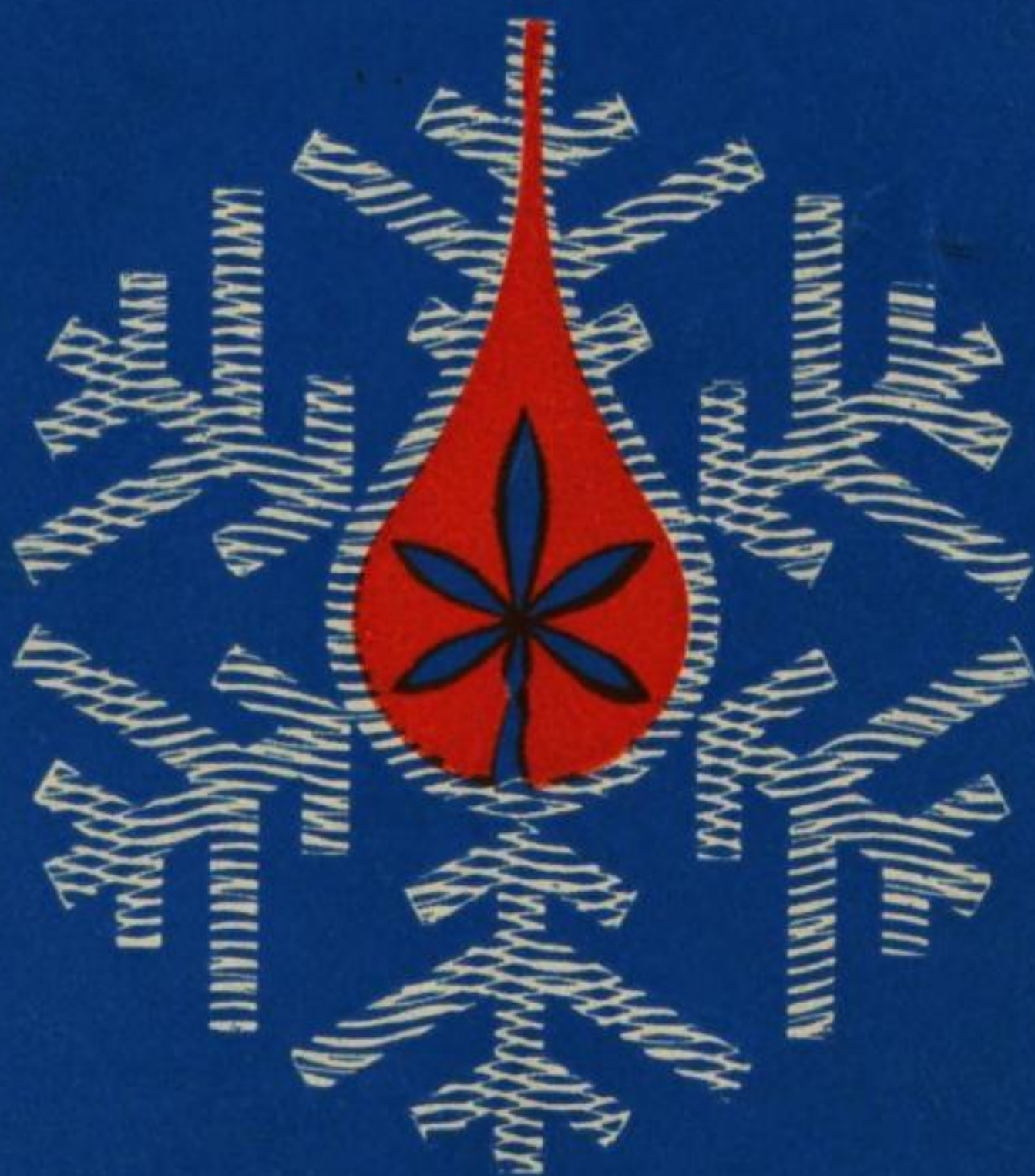


КРИОБИОЛОГИЯ И КРИОМЕДИЦИНА

ISSN 0130-2663



9

1981



АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ И КРИОМЕДИЦИНЫ

КРИОБИОЛОГИЯ И КРИОМЕДИЦИНА

РЕСПУБЛИКАНСКИЙ МЕЖВЕДОМСТВЕННЫЙ СБОРНИК

Основан в 1975 г.

ВЫПУСК
9

КИЕВ «НАУКОВА ДУМКА» 1981

УДК 57.043

Представлены результаты экспериментальных исследований по изучению механизмов кристаллообразования, криповреждений и характера взаимодействий криопротекторов и антиоксидантов с клетками и тканями при охлаждении и замораживании. Изложены медицинские аспекты применения холода, а также теоретические и практические разработки в области криогенной техники.

Для широкого круга биологов и медиков, работающих в области криобиологии и криомедицины.

Редакционная коллегия

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

Редакция межведомственных сборников

КРИОБИОЛОГИЯ И КРИОМЕДИЦИНА

Выпуск 9

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

Редактор *Е. Т. Тальнова*
Художественный редактор *А. В. Косяк*
Технический редактор *С. Г. Максимова*
Корректоры *В. Н. Божок, Л. В. Малюта*

Информ. бланк № 4007.

Сдано в набор 10.11.80. Подп. в печ. 25.08.81. БФ 00162. Формат 70×108/16. Бумага типогр. № 1. Лит. гарн. Выс. печ. Усл.-печ. л. 9,8. Уч.-изд. л. 10,31. Усл. кр.-от. 10,32. Тираж 1000 экз. Заказ 3903. Цена 1 руб. 60 коп.

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

Областная книжная типография Львовского областного управления по делам издательств, полиграфии и книжной торговли. 290000. Львов, ул. Стефаника, 11.

К $\frac{50500-410}{M221(04)-81}$ 489-81 4106000000

© Издательство «Наукова думка», 1981

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

УДК 57.043.577:576.347

А. М. Белоус, В. А. Бондаренко

МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ ХОЛОДОВОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ МЕМБРАН КЛЕТОК

Температура как фактор, способный изменять структурное состояние мембран клеток и модифицировать различные клеточные функции, является в криобиологии важным экспериментальным параметром [1—6]. Однако наряду с чисто теоретическими аспектами изучения роли температуры в изменении состояния биологических мембран важное значение приобретает изучение температурозависимых фазовых процессов в механизмах криоповреждения мембран клетки [76]. До последнего времени в анализе механизмов криоповреждений клеток предпочтение отводилось процессам, происходящим в среде замораживания, т. е. динамике образования вне- или внутриклеточного льда, концентрационным эффектам электролитов и неэлектролитов в водной фазе [67—69], макроскопическим процессам, связанным с действием осмотических факторов и т. д. [33]. Значение молекулярных изменений в структуре мембран при этом практически не учитывалось [3]. В конечном итоге возникло противоречие между пониманием роли физико-химических изменений, происходящих в среде замораживания, и отсутствием объяснения различия в холодовой чувствительности разных клеток и клеточных структур. Более того, оставались во многом непонятными механизмы термального разрушения клеток в условиях отсутствия фазового перехода вода — лед, т. е. в диапазоне гипотермических температур. Это противоречие во многом может быть разрешено при выяснении биофизических, биохимических и ультраструктурных особенностей холодовых перестроек мембранных структур клетки, которым отводится роль основной мишени при действии факторов, связанных с охлаждением [3, 27]. Наиболее актуальным при этом является выяснение специфики реакции мембраны на действие любого взятого в отдельности фактора, такого, как температура, повышение ионной силы или присутствие в среде криозащитного агента. Экспериментальный материал свидетельствует, что мембраны способны специфически реагировать на действие каждого взятого в отдельности фактора и конечная (результатирующая) реакция клетки будет зависеть от того, суммируется ли эффект на мембране (как в случае действия гиперконцентраций солей и температуры) или происходит противоположно направленный (компенсирующий) эффект одного из факторов (как в случае действия криопротекторов).

Температурозависимые изменения структуры и функции биологических мембран. К температурозависимым изменениям мембран относятся процессы, развитие которых происходит независимо от состояния водной фазы и определяется конечной температурой охлаждения, а также временем пребывания объекта в данной температурной зоне. Установлено, что наиболее высокой чувствительностью к действию температуры обладает липидная фаза мембран [24—30]. Такие процессы, как фазовые переходы липидов [55], в настоящее время можно считать на-

чальным элементом в механизме криповреждения клеток [3, 76]. Чрезвычайно важно, что граница фазовых переходов природных мембран охватывает зону от физиологических температур (хромафинные гранулы) до температур в диапазоне 0—30°C (мембраны фоторецепторов), что практически полностью совпадает с завершением процессов кристаллизации в одной фазе при замораживании. Таким образом, модификация водной фазы и температурозависимые изменения структуры мембраны — это по существу два параллельных процесса, а холодное повреждение клетки можно рассматривать как результирующий эффект действия этих процессов. Фазовый переход липидов мембран при охлаждении — комплексное явление, сопровождающееся определенными процессами в мембране, среди которых следует выделить следующие: изменение конформации и упаковки липидных молекул из *цис-транс-конформации* и обратно [74]; латеральную диффузию липидных молекул и разделение фаз в плоскости мембраны [36]; агрегацию белков мембраны и перераспределение их перпендикулярно плоскости мембраны [21]; перераспределение липид-холестериновых комплексов мембраны [49]; флуктуации плотности при изменении упаковки липидов и белков [61]; изменение характера гидратации полярных сегментов липидных молекул [75].

Важное значение в регуляции температурозависимых функций клеток, связанных с состоянием липидов мембран, принадлежит холестерину и ионам [48]. Холестерин по существу является своеобразным термальным буфером, и его количественное содержание в мембране непосредственно определяет диапазон фазовых переходов липидов в мембране [48]. При высоком его содержании в мембране (~33%) значение фазовых переходов общей массы липидов мембран существенно понижается и основную роль играют фазовые переходы «аннулярных» липидов, окружающих белки и содержащих мало холестерина [55, 56]. Как показывают многочисленные исследования [35, 47, 53], фазовые переходы липидов в мембране могут оказать отрицательное влияние на клетку, особенно в зоне, близкой к температуре фазового перехода, когда резко повышается вероятность развития вторичных процессов, способных углубить криоразрушение клетки. Для понимания значения фазовых переходов липидов мембраны в механизмах холодного повреждения клетки следует также учесть тот факт, что реальная структурная организация мембраны живой клетки, по-видимому, близка к «платформенной» модели [49], рассматривающей мембрану как мозаику из сосуществующих доменов в различном фазовом и агрегатном состоянии, а также границ, разделяющих домены [49, 55]. Для междоменных границ, представляющих собой чистую липидную фазу, будут наиболее характерны все изменения, обнаруженные на искусственных липидных мембранах при температурах фазовых переходов [41, 73]. Не менее важным является то, что междоменные границы — наиболее лабильные участки мембран и при механических нагрузках на мембрану эти участки в первую очередь будут подвергаться деформации, что позволяет говорить о возможности сенсibilизации мембраны к действию низких температур. Поэтому при прогнозировании состояния клетки при охлаждении ее до той или иной температурной зоны необходимо учитывать в первую очередь липидный состав мембраны, ионное микроокружение и обогащение ее холестерином. По этим параметрам можно условно разделить клетки и субклеточные структуры на 3 группы.

Клетки, в мембранах которых отсутствует холестерин и начало температурных фазовых переходов липидов в мембранах находится выше 0°C (некоторые микроорганизмы, синапсомы, мембраны некоторых клеток прокариотов).

Клетки и клеточные органеллы с низким (5—15%) содержанием холестерина (мембраны микоплазмы, митохондрий, лизосом и др.). Раз-

витие фазовых переходов в мембранах таких структур охватывает диапазон от положительных до субнулевых температурных зон.

Клетки с высоким содержанием холестерина (лимфоидные клетки, эритроциты и т. д.) характеризуются развитием фазовых переходов основной массы липидов в субнулевых температурных зонах.

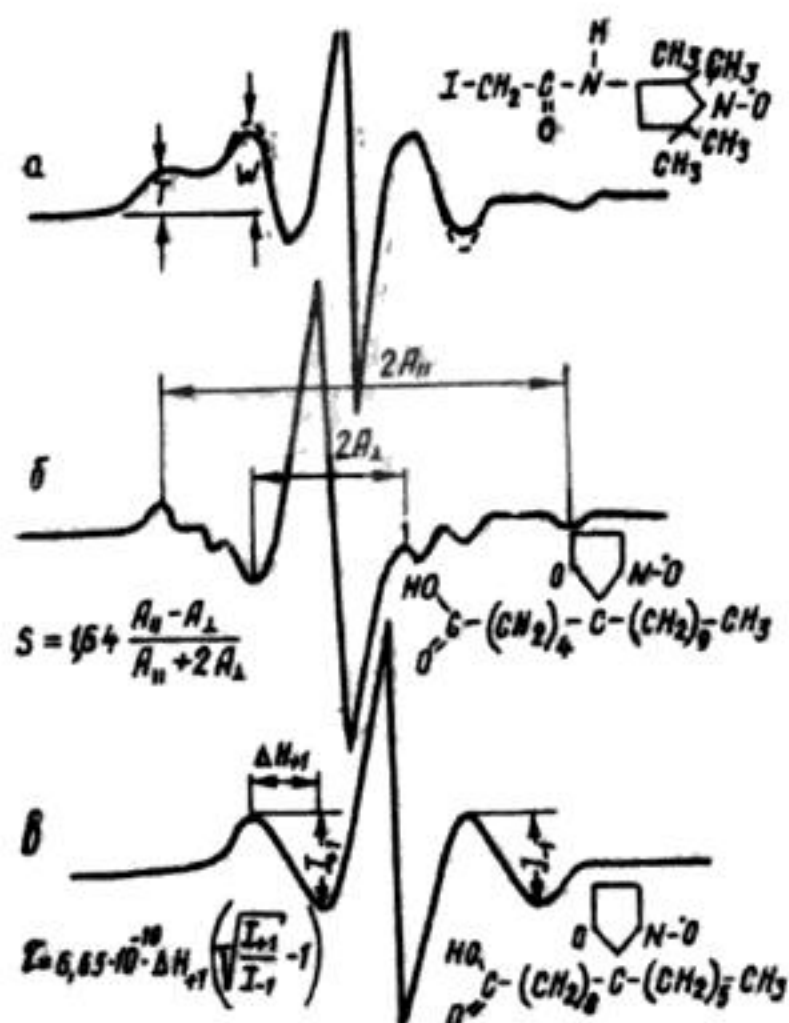
Каковы же закономерности молекулярных перестроек мембран, присущих каждой из указанной выше группе клеток в условиях низких температур?

Отсутствие холестерина и наличие фазовых переходов при низких положительных температурах обуславливают высокую чувствительность таких клеток, как, например, микроорганизмы, к охлаждению до 0°C [39, 40]. Правда, некоторые из них способны переносить замораживание до температур жидкого азота без какого-либо криозащитного агента [17]. Температура фазовых переходов липидов в мембранах клеток определяется их липидным составом, поэтому нарушения их структуры и функции в процессе охлаждения могут происходить и при положительных температурах [12—14, 26]. Повреждения мембран, связанные с гипотермией, носят комплексный характер и развиваются при относительно длительном пребывании клеток в зоне околонулевых температур [28]. Доказано, что для сохранения нормальной жизнеспособности клеток в их мембранных структурах должен поддерживаться определенный уровень микровязкости и подвижности углеводородных цепей жирнокислых радикалов [30—32], которые весьма зависимы от температуры окружающей среды [94]. Низкая температура изменяет физическое состояние липидов, инициируя в них фазовый переход из жидкокристаллического состояния в гель-фазу [94]. Такого рода температурозависимые перестройки не только изолированных, но и мембранных систем интактных клеток в зоне пониженных температур хорошо изучены [22, 74, 80]. При этом необходимо учитывать, что основными составляющими, определяющими физическое состояние жирных кислот, являются: степень их ненасыщенности, количество двойных связей, *цис*- или *транс*-конфигурации двойной связи, длина цепи и степень ее разветвленности [74, 94]. Поскольку жирнокислотные цепи фосфолипидов мембраны находятся в жидком состоянии, а их ионные концевые гидрофильные группы — в кристаллическом состоянии, считают, что липиды мембран представляют собой жидкокристаллический матрикс, в котором локализованы «диски» доменов, составленных из ассоциатов белков и липидов, обладающих определенной степенью подвижности и упаковки [49].

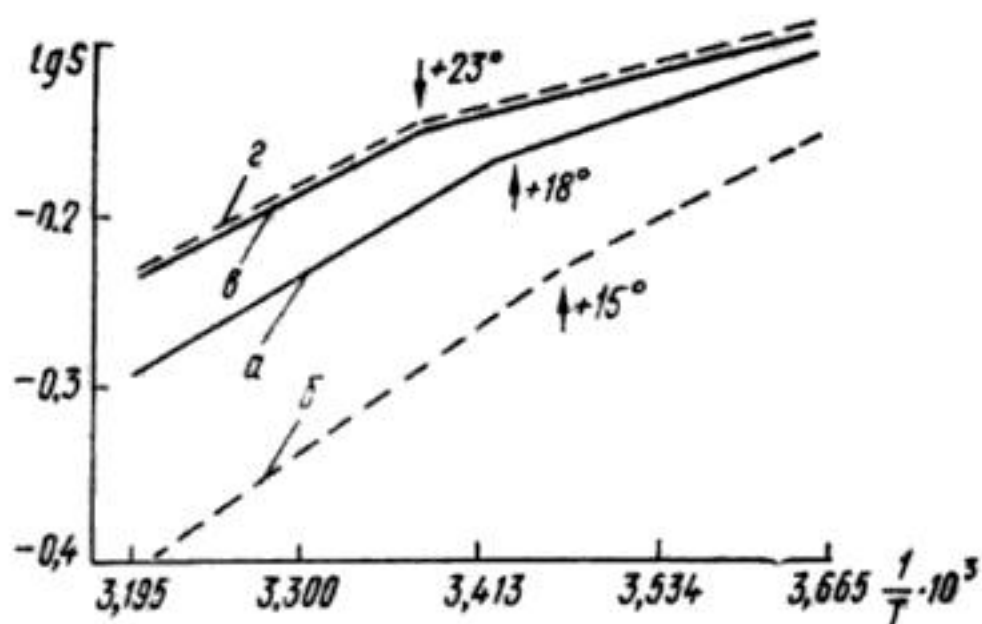
Установлено, что как при нагревании, так и при охлаждении в искусственных и естественных мембранах можно обнаружить эндо- или экзотермические фазовые переходы липидного компонента. Для их обнаружения используют методы анализа ЭПР-спиновых зондов и меток [18, 19, 28], люминесцентных и рентгеноструктурных методов [56—58, 60], калориметрического титрования и ЯМР-спектроскопии [19, 57]. При генерализации структурно-фазового перехода происходит латеральное [27] и поперечное распределение молекул липида в плоскости мембраны с образованием кластеров различной плотности упаковки [30, 59] и химического состава [19, 31]. Такое температурозависимое перемешивание липидных молекул в мембране приводит к нарушению регуляции каталитической функции мембранно встроенных белков и транспорта ионов и метаболитов в клетке. В некоторых работах [35, 36] с помощью белковых спиновых флуоресцентных меток и зондов выявлены конформационные изменения белков мембран под влиянием температурного воздействия. Нами с помощью ЭПР-ковалентной белковой метки выявлены конформационные изменения белков, встроенных в мембрану эритроцитов и саркоплазматического ретикулума (рис. 1).

В настоящее время имеется достаточное количество доказательств зависимости функционирования мембранных ферментов от физического

крысы и барана были установлены изломы на кривых Аррениуса, которые зависели от состояния и присутствия липидов в мембране. После удаления липида из мембраны с помощью детергентов кривая приобре-



Пунктиром обозначены величины сдвигов спектра.



a — контроль; *б* — мембраны СР после быстрого замораживания и отогрева; *в* — изолированный препарат Са-АТФазы; *г* — замораживание изолированного препарата Са-АТФазы [11].

При исследовании температурозависимых переходов липидов в мембранах саркоплазматического ретикулума с помощью жирнокислотной спиновой метки нами обнаружен фазовый переход при $+15^{\circ}\text{C}$ (рис. 2), что было сопряжено с нарушением функционирования Ca^{2+} -транспортирующей системы. В работах [8, 11] также обнаружен структурный переход в белках саркоплазматического ретикулума при $+15 \div +20^{\circ}\text{C}$, обусловивший изменение каталитической активности $\text{Na}^{+}-\text{K}^{+}$ - и Ca^{2+} -АТФаз. Судя по этим данным, переход связан, скорее всего, с белком, так как автор цитируемой работы с помощью калориметрии не обнаружил фазовых переходов липидов в мембранах.

Температурные переходы липидов и зависимость этих процессов от жирнокислотного состава могут быть хорошо продемонстрированы в опытах на различных микроорганизмах, которые перестраивают фосфолипидный состав мембраны в зависимости от добавки той или иной жир-

ной кислоты в среду их размножения. Так, в работе [95] было установлено, что прибавление в среду инкубации *E. coli*, ауксотрофной в отношении ненасыщенных жирных кислот, олеиновой кислоты, имеющей более низкую точку плавления, излом аррениусовской кривой смещается в сторону более низких температур, а при добавке миристоолеиновой кислоты — в область высоких температур (рис. 3).

Из этих данных следует, что фазовые переходы в липидах, искусственных и природных мембранах, индуцируемых пониженными температурами, оказывают отрицательное влияние на функционирование мембрановстроенных ферментов, которое сказывается прежде всего на увеличении энергии активации ферментативных процессов, определяемых с помощью изломов на кривых Аррениуса. Так как температура фазовых переходов «аннулярных» липидов выше температуры переходов основной массы липидов [55, 56], изменения активности ферментов происходят при температурах, относительно близких к физиологическим [19, 56]. В некоторых случаях изменения активности ферментов происходят не как следствие фазовых переходов липидов, а как результат температурозависимых изменений конформации белковых молекул [86].

Следует отметить, что все указанные термические структурно-фазовые перестройки в липид-белковых компонентах мембраны и связанные с ними нарушения ферментативной и метаболической активности носят обратимый характер и после нормализации температуры до уровня физиологических наблюдается восстановление нарушенных систем. При этом необходимо учитывать резко выраженную временную зависимость развития патологических процессов в мембранах клеток в гипотермических условиях. Если сроки экспонирования клеток при температуре 0—+4°C не превышают 1—2 ч, то возникшие процессы «старения» мембранных структур в клетке будут носить обратимый характер. Удлинение сроков хранения свыше указанного времени сопровождается углублением процессов аутолиза и деструкции клетки, развивающихся на почве гипоксии. В этом случае развитие повреждений мембранных структур клетки в условиях гипотермии будет осуществляться в определенной последовательности, в которую вовлекаются в первую очередь митохондрии и лизосомы как структуры, наиболее чувствительные к действию экстремальных факторов (схема).

Более высокая вероятность развития различных биохимических реакций в условиях переохлаждения (т. е. без кристаллизации водной фазы и дегидратации мембраны и самой клетки), по-видимому, является причиной более сильного повреждения клеток в условиях переохлаждения при отрицательных температурах по сравнению с замораживанием [3, 16]. Возникшая нестабильность мембраны при температурах фазовых переходов липидов [3, 60] способствует развитию вторичных патологических процессов в клетке. Для эритроцитов и митохондрий эта зона находится вблизи температур —8÷—10°C, о чем свидетельствуют данные ЭПР [55, 58, 92], КР-спектроскопии [91] и ДСК [24].

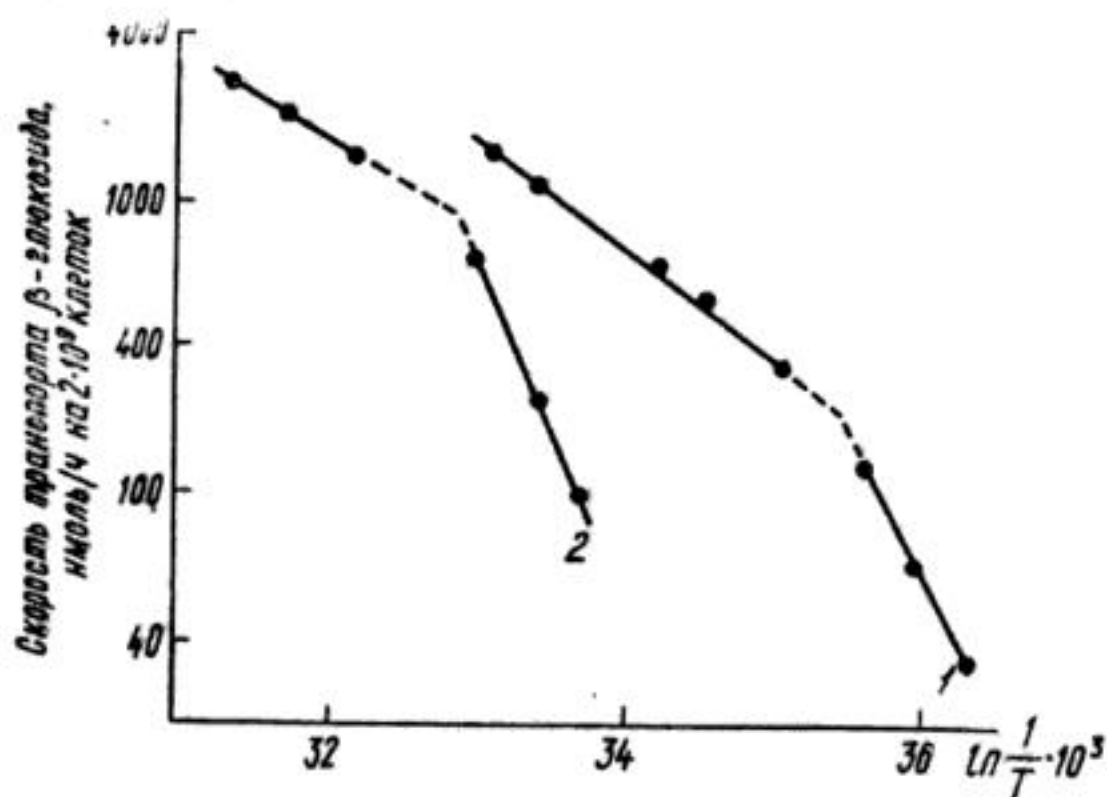
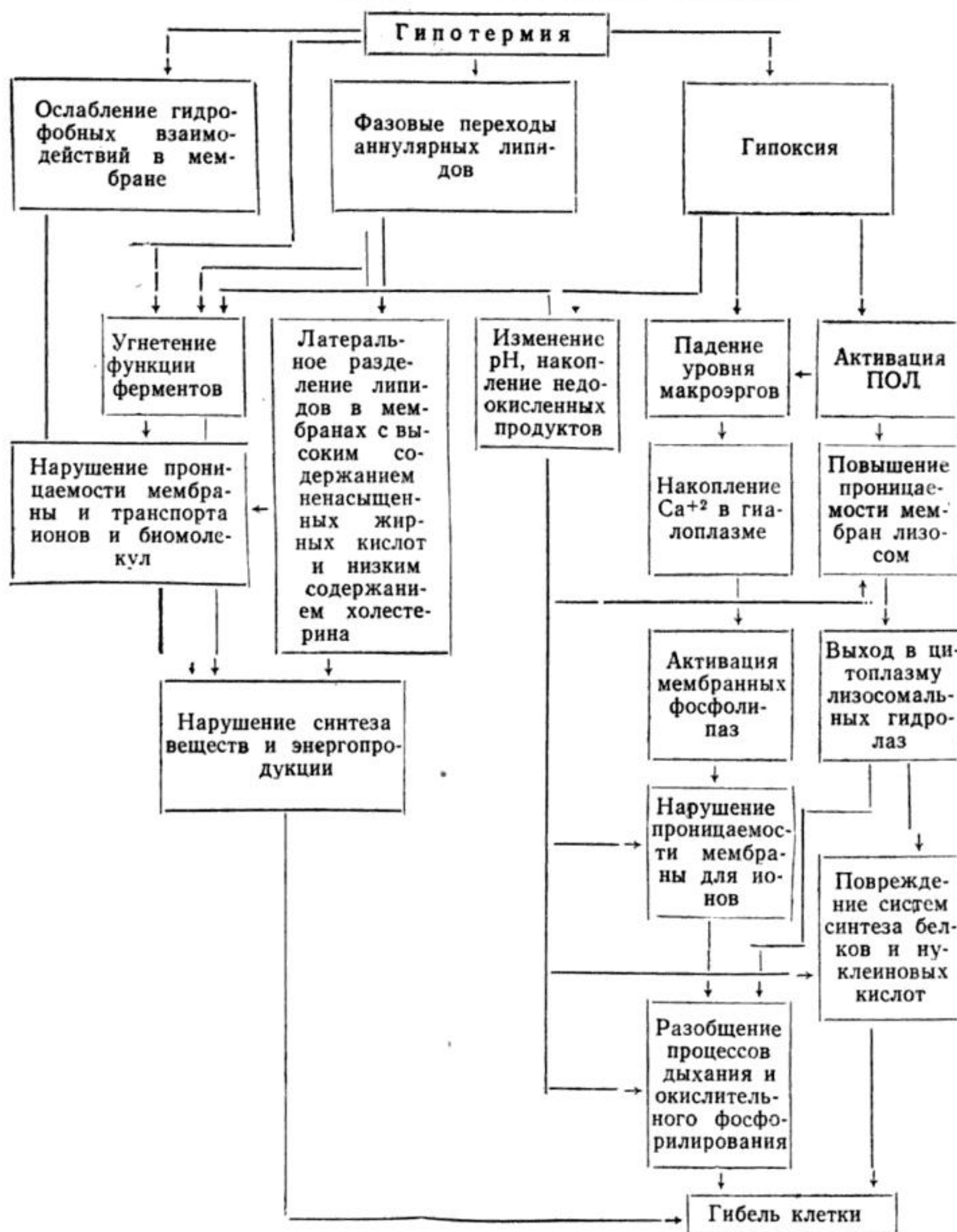


Рис. 3. Аррениусовские кривые температурной зависимости транспорта *p*-нитрофенил- β -глюкозида в *E. coli*, ауксотрофного по ненасыщенным жирным кислотам [95]: 1 — рост при добавлении линолевой кислоты; 2 — рост при добавлении элаидиновой кислоты.

Разделение повреждения клеток в условиях гипотермии



Мембранные структуры клеток второй группы неспособны переносить переохлаждение даже в изоосмотических условиях. Митохондрии, например, при переохлаждении в 40%-ном этиленгликоле до температуры фазового перехода липидов внутренней мембраны (-10°C) теряют некоторые ферменты матрикса [93].

Весьма обширную группу представляют клетки с высоким содержанием холестерина. Учитывая, что холестерин в высоких концентрациях препятствует фазовым переходам липидов [48, 64], можно полагать, что для подобных клеток явления, связанные с «холодовым шоком», маловероятны, хотя справедливость подобного утверждения носит частичный характер. В действительности для подобных клеток сохраняется указан-

ная выше закономерность повреждения, однако она будет развиваться в условиях повышения тоничности среды [37]. Это свидетельствует о том, что в этих условиях важную роль играет состояние междоменных границ, которые претерпевают определенный комплекс изменений в условиях деформации мембраны [3, 17]. К таким процессам, например, относится так называемый гипертонический криогемолиз эритроцитов [37, 50].

Важное значение в проявлении процессов, связанных с фазовыми переходами липидов, принадлежит также различным по плотности липид-белковым доменам, когда изменяется характер упаковки липидных молекул в зоне фазового перехода [63, 64]. В этом случае создаются предпосылки для появления макроскопических «дефектов» в структуре мембраны [41, 53]. По существу в зоне фазового перехода липидов происходит резкое структурное ослабление определенных участков мембраны, которые становятся уязвимыми к действию других физико-химических факторов. Важным следствием подобной нестабильности является резкое возрастание проницаемости мембраны для ионов и биомолекул [41, 61, 81]. В качестве примера развития биохимической патологии в зоне фазового перехода липидов следует указать на резкое повышение активности фосфолипаз [51, 73] и усиление действия токсинов [87], а также других агентов [83]. При замораживании митохондрий активация фосфолипазы [5, 20] происходит именно в зоне фазовых переходов липидов внутренней мембраны [92]. Активация перекисного окисления липидов в митохондриях при замораживании также начинается в температурной зоне фазовых переходов липидов внутренней мембраны [2, 6]. Подобного рода процессы в липидной фазе можно наблюдать и в мембранах других биоструктур и клеток.

Важную роль в нарушении функции клеток, подвергнутых действию низких температур, играют процессы, связанные с агрегацией мембранных белков [21, 42]. По-видимому, основную роль при этом играет степень обратимости их агрегации, а также характер межмолекулярных контактов белков в агрегированном состоянии [84]. Исследования этих процессов на мембранах митохондрий [42] показало, что агрегация цитохромоксидазы, происходящая в результате охлаждения органелл до -10°C , сопровождается нарушением функции этого фермента [42]. Прежде всего это отражается на функции каталитических белков мембранных рецепторов и на адгезивных свойствах клеток. Так, при снижении температуры β -адренорецепторы теряют специфичность и приобретают черты, присущие α -адренорецепторам [71].

Если рассматривать комплексное влияние различных факторов, связанных с фазовыми переходами липидов, становится понятным, почему нарушения функционирования таких важных мембранных структур клетки, как митохондрии, происходят в температурном интервале $0 - \text{минус } 30^{\circ}\text{C}$ [1—6]. Так, в частности, нарушение α -кетоглутаратдегидрогеназной активности этих органелл, по-видимому, связано с действием таких факторов, как фазовые переходы липидов, активация фосфолипазы A_2 и развитие перекисного окисления липидов [3, 20].

Изменения структуры мембраны, связанные с действием высокой ионной силы. Кристаллизация водной фазы охватывает прежде всего чистый растворитель [17]. В результате этого происходит соответствующее концентрирование солей и метаболитов в жидкой микрофазе [69].

Таким образом, процесс льдообразования сопровождается повышением ионной силы раствора. Если подобное концентрирование происходит одновременно внутри и вне клетки, то возникает как лиотропный, так и осмотический эффект [2, 37]. Наиболее важным является то, что действие этих факторов, как и фазовый переход липидов, сопровождается динамическими процессами пространственного перераспределения различных компонентов мембраны [49]. При этом структура мембраны

претерпевает последовательный цикл изменяющихся состояний, каждое из которых характеризуется собственной чувствительностью к низким температурам. Имеющиеся данные показывают, что главную роль при этом играет состояние мембранных липидов, субмембранного ретикулу-ма и цитоскелета клетки [50]. Анализ изменений плазматической мем-браны клетки при ее дегидратации и осмотическом сжатии указывает, что в механизмах криоповреждений важное значение приобретают про-цессы локального сжатия и растяжения различных участков мембраны [63]. В этом случае диффузия белков и липидов из участков сжатия в участки растяжения будет влиять на состояние ассоциированных с ним других структурных элементов — микротрубочек и микрофиламентов. Наибольшее количество данных о роли указанных процессов в механиз-ме холодового повреждения было получено на эритроцитах [37, 50]. Последние как экспериментальная модель позволяют изучить устойчи-вость мембран к охлаждению в зависимости от состояния следующих элементов структуры: аннулярные липиды, основная масса липидов, ли-пид-холестериновые комплексы, интегральные белки и спектрин-актино-вый комплекс, который объединяется под общим названием субмем-бранный ретикулум (СМР). Именно эксперименты, проведенные на эри-троцитах, позволили выявить важное значение СМР в механизме холо-довой чувствительности клеток. Было установлено, что СМР может влиять на степень проявления последствий фазовых переходов, т. е. он обладает определенными восстановительными свойствами. Вместе с тем высокая чувствительность СМР к действию различных физических и хи-мических факторов [79], в том числе к действию высоких концентраций электролитов [50, 69], показывает, что действие высокой ионной силы ре-ализуется прежде всего через структурную модификацию СМР. Нами установлено, что модификация структуры СМР проявляется прежде всего в изменении формы клетки. Существует определенная закономер-ность развития изменений формы, заключающаяся в появлении сначала кренированных (деформированных) форм клетки и переходе их затем в нестабильную сферическую форму, что сопровождается везикуляцией мембраны — процесса, как известно, связанного с модификацией СМР. Изменения формы клеток в гипертонической среде зависят от концен-трации раствора и времени их инкубации. Порогом чувствительности клеток к действию высоких концентраций электролитов и неэлектроли-тов является концентрация 0,6—0,8 М (рис. 4). Следует отметить, что структурная модификация СМР и изменения формы клеток сопровожда-ются прежде всего повышением пассивной проницаемости мембраны для гемоглобина и внутриклеточного K^+ , что может существенно повлиять на состояние клетки при замораживании и отогреве (рис. 5). Как видно из рисунка 5, для проявления гемолиза эритроцита при охлаждении его до $0^\circ C$ существенную роль играет предварительная температура выдер-живания клетки. Так, в присутствии 0,86 М сахарозы защитный эффект проявляется только в том случае, если клетки выдерживали при темпе-ратуре $+15^\circ C$, а затем охлаждали до $0^\circ C$. Этот эффект исчезал, когда клетки охлаждали до $0^\circ C$, предварительно выдержав при температуре $+37^\circ C$. Это свидетельствует о том, что предварительно холодовая адап-тация клеток, при которой фазовый переход липидов происходит плав-но, позволяет в присутствии защитного соединения снизить уровень ге-молиза при $0^\circ C$ после довольно длительного выдерживания клеток при этой температуре. Как известно, в изоэлектрической точке спектрина рН 6,0 проницаемость мембраны эритроцитов для ионов K^+ минимальна. По-видимому, в этих условиях поддерживается полимерное состояние спектрина, который стабилизирует липид-белковые взаимодействия [70, 96].

Криоповреждения мембран как биохимическая патология. При ана-лизе процессов, развивающихся в условиях охлаждения клетки, следует

учитывать возможность нарушения структуры воды мембран [90, 33], биохимическую модификацию липидного матрикса под влиянием процессов перекисного окисления липидов и фосфолипазного повреждения [2, 5, 20], активацию лизосомальных гидролаз [17, 82] и изменение ферментативной активности при фазово-структурных переходах липидов

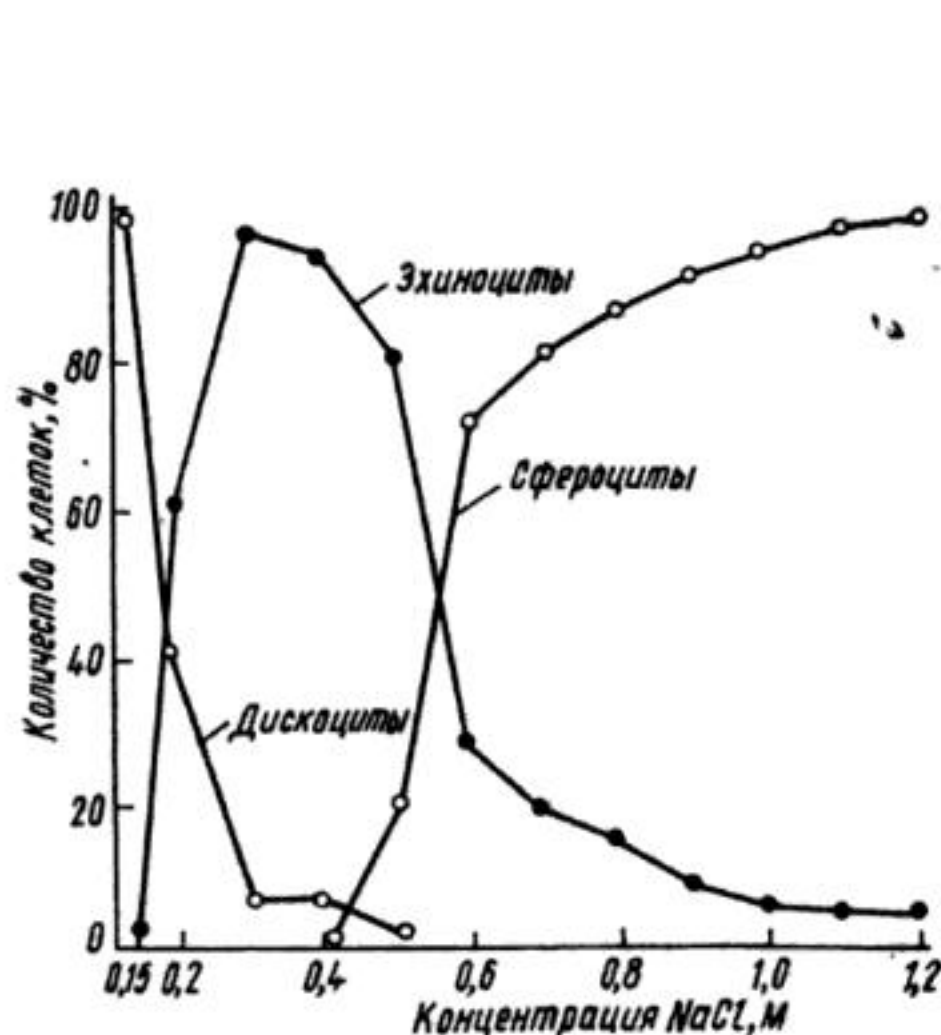


Рис. 4. Изменение формы эритроцитов в зависимости от внеклеточной концентрации NaCl (продолжительность инкубации 10 мин, температура 37°C).

