В. А. Коптелову за помощь в выборе оптимальных параметров измерения.

Матеріал, захищений авторським правом

Содержание биогенных аминов (серотонина, гистамина) в крови является результатом взаимовлияния нескольких основных факторов: синтеза, депонирования, разрушения, состояния сосудисто-тканевой циркуляции. Выбранный объект исследования — крысы — обладает видовой особенностью, заключающейся в наличии серотонина в тучных клетках. Система тучных клеток чрезвычайно реактивна и изменения

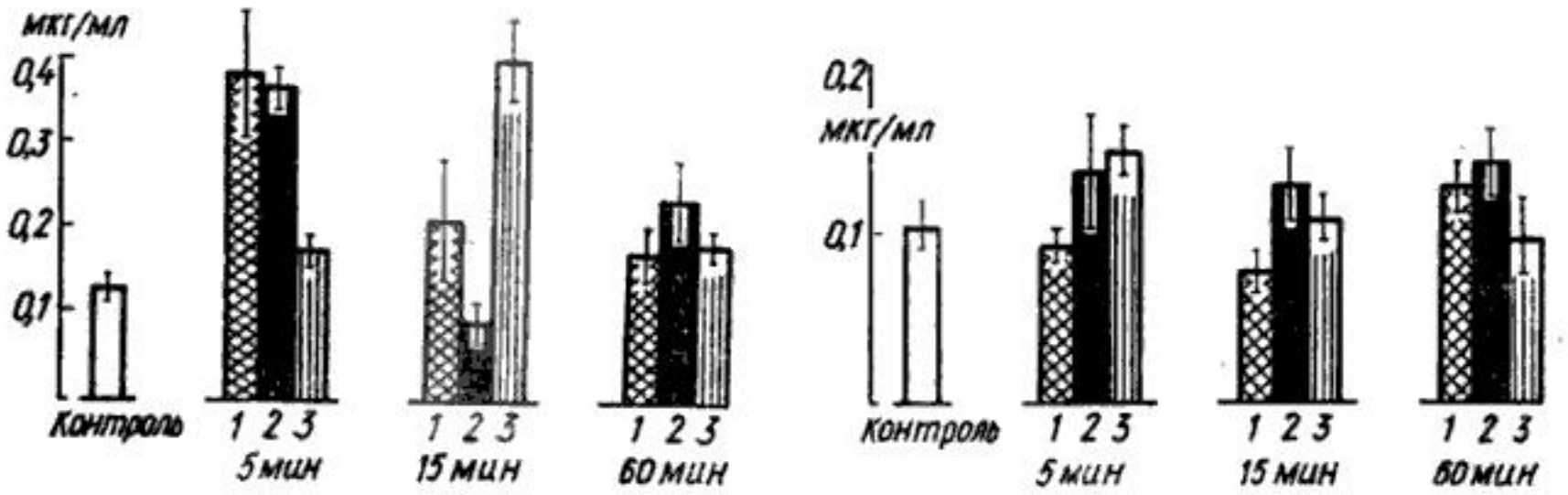


Рис. 1. Динамика серотонина цельной крови крыс после температурных повреждений кожного покрова:

1 — ожог; *2* — криовоздействие; *3* — ожог с последующим охлаждением.

Рис. 2. Содержание гистамина в крови крыс после температурных воздействий на кожу.

Условные обозначения те же, что на рис. 1

в ней выявляются уже через несколько минут после воздействия того или иного фактора. Очевидно, в механизмах нарушения микроциркуляции и проницаемости при температурных повреждениях принимают участие не только биогенные амины крови, но и тучных клеток, свободно проникающие в прилежащие капилляры. Данные работы [1] дают также основание для предположения, что нервные воздействия на сосуды могут быть опосредованы тучными клетками. Следовательно, в условиях повреждения и воспаления, когда может происходить патологическая стимуляция нервных образований места повреждения, тучные клетки могут высвобождать физиологически активные вещества, действующие на сосудистую стенку и вызывающие повышение сосудистой проницаемости. В исследованиях [3, 5] показаны повышение содержания серотонина в обожженной коже и появление его в жидкости ожоговых пузырей, при этом концентрация 5-ОИУК в моче больных резко увеличивается. Снижение количества 5-окситриптамина в крови может быть обусловлено изменением его эндогенного метаболизма. Не исключено также, что снижение содержания серотонина в крови к первому часу наблюдения связано с накоплением его в коже.

Среди разнообразных влияний серотонина на организм значительное место занимает его способность освобождать гистамин. Однако в опытах на крысах показано [6], что действие серотонина на эндотелий не связано с освобождением гистамина, так как последний уступает по активности серотонину в 200 раз. Согласно данным работы [2], интенсивность отеков кожи крыс в результате внутрикожного введения веществ снижается в следующем порядке: серотонин, препарат 48/80, брадикинин, гистамин. Следовательно, более высокая чувствительность крыс к серотонину является их видовой особенностью. На основании полученных нами экспериментальных данных можно предположить, что участие гистамина в развитии сосудистых эффектов, характерных для острого воспаления после температурных повреждений кожного покрова крыс, ограничено. Вместе с тем обращает на себя внимание более высокое содержание гистамина в крови животных после нанесения ожога с последующим охлаждением в сравнении с ожогом без охлаждения. Это может быть обусловлено усилением воспалительного процесса, вызванного термической травмой, после местного охлаждения, а также улучшением сосудисто-тканевой циркуляции в зоне ожога после применения холодовой обработки.

Матеріал, захищений авторським правом

Таким образом, при температурных повреждениях кожи крыс уже в первые минуты после воздействий обнаруживаются сложные метаболические нарушения, одним из проявлений которых — увеличение концентрации серотонина (5-окситриптамина) в крови животных. Гистамин у этих животных не играет существенного значения в развитии ранних фаз острого воспалительного процесса в ответ на локальные температурные повреждения кожного покрова.