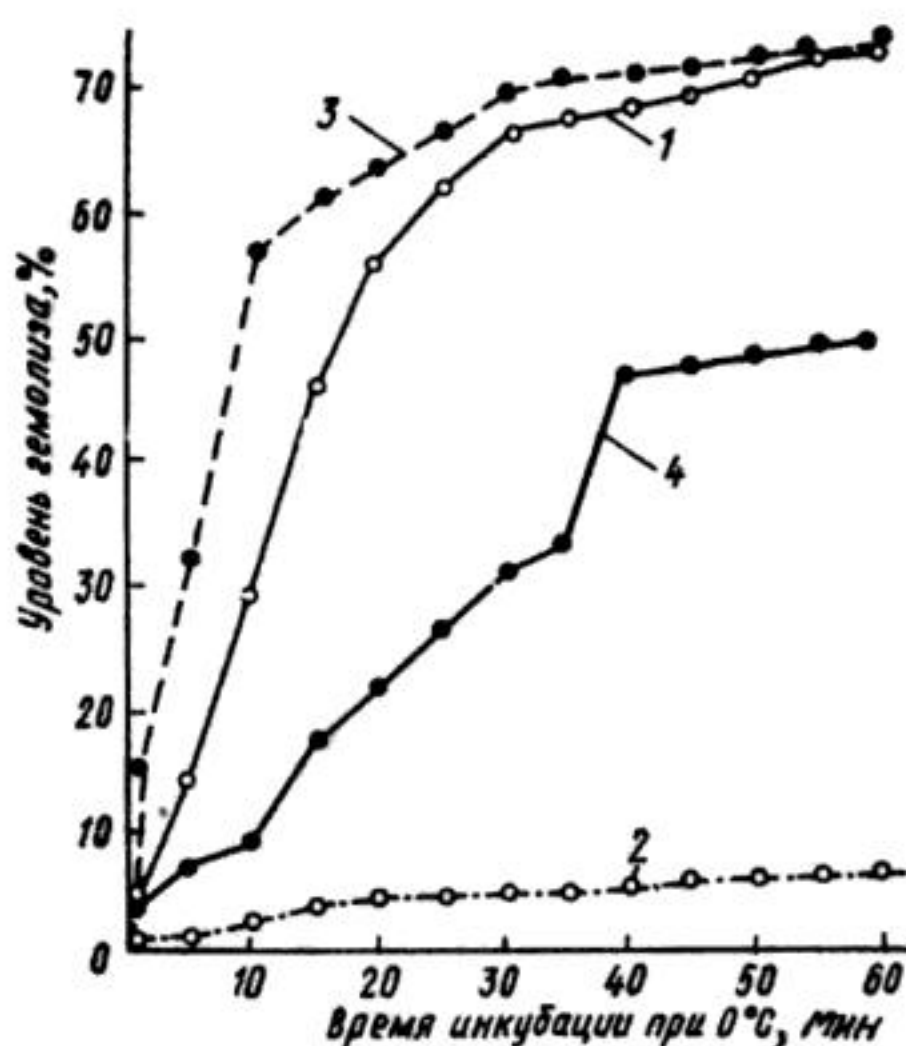


Рис. 5. Динамика гемолиза эритроцитов, подвергнутых охлаждению до 0°C в присутствии 1,2 М NaCl (1, 4) и 0,86 М сахарозы (2, 3). Начальная температура +15°C (1, 2) и +37°C (3, 4), время инкубации 15 мин.

(рис. 6). По-видимому, при этом необходимо учитывать структурные переходы «вицинальной» воды, т. е. водного слоя, локализованного непосредственно у мембраны. Обнаруженные переходы такой воды при +15°C [90], очевидно, влияют на функции белков в мембране.

Механизм модуляции ферментативной активности при изменении фазового состояния липидов остается во многом неясным. Высказано предположение о том, что изменение активности ферментов в зоне фазовых переходов липидов обусловлены латеральным сжатием липидных молекул при фазовом переходе, что ограничивает конформационную подвижность белковых молекул [25]. Подобный механизм достаточно вероятен, и его развитие может играть основную роль в повышении проницаемости мембраны, наиболее выраженное в фазе полуперехода [3, 21, 43]. Повышение проницаемости мембран в зоне фазовых переходов характерно для мембранных структур с низким содержанием холестерина [24], в первую очередь для клеточных органелл — митохондрий [93], лизосом [81] и ядра [97]. Нарушения в биохимизме клетки, связанные с изменениями проницаемости мембраны в зоне фазовых переходов липидов, могут быть весьма значительными, в первую очередь это нарушение ядерно-плазматических отношений [97], утечка ферментов матрикса митохондрий [93], потеря латентности ферментов лизосом [81]. Подобный феномен на уровне микроорганизмов известен как «холодовой шок», и во многих случаях охлаждение до околонулевых температур приводит к гибели таких клеток [29, 91]. Дефектность структуры мембраны при температурах фазовых переходов — фактор, существенно изменяющий характер липид-белковых взаимодействий [8, 12—14]. По-видимому, возрастание активности фосфолипаз в этих условиях [73] не является единственным механизмом нарушения структуры через дефектные участки.

Температура, °C	Изменения среды	Структурно-метаболические нарушения	Морфологические изменения		
+30-0° -25+20 +13+19 +4-0	Г	и п о т е р м и я	А		
0+-30° [0+-21°] [0+-25°]	З а м о р а ж и в а н и е	Фазовый переход вода - лед	Б		
				Первичная кристаллизация	Фазовые переходы основной массы мембранных липидов → Конформационные превращения и изменение активности ферментов
				Формирование межкристаллического льда на клетку	Латеральное разделение липидов → Образование структурных дефектов в плоскости мембраны → Нарушение проницаемости для биокатионов и макромолекул → Подавление биосинтеза белков, нуклеиновых кислот и образование макрорезервов → Элиминация лизосомальных гидролаз, активация мембранных фосфолипидов → Детемпимеризация белков, нуклеиновых кислот, гидролиз фосфолипидов
-40÷-120° -120÷-196°	Твердая фаза	Глубокое торможение метаболических процессов; возможность возникновения реакций за счет колебательных степеней свободы диффузионных процессов в твердой фазе	В		
				Изменение pH и ионной силы среды	Нарушение поверхностных рецепторов и трансмембранных белков → Перекрестное перераспределение белков в липидном бислое → Образование белок-белковых стабильных комплексов → Модификация пространственной структуры ферментов → Выведение клеточных и гормональных метаболитов регуляции метаболизма
				Липотропное разрушение структуры воды и модификация ее свойств как растворителя (образование потенциала замораживания)	Липотропная диссоциация липид-белковых комплексов и олигомерных белков → Индукция цепных перекисных процессов липидов → Образование токсических продуктов распада липидов
-120÷-60° 20÷0°	О т о г р е в	Пространственное сближение макромолекул → возникновение условий для криоденатурации биомacroмолекул, механическое разрушение мембран	Г		
				Деформация мембраны	Дегидратация клетки, уменьшение объема → Осмотическое сжатие клетки
				Частичное вымерзание мембраносвязанной воды → Конформационные изменения белков и полярных головок липидов	Структурно-биохимическая модификация субмембранного ретикула → Кренирование клетки
Гистерезис физико-химических процессов в мембранах и внутриклеточной фазе → возникновение патологической жидкой фазы → Механическое разрушение клетки (низкотемпературный осмотический шок)					

Рис. 6. Схема развития повреждения клеток в условиях замораживания.

Возможно также действие и других химических факторов, включая ионы Ca^{2+} , лизолецитин, продукты метаболизма и т. д. Развитие свободнорадикального окисления липидов при замораживании также связано с нарушением пространственной упорядоченности компонентов мембраны, т. е. одного из основных факторов, ответственного за регуляцию окисления липидов [4, 7, 18].

Процесс агрегации белков мембраны как фактор холодового повреждения мембраны требует изучения. Имеются данные о том, что возрастание степени упорядоченности липидных молекул приводит к активации ферментов [9, 11]. Исследование состояния цитохромоксидазы митохондрий как при охлаждении органелл, так и реконструированных мембран [42] свидетельствует о том, что процесс агрегации способен нарушить нормальное функционирование фермента. В процессе агрегации возможны также формирование неспецифических взаимодействий гликопротеинов поверхности мембраны и их модификация галактозил- и гликозилтрансферазами. Однако наиболее существенный фактор влияния температуры на состояние белков мембран — вероятность нарушения взаимодействия мембранных компонентов и элементов цитоскелета клетки. Комплексное воздействие высокой ионной силы, дегидратации, изменения объема клетки в зоне низких температур способно привести к нарушению функции цитоскелета, тем более, что основной белковый компонент цитоскелета тубулин диссоциирует при охлаждении [40]. Тот факт, что переработка клеток колхицином позволяет в некоторых случаях повысить их устойчивость к замораживанию [34], свидетельствует о важной роли цитоскелета в устойчивости к их охлаждению.

Анализ механизмов температурозависимых изменений структуры и функции клеток, представленных на рис. 6, свидетельствует о том, что основные холодовые нарушения их мембранных структур развиваются в температурной зоне 0 — минус 30°C. Более низкие температуры (от —40 до —120° и —196°C) вызывают лишь дополнительные повреждения ранее модифицированных структур клетки за счет явлений частичной либо полной рекристаллизации твердой фазы. Следует полагать, что возникшие изменения в мембранных структурах клеток при охлаждении и замораживании проявляются в процессе отогрева, когда после таяния кристаллов льда возникают потоки воды через дефектные участки мембраны. Это приводит к осмотическому шоку и разрыву клетки. При этом необходимо учитывать возможность частичного восстановления структурно-функциональной целостности клетки в результате процессов самосборки макромолекул и репарации ее поврежденных частей. Однако эти клеточные процессы в деконсервированном периоде изучены в недостаточной мере.

Все описанные в настоящей статье изменения в мембранных структурах ядродержащих клеток, охлажденных и замороженных до —196°C без присутствия в среде криопротекторных добавок, в предварительном виде представлены на рис. 6, в котором сделана попытка показать зависимость структурно-метаболических и морфологических нарушений в клетке от изменения температуры и среды. Хотя данная схема требует своего дальнейшего обсуждения и уточнения, однако она может оказаться полезной при выработке основы для построения общей теории криоповреждений на клеточном уровне.

1. Белоус А. М., Бондаренко В. А., Бондаренко Т. П. Биохимические изменения фосфолипидного состава мембран под влиянием низких температур. — *Вісн. АН УССР*, 1977, № 9, с. 54—65.
2. Белоус А. М., Бондаренко В. А., Бондаренко Т. П. Влияние замораживания-оттаивания на липидный состав митохондрий. — *Биохимия*, 1978, 43, № 12, с. 2175—2182.
3. Белоус А. М., Бондаренко В. А., Бондаренко Т. П. Молекулярные механизмы криоповреждений биомембран. — *Итоги науки и техники. Сер. Биофизика*, 1978, 9, с. 80—114.

4. Бондаренко В. А., Лемешко В. В., Белоус А. М. Влияние различных режимов замораживания-оттаивания на хемилюминесценцию митохондрий печени крыс. — Укр. биохим. журн., 1975, 47, № 6, с. 743—746.
5. Бондаренко Т. П., Бойко Н. М., Бондаренко В. А., Белоус А. М. Влияние низких температур на активность фосфолипазы A_2 митохондрий печени крыс. — Укр. биохим. журн., 51, № 6, 1979, с. 606—609.
6. Бондаренко В. А., Бондаренко Т. П., Белоус А. М. Окисление липидов митохондрий после замораживания до эвтектических температур. — Укр. биохим. журн., 51, № 5, 1979, с. 487—491.
7. Владимиров Ю. В., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М.: Наука, 1972. — 376 с.
8. Голощапов А. Н., Бурлакова Е. Б. Исследование микровязкости и структурных переходов в липидах белков клеточных мембран методом спиновых зондов. 1. Термoinдуцированные структурные изменения в ядрах различных органов мышей в норме. — Биофизика, 1975, 20, № 2, с. 816—821.
9. Жегунов Г. Ф. Функциональное состояние кальциевого насоса мембран саркоплазматического ретикулума после замораживания в присутствии криопротектора. — В кн.: Вопросы криоконсервирования биологических объектов. Киев: Наук. думка, 1978, с. 35—38.
10. Жегунов Г. Ф., Белоус А. М. Действие низких температур на проницаемость мембран саркоплазматического ретикулума для Ca^{2+} . — Укр. биохим. журн., 1978, 50, № 5, с. 600—603.
11. Жегунов Г. Ф., Максина А. Г., Артемова Л. Г. и др. Изменение структуры мембран саркоплазматического ретикулума после воздействия на них низких температур. — Докл. АН УССР, 1978, 10, № 5, с. 924—926.
12. Кирсенко О. В., Вавилова Г. Л. Роль фосфолипидов в проявлении Са-АТФ-азной активности. — Укр. биохим. журн., 1971, 43, № 1, с. 25—29.
13. Конев С. В., Аксенцев С. Л., Черницкий Е. А. Кооперативные переходы белков в клетке. — Минск: Наука и техника, 1970. — 202 с.
14. Конев С. В., Аксенцев С. Л., Черницкий Е. А. и др. К вопросу о множественности дискретных структурных состояний биологических мембран. — Изв. АН БССР. Сер. биол. наук, 1973, № 5, с. 1—68.
15. Конев С. В., Вологовский И. Д. Структурные перестройки биологических мембран. — В кн.: Биомембраны. Рига: Зинатне, 1977, с. 42—76.
16. Лозина-Лозинский Л. К., Румянцева В. М. Сравнительное исследование действия переохлаждения и замораживания на дрожжевые клетки. — Цитология, 1978, 20, № 1, с. 74—79.
17. Пушкарь Н. С., Белоус А. М. Введение в криобиологию. — Киев: Наук. думка, 1975. — 345 с.
18. Суслова Т. Б., Владимиров Ю. А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — В кн.: Биологические мембраны. М.: Медицина, 1973, с. 75—94.
19. Черницкий Е. А. Люминесценция и структурная лабильность белков в растворе и клетке. — Минск: Наука, 1972. — 279 с.
20. Araki T. Inactivation of mitochondrial 2-oxoglutarate dehydrogenase complex as a result of phospholipid degradation induced by freeze-thawing. — Biochim. et biophys. acta, 1977, 496, N 4, p. 532—546.
21. Armond P. A., Staehelin L. A. Lateral and vartical displacement of integral membrane proteins during lipid phase transition in *Anaestis-Nidulaus*. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979, 76, N 4, p. 1901—1906.
22. Ashe G. B., Steim J. M. Membrane transitions in gram—positive bacteria. — Biochim. et biophys. acta, 1971, 233, N 6, p. 810—814.
23. Bertoli E., Finean J. B., Griffiths D. E. The role of lipid in regulation of mitochondrial adenosine triphosphatase. — FEBS Letters, 1976, 61, N 2, p. 163—165.
24. Blazyk J. E., Steim J. M. Phase transitions in mammalian membranes. — Biochim. et biophys. acta, 1972, 266, N 5, p. 737—742.
25. Block M. C., Deenen L. L. M., De Gier J. Effect of the gel to liquid crystalline phase transition on the osmotic behavior of phosphatidylcholine lysosomes. — Biochim. et biophys. acta, 1976, 433, N 1, p. 1—12.
26. Chapman D., Urbina J. Phase transitions and bilayer structure of *Mycoplasma Laidlawii* B. — FEBS Letters, 1971, 12, N 1, p. 169—172.
27. Chapman D. Phase transitions and fluidity characteristics of lipids and cell membranes. — Quart. Revs Biophys., 1975, 8, N 2, p. 185—235.
28. Chapman D. Recent studies of liquid crystals of biological importance. — Pure and Appl. Chem., 1974, 38, N 1, p. 59—69.
29. Darin-Bennett A., White I. G. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on succceptibility of cold shock. — Cryobiology, 1977, 14, N 4, p. 466—470.
30. Eletr S., Inesi G. Phase changes in the liquid moisties of sarcoplasmic reticulum membranes. induced by temperature and protein conformation changes. — Biochem. et biophys. acta, 1972, 290, N 1, p. 178—185.
31. Eletr S., Keith A. Spin-label studies of dynamics of lipid alkyl chains in biological

- membranes. Role of unsaturated sites. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1972, **69**, N 3, p. 1353—1357.
32. *Eletr S., Zakim D., Vessey D. A.* A spin label study of the role of phospholipids in the regulation of membrane-bound microsomal enzymes. — *J. Mol. Biol.*, 1973, **78**, N 2, p. 351—362.
 33. *Farrant J.* Water transport and cell survival in cryobiological procedures. — *Phil. Trans. Roy. Soc. London B*, 1977, **278**, N 959, p. 191—203.
 34. *Frim J., Snyder R. A., Mc Gann L. E., Kruuv J.* Growth kinetics of cells following freezing in liquid nitrogen. — *Cryobiology*, 1978, **15**, N 5, p. 502—517.
 35. *Gier J.* Comparative permeability studies on liposomal and biological membranes with various lipid compositions. — *Biochem. Soc. Trans.*, 1973, **1**, N 2, p. 331—333.
 36. *Grant C. W. M.* Lipid lateral phase separations. Spin label freeze-fracture electron microscopy studies. — *Biophys. J.*, 1975, **15**, N 9, p. 949—952.
 37. *Green F. A., Jung C. G.* Cold-induced hemolysis in a hypertonic milieu. — *J. Membrane Biol.*, 1977, **33**, N 3/4, p. 249—262.
 38. *Haest C. W. M., de Gier J., Van Es G. A., Verkleij A. J., Van Deenen L. L. M.* Fragility of the permeability barrier of *Escherichia coli*. — *Biochim. et biophys. acta*, 1972, **288**, N 1, p. 43—53.
 39. *Haest C. W. M., Verkleij A. J., de Gier J., Scheek R., Ververgaert P. H. J., Van Deenen L. L. M.* The effect of lipid phase transitions on the architecture of bacterial membranes. — *Biochim. et biophys. acta*, 1974, **356**, N 1, p. 17—26.
 40. *Hajos F., Csillag A., Kalman M.* The morphology of microtubules in incubated synaptosomes. Effect of low temperature and vinblastine. — *Exp. Brain Res.*, 1979, **35**, N 2, p. 387—391.
 41. *Hertz R., Barenholz Y.* Permeability and integrity properties of lecithin—sphingomyelin liposomes. — *Chem. and Phys. Lipids*, 1975, **15**, N 2, p. 138—156.
 42. *Hochli M., Harkenbrock C. R.* Lateral translation diffusion cytochrome c-oxidase in mitochondrial energy-transducing membrane. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1979, **76**, N 3, p. 1236—1240.
 43. *Hokin L. E., Hexum T. D.* Studies on the characterization of the sodium-potassium transport adenosine triphosphatase. IX. On the role phospholipids in the enzyme. — *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1972, **151**, N 5, p. 453—461.
 44. *Howell J. I., Ankong Q. F., Cramp F. C. et al.* A membrane fluidity and membrane fusion. — *Biochem. J.*, 1972, **130**, N 1, p. 1130—1135.
 45. *Houslay M. D., Hesketh T. R., Smith G. A., Warren G. B., Metcalfe J. C.* The lipid environment of the glucagon receptor regulates adenylate cyclase activity. — *Biochim. et biophys. acta*, 1976, **436**, N 2, p. 495—504.
 46. *Inesi G., Milman M., Eletr S.* Temperature-induced transitions of function and structure in sarcoplasmic reticulum membranes. — *J. Mol. Biol.*, 1973, **81**, N 4, p. 483—504.
 47. *Inoue K.* Permeability properties of lysosomes prepared from dipalmitoyllecithin, dimyristoyllecithin, egg lecithin rat liver lecithin and beef brain sphingomyelin. — *Biochim. et biophys. acta*, 1974, **339**, N 3, p. 390—402.
 48. *Jain M. K.* Role of cholesterol in biomembranes and related systems. — *Gurr. Top. Membranes and Transp.*, 1975, **6**, p. 1—70.
 49. *Jain M. K., White H. B.* III. Long-range order in biomembranes. — *Adv. Lipid Res.*, 1977, **15**, p. 1—60.
 50. *Jung C. Y., Green F. E.* Hypertonic cryohemolysis: ionophore and pH effects. — *J. Membrane Biol.*, 1978, **39**, N 2/3, p. 273—284.
 51. *Kannagi R., Kolzumi K.* Effect of different physical studies of phospholipid substrates on partially purified platelet phospholipase A₂ activity. — *Biochim. et biophys. acta*, 1979, **556**, N 3, p. 423—434.
 52. *Kruiff B., Cullis P. R., Radda G. K.* Differential scanning calorimetry and ³¹P NMR studies on sonicated and unsonicated phosphatidylcholine liposomes. — *Biochim. et biophys. acta*, 1975, **406**, N 1, p. 6—20.
 53. *Lawaezeck R., Kainosho M., Chan S. I.* The formation and annealing of structural defects in lipid bilayer vesicles. — *Biochim. et biophys. acta*, 1976, **443**, N 3, p. 313—330.
 54. *Le Maire M., Lind K. E., Jorgensen K. E., Roigaard H., Moller J. V.* Enzymatically active Ca²⁺ ATPase from sarcoplasmic reticulum membranes, solubilized by non-ionic detergents. Role of lipid for aggregation of protein. — *J. Biol. Chem.*, 1978, **253**, N 19, p. 7051—7061.
 55. *Lee A. G., Birrell N. J. M., Metcalfe J. C., Toon A. P., Warren G. B.* Clusters in lipid bilayers and interpretation of thermal effects in biological membranes. — *Biochemistry*, 1974, **13**, N 18, p. 3699—3705.
 56. *Lee A. G.* Functional properties of biological membranes: a physical-chemical approach. — *Progr. Biophys. and Mol. Biol.*, 1975, **29**, N 1, p. 3—56.
 57. *Lee A. G.* Annular events: lipid-protein interactions. — *Trends. Biochem. Sci.*, 1977, **2**, N 10, p. 231—233.
 58. *Lee A. G.* Calculation of phase diagrams for non-ideal mixtures of lipids and possible non-random distribution of lipids in lipid mixtures in the liquid crystalline phase. — *Biochim. et biophys. acta*, 1978, **507**, N 3, p. 433—444.

59. *Lenas G., Sechi A. M.* Architecture and asymmetry of biomembranes. — *Ital. J. Biochem.*, 1976, N 6, p. 427—516.
60. *Levine Y. K.* X-ray diffraction studies of membranes. — *Progr. Surface Sci.*, 1973, 3, N 4, p. 279—352.
61. *Linden C. D., Wright L., McConnel H. M., Fox C. F.* Lateral phase separations in membrane lipids and the mechanism of sugar transport in *Escherichia coli*. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1973, 70, N 6, p. 2271—2275.
62. *Lyons J. M.* Phase transitions and control of cellular metabolism at low temperature. — *Cryobiology*, 1972, 9, N 5, p. 341—350.
63. *Marcelja S.* Lipid-mediated protein interaction in membranes. — *Biochim. et biophys. acta*, 1976, 455, N 1, p. 1—7.
64. *Marcelja S., Wolfe J.* Properties of bilayer membranes in the phase transition or phase separation region. — *Biochim. et biophys. acta*, 1979, 557, N 1, p. 24—32.
65. *Marsh D.* Statistical mechanism of the fluidity of phospholipid bilayers and membranes. — *J. Membr. Biol.*, 1974, 18, N 1, p. 145—151.
66. *Melchior D. L., Morowitz H. J., Sturtevant J. M. et al.* Characterization of the plasma membrane of *Mycoplasma Laidwalii*. VII. Phase transitions of membrane lipids. — *Biochim. et biophys. acta*, 1970, 219, N 1, p. 114—122.
67. *Meryman H. T.* General principles of freezing and freezing injury in cellular materials. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1960, 85, p. 503—509.
68. *Meryman H. T.* Freezing injury and its prevention in living cells. — *Ann. Rev. Biophys. and Bioeng.*, 1974, 3, p. 341—363.
69. *Meryman H. T., Williams R. J., Douglas M. St. J.* Freezing injury from «solution effects» and its prevention by natural or artificial cryoprotection. — *Cryobiology*, 1977, 14, N 3, p. 287—302.
70. *Mombers C., Verkleij A. J., de Gier J., van Deenen L. L. M.* The interaction on spectrin-actin and synthetic phospholipids. II. The interaction with phosphatidylserine. — *Biochim. et biophys. acta*, 1979, 551, N 2, p. 271—282.
71. *Mori K., Hashimoto H., Hasegawa H., Nakashima M.* Influence of temperature of the sensitivity of the adenoreceptors in the isolated atria of guinea pigs and rats. — *Eur. J. Pharmacol.*, 1979, 55, N 2, p. 189—199.
72. *Nagle J. F., Scott H. L.* Lateral compressibility of lipid mono- and bilayers: Theory of membrane permeability. — *Biochim. et biophys. acta*, 1978, 513, N 2, p. 236—244.
73. *Op den Kamp J. A. F., de Gier J., van Feenen L. L. M.* Hydrolysis of phosphatidylcholine liposomes by pancreatic phospholipase A₂ at the transition temperature. — *Biochim. et biophys. acta*, 1974, 345, N 2, p. 253—256.
74. *Phillips M.* The physical state of phospholipids and cholesterol in monolayers, bilayers and membranes. — *Progr. Surface and Membr. Sci.*, 1972, 5, p. 139—221.
75. *Powers L., Pershau P. S.* Monodomain samples of dipalmitoyl phosphatidylcholine with varying concentrations of water and other ingredients. — *Biophys. J.*, 1977, 20, N 2, p. 137—153.
76. *Prestegard J. H., Kantor H. L.* Rapture and transformation of lipid bilayer membranes of thermal phase transitions. — *Cryobiology*, 1978, 15, N 2, p. 219—221.
77. *Raison J. K., Lyons J. M., Thomson W. W.* The influence of membranes on the temperature induced changes in the kinetics of some respiratory enzymes of mitochondria. — *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1971, 142, N 1, p. 83—90.
78. *Raison J. K., McMurchie E. J.* Two-temperature-induced changes in mitochondria membranes detected by spin labelling and enzyme kinetics. — *Biochim. et biophys. acta*, 1974, 363, N 2, p. 135—140.
79. *Ralston G. B.* The influence of salt on the aggregation state of spectrin from bovine erythrocyte membranes. — *Biochim. et biophys. acta*, 1976, 443, p. 387—393.
80. *Reinert J. C., Steim J. M.* Calorimetric detection of a membrane lipid phase transition in living cells. — *Science*, 1970, 168, N 5438, p. 1580—1582.
81. *Ruth R. C., Weglicki W. B.* The temperature-dependence of the loss of latency of lysosomal enzymes. — *Biochem. J.*, 1978, 172, N 1, p. 163—177.
82. *Sakai T., Makino H., Tanaka R.* Increased activity of cyclic AMP phosphodiesterase from frozen-thawed rat liver. A role of lysosomal protease in enzyme activation. — *Biochim. et biophys. acta*, 1978, 522, N 2, p. 477—490.
83. *Scherphof G., Morselt H., Regts J., Wilsehit J. C.* The involvement of lipid phase transitions in the plasma-induced dissolution of multilamellar phosphatidylcholine vesicles. — *Biochim. et biophys. acta*, 1979, 556, N 2, p. 196—208.
84. *Seltow W. P., Roth S., Edidiu M.* Effects of temperature on glycosyltransferase activity in the plasma membrane of L-cells. — *Exp. Cell Res.*, 1979, 121, N 1, p. 55—63.
85. *Shimshick E. J., McConell H. M.* Lateral phase separation in phospholipid membranes. — *Biochemistry*, 1973, 12, p. 2351—2360.
86. *Sondergaard L.* Role of proteins and lipids in non-linear Arrhenius plots of *Drosophila* mitochondrial succinate-cytochrome c reductase studied by rebinding experiments. — *Biochim. et biophys. acta*, 1979, 557, N 1, p. 208—217.
87. *Strong P. N., Kelly R. B.* Membranes undergoing phase transitions are preferentially hydrolysed by beta-bungarotoxin. — *Biochim. et biophys. acta*, 1977, 469, N 2, p. 231—236.

88. *Sturtevant J. M., Mateo P. L.* Proposed temperature-dependent conformational transitions in D-amino acid oxidase-differential scanning microcalorimetric study. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1978, 75, N 6, p. 2581—2588.
89. *Tanaka R., Teruya A.* Lipid dependence of activity-temperature relationship of Na^+ - K^+ -activated ATPase. — *Biochim. et biophys. acta*, 1973, 323, N 5, p. 584—592.
90. *Van Stevenik J., Ledeboer A. M.* Phase transition in the yeast cell emmbrane: The influence of temperature of the reconstitution of active dry yeast. — *Biochim. et biophys. acta*, 1974, 352, N 1, p. 64—70.
91. *Verma S. P., Wallach F. H.* Multiple thermotropic state transitions in erythrocyte membranes. A laser-Raman study of the ch-stretching and acoustical regions. — *Biochim. et biophys. acta*, 1976, 436, N 2, p. 307—318.
92. *Waring A. J., Glatz P., Vanderkooi L. M.* Subzero temperature study of the inner mitochondrial membrane and related phospholipid membrane system with the fluorescent probe, transparinatic acid. — *Biochim. et biophys. acta*, 1979, 557, N 2, p. 391—399.
93. *Wattiaux, De Coninck S., Dubois F., Wattiaux R.* Lateral phase separations and structural integrity of the inner membrane of rat liver mitochondria: Effect of compression. Implications in the centrifugation of these organelles. — *Biochim. et biophys. acta*, 1977, 471, N 3, p. 421—436.
94. *Williams R. M., Chapman D.* Phospholipids, liquid crystals and cell membranes. — *Progr. Chem. Fats. and Other Lipids*, 1972, 11, p. 1—79.
95. *Wilson G., Fox C. F.* The contribution of fatty acids into lipid phase transitions in *E. coli* membranes at different temperatures. — *J. Mol. Biol.*, 1971, 55, N 1, p. 49—60.
96. *Wu S. H—W., McConell H. M.* Phase separations in phospholipid membranes. — *Biochemistry*, 1975, 14, N 4, p. 847—854.
97. *Wunderlich F., Wallach D. F., Speth V., Fisher H.* Differential effects of temperature on the nuclear and plasma membranes of lymphoid cells: A study by freeze-etch electron microscopy. — *Biochim. et biophys. acta*, 1974, 373, N 1, p. 34—43.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
20.02.80

УДК 57.043.576.3.347

В. А. Бондаренко, А. М. Белоус, Г. Я. Дубур

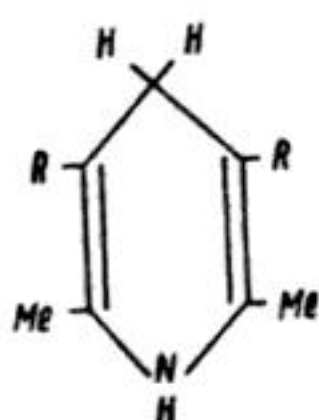
ВЛИЯНИЕ АНТИОКСИДАНТОВ НА УРОВЕНЬ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В МЕМБРАНАХ МИТОХОНДРИЙ ПОСЛЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ-ОТОГРЕВА

Нарушения структурно-функциональной целостности мембран митохондрий, в основе которых лежат изменения химического состояния липидов, могут быть следствием двух процессов: активации мембранных фосфолипаз [14] и развития перекисного окисления липидов (ПОЛ) [6, 15]. Считая развитие первого из указанных выше процессов достаточно вероятным результатом низкотемпературного воздействия, второй процесс — ПОЛ, согласно имеющимся данным [1, 16], можно рассматривать как специфический фактор криповреждения митохондрий.

Как известно, именно липиды митохондрий отличаются выраженной способностью подвергаться ПОЛ [6, 23], поскольку содержат много полиненасыщенных жирных кислот [17]. Кроме того, в митохондриях есть агенты, способные катализировать ПОЛ (геминные белки и негеминное железо) [25]. Развитие ПОЛ во внутренней мембране митохондрий вызывает их необратимые функциональные нарушения, поскольку именно внутренняя мембрана в комплексе с матриксом обеспечивает все интегральные функции этих органелл [33]. В предыдущих наших работах [2, 4], а также в других исследованиях [8] доказано развитие ПОЛ в мембранах замороженных митохондрий и других объектах.

Признание ПОЛ как фактора криповреждения структур, характеризующихся высоким содержанием полиненасыщенных жирных кислот, обусловило проведение нами исследований, направленных на поиск путей предупреждения этих процессов в мембранах замораживаемого

- 1- COOH_2 -
- 2- COOC_6H_5 (n^-)
- 3- $\text{COOC}_6\text{H}_4\text{CH}_3$
- 4 COOC_6H_5 (H^-)
- 5 CONHC_6H_5
- 6 $\text{COOC}_6\text{H}_4\text{OH}$ (n^-)
- 7 COOC_2H_5
- 8 CONH -
- 9 $\text{COOC}_8\text{H}_{17}$
- 10 CONH -
- 11 $\text{COOCH}_2\text{CHCNC}_6\text{H}_5$



с помощью тонкослойной хроматографии по [11, 13] с последующим спектрофотометрированием фракций по [7]. 1,4-ДГП (дилудин-С, дилудин, соединения AV-154-Na, PP-256) инкубировали с митохондриями в среде, содержащей 0,175 М KCl, 0,015 М *трис*-HCl буфера с pH 7,4

Материалы и методы. Митохондрии из печени крысы выделяли по методу [24]. Кинетику Fe^{2+} -активированной хемилюминесценции митохондрий регистрировали, как описано ранее [4]. Определение малонового диальдегида (МДА) проводили по известной методике [18]. Фосфолипидный состав митохондрий изучали

оматографии по [11, 13] с последующим
акций по [7]. 1,4-ДГП (дилудин-С, дилу-
Р-256) инкубировали с митохондриями в
КСИ, 0,015 М *трис*-НСI буфера с рН 7,4

Контроль (нативные)	0,158±0,003
Опыт (замораживание)	0,208±0,004
Замораживание + антиоксиданты	
Дилудин	0,180±0,003
Дилудин-С	0,161±0,003
AV-154	0,179±0,004
PP-256	0,187±0,003

Результаты и их обсуждение. Как видно из представленных ниже данных, при медленном замораживании митохондрий до -25°C в присутствии различных производных 1,4-ДГП ($1 \cdot 10^{-5}$) в среде замораживания снижается количество МДА ($\text{M} \cdot 10^{-6}/\text{мг}$ белка), образующегося к моменту отогрева суспензии. Вместе с тем видно, что в концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ М активность антиоксидантов оказывалась различной. Наиболее активным оказался дилудин-С, практически полностью подавляющий образование МДА при замораживании и отогреве. Другие производные 1,4-ДГП в этой концентрации оказались менее эффективными. Ввиду довольно хорошей растворимости AV-154 и PP-256 в воде было исследовано их действие в более высоких концентрациях. Оказалось, что в концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ М эти антиоксиданты предотвращали накопление МДА при замораживании митохондрий (рис. 2). О высокой активности 1,4-ДГП как антиоксидантов свидетельствовало также значительное изменение кинетики Fe^{2+} -активируемой хемилюминесценции в митохондриях (рис. 3). В присутствии дилудина-С ($1 \cdot 10^{-5}$ М) увеличивался латентный период свечения, уменьшалась амплитуда «медленной» вспышки и снижался уровень стационарного свечения митохондрий. Важной в действии исследуемых криопротекторов явилась их способность сохранять высокую активность не только сразу после замораживания-отогрева, но и более продолжительное время, в процессе хранения отогретых

митохондрий при $+22^{\circ}\text{C}$ (табл. 1). Как видно из табл. 1, после замораживания-отогрева и хранения при $+22^{\circ}\text{C}$ на протяжении 5 ч дилудин-С (ДС) сохранял свою активность, что проявлялось в снижении интенсивности Fe^{2+} -активируемой хемилюминесценции митохондрий, инкубируемых при $+30^{\circ}\text{C}$. Об этом свидетельствовали также результаты изуче-



Рис. 2. Влияние антиоксидантов на уровень ТБК-активных продуктов после отогрева замороженных до -25°C митохондрий: 1 — нативные митохондрии (контроль); 2 — замораживание без антиоксидантов; 3 — замораживание в присутствии ЭДТА; 4 — замораживание + PP-256; 5 — замораживание + AV-154.

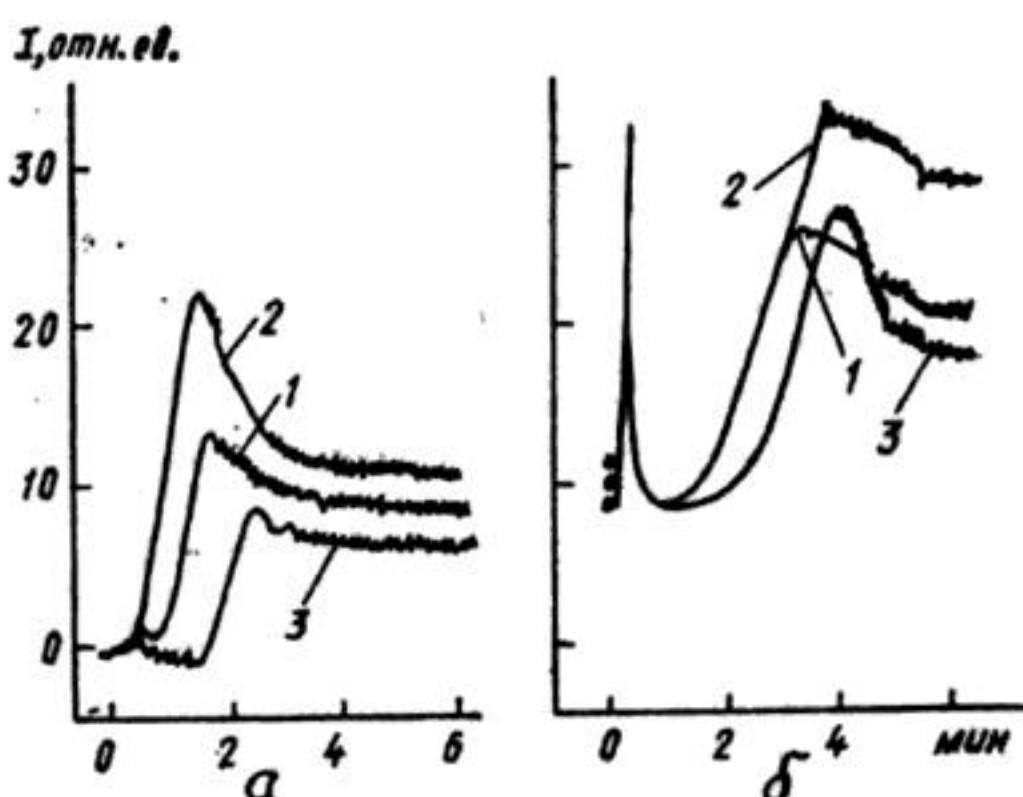


Рис. 3. Кинетика Fe^{2+} -активируемой ($30 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) хемилюминесценции митохондрий после замораживания до -25°C : 1 — нативные (контроль); 2 — замораживание; 3 — замораживание + дилудин-С ($1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$); а — характер медленной вспышки; б — быстрой вспышки свечения.

ния динамики накопления МДА при хранении проб, когда на всем протяжении хранения дилудин-С предотвращал накопление этого продукта перекисления. Для более полного изучения влияния антиоксидантов на развитие ПОЛ в мембранах замороженных митохондрий нами изучено содержание фосфолипидов в отогретых пробах, содержащих и не содержащих производные 1,4-ДГП.

Как видно из табл. 2, добавление антиоксидантов позволяет предотвратить потерю основных видов фосфолипидов при замораживании митохондрий, причем наибольшую эффективность проявляют при этом дилудин-С и AV-154.

В предыдущих исследованиях [1, 3] нами было показано, что именно деградация фосфолипидов является важной причиной нарушения функциональной активности митохондрий, подвергнутых замораживанию. Охлаждение митохондрий до эвтектических температур приводило к уменьшению дыхательного контроля и коэффициента фосфорилирования АДФ/О, а также к изменению кинетики окислительно-восстановительных превращений НАД [12]. Согласно [30], структурное разрушение митохондрий в процессе развития ПОЛ сопровождалось также избирательным уменьшением именно фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина и кардиолипина, вызывающим набухание и лизис органелл [29, 31]. Поскольку для мембран митохондрий характерна «латентность» их повреждения [32], можно полагать, что развитие процессов ПОЛ и сопряженный с ним распад фосфолипидов могут оказать существенное влияние на функционирование липид-зависимых ферментов, локализованных в мембране митохондрий после их длительного хранения [19, 21]. Это подтверждается литературными данными [26, 27], в которых показана элиминация β -оксибутиратдегидрогеназы, а также снижение активности сукцинатоксидазы [28] и цитохромоксидазы [32] после замо-

Таблица 1

Интенсивность Fe^{2+} -активируемой ($3 \cdot 10^{-4}$ М и через 10 мин $5 \cdot 10^{-4}$ М) хемилюминесценции (в тыс. имп.) в зависимости от продолжительности хранения митохондрий при $+22^\circ\text{C}$ после медленного замораживания до -25°C в присутствии $1 \cdot 50^{-5}$ М дилудина-С

Время хранения, ч	Условия опыта	Продолжительность инкубации при $+30^\circ\text{C}$, мин					
		2	p	4	p	10	p
0	Нативные	$1,33 \pm 0,014$	—	$2,33 \pm 0,022$	—	$5,19 \pm 0,024$	—
	Замораживание	$1,61 \pm 0,022$	$< 0,01$	$2,73 \pm 0,014$	$< 0,001$	$5,77 \pm 0,033$	0,001
	Замораживание + ДС	$0,93 \pm 0,52$	$< 0,01$	$1,84 \pm 0,020$	$< 0,001$	$4,93 \pm 0,28$	0,001
1,5	Нативные	$1,60 \pm 0,020$	—	$2,74 \pm 0,020$	—	$6,52 \pm 0,017$	—
	Замораживание	$1,88 \pm 0,020$	$< 0,01$	$3,21 \pm 0,020$	$< 0,001$	$7,35 \pm 0,020$	$< 0,001$
	Замораживание + ДС	$1,46 \pm 0,22$	$< 0,02$	$2,47 \pm 0,022$	$< 0,001$	$5,71 \pm 0,024$	$< 0,001$
5	Нативные	$1,98 \pm 0,220$	—	$3,52 \pm 0,022$	—	$8,36 \pm 0,024$	—
	Замораживание	$2,29 \pm 0,020$	$< 0,01$	$4,02 \pm 0,002$	$< 0,001$	$9,61 \pm 0,024$	$< 0,001$
	Замораживание + ДС	$1,68 \pm 0,22$	$< 0,001$	$3,06 \pm 0,024$	$< 0,001$	$7,19 \pm 0,022$	$< 0,001$

раживания до $-16 \div -20^\circ\text{C}$, связанных с низкотемпературной деградацией фосфатидилхолина. Способность антиоксидантов уменьшать низкотемпературную деградацию фосфолипидов в составе мембраны может явиться важным средством в комплексной защите различных биомате-

Таблица 2

Изменение фосфолипидного состава митохондрий печени крыс при медленном замораживании до -25°C в присутствии различных производных 1,4-ДГП (фосфолипиды в мгк на 1 мг белка)

Фракция фосфолипидов	Нативные (контроль)	Замораживание	Замораживание + 1,4-ДГП		
			AV-154	PP-256	Дилудин-С
Фосфатидилхолин	$0,479 \pm 0,015$	$0,317 \pm 0,015$	$0,416 \pm 0,02$	$0,384 \pm 0,026$	$0,432 \pm 0,023$
Фосфатидилэтаноламин	$0,278 \pm 0,011$	$0,19 \pm 0,01$	$0,258 \pm 0,012$	$0,232 \pm 0,009$	$0,259 \pm 0,013$
Кардиолипид	$0,211 \pm 0,009$	$0,127 \pm 0,011$	$0,19 \pm 0,008$	$0,178 \pm 0,012$	$0,190 \pm 0,011$

риалов при их криоконсервации. В работах [20, 22] была показана эффективность других антиоксидантов бутилированного гидрокситолуола и селенита натрия при замораживании клеток под защитой криопротекторов.

Выводы. Введение в среду производных 1,4-дигидропиридинов ингибирует процессы ПОЛ в мембранах митохондрий после медленного замораживания до -25°C . Наиболее эффективным антиоксидантом оказался дилудин-С в концентрации $10^{-3} - 10^{-5}$ М.

Исследуемые антиоксиданты достоверно снижают степень низкотемпературной деградации фосфолипидов в составе мембран митохондрий, что повышает их структурно-функциональную стабильность после замораживания.