1. *Александров П. Н.* Изучение действия препарата 48/80 на тучные клетки и микроциркуляторное ложе брыжейки крысы. — Патол. физиология и эксперим. терапия, 1972, № 5, с. 18—23.
2. *Гапонюк П. Я.* Участие кининовой системы в воспалении. — Там же, 1968, № 5, с. 81—87.
3. *Громова Е. А.* Серотонин и его роль в организме. — М.: Медицина, 1966. — 183 с.
4. *Кулинский В. И., Костюковская Л. С.* Определение серотонина в цельной крови человека и лабораторных животных. — Лаб. дело, 1969, № 7, с. 390—394.
5. *Панченко Н. И., Пекарский Д. Е., Масленникова Н. К.* Изменение содержания серотонина у больных ожоговой болезнью. — Вестн. хирургии, 1976, **117**, № 2, с. 84—86.
6. *Пидевич И. И.* Фармакология серотонина. — В кн.: Фармакология моноаминергических процессов. М.: Медицина, 1971, с. 263—276.
7. *Рудовский В., Назиловский В., Зиткевич В., Зиткевич К.* Теория и практика лечения ожогов: Пер. с англ. — М.: Медицина, 1980. — 375 с.
8. *Чернух А. М.* Воспаление: Очерки патологии и эксперим. терапии. — М.: Медицина, 1979. — 448 с.
9. *Boykin I. V., Eriksson E., Sholley M. M. et al.* Histamine-mediated delayed permeability response after scald burn inhibited by cimetidine or cold-water treatment. — Science, 1980, **209**, N 4458, p. 815—817.
10. *Shore P. A., Burkhalter A., Cohn V. H.* A method for the fluorometric assay of histamine in tissues. — J. pharmacol. exp. therap., 1959, **127**, N 3, p. 182—186.
11. *Shulman A. G., Wagner K.* Effect of cold water immersion on burn edema in rabbits. — Surg. Gynec. Obstet., 1962, **115**, p. 557—560.
12. *Spector W. G., Willoughby D. A.* The inflamatory response. — Bacteriol. Revs, 1963, **27**, p. 117.

Ин-т пробл. криобиологии и криомедицины АН УССР, Харьков Получено 10.02 82

Матеріал, захищений авторським правом

СОДЕРЖАНИЕ

I. Теоретическая и экспериментальная биология

Родин В. В., Исангалин Ф. Ш., Волков В. Я. Структура водных растворов белков в присутствии клатратов ксенона 3
Родин В. В., Архангельский А. Н., Исангалин Ф. Ш., Волков В. Я. Получение клатратов ксенона в воде и исследование их свойств импульсным методом ЯМР 8
Пичугин Ю. И., Новиков А. Н., Олейник С. Т. Лиотропный ряд криопротекторов 12
Карташов В. Ф. К исследованию эмбриотропных свойств криопротектора ПЭО-1500. Влияние длительного антенатального воздействия на развитие потомства 19
Шамша Б. В., Саенко В. И. К вопросу о методологических основах применения математической теории экспериментов в криобиологии 22
Саенко В. И., Лобынцева Г. С., Вотякова И. А., Тимошенко Ю. П. О поиске оптимальных условий процесса криоконсервирования лейкомассы 29
Семенченко А. Ю., Бондаренко В. А., Белоус А. М. Влияние дифильных соединений на диффузию белков в растворе 34

II. Криоконсервирование биологических объектов

Утевский А. М., Чуйко В. А., Карпенко Л. Г. Влияние замораживания печени до —196 °С на связывание ^{125}I-трийодтиронина ядрами и его адренергическую регуляцию 39
Евдокимова Н. Ю., Бездробный Ю. В. Влияние замораживания жировой ткани на инсулинрецепторное взаимодействие в ее плазматических мембранах . 43
Новиков А. Н., Олейник С. Т., Черныш Е. Н., Пашковская О. В. Адсорбционное понижение прочности мембран эритроцитов при холодовом воздействии ПЭО-1500 46
Кочережская И. А. Электроспектроскопическое исследование крови, подлежащей низкотемпературному консервированию 50
Кочережская И. А. Электропроводность суспензии эритроцитов и повреждение при замораживании 53
Грищенко В. И., Паращук Ю. С., Капрельянц А. С. Ультраструктура сперматозоидов человека после криоконсервации 56
Ильясова Е. Н. Сезонные изменения ультраструктуры клеток коры надпочечников у зимоспящего суслика (Citellus suslicus) 60
Муравьева Л. И., Буданцев А. Ю. Гистохимическое изучение распределения и содержания биогенных моноаминов в головном мозгу длиннохвостого суслика (Citellus parryi Rich, 1827) 70
Капрельянц А. С., Марченко Л. Н., Матяш И. П. Ультраструктура ткани печени in vivo при локальном действии низких температур. Сообщение I. Электронно-микроскопический и стереометрический анализ гепатоцитов при охлаждении до —30 °С 72
Иванов А. Г., Унксов М. Е., Шпиченецкий Б. Я., Онищенко Н. А. Электрометрический метод исследования изменений, происходящих при консервации органов 77
Говоруха Т. П., Скорняков Б. А., Петренко А. Ю. Ультраструктурная характеристика щитовидной железы после эквилибрации с диметилсульфоксидом (ДМСО) 80
Куракса В. М., Милешкин М. Б., Дворцевой В. К. Способ определения механических повреждений органа в процессе криоконсервации 83

III. Криомедицина

Тимченко В. Г., Симонова Л. И., Гертман В. З., Чубяк Н. В. О положительном влиянии криотерапии ожогов на систему свертывания и протеолитическую активность крови 88
Журихина Л. Ф., Хвостова С. Г., Гусакова Н. Е., Сандомирский Б. П. Содержание биогенных аминов (серотонина, гистамина) в крови крыс после температурных воздействий на кожу 93

Матеріал, захищений авторським правом

CONTENTS

I. Theoretical and Experimental Cryobiology

Rodin V. V., Isangalin F. Sh., Volkov V. Ya. Structure of Aqueous Protein Solutions in the Presence of Xenon Clathrates 3
Rodin V. V., Arkhangelsky A. N., Isangalin F. Sh., Volkov V. Ya. Production of Xenon Clathrates in Water and Investigation of Their Properties by the Pulse NMR-Method 8
Pichugin Yu. I., Novikov A. N., Oleinik S. T. Lyotropic Series of Cryoprotectors 12
Kartashov V. F. Studies of Embryotropic Properties of PEO-1500 Cryoprotector: the Effect of Long Antenatal Effect on Posterity Development 19
Shamsha B. V., Saenko V. I. Methodological Principles of Application of a Mathematical Theory of Experiments in Cryobiology 22
Sayenko V. I., Lobintseva G. S., Votyakova I. A., Timoshenko Yu. P. About optimum conditions of process of leukomass cryopreservation 29
Semenchenko A. Y., Bondarenko V. A., Belous A. M. Effect of diphile combinations on diffusion of albumins in solution 34

II. Cryopreservation of Biological Objects

Utevsky A. M., Chuiko V. A., Karpenko L. G. Influence of Liver Freezing Down to —196 °C on Incorporation of ^{125}J-triiodothyronine by Nuclei and on Its Adrenergic Regulation 39
Evdokimova N. Yu., Bezdrobny Yu. V. The Influence of Adipose Tissue Freezing on Insulin-Receptor Interrelation in Its Plasma Membranes 43
Novikov A. N., Oleinik S. T., Chernysh E. N., Pashkovskaya O. V. Adsorption Decrease in Erythrocyte Membrane Strength Under Cold Influence of PEO-1500 46
Kocherezhskaya I. A. Electrospectroscopic Study of Blood Intended for Low Temperature Preservation 50
Kocherezhskaya I. A. Electroconductivity of Erythrocyte Suspension and Damage During Freezing 53
Grischenko V. I., Paraschuk Yu. S., Kaprel'yants A. S. Ultrastructure of human spermatozoa after cryopreservation 56
Ilyasova E. N. Seasonal ultrastructural alterations of adrenocortical cells in hibernating ground squirrel, Citellus suslicus 60
Muravjova L. I., Budantsev A. U. Histochemical research of distribution and content of biogenic monoamines in the brain of ground squirrel Citellus Parryi Rich., 1827 70
Kaprelyants A. S., Marchenko L. N., Matyash I. P. The Ultrastructure of Liver Tissue in vivo Under Local Effect of Low Temperatures. Communication I. Electron-Microscopic and Stereometric Analysis of Hepatocytes at Cooling Down to —30 °C 72
Ivanov A. G., Unskov M. E., Shpichenetsky B. Ya., Onishchenko N. A. The Electrometric Method of Studying Changes During Organ Preservation . . . 77
Govorukha T. P., Skornyakov B. A., Petrenko A. Yu. The Ultrastructure Characteristic of the Thyroid Gland After Equilibration with Dimethylsulphoxide (DMSO) 80
Kuraksa V. M., Mileshkin M. B., Dvortsevoy V. K. Method for Determining Mechanical Damage of an Organ During Cryopreservation 83

III. Cryomedicine

Timchenko V. G., Simonova L. I., Gertman V. Z., Chubyak N. V. Positive Influence of Burn Cryotherapy on the System of Blood Coagulation and Proteolytic Activity 88
Zhurikhina L. F., Khvostova C. G., Gusakova N. E., Sandomirsky B. P. Content of Biogenic Amines (Serotonin, Histamine) in Rat Blood After the Temperature Influence on Skin 93

Матеріал, захищений авторським правом

КРИОБИОЛОГИЯ И КРИОМЕДИЦИНА
Выпуск 14

Утверждено к печати ученым советом
Института проблем криобиологии и криомедицины АН УССР

Редактор *А. Н. Шадрина.* Художественный редактор *В. И. Мелашенко.*
Технический редактор *Т. С. Березяк.* Корректоры *М. Т. Кравчук, С. Д. Семенова, Л. Н. Регета.*

Сдано в набор 31. 10. 83. Подп. в печ. 09. 08. 84. БФ 01968. Формат 70×108/16. Бум. тип. № 1. Лит. гарн. Выс. печ. Усл. печ. л. 8,75. Усл. кр.-отт. 9,28. Уч.-изд. л. 9,69. Тираж 1000 экз. Заказ 3012. Цена 1 р. 50 к.

Издательство «Наукова думка». 252601 Киев 4, ул. Репина, 3.

Львовская областная книжная типография, 290000 Львов, Стефаника, 11.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 539.143.43(577.112:54—145.2)

Структура водных растворов белков в присутствии клатратов ксенона / Родин В. В., Исангалин Ф. Ш., Волков В. Я. — Криобиология и криомедицина, 1984, вып. 14, с. 3—7.

Методом импульсного ЯМР на частотах резонанса протонов 20 и 90 МГц исследовано влияние молекул белка на образование клатратов ксенона в водных растворах белков. Количество образовавшихся клатратов максимально в области весовых концентраций белка 0,5—4 %. Обсуждаются особенности структурирования воды в водных растворах белков в присутствии клатратов ксенона. При образовании клатратов снижается подвижность молекул воды и белка. Вода, гидратно связанная с молекулами белка, не участвует в образовании клатратов. Ил. 4. Табл. 1. Библиогр.: 8 назв.

УДК 57.043.539.143:(546.295:546.212)+53.092:(546.295:546.212)

Получение клатратов ксенона в воде и исследование их свойств импульсным методом ЯМР / Родин В. В., Архангельский А. Н., Исангалин Ф. Ш., Волков В. Я. — Криобиология и криомедицина, 1984, вып. 14, с. 8—11.

Методом ^{1}H-ЯМР-релаксации на частоте резонанса 20 МГц изучена подвижность молекул воды в присутствии клатратов ксенона. Для получения клатратов газа под давлением 0,2—2,0 мПа и их изучения методом ЯМР сконструирована специальная пирексная (10 мм) ампула. Количество образующихся в образце клатратов определяли методом ЯМР по уменьшению амплитуды спада свободной индукции после 90°-ного импульса. Данные по T_1 свидетельствуют о незначительном понижении подвижности молекул жидкой фракции воды при образовании клатратов ксенона. В то же время подвижность молекул воды в клатратных структурах оказывается сниженной примерно на пять порядков по сравнению с подвижностью молекул жидкой воды. При измерении T_2 последовательностью импульсов Карра — Парселла — Мейбума — Гилла было показано, что заметное снижение времени T_2 молекул жидкой воды при образовании в образце 10—30 % клатратов обусловлено образованием внутренних микрогетерогенностей с размером около 1 мкм. Ил. 3. Библиогр.: 11 назв.

УДК 57.043:578.088

Лиотропный ряд криопротекторов / Пичугин Ю. И., Новиков А. Н., Олейник С. Т. — Криобиология и криомедицина, 1984, вып. 14, с. 12—13.

Получены коэффициенты распределения 15-ти распространенных криопротекторов в системе хлороформ—вода. Показано, что на коэффициент распределения очень влияет соотношение гидрофобных и гидрофильных групп в молекуле. ПЭО с молекулярным весом выше 400 обладает значительно большей лиотропностью по сравнению с другими криопротекторами, поэтому можно предполагать их внедрение в билипидный слой биологической мембраны. Библиогр.: 3 назв.

УДК 57.043.547.422:618

К исследованию эмбриотропных свойств криопротектора ПЭО-1500. Влияние длительного антенатального воздействия на развитие потомства / Карташов В. Ф. — Криобиология и криомедицина, 1984, вып. 14, с. 19—22.