Производные 1,4-ДГП и подобные им антиоксиданты как активные антиокислители целесообразно использовать в составе защитных средств при криоконсервации различных биоматериалов.

1. Білоус А. М., Бондаренко В. А., Бондаренко Т. П. Біохімічні зміни фосфоліпідного складу біомембран під впливом низьких температур. — Вісн. АН УРСР, 1977, № 9, с. 54—64.
2. Белоус А. М., Бондаренко В. А., Бондаренко Т. П. Влияние замораживания-оттаивания на липидный состав митохондрий. — Биохимия, 1978, 43, № 12, с. 2175—2182.
3. Белоус А. М., Бондаренко В. А., Бондаренко Т. П. Молекулярные механизмы криоповреждений биомембран. — Итоги науки и техники. Сер. Биофизика, 1978, 9, с. 80—114.
4. Бондаренко В. А., Лемешко В. В., Білоус А. М. Вплив різних режимів заморожування-відтавання на хемілюмінесценцію мітохондрій печінки щурів. — Укр. біохім. журн., 1975, 47, № 6, с. 743—746.
5. Велена А. Х. Исследование действия антиоксидантов дигидропиридинового ряда на биологические мембраны и их модели: Автореф. ... канд. хим. наук. — Рига, 1975. — 25 с.
6. Владимиров Ю. В., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М.: Наука, 1972. — 345 с.
7. Грибанов Г. А., Сергеев С. А. Экспресс-микроанализ общих липидов сыворотки крови и их фракций. — Вопр. мед. химии, 1975, 21, № 6, с. 652—655.
8. Джафаров А. И., Кольс О. Р. Изменение антирадикальной активности липидов клеточных органелл при глубоком охлаждении. — Биофизика, 1976, 21, № 4, с. 653—656.
9. Дубур Г. Я., Улдрикус Я. Р., Кумерова А. О. и др. Водороднодонорные свойства аналогов дигидроникотинамида. — В кн.: Тез. 7-го Междунар. симпоз. по химии природ. соединений. Рига, 1970, с. 682—683.
10. Зилбер Ю. А., Дубур Г. Я., Кумсар К. К., Велена А. Х. Влияние антиоксидантов на перекисное окисление биомолекулярных фосфолипидных мембран. — Изв. АН ЛатвССР, 1971, 287, № 6, с. 80—82.
11. Кейтс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов. — М.: Мир, 1975, с. 34—42.
12. Лемешко В. В. Влияние различных режимов замораживания и криопротекторов (ПЭО-400 и глицерина) на дыхание и окислительное фосфорилирование митохондрий печени крысы: Автореф. ... канд. биол. наук. — Харьков, 1973. — 21 с.
13. Покровский А. А. Биохимические методы исследования в клинике. — М.: Медицина, 1969. — 652 с.
14. Сороковой В. И., Владимиров Ю. А. Повреждение митохондрий при аноксии. — Итоги науки и техники. Сер. Биофизика, 1975, 5, с. 12—46.
15. Суслова Т. Б., Владимиров Ю. А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — В кн.: Биологические мембраны. М.: Медицина, 1973, с. 75—94.
16. Araki T. Damage of mitochondrial membrane by freezing. II. Site in mitochondrial oxidative system of rabbit liver sensitive to freezing and thawing. — Low Temperature Sci. (Biol. Sci.), 1972, N 1, p. 23—31.
17. Coleman R. Some features of the lipid composition of rat liver surface and cytoplasmic membranes. — Chem. and Phys. Lipids, 1968, 3, N 1, p. 144—146.
18. Estabrook R. W., Pullman M. E. Methods in Enzymology. — New York: Acad. press, 1967, 10, p. 671—672.
19. Fleischer S., Bock H. G., Gazzotti P. Studies of phospholipidprotein interaction in D-L-hydroxybutyrate dehydrogenase a lecithin requiring enzyme. — In: Membrane proteins transport and phosphorylat. Amsterdam, 1974, p. 125—136.
20. Frim J., Rule G. S., Rance M. et al. The effect of membrane lipid perturbens on cold (+5°C) and freeze-thaw survival of mammalian cells. — Cryobiology, 1976, 13, N 6, p. 645—646.
21. Gazzotti P., Bock H. G., Fleischer S. Role of lecithin in D-hydroxybutyrate dehydrogenase function. — Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1974, 58, N 2, p. 309—315.
22. Hackensellner H. A., Mathes G. Some aspects for the further improvement in cell cryopreservation. — Folia haematol., 1979, 106, N 3, p. 389—393.
23. Hanstein W. G., Hatefi Y., Tejada P. Lipid oxidation in biological membranes. II. Kinetics and mechanism of lipid oxidation in submitochondrial particles. — Arch. Biochem. and Biophys., 1970, 138, N 1, p. 87—95.
24. Hunter F. E., Malison J. B., Bridges W. F. Reincorporation of diphosphopyridinnucleotide into mitochondrial enzyme systems. — J. Biol. Chem., 1959, 234, N 5, p. 693—699.
25. Kaschnitz R. M., Hatefi Y. Lipid oxidation in biological membranes. Electron transfer proteins as initiators of lipid autooxidation. — Arch. Biochem. and Biophys., 1975, 171, N 2, p. 292—304.
26. Lusena C. V. Release of enzymes from rat liver mitochondria by freezing. — Can. J. Biochem., 1965, 43, N 6, p. 1787—1798.
27. Lusena C. V., Dass C. M. Structure changes associated with the release of enzymes from rat liver mitochondria by freezing. — Can. J. Biochem., 1966, 44, N 4, p. 775—781.
28. Raison J. K., Lyons J. M., Thomson W. W. The influence of membranes on the tem-

- perature induced changes in the kinetics of some respiratory enzymes of mitochondria. — Arch. Biochem. and Biophys., 1971, 142, N 1, p. 83—90.
29. *Santiago E., Guerra F., Macarulla J. H.* Effect of ascorbate on phospholipids during mitochondrial swelling and lysis. — Rev. esp. fisiol., 1968, 24, N 1, p. 25—29.
 30. *Santiago E., Lopez-Mortalla N., Segovia J. L. et al.* Specific relationships of phospholipids and enzymes in the inner mitochondrial membrane. — In: 9th Intern. Congr. Biochem. Stockholm: Abstr. Book., 1973, p. 257—258.
 31. *Santiago E., Vazquez J. J., Guerra F.* Ascorbate induced lysis in inner mitochondrial membrane. Isolation and electron microscopic studies of three subfractions. — Rev. esp. fisiol., 1968, 24, N 1, p. 31—35.
 32. *Sherman J. K.* Correlation in cryo-injury of mitochondrial ultrastructure with respiratory control ratio, cytochrome oxydase activity and rate of tissue oxygen consumption. — Cryobiology, 1970, 7, N 6, p. 581—582.
 33. *Smoly J. M., Kuylensstierna B., Ernster L.* Topological and functional organization of the mitochondrion. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1970, 66, N 1, p. 121—135.

Институт проблем криобиологии и
криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
05.03.80

УДК 541.49:576.3:57.083

Т. А. Глушко

ХАРАКТЕР ДЕЙСТВИЯ КРИОПРОТЕКТОРОВ НА МИТОТИЧЕСКИЙ РЕЖИМ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР

Все эффективные методы криоконсервирования основаны на применении криозащитных веществ — криопротекторов. Последние, являясь обязательными компонентами среды замораживания, контактируют с биологическим материалом на протяжении всего процесса замораживания — размораживания. При этом они, как установлено в работах [2—5], кроме защитного действия (снижение температуры замораживания, уменьшение гиперконцентрации солей и т. д.) оказывают влияние на некоторые стороны метаболизма клеток (снижение активности окислительно-восстановительных ферментов, потребления кислорода, синтеза белка и ДНК). Все указанные изменения, естественно, отражаются на нормальном течении метаболизма клеток и влияют на способность их к дальнейшей пролиферации. Вместе с тем в литературе отсутствуют данные о влиянии криопротекторов на митотический режим клеток. В связи с этим цель настоящей работы — изучение характера действия криопротекторов на митотический режим клеточных культур.

Материалом исследования служили краткосрочная культура лейкоцитов периферической крови человека, стимулированная ФГА, и однослойная перевиваемая культура фибробластоподобных клеток китайского хомячка (клон 237). Криопротектором служил глицерин, оксиэтилированный глицерин пятой степени полимеризации (ОЭГ $n=5$) и полиэтиленоксид молекулярной массы M_m 400 (ПЭО=400), из которых два последних вещества синтезированы в Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР.

Криопротекторы добавляли в среду культивирования в 2,5; 5 и 10%-ных конечных концентрациях в начале культивирования клеток. Контролем служили образцы клеточных культур, растущие в среде без добавления криопротекторов. Клетки крови культивировали в течение 69 ч при температуре 37°C по применяемой нами ранее методике [1]. Культивируемые клетки китайского хомячка инкубировали в течение 4 ч с исследуемыми криопротекторами при температуре 37°C. Клеточную суспензию в среде Игла с 10% бычьей сыворотки рассеивали по 2 мл с концентрацией клеток 2×10^5 в 1 мл в пенициллиновые флаконы с плексигласовыми крышками. После 4 ч инкубирования плексигласовые крышки с осевшими на них клетками тщательно промывали в растворе Хенкса, часть из них фиксировали в спирт-уксусной кислоте (3:1), остальные переносили в свежую питательную среду, продолжая культивировать их

Таблица 1

Изменение митотического режима краткосрочной культуры периферической крови человека при инкубировании с криопротекторами ($M \pm m$, $n=5$)

Культура	Количество бластных клеток		Митотический индекс		Количество метафаз	
	в %	% к контролю	в ‰	% к контролю	в %	% к контролю
Контроль ПЭО-400	$82,5 \pm 3,4$		$38,4 \pm 1,7$		$51,0 \pm 3,6$	
2,5%	$46,6 \pm 3,1^{**}$	57	$32,8 \pm 2,6$	85	$57,0 \pm 4,8$	112
5%	$25,6 \pm 4,4^{***}$	31	$18,0 \pm 1,9^{***}$	47	$69,9 \pm 6,1^*$	137
10%	$14,4 \pm 3,5^{***}$	18	$13,4 \pm 2,5^{***}$	35	$71,1 \pm 7,3^*$	137
Контроль ОЭГ $n=5$	$51,2 \pm 2,5$		$37,3 \pm 6,1$		$59,4 \pm 7,6$	
2,5%	$72,6 \pm 7,1$	89	$28,3 \pm 1,1$	76	$67,8 \pm 8,6$	114
5%	$60,0 \pm 9,1$	74	$11,6 \pm 3,1^{**}$	31	$84,3 \pm 8,8^*$	142
10%	$32,6 \pm 8,1^{***}$	40	$9,7 \pm 3,1^{**}$	26	$76,8 \pm 5,4^*$	129
Контроль Глицерин	$90,3 \pm 4,1$		$40,2 \pm 5,3$		$59,1 \pm 5,2$	
2,5%	$88,0 \pm 2,5$	97	$35,2 \pm 2,6$	88	$76,7 \pm 2,5^*$	130
5%	$70,2 \pm 4,1^{**}$	78	$28,2 \pm 2,8^*$	70	$79,9 \pm 4,8^*$	135
10%	$72,6 \pm 2,4^{**}$	80	$13,2 \pm 0,6^{**}$	33	$80,3 \pm 6,3^*$	136

* $p < 0,05$.
 ** $p < 0,01$.
 *** $p < 0,001$.

при той же температуре. Фиксацию этого материала проводили соответственно через 2 и 24 ч роста после отмывания. Контрольные культуры подвергали той же обработке. На окрашенных препаратах культур клеток крови китайского хомячка определяли митотический индекс (МИ) в промилле, количество бластных клеток в процентах и соотношение фаз митоза в процентах к соответствующему МИ. Результаты статистически обрабатывали по методу Фишера—Стьюдента.

Проведенные исследования показали, что добавление исследуемых криопротекторов в среду культивирования клеток крови достоверно снижает их МИ (табл. 1). Одновременно в этих культурах с увеличением концентрации криопротекторов в питательной среде до 10% отмечали изменение в процентных соотношениях отдельных фаз митоза, которые выражались в снижении количества профаз и ана-телофаз до полного отсутствия последних. Анализ распределения отдельных фаз митоза выявил достоверное увеличение относительного числа метафаз по сравнению с контрольным уровнем ($p < 0,05$). Наряду с этим отмечалось достоверное снижение количества бластных клеток во всех опытных культурах, особенно при 5—10%-ной концентрации.

Анализ митотического режима фибробластоподобных клеток китайского хомячка проводили сразу после контакта с криопротекторами и после отмывания от них культур через 2 и 24 ч. Как показали результаты, представленные в табл. 2, после 4 ч инкубирования клеточных культур с исследуемыми веществами в 5—10%-ных конечных концентрациях, как и в культурах крови, наблюдалась тенденция к снижению МИ по сравнению с контролем. Особенно низкий МИ (почти в 2—3 раза ниже контрольного уровня) отмечался через 2 ч после отмывания клеток от криопротекторов. Через 24 ч роста в свежей питательной среде МИ клеточных культур китайского хомячка сравним с контрольной величиной, за исключением МИ культур, обработанных 5%-ным глицерином, а также ПЭО-400 и ОЭГ в 10%-ной концентрации. Анализ распределения отдельных фаз митоза показал, что после 4 ч инкубирования клеток китайского хомячка с криопротекторами число профаз и ана-телофаз

Изменение митотического режима клеток китайского хомячка после 4-часового инкубирования с криопротекторами ($n=5$)

Концентрация криопротекторов, %	Культура	4 ч после контакта с криопротектором				2 ч после отмывания от криопротектора				24 ч после отмывания от криопротектора			
		Митотический индекс, %	% к контролю	Метафазный индекс, %	% к контролю	Митотический индекс, %	% к контролю	Метафазный индекс, %	% к контролю	Митотический индекс, %	% к контролю	Метафазный индекс, %	% к контролю
2,5	Контроль	25,0±2,4		40,3±3,7		28,2±1,3		41,0±2,7		39,3±2,5		39,2±6,6	
	ПЭО-400	19,0±1,9	76	37,2±3,8	92	24,0±3,1	85	37,4±2,6	91	33,5±2,4	85	40,9±4,3	104
	ОЭГ $n=5$	22,8±4,3	88	43,2±4,2	107	21,5±4,2	75	45,2±7,9	110	37,0±4,5	84	44,4±2,5	113
	Глицерин	28,0±4,6	112	39,8±7,7	99	28,3±1,4	100	42,5±4,2	103	36,0±2,2	89	45,0±2,6	115
5	Контроль	21,8±2,1		53,0±9,5		22,8±2,9		47,8±7,4		41,6±2,9		56,6±4,2	
	ПЭО-400	17,0±2,7	73	76,1±8,3*	143	10,8±2,1**	47	39,2±9,8	80	34,4±3,0	83	47,1±1,8	83
	ОЭГ $n=5$	17,6±2,5	73	74,9±6,5*	141	7,8±0,4***	34	58,0±9,7	121	40,6±2,9	97	53,5±2,6	94
	Глицерин	18,5±2,1	84	82,2±6,2**	165	14,4±4,0**	65	54,0±5,8	114	35,8±1,5*	86	49,9±3,0	88
10	Контроль	21,8±2,1		53,0±9,5		22,8±2,9		47,8±7,4		41,6±2,9		56,6±4,2	
	ПЭО-400	13,0±1,0***	57	74,3±4,2*	140	8,7±2,3***	38	34,4±5,0	72	30,5±2,5**	73	60,1±3,0	106
	ОЭГ $n=5$	6,3±4,6***	28	76,4±2,3**	144	6,3±2,6***	27	44,4±1,5	93	26,3±4,2**	63	60,7±7,8	107
	Глицерин	19,0±1,5	86	85,6±2,0***	161	6,4±0,8***	28	67,5±5,0**	141	34,2±3,5	82	63,8±6,7	95

* $p < 0,05$.** $p < 0,01$.*** $p < 0,001$.

уменьшается, а число метафаз достоверно увеличивается по сравнению с контролем. В более поздние сроки роста (через 2 и 24 ч после отмывки от веществ), количество профаз нарастало, а количество метафаз и ана-телофаз достигало в основном контрольного уровня.

Таким образом, изучение влияния таких криопротекторов, как глицерин, ПЭО-400 и ОЭГ $n=5$ в различных концентрациях, на митотический режим краткосрочной культуры периферической крови человека и перевиваемой линии фибробластоподобных клеток китайского хомячка выявило однотипный характер действия этих веществ на рост клеток в культуре. При этом установлены некоторые особенности митотического режима исследуемых клеточных культур, выражающиеся в снижении митотического индекса, количества бластных клеток и увеличении относительного числа метафаз по мере увеличения концентрации криопротекторов в среде культивирования. Полученные данные свидетельствуют об антимитотическом и статмокинетическом действии криопротекторов, носящем обратимый характер после отмывания клеточных культур.

1. Панков Е. Я., Маркова О. П., Глишко Т. А., Яцына Б. М. Особенности роста клеток крови в культуре в присутствии криопротектора полиэтиленоксида 400. — Бюл. эксперим. биол. и мед. 1978, № 6, с. 729—731.
2. Пушкар Н. С., Белоус А. М. Введение в криобиологию. — Киев: Наук. думка, 1975. — 344 с.
3. Пушкар Н. С., Шраго М. И., Белоус А. М., Калугин Ю. В. Криопротекторы. — Киев: Наук. думка, 1978. — 204 с.
4. Шраго М. И. Криопротекторы. — В кн.: Криоконсервирование иммунокомпетентной ткани. Киев: Наук. думка, 1979, с. 63—71.
5. Yasukawa M., Terasima T., Yamada M., Matsumura N. Inactivation of proliferative capacity of cultured mammalian cells by liquid nitrogen storage procedure. — Cryobiology, 1974, 11, N 6, p. 493—499.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
08.02.80

УДК 57.043.612.112.014.41

Т. П. Говоруха, Б. А. Скорняков

УЛЬТРАСТРУКТУРА ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ ПОСЛЕ ИНКУБАЦИИ С ПОЛИЭТИЛЕНОКСИДОМ-400 И ОКСИЭТИЛИРОВАННЫМ ГЛИЦЕРИНОМ

Низкие температуры получили широкое применение для консервирования цельной крови и ее фракций [3]. Это обусловлено прежде всего внедрением в практику криопротекторов, среди которых наиболее распространенными являются глицерин, ДМСО, ПЭО-400 [1, 8]. Однако действие этих криопротекторов на структуру клеток крови изучено в недостаточной степени [2, 5]. В то же время, согласно работам В. Н. Теодоровича и Г. А. Козлова [6], Кроули и соавт. [7], глицерин и ДМСО, используемые для консервирования крови, обладают определенным повреждающим действием. Показано, что после инкубирования лейкоцитов с ДМСО в течение 1 ч жизнеспособность составляла 50%, а спустя 24 ч их количество уменьшалось до 40%. Повреждающее действие глицерина и ДМСО было также показано на субклеточных органеллах. Так, Вайс и Армстронг [11] установили, что при инкубации клеток с 15%-ным глицерином в течение 1 ч происходят набухание клеток, просветление цитоплазмы, нарушение целостности митохондрий. Согласно данным Н. С. Пушкар и соавт. [4], ПЭО-400 вызывает меньшие изменения в ультраструктуре лейкоцитов, чем глицерин и ДМСО. Ультраструктурные характеристики клеток лейкоконцентрата при эквilibрации их с ОЭГ в литературе отсутствуют.

В связи с этим основной целью настоящей работы явилось изучение ультраструктуры лейкоцитов периферической крови человека после

эквilibрации с криопротекторами ПЭО-400 и ОЭГ на этапе подготовки к низкотемпературному консервированию. Объектом исследования служил лейкоконцентрат свежезаготовленной крови человека на ЦОЛИПК-76.

Образцы для электронно-микроскопических исследований готовили по следующей методике: суспензию лейкоцитов объемом 10 мл центрифугировали при 1000 об/мин. Из общего объема лейкоконцентрата отбирали порции по 0,2 мл, которые фиксировали в 5%-ном глутаральдегиде, постфиксировали в 2%-ном OSO_4 , обезвоживали в ацетоне и заливали в эпон-аралдитовую смесь. Полимеризация проводилась при температуре $+60^\circ\text{C}$. Срезы, изготовленные на ультрамикротоме УМТП-2, просматривали на микроскопе ЭМВ-100А.

Исследовали лейкоконцентрат после инкубации при температуре $+4^\circ\text{C}$ в течение 30 мин с 10%-ными растворами ПЭО-400 и ОЭГ со степенью полимеризации $n=5$. Контролем служил лейкоконцентрат, инкубированный при температуре 4°C 24 ч в растворе ЦОЛИПК-76.

Анализ результатов исследований показал, что в контроле ультраструктура лейкоцитов близка к нативному состоянию. Большинство нейтрофильных лейкоцитов (рис. 1) имело четко очерченное сегментированное ядро, в котором преобладал эухроматин. Перинуклеарное пространство по размерам и форме соответствует норме. Гиалоплазма с мелкодисперсной равномерной зернистостью. Немногочисленные митохондрии округлой формы, небольшие по размерам, с тонкими, четкими кристами. Округлые электронноплотные лизосомы имели частью равномерный матрикс, частью в нем определялись прямоугольной формы кристаллоиды. Небольшие по протяжению канальцы эндоплазматической сети местами несколько неравномерно расширены и имели на наружной поверхности редко расположенные рибосомы. Отдельные нейтрофилы с вакуолеобразным расширением канальцев эндоплазматической сети, увеличенными митохондриями с просветленным матриксом и неравномерно расположенными кристами. Лимфоциты с незначительно складчатой линией цитоплазматической мембраны, однородной структурой гиалоплазмы и с небольшими округлыми митохондриями. Таким образом, инкубация в растворе ЦОЛИПК-76 существенно не изменяет ультраструктуру клеток лейкоцитов.

При инкубации лейкоцитов с ПЭО-400 значительно возрастала гетерогенность клеток. Часть их уменьшилась в размерах в основном за счет объема цитоплазмы. Цитоплазматическая мембрана приобрела более сложный контур, образовалось большое количество мелких микроворсинок. В уплотненной гиалоплазме четко определялись мембранные структуры редкой, с суженными канальцами эндоплазматической сети, митохондрии уплотнились. Структура лизосом существенно не изменилась, но размеры некоторых из них уменьшились. Наблюдается уплотнение гетерохроматина, объем которого в структуре ядра существенно возрос. Одновременно с этим выявлено значительное количество клеток увеличенного размера с равномерно растянутой цитоплазматической мембраной, с гладким наружным контуром. Гиалоплазма местами с единичными мелкими глобулярными и фибриллярными частицами. Эндоплазматическая сеть представлена крупными вакуолеобразными полостями (рис. 2), часть которых содержит остатки крист на внутренней поверхности мембраны, что позволяет считать их сильно набухшими митохондриями. Перинуклеарное пространство неравномерно расширено, местами с вакуолеобразными полостями. В ядре наряду с уплотнением гетерохроматина определяются участки неравномерно просветленной нуклеоплазмы.

После инкубации лейкоцитов с ОЭГ выявлено увеличение гетерогенности клеток, что выражается как в увеличении количества «темных» — уплотненных клеток, так и в появлении «светлых» — набухших

клеток. Вместе с тем следует отметить, что количество «светлых» клеток и клеток с вакуолизацией мембранных компонентов было заметно меньше, чем после инкубации с ПЭО-400. Обнаруживались в основном клетки с неравномерным расширением перинуклеарного пространства (рис. 3).



Рис. 1. Лейкоцит, инкубированный в растворе ЦОЛИПК-76, $\times 12000$.



Рис. 2. Лейкоцит, инкубированный в 10%-ном растворе ПЭО-400, $\times 12000$.

Таким образом, инкубация в растворах ПЭО-400 и ОЭГ определенным образом изменяет структуру некоторых клеток, что сопровождается увеличением их гетерогенности и появлением сжатых и набухших клеток.

Сопоставление представленных данных с имеющимися в литературе [9, 10] показывает, что клетки в основном претерпевают изменения объе-

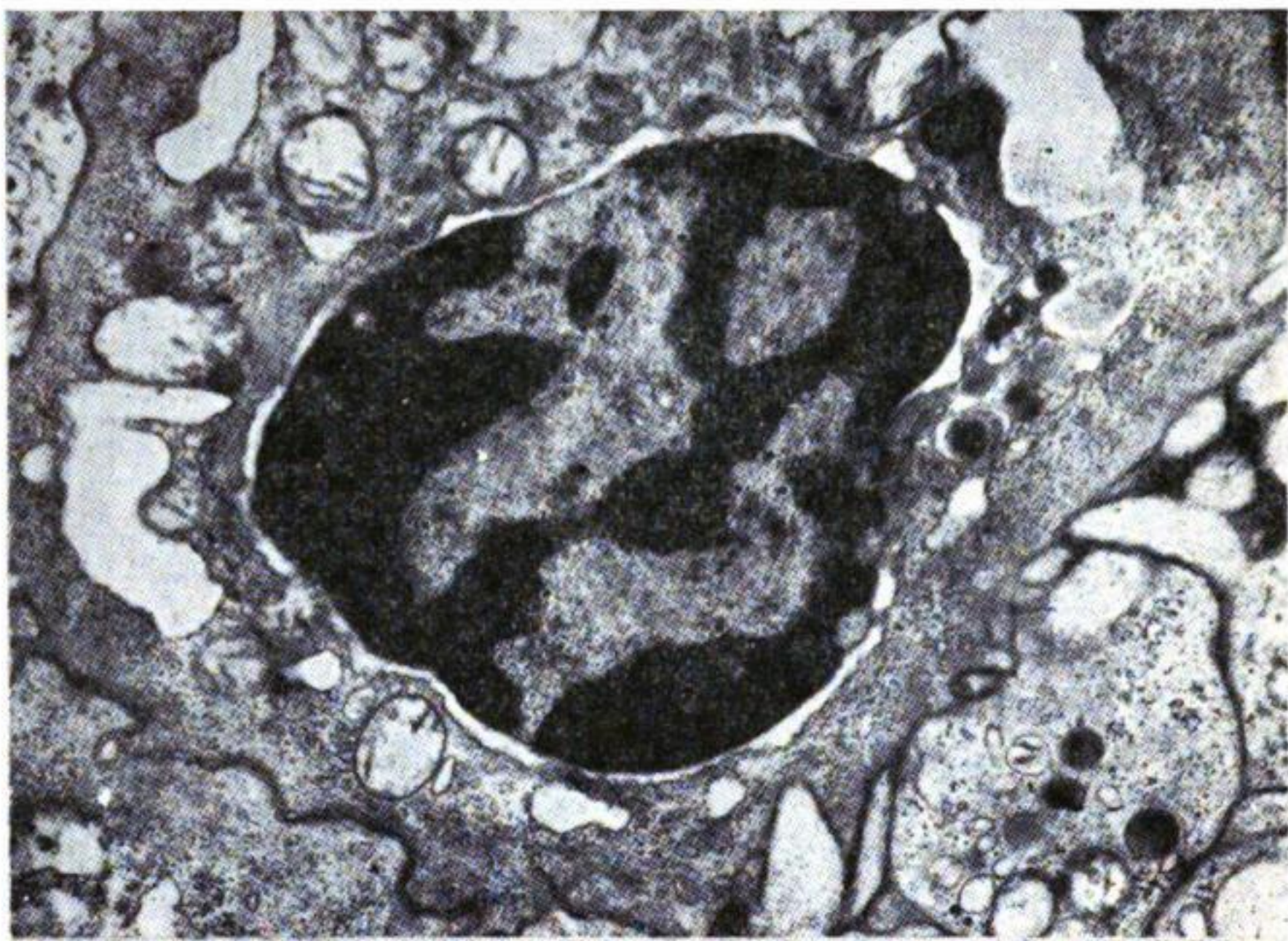


Рис. 3. Лейкоцит, инкубированный в 10%-ном растворе ОЭГ, $\times 12000$.

ма и ультраструктуры, очевидно, связанные с дегидратирующим эффектом криопротекторов. Об этом свидетельствует образование микроворсинок, уплотнение гиалоплазмы и нуклеоплазмы, возрастание плотности хроматина. Уменьшаются также размеры лизосом. Возможно, что наблюдаемое нами уплотнение внутриклеточных структур может достичь определенной критической величины, после которой наступает нарушение мембранных комплексов и увеличение внутриклеточной осмомолярности. Вследствие таких изменений создаются условия для повышенного потока воды внутрь клеток, наступает их набухание и образуются «светлые» клетки. Однако такие эффекты, очевидно, очень зависят от исходного состояния лейкоцитов, поскольку в наших наблюдениях только часть клеток претерпевала описанные выше изменения.

Вывод. На основании проведенных исследований можно заключить, что ОЭГ со степенью полимеризации $n=5$ в 10%-ной концентрации оказывает менее выраженное повреждающее действие на ультраструктуру лейкоцитов крови человека и обуславливает меньшую гетерогенность клеток, чем ПЭО-400.

1. Белоус А. М., Шраго М. И., Пушкарь Н. С. Криоконсерванты. — Киев: Наук. думка, 1979. — 195 с.
2. Грачева А. И. Электронно-микроскопическая техника при изучении клеток крови и некоторые вопросы интерпретации структур этих клеток. — Цитология, 1974, 16, № 4, с. 511—513.
3. Пушкарь Н. С., Белоус А. М., Цуцаева А. А. и др. Низкотемпературное консервирование костного мозга. — Киев: Наук. думка, 1976. — 284 с.
4. Пушкарь Н. С., Капрельянц А. С., Панков Е. Я. Ультраструктура клетки при низких температурах. — Киев: Наук. думка, 1978. — 139 с.

5. Терентьева Э. И. Электронная микроскопия лейкоцитов в процессе их хранения. — Пробл. гематологии и переливания крови, 1966, № 1, с. 28—34.
6. Теодорович В. Н., Козлов Г. А. Влияние защитных веществ на процесс замораживания и оттаивания клеточных элементов крови. — В кн.: Реакция клеток и их белковых компонентов на экстремальные воздействия. М.; Л.: Наука, 1966, с. 51—57.
7. Crowley J. P., Rene A., Valeri C. R. The recovery, structure, and function of human blood leukocytes after freeze-preservation. — Cryobiology, 1974, 11, N 5, p. 395—404.
8. French J. E., Flor W. J., Crissmon M. P. Recovery, structure and function of dog granulocytes after freeze-preservation. with dimethylsulfoxide. — Cryobiology, 1977, 14, N 1, p. 1—14.
9. Mazur P. Theoretical and experimental effects of cooling and warming velocity on the survival of frozen and fixed cells. — Cryobiology, 1966, 9, N 2, p. 181—192.
10. Meryman H. T., Kafig F. The study of frozen specimens of whole blood. — Res. Rep. Naval Med. Res. Inst. Maryland, 1955, 13, N 1, p. 953—964.
11. Weiss M. D., Armstrong M. B. Structural changes in mammalian cells associated with cooling to -79°C . — J. Biophys., Biochem. and Cytol., 1960, 7, N 4, p. 673—677.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
11.02.80

УДК 57.043.517:576.314:612.014.43

Е. А. Гордиенко, О. И. Гордиенко, Ю. А. Иткин

ТЕРМОДИНАМИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ПАССИВНОГО ПЕРЕНОСА МНОГОКОМПОНЕНТНОЙ ЖИДКОСТИ ЧЕРЕЗ ЗАМКНУТУЮ ИЗБИРАТЕЛЬНО ПРОНИЦАЕМУЮ МЕМБРАНУ

В работах [2—5] получены уравнения, описывающие пассивный транспорт веществ через клеточную мембрану без учета трансмембранной разности потенциалов. Эти уравнения описывают случай, когда наряду с непроникающим имеется проникающий через мембрану компонент. В данной статье описан диффузионный обмен клеток с окружающей их средой, имеющей в своем составе набор проникающих через мембрану веществ, когда время проникновения их резко различается, и получено выражение для суммарного ионного тока, протекающего через клеточную мембрану при изменении состава внеклеточной среды.

В линейном приближении для изотермических процессов плотность потока массы k -го вещества описывается уравнением [6]

$$I_k/S = - \sum_{i=1}^n L_{ki} [\mu_i + \psi_i] / \delta T, \quad (1)$$

где S и δ — площадь поверхности и толщина мембраны, T — температура, μ_i и $\psi_i = z_i \psi$ — соответственно химический и электростатический потенциалы i -го компонента жидкости, z_i — заряд i -го компонента, ψ — электростатический потенциал, n — количество компонентов в жидкости, квадратные скобки определяют разность значений фигурирующей в них величины внутри и снаружи клетки, а L_{ki} — феноменологические коэффициенты, удовлетворяющие соотношению взаимности

$$L_{ki} = L_{ik}. \quad (2)$$

С помощью соотношения Гиббса — Дюгема [1]

$$\sum_{k=1}^n c_k [\mu_k]_{T,P} = 0 \quad (3)$$

уравнения (1) приводятся к виду

$$I'_k \equiv I_k - \frac{c_k}{c_n} I_n = S \sum_{i=1}^{n-1} w_{ki} \bar{c}_i [\mu_i]_{T,P/v} - \\ - S \sigma_k L_p \bar{c}_k [P] / v + S \beta \alpha_k L_p \bar{c}_k [\psi] / v, \quad (4)$$

$$I_v = -S \sum_{i=1}^{n-1} \sigma_i L_p \bar{c}_i [\mu_i]_{T,P/v} + S L_p [P] - S \beta L_p [\psi], \quad (5)$$

$$I = S \sum_{i=1}^{n-1} \alpha_i \beta L_p \bar{c}_i [\mu_i]_{T,P} - S \beta L_p [P] - S A [\psi], \quad (6)$$

где c_k — массовая концентрация k -го компонента, P — давление, v — удельный объем жидкости, индекс n относится к растворителю, $I_v \equiv \equiv -\dot{V} + \int_S \sum_k v_k \rho_k \vec{v}_k d\vec{S}$, V — объем ячейки, окруженной мембраной, $\bar{c}_k$ — среднее между значениями концентрации k -го компонента на внутренней и внешней сторонах мембраны, I/S — плотность мембранного ионного тока;

$$w_{ki} \equiv \frac{1}{S} \left\{ \frac{I'_k}{[\pi_i]} \right\}_{[P]=0, [\psi]=0, [\pi_j]=0 (j \neq i)} = -\frac{v}{\delta T} \left(L_{ki} - \right. \\ \left. - \frac{c_i}{c_n} L_{kn} - \frac{c_k}{c_n} L_{ni} + \frac{c_k c_i}{c_n^2} L_{nn} \right) \frac{1}{\bar{c}_i};$$

$$L_p \equiv \frac{1}{S} \{ I_v / [P] \}_{[\pi_i]=0, [\psi]=0} = -\frac{1}{\delta} \sum_{i,k=1}^n L_{ki} v_i v_k / T -$$

коэффициент фильтрации мембраны,

$$\sigma_i \equiv \left\{ \frac{[P]}{[\pi_i]} \right\}_{I_v=0, [\psi]=0, [\pi_j]=0 (j \neq i)} = \frac{v}{\delta T L_p} \sum_{k=1}^n v_k \left(L_{ki} - \right. \\ \left. - \frac{c_k}{c_n} L_{ni} \right) \frac{1}{\bar{c}_i} -$$

коэффициент избирательности мембраны для k -го растворенного вещества,

$$A \equiv \frac{1}{S} \left\{ \frac{I}{[\psi]} \right\}_{[\pi_i]=0, [P]=0} = -\frac{1}{\delta} \sum_{i=1}^n \sum_{k=1}^n L_{ki} z_k z_i / T -$$

проводимость мембраны,

$$\alpha_k \equiv \left\{ \frac{[P]}{[\pi_k]} \right\}_{[\pi_j]=0 (j \neq i), I=0, [\psi]=0} = -\frac{1}{\delta T \beta L_p} \sum_{i=1}^n z_k \left(L_{ki} - \right.$$

$$-\frac{c_i}{c_n} L_{kn} \Big) \frac{v}{c_k},$$

$$\beta \equiv \left\{ \frac{[P]}{[\psi]} \right\}_{[\pi_j]=0, I_v=0} = \frac{1}{\delta T L_p} \sum_{i=1}^n \sum_{k=1}^n L_{ki} z_i v_k,$$

v_k — парциальный удельный объем k -го компонента, $\pi_i = \frac{RTc_i}{m_i v}$ — осмотическое давление i -го компонента, а m_i — молярная масса i -го компонента. Очевидно,

$$w_{ki} \bar{c}_i = w_{ik} \bar{c}_k.$$

Поскольку матрица коэффициентов L_{ki} положительно определенная, справедливы следующие неравенства:

$$L_p \geq 0, A \geq 0, w_{ii} \geq 0, w_{ii} w_{kk} \geq w_{ik} w_{ki},$$

$$w_{kk} \geq \frac{\sigma_k^2 L_p \bar{c}_k}{v}, \quad w_{kk} \geq \frac{\alpha_k \beta^2 L_p \bar{c}_k}{A v}, \quad A \geq \beta^2 L_p. \quad (7)$$

В приближении слабых несжимаемых растворов

$$v I'_k = -\dot{c}_k V, \quad [\mu_i]_{T,P} = \frac{RT}{m_i} [c_i] / \bar{c}_i, \quad I_v = -\dot{V},$$

где R — универсальная газовая постоянная. Поэтому уравнения (4) — (6) можно представить в виде

$$\dot{c}_k = -\gamma \sum_{i=1}^{n-1} \left(w_{ki} + \frac{\sigma_k \sigma_i L_p \bar{c}_k}{v} \right) \frac{RT}{m_i} [c_i] + \gamma \sigma_k L_p \bar{c}_k \epsilon \kappa -$$

$$-\gamma \beta L_p \bar{c}_k [\psi], \quad (8)$$

$$\kappa = \gamma (1 + \kappa) \left\{ \sum_{i=1}^{n-1} \sigma_i L_p \frac{RT}{m_i v} [c_i] - L_p \epsilon \kappa + \beta L_p [\psi] \right\}, \quad (9)$$

$$I/S = \sum_{i=1}^{n-1} \alpha_i \beta L_p \frac{RT}{m_i v} [c_i] - \beta L_p \epsilon \kappa - A [\psi], \quad (10)$$

где верхний индекс i относится к концентрации соответствующего компонента внутри клетки, $\chi \equiv (V - V_0)/V_0$ — относительный объем клетки, V_0 — объем клетки в отсутствие деформации клеточной мембраны. Модуль упругости клеточной мембраны ϵ определяется соотношением

$$[P] = \epsilon \kappa, \quad \gamma = S/V, \quad \text{а}$$

$$w_{ki}^* \equiv \left\{ \frac{I'_k}{[\pi_i]} \right\}_{I_v=0, [\pi_j]=0 (j \neq i), [\psi]=0} = w_{ki} - \frac{\sigma_k L_p \sigma_i \bar{c}_k}{v}.$$

Из закона сохранения массы находим

$$[c_k] = (c_k^i - \bar{c}_k) (1 + \Phi) / (1 - \chi \Phi), \quad (11)$$

где Φ — начальное отношение внутриклеточного к внеклеточному объему суспензии. С учетом [11] система уравнений (8) — (10) приводится к виду (при $\kappa \ll 1$)

$$\dot{c}_k = -\gamma \sum_{i=1}^{n-1} \left(\omega_{ki} + \frac{\sigma_k \sigma_i L_p \bar{c}_k}{v} \right) \frac{RT}{m_i} (c_i - \bar{c}_i) (1 + \Phi) + \\ + \gamma \sigma_k L_p \bar{c}_k \epsilon \kappa - \gamma \beta \alpha_k L_p \bar{c}_k [\psi], \quad (12)$$

$$\dot{\kappa} = \gamma \left\{ \sum_{i=1}^{n-1} \sigma_i L_p \frac{RT}{m_i v} (c_i - \bar{c}_i) (1 + \Phi) - L_p \epsilon \kappa + \beta L_p [\psi] \right\}, \quad (13)$$

$$I/S = \sum_{i=1}^{n-1} \alpha_i \beta L_p \frac{RT}{m_i v} (c_i - \bar{c}_i) (1 + \Phi) - \beta L_p \epsilon \kappa - A[\psi]. \quad (14)$$

Градиентами концентрации вне и внутри клеток пренебрегаем. Первое из этих предположений выполняется в широком диапазоне условий, поскольку характерное время перераспределения веществ внутри клетки по порядку величины составляет только $a^2/D \approx 10^{-1}$ с, где a — характерный размер клетки (10 мкм), а D — коэффициент диффузии растворенного внутри клетки вещества. Второе из предположений не приводит к существенной ошибке, если клеточная суспензия интенсивно перемешивается.