В опытах на беспородных белых крысах показано, что ежедневное парентеральное введение ПЭО-1500 в течение всей беременности в дозе, рекомендованной для его клинического использования в качестве криопротектора при низкотемпературном консервировании эритроцитов человека (0,6 г/кг — 1/20 ЛД-50), не приводит к гибели плодов или появлению внешних аномалий развития, не вызывает задержку роста и морфологического созревания потомства, нарушения функциональной полноценности печени крысят, что свидетельствует об отсутствии существенного влияния ПЭО-1500 на развитие потомства при его антенатальном воздействии в изученном режиме. Табл. 3. Библиогр.: 7 назв.

УДК 57.043

К вопросу о методологических основах применения математической теории экспериментов в криобиологии / Шамша Б. В., Саенко В. И. — Криобиология и криомедицина, 1984, вып. 14, с. 22—29.

Показано, что применение методов математической теории экспериментов в криобиологии должно проводиться в строгом соответствии с решаемой задачей и представлять собой оптимальную в определенном смысле процедуру проведения исследований. Описаны наиболее трудноформализуемые этапы, вскрыты их особенности. Предложена структурная схема пакета прикладных программ. Даны рекомендации к принятию решений при исследованиях. Ил. 1. Табл. 3. Библиогр.: 18 назв.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043

О поиске оптимальных условий процесса криоконсервирования лейкомассы / Саенко В. И., Лобынцева Г. С., Вотякова И. А., Тимошенко Ю. П. — Криобиология и криомедицина, 1984, вып. 14, с. 29—34.

Приведены результаты экспериментальных исследований процесса криоконсервирования ядросодержащих клеток крови, полученных с применением методов планирования экспериментов. Определены возможные области расположения экстремумов при размораживании в водяной бане (+40 °С) и поле СВЧ. Выяснено, что для адекватного описания объекта необходимо использовать нелинейные модели с обязательным преобразованием переменных. В качестве планов эксперимента должны применяться планы второго порядка. Ил. 1. Табл. 4. Библиогр.: 11 назв.

УДК 57.043.547.422.426.1:547.963.4

Влияние дифильных соединений на диффузию белков в растворе / Семенченко А. Ю., Бондаренко В. А., Белоус А. М. — Криобиология и криомедицина, 1984, вып. 14, с. 34—38.

Изучали диффузию гемоглобина в растворах криопротекторов различной молекулярной массы. Установили, что повышение концентрации низкомолекулярных криопротекторов (глицерин, диметилсульфоксид, ПЭО-100) вызывает существенное снижение скорости диффузии белка в свободном объеме. Наиболее выраженный эффект наблюдался в присутствии глицерина. Под влиянием полиэтиленоксидов различных молекулярных масс (400—1500) снижение диффузии происходило в интервале концентраций 5—15 %. При более высоких концентрациях ПЭО скорость диффузии выравнивалась независимо от молекулярной массы полимера. Предполагается, что наблюдаемые процессы могут играть существенную роль в механизме криозащиты биообъектов. Ил. 3. Библиогр.: 7 назв.

УДК 57.043.577.15.576.347

Влияние замораживания печени до —196 °С на связывание ^{125}I-трийодтиронина ядрами и его адренергическую регуляцию / Утевский А. М., Чуйко В. А., Карпенко Л. Г. — Криобиология и криомедицина, 1984, вып. 14, с. 39—42.

Изучено влияние различных концентраций норадреналина и быстрого (300—400 °/мин) замораживания на связывание ^{125}I-трийодтиронина ядрами печени быка. Установлена прямая зависимость стимулирующего эффекта норадреналина со связыванием трийодтиронина ядрами, выделенными из нативной печени. Показано, что ядра, выделенные из печени после замораживания — оттаивания, сохраняют способность связывать меченый гормон, однако добавление норадреналина не приводит к увеличению связывания. Ил. 2. Табл. 1. Библиогр.: 9 назв.

УДК 57.043:611—018.26:612.349.8

Влияние замораживания жировой ткани на инсулинрецепторное взаимодействие в ее плазматических мембранах / Евдокимова Н. Ю., Бездробный Ю. В. — Криобиология и криомедицина, 1984, вып. 14, с. 43—46.

Показано, что замораживание при —20 °С жировой ткани людей и собак приводит к снижению инсулинсвязывающей активности рецепторов в выделенных из нее плазматических мембранах. При этом инсулинсвязывающие способности мембран, выделенных до и после замораживания ткани, связаны прямой корреляционной зависимостью. Ухудшение связывания инсулина его рецепторами после замораживания обусловлено снижением количества рецепторов, в то время как их свойства (сродство к инсулину и отрицательное кооперативное взаимодействие) не изменяются. Вероятно, криоповреждение мембран не затрагивает самой структуры инсулиновых рецепторов, но нарушает обмен рецепторов между внутриклеточным и поверхностно-мембранным пулами. Ил. 2. Табл. 2. Библиогр.: 8 назв.

УДК 57:043:57.536.48.047:548.0:661.073.585

Адсорбционное понижение прочности мембран эритроцитов при холодовом воздействии ПЭО-1500 / Новиков А. Н., Олейник С. Т., Черныш Е. Н., Пашковская О. В. — Криобиология и криомедицина, 1984, вып. 14, с. 46—50.

Изучено влияние криопротектора ПЭО-1500 на прочность мембран эритроцитов, предварительно подвергнутых различным температурным воздействиям. Отмечается упрочение мембран эритроцитов в присутствии ПЭО-1500, не подвергавшихся холодовому воздействию или подвергавшихся ему без льдообразования. При холодовом воздействии со льдообразованием влияние ПЭО-1500 на мембрану проявляется в ее разупрочнении. Сделано предположение, что в обоих случаях действие ПЭО-1500 на мембрану имеет адсорбционный механизм: упрочение мембраны адсорбционным полислоем молекул ПЭО-1500 или разупрочнение при наличии в ней микротрещин поверхностно-активными молекулами ПЭО-1500. Ил. 2. Табл. 3. Библиогр.: 5 назв.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043:612.111.014.41

Электроспектроскопическое исследование крови, подлежащей низкотемпературному консервированию / Кочережская И. А. — Криобиология и криомедицина, 1984, вып. 14, с. 50—53.

Обнаружено несовпадение для разных доноров электрических параметров компонентов суспензий и значений удельной электропроводности суспензий. Разнообразие параметров связано с групповой принадлежностью и индивидуальными особенностями крови донора. Показана зависимость электропроводности мембраны и цитоплазмы эритроцитов от группы крови донора. Ил. 4. Библиогр.: 6 назв.

УДК 57.043:612.111.014.41

Электропроводность суспензии эритроцитов и повреждение при замораживании / Кочережская И. А. — Криобиология и криомедицина, 1984, вып. 14, с. 53—56.