Если i -е вещество не проникает через мембрану, то, очевидно,

$$C_i^i = C_{i0}^i / (1 + \kappa), \quad (15)$$

где нижний индекс 0 относится к начальному значению концентрации. Подстановкой (15) в уравнения (12), (13) образуем тождество и находим, что в случае непроникающего i -го вещества

$$\omega_{ki}^* = 0 \text{ для любого } k = 1, 2, \dots, n-1, \\ \sigma_i = 1, \alpha_i = 1.$$

Если растворенные вещества $j+1, \dots, n-1$ не проникают через мембрану, то система уравнений (12) — (14) упрощается и принимает вид

$$\dot{c}_k + \gamma \sum_{i=1}^j \omega_{ki} \frac{RT}{m_i} c_i^i (1 + \Phi) - \gamma \sigma_k L_p \bar{c}_k \epsilon \kappa + \gamma \beta \alpha_k L_p \bar{c}_k [\psi] + \\ + \sum_{i=j+1}^{n-1} \frac{\sigma_k L_p \bar{c}_k}{v} \frac{RT}{m_i} c_{i0}^i (1 - \kappa) (1 + \Phi) = \gamma \sum_{i=1}^j \omega_{ki} \frac{RT}{m_i} \bar{c}_i (1 + \Phi) + \\ + \sum_{i=j}^{n-1} \frac{\sigma_k L_p \bar{c}_k}{v} \frac{RT}{m_i} \bar{c}_i (1 + \Phi), \quad (16)$$

$$\dot{\kappa} - \gamma \sum_{i=1}^j \sigma_i L_p \frac{RT}{m_i v} c_i^i (1 + \Phi) + \gamma L_p \epsilon \kappa - \gamma \beta L_p [\psi] -$$

$$-j \sum_{i=j+1}^{n-1} L_p \frac{RT}{m_i v} c_{i0}^i (1-\kappa) (1+\Phi) = -\gamma \sum_{i=1}^j \sigma_i L_p \frac{RT}{m_i v} \bar{c}_i (1+\Phi) -$$

$$-\gamma \sum_{i=j+1}^{n-1} L_p \frac{RT}{m_i v} \bar{c}_i (1+\Phi), \quad (17)$$

$$I/S = \sum_{i=1}^j \alpha_i \beta L_p \frac{RT}{m_i v} (c_i - \bar{c}_i) (1+\Phi) +$$

$$+ \sum_{i=j+1}^{n-1} \beta L_p \frac{RT}{m_i v} (c_{i0}^i - \bar{c}_i - c_{i0}^i \kappa) - \beta L_p \epsilon \kappa - A[\psi]. \quad (18)$$

Как известно [8], поле полного тока, который состоит из тока смещения $\frac{\partial}{\partial t} \epsilon_0 \vec{E}/4\pi$, и тока проводимости, лишено источников или стоков, т. е. суммарный ток проводимости через любую замкнутую поверхность равен $-\int_s \frac{\partial}{\partial t} \epsilon_0 \vec{E} d\vec{S}/4\pi$, где $\epsilon_0 \epsilon$ — диэлектрическая проницаемость, а $\vec{E}$ — напряженность электрического поля. Поэтому, в частности, имеем

$$I = C_m \frac{d}{dt} [\psi], \quad (19)$$

где $C_m = \epsilon_0 \epsilon_m S/4\pi\delta$ — емкость мембраны, а $\epsilon_0 \epsilon_m$ — диэлектрическая проницаемость мембраны. Таким образом, с учетом (19) уравнение (18) приводится к виду

$$C_m \frac{d}{dt} [\psi] = S \sum_{i=1}^j \alpha_i \beta L_p \frac{RT}{m_i v} (c_i - \bar{c}_i) (1+\Phi) - S \beta L_p \epsilon \kappa -$$

$$- S A[\psi] + S \sum_{i=j+1}^{n-1} \beta L_p \frac{RT}{m_i v} (c_{i0}^i - \bar{c}_i - c_{i0}^i \kappa). \quad (20)$$

Уравнения (17), (18) совместно с (11), (15) и (20) представляют собой замкнутую систему уравнений, решения которых описывают кинетику изменения концентраций растворенных вне и внутри клеток веществ, относительного объема клеток и трансмембранной разности потенциалов. Уравнения (17), (18) и (20) можно записать в виде

$$\tau_k \dot{c}_k^i + c_k^i + \sum_{i=1}^j \frac{\omega_{ki} m_k}{\omega_{kh} m_i} c_i - \frac{\sigma_k L_p \bar{c}_k m_k}{\omega_{kh} RT (1+\Phi)} \left(\epsilon + \right.$$

$$\left. + \sum_{i=j+1}^{n-1} \pi_{i0} (1+\Phi) \right) \kappa + \frac{\beta \alpha_k L_p \bar{c}_k m_k}{\omega_{kh} RT (1+\Phi)} [\psi] =$$

$$= \sum_{i=1}^j \frac{\omega_{hi} m_h}{\omega_{hh} m_i} \bar{c}_i + \sum_{i=j+1}^{n-1} \frac{\sigma_h L_p \bar{c}_h m_h}{\omega_{hh} m_i v} (\bar{c}_i - \bar{c}_{i0}), \quad (21)$$

$$\begin{aligned} & \tau_{\kappa} \kappa + \kappa - \sum_{i=1}^j \frac{\sigma_i R l (1+\Phi) c_i}{\left(\varepsilon + \sum_{i=j+1}^{n-1} \pi_{i0} (1+\Phi) \right)} - \\ & - \frac{\beta}{\varepsilon + \sum_{i=j+1}^{n-1} \pi_{i0} (1+\Phi)} [\psi] = - \sum_{i=1}^j \frac{\sigma_i R T \bar{c}_i (1+\Phi)}{\varepsilon + \sum_{i=j+1}^{n-1} \pi_{i0} (1+\Phi)} - \\ & - \sum_{i=j+1}^{n-1} \frac{R T (1+\Phi) (\bar{c}_i - c_{i0})}{\varepsilon + \sum_{i=j+1}^{n-1} \pi_{i0} (1+\Phi)}, \quad (22) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \tau_{\psi} \frac{d}{dt} [\psi] &= \sum_{i=1}^j \frac{\alpha_i \beta L_p R l}{A m_i v} (c_i - \bar{c}_i) (1+\Phi) - \\ & - \frac{\beta L_p}{A} \left(\varepsilon + \sum_{i=j+1}^{n-1} \pi_{i0} (1+\Phi) \right) \kappa - [\psi] + \sum_{i=j+1}^{n-1} \frac{\beta L_p}{A} \frac{R T}{m_i v} (c_{i0} - \bar{c}_i) \times \\ & \times (1+\Phi), \quad (23) \end{aligned}$$

$$\tau_h = \left[\gamma w_{hk} \frac{R T}{m_h} (1+\Phi) \right]^{-1}, \quad \tau_{\kappa} = \left[\gamma L_p \varepsilon + \sum_{i=j+1}^{n-1} \pi_{i0} (1+\Phi) \right]^{-1},$$

$$\tau_{\psi} = \frac{C_m}{S A}.$$

Пусть

$$\tau_{\psi} \ll \tau_{\kappa} \ll \tau_1 \ll \tau_2 \ll \dots \ll \tau_n.$$

Тогда, согласно теореме А. Н. Тихонова [7], процесс, характеризующийся временем релаксации τ_{α} , описывается системой уравнений

$$\begin{aligned} & \left\{ \varepsilon + \sum_{i=j+1}^{n-1} (1+\Phi) \right\} \kappa = \sum_{i=1}^j \sigma_i \frac{R T}{m_i v} (1+\Phi) \bar{c}_i + \beta [\psi] - \\ & - \sum_{i=1}^j \sigma_i \bar{\pi}_i (1+\Phi) - \sum_{i=j+1}^{n-1} (\bar{\pi}_i - \pi_{i0}) (1+\Phi), \quad (24) \\ & [\psi] = \sum_{i=1}^j \frac{\alpha_i \beta L_p}{A} \frac{R T}{m_i v} (c_i - \bar{c}_i) (1+\Phi) + \end{aligned}$$

$$+ \sum_{i=j+1}^{n-1} \frac{\beta L_p}{A} \frac{RT}{m_i v} (c_{i0} - \bar{c}_i) (1 + \Phi) -$$

$$- \frac{\beta L_p}{A} \left(\varepsilon + \sum_{i=j+1}^{n-1} \pi_{i0} (1 + \Phi) \right) \kappa, \quad (25)$$

$$\tau_\alpha \dot{c}_\alpha + c_\alpha + \sum_{i=1}^j \frac{\omega_{\alpha i} m_\alpha}{\omega_{\alpha\alpha} m_i} c_i - \frac{\sigma_\alpha L_p \bar{c}_\alpha m_\alpha}{\omega_{\alpha\alpha} RT (1 + \Phi)} \times$$

$$\times \left(\varepsilon + \sum_{i=j+1}^{n-1} \pi_{i0} (1 + \Phi) \right) \kappa + \frac{\beta \alpha_\alpha L_p \bar{c}_\alpha m_\alpha}{\omega_{\alpha\alpha} RT (1 + \Phi)} [\psi] =$$

$$= \sum_{i=1}^j \frac{\omega_{\alpha i} m_\alpha}{\omega_{\alpha\alpha} m_i} \bar{c}_i + \sum_{i=j+1}^{n-1} \frac{\sigma_\alpha L_p \bar{c}_\alpha m_\alpha}{\omega_{\alpha\alpha} m_i v} (\bar{c}_i - c_{i0}). \quad (26)$$

Здесь значения тех переменных, времена релаксации которых значительно превышают τ_α , заменены постоянными начальными значениями, а значения переменных, времена релаксации которых много меньше τ_α , принимаются равными их стационарным значениям. Четвертое из условий (7) совместно с условием $\tau_3 \gg \tau_2 \gg \tau_1$ приводит к неравенству

$$\omega_{21}/\omega_{11} \ll 1, \quad \omega_{23}/\omega_{22} \ll 1, \quad \omega_{13}/\omega_{11} \ll 1. \quad (27)$$

Для упрощения вычислений полагаем $n=5$, $\alpha=2, 3$ и получаем, считая, что неравенства (7) выполняются с большим запасом:

$$\ddot{c}_i + \left(\frac{1}{\tau_2} + \frac{1}{\tau_3} \right) \dot{c}_i + \frac{1}{\tau_2 \tau_3} c_i = \frac{1}{\tau_2 \tau_3} \bar{c}_i \quad (i=2, 3),$$

где

$$\frac{1}{\tau_2} = \gamma RT (1 + \Phi) \frac{\omega_{22}}{m_2}, \quad \frac{1}{\tau_3} = \gamma RT (1 + \Phi) \frac{\omega_{33}}{m_3}. \quad (28)$$

Решение уравнения (28) имеет вид

$$c_i = \bar{c}_i + (c_{i0} - \bar{c}_i) e^{-t/\tau_i} \quad (i=2, 3) \quad (29)$$

или с учетом закона сохранения массы

$$\bar{c}_i = c_{i0} - \Phi (c_{i0} - \bar{c}_i) e^{-t/\tau_i}. \quad (30)$$

Изменение трансмембранной разности потенциалов за счет перераспределения второго и третьего вещества между клеткой и окружающей ее средой в тех же приближениях определяется выражением

$$[\psi] = - \frac{\beta L_p}{A} \left\{ (\alpha_2 - \sigma_2) \frac{RT}{m_2 v} c_2 + (\alpha_3 - \sigma_3) \frac{RT}{m_3 v} c_3 - \right.$$

$$\left. - (\alpha_2 - \sigma_2) \bar{\pi}_2 - (\alpha_3 - \sigma_3) \bar{\pi}_3 \right\}. \quad (31)$$

Суммарный ионный ток в том случае, когда с одной стороны мембраны состав раствора поддерживается неизменным, а $\kappa=0$, равен:

$$I/S = \beta L_p \{ \sigma_2 (\pi_{20} - \pi_2) e^{-t/\tau_2} + \sigma_3 (\pi_{30} - \pi_3) e^{-t/\tau_3} \}. \quad (32)$$

Полученные нами решения могут быть использованы для анализа процессов обезвоживания клеток в гипо- и гипертонических средах, для изучения явления диэлектрического пробоя мембраны [9] или для количественного анализа ионных мембранных токов при фиксированном потенциале [8]. С учетом посторонних электродвижущих сил, в качестве которых можно рассматривать приложенное внешнее поле или разность потенциалов на мембране, создаваемую за счет наличия связанных в мембране зарядов, уравнение (31) переходит в

$$[\psi + \psi_m] = - \frac{\beta L_p}{A} \left\{ (\alpha_2 - \sigma_2) \frac{RT}{m_2 v} c_2 + (\alpha_3 - \sigma_3) \frac{RT}{m_3 v} c_3 - \right. \\ \left. - (\alpha_2 - \sigma_2) \bar{\pi}_2 - (\alpha_3 - \sigma_3) \bar{\pi}_3 \right\}. \quad (33)$$

1. Гленсдорф П., Пригожин И. Термодинамическая теория структуры, устойчивости и флуктуаций. — М.: Мир, 1973. — 280 с.
2. Гордиенко Е. А., Бронштейн В. Л. К механизму лизиса. I. Математическая модель. — В кн.: Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины. Киев: Наук. думка, 1974, с. 13—15.
3. Гордиенко Е. А., Бронштейн В. Л. К механизму лизиса. II. Приложения к криобиологии. — В кн.: Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины. Киев: Наук. думка, 1974, с. 15—18.
4. Гордиенко Е. А., Иткин Ю. А., Ишков Г. С. Кинетика обезвоживания клеток в n -компонентных растворах веществ, не проникающих в клетку. — В кн.: Механизмы криоповреждения и криозащиты биологических структур. Киев: Наук. думка, 1977, с. 14—16.
5. Гордиенко Е. А., Иткин Ю. А., Ишков Г. С. Кинетика обезвоживания клеток в многокомпонентных средах при наличии проникающего через плазматическую мембрану вещества. — В кн.: Механизмы криоповреждения и криозащиты биологических структур. Киев: Наук. думка, 1977, с. 16—17.
6. Гроот де С. Р., Мазур П. Неравновесная термодинамика. — М.: Мир, 1964. — 456 с.
7. Тихонов А. Н. Системы дифференциальных уравнений, содержащих малые параметры при производных, — Мат. сб., 1952, 31, с. 575—586.
8. Ходоров Б. И. Общая физиология возбудимых мембран. — М.: Наука, 1975. — 406 с.
9. La Celle P. L., Rothstein A. The passive permeability of the red blood cell to cations. — J. General Physiol., 1966, 50, p. 171—188.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
19.03.80

УДК 57.043.615.9

М. М. Гучок, В. М. Гучок, В. К. Мазалов
**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
ТОКСИЧНОСТИ ЭТИЛЕНГЛИКОЛЯ,
 α -ПРОПИЛЕНГЛИКОЛЯ И ГЛИЦЕРИНА**

Многоатомные спирты этиленгликоль, α -пропиленгликоль (1,2-пропандиол) и глицерин — активные криопротекторы. Каждый из них более или менее широко используется в клинической или экспериментальной практике при криоконсервировании различных биологических объектов [8, 9, 13, 14]. Кроме того, глицерин и α -пропиленгликоль применяются в медицинской и фармацевтической практике с различными целями. Глицерин используется для лечения внутричерепной гипертензии и отека мозга, глаукомы, рекомендуется для парентерального питания, применяется в качестве растворителя некоторых лекарственных

веществ [2, 6, 9, 15 и др.] и т. д. α -Пропиленгликоль используется в качестве растворителя ряда лекарственных веществ, предназначенных для парентерального введения [15], рекомендуется в качестве источника энергии при парентеральном питании [1, 4, 5] и для других целей.

При выборе криопротекторов, лекарственных веществ или их растворителей одним из важнейших критериев является степень токсичности сравниваемых химических агентов. Однако сравнительных данных о токсичности этиленгликоля, α -пропиленгликоля и глицерина при парентеральном и пероральном введении их в организм, полученных в одинаковых условиях эксперимента, в доступной нам литературе нет. Между тем известно, что значение среднесмертельных доз одного вещества для каждого вида животных в зависимости от ряда факторов может изменяться в два-три и более раз [10]. В имеющихся в литературе сведениях о раздельном изучении токсичности каждого из указанных веществ получены резко отличающиеся значения среднесмертельных доз [12, 15]. Они получены в несравнимых условиях эксперимента (различные географические условия и времена года, масса, возраст животных и концентрация веществ, а также не учитывалась скорость их внутривенного введения и т. д.) и, следовательно, не позволяют объективно сравнить степень токсичности рассматриваемых веществ. Опасность развития острых смертельных отравлений вообще не изучалась.

Все это и послужило обоснованием целесообразности сравнительного изучения токсичности этиленгликоля, α -пропиленгликоля и глицерина.

Методы исследования. Эксперименты выполнены на 341 беспородной белой крысе массой 195—245 г., 84 беспородных белых мышах массой 18,0—23,0 г и 6 кроликах породы шиншилла массой 3,0—3,15 кг обоего пола. Этиленгликоль, α -пропиленгликоль и глицерин вводили однократно медленно (с одинаковой скоростью) внутривенно и внутрибрюшинно в неразбавленном виде и в 20%-ных растворах, приготовленных на 0,9%-ном растворе NaCl. Кроме того, 20%-ные растворы α -пропиленгликоля сочетали с 5% сахарозы. В качестве интегрального показателя токсичности, отражающего всю совокупность развивающихся морфофункциональных изменений, учитывали гибель животных и ее сроки в течение двухнедельного наблюдения. Верхние параметры токсичности определяли методом пробит-анализа по В. Б. Прозоровскому [7]. Вычисляли также показатели опасности развития острого смертельного отравления животных: отношение $\frac{ДЛ-84}{ДЛ-16}$ [3], показатели функции

угла наклона S [16], суммарный показатель опасности по формуле $\frac{1}{ДЛ-50 \cdot S}$ [10] и коэффициенты видовой выносливости животных. Средне-

смертельные дозы α -пропиленгликоля и глицерина для кроликов определяли методом Дейхмана и Ле Бланка [11] при внутривенном введении 20%-ных растворов веществ со скоростью 25—30 капель/мин. Все вещества изучались параллельно. Животные содержались в одинаковых условиях вивария.

Результаты исследования и их обсуждение. Полученные сравнительные экспериментальные данные о величинах среднесмертельных доз (ДЛ-50) и их доверительных границах приведены в табл. 1, 3 и на рисунке.

Из табл. 1 и рисунка следует, что при однократном медленном внутривенном введении указанных веществ крысам в неразведенном состоянии и в виде 20%-ных растворов степень их токсичности возрастает в такой последовательности: α -пропиленгликоль, глицерин, этиленгликоль. Так, при введении криопротекторов в неразбавленном виде и в 20%-ных растворах выносливость животных к α -пропиленгликолю соответственно

Сравнительные данные о токсичности этиленгликоля, α -пропиленгликоля и глицерина для белых крыс

Криопротектор	Концентрация вещества %	Пол животных	Путь введения	ДЛ-50 и ее доверительные границы	
				в единицах массы, г/кг	в молярных единицах моль/кг
Этиленгликоль	99,5	♂	В вену	3,26 (2,9—3,7)	0,0525 (0,046—0,0596)
α -Пропиленгликоль	99,5	♂	" "	13,1 (11,56—14,64)	0,1722 (0,152—0,192)
Глицерин	99,0	♂	" "	7,62 (6,4—9,1)	0,0827 (0,069—0,099)
Этиленгликоль	20,0	♂	" "	5,86 (5,02—6,71)	0,0944 (0,0808—0,108)
α -Пропиленгликоль	20,0	♂	" "	19,05 (15,53—22,56)	0,25 (0,204—0,296)
α -Пропиленгликоль + сахара	5,0	♂	" "	19,05 (15,53—22,56)	0,25 (0,204—0,296)
Глицерин	20,0	♂	" "	7,08 (6,3—7,9)	0,0769 (0,068—0,086)
Этиленгликоль	20,0	♂	Внутрибрюшинно	5,75 (5,03—6,46)	0,0926 (0,081—0,104)
Этиленгликоль	20,	♀	То же	5,01 (3,19—6,83)	0,0807 (0,051—0,11)
α -Пропиленгликоль	20,0	♂	"	18,22 (14,0—22,44)	0,239 (0,184—0,295)
α -Пропиленгликоль + сахара	5,0	♂	"	18,22 (14,0—22,44)	0,239 (0,184—0,295)
Глицерин	20,0	♂	"	7,35 (6,68—8,01)	0,08 (0,0725—0,087)
	20,0	♀	"	6,66 (5,92—7,73)	0,0723 (0,064—0,08)

в 4 и 3,26, к глицерину — в 2,34 и 1,21 раза выше, чем к этиленгликолю. Выносливость крыс к α -пропиленгликолю соответственно концентрации веществ в 1,72 и 2,69 раза выше, чем к глицерину.

В условиях не столь выраженного значения скорости введения веществ — при введении в брюшную полость — выносливость крыс к α -пропиленгликолю в 3,16 и к глицерину — в 1,28 раза выше, чем к этиленгликолю. Устойчивость животных к α -пропиленгликолю в 2,49 раза выше, чем к глицерину. Однако сравнение токсичности в удобных для практики единицах массы далеко не всегда отражает реальные различия биологической активности изучаемых веществ. В этой связи необходимо отметить, что химические соединения обычно реагируют с биосубстратами в молекулярных, ионных и других отношениях. Поэтому сравнение токсичности и в целом биологической активности химических агентов в молярных единицах представляется важным, более реально отражающим истинное соотношение биологической активности исследуемых веществ.

Из сравнения токсичности рассматриваемых веществ в молярных единицах (см. табл. 1) следует, что и при этом варианте наименее токсичным оказался также α -пропиленгликоль. При воздействии неразбавленных веществ глицерин занял промежуточное положение между α -пропиленгликолем и этиленгликолем. Однако при введении 20%-ных растворов на промежуточном месте оказался не глицерин, а этиленгликоль. Так, при внутривенном введении веществ крысам в неразведенном виде и в 20%-ных растворах выносливость животных к α -пропиленгликолю соответственно в 3,28 и 2,65 раза выше, чем к этиленгликолю и в 2,08 и 3,25 раза выше, чем к глицерину. Устойчивость крыс к неразведенному глицерину в 1,57 раза превосходит их выносливость к этилен-

гликолю, а выносливость животных к 20%-ным растворам глицерина в 1,23 раза уступает их устойчивости к аналогичным растворам этиленгликоля. При внутрибрюшинном введении 20%-ных растворов крысам кратность и направленность различий в токсичности этиленгликоля, глицерина и α -пропиленгликоля остаются такими же, как и после внутривенного применения аналогичных растворов веществ.

Известно, что вероятность смертельного отравления веществами с одинаковыми или близкими величинами среднесмертельных доз может оказаться различной. Поэтому сравнение опасности химических агентов только по величине смертельных доз может привести к ошибочным выводам [10].

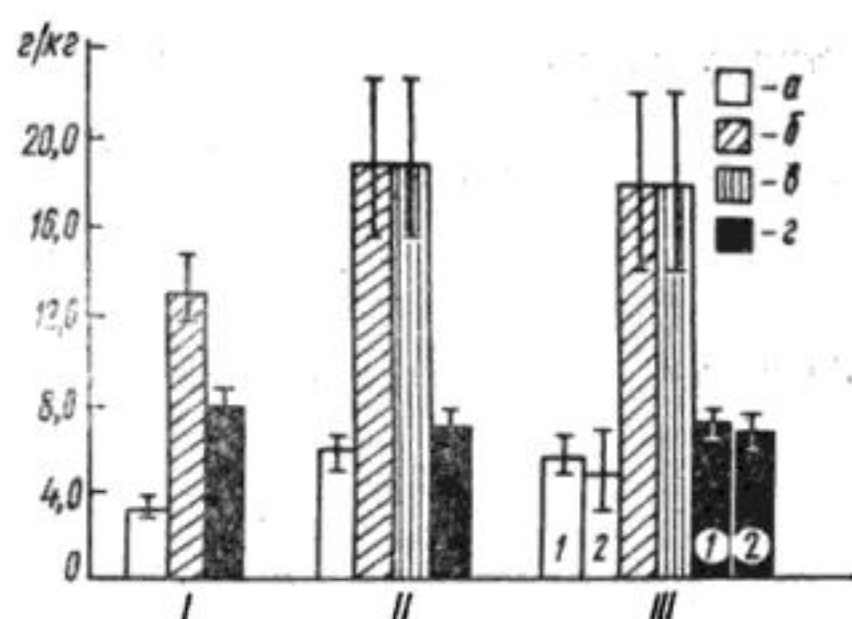
Чтобы исключить возможность подобных ошибок, нами определены помимо среднесмертельных доз и другие объективные показатели опасности развития острого смертельного отравления исследуемыми веществами у животных (табл. 2). Используемые нами показатели — от-

ношение $\frac{\text{ДЛ-84}}{\text{ДЛ-16}}$ и функция угла на-

клона S — отражают наклон прямой доза — эффект или вариабельность смертельных доз. Чем меньше

величина этих показателей, тем значительнее возможность смертельного отравления при колебании больших доз вещества, и чем меньше вели-

чина интегрального показателя опасности $\frac{1}{\text{ДЛ-50} \cdot S}$, учитывающего степень опасности и вариабельность смертельных доз, тем меньше опасность развития смертельного отравления [10]. Из данных табл. 2 сле-



Сравнение токсичности этиленгликоля, α -пропиленгликоля и глицерина для крыс:

а — этиленгликоль; б — α -пропиленгликоль; в — 20%-ный раствор α -пропиленгликоля+5% сахарозы; г — глицерин; 1 — самцы, 2 — самки; I — внутривенное введение неразведенных веществ; II — внутривенное введение 20%-ных растворов; III — внутрибрюшинное введение 20%-ных растворов.

Таблица 2
Сравнительные данные опасности развития острого смертельного отравления этиленгликолем, α -пропиленгликолем и глицерином у белых крыс

Криопротектор	Концентрация вещества, %	Путь введения	ДЛ-5		Некоторые показатели опасности развития острого смертельного отравления					
			г/кг	моль кг	в единицах массы			в молярных единицах		
					ДЛ-84 ДЛ-16	S	$\frac{1}{\text{ДЛ-50} \cdot S}$	ДЛ-84 ДЛ-16	S	$\frac{1}{\text{ДЛ-50} \cdot S}$
Этиленгликоль	99,5	В вену	3,26	0,0525	1,31	1,29	0,238	1,316	1,147	16,61
α -Пропиленгликоль	99,5	"	13,1	0,1722	1,4	1,18	0,0645	1,4	1,183	4,91
Глицерин	99,0	"	7,62	0,0827	1,36	1,16	0,113	1,36	1,165	10,38
Этиленгликоль	20,0	"	5,86	0,0944	1,41	1,19	0,1434	1,41	1,187	8,93
α -Пропиленгликоль	20,0	"	19,05	0,25	1,28	1,13	0,046	1,283	1,13	3,54
α -Пропиленгликоля+сахароза	20,0	"	19,05	0,25	1,28	1,13	0,046	1,283	1,13	3,54
Глицерин	5,0	"	7,08	0,0769	1,37	1,163	0,120	1,368	1,169	11,135
Этиленгликоль	20,0	Внутрибрюшинно	5,75	0,0926	1,30	1,14	0,1525	1,299	1,14	9,47
α -Пропиленгликоль	20,0	"	18,22	0,239	1,37	1,12	0,049	1,37	1,17	3,57
α -Пропиленгликоля+сахароза	20,0	"	18,22	0,239	1,37	1,12	0,049	1,37	1,17	3,57
Глицерин	5,0	"	7,35	0,08	1,36	1,16	0,1166	1,36	1,168	10,75

Сравнительные данные токсичности этиленгликоля, α -пропиленгликоля и

Криопротектор	Концентрация вещества, %	ДЛ-50 и ее доверительные границы	
		в единицах массы, г/кг	в молярных единицах, моль/кг
Этиленгликоль	20,0	6,87 (5,0÷8,74)	0,1106 (0,0805÷0,14)
α -Пропиленгликоль	20,0	14,17 (11,59÷16,74)	0,186 (0,152÷0,22)
Глицерин	20,0	6,93 (5,25÷9,15)	0,075 (0,057÷0,099)

дует, что различия показателей, отражающих наклон доза — эффект при внутривенном и внутрибрюшинном введении этиленгликоля, α -пропиленгликоля и глицерина крысам, не превышают 2—11%, что свидетельствует о примерно одинаковой вариабельности смертельных доз и о приблизительно одинаковой опасности развития острого смертельного отравления.

Однако при оценке опасности развития острого смертельного отравления по суммарному показателю $\frac{1}{\text{ДЛ-50} \cdot S}$ ее степень обычно хорошо коррелирует с величинами среднесмертельных доз — токсичностью этиленгликоля, глицерина и α -пропиленгликоля.

Из сравнительных данных табл. 3 видно, что при выражении токсичности в единицах массы выносливость белых мышей к глицерину и этиленгликолю в 2 раза ниже их выносливости к α -пропиленгликолю. При выражении токсичности в молярных единицах устойчивость мышей к α -пропиленгликолю в 1,68 раза выше, чем к этиленгликолю и в 2,47 раза выше, чем к глицерину. Устойчивость мышей к глицерину в 1,47 раза ниже устойчивости к этиленгликолю.

Анализ изученных показателей опасности развития острого смертельного отравления у мышей показал, что по критериям вариабельности смертельных доз при обоих способах выражения токсичности выгодно отличается глицерин. Однако при оценке опасности по суммарному показателю $\frac{1}{\text{ДЛ-50} \cdot S}$ при ее выражении в единицах массы наименее

опасным оказался α -пропиленгликоль и наиболее опасным — этиленгликоль. Глицерин занимает промежуточное положение. При выражении опасности в молярных единицах наименее опасным остается α -пропиленгликоль, а наиболее опасным — глицерин. Необходимо, однако, отметить, что различия опасности глицерина и этиленгликоля при обоих способах выражения токсичности не превышают 18,6—30%.

Необходимо отметить, что добавление к 20%-ному раствору α -пропиленгликоля 5% сахарозы не изменило показателей токсичности α -пропиленгликоля (см. табл. 1, 2 и рисунок).

Приблизительные среднесмертельные дозы, установленные по Дейхману и Ле Бланку [11], при внутривенном капельном введении 20%-ных растворов кроликам составили для α -пропиленгликоля 12,0 и для глицерина 6,0 г/кг. Симптоматика отравления белых мышей, крыс и кроликов большими дозами этиленгликоля, α -пропиленгликоля и глицерина не отличается от ранее опубликованных признаков соответствующих интоксикаций.

Таблица 3

глицерина для белых мышей самцов при внутрибрюшинном введении

Некоторые показатели опасности развития острого смертельного отравления						Сроки гибели павших животных и их количество в %
в единицах массы			в молярных единицах			
$\frac{ДЛ-84}{ДЛ-16}$	S	$\frac{1}{ДЛ-50 \cdot S}$	$\frac{ДЛ-84}{ДЛ-16}$	S	$\frac{1}{ДЛ-50 \cdot S}$	
1,87	1,37	0,1062	1,87	1,368	6,62	1-е сут — 83,3% 3-и сут — 16,7%
1,7	1,3	0,0543	1,695	1,3	4,13	1-е сут — 20% 2-е сут — 40% 3 сут — 33,3% 5 сут — 6,67%
2,54	1,61	0,0895	2,57	1,607	8,58	1 сут — 95,5% 6 сут — 4,5%

Большинство павших крыс погибло в первые сутки и лишь 15—20% — к концу 2-х сут. Гибель мышей наступала в течение первых 3 сут и лишь изредка на 5—6-е сут (см. табл. 3).

Не выявлено выраженных различий токсичности изученных веществ в зависимости от пола крыс, что видно из величин ДЛ-50 этиленгликоля и глицерина для самок и самцов при внутрибрюшинном введении веществ (см. табл. 1, 2 и рисунок).

Видовые различия выносливости крыс, мышей и кроликов к этиленгликолю, α -пропиленгликолю и глицерину не выражены, что подтверждается величинами коэффициентов видовой выносливости, не выходящими за пределы 1,08—1,59.

Анализ данных, полученных нами в сравнимых условиях экспериментов, позволяет сделать ряд следующих обобщений.

По величинам среднесмертельных доз для α -пропиленгликоля, глицерина и этиленгликоля, установленным при однократном введении крысам, мышам и кроликам в вену и в брюшную полость в неразбавленном виде и в 20%-ных растворах, указанные вещества согласно укрупненной классификации, утвержденной пленумом Секции ПДК [10], следует отнести к малотоксичным веществам.

При обоих способах выражения токсичности по совокупности данных о величинах среднесмертельных доз и опасности развития острого смертельного отравления для мышей, крыс и кроликов наименее токсичным и наименее опасным в изученном ряду криопротекторов является α -пропиленгликоль. Место глицерина и этиленгликоля зависит от концентрации веществ, способа выражения токсичности и пути их введения в организм животных (см. табл. 2, 3). По всем показателям, полученным после внутривенного введения неразбавленных веществ, глицерин занимает промежуточное положение. При использовании 20%-ных растворов глицерин и этиленгликоль по различным показателям оказываются на разных местах ряда. Однако различия показателей, их токсичности и опасности незначительны, и по совокупности всех данных предпочтение следует отдать глицерину.

Необходимо отметить существенную зависимость токсичности веществ от изученных концентраций, резко отличающихся между собой.

Сравнительно малые величины отношения $\frac{ДЛ-84}{ДЛ-16}$, функции угла наклона S и относительно большие значения суммарного показателя опасности $\frac{1}{ДЛ-50 \cdot S}$ (см. табл. 2, 3) свидетельствуют об опасности развития смертельных отравлений при колебании больших доз этиленгликоля, глице-

рина и α -пропиленгликоля, что всегда необходимо помнить при использовании этих веществ в экспериментальной и особенно в клинической практике.

Произведенная нами экспериментальная сравнительная оценка токсичности и опасности этиленгликоля, α -пропиленгликоля и глицерина относится только к случаям однократного их применения.

Выводы. Степень токсичности этиленгликоля, α -пропиленгликоля и глицерина зависит от пути и скорости их введения в организм, концентрации веществ и способа выражения токсичности.

α -Пропиленгликоль при однократном медленном внутривенном введении крысам в зависимости от концентрации веществ в 2,65—3,28 раза менее токсичен, чем этиленгликоль при выражении токсичности в молярных единицах и в 3,26—4,0 раза — при ее выражении в единицах массы. Глицерин соответственно в 2,08—3,25 и 1,72—2,69 раза более токсичен α -пропиленгликоля, но в неразведенном состоянии в 1,57 и 2,34 раза менее токсичен, чем этиленгликоль. Токсичность 20%-ных растворов глицерина и этиленгликоля значимо не отличаются.

α -Пропиленгликоль при однократном внутрибрюшинном введении крысам и мышам менее токсичен, чем глицерин и этиленгликоль, соответственно в 2,99 и 2,58; 2,47 и 1,68 раза при выражении токсичности в молярных единицах, в 2,49; 3,16 и 2,0 раза — при ее выражении в единицах массы. Различия токсичности глицерина и этиленгликоля не достоверны.

α -Пропиленгликоль при однократном внутривенном введении кроликам в 2 раза менее токсичен глицерина в единицах массы и в 2,42 раза — в молярных единицах.

Установленные степени опасности развития острого смертельного отравления большими дозами этиленгликоля, α -пропиленгликоля и глицерина не изменяют соотношений токсичности и опасности веществ.

Различия токсичности этиленгликоля, α -пропиленгликоля и глицерина в зависимости от вида и пола животных в ряду мыши, крысы, кролики не выражены.

1. Бауман В. Р., Кокта А. Я., Кремер Ю. Н. Гепатотоксическое действие некоторых метаболизируемых спиртов при их парентеральном введении. — Изв. АН ЛатвССР, 1970, № 7, с. 64—69.
2. Кандель Э. И., Чеботарева Н. М. Профилактика и лечение отека мозга с помощью современных медикаментозных средств. — Журн. невропатологии и психиатрии, 1972, № 1, с. 124—130.
3. Карасик В. М. Кривые индивидуальной чувствительности в фармакологическом анализе. — Успехи совр. биологии, 1944, 17, № 1, с. 71—86.
4. Кремер Ю. Н., Витолина С. П., Франк Е. П. Диолы в качестве источника энергии при оральном и парентеральном питании. — Вопр. питания, 1970, 29, № 3, с. 62—67.
5. Кремер Ю. Н., Шмидт А. А. Обеспечение пластических и энергетических потребностей организма парентеральным путем (современное состояние вопроса и перспективы). — Вопр. питания, 1971, 30, № 2, с. 3—12.
6. Крышень П. Ф., Рафес Ю. И. Сорбит, ксилит, глицерин и их применение в медицине. — Киев: Наук. думка, 1979. — 292 с.
7. Прозоровский В. Б. Использование метода наименьших квадратов для пробит-анализа кривых летальности. — Фармакология и токсикология, 1962, № 1, с. 115—119.
8. Пушкарь Н. С., Белоус А. М. Введение в криобиологию. — Киев: Наук. думка, 1975. — 343 с.
9. Пушкарь Н. С., Шраго М. И., Белоус А. М., Калугин Ю. В. Криопротекторы. — Киев: Наук. думка, 1978. — 204 с.
10. Саноцкий И. В., Уланова И. П. Критерии вредности в гигиене и токсикологии при оценке опасности химических соединений. — М.: Медицина, 1975. — 328 с.
11. Deichman B. W., Le Blanc T. I. Industr. Hyg. Toxicol., 1943, 25, N 9, p. 415—417. — Приводится по: Елизарова О. Н. Определение пороговых доз промышленных ядов при пероральном введении. — М.: Медицина, 1971, с. 35.
12. Hanke M. E. The physiological action of glycerol. — In: Glycerol. New York, 1953, p. 402—422.
13. Karow A. M. Cryoprotectants — a new class of drugs. — J. Pharm. and Pharmacol., 1969, 21, N 4, p. 209—213.

14. Karow A. M., Abouna I. J., Humphries A. L. Organ preservation for transplantation. — Boston: Little Brown and Co., 1974. — 261 p.
15. Królczyński L. Technologia leków parenteralnych. — Warszawa, 1966. — 290 s.
16. Litchfield J. T., Wilcoxon I. and F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. — J. Pharm. Exp. Ther., 1949, 96, N 2, p. 99—113.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
15.02.80

УДК 57.043.581

В. Д. Мануильский, Н. С. Пушкарь,
В. В. Манк, К. М. Сытник

КРИОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ ЗАРОДЫШЕЙ СЕМЯН ФАСОЛИ

Резистентностью к низким температурам (-196°C) обладают семена, пыльца, споры [3—5, 6] — организмы, способные, не теряя жизнеспособности, длительное время находиться в состоянии вынужденного покоя при низких уровнях влажности. В данном случае следует рассматривать устойчивость к обезвоживанию и замораживанию. Повышение влажности семян при набухании приводит к утрате резистентности к низким температурам, что свидетельствует об изменении криоустойчивости клеточных структур.

В литературе нет единого мнения относительно уровней влажности, при которых растительные клетки, замороженные до температуры жидкого азота, погибают [5]. В связи с этим нами исследовалось влияние режимов охлаждения на жизнеспособность семян и зародышей фасоли, а также особенности процесса кристаллообразования льда в воздушно-сухих и начавших набухать семенах. Это интересно для выяснения изменений, происходящих на начальных этапах роста, а также для понимания механизмов устойчивости к экстремальным воздействиям.

Материалы и методика. Исследования проводились на семенах фасоли сорта «Белозерная». Семена или зародыши увлажняли в дистиллированной воде при комнатной температуре, а при необходимости — над поверхностью жидкости и замораживали в герметических полиэтиленовых ампулах прямым погружением в жидкий азот. Размораживали материал в водяной бане при температуре 37°C . Жизнеспособность определяли проращиванием семян в стерильных условиях на влажной фильтровальной бумаге. Содержание свободной и связанной форм воды измеряли методом ЯМР. Спектры снимали на приборах РЯ-2305 и INM-4H-100 с рабочей частотой для протонов соответственно 60 и 100 мГц, а термограмму охлаждения и отогрева — на сканирующем калориметре ДСМ-2.

Результаты и обсуждение. Семена фасоли, находящиеся в состоянии вынужденного покоя при влажности от 14 до 25%, способны выдерживать замораживание до -196°C . Скорость охлаждения воздушно-сухих семян обычно не влияет на их жизнеспособность, однако при скоростях отогрева свыше $50^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ наблюдается растрескивание эндосперма и зародыша семени, что ведет к их гибели. Величину влажности, при которой семена погибают в результате действия низких температур, сложно установить в связи с тем, что пробы, используемые для определения жизнеспособности, содержат семена с различной способностью поглощать воду. Исходя из этого были проведены опыты с изолированными зародышами, которые извлекали из сухих семян, а затем замачивали в воде. После обработки при низких температурах эти зародыши в стерильных условиях раскладывали в чашки Петри на фильтровальную бумагу, смоченную дистиллированной водой, а затем помещали в термостатируемую камеру при 26°C . Жизнеспособность определяли по изме-

нению длины зародышевой оси, которую измеряли на 3-й день после обработки низкими температурами.

Полученные данные свидетельствуют о том, что при влажности около 25% резко уменьшалась длина зародышевой оси, и при 30%-ной влажности зародыш фасоли полностью терял жизнеспособность. Эту точку в дальнейшем будем называть критической при обработке зародышей низкими температурами (рис. 1).

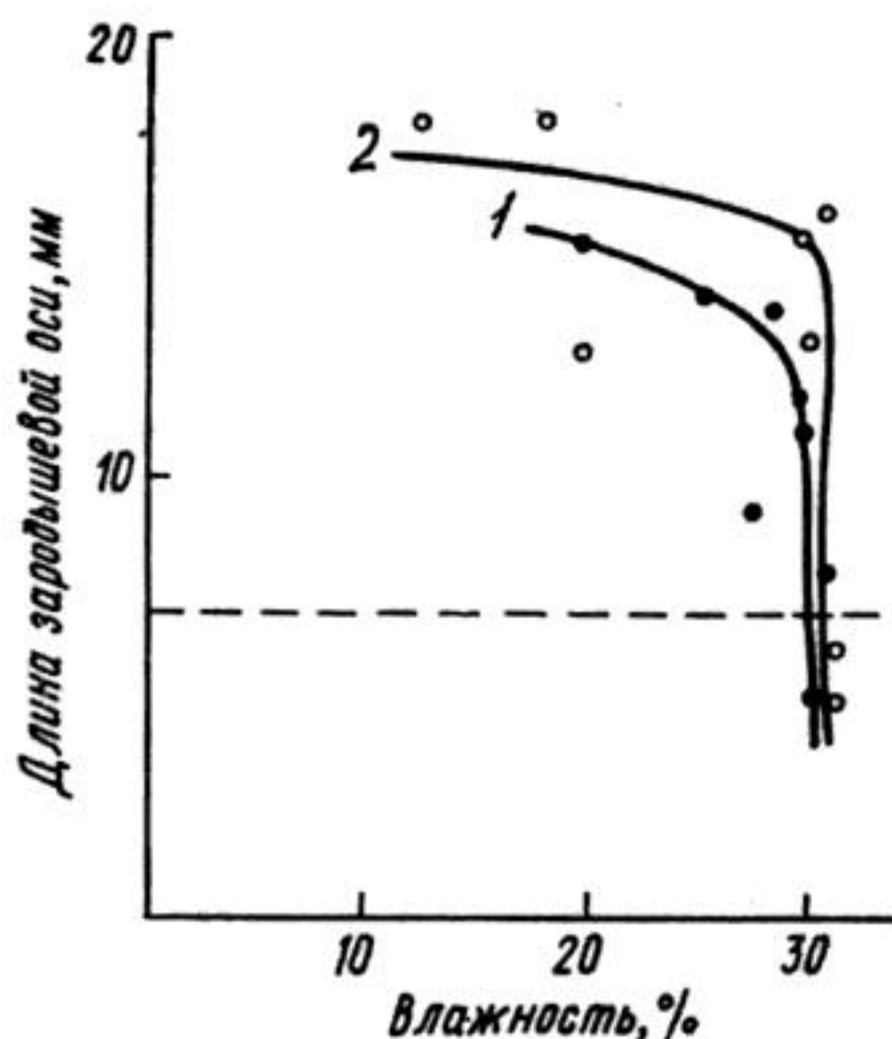


Рис. 1. Действие низких температур на жизнеспособность зародышей фасоли при разных уровнях влажности:
1 — при замачивании зародышей в воде; 2 — при насыщении в парах воды над поверхностью жидкости.