Исследовали зависимость сохранности эритроцитов при консервировании с добавлением 20%-ного водного раствора ПЭО-1500 от электропроводности нативной эритроцитарной массы. Показано, что измерение электропроводности суспензии нативных эритроцитов позволяет дифференцированно подойти к выбору концентрации криопротектора, что обеспечивает оптимальные условия по осмотичности среды замораживания, концентрации криопротектора и клеток при низкотемпературном консервировании. Ил. 1. Табл. 1. Библиогр.: 5 назв.

УДК 57.043:611—013.12

Ультраструктура сперматозоидов человека после криоконсервации / Грищенко В. А., Паращук Ю. С., Капрельянц А. С. — Криобиология и криомедицина, 1984, вып. 14, с. 56—60.

Изучалась ультраструктура сперматозоидов человека в норме и после криоконсервации под защитой криопротектора — глицерина. Установлено, что степень повреждений зависит от скорости замораживания. При охлаждении по методике Шермана происходят значительные изменения хроматина ядра головки сперматозоида, повреждения ядерной и плазматической мембран, а также митохондрий связующего отдела большинства сперматозоидов. Двухэтапная программа замораживания до —196 °С вызывает изменения ультраструктуры связующего отдела отдельных сперматозоидов с сохранением обычной ультраструктурной характеристики основной части криоконсервированных сперматозоидов человека. Ил. 3. Библиогр.: 16 назв.

УДК 591.543.42:576.31

Сезонные изменения ультраструктуры клеток коры надпочечников у зимоспящего суслика (Citellus suslicus) / Ильясова Е. Н. — Криобиология и криомедицина, 1984, вып. 14, с. 60—70.

Описаны морфологические изменения, происходящие в клетках клубочковой и пучковой зон коры надпочечников зимоспящего суслика на протяжении двух месяцев зимней спячки (январь — февраль) и через одну-две недели после окончательного пробуждения от спячки (март). Отмечается более высокая активность клеток клубочковой зоны в январе по сравнению с клетками пучковой зоны. Изменения, происходящие в клетках пучковой зоны в феврале, позволяют предположить увеличение активности этих клеток: присутствие хорошо структурированного тубулярного гладкого эндоплазматического ретикулума (ГЭР) с диаметром трубочек 60 нм, появление удлиненных митохондрий и шероховатого ретикулума и т. д. Однако наиболее значительные изменения наблюдаются в марте, когда ГЭР выявляет несколько типов структурной организации: плотно упакованные тубулы диаметром 40—50 нм, рыхло расположенные короткие трубочки диаметром 50—60 нм и длинные трубочки диаметром около 40 нм. Ил. 5. Библиогр.: 32 назв.

УДК 57.043:(599.322)591.481

Гистохимическое изучение распределения и содержания биогенных моноаминов в головном мозгу длиннохвостого суслика Citellus parryi Rich., 1827 / Муравьева Л. И., Буданцев А. Ю. — Криобиология и криомедицина, 1984, вып. 14, с. 70—72.

С помощью флуоресцентно-гистохимического метода Фалька — Овмана исследовано распределение биогенных моноаминов в головном мозгу сезонного гибернатора — арктического длиннохвостого суслика. Наблюдавшееся распределение моноаминсодержащих структур было аналогично таковому у других изученных видов млекопитающих. Количественно-гистохимический анализ содержания катехоламинов проводился для трех моноаминергических систем нейронов мозга: дофаминергических (нигро-неостриальной и мезолимбической) и норадренергической. Уровень дофамина и норадреналина в изучавшихся областях мозга был значительно выше у гибернирующего животного по сравнению с активным. Вероятно, наблюдавшееся во время спячки увеличенное содержание катехоламинов можно рассматривать как депонирование медиаторов, запасы которых могут быть быстро мобилизованы в процессе выхода из состояния оцепенения. Табл. 1. Библиогр.: 10 назв.

УДК 57.043:611.36.085.1.086.1:537.533.35

Ультраструктура ткани печени in vivo при локальном действии низких температур. Сообщение I. Электронно-микроскопический и стереометрический анализ гепатоцитов при охлаждении до —30 °С / Капрельянц А. С., Марченко Л. Н., Матяш И. П. — Криобиология и криомедицина, 1984, вып. 14, с. 72—77.

Матеріал, захищений авторським правом

Проведено электронно-микроскопическое и стереометрическое изучение ультраструктуры гепатоцитов при локальном охлаждении печени крыс до —30 °С с использованием метода прижизненной фиксации путем перфузии. Качественные и количественные данные свидетельствуют об отсутствии деструктивных изменений ультраструктуры основной массы гепатоцитов после отогрева. Ил. 5. Библиогр.: 12 назв.

УДК 57.043:53.082.7

Электрометрический метод исследования изменений, происходящих при консервации органов / Иванов А. Г., Унксов М. Е., Шпиченецкий Б. Я., Онищенко Н. А. — Криобиология и криомедицина, 1984, вып. 14, с. 77—80.

Проведено изучение возможностей применения электрометрического метода для оценки изменений, происходящих в изолированных органах в процессе их консервации в консервирующем растворе. Полученные данные свидетельствуют о том, что по динамике импеданса в низкочастотном диапазоне можно оценить эти изменения, причем наиболее выраженная динамика наблюдается при использовании игольчатого коаксиального электрода. Ил. 2. Библиогр.: 2 назв.

УДК 57.043:611.441.361.014.41:537.533.35

Ультраструктурная характеристика щитовидной железы после эквилибрации с диметилсульфоксидом (ДМСО) / Говоруха Т. П., Скорняков Б. А., Петренко А. Ю. — Криобиология и криомедицина, 1984, вып. 14, с. 80—83.

Проведено электронно-микроскопическое исследование тиреоцитов человека после эквилибрации с ДМСО различных концентраций на этапе подготовки к низкотемпературному консервированию. Показано, что инкубация кусочков щитовидной железы с 7,5%-ным раствором ДМСО вызывает определенные изменения во всех компонентах ультраструктуры тиреоцитов. Наблюдаются набухание митохондрий, неравномерное расширение перинуклеарного пространства, возрастает количество плотного хроматина. После инкубации с 15%-ным и 30%-ным растворами ДМСО указанные изменения проявляются в более выраженной форме. Сделан вывод об однонаправленном характере изменений ультраструктуры тиреоцитов при инкубации с ДМСО различной концентрации. Ил 4. Табл. 2. Библиогр.: 8 назв.