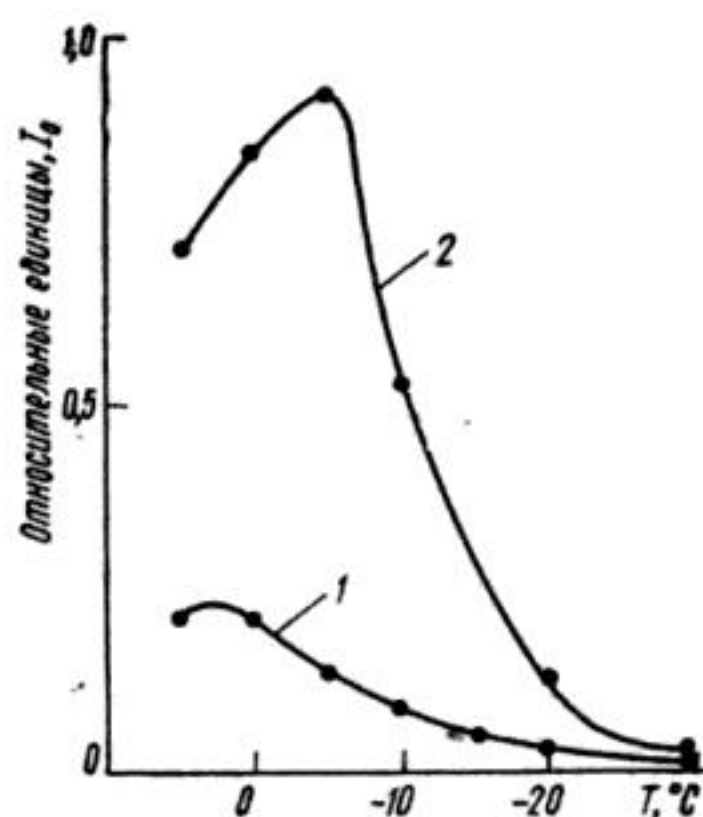


Рис. 2. Интенсивность сигнала ЯМР у зародышей фасоли при различной влажности:
1 — зародыши фасоли при влажности 14%; 2 — зародыши фасоли при влажности около 30%.

Использование низких концентраций криопротекторов (5—10%-ные водные растворы) полиэтиленоксидов (ПЭО), диметилсульфоксида (ДМСО), полиэтиленгликоля (ПЭГ) и глицерина при быстрых скоростях замораживания не оказало положительного действия. Эффективными были только высокие концентрации криопротекторов, которые во время инкубации вызывали обезвоживание семян и зародышей. Следует отметить, что криопротекторы с низкой молекулярной массой — ПЭО-100, ПЭГ-600 и глицерин — обладали бóльшим обезвоживающим действием по сравнению с высокомолекулярными. Положение критической точки также не изменялось при замачивании зародышей фасоли до 50% влажности с последующим высушиванием до воздушно-сухого состояния и повторным замачиванием. Таким образом, во всех случаях низкие температуры оказывали летальное действие при влажности зародышей около 30%.

Для исследования влияния скорости поглощения воды на резистентность к низким температурам были проведены опыты по насыщению зародышей фасоли в парах воды над поверхностью жидкости. Продолжительность насыщения водой для достижения 30%-ной влажности в этом случае составляла 12 ч, тогда как при замачивании в воде такой же уровень влажности наблюдался через 3—4 мин. Однако, несмотря на значительные различия в скорости поступления воды в зародыш, влажность, при которой низкие температуры оказывали летальное действие, оставалась около 30%.

Для объяснения причин, вызывающих гибель зародыша фасоли при замораживании, были исследованы формы воды в сухом и замоченном

зародыше с помощью метода ядерного магнитного резонанса (ЯМР) (рис. 2). Установлено, что у зародышей с влажностью больше 30% резко уменьшается количество невымерзшей воды в интервале температур от 0 до -15°C , рассчитанное по площади кривых поглощения H_2O . Ниже этих температур интенсивность спектра ЯМР определяется водой, сохраняющей подвижность при данной температуре. Его интегральная интенсивность меняется слабо при снижении температуры и практически одинакова для сухих и замоченных зародышей. В соответствии с представлениями Кюнтца [9], невымерзшей остается вода, непосредственно связанная с гидрофильными центрами молекул, которая, по-видимому, может быть приравнена к связанным формам воды [1]. Резкое уменьшение количества свободной воды, вымораживаемой при температуре ниже нуля, связано с ее кристаллизацией. Это было подтверждено при исследовании скоростей образования центров кристаллизации у зародышей фасоли при различной влажности.

Термограммы замораживания, полученные с помощью сканирующего калориметра, свидетельствуют об отсутствии кристаллизации в воздушно-сухих семенах (рис. 3, а, б). Зародыши, содержащие более 30% воды, имеют четко выраженный пик кристаллизации при температурах $-16 \div -18^{\circ}\text{C}$. Судя по форме пика, начальное переохлаждение ведет к гетерогенному образованию кристаллического зародыша в локальном участке образца, а в дальнейшем имеет место замедленный, в отличие от чистой воды, процесс кристаллизации, связанный с распространением кристаллов по всему образцу. На кривой отогрева наблюдается небольшой плавный пик при $-26,5^{\circ}\text{C}$, соответствующий эвтектической температуре (рис. 3, в, г). Эти данные являются дополнительным доказательством того, что гибель зародыша семян, содержащих около 30% воды, при действии низких температур в основном связана с процессами кристаллообразования льда, хотя можно предположить, что потеря криорезистентности в данном случае обуславливается не только нарушениями, вызванными образованием льда, поскольку при набухании семян происходит экспоненциальное увеличение дыхания, которое при влажности 30% почти удваивается по сравнению с интенсивностью дыхания сухого семени [3].

Интересны полученные нами данные [4] о том, что потеря криорезистентности пыльцы при увеличении влажности связана с отходом осмиофильных глобул с поверхности плазмалеммы внутрь цитоплазмы. Эти данные дают возможность судить о начальных превращениях в клетке при увеличении ее влажности. В зародыше фасоли, как и у пыльцы, на ранних этапах набухания осмиофильные глобулы перемещаются с поверхности плазмалеммы внутрь цитоплазмы, что может быть связано с активацией гидролитических ферментов. Эти глобулы (или сферосомы) имеют липидную природу и в основном состоят из триглицеридов [8]. Известно, что на первых этапах набухания семян происходит активизация липаз, гидролизующих липидные глобулы до глицерина и свободных жирных кислот. Глицерин, обладая защитной функцией, при низкой температуре должен повышать устойчивость к замораживанию. Однако этого мы не наблюдали, в связи с чем трудно судить о роли глицерина в данном случае. Свободные жирные кислоты (СЖК), являющиеся источником энергии и предшественником углеводов, белков и других необходимых для синтеза нового клеточного материала веществ, накапливаются при набухании семени, по-видимому, в связи с тем, что ферментативные системы клетки еще недостаточно активированы для утилизации этих продуктов. Гидролиз запасных липидов до СЖК происходит в жизнеспособных и нежизнеспособных семенах, но у нежизнеспособных семян СЖК в дальнейшем не превращаются в углеводы [11]. Накопление СЖК отмечено также в мембранах митохондрий при повреждающем действии низких температур на животные ткани, что рас-

смачивается как возможное низкотемпературное активирование фосфолипаз, свидетельствующее о значительном повреждении проницаемости этих клеточных структур [2].

Согласно классическим представлениям СЖК окисляются митохондриями. Однако, помимо этого, есть мнение, что существует внемитохондриальное окисление СЖК так же, как существует внемитохон-

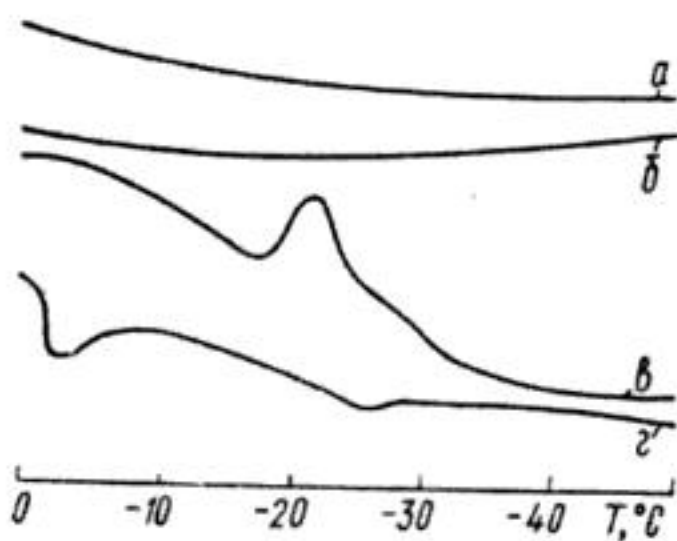


Рис. 3. Термограммы замораживания и отогрева сухих (а, б) и насыщенных в течение 14 ч в парах воды (в—г) зародышей фасоли. Скорость замораживания и отогрева $3^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$

дриальная система транспорта электрона в клетке [10]. Если считать, что СЖК окисляются в митохондриях и цитоплазме одновременно, то их накопление в объектах, подвергнутых замораживанию, может привести к нарушению активности ферментов, непосредственно связанных с окислительным фосфорилированием и электронтранспортной цепью.

Возможно также, что накопление СЖК в митохондриях может способствовать разобщению фосфорилирования и дыхания.

Такие представления, по-видимому, имеют под собой основу в связи с тем, что при действии низких температур на клетку в первую очередь подвержены изменениям мембраны клеточных структур, в данном

случае митохондрий, повреждение которых приводит к нарушению процессов запасаения энергии и образованию промежуточных продуктов, что в конечном счете ведет к гибели клетки. Накопление СЖК отмечено также в мембранах митохондрий при повреждающем действии низких температур на животные ткани, что рассматривается как возможное низкотемпературное активирование фосфолипаз, свидетельствующее о значительном повреждении проницаемости этих клеточных структур [2].

То, что низкие температуры не оказывают действия на ферменты, гидролизующие запасные триглицериды, согласуется с представлениями, что в водно-органических смесях ферменты, состоящие из одной полипептидной цепи, значительно более устойчивы к замораживанию по сравнению с ферментами, состоящими из нескольких субъединиц [6].

1. Аксенов С. И. О состоянии воды в биологических объектах. — В кн.: Тез. докл. XII Междунар. ботан. конгр. М.: Наука, 1975, 2. — 478 с.
2. Биофизика / Под ред. Н. С. Пушкаря. — М., 1978. — 114 с. — (Итоги науки и техники / ВИНТИ; т. 9).
3. Джеймс В. Дыхание растений. — М.: Изд-во иностр. лит., 1956. — 439 с.
4. Мануильский В. Д., Мартын Г. И. Криорезистентность и ультраструктурная организация покоящейся и прорастающей пыльцы. — В кн.: Применение электронной микроскопии в материаловедении, биологии и медицине: Тез. докл. 2-й Респ. конф. Киев, 1979, с. 69—70.
5. Самыгин Г. А., Лившин А. З. О причинах гибели проростков семян при медленном замораживании. — Физиология растений, 1971, 18, вып. 3, с. 594—600.
6. Сергеев Г. Б., Батюк В. А. Криохимия. — М.: Химия, 1978. — 295 с.
7. Сытник К. М., Мануильский В. Д. Проблемы криофитофизиологии. — Висн. АН УРСР, 1978, № 9, с. 22—33.
8. Butler V., Bornman C. H., Jensen W. A. *Welwitschia mirabilis*; Fine structure of germination seed. IV. The Imbibed Gametophyte. — Z. Pflanzenphysiol., 1979, 92, N 2, p. 95—113.
9. Kuntz I. D. Hydration of macromolecules. III. Hydration of polypeptides. — J. Amer. Chem. Soc., 1971, 93, N 2, p. 514—516.
10. Mapson L. W., Moustafa E. M. Ascorbic acid and glutathion as respiratory carriers in the respiration of pea seedling. — Biochem. J., 1956, 62, p. 248—259.
11. Staden J., Davey J. E., Plessis L. M. Lipid utilization in viable *Protea compacta* embryos during germination. — Z. Pflanzenphysiol., 1976, 77, N 2, p. 113—119.
12. Stanley R. G., Linskens H. J. Pollen, Biology, Biochemistry, Management. Berlin etc.: Springer-Verlag, 1974. — p. 307.

А. Н. Новиков, Ю. И. Пичугин, Л. Г. Кулешова

ВЛИЯНИЕ РЯДА КРИОПРОТЕКТОРОВ НА ПРОЦЕСС ЗАРОДЫШЕОБРАЗОВАНИЯ ЛЬДА В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Основным процессом, обуславливающим все явления, сопровождающие низкотемпературную консервацию биологических объектов, является фазовый переход вода — лед. От того, как реализуется фазовый переход и от возможности управления им во многом зависит результат криоконсервации. Накопленный криомикроскопический экспериментальный материал о возникновении первичных кристаллических структур и о влиянии на них криопротекторов и модификаторов кристаллизации, а также скоростей охлаждения носит в основном описательный характер [1, 5, 7]. Применение метода низкотемпературной рентгенографии позволило исследовать структурные особенности микрокристаллов, а математическая обработка рентгеновских диффракционных картин — количественно рассчитать размеры кристаллов, степень их деформации при различных условиях [2]. Однако количественные данные о влиянии криопротекторов на зародышеобразование и его механизме отсутствуют. В связи с этим в настоящей статье изучено влияние ряда криопротекторов на зародышеобразование льда в плазме крови человека.

В экспериментах использовалась методика оценки кинетики закристаллизовывания мелких капель исследуемого раствора, находящихся в неполярной среде [4]. Суть этой методики такова: определенное количество исследуемой жидкости, в данном случае раствора плазмы крови, диспергировалось в неполярной среде, например в смеси вазелинового масла и гептана в объемном соотношении 1 : 1. Часть полученной эмульсии переносилась в кювету, помещаемую в криоприставку криомикроскопа. Система охлаждалась со скоростью 5,2°С/мин до температуры экспозиции —25,0°С. Визуально или с помощью микрофотосъемки подсчитывалась доля закристаллизовавшихся частиц во времени, что являлось мерой процесса первичного зародышеобразования. Размеры капель эмульсии выбирали в интервале 28—56 мкм. Точность результатов измерений, выраженная величиной стандартного отклонения, составляла ±4,4% в доверительном интервале 95%.

В табл. 1 приведены результаты экспериментов по влиянию ряда криопротекторов на изучаемый процесс. Для обработки экспериментальных данных было использовано уравнение, полученное для описания процесса зародышеобразования в каплях эмульсии [3]. Уравнение выведено в предположении, что в каждой капле раствора может одновременно и независимо реализоваться механизм как гетерогенного, так и гомогенного зародышеобразования. Уравнение имеет следующий вид:

$$\alpha = 1 - \frac{1}{1 + \frac{3}{2} I_v \tau + \frac{3}{2} m [1 - \exp(-I_k \tau)]}, \quad (1)$$

где α — доля закристаллизовавшихся капель эмульсии; I_v — частота флуктуативного зародышеобразования в капле характеристического размера; I_k — частота зародышеобразования на твердой примеси; τ —

Таблица 1

Влияние криопротекторов на кинетику процесса зародышеобразования льда в плазме крови человека

Криопротектор	Концентрация, % массы	Скорость охлаждения, °С/мин	Температура экспозиции, °С	Доля закристаллизовавшихся капель (%) за время, мин			
				2,5	5	7,5	10
ПЭО-100	10	5,2	—25,0	12,0	15,0	18,0	18,0
ДМСО	10	5,2	—25,0	11,0	11,0	13,0	14,0
Этиленгликоль	5	5,2	—25,0	15,0	17,0	19,0	18,0
	7,5	5,2	—25,0	6,0	8,0	8,0	8,0
	10	5,2	—25,0	3,0	4,0	4,0	5,0
	15	5,2	—25,0	1,0	2,0	2,0	2,0
	10	5,2	—25,0	15,0	17,0	18,0	19,0
Глицерин	10	5,2	—25,0	14,0	19,0	19,0	19,0
ПЭО-400	5	5,2	—25,0	24,0	28,0	28,0	29,0
ПЭГ-1500	10	5,2	—25,0	21,0	22,0	23,0	24,0
	15	5,2	—25,0	15,0	17,0	17,0	18,0
	20	5,2	—25,0	6,0	10,0	11,0	11,0
	5	5,2	—25,0	28,0	31,0	32,0	33,0
	7,5	5,2	—25,0	27,0	29,0	32,0	32,0
ПВП	10	5,2	—25,0	27,0	29,0	30,0	31,0
	12,5	5,2	—25,0	27,0	29,0	31,0	32,0

время; m — среднее число твердых примесей в капле характеристического размера $m = \frac{\pi}{6} r_0^3 \cdot n$, где n — частичная концентрация твердых примесей; r_0 — наиболее вероятный размер капли.

Экспериментальные данные обработаны по уравнению (1) на ЦЭВМ методом нелинейного оценивания Маркуадта [3] и представлены в табл. 2. Величины рассчитанных параметров уравнения (1) позволяют получить информацию о механизме процесса зародышеобразования льда и о характере влияния на него криопротекторов. Сопоставление величин частот гетерогенного и флуктуативного зародышеобразования показывает, что в среднем вклад механизма гомогенного зародышеобразования составляет 2,6%. Иными словами, процесс зародышеобразования льда в исследуемой системе практически полностью протекает по гетерогенному механизму.

Влияние исследованных криопротекторов на зародышеобразование льда проявляется только в его пассивации. Сопоставление рассчитанных величин частот гетерогенного зародышеобразования в 1 мл, числа активных примесей в 1 мл, частот гетерогенного зародышеобразования на твердой примеси показывает, что низкомолекулярные криопротекторы ПЭО-100, ДМСО, глицерин и особенно этиленгликоль замедляют процесс зародышеобразования более значительно, чем высокомолекулярные ПЭГ-1500, ПВП. Увеличение в системе концентрации криопротекторов также приводит к замедлению процесса. Акт образования зародыша кристалла льда на частице твердой примеси — результат полимолекулярной адсорбции молекул воды на поверхности примеси. Характер адсорбции зависит как от адсорбционных свойств поверхности примеси, так и от свойств окружающей среды. Исследованные криопротекторы, за исключением ПВП, не могут обладать поверхностной активностью на границе раздела твердая примесь — раствор, т. е. адсорбция их на поверхности твердой примеси — процесс маловероятный, а следовательно, на адсорбционные свойства последних влиять не могут. Поэтому уменьшить или замедлить адсорбцию воды на твердых примесях криопротекторы могут лишь связав ее в гидратные структуры. Для подтверждения этого полученные данные частот гетерогенного зародышеоб-

Таблица 2

Оценка параметров уравнения (1) по экспериментальным данным таблицы 1

Криопротектор	Концентрация, % массы	Скорость охлаждения, °С/мин	Температура экспозиции, °С	Расчетные параметры по уравнению (1)			
				Частота гетерогенного зародышеобразования в 1 мл, $I_k \cdot 10^6$, мин ⁻¹ ·мл ⁻¹	Частота флуктуативного зародышеобразования в 1 мл, $I_k \cdot 10^6$, мин ⁻¹ ·мл ⁻¹	Число активных примесей в 1 мл, $n \cdot 10^6$	Частота гетерогенного зародышеобразования на твердой примеси I_k , мин ⁻¹
ПЭО-100	10	5,2	-25,0	2,86	13,05	2,98	0,95
ДМСО	10	5,2	-25,0	2,30	4,70	2,50	0,92
Этиленгликоль	5	5,2	-25,0	2,57	11,99	3,49	0,74
	7,5	5,2	-25,0	0,85	0,73	1,81	0,47
	10	5,2	-25,0	0,33	1,86	0,95	0,32
	15	5,2	-25,0	0,16	5,98	0,76	0,21
	10	5,2	-25,0	2,67	12,72	3,39	0,79
Глицерин	10	5,2	-25,0	2,32	1,06	4,43	0,52
ПЭО-400	5	5,2	-25,0	4,58	8,97	4,72	0,97
ПЭГ-1500	10	5,2	-25,0	4,07	4,68	4,11	0,99
	15	5,2	-25,0	3,30	8,57	3,44	0,96
	20	5,2	-25,0	0,73	6,31	2,85	0,25
ПВП	10	5,2	-25,0	5,75	13,53	6,78	0,85

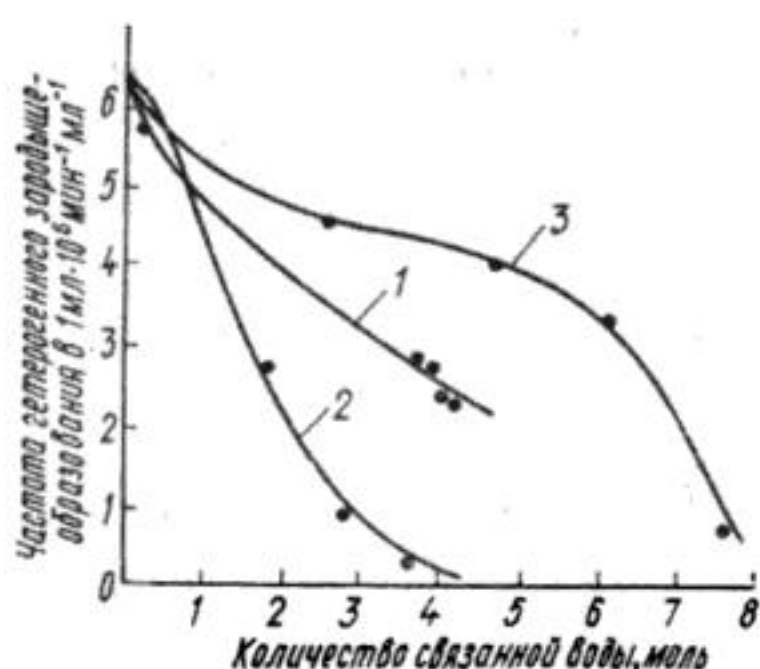
разования (см. табл. 2) сопоставлялись с величинами гидратации криопротекторов, выраженными в молях связанной воды соответствующим мольным количествам криопротекторов по данным работы [6] (табл. 3). Из рисунка видно, что частота гетерогенного зародышеобразования находится в обратной зависимости от количества связанной воды. Гидратация криопротекторов заключается в связывании воды и соответственно в изменении диффузионных свойств среды, что влечет за собой пассивацию гетерогенного зародышеобразования.

Наличие трех графических зависимостей позволяет предположить существование влияния криопротекторов, обусловленного их гидратационными свойствами, и влияния, определяемого каким-то другим или другими свойствами. Расшифровать природу влияния другого, неизвестного свойства исследуемых криопротекторов на гетерогенное зародышеобразование на данном этапе невозможно. Можно лишь оценить вклад

Таблица 3

Влияние гидратации криопротекторов на частоту гетерогенного зародышеобразования

Криопротектор	Молекулярная масса, M_m	Концентрация криопротектора		Количество связанной воды, моль	Частота гетерогенного зародышеобразования в 1 мл $\times 10^6$, мин ⁻¹ $\times$ мл ⁻¹
		% массы	моль		
ПЭО-100	106	10	0,94	3,76	2,86
ДМСО	78,1	10	1,29	4,13	2,30
Этиленгликоль	62,1	5	0,81	1,76	2,57
		7,5	1,28	2,82	0,85
		10	1,63	3,62	0,33
		15	2,40	4,06	0,16
		10	1,11	3,83	2,67
Глицерин	92,1	10	0,25	4,05	2,32
ПЭО-400	400	5	0,033	2,56	4,58
ПЭО-1500	1500	10	0,067	4,74	4,07
		15	0,100	6,17	3,30
		20	0,139	7,65	0,75
ПВП	12800	10	0,00078	0,336	5,75



Влияние гидратации криопротекторов на частоту гетерогенного зародышеобразования:

1 — ПЭО-100, глицерин, ДМСО, ПЭО-400, ПВП; 2 — этиленгликоль; 3 — ПЭО-1500.

его в суммарный процесс пассивации зародышеобразования. Так, влияние глицерина, ДМСО, ПЭО-100, ПЭО-400, ПВП на гетерогенное зародышеобразование обусловлено в основном гидратацией их молекул. Для этиленгликоля и ПЭО-500 вклад влияния неизвестного их свойства существен, причем у этиленгликоля он способствует пассивации гетерогенного зародышеобразования, а у ПЭО-1500 — активации. Количественные характеристики влияния криопротекторов на процесс флуктуативного зародышеобразования льда (величины частот флуктуативного зародышеобразования см. в табл. 2) из-за их небольшой величины, ошибок эксперимента и расчета никакой достоверной информации дать не могут.

1. Иткин Ю. А., Розанов Л. Ф., Гордиенко Е. А., Сагалов В. Л. Процессы кристаллизации при низкотемпературной консервации биологических объектов. — В кн.: Механизмы криповреждения и криопротекции биологических структур. Киев: Наук. думка, 1976, с. 36—39.
2. Кулешова Л. Г. Исследование структурных особенностей замороженных водных растворов ПЭО-400. — В кн.: Современные вопросы криобиологии. Киев: Наук. думка, 1976, с. 11—13.
3. Мелихов И. В., Присяжнюк В. А. О нуклеации в диспергированных жидкостях. — ЖФХ, 1979, 53, № 5, с. 1108—1112.
4. Панов В. И., Новиков А. Н. Методика оценки устойчивости перенасыщенных растворов. — В кн.: Промышленная кристаллизация. М.: Химия, 1969. — 20 с.
5. Пушкарь Н. С., Белоус А. М., Иткин Ю. А. и др. Низкотемпературная кристаллизация в биологических объектах. — Киев: Наук. думка, 1977. — 240 с.
6. Пушкарь Н. С., Степин Л. Д., Калугин Ю. В. и др. Гидратация криопротекторов: Препринт. — Харьков, 1972. — 5 с.
7. Rapatz G., Luyet B. Microscopic observation on the development of the ice phase in the freezing of blood. — *Biodynamica*, 1960, 8, N 166, p. 195—239.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
12.03.80

УДК 57.043 617.713.089.843:535.37

О. В. Ренко

ИММУНОЛЮМИНЕСЦЕНТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РОГОВИЦЫ КРОЛИКА ПОСЛЕ ЧАСТИЧНОЙ СКВОЗНОЙ АУТОТРАНСПЛАНТАЦИИ

Развитие кератопластики неразрывно связано с изучением ее иммунологических аспектов. Нарушение целостности роговой оболочки при частичной сквозной трансплантации является травмирующим воздействием, которое может быть расценено как разрешающий фактор неантигенной природы, вызывающий нарушение гематофтальмического барьера и развитие иммунной реакции [1]. По мнению некоторых авторов [2, 4, 5], истинная аутоиммунная реакция развивается при повреждении тканей, изолированных гистогематическими барьерами. К антигенам таких структур, в частности тканей глаза, естественная иммунологическая толерантность выражена слабо или не существует вообще.

Одним из показателей развивающегося аутоиммунного процесса может быть появление в тканях связанных иммуноглобулинов, обнаруживаемых прямым методом люминесцирующих антител. Так, в срезах

биопсии кожи больных пузырчаткой, обработанных люминесцентной сывороткой против иммуноглобулинов человека, в межклеточных пространствах эпидермиса обнаруживается связанный с тканями иммуноглобулин [3]. При системной красной волчанке методом прямой иммунофлюоресценции в срезах биопсии кожи и почек выявляются связанные с тканями иммуноглобулины и отложения иммунных комплексов [7, 9]. Связанный иммуноглобулин выявляется также в срезах кожи при буллезном пемфигоиде [3], в тканях синовиальной оболочки пораженного сустава при ревматоидном артрите [8]. В доступной литературе сведений об иммунолюминесцентном исследовании роговицы после трансплантации обнаружено не было.

В связи с изложенным цель проводимого исследования заключалась в выяснении характера распределения иммуноглобулинов, связанных с тканью роговицы кролика после частичной сквозной аутотрансплантации.

Методика исследования. В работе использовался прямой метод люминесцирующих антител, впервые предложенный Кунс и соавторами в 1941 г. При постановке этого метода наиболее эффективным является применение чистых моноспецифических антител к иммуноглобулину, что исключает участие в реакции других белков сыворотки и тем самым значительно уменьшает неспецифическое свечение структур препарата [6, 9].

Препараты чистых антител к иммуноглобулину кролика, меченные изотиоцианатом флюоресценна, получали в лаборатории стрептококковых инфекций Института эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи АМН СССР. В качестве иммуносорбента использовали глютаральдегид по методике С. Аврамес, Т. Тернинк. Хранили меченую лиофилизированную сыворотку при 4°C.

В эксперименте использовано 20 кроликов породы шиншилла массой 1800—2000 г. Под общим наркозом (тиопентал натрия в/в) в центре роговицы производили сквозной разрез трепаном Д (6,5 мм) и накладывали узловатые капроновые швы. Животных забивали воздушной эмболией в сроки 1; 5; 10 и 20 сут.

В результате индивидуального подбора режима окраски для данной ткани мы выбрали следующий порядок приготовления препаратов: криостатные срезы роговицы толщиной 5—6 мкм подсушивали 30 мин при комнатной температуре и хранили до начала окраски не более 1 сут при температуре 4°C. Для удлинения срока хранения криостатных срезов до окраски мы использовали инкубацию их в течение 3—4 ч с 10%-ным раствором полиэтиленоксида M_m 400, затем отмывали забуференным фосфатным 0,85%-ным раствором NaCl (pH 7,2—7,4) в течение 20 мин и хранили до 7 сут при -20°C. При люминесцентной микроскопии сохраняемых таким образом срезов существенных изменений в характере свечения не обнаружено, в то время как срезы, не инкубированные в растворе ПЭО, к 7-м сут имели свечение, отличное от нативной ткани.

Непосредственно перед окраской меченой сывороткой криостатные срезы роговицы промывали в течение 30—40 мин в забуференном фосфатном 0,85%-ном растворе NaCl (pH 7,2—7,4). Окраску производили во влажной камере при комнатной температуре в течение 60 мин, после чего отмывали от несвязавшегося красителя в забуференном растворе NaCl 30—40 мин,

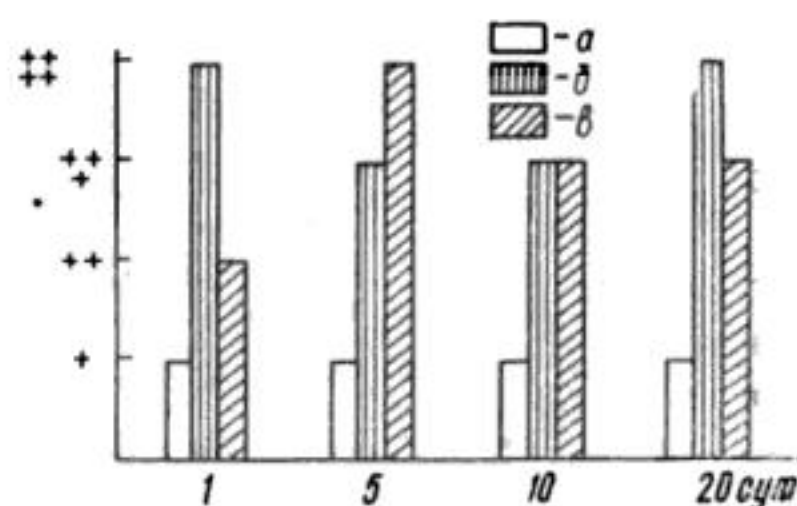


Рис. 1. Динамика свечения иммуноглобулинов в строме роговицы после частичной сквозной аутотрансплантации:

а — контроль; б — периферия оперированной роговицы; в — область аутотрансплантата.

заключали в забуференный глицерин (8 частей глицерина и 2 части фосфатного буфера) и покрывали покровным стеклом.

Специфичность реакции меченых препаратов проверяли в реакции ингибирования, для чего срезы обрабатывали 40 мин немеченым препаратом, промывали 20 мин забуференным раствором NaCl и инкубировали 60 мин с меченым препаратом антител к иммуноглобулину кролика. Отсутствие свечения в этой реакции свидетельствовало о специфичности окраски мечеными антителами.

Готовые препараты исследовали в люминесцентном микроскопе МЛ-2 при длине волны 400 нм с фильтрами СЗС-7, ФС-1 и БС-8, (окулярные фильтры ЖС-18 и ЖЗС-19, водная иммерсия, объектив 40, окуляр 8).

Для фотографирования препаратов применялись микрофотонасадка МФН-5, фотопленка РФ-3 с избирательной чувствительностью к зеленой части спектра.

Интенсивность свечения препаратов оценивалась по принятой полуколичественной системе: максимальная (++++), минимальная (±).

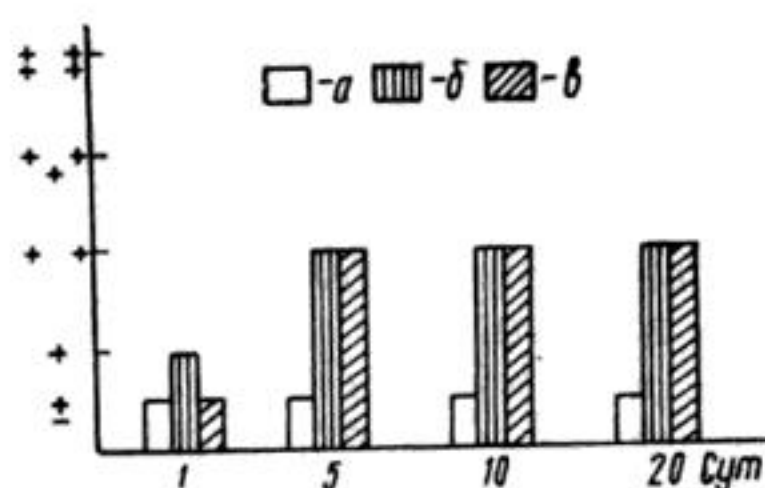


Рис. 2. Динамика свечения иммуноглобулинов в эпителии роговицы после частичной сквозной аутоотрансплантации. Условные знаки те же, что на рис. 1.

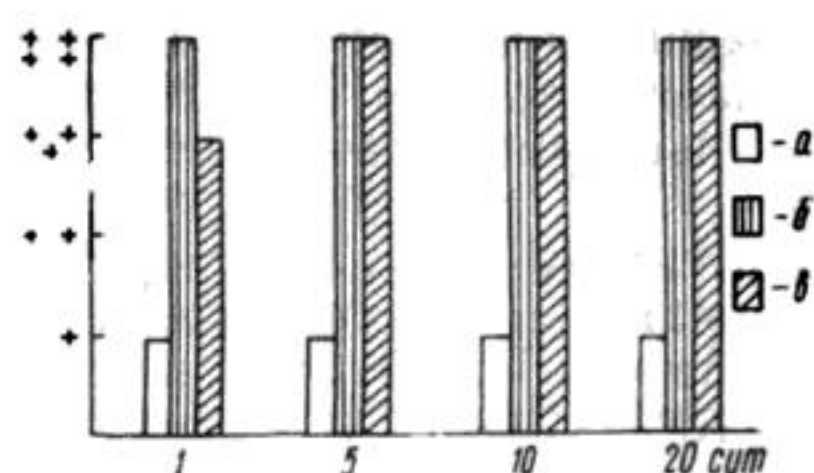


Рис. 3. Динамика свечения иммуноглобулинов в заднем эпителии роговицы после частичной сквозной аутоотрансплантации. Условные знаки те же, что на рис. 1.

Результаты наблюдений. При исследовании в люминесцентном микроскопе необработанных срезов роговой оболочки свечение препарата в темном поле не улавливалось, что свидетельствовало об отсутствии эффекта аутофлуоресценции. Это позволило исключить необходимость учета этого фактора при оценке окрашенных препаратов.

Наблюдению и анализу в каждом сроке подвергались: роговица кролика после частичной сквозной аутоотрансплантации; роговица здорового неопытного кролика (контроль).

При исследовании срезов роговиц контрольных кроликов отмечалось некоторое различие в интенсивности свечения ее слоев. Эпителий едва различим (±) между стромой и темным фоном, интенсивность свечения стромы средняя (+). Задний эпителий по интенсивности свечения (+) близок к строме, а между ними различается менее яркая десцеметова мембрана (±).

В отличие от роговицы человека Боуменова мембрана в роговице кроликов, крыс и мышей отсутствует [12]. Интенсивность свечения всех структур роговицы значительно усиливается уже в 1-е сут после операции, особенно стромы и заднего эпителия (рис. 1—3). Необходимо отметить различие в окраске центральной (области трансплантата) и периферической частей оперированной роговицы, выражающееся в нарастании интенсивности свечения от лимба к центру. Представляет интерес появление в эпителии на 5—10-е сут после операции ярко светящихся глыбок различной величины — от пылевидных до крупных конгломератов, локализованных преимущественно в базальном слое.

Проведенные наблюдения позволяют предположить, что частичная сквозная аутопластика роговой оболочки приводит к развитию ау-

тоиммунной реакции в связи с нарушением гематоофтальмического барьера. Об этом свидетельствуют обнаруженные с помощью прямого метода люминесцирующих антител связанные с тканью иммуноглобулины. Интенсивно светящиеся глыбки и конгломераты в эпителии, возможно, являются скоплением иммуноглобулинов. Вместе с тем наблюдаемое нарастание интенсивности свечения и, следовательно, увеличение содержания в строме роговицы иммуноглобулинов в направлении от ее периферии к центру, очевидно, демонстрирует участие в процессе регенерации циркулирующих в крови антител, выход которых в ткани роговицы обусловлен повышением проницаемости сосудов краевой петливой сети.

Дальнейшие наблюдения позволят сделать более определенные выводы о роли иммуноглобулинов в процессе жизнедеятельности оперированной роговицы.

1. Войно-Ясенецкий В. В. Особенности иммунологических проявлений тканевой несовместимости при кератопластике. — В кн.: Проблемы пересадки роговой оболочки: Тр. Междунар. симпоз. по кератопластике, Одесса, 18—22 авг. 1962 г. Киев: Здоров'я, 1966, с. 309—314.
2. Гольдин Л. В., Белецкая Л. В., Крюкова И. Н., Шаханина К. Л. Иммунолюминесценция в медицине / Под ред. Е. Н. Левиной. — М.: Медицина, 1977. — 240 с.
3. Ежов Н. Я. Клиническое и иммуно-морфологическое исследование у больных пузырчаткой в процессе лечения кортикостероидными гормонами и метотрексатом: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 1975. — 21 с.
4. Зубжицкий Ю. Н. Метод люминесцентной микроскопии в микробиологии, вирусологии и иммунологии. — Л.: Медицина, 1964. — 152 с.
5. Иоффе В. И. Экспериментальная и клиническая иммунопатология. — Вестн. Акад. мед. наук СССР, 1974, № 2, с. 16—23.
6. Рукосуев В. С. К методике получения чистых антител при иммуно-морфологическом исследовании. — Арх. патологии, 1973, 35, № 4, с. 76—79.
7. Серов В. В., Варшавский В. А., Кактурский Л. В. Биопсии кожи при системной красной волчанке. — Арх. патологии, 1971, 33, № 4, с. 70—71.
8. Серов В. В., Зубжицкий Ю. Н. Принципы и возможности морфологического изучения иммунопатологических процессов. — Арх. патологии, 1971, 33, № 9, с. 13—14.
9. Тареева И. Е. Современные представления о патогенезе волчаночного нефрита. — Арх. патологии, 1973, 35, № 6, с. 74—82.
10. Энгельгардт Н. В. Применение антител против гамма-глобулина в непрямом методе флюоресцирующих антител. — Бюл. эксперим. биологии и медицины, 1964, № 1, с. 67—71.
11. Avrameas S., Ternynck T. The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoabsorbents. — Immunochemistry, 1969, 6, p. 53—66.
12. Coons A. H., Kaplan M. H. Localization of antigen in tissue cells. — J. Exp. Med., 1950, 91, p. 1—13.
13. Reh binder Claes. Fine structure of the mouse cornea. — Z. Versuchstierk, 1978, 20, N 1, p. 28—34.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
04.01.80

УДК 57.043

А. С. Черепнев

ПРОБЛЕМА АВТОМАТИЗИРОВАННОЙ ОБРАБОТКИ ДАННЫХ ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Один из наиболее информативных, но трудоемких методов биологических исследований — метод электронной микроскопии, позволяющий достаточно объективно оценить изменение состояния биообъекта после воздействия на него экстремальных факторов. Автоматизация такого рода исследований должна быть направлена на создание человеко-машинного комплекса на базе электронного микроскопа и ЭВМ.

Анализ существующих систем автоматизированной обработки электронно-микроскопических изображений биологических объектов сви-

детельствует о недостаточно высоком уровне их развития и позволяет считать наиболее актуальным направлением разработку специализированного человеко-машинного комплекса на основе использования электронного микроскопа и ЭВМ для решения задач следующих трех типов.

К 1-му типу можно отнести задачи так называемого параметрического определения биологического объекта по его электронно-микроскопическому изображению, связанные с вычислением некоторых количественных параметров, например выделение и подсчет дискретных элементов электронно-оптического изображения, выделение и расчет площадей, диаметров, периметров, хорд (клеток, ядер и др.), а также их отношений. Решение задач этого типа, хотя и не позволяет дать общего представления об исследуемой ультраструктуре, однако весьма полезно для определения систем информативных признаков биологических объектов, выраженных количественными параметрами и необходимых для синтеза некоторых описаний исследуемых объектов [4]. В связи с этим естественно выделить более высокий уровень задач 2-го типа, связанных с разработкой методов организации различных структур данных, порождающих грамматик и соответствующих языков описания сложных изображений.

И наконец, к еще более высокому уровню следует отнести задачи 3-го типа, связанные с классификацией, идентификацией и систематизацией исследуемых биологических объектов и ультраструктур на основе определенных ранее различных морфологических показателей, синтаксических описаний, соответствующих грамматик. Круг задач этого типа связан с более сложным процессом классификационной обработки данных (КОД), с использованием методов теории кодирования и распознавания образов.

В данной статье рассмотрим задачи 3-го типа, выделим и сформулируем определенный класс задач в криобиологических исследованиях и рассмотрим пути их решения на основе использования изложенного в [1, 2, 4] структурно-аналитического метода КОД. Все задачи выделенного класса имеют следующую общую постановку.

Задано множество M объектов, относительно которых производятся идентификация, систематизация либо классификация. Известно, что M представимо суммой подмножеств

$$K_1 \cup K_2 \cup \dots \cup K_k = M, \quad K_i \cap K_j = \emptyset, \quad (i, j = 1, \bar{k}),$$

называемых классами, или образами.

Задана неполная информация $I(K_k)$ о классах $K_1, \dots, K_k$, а также описание множества M и описание $I(O)$ объекта O .

Принадлежность объекта O к образам $K_1, \dots, K_k$ в общем случае неизвестна. Требуется создать систему, которая по информации $I(K_k)$ и описанию $I(O)$ позволяла бы устанавливать для каждого j ($j = 1, 2, \dots, k$) правило принадлежности (решающее правило) любого объекта данной природы O образу K_j , т. е. определять значение некоторого обобщенного свойства « $O \in K_j$ ». При этом на вход системы подается вначале конечная совокупность реализаций, принадлежность которых к тому или иному классу K_j в определенной степени известна и может быть сообщена системе. В этот период система «обучается» или «самообучается», в результате чего автоматически составляются и запоминаются некоторые обобщенные описания классов (решающие правила) распознаваемых (систематизируемых, идентифицируемых) объектов. Степень «обученности» системы устанавливается на «экзамене», который заключается в проверке «способности» системы правильно классифицировать с помощью выработанных решающих правил новые, ранее не встречавшиеся объекты с известной классификацией.

В зависимости от специфики и целевых условий решаемой задачи из приведенной общей постановки вытекает конкретизированная частная постановка задачи при сохранении одной и той же входной информации. Особенность входной информации состоит в следующем. Электронно-оптическое изображение биологического объекта преобразуется в так называемую таблицу эмпирических данных (ТЭД), представляющую собой цифровую матрицу с присвоением каждому элементу изображения пространственной ординаты яркости. Такая ТЭД получается путем преобразования электронно-оптического изображения в электрические сигналы с использованием сканирования по строкам и кадрам с помощью электромагнитной отклоняющей системы, расположенной в колонне электронного микроскопа в области юстировочного механизма. В плоскости формирования электронно-оптического изображения расположен сцинтилляционный счетчик с высокой чувствительностью, относительно неподвижной диафрагмы которого производится сканирование изображения. Амплитуда электрического сигнала на выходе блока преобразования характеризует изменение величины электронно-оптической плотности изучаемого объекта по линии сканирования. Полученное при сканировании изображения изменение величины электронно-оптической плотности определяется ультраморфологическими свойствами исследуемого образца. Затем в амплитудно-временном режиме работы электронного микроскопа-анализатора изображение преобразуется в цифровую матрицу, каждый элемент которой своим цифровым значением определяет степень яркости того или иного участка изображения.

Зная соответствие степени яркости конкретным структурным элементам биологического объекта, можно однозначно идентифицировать их по соответствующим аналитическим пороговым выражениям относительно уровней яркости. Полученная ТЭД в виде цифровой матрицы значений яркости элементарных ячеек изображения представляет входную эмпирическую информацию в шкале наименований [1, 2, 4]. В общем случае для решения задач систематизации, идентификации и классификации объектов анализ ТЭД осуществляется как по столбцам, так и по строкам предварительно нормализованных цифровых матриц. Сущность процесса нормализации ТЭД будет описана позже, когда будут сформулированы задачи выделенного класса в следующей последовательности: задачи идентификации, классификации и систематизации.

Задача идентификации формулируется нами как требование найти по исходной ТЭД идентифицирующие правила распознавания состояний биологических объектов согласно определенным целям медико-биологических исследований. Как видно, задача идентификации вытекает из общей постановки и сводится к задачам КОД с обучением либо самообучением. Задача классификации тесно связана с идентификацией и состоит в организации классифицирующей процедуры отнесения исследуемых объектов к определенному классу с помощью уже найденных решающих правил в процессе идентификации. Успешное решение этих двух задач позволяет перейти к решению задачи систематизации, которая формулируется так: создать архивную систему машинной памяти для систематизации идентифицируемых и классифицируемых объектов по определенным категориям с целью упорядочения и обобщения научных выводов на основе криобиологических экспериментов.

Эти задачи, как правило, возникают при исследовании уровня жизнеспособности клеток после замораживания-оттаивания на основе изучения по электронно-микроскопическим изображениям изменения ультраструктуры клеток при различных режимах замораживания.

Основная цель моделирования состояла в получении ответа на вопрос: можно ли и какими способами «научить» машину по информации электронно-оптического изображения (цифровых матриц) распознавать (идентифицировать) состояние клеток, свидетельствующих об опре-

деленном уровне выживаемости при различных режимах замораживания клеток того же вида.

Принципы моделирования задач идентификации и классификации основывались на следующих соображениях. Анализируя результаты проводимых медико-биологических исследований с использованием электронного микроскопа для изучения уровня жизнеспособности клеток после замораживания-оттаивания, необходимо выявить характерные признаки состояний ультраструктуры клеток на изображении после воздействия экстремальных факторов [4]. Затем, руководствуясь этими признаками, подобрать типичные образцы ультраструктур исследуемых клеток для формирования обучающей выборки, по которой машина должна «обучаться» распознавать новые объекты, т. е. классифицировать их. В качестве способа обучения использовался СА-метод распознавания образов, реализованный системой ППП КОД-1 ДОС ЕС в режиме КОД с обучением.

Моделируемая задача формировалась следующим образом. Исследуется процесс динамики повреждения ультраструктуры клетки при медленном охлаждении до различных температур [4]. В этих исследованиях клеток можно выделить три уровня состояния их ультраструктуры, подвергнутых различным холодовым воздействиям клеток: 1-й образ — 1-й уровень при охлаждении до -5°C ; 2-й образ — 2-й уровень при охлаждении до -25°C и 3-й образ — 3-й уровень при охлаждении до -196°C . Формируется обучающая выборка образцов изображений клеток каждого образца из соответствующих цифровых матриц, а также выборка контрольных образцов для установления правильности определяемых в процессе обучения правил идентификации. Требуется на основе использования программных средств ППП КОД-1 ДОС ЕС по заданной обучающей выборке определить решающие правила идентификации контрольных образцов, характеризующиеся минимальной ошибкой классификации. Искомые решающие правила должны быть представлены в виде двухзначной R -функциональной грамматики образцов $G_R^{(2)}$ с элементами терминального словаря, выраженными терминальными $S-P$ для входных данных, измеренных в шкале наименований со значениями, определяемыми числами яркости элементов цифровых матриц исследуемых объектов. Заметим, что в модельном эксперименте использовались не реальные, а гипотетические цифровые матрицы, содержательно адекватные реальным, хотя и представляющие меньший объем информации об исследуемом объекте. Это ограничение было вызвано временным отсутствием аппаратной возможности генерации реальных цифровых матриц. Число градаций квантования яркости элементов изображений было принято равным девяти $\{0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8\}$, где 0 — максимальная степень яркости, а 8 — минимальная. На рис. 1, а — в, показаны три цифровые матрицы типичных образцов, представляющих описанные три образа эволюции их ультраструктуры при медленном охлаждении до -5°C ; -25°C и -196°C уже в нормализованном виде, хотя сетка декартовой системы координат XOY оставлена в своем обычном крайнем слева положении, чтобы сохранить положительными все декартовы координаты элементов изображений после их нормализации.

Формирование обучающей ТЭД в условиях данного эксперимента осуществлялось несколько иначе, нежели в описанном выше общем случае, а именно: каждая цифровая матрица вида (рис. 1, а — в) для трех клеток 1-го образа, трех — 2-го и трех — 3-го образа расчленялась на столбцы и строки как своеобразные 18-мерные векторы (точки) исходного пространства признаков. Таким образом, каждое изображение представлялось цифровой таблицей из 18-, 36-столбцовых строк, поскольку к 18 исходным строкам построчно присоединялись транспонированные столбцы. Следовательно, на каждый из 3 заданных образов приходилось $3 \times 18 = 54$ 36-мерных точек, а общий объем обучающей вы-

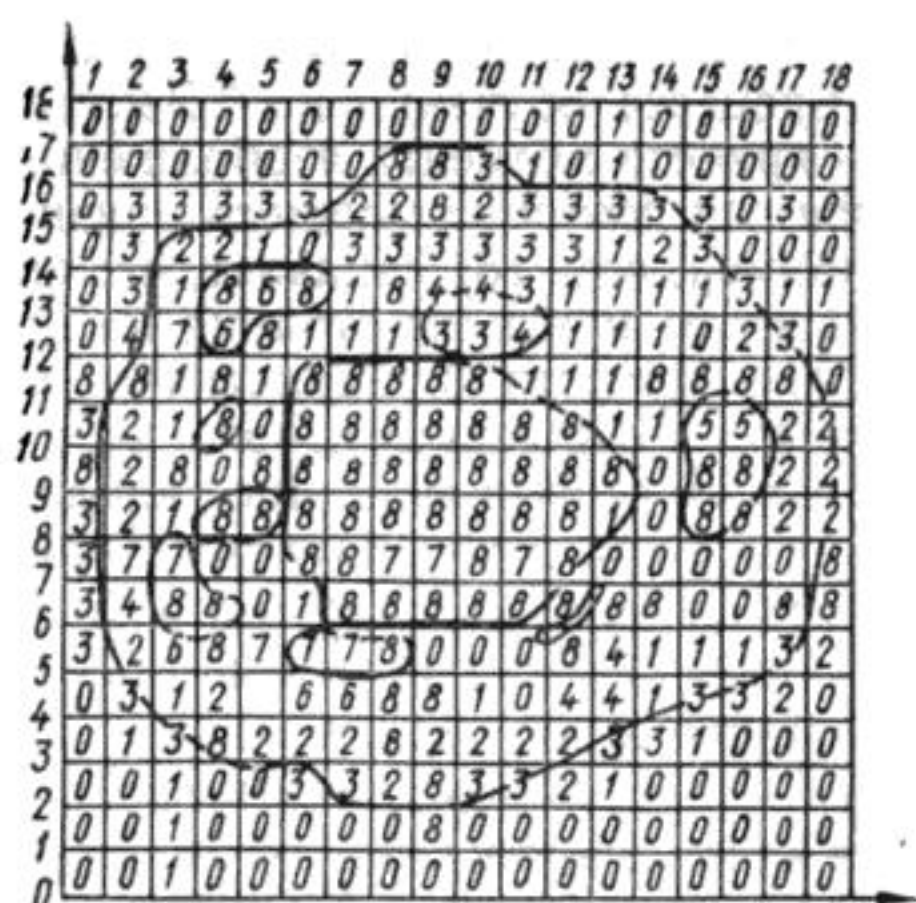
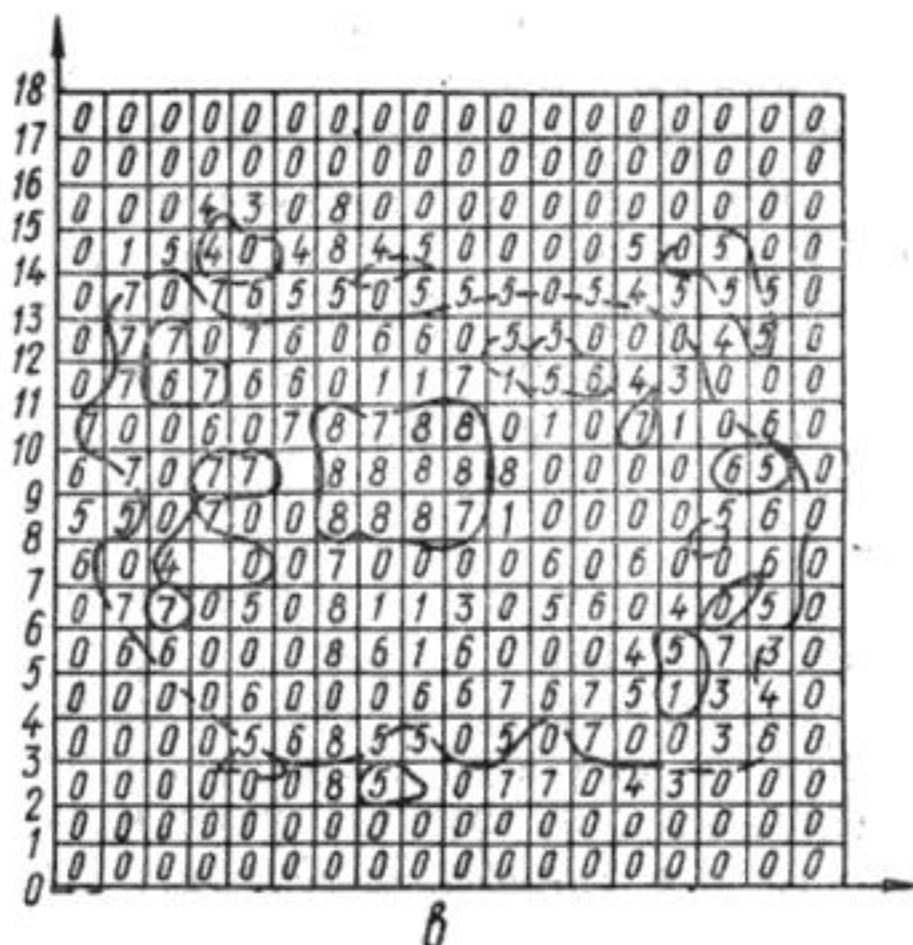
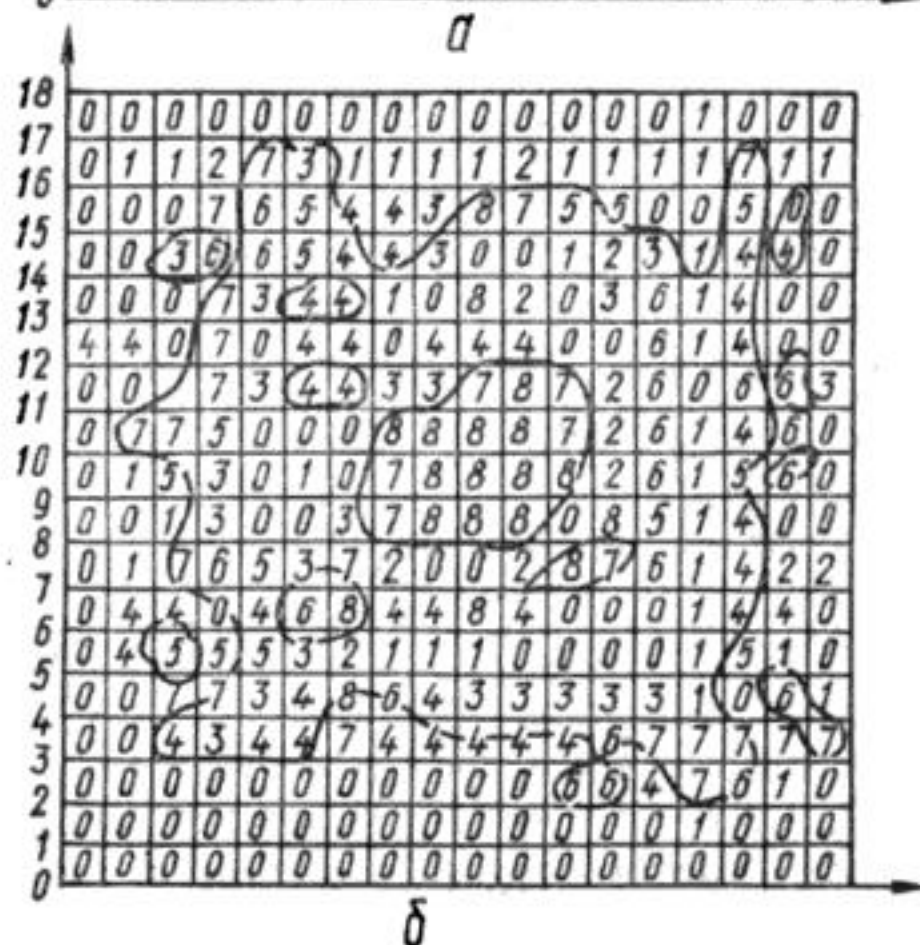


Рис. 1. Гипотетические цифровые матрицы образов клеток выживания после воздействия на них холодом:

а — 1-му уровню; б — 2-му уровню; в — 3-му уровню.



борки для трех образов составлял $3 \times 54 = 162$ точки, которые и представляли исходную обучающую ТЭД. Столбцы такой ТЭД считались первичными признаками объектов, обозначаемых x_j ($j=1, 2, \dots, 36$), а строки — реализациями объектов с компонентами, измеренными в шкале наименований $\bar{x}_i = (x_1, \dots, x_{36})$, ($i=1, 2, \dots, 162$).

Каждая строка $\bar{x}_i$ была помечена «указанием учителя», соответствующим указателю принадлежности данной точки определенному образу из трех заданных. Образцы контрольной выборки подвергались аналогичному преобразованию.

Решение поставленной модельной задачи начиналось с нормализации. Сущность процесса нормализации объектов распознавания состоит в нахождении параметров переноса (x_0, y_0), поворота γ и подобия (K_1) путем нормализации эллипса инерции плоской дискретной картины в ее «центре тяжести» относительно «масс», представляемых точечными значениями градаций яркости изображения в его элементах. В качестве теоретических предпосылок, обосновывающих указанный процесс нормализации, использовались некоторые положения их механики [3].

После нормализации формируется окончательная ТЭД, которая подается на вход ППП КОД-1 ДОС ЕС и обрабатывается в режиме КОД с обучением. После обработки получено решающее правило идентификации в виде грамматического бинарного (рис. 2) дерева $G_R^{(2)}$, с помощью которого можно распознать 3 класса степени выживаемости после холодового воздействия клетки по ее ультраструктуре.

В вершинах дерева (кружках) стоят терминальные свойства — предикаты $(C — П) \varphi_v(u)$, найденные в процессе обучения по ТЭД, где числовое значение из $\{0, 1, 2, 3, \dots, 8\}$ — яркости элемента изображения, v — индекс, указывающий наименование оси соответствующего признака и его порядковый номер в ТЭД. Например, $\varphi_{x_{10}}(8)$ означает, что вычисляемое значение $\{0, 1\} C — П \varphi$ зависит от признака-столбца на оси OX под номером 10, имеющего значение яркости 8; аналогично $\varphi_{y_4}(4)$ — это значение $C — П \varphi$, вычисляемое по признаку-строке на оси OY под номером 4 со значением яркости 4. Листовые вершины (квадратики) грамматики образов $G_R^{(2)}$ содержат номера распознаваемых классов и всегда располагаются в конце соответствующих ветвей дерева, начинающихся с корневой вершины последнего. Каждая ветвь $V(G_R^{(2)})$ описывается конъюнкцией всех содержащихся в ней терминальных $C — П$ и представляет собой цепочку языка $L(G_R^{(2)})$, порождаемого грамматикой $G_R^{(2)}$ и применяемого для описания закономерностей в исследуемой ультраструктуре клетки. Дизъюнкция всех ветвей, оканчивающихся листьями с одним и тем же номером j ($j=1, 2, 3$), составляет полное описание образа на языке $L(G_R^{(2)})$.

Использование решающего дерева (рис. 2) происходит следующим образом. Для идентификации (классификации, прогнозирования) произвольного объекта (изображения клетки) по соответствующей цифровой матрице на корневую вершину $\varphi_{x_{10}}(8)$ дерева $G_R^{(2)}$ подается значение признака x_{10} , равное 8. В зависимости от истинности или ложности $C — П \varphi_{x_{10}}$ действия самоанализа грамматики передается следующему $C — П$, для которого вызывается соответствующий признак и его значение и так далее до появления листа (конца ветви). Номер листа указывает класс (образ), к которому и относится испытуемый объект. В этом процессе действие грамматического самоанализа может передаваться по связи «1», что означает наличие данного свойства ($C — П \varphi$) в описываемой закономерности (ветви), либо по связи «0», означающей отсутствие данного свойства в этой закономерности, и в цепочке соответствующей $C — П \varphi$ имеет обозначение $\bar{\varphi}_v(u)$, т. е. с отрицанием.

Кроме удобств реализации самой процедуры распознавания дерево $G_R^{(2)}$ несет также важную семантическую информацию об ультраструктуре объекта, если восстановить смысл каждого терминального $C — П \varphi$ в зависимости от определенного значения яркости.

Произведем, например, семантический анализ объектов 1-го класса, т. е. установим содержательный смысл цепочек решающего дерева, заканчивающихся листом с номером «1» и описывающих в языке $L(G_R^{(2)})$ логику ультраструктуры клеток со степенью выживаемости после охлаждения до -5°C . Для этого выпишем дизъюнкцию всех ветвей первого образа, пронумеровав все конъюнкции (ветви) грамматического дерева $G_R^{(2)}$ (рис. 2) (номера в квадратных скобках):

$$\begin{aligned}
 & [1] \varphi_{x_{10}}(8) \cdot \bar{\varphi}_{x_7}(4) \cdot \varphi_{y_{12}}(8) \cdot \bar{\varphi}_{x_8}(8) V [2] \varphi_{x_{10}}(8) \cdot \bar{\varphi}_{x_7}(4) \cdot \varphi_{y_{12}}(8) \cdot \varphi_{x_8}(8) \cdot \\
 & \varphi_{x_6}(6) \cdot \bar{\varphi}_{y_8}(6) \cdot \bar{\varphi}_{y_8}(0) \cdot \varphi_{y_8}(3) V [3] \varphi_{x_{10}}(8) \cdot \bar{\varphi}_{x_7}(4) \cdot \varphi_{y_{12}}(8) \cdot \varphi_{x_8}(8) \cdot \\
 & \bar{\varphi}_{x_6}(8) \cdot \varphi_{y_7}(8) \cdot \varphi_{y_8}(8) \cdot \varphi_{x_8}(8) \cdot \varphi_{y_{10}}(8) \cdot \varphi_{y_{12}}(8) V [4] \varphi_{x_{10}}(8) \cdot \bar{\varphi}_{x_7}(4) \cdot \\
 & \varphi_{y_{12}}(8) \cdot \varphi_{x_8}(8) \cdot \bar{\varphi}_{x_8}(8) \cdot \varphi_{y_7}(8) \cdot \varphi_{y_8}(8) \varphi_{x_8}(8) \cdot \bar{\varphi}_{y_{10}}(8) \cdot \varphi_{y_{12}}(1) V [5] \\
 & \varphi_{x_{10}}(8) \cdot \varphi_{x_7}(4) \cdot \bar{\varphi}_{y_{12}}(8) \cdot \bar{\varphi}_{x_{15}}(0) \cdot \varphi_{x_{15}}(3) \cdot \varphi_{x_{13}}(1) V [6] \bar{\varphi}_{x_{10}}(8) \cdot \\
 & \cdot \varphi_{y_{10}}(3) \cdot \varphi_{y_{14}}(1) \cdot \varphi_{y_{12}}(1) \cdot \varphi_{y_8}(0) V [7] \varphi_{x_{10}}(8) \cdot \varphi_{y_{10}}(3) \cdot \varphi_{y_{14}}(1) \cdot
 \end{aligned}$$

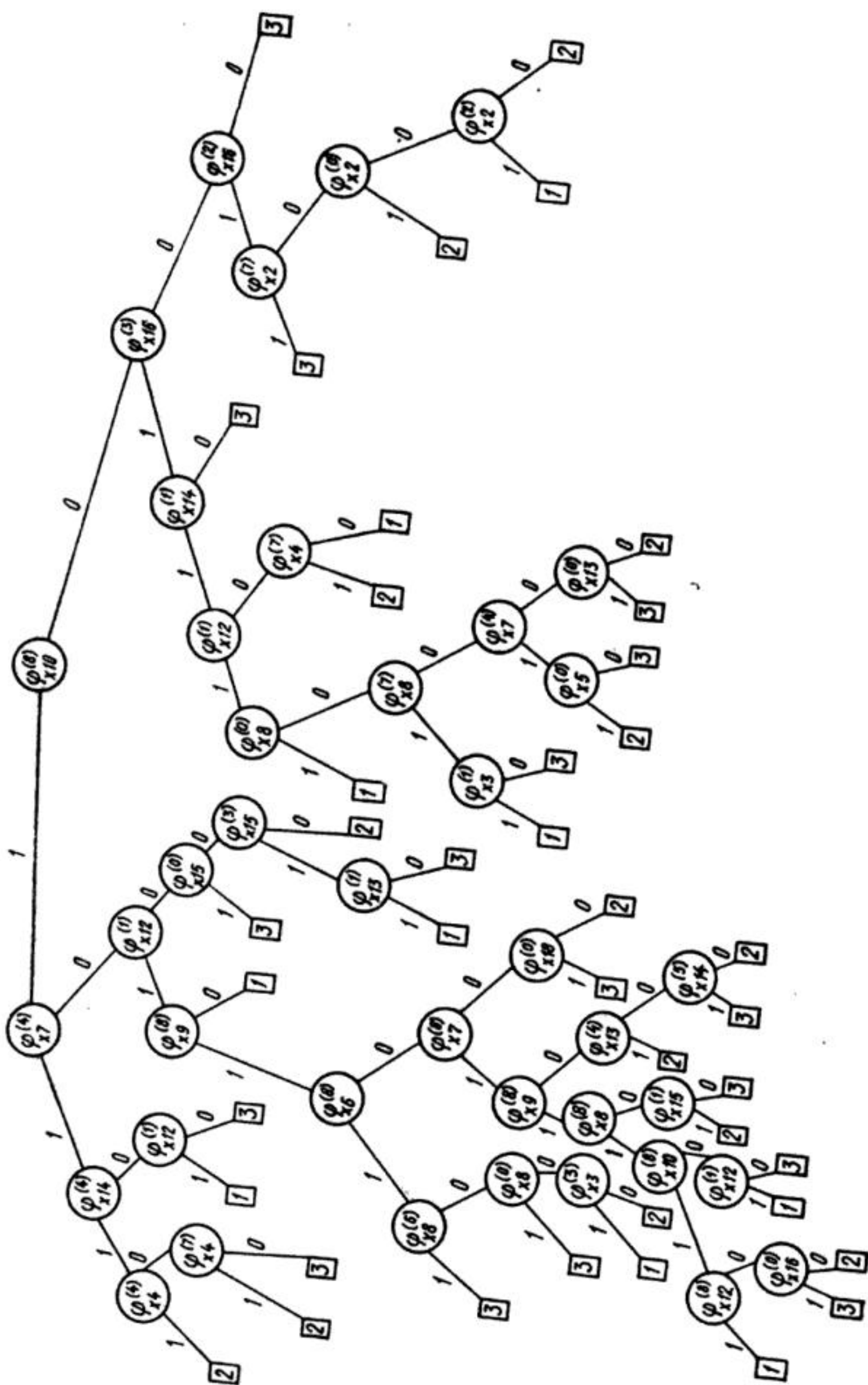


Рис. 2. Решающее правило классификации ($G_R^{(2)}$) на три класса — 1, 2 и 3.

$$\begin{aligned} & \cdot \bar{\varphi}_{y_{12}}(1) \cdot \bar{\varphi}_{x_4}(7) V8^{x_4} \cdot \bar{\varphi}_{y_{10}}(3) \cdot \varphi_{y_{10}}(2) \cdot \bar{\varphi}_{x_2}(7) \cdot \bar{\varphi}_{x_2}(0) \cdot \\ & \cdot \varphi_{x_2}(2) V[9] \bar{\varphi}_{x_{10}}(8) \cdot \varphi_{y_{10}}(3) \cdot \varphi_{y_{14}}(1) \cdot \varphi_{y_{12}}(1) \cdot \bar{\varphi}_{y_8}(0) \cdot \varphi_{y_8}(7) \cdot \varphi_{x_3}(1). \end{aligned}$$

Анализируя эти цепочки и сопоставляя с цифровой матрицей образца класса 1 (см. рис. 1, а), легко заметить, что ветви [1] — [5] в объединении полностью описывают ядро клетки, «затемненное» значениями 8 признаков-столбцов $x_6—x_{12}$ и признаков-строк $y_7—y_{12}$. Остальные ветви своеобразно доопределяют фрагменты структуры данной клетки, о содержании которых также можно судить по определенным значениям яркости их элементов.

Результаты классификации 6 новых объектов с помощью полученного в режиме обучения на 6 учебных образцах описанного решающего правила показали безошибочное распознавание всех испытуемых цифровых матриц с достаточно разумной содержательной интерпретацией правил принятия решений.

Это дает основание говорить о возможности использования метода КОД и средств его автоматизированной реализации для машинного решения классификационных задач описанного типа при электронно-микроскопических исследованиях медико-биологических объектов.

1. Сироджа И. Б. Теоретические основы синтеза структурно-аналитических моделей и алгоритмов распознавания образов для автоматизации классификационной обработки данных. — Мат. методы анализа динам. систем, 1977, вып. 1, с. 28—29.
2. Сироджа И. Б. Системный синтез структурно-аналитических алгоритмов распознавания образов для автоматизации классификационной обработки данных. — Мат. методы анализа динам. систем, 1978, вып. 2, с. 79—102.
3. Воронков А. М. Теоретическая механика. — М.: Физматгиз, 1962. — 210 с.
4. Пушкарь Н. С., Капрельянц А. С., Панков Е. Я. Ультра-структура клетки при низких температурах. — Киев: Наук. думка, 1978. — 128 с.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
11.03.80

КОНСЕРВИРОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

УДК 57.043:576.3.355

*В. С. Белокопъ, Г. Б. Герус, П. Т. Берус,
Т. А. Глушко, О. П. Маркова*

МИТОТИЧЕСКИЙ РЕЖИМ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК СПЭВ ПОСЛЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ ПРИ —196°С ПОД ЗАЩИТОЙ ДМСО

В настоящее время разработаны эффективные методы низкотемпературного консервирования для клеточных суспензий и некоторых плотных тканей. Процесс криоконсервирования биологических объектов, как известно, состоит из нескольких этапов: подготовка материала к замораживанию, замораживание, хранение в замороженном состоянии при различных низких температурах и размораживание. Для предохранения биологических объектов от повреждающего действия холода, а также получения биологически полноценного материала при консервировании используются ограждающие вещества, так называемые криопротекторы, которые являются обязательными компонентами среды замораживания.

Однако процесс замораживания и длительного хранения при особо низких температурах, по некоторым литературным данным, неблагоприятно влияет на пролиферативную способность реконсервированных клеток. Так, согласно данным [6], каждый этап процесса замораживания-размораживания вносит свой вид повреждения и тем самым инактивирует в той или иной степени пролиферативную способность размороженных клеток. При этом скорость инактивации во время хранения культур клеток Hela под защитой ДМСО приблизительно достигает 7% в год. По данным других авторов [1—5], замораживание и долгосрочное хранение различных клеточных культур не приводят к значительному снижению темпа роста реконсервированных клеток. Разноречивость приведенных данных можно отнести как за счет использования различных клеточных линий, так и за счет применения различных методов замораживания и хранения.

При анализе литературы нами не были встречены данные по влиянию долгосрочного хранения культуры клеток СПЭВ на ее митотический режим. Как известно, клетки СПЭВ весьма широко используются как в ветеринарной, так и медицинской практике при выполнении различных экспериментальных исследований, а также как клеточная биомасса для наработки диагностических и вакцинных препаратов.

Таблица 1
Жизнеспособность клеток СПЭВ после долгосрочного хранения под защитой ДМСО при —196°С

Культура клеток	Количество живых клеток, %			
	до замораживания	после хранения в замороженном состоянии		
		1 ч	6 мес	12 мес
Нативная	98±3,2	—	—	—
После добавления ДМСО (10%)	96±1,5	94±2,3	93±2,3	89±2,9

Митотический режим клеток СПЭВ после

Культура клеток	Срок хранения	Номер пас- сажа	Митотический индекс, % ($M \pm m$)		
			24 ч	48 ч	72 ч
Контроль Опыт	1 ч	1	$33,3 \pm 1,5$	$39,0 \pm 6,1$	$43,0 \pm 1,5$
			$4,7 \pm 1,0$	$34,3 \pm 4,5$	$42,6 \pm 2,5$
			$p < 0,001$	$p > 0,05$	$p > 0,05$
Опыт	6 мес	2	$24,7 \pm 6,6$	$29,0 \pm 5,5$	$38,3 \pm 8,1$
			$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$
		3	$33,0 \pm 4,5$	$32,6 \pm 3,0$	$43,7 \pm 5,5$
Опыт	12 мес	1	$p = 0$	$p > 0,05$	$p = 0,1$
			$5,3 \pm 1,4$	$39,5 \pm 2,9$	$41,3 \pm 1,5$
			$p < 0,001$	$p > 0,05$	$p > 0,05$
Опыт	12 мес	2	$40,0 \pm 2,7$	$33,3 \pm 2,3$	$44,7 \pm 1,0$
			$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$
		3	$35,3 \pm 3,5$	$37,7 \pm 4,1$	$49,6 \pm 5,1$
Опыт	12 мес	1	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$
			$4,3 \pm 2,0$	$43,0 \pm 10,1$	$50,8 \pm 2,0$
			$p < 0,001$	$p > 0,05$	$p < 0,05$
Опыт	12 мес	2	$37,7 \pm 4,5$	$41,3 \pm 2,5$	$51,3 \pm 1,5$
			$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,05$
		3	$36,7 \pm 1,5$	$38,7 \pm 3,0$	$52,3 \pm 2,3$
Опыт	12 мес		$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,05$

Примечание: p — сравнение с контролем; $n=5$.

В связи с этим цель настоящей статьи — изучение митотического режима перевиваемой культуры СПЭВ после длительного хранения при -196°C под защитой ДМСО.

Для проведения исследований использовались клетки 3-суточной культуры СПЭВ. Клетки снимали с матраса раствором версена с трипсином в соотношении 9 : 1 и помещали в питательную среду 199 с 10% сыворотки крупного рогатого скота. Концентрацию клеток в суспензии доводили до $1-1,5 \cdot 10^7$ в 1 мл. В качестве криопротектора использовали ДМСО в 10%-ной конечной концентрации, который осторожно добавляли в клеточную суспензию. Время экспозиции составляло 15 мин, после чего приготовленную таким образом клеточную суспензию разливали по 2 мл в 5-миллиметровые стеклянные ампулы, которые сразу запаивали с помощью пламени газовой горелки. Заморозку проводили по 3-этапной программе в течение 1 ч в камере лабораторного морозильного стола «НСЛ 250/70» (ЧССР):

I этап — от $+22$ до $+6^\circ\text{C}$ со скоростью $1^\circ\text{C}/\text{мин}$

II этап — от $+6$ до -40°C со скоростью $3-5^\circ\text{C}/\text{мин}$

III этап — от -40 до -196°C со скоростью $100^\circ\text{C}/\text{мин}$

После достижения в образцах температуры -40°C их быстро опускали в сосуд с жидким азотом. Образцы хранились в течение 1 ч, 6 и 12 мес. Размораживали образцы в водяной бане при $+39-40^\circ\text{C}$. После размораживания клеточную суспензию центрифугировали в течение 15 мин при 1500 об/мин, сливали надосадочную жидкость и добавляли свежую питательную среду комнатной температуры. После повторного центрифугирования осадок клеток ресуспендировали и переносили во флакон со свежей питательной средой. Количество жизнеспособных клеток подсчитывали после окрашивания 1%-ным раствором трипанового синего и выражали в процентах.

Для проведения морфологического анализа часть клеток высевали в пенициллиновые флаконы, содержащие покровные стекла, а остальную часть — в культуральные сосуды емкостью 100 мл. Выросшие клет-

длительного хранения при -196°C

Метафазный индекс, % ($M \pm m$)			Патологические митозы, % ($M \pm m$)		
24 ч	48 ч	72 ч	24 ч	48 ч	72 ч
50,6 $\pm$ 1,4	43,3 $\pm$ 6,6	43,3 $\pm$ 4,3	9,8 $\pm$ 2,8	7,9 $\pm$ 3,5	4,2 $\pm$ 2,4
44,4 $\pm$ 8,5	51,7 $\pm$ 4,8	47,0 $\pm$ 4,6	27,7 $\pm$ 0,8	28,2 $\pm$ 6,5	27,2 $\pm$ 3,1
$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,001$
45,3 $\pm$ 6,7	41,3 $\pm$ 2,1	39,8 $\pm$ 0,9	14,4 $\pm$ 2,5	14,7 $\pm$ 2,9	12,5 $\pm$ 0,9
$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,1$	$p < 0,05$
34,4 $\pm$ 1,6	47,6 $\pm$ 5,0	37,4 $\pm$ 0,4	10,8 $\pm$ 3,7	10,1 $\pm$ 3,9	11,2 $\pm$ 3,5
$p < 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,1$	$p < 0,05$
78,5 $\pm$ 11,7	76,3 $\pm$ 4,5	56,6 $\pm$ 1,9	56,2 $\pm$ 4,2	39,3 $\pm$ 13,4	22,3 $\pm$ 4,9
$p < 0,1$	$p < 0,01$	$p < 0,05$	$p < 0,01$	$p < 0,001$	$p < 0,05$
41,6 $\pm$ 3,2	53,9 $\pm$ 5,3	45,9 $\pm$ 1,8	17,4 $\pm$ 2,8	12,3 $\pm$ 5,6	11,7 $\pm$ 4,7
$p < 0,1$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,05$
44,1 $\pm$ 16,1	58,8 $\pm$ 13,4	42,3 $\pm$ 1,5	13,2 $\pm$ 1,2	12,5 $\pm$ 4,5	7,6 $\pm$ 2,6
$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,1$	$p < 0,05$	$p > 0,05$
70,8 $\pm$ 12,1	61,5 $\pm$ 3,5	59,8 $\pm$ 2,3	36,5 $\pm$ 4,9	27,9 $\pm$ 15,9	20,9 $\pm$ 4,7
$p < 0,1$	$p < 0,1$	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,1$	$p < 0,01$
40,2 $\pm$ 5,7	39,3 $\pm$ 6,0	57,8 $\pm$ 3,6	16,1 $\pm$ 3,4	15,9 $\pm$ 2,3	13,5 $\pm$ 3,5
$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,1$	$p < 0,1$	$p < 0,1$	$p < 0,05$
46,8 $\pm$ 13,7	58,6 $\pm$ 6,9	52,1 $\pm$ 3,3	11,0 $\pm$ 9,0	8,3 $\pm$ 5,8	5,7 $\pm$ 1,7
$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$

ки в матрасах снимали и высевали в той же последовательности. Всего проведено три пассажа реконсервированных клеток после каждого срока хранения в жидком азоте. Клетки, растущие в пенициллиновых флаконах, анализировали через 24, 48 и 72 ч в каждом пассаже. Для этого извлекали покровные стекла из флаконов, клетки фиксировали спиртуксусной кислотой (3 : 1), окрашивали гематоксилином Карачи. В препаратах определяли митотический индекс (МИ), который выражали в промилле, фазы митоза и количество патологических митозов в процентах к соответствующему МИ. Контролем служили клеточные культуры, не подвергавшиеся замораживанию. Полученные результаты обрабатывали статистически по методу Фишера—Стьюдента.

Как показали результаты исследований, замораживание и хранение клеток СПЭВ при -196°C незначительно отражаются на количестве живых клеток (табл. 1). В то же время темп и характер пролиферации клеток, переживших замораживание, на первых этапах роста отличаются от такового нативных. Так, независимо от срока хранения у размороженных клеток после 24 ч роста в свежей питательной среде наблюдается резкое, в шесть-семь раз, снижение митотической активности (табл. 2) по сравнению с контрольной культурой ($p < 0,001$). Через 48 и 72 ч митотический индекс размороженных клеточных культур нарастает и достигает контрольного уровня.

При анализе соотношения фаз митоза в эти сроки наблюдения нами отмечено достоверное увеличение количества метафаз в культурах, хранившихся 6 и 12 мес, тогда как после одночасового хранения соотношение фаз митоза почти не отличается от такового контрольных культур. Наряду с этими изменениями во всех опытных образцах наблюдали увеличение количества патологических митозов, которых в среднем в 4—5 раз больше, чем в контроле ($p < 0,01$).

В процессе последующих 2-го и 3-го пассажей культуры клеток митотический индекс достигал контрольного уровня. Аналогичное явление наблюдалось и с числом метафаз. Однако, несмотря на снижение количества патологических митозов во 2-м пассаже по сравнению с первым, уровень их достоверно превышал контрольный ($p < 0,05$). После 3-го пе-

ресева число патологических форм деления уменьшалось и достигало контрольных величин, особенно после 72 ч культивирования клеток СПЭВ, хранившихся 6 и 12 мес. В то же время интересен факт повышенного фона патологий деления после 1-часового хранения. Это может быть связано, скорее всего, с качеством питательных сред разных серий.

Из патологических форм деления чаще всего встречали колхицино-подобный митоз или К-митоз в виде комковатой метафазы и метафазы с разбросанными гиперспирализованными хромосомами, а также 3- и многополюсные митозы. Кроме изменения митотического режима в первом пассаже нами отмечено нарушение темпа пролиферации размороженных клеток независимо от срока хранения, что выражалось в задержке образования полного монослоя в культуральных сосудах. Так, в норме в наших исследованиях клетки СПЭВ при плотности 1×10^7 в 1 мл достигают стационарной фазы роста (сплошной монослой) на 2-е—3-и сут, тогда как опытные при той же плотности — только на 5—6-е. Эти данные согласуются с низкой митотической активностью в первые часы роста. Цитологический анализ препаратов в эти сроки наблюдения также выявил разреженность монослоя. Кроме того, были обнаружены разрушенные клетки, клетки с пикнотическими ядрами, вакуолизированной цитоплазмой.

Во втором и третьем пассажах отмечалось восстановление не только митотического режима клеток СПЭВ, но и их морфологических структур.

Таким образом, клетки СПЭВ, подвергшиеся замораживанию и хранению при -196°C в течение 1 ч, 6 и 12 мес, переносят некоторый стресс, который не зависит от срока хранения и выражается в снижении митотического индекса, торможении образования монослоя, изменении соотношения фаз митоза, увеличении количества патологических митозов и различных цитологических изменений клеток в первые часы роста после размораживания. Однако все эти изменения носят обратимый характер, и после 2—3-кратного пассирования клетки СПЭВ восстанавливают митотический режим и свои морфологические особенности.

Следовательно, полученные данные свидетельствуют, что клетки перевиваемой линии СПЭВ криолабильны и могут подвергаться замораживанию и долгосрочному хранению в условиях особо низких температур.

1. Глинских Н. П., Зусман Ф. Я. Исследование восстановления переливаемых клеток после длительного хранения при температуре жидкого азота. — Цитология, 1976, № 7, с. 886—890.
2. Гордиенко О. И. Замораживание культур тканей с ПЭО-400 в жидком азоте. — В кн.: Современные вопросы криобиологии. Киев: Наук. думка, 1976, с. 29—31.
3. Пархоменко И. И. Рост клеток первичных эмбриональных культур после хранения при низких температурах. — Цитология, 1970, № 12, с. 443—445.
4. Green A. E., Manduka M. J., Ceriell L. Viability of cell cultures stored up to 12 years in liquid nitrogen. — Cryobiology, 1975, 12, N 6, p. 583—584.
5. Hackensellner H. A., Matthes G. Some aspects for further improvement in cell cryopreservation. — Eolia haematol., 1979, 106, N 3, p. 389—393.
6. Yasukawa M., Terasima T., Yamada M., Matsamura T. Inactivation of proliferative capacity of cultured mammalian cells by liquid storage procedure. — Cryobiology, 1974, 11, N 6, p. 493—499.

Украинский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии южного отделения ВАСХНИЛ, г. Харьков, Институт проблем криобиологии и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
27.02.80

*Б. А. Скорняков, В. И. Вишневский, А. Н. Новиков,
Л. К. Стусь, Т. Ф. Гордеева*

ВЛИЯНИЕ МАГНИТНОГО ПОЛЯ НА ПРОЦЕСС ЗАМОРАЖИВАНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ

Из данных литературы известно, что процесс замораживания биологических объектов и пищевых продуктов под действием магнитного поля ускоряется [3, 5, 13]. При этом эффективная магнитная обработка может быть произведена как перед, так и во время охлаждения [4]. Эти данные представляют собой определенный интерес для выяснения механизма действия магнитного поля как фактора, стимулирующего резистентность биообъектов при низкотемпературном консервировании. К настоящему времени известны способы замораживания клеточных суспензий, обработанных магнитным полем, при повышенной сохранности количества жизнеспособных клеток [9, 18], однако теоретическое обоснование указанного явления отсутствует. Это затрудняет дальнейшее его развитие и практическое использование магнитной обработки.