УДК 57.043.616.61.014.41

Способ определения механических повреждений органа в процессе криоконсервации / Куракса В. М., Милешкин М. Б., Дворцевой В. К. — Криобиология и криомедицина, 1984, вып. 14, с. 83—87.

Впервые при замораживании органа с помощью специальной аппаратуры зарегистрировано ультразвуковое излучение, сопровождающее возникновение в органе микро- и макроразрывов. Предложенный способ регистрации позволяет получать мгновенную информацию о температуре и времени возникновения повреждения. Показана роль криопротектора в защите органа от механических повреждений. Ил. 5. Библиогр.: 7 назв.

УДК 57.043.616—001.17:615.832.9

О положительном влиянии криотерапии ожогов на систему свертывания и протеолитическую активность крови / Тимченко В. Г., Симонова Л. И., Гертман В. З., Чубяк Н. В. — Криобиология и криомедицина, 1984, вып. 14, с. 88—92.

В эксперименте на крысах линии Вистар изучено состояние свертывающей системы и протеолитической активности крови при криотерапии ожогов пламенем 3Б-4 степени 7—8 % поверхности их тела. Установлено, что криотерапия ожоговой раны оказывает положительное влияние на коагулолизисную систему крови, что проявляется в снижении степени гиперкоагуляции, большей сбалансированности в каскаде ферментных процессов и может быть отнесено за счет вызванной активации протеазной системы крови. Ил. 4. Табл. 1. Библиогр.: 8 назв.

УДК 57.043.577.1:612.1:616—001.18:616.5

Содержание биогенных аминов (серотонина, гистамина) в крови крыс после температурных воздействий на кожу / Журихина Л. Ф., Хвостова С. Г., Гусакова Н. Е., Сандомирский Б. П. — Криобиология и криомедицина, 1984, вып. 14, с. 93—95.

В экспериментах на крысах изучена динамика серотонина и гистамина цельной крови после ожога, криовоздействия и их сочетания. Результаты исследования показали увеличение концентрации серотонина в первые минуты после травмы, при этом максимальные концентрации моноамина при сочетании теплового и холодового воздействий определяются в более поздний срок. Изучение содержания гистамина не выявило достоверных изменений показателя по сравнению с контролем. Отмечено более высокое его содержание в крови животных после нанесения ожога с последующим охлаждением в сравнении с ожогом без охлаждения. Ил. 2. Библиогр.: 12 назв.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 57.043:539.143.43:(577.112:54—145.2)

Structure of Aqueous Protein Solutions in the Presence of Xenon Clathrates / Rodin V. V., Isangalin F. Sh., Volkov V. Ya. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1984, iss. 14, p. 3—7.

Formation of xenon clathrates in aqueous protein solutions was investigated by the pulse proton nuclear magnetic resonance at frequencies of 20 and 90 MHz. The quantity of clathrates was maximum in solutions with 0,5-4% weight concentrations of proteins. Peculiarities of water structurization in aqueous protein solutions in the presence of xenon clathrates are discussed. Studies on time of longitudinal and transversal relaxation of protons in proteins solutions demonstrated a decrease in the mobility of both proteins and water molecules in the process of clathrate formation. The water bound to protein molecules does not actually participate in the formation of clathrates. 4 figs. 1 table. Refs: 9 titles.

UDC 539.143.43:(546.295:546.212)+53.092:(546.295.546.212)

Production of Xenon Clathrates in Water and Investigation of Their Properties by the Pulse NMR-Method / Rodin V. V., Arkhangelsky A. N., Isangalin F. Sh., Volkov V. Ya. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1984, iss. 14, p. 8—11.

Mobility of water molecules in the presence of xenon clathrates has been studied using the pulse ^{1}H-NMR method at the proton resonanse frequency of 20 MHz. Special 10 mm pyrex tubes were used to obtain gas clathrates under a pressure of 0,2 to 2,0 MPa and their investigation by the NMR method. The method was used to determine the quantity of produced clathrates by the diminishing the free induction decay amplitude after 90°C pulse. T_1 measurements testify to a slight decrease in the mobility of the portion of water during the formation of xenon clathrates. At the same time the mobility of water molecules in clathrate structures is 10^5 times as slow as that of the molecules of remaining liquid water. The study of transversal relaxation time in water with 10-30% of clathrates by the pulse sequence of Carr-Purcell-Gill-Meiboom showed that a considerable reduction of transversal relaxation time of liquid water molecules is due to the formation of inner microheterogeneities with a characteristic size of about 1 μm. Evidently, these microhomogeneities are clathrate crystals which occupy all volume of water, because liquid water is not visually seen in the presence even of small quantities of clathrates. 3 figs. Refs: 11 titles.

UDC 57.043:578.088

Lyotropic Series of Cryoprotectors / Pichugin Yu. I., Novikov A. N., Oleinik S. T. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1984, iss. 14, p. 12—13.

Distribution coefficients are obtained for 15 wide-spread cryoprotectors in the chloroform-water system. It was shown that correlation of hydrophobic and hydrophilic groups in a molecule greatly influences the distribution coefficient. PEOs with the molecular weight higher than 400 are much more lyotropic than other cryoprotectors, so they may be incorporated into the bilipid layer of a biological membrane. Refs: 4 titles.

UDC 57.043.547.422:618

Studies of Embryotropic Properties of PEO-1500 Cryoprotector: the Effect of Long Antenatal Effect on Posterity Development / Kartashov V. F. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1984, iss. 14, p. 19—22.

Experiments on common albino rats show that daily parenteral injection of PEO-1500 during pregnancy in the dose recommended for its clinical use as a cryoprotector in low-temperature preservation of human erythrocytes (0.6 g/kg-1/20 LD-50) does not lead to fetus death or to the external anomalies of development, delay of the growth and morphological maturing of the posterity, disfunctional integrity of the baby rat liver. This gives evidence for the absence of a significant influence of PEO-1500 on the development of posterity during the cryoprotector antenatal effect in the studied regime. 3 tables. Refs: 7 titles.

UDC 57.043

Methodological Principles of Application of a Mathematical Theory of Experiments in Cryobiology / Shamsha B. V., Saenko V. I. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1984, iss. 14, p. 22—29.

It is shown that the methods of a mathematical theory of experiments should be used in cryobiology in strict accordance with the problem under consideration and should be an optimal research procedure. Stages most difficult for a formalized description are mathematically defined and their peculiarities are determined. A block diagram of the applied programme pack is suggested. Recommendations are given for decision making at different stages of the experiment. 3 figs. 1 table. Refs: 18 titles.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 57.043

About optimum conditions of process of leukomass cryopreservation / Sayenko V. I., Lobyntseva G. S., Votyakova I. A., Timoshenko Yu. P. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1984, iss. 14, p. 29—34.

The results of experimental investigations of cryopreservation of nucleus containing blood cells received using the methods of experiments planning are given. Possible regions of extremums location when thawed on the water bath (+40°C) and in the microwave field have been defined. It has been found that the adequate descriptions of the object within wide range of factors needs the usage of non-linear models with the obligatory transformation of variables of the kind Plans of the second order are to be used as the plans of the experiment. 1 figs. 4 tables. Refs: 12 titles.

UDC 57.043.547.422.426.1:547.963.4

Effect of diphilic combinations on diffusion of albumins in solution / Semenchenko A. Y., Bondarenko V. A., Belous A. M. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1984, iss. 14, p. 34—38.

In the work it was studied the diffusion of haemoglobin in solutions of cryoprotectors of different molecular mass. It has been found that the increase of concentration of low molecular cryoprotectors (glycerole, dimethyl sulfoxide, PEO-100) caused a considerable decrease of the rate of albumin diffusion in the free volume. The most manifested effect is observed in the presence of glycerol. Under the influence of polyethylene oxides of different molecular masses (400-1500) the decrease of diffusion occurred within the interval of concentrations from 5 to 15%. Under conditions of higher PEO concentrations the rate of the diffusion regulated irrespective of the molecular mass of polymer. The observed processes are supposed to be able to play a substantial role in the mechanism of biological object cryoprotection. 3 figs. Refs: 7 titles.

UDC 57.043.577.15.576.347

Influence of Liver Freezing Down to —196 °C on Incorporation of ^{125}I-triiodothyronine by Nuclei and on Its Adrenergic Regulation / Utevsky A. M., Chuiko V. A., Karpenko L. G. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1984, iss. 14, p. 39—42.

The paper is concerned with the influence of different concentrations of noradrenaline and quick freezing (300-400°C/min) on incorporation of ^{125}I-triiodothyronine by bull liver nuclei. A direct correlation is found between the stimulating effect of noradrenaline and incorporation of triiodothyronine by the nuclei isolated from the native liver After freezing-thawing nuclure able of incorporating the labelled hormone but the addition of noradrenaline does not increase the incorporation. 2 figs. 1 table. Refs: 9 titles.

UDC 57.043:611—018.26:612.349.8

The Influence of Adipose Tissue Freezing on Insulin-Receptor Interrelation in Its Plasma Membranes / Evdokimova N. Yu., Bezdrobny Yu. V. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1984, iss. 14, p. 43—46.

It is shown that freezing of adipose tissue of human beings and dogs at —20°C leads to a decrease in the insulin-bindings activity of receptors in plasma membranes isolated from the adipose tissue. Under these conditions the insulin-binding capacity of membranes isolated before and after tissue freezing are in direct correlation. A decrease in the incorporation of insulin by its receptors after freezing is due to a drop in the number of receptors whereas their properties (affinity for insulin and negative cooperative interaction) remain unchanged. The cryodamage of the membranes may has no effect on the structure of insulin receptors but impair the exchange of receptors between intracellular and surface membrane pool. The data obtained show that plasma membranes isolated from frozen adipose tissue may be used to study insulin receptors. 2 tables. Refs: 8 titles.

UDC 57:043:57:536.48.047:548:0:661:073.585

Adsorption Decrease in Erythrocyte Membrane Strength Under Cold Influence of PEO-1500 / Novikov A. N.. Oleinik S. T., Chernysh E. N., Pashkovskaya O. V. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1984, iss. 14, c. 46—50.

The paper deals with the influence of PEO-1500 cryoprotector on the strength of erythrocyte membrane preliminary subjected to various temperature effects. It is shown that the presence of PEO-1500 caused strengthening of erythrocyte membranes which were not exposed to cold or were exposed to cold without the ice formation. During exposure to cold with ice formation the effect of PEO-1500 on the membrane is manifested in loss of its strength. It is supposed that in both cases the effect of PEO-1500 on the membrane follows the adsorption mechanism: the strengthening of the membrane by the adsorption polylayer of PEO-1500 molecules or loss of its strength in the presence of microcracks by surface-active PEO-1500 molecules which function as a strength reducer. 2 figs. 3 tables. Refs: 5 titles.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 57.043:612.111.014.41

Electrospectroscopic Study of Blood Intended for Low Temperature Preservation / Kocherezhskaya I. A. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1984, iss. 14, p. 50—53.

A discrepancy in electrical parameters of suspension components as well as in values of specific electrical conductivity of suspension as a whole was found for different donors. The variety of the parameters is associated both with group belonging and with individual peculiarities of donor blood. Electroconductivity of membrane and erythrocytes cytoplasm is shown to depend on the donor blood group. The most important is the correlation between erythromass electroconductivity and erythrocyte concentration. 4 figs. Refs: 6 titles.

UDC 57.043:612.111.014.41

Electroconductivity of Erythrocyte Suspension and Damage During Freezing / Kocherezhskaya I. A. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1984, iss. 14, p.. 53—56.

The dependence was studied between the erythrocytes integrity during preservation with addition of the 20% PEO-1500 aqueous solution and electroconductivity of the native erythrocyte mass. It is shown that the measurement of native erythrocyte mass. It is shown that the measurement of native erythrocyte suspension electroconductivity permits a differentiated approach to the cryoprotector concentration choice, which provides optimal conditions as to osmotic property of the freezing medium, concentration of cryoprotector and cells during low-temperature preservation. For the suspension whose specific electroconductivity is not more than $2{,}7 \cdot 10^{-1}$ $S \cdot m^{-1}$ the best result of preservation was when using a 20% PEO-1500 in 3 : 1 dilution, and for the suspension with higher electroconductivity — in 1 : 1 dilution. 1 fig. 1 table. Refs: 5 titles.

UDC 57.043:611—013.12

Ultrastructure of human spermatozoa after cryopreservation / Grischenko V. I., Paraschuk Yu. S., Kaprel'yants A. S. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1984, iss. 14, p. 56—60.

The ultrastructure of normal and cryopreserved under protection of glycerol human spermatozoa has been studied. It has been found that the degree of injury depended upon the speed of freezing. During cooling according to Sherman there were considerable changes of acrosome nucleus chromatin, injuries of nucleus and plasmatic membranes as well as mitochondria of connecting part of most spermatozoa. Il-staged freezing program (—196°C) caused inconsiderable changes of ultrastructure of some spermatozoa connecting part, with preservation of usual ultrastructural characteristics of main part of cryopreserved human spermatozoa. Refs: 16 titles.