В литературе накоплен обширный экспериментальный материал по изучению физико-химических изменений воды и водных растворов неорганических и органических веществ под действием магнитного поля. Установлено, что магнитное поле изменяет поверхностное натяжение воды, вязкость, плотность и электропроводность. Эти изменения тем больше, чем больше жесткость (содержание солей в воде) и чем выше напряженность поля [7, 16]. Чистая вода (трижды дистиллированная, предварительно обессоленная), по данным измерений электропроводности, оптической плотности и коэффициента преломления, не претерпевает сколько-нибудь заметных изменений под действием магнитного поля [11]. При этом отмечено, что только некоторые из технических вод и растворов солей изменяют свои физические параметры под действием магнитного поля. В эксперименте наблюдали повышение концентрации O_2 в дистиллированной омагниченной воде [8]. В противоположность отмеченным данным опубликованы результаты, отражающие индифферентную реакцию воды и водных растворов на действие магнитного поля [6].

Известно также, что процесс кристаллизации солей из водных растворов и органических веществ под действием магнитного поля изменяется [2, 14, 15, 17]. При замораживании водных растворов процесс их кристаллизации также меняется, когда магнитное поле действует как в процессе охлаждения, так и перед ним [10, 12].

Магнитное поле облегчает льдообразование в воде, при этом структура образующегося льда слоистая, а направление слоев соответствует направлению магнитных силовых линий [15]. Отмечается также изменение формы кристаллов, а введение в воду ионов солей или других примесей более наглядно проявляет действие магнитных полей на процесс кристаллизации, образование центров кристаллизации и рост кристаллов.

Представленный краткий обзор литературы отражает многообразие форм проявления действия магнитных полей на водные среды. Известные экспериментальные данные в значительной мере противоречиво характеризуют это явление и не позволяют заранее предположить возможные изменения в ходе кристаллизации биообъектов при замораживании.

В связи с этим для разностороннего изучения эффекта омагничивания суспензий клеток крови при низкотемпературном консервировании целесообразно выяснить прежде всего влияние поля на процесс кристаллизации.

В проведенных нами экспериментах исследовали эффект воздействия постоянного, квазипеременного и импульсного магнитных полей на процесс замораживания суспензий эритроцитов крови человека.

Методика экспериментов по изучению влияния постоянного магнитного поля состояла в следующем: омагничивание осуществляли в поле постоянного магнита с напряженностью порядка 2000 Э.

Суспензию эритроцитов омагничивали: а) в процессе эквilibрации с криопротектором; в качестве криопротектора использовали полиэтиле-

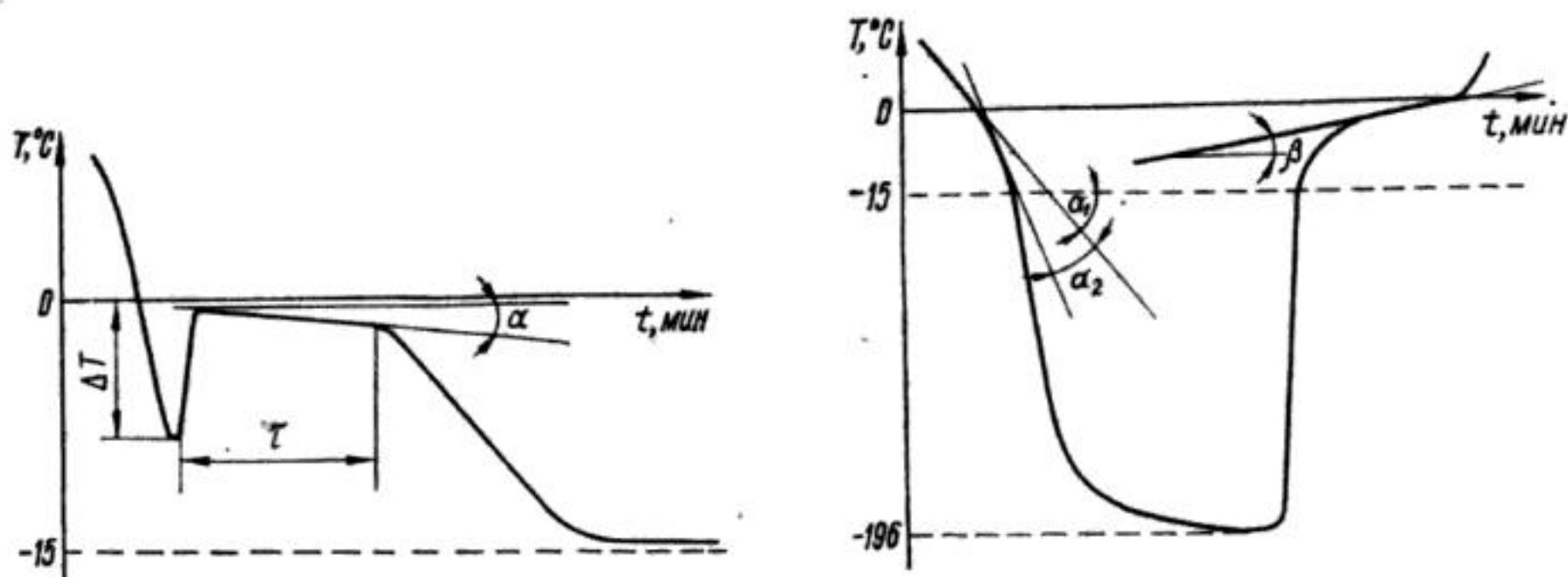


Рис. 1. Термограмма замораживания суспензий эритроцитов до -15°C : ΔT — величина переохлаждения; τ — время кристаллизации; α — угол наклона касательной в области плато кривой к горизонту.

Рис. 2. Термограмма замораживания суспензий эритроцитов до -196°C : α_1 — угол наклона касательной к кривой до фазового перехода; α_2 — угол наклона касательной к кривой в области кристаллизации; β — угол наклона касательной к кривой в области плавления.

ноксид с молекулярной массой $M_m = 1500$ (ПЭО-1500), его концентрация в суспензии 10%; б) в процессе замораживания; в) в процессе эквilibрации и замораживания.

Замораживание проводили до -15°C и до -196°C , погружая образцы в хладагент (охлажденные до -15°C спирт и жидкий азот). Процесс замораживания контролировали термографически. Из термограмм определяли: при замораживании до -15°C (рис. 1) величину переохлаждения, время кристаллообразования как протяженность во времени на термограмме плато, характеризующего выделение скрытой теплоты кристаллизации, и угол наклона касательной к плато, который характеризует динамику процесса кристаллизации; при замораживании до -196°C измеряли угол наклона касательной к кривой на участке, отражающем процесс кристаллизации (аналогично углу α_2 , рис. 2).

В результате экспериментов установлено, что при замораживании до -15°C суспензий эритроцитов, омагниченных в процессе эквilibрации, переохлаждение образцов возрастает примерно в два раза, время кристаллизации увеличивается на 8,5%, а угол наклона касательной к плато термограммы уменьшился на 23%.

Эти изменения термограммы могут отражать влияние магнитного поля на устойчивость фронта кристаллизации. Термографические измерения выполнялись с помощью термодпары, помещенной в центр объема суспензии. Поэтому полученные кривые отражают кинетические и термодинамические параметры распространения фронта кристаллизации от периферии объема к его центру. Как следует из изменений термограмм, в замораживаемом образце, вероятно, изменяется характер кристаллообразования, число и размеры кристаллов. Близкие результаты получены при исследовании кристаллизации омагниченной воды [1].

После замораживания до -196°C угол наклона касательной к кривой в области кристаллизации, т. е. практически скорость кристаллизации, для контрольных образцов составляет 25° , для суспензий, омагни-

ченных в процессе эквilibрации, $-47,75^\circ$, для суспензий, замороженных в магнитном поле, $-43,5^\circ$, и для суспензий, эквilibрированных и замороженных в магнитном поле, $-51,5^\circ$. Следовательно, постоянное магнитное поле, действующее на суспензии эритроцитов как до, так и в процессе охлаждения, увеличивает скорость замораживания. В связи с этим представляется возможным оценивать влияние магнитных полей на замораживание суспензий, выполняя омагничивание перед охлаждением.

В следующей серии экспериментов изучали влияние квазипеременного магнитного поля на процесс замораживания суспензий. Квазипеременное поле создавали путем вращения ампулы с суспензией в постоянном магнитном поле. Кроме этого с помощью ферромагнетика небольшого объема, помещаемого в различные места рабочего пространства соленоида магнита, меняли распределение силовых линий, т. е. степень неоднородности магнитного поля. Методика эксперимента состояла в том, что после эквilibрации эритроцитов с 10%-ным ПЭО-1500 суспензию помещали в магнитное поле, в котором ампула с образцом вращалась в течение нескольких секунд. Величины поля и скорости вращения в эксперименте варьировали. После омагничивания суспензию замораживали погружением в жидкий азот. Процесс замораживания фиксировали термографически.

Вначале были проведены эксперименты по выбору интервалов варьирования факторов магнитной обработки (напряженности поля, скорости вращения образцов, времени омагничивания и градиента неоднородности поля). Интервалы выбирали такими, чтобы фиксировалось изменение контролируемых параметров.

Контролируемыми параметрами были скорость замораживания и оттаивания, определяемые по углам наклона касательных к термограмме замораживания-оттаивания.

В результате выбраны следующие интервалы варьирования факторов: 1) напряженность магнитного поля $H=0-2500$ Э; 2) число оборотов ампулы с образцом $n=0-800$ об/мин; 3) экспозиция $t=4-15$ с; 4) неоднородность поля (в относительных единицах) $\Delta H=0-40$.

На основе выбранных шагов варьирования проведен четырехфакторный эксперимент, в котором приняты следующие обозначения: а) факторы: $x_1=H$; $x_2=n$; $x_3=t$; $x_4=\Delta H$; б) функции отклика: $y_1=\alpha_1$ — угол наклона касательной к термограмме замораживания в области начала кристаллизации ($t=5-10^\circ\text{C}$) (см. рис. 1); $y_2=\alpha_2$ — угол наклона касательной к термограмме в области кристаллизации (см. рис. 1); $y_3=\beta$ — угол наклона касательной к термограмме плавления на участке фазового перехода лед — вода.

После математической обработки результатов адекватным было получено только уравнение для функции $y_2=\alpha_2$ — скорости кристаллизации. В кодированных переменных уравнение имеет следующий вид:

$$y_2=57,53-1,59 x_1-1,59 x_3-2,03 x_3x_4, \quad (1)$$

где x_3x_4 — совместное действие фактора времени и градиента напряженности.

Анализ уравнения позволяет сделать вывод о том, что увеличение значений исследуемых факторов воздействия ведет к уменьшению угла наклона касательной, т. е. к уменьшению скорости кристаллизации. Следовательно, выбранные условия омагничивания суспензий эритроцитов в квазипеременном поле перед замораживанием изменяют физико-химические параметры объекта, что вызывает уменьшение скорости кристаллизации при охлаждении.

Последним этапом исследований было изучение влияния импульсного магнитного поля на процесс кристаллизации суспензий эритроцитов. Исследования проведены по схеме трехфакторного эксперимента.

Изучаемые факторы и пределы их варьирования следующие: 1) x_1 — время омагничивания 5—15 с; 2) x_2 — напряжение на соленоиде 50—220 В; 3) x_3 — частота импульсного магнитного поля 5—25 Гц.

Суспензии омагничивали после эквilibрации с 10%-ным ПЭО-1500, замораживали через 3—5 мин. Процесс замораживания фиксировали термографически.

Функциями отклика были выбраны углы наклона касательных к кривой температура — время: $y_1 = \alpha_1$ — на участке кривой до фазового перехода; $y_2 = \alpha_2$ — на участке фазового перехода при $t = 0 \div 10^\circ\text{C}$; $y_3 = \alpha_3$ — на участке завершения кристаллизации при $t = 15 \div 80^\circ\text{C}$.

Математическая обработка полученных результатов позволила получить адекватными только уравнения для α_1 и α_2 , а в уравнении для α_3 все члены, кроме свободного, оказались незначимыми:

$$y_1 = \alpha_1 = 34,37 + 0,875 x_3, \quad (2)$$

$$y_3 = \alpha_3 = 56,187 + 2,06 x_2 x_3. \quad (3)$$

Уравнение (3) отражает прямую зависимость скорости кристаллизации эвтектик от совместного действия напряженности и частоты импульсного магнитного поля. Из уравнения (2) следует, что скорость охлаждения до фазового перехода в омагниченных суспензиях при этом увеличивается.

В целом результаты проведенных исследований позволяют утверждать, что постоянные, квазиперемежные и импульсные магнитные поля изменяют физико-химические свойства суспензий эритроцитов и обуславливают изменения в кинетике процесса их кристаллизации при замораживании. Хотя отмеченные в экспериментах изменения динамики замораживания не очень велики, тем не менее они могут обуславливать отклонения в сохранности клеток при низкотемпературном консервировании.

1. Бантыш Л. А., Половский В. Г., Лазаренко Б. Р., Крепоносова А. Н. Влияние внешнего магнитного поля на скорость кристаллизации воды и структуру образующегося льда. — В кн.: Материалы III Всесоюз. совещ. по электр. обраб. материалов. М., 1973, с. 50—51.
2. Берлага Р. Я., Горский Ф. К. О линейной скорости кристаллизации в магнитном поле. — ЖЭТФ, 1934, вып. 4, № 5527, с. 5—5.
3. Бражников А. М., Малова Н. Д., Ефимов А. В. Влияние постоянного магнитного поля на процессы холодильной обработки мясopодуKтов. — Экспресс-информ. Серия Холодил. пром-сть и транспорт, 1977, вып. 5, с. 10—12.
4. А. с. 359877 (СССР). Способ охлаждения пищевых продуктов и биологических материалов / В. А. Воскобойников, Д. Н. Озирная, Э. И. Каухчешвили. — Оpubл. в. Б. И., 1974, № 10.
5. Ефимов А. В., Бражников А. М. Исследование влияния магнитного поля на ускорение процесса холодильной обработки мясopодуKтов. — В кн.: Сборник научных трудов аспирантов, соискателей и молодых ученых по итогам научно-исследовательских работ / Моск. технол. ин-т мясной и молоч. пром-сти. М., 1975, с. 50—52.
6. Киргинцев А. Н., Соколов В. М., Бурлакова Н. И. О механизме процесса магнитной обработки воды. — Изв. Сиб. отд-ния АН СССР. Сер. хим. наук, 1963, вып. 1, № 3, с. 25—25.
7. Классен В. И., Щербакова С. В. Улучшение технологических свойств воды воздействием магнитного поля. — Горн. журн., 1965, № 5, с. 58—58.
8. Классен В. И., Шафеев Р. Ш., Хажинская Г. Н. О влиянии магнитной обработки воды на концентрацию растворенного O_2 . — ДАН СССР, 1970, 190, № 6.
9. Ковальов М. Г. Дія магнітного поля. — Тваринництво України, 1969, № 7, с. 48—49.
10. Мартынова О. И., Гусев Б. Т., Леонтьев Е. А. К вопросу о механизме влияния магнитного поля на водные растворы солей. — УФН, 1969, 98, вып. 1, с. 68—72.
11. Мартынова О. И., Гусев Б. Т., Леонтьев Е. А. К вопросу о механизме влияния магнитного поля на водные растворы солей. — УФН, 1969, 98, вып. 1, с. 76—82.
12. Миненко В. И., Петров С. М., Миц М. Н. Магнитная обработка воды. — Харьков, 1962. — 82 с.

13. Озирная Д. Н. Исследование теплофизических процессов замораживания мышечной ткани : Автореф. дис. ... канд. техн. наук. — М., 1975. — 25 с.
14. Рогачева Э. Д., Дубров А. П., Булатова Н. К. Влияние магнитного поля Земли на кристаллизацию эпсомита. — В кн.: Биологическое действие естественных и слабых искусственных полей : Материалы Всесоюз. симпоз. Белгород, 1973, с. 210—215.
15. Розенталь О. М. О структурном действии магнитного поля. — В кн.: Вопросы теории и практики магнитной обработки воды и водных систем : Материалы III Всесоюз. науч. семинара. Новочеркасск : Новочеркас. политехн. ин-т, 1975, с. 110—115.
16. Улазовский В. А., Ананьина С. А. Влияние омагничивания воды затворения на процесс кристаллизационного твердения цементного камня. — Волгоград, 1970. — 115 с.
17. Шипов К. Г. О влиянии магнитного поля на кристаллизацию веществ. — Тр. Вологод. молоч. ин-та, 1948, вып. 9, с. 127—132.
18. Knaack J., Nehring H., Lorenz G., Stosser R., Preidel I. Erhöhung der Befruchtungsergebnisse durch biomagnetische Behandlung von Rindersperma. — I Mit. Tierzucht, 1973, 27, N 4, p. 153—155.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
06.03.79

П. А. Бездетко

О ВЛИЯНИИ ПЭО-3000 НА ВНУТРИГЛАЗНОЕ ДАВЛЕНИЕ И ГЕМОДИНАМИКУ ГЛАЗА У КРОЛИКОВ

Применение полиэтиленоксидов в клинической практике в качестве эффективных, низкотоксичных, не требующих предварительного удаления криопротекторов для консервирования различных органов и тканей [8—13] требует тщательного и всестороннего изучения влияния указанных полимеров на организм больного. В связи с этим заслуживают внимания сообщения о выраженном осмодиуретическом действии ПЭО-400 и ПЭО-1500 на организм человека и экспериментальных животных [2, 6, 7, 14]. Учитывая, что при переливании 500 мл эритроцитарной взвеси в организм человека попадает до 100 г чистого ПЭО [3, 8, 10], можно ожидать сдвиги в гемодинамике и гидродинамике глаза. Мы не нашли сведений об экспериментальных или клинических исследованиях влияния полиэтиленоксидов на внутриглазное давление и гемодинамику глаза. Это и послужило поводом для изучения действия полиэтиленоксидов различных молекулярных масс (400, 1500 и 3000) на указанные параметры.

В настоящей статье представлены результаты экспериментального изучения влияния ПЭО-3000 на внутриглазное давление и гемодинамику глаза.

Материалы и их обсуждение. Опыты проведены на 78 кроликах (156 глаз) породы шиншилла массой 1500—2500 г. Внутриглазное давление измерялось стандартным тонометром А. Н. Маклакова массой 10,0 г под местной капельной анестезией роговицы и конъюнктивы 0,5%-ным раствором дикаина.

Гемодинамика глаза изучалась с помощью реографического метода по Л. А. Кацнельсон [4]. Используемая аппаратура состояла из четырехканальной реографической приставки 4 РГ-1, электроэнцефалографа типа 4-ЭЭГ-1 и реографического датчика собственной конструкции. Для исключения окуло-окулярной реакции исследование правого и левого глаза проводили с 10-минутным интервалом. Так как качественная оценка реограммы в офтальмологии затруднена [4], проведена количественная оценка реоофтальмограммы. По общепринятой методике рассчитывались величина амплитуды в Омах (A_{om}), реографический коэффициент (RK), показатель отношения анакроты ко всей длине волны $\left(\frac{\alpha}{\alpha+\beta}\right)$, характеризующий сосудистый тонус, пульсовой объем [5, 6]. Экспериментальные данные статистически обработаны по Фишеру—Стьюденту.

Для внутривенного введения раствора ПЭО-3000 готовились на изотоническом растворе хлористого натрия, для перорального — на дистиллированной воде. При парентеральном введении ПЭО-3000 вводился в краевую вену уха, при пероральном — в желудок с помощью тонкого резинового зонда.

В первой части эксперимента (24 кролика, 48 глаз) изучено изменение внутриглазного давления (ВГД) после внутривенного введения в

зависимости от концентрации и дозы данного препарата. В результате исследования ряда концентраций (15; 20; 25 и 30%) и доз (0,5; 1,0; 1,5 и 2,0 г/кг массы животного) установлено, что при внутривенном введении 20%-ного и более концентрированных растворов ПЭО-3000 в дозе 1,5—2,0 г чистого вещества на 1 кг массы животного отмечается достоверное снижение внутриглазного давления на 2,3—4,1 мм рт. ст. ($p < 0,01$).

В следующей серии экспериментов (9 кроликов, 18 глаз) прослежена динамика ВГД после внутривенного введения 20%-ного раствора ПЭО-3000 в дозе 1,5 г/кг массы животного (минимально эффективная доза). Установлено, что максимальное снижение ВГД отмечено через 30 мин после введения препарата (на 4,81 мм рт. ст.), а через 6 ч внутриглазное давление недостоверно отличается от исходного (рис. 1).

Как свидетельствуют данные, представленные в табл. 1, после внутривенного введения полиэтиленоксидов в указанной дозе не отмечается достоверного изменения всех реографических показателей.

На 24 кроликах (48 глаз) исследовано изменение ВГД после перорального введения 20-, 30-, 40- и 50%-ного раствора ПЭО-3000 в дозах 0,5; 1,0; 1,5 и 2,0 г/кг массы животного. Как следует из полученных данных, при пероральном введении ПЭО-3000 наступает достоверное снижение внутриглазного давления в среднем на 5,8 мм рт. ст. ($p < 0,01$).

На рис. 2 представлены результаты изучения динамики внутриглазного давления после перорального введения полиэтиленоксида молеку-

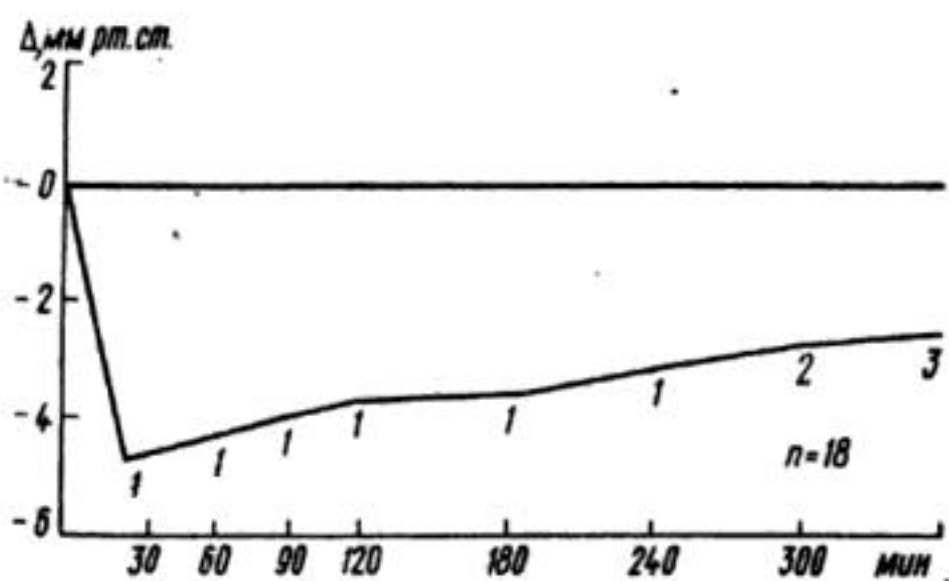


Рис. 1. Динамика внутриглазного давления после внутривенного введения 20%-ного раствора ПЭО-3000 в дозе 1,5 г/кг массы: 1 — $p < 0,01$; 2 — $p < 0,05$; 3 — $p > 0,05$.

Таблица 1

Реоофтальмографические показатели до и через 0,5 ч после внутривенного введения 20%-ного раствора ПЭО=3000 в дозе 1,5 г/кг массы животного

Статистический показатель	До введения ПЭО-3000				После введения ПЭО-3000			
	A_{Om}	$\frac{\alpha}{\alpha+\beta}$	RK	ПО	A_{Om}	$\frac{\alpha}{\alpha+\beta}$	RK	ПО
<i>n</i>	12	12	12	12	12	12	12	12
<i>M</i>	0,392	0,361	1,489	10,79	0,371	0,395	1,364	9,881
$\pm \delta$	0,084	0,086	0,22	1,59	0,099	0,1	0,33	2,355
$\pm m$	0,025	0,026	0,066	0,48	0,03	0,03	0,099	0,709
<i>t</i>	—	—	—	—	0,539	0,84	1,05	1,064
<i>p</i>	—	—	—	—	$> 0,05$	$> 0,05$	$> 0,05$	$> 0,05$

лярной массы 3000. Максимальное снижение ВГД на 4,59 мм рт. ст. наступает через 1,5 ч после введения и продолжается более 6 ч.

Пероральное введение полиэтиленоксида молекулярной массы 3000, как свидетельствуют данные, представленные в табл. 2, не вызывает нарушения гемодинамики глаза. Все реографические показатели не отличаются достоверно от контрольных.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о наличии у ПЭО-3000 гипотензивного эффекта на внутриглазное давление. При внутривенном и пероральном введении этот полимер вызывает достоверное снижение ВГД, наблюдающееся на протяжении 6 ч и более, не изменяя при этом гемодинамических показателей глаза. Так как полиэтиленок-

сиды различных молекулярных масс обладают дегидратационными и осмотическими свойствами [10], а для ПЭО-400 описан резко выраженный осмодиуретический эффект [2, 6, 7, 14], можно предположить, что гипотензивный эффект ПЭО-3000 по механизму действия такой же, как и у других гиперосмотиков (мочевина, маннитол, глицерин) [1, 15]. Однако, как известно из литературных данных [16], при пероральном введении около 2% ПЭО-4000 всасывается, а 98% выводится через кишечный тракт в неизменном виде. Исходя из этого можно предположить, что механизм действия полиэтиленоксидов после перорального введения несколько отличается от такового после внутривенного введения полимера. В этих условиях гипотензивный эффект предположительно можно объяснить активным перемещением воды в кишечник и связанной с этим дегидратацией тканей глаза.

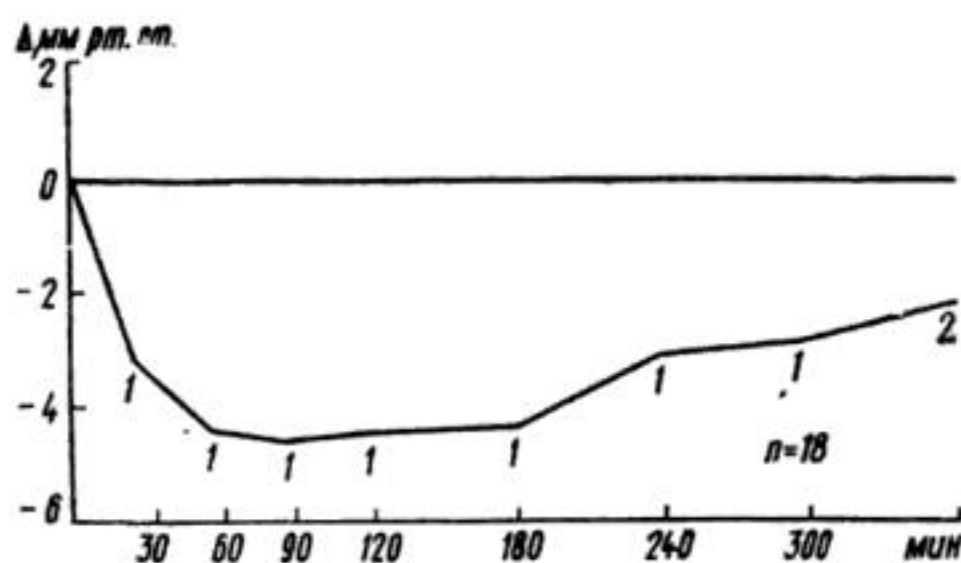


Рис. 2. Динамика внутриглазного давления после перорального введения 50%-ного раствора ПЭО-3000 в дозе 1,5 г/кг массы:
1 — $p < 0,01$; 2 — $p < 0,05$.

Все описанное выше позволяет нам рекомендовать ПЭО-3000 для дальнейшего изучения в качестве дегидратанта.

Выводы. Внутривенное введение 20%-ного раствора ПЭО-3000 в дозе 1,5 г/кг массы животного вызывает снижение внутриглазного давления на 5—6 ч с максимально выраженным эффектом через 0,5 ч после введения.

Пероральное введение 50%-ного раствора ПЭО-3000 в дозе 1,5 г/кг массы животного вызывает достоверное снижение внутриглазного давле-

Таблица 2

Реоофтальмографические показатели до и через 1,5 ч
после перорального введения 50%-ного раствора ПЭО-3000
в дозе 1,5 г/кг массы животного

Статистический показатель	До введения ПЭО-3000				После введения ПЭО-3000			
	$\Delta_{\text{Ом}}$	$\frac{\alpha}{\alpha + \beta}$	РК	ПО	$\Delta_{\text{Ом}}$	$\frac{\alpha}{\alpha + \beta}$	РК	ПО
n	12	12	12	12	12	12	12	12
M	0,371	0,366	1,119	8,079	0,337	0,379	1,127	8,163
$\pm \delta$	0,08	0,046	0,17	1,234	0,092	0,049	0,155	1,122
$\pm m$	0,024	0,013	0,05	0,372	0,028	0,015	0,047	0,338
t	—	—	—	—	0,928	0,669	0,169	0,167
p	—	—	—	—	$> 0,05$	$> 0,05$	$> 0,05$	$> 0,05$

ния более чем на 6 ч с максимально выраженным гипотензивным эффектом через 1,5 ч после введения.

Внутривенное и пероральное введение ПЭО-3000 не вызывает изменения гемодинамических показателей глаза.

1. Биетти Д., Буччи М. Гипотензивные глазные средства осмотического действия. — Офтальмол. журн., 1966, № 6, с. 443—453.
2. Винниченко Л. И., Сабинин Г. В., Наточин Ю. В., Шахматова Е. И. Ультраструктура и функция почки при интенсивном диурезе, вызванном фуросемидом и ПЭО-400. — Арх. анатомии, гистологии и эмбриологии, 1973, № 8, с. 61—68.
3. Гайсенюк Л. А. Изучение полиэтиленоксида-400 при низкотемпературном консервировании и трансплантации костного мозга в онкологической клинике: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Харьков, 1972. — 23 с.
4. Кацнельсон Л. А. Реография глаза. — М.: Медицина, 1977. — 117 с.
5. Козлов В. И. Кровообращение глаз и циркуляция водянистой влаги в норме и при глаукоме: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Запорожье, 1976. — 47 с.

6. Наточин Ю. В., Шахматова Е. И. Диуретическое действие полиэтиленоксидов. — Бюл. эксперим. биологии и медицины, 1970, № 4, с. 79—81.
7. Пинегин Л. Е., Тибеккина Л. М., Шахматова Е. И., Наточин Ю. В. Вода и электролиты мозга при изменении осмолярности и объема внеклеточной жидкости. — Физиол. журн. СССР, 1979, 65, № 1, с. 122—127.
8. Пушкарь Н. С. Консервирование глубоким охлаждением (-196°C) костного мозга и его использование в клинических целях: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Харьков, 1968. — 24 с.
9. А. с. 549123 (СССР). Способ консервирования кожи / Н. С. Пушкарь, Д. Е. Печкарский, Б. П. Сандомирский. — Оpubл. в Б. И., 1977, № 9.
10. Пушкарь Н. С., Шраго М. И., Белоус А. М., Калугин Ю. В. Криопротекторы. — Киев: Наук. думка, 1978. — 201 с.
11. Чередниченко В. М., Шарлай Т. М., Обозная Э. И. Влияние полиэтиленоксидов-400 на дыхательную функцию роговицы до и после ее глубокого охлаждения (-196°C). — Вестн. офтальмологии, 1973, № 6, с. 69—70.
12. Шарлай Т. М. Сравнительная оценка действия низкотемпературной консервации на дыхательную функцию роговой оболочки человека и некоторых животных. — Кробиология и криомедицина, 1976, вып. 2, с. 81—84.
13. Шраго М. И. О криозащитном действии полимеров окиси этилена на эритроциты человека при глубоком охлаждении: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Харьков, 1971. — 35 с.
14. Beuttner W., Steiger—Trippi K. Die Polyethylenglycole und ihre Bedeutung für die Pharmacie. — Schwein. Archpoth. ZTG, 1958, 96, N 16, S. 293—298.
15. Virno M., Pecori—Jiraldi I. Emploi des agents osmotiques et Leurs indication en ophthalmologie. — Ann. Oculist, 1977, 210, N 1, p. 63—69.
16. Shaffer C. B., Critchfield F. N. The absorption and excretion of the solid polyethylenglycols («carbowaх» compounds). — J. Amer. Pharm. Assoc. Sci. Ed., 1947, 36, N 5, p. 152—160.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
28.02.80

УДК 57.043

Ф. Бем, Р. Праус, Р. Дворжак

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВКЛЮЧЕНИЯ РАДИОАКТИВНОГО СУЛЬФАТА КАК КРИТЕРИЯ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КОЖНОГО ЛОСКУТА ПОСЛЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ ДО -196°C В ПРИСУТСТВИИ КРИОПРОТЕКТОРНЫХ ВЕЩЕСТВ

Нарастающая потребность в кожных лоскутах в качестве временно-го покрытия при лечении ожогов [1, 3] заставляет искать подходящие методы длительной консервации кожи для нужд пластической хирургии. Клинический опыт показал, что живой кожный алло- или ксенолоскут является во многих отношениях лучшим покрытием, чем лиофилизированная кожа или различные синтетические среды [16]. Применяются обычно свиная кожа и человеческие кадаверные аллолоскуты [2, 12, 22]. Кожные лоскуты можно долгое время сохранять с помощью замораживания (до -196°C) в присутствии криопротекторных веществ (главным образом глицерина и диметилсульфоксида), которые предохраняют кожный лоскут от повреждения холодом, снижая ионную силу внутриклеточной жидкости, предотвращая сокращение клеток и потерю электролитов. Свойства клеточной мембраны и дыхательная функция клеток в основном сохраняются [11, 13, 17, 18]. В связи с этим понятен интерес, проявляемый к проблеме консервации кожи методом глубокого замораживания [1, 5, 6, 8, 9].

При биохимических методах тестирования жизнеспособности кожного лоскута, консервированного холодом, используют прежде всего включение метаболитов, содержащих радиоактивные изотопы, в самые различные клеточные и тканевые компоненты [9, 10].

В настоящей статье мы использовали изотоп ^{35}S в неорганическом сульфате, который включается в сульфатные группы кислых гликозаминогликанов, содержащихся в коже. Преимуществом этого изотопа является существенно более низкая цена по сравнению с радиоактивным углеродом или тритием.

В качестве кожного лоскута мы использовали свежую свиную кожу, которая омывалась мыльным раствором, освобождалась от щетины, ополаскивалась физиологическим раствором и 1%-ным раствором йода в этаноле. Затем ее погружали в раствор антибиотиков (хлорамфеникол 0,8 мг/мл, стрептомицин 0,4 мг/мл, фурантоин 0,24 мг/мл — СПОФА, ЧССР) на несколько минут и снова омывали физиологическим раствором. Тонкий дермоэпидермальный лоскут вырезали с помощью специального ножа (НИМВУ). Из лоскута, подготовленного таким образом, трепаном (диаметр 16 мм) вырезали кружочки, которые погружали в раствор криопротектора, в качестве которого мы использовали раствор, содержащий 0,16% NaCl, 3% сорбита и 15% глицерина или ДМСО [9] ч. д. а.

Четыре образца кожи помещали в пробирки с завинчивающимися крышками и тефлоновыми прокладками (Kimax 16×75 мм), содержащими 5 мл криопротекторного раствора. Замораживание проводилось постепенно по методу Де Леккера и соавт. [9]: 30 мин при комнатной температуре, 30 мин при 4°C, 30 мин при -18°C, 30 мин в парах жидкого азота (приблизительно -150°C) и 30 мин в жидком азоте (-196°C). В некоторых опытах в процессе замораживания применялась еще температура -50°C. После двухчасовой выдержки в жидком азоте пробирки переносили в водяную ванну (40°C). После отогрева и удаления раствора криопротектора образцы трижды промывали раствором Тироде, а затем переносили в раствор Тироде (5 мл), обогащенный 10 $\mu\text{Ci/ml}$ сульфата натрия ($^{35}\text{SO}_4$) (Институт термоядерных исследований, Свиерк, Отвоцк, Польша). Контрольные и опытные образцы инкубировали 2 ч в ротационной водяной бане (37°C).

Сразу же после окончания инкубации образцы кожи вынимали, высушивали фильтровальной бумагой и, покачивая, выдерживали несколько часов в 1 мМ йодоктана натрия в 0,1 М сульфата натрия и дистиллированной воде при 4°C для удаления невключенного радиоактивного сульфата. Образцы ткани дегидратировали погружением на ночь в ацетон и высушиванием на воздухе при 105°C до постоянной массы. После высушивания образцы переносили в жидкость по методу Тернера [21] с помощью солиubilизации (Эмершем, Иллинойс, США). Радиоактивность измеряли на жидкостном сцинтилляционном счетчике NE 6500A (Наклеар Энтерпрайсис, Шотландия). Из полученных данных была впоследствии вычислена удельная радиоактивность $\mu\text{Ci/mg}$ сухого вещества.

Первая часть опытов была направлена на установление влияния поверхностной обработки свиной кожи на жизнеспособность кожного лоскута. Свиную кожу последовательно обмывали мылом, физиологическим раствором йода в этаноле, раствором антибиотиков и снова физиологическим раствором; включение радиоактивного сульфата исследовали после каждой последующей промывки. Результаты приведены на рис. 1. Оказалось, что простая промывка мылом и физиологическим раствором практически не изменяет включение сульфата, но последующие промывки уже снижают его включение в кожный лоскут: после промывки раствором йода оно понизилось примерно на 20%, после промывки раствором антибиотиков — примерно на 30% по сравнению с контролем. Комплексная обработка свиной кожи привела к общему понижению включения радиоактивного сульфата в кожный лоскут на 40%.

Во избежание тормозящего действия раствора йода и антибиотиков в последующих опытах свиная кожа обрабатывалась только раствором

мыла и физиологическим раствором. Подготовленный кожный лоскут потом в виде кружочков погружали в раствор глицерина или ДМСО и постепенно охлаждали. Результаты приведены на рис. 2. Очевидно, что постепенное охлаждение до температуры -18°C снизило включение радиоактивного сульфата в кожный лоскут только в опытах с глицерином

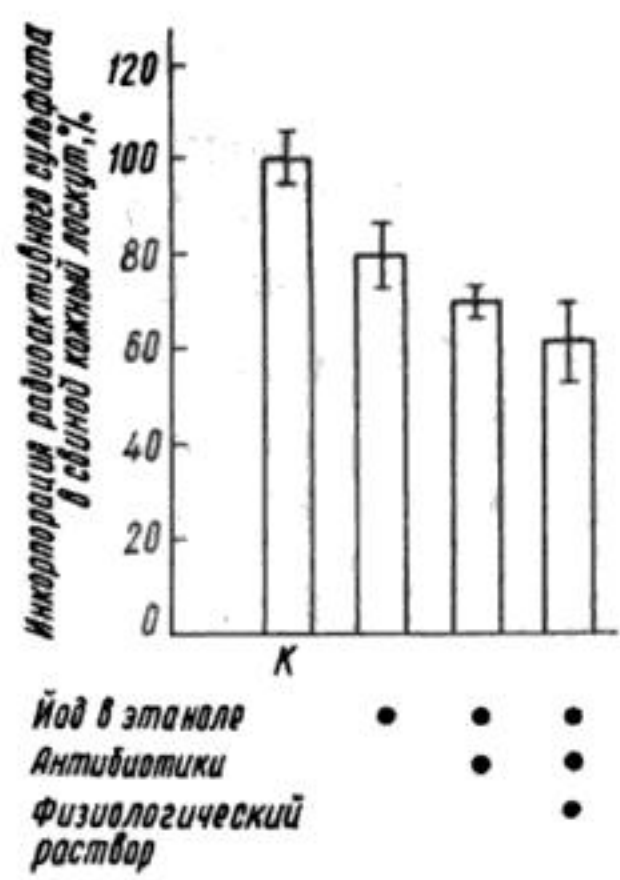


Рис. 1. Включение радиоактивного сульфата в свиной кожный лоскут.

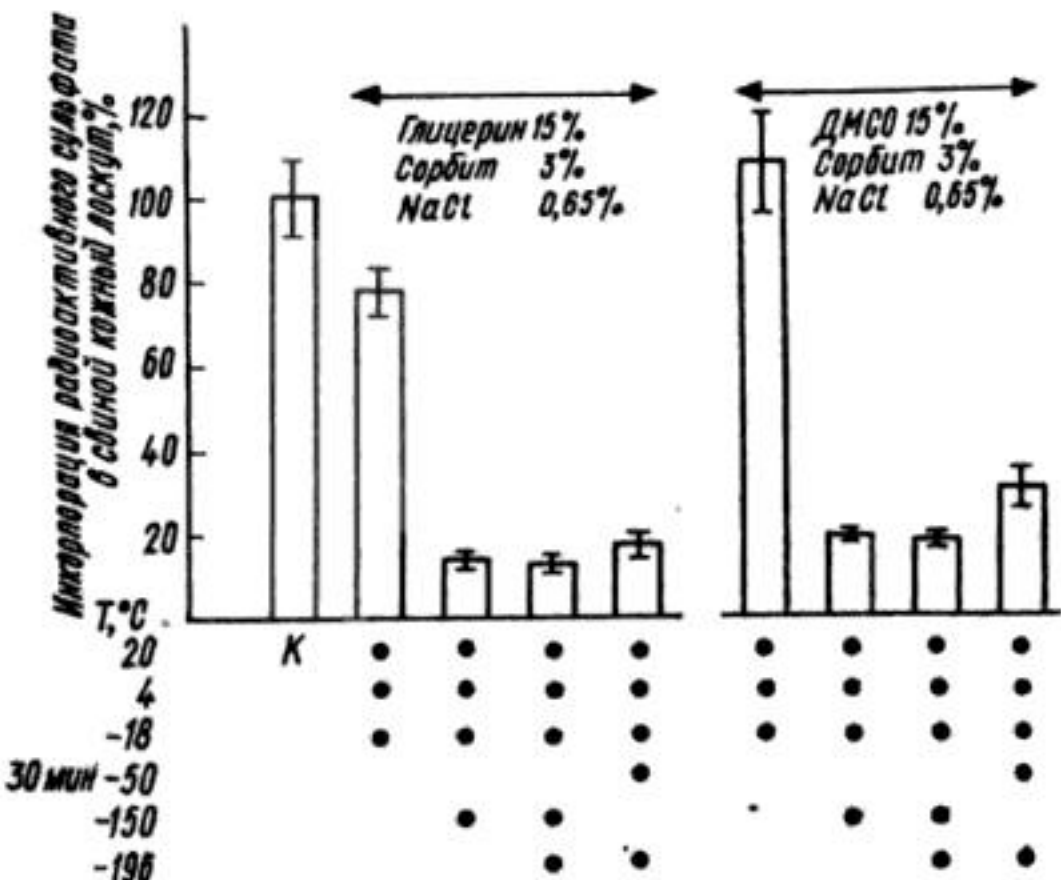


Рис. 2. Включение радиоактивного сульфата в свиной кожный лоскут, замороженный до различных температур под защитой глицерина и ДМСО.