UDC 591.543.42:576.31

Seasonal ultrastructural alterations of adrenocortical cells in hibernating ground squirrel, Citellus suslicus / Ilyasova E. N. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1984, iss. 14, p. 60—70.

Ultrastructural changes in adrenocortical cells of ground squirrel, Citellus suslicus, during two months of hibernation (January—February) and after arousal (March) are described. Experimental data on relatively high activity characteristic for zona glumerulosa cells in January are considered in comparison with fascicular ones. The changes occuring in the latter cells during February allow to suggest the increasing activity of zona fasciculata over that period. The alterations testifying to the highest activity of both zones are observed in March. 14 figs. Refs: 32 titles.

UDC 57.043:(529.322)591.481

Histochemical research of distribution and content of biogenic monoamines in the brain of ground squirrel Citellus Parryi Rich., 1827 / Muravjova L. I., Budantsev A. U. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1984, iss. 14, p. 70—72.

It has been shown that catecholamine level increased during hibernation in some dopamine and noradrenergic neuron systems of the brain during hibernation in comparison with active state. It is possible that increased content of catecholamines can be immediately used in the awakening processes.

UDC 57.043:611.36.085.1.086.1:537.533.35

The Ultrastructure of Liver Tissue in vivo Under Local Effect of Low Temperatures. Communication I. Electron-Microscopic and Stereometric Analysis of Hepatocytes at Cooling Down to —30 °C / Kaprelyants A. S., Marchenko L. N., Matyash I. P. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1984, iss. 14, p. 72—77.

Electron-microscopic and stereometric studies of hepatocytes ultrastructure were performed at local cooling of the liver down to —30°C using the method of intravital fixation by the rat liver perfusion.

The obtained qualitative and quantitative data give evidence for the absence of considerable destructive changes in the ultrastructure of the main mass of hepatocytes immediately after thawing. 5 figs. Refs: 12 titles.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 57.043.53.082.7

The Electrometric Method of Studying Changes During Organ Preservation / Ivanov A. G., Unskov M. E., Shpichenetsky B. Ya., Onishchenko N. A. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1984, iss. 14, p. 77—80.

The electrometric method was studied for its possibile use to estimate changes appearing in isolated organs during their preservation in a preserving solution. The data obtained give evidence for the fact that these changes may be estimated from impedance dynamics within a low-frequency range. The most pronounced dynamics is observed when using the needle coaxial electrode. 2 figs. Refs: 2 titles.

UDC 57.043:611.441.361.014.41:537.533.35

The Ultrastructure Characteristic of the Thyroid Gland After Equilibration with Dimethylsulphoxide (DMSO) / Govorukha T. P., Skornyakov B. A., Petrenko A. Yu. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1984, iss. 14, p. 80—83.

An electron-microscopic study of human thyreocytes was made after their equilibration with DMSO of different concentrations during preparation for low-temperature preservation. It is shown that the incubation of the thyroid gland fragments with a 7,5% solution of DMSO causes definite changes in all the components of the thyreocytes ultrastructure: mitochondrion swelling, nonuniform expansion of the perinuclear space, an increase in the quantity of solid chromatin. After incubation with 15% and 30% solution of DMSO the above-mentioned changes are more pronounced. A conclusion is drawn on a unidirectional character of changes in the thyreocyte ultrastructure during the incubation with DMSO of various concentrations. 4 figs. 2 tables. Refs: 8 titles.

UDC 57.043.616.61.014.41

Method for Determining Mechanical Damage of an Organ During Cryopreservation / Kuraksa V. M., Mileshkin M. B., Dvortsevoy V. K. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1984, iss. 14, p. 83—87.

Ultrasound emission accompanying the appearance of micro- and macroruptures in an organ during its freezing has been recorded for the first time by a special device. This method of recording permits obtaining immediate information on the temperature and time of the damage appearance. A comparison of the intensive acoustic emission results obtained during freezing of the kidney without a cryoprotector and that protected by various cryoprotector concentrations gives good evidence for the role of the cryoprotector in preventing mechanical damages of the organ. 5 figs. Refs: 7 titles.

UDC 57.043.616—001.17.615.832.9

Positive Influence of Burn Cryotherapy on the System of Blood Coagulation and Proteolytic Activity / Timchenko V. G., Simonova L. I., Gertman V. Z., Chubyak N. V. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1984, iss. 14, p. 88—92.

The condition of the blood coagulative system and proteolytic activity during cryotherapy of 3B-4 degree burns covering 7-8% of the body surface has been studied in an experiment with Wistar rats. It is determined that cryotherapy of a burn wound positively affects the blood coagulolysis system, which is manifested in a decrease of hypercoagulation degree, greater balancing in enzyme processes and may occur due to the evoked activation of the blood protease system. 4 figs. 1 table. Refs: 8 titles.

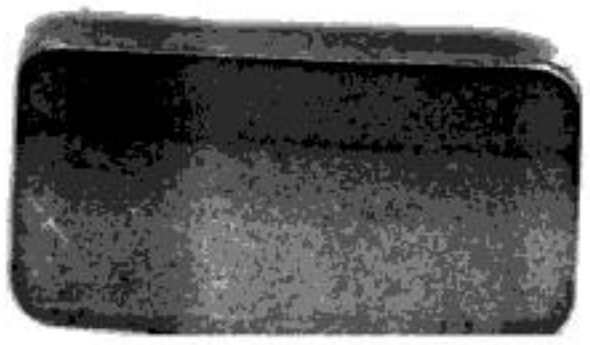
UDC 577.1:612.1:616—001.18:616.5

Content of Biogenic Amines (Serotonin, Histamine) in Rat Blood After the Temperature Influence on Skin / Zhurikhina L. F., Khvostova C. G., Gusakova N. E., Sandomirsky B. P. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1984, iss. 14, p. 93—95.

Dynamics of the whole blood serotonin and histamine was studied after burn, cryotreatment and their combination in experiments with rats. The results of the study showed an increase in the serotonin concentration during first minutes after injuries, with the maximum concentrations of monoamine under combination of heat and cold treatment determined later. A study of the histamine content did not show significant changes in the index as compared to the control. It is found that the content of histamin in blood of the animals after burn with subsequent cooling is higher than after burn. 2 figs. Refs: 12 titles.

Матеріал, захищений авторським правом





Матеріал, захищений авторським правом

Цена 1 р. 50 к.

НАУКОВА ДУМКА

Криобиология и криомедицина. 1984, вып. 14, 1—100

Матеріал, захищений авторським правом