(примерно на 20%), тогда как при применении ДМСО не наблюдалось никакого понижения активности. Дальнейшее же замораживание значительно понизило включение кожей радиоактивного сульфата в обоих растворах криопротекторов. Практически не была обнаружена разница во влиянии температуры -150°C и -50°C . В данном случае активность лоскута под защитой ДМСО составляла примерно 30% контроля. Результаты показывают, что ДМСО является более действенным криопротектором, чем глицерин.

Согласно нашим данным, включение радиоактивного сульфата в кожный лоскут может применяться как тест на жизнеспособность после замораживания материала, охлажденного до температуры жидкого азота. Мы, как и другие авторы [9, 10], наблюдали после замораживания кожного лоскута до температуры газовой и жидкой фаз азота значительное понижение жизнеспособности лоскута, выраженное в сильном снижении удельной радиоактивности ткани по сравнению с удельной радиоактивностью свежего контроля. Включение температуры -50°C в режим замораживания оказалось благоприятным, но метод охлаждения до температуры ниже -18°C следовало бы изучить более подробно.

В свином кожном лоскуте выявлено большее понижение метаболической активности при одинаковом методе замораживания, чем в коже крыс, которую в своих опытах применяли Де Леккер и др. [9, 19]. Можно предположить, что кожа молодых крыс оказывает большее сопротивление холодовому повреждению, чем кожа взрослых свиней, благодаря более интенсивному обмену веществ. Свиной кожный лоскут, бесспорно, гораздо жирнее, и остатки жира в ткани лоскута могут мешать достаточному проникновению криопротекторов.

Воздействие на поверхность кожи мыльного раствора кажется безвредным, в то время как обмывание спиртовым раствором йода и раствором антибиотиков явно понижает конечную удельную радиоактивность кожного лоскута. Возможно, что этанол в применяемой концентрации частично денатурирует некоторые протеины кожи, что проявляется в понижении энзиматической активности.

Антибиотики могут повлиять на синтез протеинов. Тем не менее оставшиеся примерно 30% активности кожного лоскута после замораживания до температуры жидкого азота и размораживания свидетельствуют об устойчивости кожной ткани при криоконсервировании, что является важным для применения ее в клинике в качестве временного естественного покрытия при лечении ожогов.

1. Artz C. P., Bittenbury M. S., Yarbrough D. R. An appraisal of allografts and xenografts as biological dressing for wounds and burns. — *Ann. Surg.*, 1972, 175, p. 934—938.
2. Baksa J., Simon J., Demececky M. et al. The use of pig's skin (xenograft) for the treatment of burns. — *Magyar Traumatol.*, 1976, 19, p. 138—145.
3. Bartholdson L. Antibacterial effect of biological dressings in the treatment of infected wounds. — *Scand. J. Plast. Surg.*, 1977, 11, p. 33—37.
4. Baxter H., Entin M. A. Experimental and clinical studies of reduced temperatures in injury and repair in man. III. Direct effect of cooling and various elements of human skin. — *Plast. Reconstr. Surg.*, 1948, 3, p. 303—334.
5. Berggren R. B., Lehr H. B. Clinical use of viable frozen human skin. — *J. Amer. Med. Assoc.*, 1965, N 194, p. 149—151.
6. Billingham R. E., Medawar P. B. The freezing, drying and storage of mammalian skin. — *J. Exp. Biol.*, 1952, 29, p. 454—468.
7. Bondoc C. C., Burke J. F. Clinical experiences with viable frozen human skin and a frozen skin bank. — *Ann. Surg.*, 1971, 174, p. 371—382.
8. De Loecker W., Doms D., Stas M. L., Verstreken J. Metabolic changes in rat skin stored in buffer medium at -3°C . — *Cryobiology*, 1974, 11, p. 358—365.
9. De Loecker W., De Wever F., Jullet R., Stas M. L. Metabolic changes in rat skin during preservation and storage in glycerol buffer at -196°C . — *Cryobiology*, 1976, 13, p. 24—30.
10. De Loecker W., Stas M. L., De Wever F., Jullet R. The effects of cortisol and amino acids on the metabolic activity of rat skin stored in dimethyl sulfoxide buffer at -196°C . — *Cryobiology*, 1978, 15, p. 59—66.
11. Dickinson D. B., Misch M. J., Drury R. E. Dimethylsulfoxide protects tightly coupled mitochondria from freezing damage. — *Science*, 1967, 156, p. 1738—1739.
12. Hiramato M. Use of porcine skin in the treatment of burns of hand. — *Acta dermatol. (Kyto)*, 1975, 70, p. 123—124.
13. Kollarits C. R., Lessler M. A., Berggren R. B., Kollarits F. J. Oxygen utilization by rat skin exposed to several cryoprotective solutions during liquid nitrogen storage. — *Cryobiology*, 1970, 7, p. 94—99.
14. Lehr H. B., Berggren R. B., Lotke P. A., Corriell L. L. Permanent survival of preserved skin autografts. — *Surgery*, 1964, 56, p. 742—746.
15. Lessler M. A., Jensen J. H., Berggren R. B. Effect of cryostorage on oxygen uptake and autograft viability of rat skin. — *Cryobiology*, 1973, 10, p. 185—189.
16. Moserova J., Behounkova E. Dočasné kryty v dehydrotaci dermis. — *Rozhledy v chirurgii*, 1978, 57, p. 149—153.
17. Offerijns F. G. J., Ter Welle H. F. The effects of freezing, of supercooling and of DMSO on the function of mitochondria and on the contractibility of the rat heart. — *Cryobiology*, 1974, 11, p. 152—159.
18. Pribor D. B. Biological interactions between cell membranes and glycerol or DMSO. — *Cryobiology*, 1975, 12, p. 309—320.
19. Reuveny Z., Fillner P. A new assay for ATP sulfurylase based on differential solubility of the sodium salts of adenosin 5-phosphosulfate and sulfate. — *Ann. Biochem.*, 1976, 75, p. 410—428.
20. Roth C. A., Berggren R. B., Lessler M. A. The effect of dimethylsulfoxide on rat skin oxygen utilization. — *J. Invest. Dermatol.*, 1969, 52, p. 514—516.
21. Turner J. C. Sample preparation for liquid scintillation counting. — Amersham, Bucks, England: Centre Ltd., 1971.
22. Zellner P. R. Konservierte Leichenhaut zur Deckung grossflächigen drittgradiger Verbrennungswunden. — *Zbl. Chir.*, 1974, 99, S. 1105—1107.

Институт экспериментальной
медицины ЧАВ, Прага

Поступила в редколлегию
07.02.80

Н. А. Волкова

ОРГАННОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КОЖИ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ В ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ

Широко используемый метод научного исследования — органотипическое, или органное, культивирование клеток, тканей и органов — можно определить, как «такое содержание или рост тканей, зачатков органов или целых органов, или их частей *in vitro*, при котором может происходить дифференцировка и сохраняться архитектура и (или) функция» [14]. Это возможно при наличии условий для клеточных взаимодействий, которые обеспечиваются высокой клеточной плотностью, присутствием в эксплантируемом материале различных клеточных элементов, необходимых для организации структур, и высокой степенью аэрации, что достигается помещением эксплантата на границу газовой фазы и питательной среды. При этом должен поддерживаться уровень пролиферации, свойственный для обновляющихся тканей, и образовываться стабильные клеточные контакты, ответственные за форму структуры [2]. В результате вне организма воссоздаются более или менее сложно организованные структуры, частично отражающие элементарные функциональные единицы органа; эксплантат оказывается способным осуществлять специализированные метаболические процессы и проявлять клеточную активность.

Установлено, что в условиях органной культуры можно содержать многие эмбриональные и постнатальные ткани человека и животных [3, 15, 27]. Каждый конкретный объект для оптимального развития требует учета таких факторов, как источник, способ получения и возраст исследуемого материала, размеры эксплантата, состав газовой и питательной среды, ее осмолярность и pH, температуру культивирования [8, 27, 33, 36]. Не исключение в этом смысле и кожа человека и животных. Как объект культивирования она является сложной системой, состоящей из популяции клеток различного происхождения и межклеточного вещества. Эти составляющие обладают разными потенциями и при развитии вне организма. Полагают [44], что их можно представить таким образом:

- 1) клетки эктодермального происхождения, кератиноциты, находятся в эпидермисе и дермальных придатках, синтезируют кератин;
- 2) клетки нейроэктодермального происхождения, меланоциты, обнаруживаются в базальном слое эпидермиса и дерме;
- 3) мезенхимальный класс клеток, включающий все клетки, ответственные за синтез макромолекул межклеточного вещества — коллагена, эластина, гликозаминогликанов и структурных гликопротеинов, — фибробласты;
- 4) малочисленные нервные клетки и клетки крови, живущие несколько дней.

Минимальное травмирование ткани при иссечении, достаточное питание и снабжение кислородом, маленькие размеры образца (1—4 мм²), позволяющие газам и жидкостям легко проникать в центральную часть эксплантата, обеспечивают активность и рост клеток на периферии и в глубине образца, помещенного в условия органной культуры. В подобной системе возможно формирование рогового слоя и гранул кератогиалина, при этом ростковый слой эпидермиса находится в частично репрессированном состоянии, количественно рост приблизительно такой же, как в целом организме, но иначе ориентирован в пространстве: эпителиальные клетки инкапсулируют дерму. Изучение эпидермально-мезенхимального взаимодействия показывает, что соединительная ткань направленно влияет на рост и организацию эпидермиса, но эта способ-

ность дермы пропадает при ее нагревании при 56°C в течение 4 ч. В таком случае, а также если эпидермис отделяют от дермы перед помещением в культуру, все эпидермальные клетки вырождаются и рост прекращается [19, 33].

Варианты техники органного культивирования кожи в основном определяются различиями в составе питательных сред и способами поддержания фрагментов ткани на их поверхности. При постановке органотипических культур кожи используют приемы, являющиеся целесообразными и традиционными для других тканей, органов и клеток [15, 27]: применяют плотные среды — плазменный сгусток [8, 37], агар [31, 52], жидкие среды, на поверхности которых эксплантат держится благодаря поверхностному натяжению («плавающие» эксплантаты) [20, 39], посредством сетки из нержавеющей стали [6, 8], целлюлозной губки [46], бумажного «плотика» [50], трехмерной матрицы из фибрина [32], миллипорового фильтра [4, 10], на поверхности алло- или ксеногенной дермы, которую может поддерживать сетка из нержавеющей стали [9, 18, 19, 29, 41]. При любой из указанных методик кожа взрослого человека живет в культуре 3—6 недель [48, 52]. При этом наблюдается реализация гистобластических возможностей базальных клеток. Имеют место, как правило, два типа роста эпителиальных клеток: вертикальная миграция, при которой формирование рогового слоя и гранул кератогиалина сходно с соответствующими процессами в организме, и эпиболия — миграция эпителиальных клеток из края ткани и образование клеточной капсулы вокруг дермы. Клетки дермы при содержании кожи в органной культуре признаков активного роста могут не проявлять [33].

В первые 48 ч пребывания в условиях культивирования на поверхности жидкой питательной среды структура эпидермиса и дермы на уровне световой микроскопии представляется нормальной, хотя ультраструктурное изучение обнаруживает появление в верхнем слое эпидермиса нового гранулярного материала, изменения в зернистом слое и мембранной оболочке. Позднее эти изменения отмечаются во всех клетках эпидермиса [50]. После 3 сут культивирования в эпидермисе трансформируется единственный слой клеток, прикрепленный утолщенной базальной мембраной к дерме и сохраняющий все потенциальные свойства после пересадки донору [33, 53]. Сравнительная гистологическая характеристика эксплантатов во времени при развитии на жидких и плотных средах, как видно из таблицы, обнаруживает очень близкие результаты [52].

Изменения в развитии эксплантатов в органной культуре доступны для изучения на уровне световой, фазово-контрастной [37] и электронной микроскопии с помощью гистологических, автордиографических [7, 20], иммуноцитохимических, флуоресцентных [48] методов. Необходимо отметить, что наиболее широко применим морфологический контроль состояния культивируемой ткани, при котором характеризуются сохранность архитектоники эпидермиса, тинкториальные свойства, признаки миграции эпителиальных клеток [46], а также включение меченых предшественников в эпидермальные и дермальные ядра клеток [10]. Значительная часть исследований посвящена ультраструктурным изменениям в эксплантированной таким образом коже [4, 5, 28, 48].

В современных исследованиях органные культуры широко используют для изучения процессов пролиферации, дифференцировки, морфогенеза и специфической функции тканей [3]. Установлено, что формирование зерен кератогиалина, как показатель дифференцировки кожи, зависит от двух основных факторов: содержания глюкозамина в культуральной среде [24] и наличия концентрации водородных ионов 7, 6 [47], что приводит к увеличению синтеза в зернистом слое. В эпиболийном слое клеток истинная кератинизация не наблюдается, хотя трансмиссионный электронный микроскоп позволяет обнаружить под мигрирующи-

ми клетками эпителия новую базальную мембрану [36], причем компонентом питательной среды, обеспечивающим эпиболию, является сы-воротка.

Однако главная точка приложения органных культур кожи — в изучении их реакций на повреждения, наносимые до культивирования,

Гистология человеческой кожи в органной культуре [52]

Гистологические изменения	Культуральная среда	
	жидкая	плотная
Пролиферация эпителиальных кле-ток	24—48 ч	24—48 ч
Максимум пролиферации	5—6 сут	4—5 сут
Появление эпиболии	4—6 сут	4—5 сут
Полная эпиболия	3—5 нед	2—3 нед
Митотическая активность	3-и сут	2-е сут
Максимум митотической актив-ности	4—5 сут	3—4 сут
Вакуолизация цитоплазмы	4 сут	4 сут
Паракератоз	4—5 сут	2—3 сут
Полный паракератоз	24—28 сут	19—21 сут
Некролиз к концу 2-й недели	Почти во всех эксплан-татах	В малом числе эксплан-татов
Основные явления в дерме через неделю	Встречается спорадический пикноз ядер и начи-нается дезинтеграция дермы	
Строение кожи через 5 недель	Появляется размягчение	Остается нормальной

или на изменения условий содержания. Подобная ситуация понятна еще и потому, что многие реакции эксплантата в значительной мере сходны с теми, которые наблюдаются в сходных обстоятельствах в организме [7, 47]. Например, если роговой слой взрослой человеческой кожи удалить, сняв его липкой лентой, приблизительно к 48-му ч после этого число митотических фигур в базальном слое возрастает. Подобно этому срезы человеческой кожи, снятые липкой лентой и помещенные в органную культуру, увеличивают в этот срок свою митотическую активность и включение радиоактивного тимидина [7, 47].

Значительное место в современных исследованиях занимают работы, посвященные определению влияния отдельных биологических, химических и физических факторов на состояние и развитие кожи в органной культуре. Применяя названный метод, успешно изучали действие на эту ткань вирусов герпеса и осповакцины [30, 35]. Показано, что инокуляция эксплантатов вирусом герпеса приводит к развитию типичной (как *in vivo*) картины заболевания: некроз, изменения ядер, появление гигантских ядер, вакуолизация эпидермиса и другое, т. е. явления, свойственные истинному заболеванию кожи.

Среди веществ биогенного происхождения, влияние избытка или дефицита которых изучалось на органных культурах кожи, ведущее место принадлежит гормонам и витаминам. При исследовании эффекта стероидных гормонов, в том числе гидрокортизона [11, 20], прогестерона, тестостерона, эстрадиола [22], установлено, что кортизон и прогестерон, подавляя дезорганизацию и дегенерацию соединительной ткани, способствуют сохранению кожного эксплантата, а это благоприятно сказывается на его приживлении при аутотрансплантациях, в то время как эстрадиол нарушает целостность кожи в культуре. Эти эксперименты показали, что добавка гормонов к питательной среде позволяет изучать взаимоотношения гормона и ткани, установить реакцию отдельных компонентов кожи на действие указанных веществ. В органной культуре кожи детально изучали эпителиальный морфогенез под влиянием вита-

минов [4, 13, 25]. Выяснили, что избыток витамина А, например, вызывает заметные изменения в культуре, заключающиеся в угнетении кератинизации, образовании микроворсинок, уменьшении числа и размеров пучков тонофиламентов и десмосом, расширении межклеточных промежутков.

В число исследовавшихся с помощью органных культур кожи биологически активных веществ входят также стафилококковый токсин [38, 51], фитогемагглютинин [20, 49], гистамин и катехоламины [17], лейкоцитарный интерферон [34], ингибиторы белкового синтеза [21] и другие [8, 44].

На модели органной культуры кожи возможно также изучение этиологии некоторых дерматологических заболеваний человека, включая дефектный рост и созревание, позволяющее определить биологическую суть этих процессов. Достигнуты определенные успехи при исследовании таких распространенных патологий, как псориаз [10, 16, 34] и пузырчатка [5, 40].

Особенно перспективными органные культуры кожи оказались для экспериментально-онкологических исследований. Именно на таком надклеточном уровне удобно изучать канцерогенез вне организма, видеть предрак, причем достоверность наблюдений, как указывает ряд авторов [3, 26, 43], не меньше, а экономичность и скорость получения результата выше, чем при работе с подопытными животными.

Изучение эффекта разных ситуаций *in vitro* на выживание постэмбриональной кожи представляет значительный интерес для хирургов, нуждающихся в биологически полноценном пластическом материале, так как позволяет исследовать его реактивность, показания к применению, а также трансплантировать на раневую поверхность [18, 41]. Подобные манипуляции возможны, когда ткань находится в условиях, совместимых с клеточной активностью, т. е. при температуре культивирования, близкой к температуре тела. Охлаждение или замораживание и хранение больших образцов кожи позволяют сохранять жизнеспособность клеток, биологическая полноценность деконсервированного материала может быть успешно оценена с помощью органной культуры [1].

Необходимо отметить, что органное культивирование кожи для целей трансплантации пользуется значительным вниманием исследователей [18, 29, 41]. В 1974 г. группа авторов во главе с Эглом и Фрименом разработала и опробовала в эксперименте способ закрытия больших раневых поверхностей аутокожей, выращенной по правилам органного культивирования: маленькие кусочки кожи кролика помещали в центр поддерживающей поверхности (питание поступало снизу), содержали в таком положении до трех недель и успешно ретрансплантировали донору. При этом эксплантаты на подложках увеличивали свою эпителиальную поверхность в 50 раз по сравнению с исходной. Для наглядности интересно указать, что высший коэффициент закрытия раневой поверхности расщепленным кожным лоскутом при использовании современных перфорирующих устройств составляет 1 : 10. При этом установлено, что аутоотрансплантат, выращенный на аллогенной дерме, вызывает у донора при ретрансплантации меньшую воспалительную реакцию, чем росший на ксеногенной дерме или пластике. Исследования в этом направлении были продолжены другими и был получен органотипический рост донорской и трупной кожи человека, помещенной на трупную дерму [9]. Более того, опубликованы экспериментальные данные о возможности объединения культивирования и замораживания с целью хранения кожи до момента пересадки [41]. Они свидетельствуют об успешных трансплантациях аутокожи, культивированной на нежизнеспособной свиной дерме, затем замороженной до азотных температур в присутствии ДМСО и хранившейся от 1 до 20 сут в низкотемпературном банке до момента пересадки.

Обсуждая результаты приведенных выше работ, следует отметить их своеобразие: эксплантаты, безусловно, находились в условиях органной культуры, однако получен чрезвычайно активный эпителиальный рост на поддерживающую дерму, распространяющийся на периферию от образца, хотя для органных культур кожи более типичен замкнутый характер роста [44]. Описанный «гистиопатический» характер роста можно, видимо, объяснить как особенностями эксплантируемой ткани, так и влиянием поддерживающей поверхности.

Одновременно с названными опубликованы работы, авторы которых успешно выращивали кусочки кожи человека и мыши в органной культуре на плотной среде (5%-ный агар) до 5 недель. Отмечено, что гистологическая структура кожи в эти сроки меняется мало при выращивании таким способом, тогда как при культивировании на жидких средах она существенно деградирует к этому сроку [52]. Использование кожи, росшей на плотной среде, для аллогенных трансплантаций приводит, как указывается [31], к успешному закрытию раневой поверхности у реципиента, однако характер приживания такого трансплантированного материала еще изучается.

Несколько в стороне от традиционных приемов органного культивирования находится метод так называемой органной культуры больших фрагментов [48, 53]. Суть его заключается в том, что фрагменты кожи площадью 4—6 см² погружают под слой питательной среды, где и происходит их развитие. Превращения в подобной культуре происходят в две фазы: первые две недели эпидермис отделяется от дермы, а затем немногие оставшиеся базальные клетки формируют новый эпидермис, причем кожа человека может содержаться в живом состоянии до 4 мес. Более того, полагают [54], что такая длительно культивированная кожа представляет интерес для аллогенных трансплантаций, так как не обнаруживает феномена нормального отторжения. Однако в научной литературе последующих лет отсутствуют работы, подтверждающие факт истинного приживания аллогенной кожи, культивированной методом «органной культуры больших фрагментов». Напротив, в опытах на линейных мышах установлено, что таким образом культивированная кожа не всегда приживляется даже на сингенном реципиенте в силу ее «истощения» после пребывания в культуре, а в случае аллогенных пересадок она отторгается, как истинный чужеродный трансплантат [42].

Описанный способ культивирования кожи взрослого человека, хотя и является органным в общепринятом понимании, представляет интерес, поскольку позволяет наблюдать процесс регенерации вне организма, причем благодаря сравнительно большой массе эксплантата допускает биохимические исследования.

Приведенные данные литературы позволяют определить сущность органных культур кожи как тканевую систему данного органа, что дает возможность исследовать взаимоотношения отдельных компонентов этого органа, закономерности их морфогенеза и патоморфоза, изменений под влиянием внешних факторов. Очевидно, что наблюдения, полученные на органных культурах, стоят ближе к организму, чем при использовании других видов культур [3]. Следует, однако, отметить, что стандартная органная культура имеет ряд недостатков: клетки трудно наблюдать в живом виде, четкая эпиболия на дерме и вокруг нее не видна непосредственно и практически все морфологические изменения можно увидеть только после гистологической обработки [39]; эксплантат должен быть маленьким, чтобы быстро происходили питание и снабжение кислородом [46, 49]; система органной культуры гетерогенна, находящиеся вместе с эпидермальными элементами дермальные клетки и матрикс могут сильно влиять на метаболизм культивируемого эпидермиса.

Тем не менее очевидны значительные возможности методов органного культивирования кожи для целей трансплантологии. Органное

культивирование может предоставлять жизнеспособный материал для закрытия раневых дефектов, а также быть убедительным способом доказательства биологической полноценности трансплантационного материала.

1. Волкова Н. А., Сандомирский Б. П., Бронштейн В. Л., Панков Е. Я. Оценка криоконсервированной кожи методом органной культуры. — Ортопедия и травматология, 1978, № 1, с. 58—60.
2. Лурия Е. А. Методические принципы органного культивирования. — В кн.: Орган-ные культуры как метод лабораторного исследования. Тбилиси, 1976, с. 7—22.
3. Шабад Л. М., Колесниченко Т. С., Сорокина Ю. Д. Трансплацентарный бласто-могенез и органные культуры. — М.: Медицина, 1975. — 129 с.
4. Barnett M. L., Szabo G. Effect of vitamin A on epithelial morphogenesis in vitro. — Exp. Cell Res., 1973, 76, N 1, p. 118—126.
5. Barnett M. L., Beutner E. H., Chorzelski T. P. Organ culture studies of pemphigus antibodies. II. Ultrastructural comparison between acantholytic changes in vitro and human pemphigus lesions. — J. Invest. Dermatol., 1977, 68, N 5, p. 265—271.
6. Bietry A. Cultures organotypiques de pene humaine, e'tude ultrastructurale. — Ann. Sci. Univ. Besangon. Zool., physiol. et biol. anim., 1974, N 11, p. 139—177.
7. Bishop S. C., Cox A. J. Autoradiographic study of the DNA synthetic activity in human skin cultured in vitro: effects of stripping and the inhibition by glucosamine. — J. Invest. Dermatol., 1974, 62, N 2, p. 74—79.
8. Brotherton J. Effects of steroid hormones and inhibitors of protein biosynthesis of thymidine and arginine incorporation by pig skin in organ culture. — Cytobios, 1969, 1, N 2, p. 209—220.
9. Carles D., Bodkier M., Verdier M. M., Neretti J., Richir C. Culture organotypique de peau humaine sur dermo de caadvre. — C. r. Soc. biol., 1978, 172, N 5, p. 891—893.
10. Caron G. A. Organ culture of normal and psoriatic skin. — Arch. Dermatol., 1968, 97, N 5, p. 575—586.
11. Caron G. A. The effect of hydrocortisone on skin in organ cultures. — Acta dermato-venerol., 1969, 49, N 1, p. 59—69.
12. Chopra D. P., Flaxman B. A. Mitotic inhibition of epidermal cells from psorias lesions in vitro by extracts from normal human skin. — J. Nat. Cancer. Inst., 1972, 50, p. 281—283.
13. Chopra D. P., Flaxman B. A. The effect of vitamin A on growth and differentiation of human keratinocytes in in vitro. — J. Invest. Dermatol., 1975, 64, N 1, p. 19—22.
14. Federoff S. Proposen usage of animal tissue culture terms. — J. Nat. Cancer Inst., 1963, 38, p. 607—611.
15. Fell H. B. The development of organ culture. — In: Organ culture in biomedical research. Cambridge e. a., 1976, p. 1—13.
16. Flaxman B. A. Replication and differentiation in vitro of epidermal cells from normal human skin and from benign (psorias) and malignant (basal cell cancer) hyperplasia. — In Vitro, 1972, 8, N 3, p. 237—255.
17. Flaxman B. A., Harper R. A. In vitro analysis of the control of keratinocyte in human epidermis by physiologic and pharmacologic agents. — J. Invest. Dermatol., 1975, 65, N 1, p. 52—59.
18. Freeman A. E., Igel H. J., Waldman N. L., Lisicoff A. M. A new method for covering large area wounds with autografts. I. In vitro multiplication of rabbit-skin epithelial cells. — Arch. Surg., 1974, 108, N 5, p. 721—723.
19. Fukui J. Dermal control of epidermal different-ation in vitro. — J. Sci. Univ. Tokyo, 1976, Sec. 4, 13, N 4, p. 353—361.
20. Gaylarde P. M., Sarkany J. Cell migration and DNA synthesis in organ culture of human skin. — Brit. J. Dermatol., 1975, 92, N 4, p. 375—380.
21. Gibbins J. R. Epithelial migration in organ culture. Role of protein synthesis as determined by metabolic inhibitors. — Exp. Cell Res., 1973, 80, N 2, p. 281—290.
22. Gillette D., Goulian J., Conway H. Comparative effects of steroids of skin maintained in organ culture. II. Estradiol, progesterone and testosterone. — J. Nat. Cancer. Inst., 1967, 39, p. 947—964.
23. Gradwohl P. R. The proliferation of epidermal cells in mouse ear organ culture. — Arch. Dermatol. Res., 1978, 263, N 3, p. 273—281.
24. Hambrick G. S., Zamberg S. J., Bloomberg R. Observation on keratinization of human skin in vitro. — J. Invest. Dermatol., 1966, 47, N 6, p. 541—550.
25. Hardy M. H., Sweeny P. R., Bellows C. G. The effects of vitamin A on the epidermis of the fetal mouse in organ culture — an ultrastructural study. — Ultrastruct. Res., 1978, 64, N 3, p. 246—260.
26. Heibert C. The carcinogenic action of methylcholanthrene on mouse skin in organ culture. — Cancer, 1959, 12, p. 663—672.
27. Hodges G. M. A review of methodology in organ culture. — In: Organ Culture in biomedical research. Cambridge etc., 1976, p. 15—59.

28. *Hu F. N., Holmes S. G., Pomerat C. M., Livingood C. S., McConnell K. P.* Tissue culture studies on human skin. — *Tex. Rep. Biol. Med.*, 1951, **9**, p. 739—748.
29. *Igel H. J., Freeman A. E., Boeckman C. K., Kleinfeld K. L.* A new method for covering large surface area wounds with autografts. II Surgical application of tissue culture extended rabbit-skin autografts. — *Arch. Surg.*, 1974, **108**, N 5, p. 724—729.
30. *James Z. H., Povey R. C.* Organ culture of bovine teat skin and its application to the study of herpes mammillitis and pseudocowpox infections. — *Res. Vet. Sci.*, 1973, **15**, N 1, p. 40—49.
31. *Janssen de Limpens A. M. P., Cormane R. H., Siddique A. H.* Allotransplantation of cultured human skin. — *Arch. Dermatol. Res.*, 1978, **262**, N 3, p. 323—328.
32. *Kalus M., O'Neal R. M.* Organ tissue culture on a three-dimensional matrix of human fibrin foam. — *Arch. Pathol.*, 1968, **86**, N 1, p. 52—59.
33. *Karasek M. A.* In vitro growth and maturation of epithelial cells from postembryonic skin. — *J. Invest. Dermatol.*, 1975, **65**, N 1, p. 60—66.
34. *Kariniemi A. L.* Effect of human leukocyte interferon on DNA synthesis in human psoriatic skin cultured in diffusion chambers. — *Acta pathol. microbiol. Scand. (A)*, 1977, **85**, N 2, p. 270—272.
35. *Kitano J., Hata S.* The human epidermal cells infected with herpes simplex virus in vitro. — *Arch. Dermatol. Forsch.*, 1972, **245**, N 3, p. 203—210.
36. *Levine M.* The growth of adult human skin. — *Brit. J. Dermatol.*, 1972, **86**, N 5, p. 481—490.
37. *Lewis S. R., Pomerat C. M., Ezell D.* Human epidermal cells observed in tissue culture with phase contrast microscopy. — *Anat. Rec.*, 1949, **104**, p. 487—504.
38. *McCallum H. M., Arbuthnott J. P.* Action of staphylococcal epidermolytic toxin on mouse skin in organ culture. — *J. Med. Microbiol.*, 1973, **6**, N 1, p. 13—18.
39. *Medawar P. B.* The cultivation of adult mammalian skin epithelium in vitro. — *Quart. J. Microsc. Sci.*, 1948, **89**, p. 187—196.
40. *Michel B., Ko C. S.* An organ culture model for the study of pemphigus acantholysis. — *Br. J. Dermatol.*, 1977, **96**, N 3, p. 295—302.
41. *Nathan P., Robb E. C., Harper A. D., Ballantyne D. L.* Long-term skin preservation by combined use of tissue culture and freezing techniques. — *Cryobiology*, 1978, **15**, N 2, p. 133—141.
42. *Ninnemann J. L., Good R. A.* Allogenic transplantation of organ cultures without immunosuppression. An evaluation using adult mouse skin. — *Transplantation*, 1974, **18**, N 1, p. 1—5.
43. *Noguchi P. D., Johnson J. B., O'Donnell R., Petricciani J. C.* Chick embryonic skin as a rapid organ culture assay for cellular neoplasia. — *Science*, 1978, **199**, N 4332, p. 980—983.
44. *Prunieras M.* Culture of skin: how and why. — *Int. J. Dermatol.*, 1975, **14**, N 1, p. 12—22.
45. *Prunieras M., Delescluse C., Regnier M.* The culture of skin a review of theories and experimental methods. — *J. Invest. Dermatol.*, 1976, **67**, N 1, p. 58—65.
46. *Reaven E. P., Cox A. J.* Organ culture of human skin. — *J. Invest. Dermatol.*, 1965, **44**, N 2, p. 151—156.
47. *Reaven E. P., Cox A. J.* Behavior of adult human skin in organ culture. II. Effects of cellophane tape stripping, temperature, oxygen tension, pH and serum. — *J. Invest. Dermatol.*, 1968, **50**, N 2, p. 118—128.
48. *Rowden G., Lewis M. G., Sheikh K. M., Summerlin W. T.* Long-term organ culture of human skin: an ultrastructural and immunochemical study. — *J. Pathol.*, 1975, **117**, N 3, p. 139—149.
49. *Sarkany J., Caron G. A.* Phytohaemagglutinin induced mitotic stimulation of epithelial cells in organ culture of adult human skin. — *Brit. J. Dermatol.*, 1965, **77**, N 5, p. 439—443.
50. *Sarkany J., Grice K., Caron G. A.* Organ culture of adult human skin. — *Br. J. Dermatol.*, 1965, **77**, N 1, p. 65—76.
51. *Sarkany J., Gaylarde P. M.* Action of staphylococcal epidermolytic toxin on mouse skin in organ culture. — *Br. J. Dermatol.*, 1972, **87**, N 6, p. 516—517.
52. *Siddiqui A. H., Janssen de Limpens A. M. H., Cormane R. H.* In vitro organ culture of adult human and mouse skin. — *Acta dermatol. venerol.*, 1974, **54**, p. 255—258.
53. *Summerlin W. T., Charlton E., Karasek M. A.* Transplantation of organ cultures of adult human skin. — *J. Invest. Dermatol.*, 1970, **55**, N 4, p. 310—316.
54. *Summerlin W. T.* Allogenic transplantation of organ cultures of adult skin. — *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1973, **1**, N 3, p. 372—384.

Институт проблем криобиологии и
криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
28.02.80

Н. А. Кодола, С. А. Павлик, Т. Д. Центило

РЕАБИЛИТАЦИЯ БОЛЬНЫХ ПОСЛЕ КРИОДЕСТРУКЦИИ ПАТОЛОГИЧЕСКИ ИЗМЕНЕННЫХ ТКАНЕЙ ПАРОДОНТА И СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА

Криодеструкция широко применяется в терапии пародонтоза, пульпитов, предраковых и других заболеваний слизистой оболочки полости рта, губ и т. д. [3, 6, 9, 11—15]. Для этой цели создан криохирургический инструмент стоматологического назначения (КАС-01-У4-2). Работает он по принципу действия открытой парожидкостной струи. Клиническая апробация показала его высокую эффективность. Дальнейшая разработка проблем криомедицины позволяет создавать новые конструкции криоаппаратуры, обладающие определенными техническими и медицинскими свойствами.

В проведенном клинико-лабораторном исследовании использован экспериментальный образец криохирургического автономного аппарата «Иней», который работает по принципу криогенной тепловой трубы, что обеспечивает его высокую надежность и простоту эксплуатации. Охлаждающим агентом является жидкий азот. Аппарат имеет набор сменных аппликаторов различной формы и размеров. Холодопроизводительность 8 Вт, температурный уровень на поверхности криоаппликатора 160—180°C. Время выхода на режим 1 мин. Время непрерывной работы при одной заливке жидким азотом 20 мин. Вес аппарата 400 г. Экспозиция криодеструкции 40—50 с. Ввиду того что при работе «Иней-3» используется предельно низкая температура (от —160 до —180°C), отторжение аппликатора от слизистой не требует системы оттаивания, что упрощает его конструкцию и сокращает время, затрачиваемое на манипуляции. Высокие теплофизические свойства аппарата позволяют использовать его в стоматологической практике для лечения различных заболеваний слизистой оболочки полости рта и пародонта: гипертрофического гингивита, эпюлида, папиллитов, лейкоплакии, а также для криокюретажа патологических зубо-десневых карманов.

Цель нашей работы — изучить возможность ускорения процессов заживления тканей после криодеструкции, воздействуя на рану некоторыми растительными средствами, стимулирующими регенерацию.

Под нашим наблюдением находилось 93 больных в возрасте от 15 до 60 лет, из них 40 мужчин и 53 женщины. Криодеструкция проведена у 39 больных пародонтозом (у 26 — криокюретаж патологических зубо-десневых карманов, у 13 — деструкция гипертрофированного десневого края). В остальных 57 случаях криодеструкция была проведена по поводу гипертрофического гингивита (12), лейкоплакии (4), эпюлида (7), папиллита (20), папилломатоза нижней губы (1), папилломы языка (3), грануломатозного хронического периодонтита (деструкция грануляций свищевого хода) (5), красного плоского лишая (2).

Время полной эпителизации после криодеструкции без стимулирования регенерации, по нашим наблюдениям и литературным данным, равно 18—20 сут. В развитии очага деструкции, возникшего под воздействием низкой температуры, отмечается определенная последовательность изменений. Аналогично данным литературы [5, 8, 11, 13] нами отмечены четыре фазы течения криодеструктивного процесса. Каждая фаза имеет свои характерные клинические признаки, а именно: первая характеризуется появлением замороженного участка слизистой с четкими границами; после удаления аппликатора это состояние слизистой длится 2—3 с; вторая характеризуется появлением резкой гипере-

мии подвергнутого замораживанию ограниченного участка слизистой и нарастанием ее отека в первые сутки; третья наступает на вторые сутки, длится 2—4 сут и характеризуется незначительным уменьшением отека с появлением на месте воздействия низкой температуры фибринозной некротической пленки серого цвета; четвертая — дальнейшее уменьшение отека; участок измененной слизистой постепенно нормализуется, некротическая пленка отторгается, наступает эпителизация слизистой.

С целью стимулирования регенерации слизистой полости рта нами использовались масляные эмульсии 20%-ных спиртовых настоек календулы, зверобоя или лапчатки прямостоячей (табл. 1). Календула, зве-

Т а б л и ц а 1

Распределение больных на группы в зависимости от средств стимуляции регенерации

Группа больных	Количество больных в группе	Растительная лекарственная форма	Соотношение ингредиентов (настойка масла)
1	24	Календула на кукурузном масле	1:5
2	8	Зверобой на кукурузном масле	1:2
3	7	Лапчатка на кукурузном масле	1:40
4	7	Календула на вазелиновом масле	1:5
5	7	Зверобой на вазелиновом масле	1:2
6	6	Лапчатка на вазелиновом масле	1:40
7 (контроль)	25	Кукурузное и вазелиновое масла	

робой и лапчатка прямостоячая, по сведениям литературы, применяются для лечения ран, отеков, вызванных отморожением; они обладают вяжущим, противовоспалительным, бактерицидным действием, усиливают регенерацию, способствуют восстановлению тканей [2, 9, 17, 18]. Указанные лечебные свойства послужили основанием для применения названных выше препаратов в виде аппликаций после криодеструкции с целью усиления процессов регенерации.

Криодеструкцию патологического очага проводили после предварительного туалета полости рта (удаления зубных отложений, ирригации или полоскания антисептическими средствами растительного происхождения — настой зверобоя, ромашки, эвкалипта) без обезболивания. На участок ткани, подвергнутой замораживанию, и смежные с ним больным 1—6-й групп накладывали на 15 мин марлевую салфетку, обильно увлажненную одним из избранных для изучения средств. Лечение проводили в течение всего периода заживления. Эпителизация полностью наступает к 10-му дню в отличие от контрольной (7) группы, где она продолжается до 18—20 дней. Все больные без осложнений переносили манипуляцию криодеструкции. После криокюретажа патологических зубо-десневых карманов на второй день возникала чувствительность зубов к термическим раздражителям в месте приложения криоаппликатора, которая через 3—4 дня полностью исчезала. Возникающая чувствительность при криотерапии может быть объяснена обратимыми функционально-морфологическими сдвигами в пульпе [1].

Клиническая оценка эффективности лекарственных аппликаций сочеталась с анализом лабораторных тестов (энерговыделение, исследование микрофлоры в очаге поражения, цитологическое исследование), полученных до, непосредственно после криодеструкции и спустя 10 дней.

Одним из диагностических тестов и методов контроля, позволяющих судить о степени активности патологического процесса, являются энергообразование воспаленных тканей и энерговыделения с их поверхности. Воспалительные процессы в тканях сопровождаются гиперемией в очаге воспаления, резким повышением обмена, увеличенным энерговыделением. В современной экспериментальной физиологии разработан

метод, позволяющий с высокой точностью определять количественно степень энергосыделения с поверхности тканей [4, 10]. Условия полости рта позволяют применять микрокалориметрию в диагностических целях и в качестве контроля эффективности лечения различных патологических процессов [16]. Энергосыделение с патологических участков после крио-

Таблица 2

Длительность фаз регенерации в зависимости от примененных средств стимуляции

Фазы	Лекарственное средство			Масла
	Лапчатка	Зверобой	Календула	Контроль
I	1—2 с	1—2 с	1—2 с	1—2 с
II	18—24 ч	18—24 сут	18—24 ч	18—24 ч
III	2—4 сут	2—4 сут	2—4 сут	3—5 сут
IV	7—10 сут	7—10 сут	5—7 сут	18—20 сут

деструкции значительно повышалось по сравнению с энергосыделением этих же участков до манипуляций, что связано с интенсивными гиперемией и обменом веществ, способствующими регенерации. Динамика энергосыделения в период регенерации позволяет отметить быструю и равномерную его нормализацию под влиянием растительных средств, особенно календулы. В контрольной группе процесс нормализации энергосыделения происходил скачкообразно и в более длительные сроки. Исследования раневой микрофлоры не позволили обнаружить избирательного действия стимулирующих средств на микрофлору: в равной степени во всех случаях происходило значительное уменьшение количества грибков, кокков, простейших. Действие избранных средств стимуляции регенерации не зависит от растворителя (вазелиновое или кукурузное масла).

Обобщенные клинические и лабораторные данные показали, что избранные нами растительные лекарственные средства обладают стимулирующим регенерацию действием после криодеструкции, однако наиболее сильное действие оказывает календула. Сроки эпителизации под ее действием на 1—2 дня короче, чем при использовании зверобоя и лапчатки прямостоячей (табл. 2). Клиническая апробация масляной эмульсии спиртовой настойки календулы, зверобоя и лапчатки прямостоячей как стимуляторов регенерации после криодеструкции позволяет рекомендовать их в широкую стоматологическую практику. Из апробированных нами средств календула обладает наибольшей степенью стимуляции регенерации.

1. Беляева Н. Г. Экспериментальное обоснование и применение в стоматологической практике метода криообезболивания зуба: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Куйбышев, 1972. — 20 с.
2. Богданова Н. С. Изучение противовоспалительных свойств календулы лекарственной. — Фармакология и токсикология, 1970, № 3, с. 349—354.
3. Веркин Б. И., Никитин В. А., Носов М. Е., Григорьева К. В. Применение низких температур при лечении заболеваний полости рта. — В кн.: Механизмы криоповреждений и криопротекции биологических структур. Киев: Наук. думка, 1976, с. 109—110.
4. Геращенко О. А., Кодола Н. А., Тарсис Э. Е., Кондратьев Л. А. — В кн.: Рациональные авторские предложения и изобретения в медицине. Киев: Здоров'я, 1974, с. 111—112.
5. Григорьева К. В. Определение скорости и степени охлаждения слизистой оболочки полости рта при криовоздействии. — Стоматология, 1975, № 5, с. 18—20.
6. Григорьева К. В. Отдаленные результаты криотерапии лейкоплакии. — В кн.: Механизмы криоповреждения и криозащиты биологических структур. Киев: Наук. думка, 1977, с. 65—66.
7. Григорьева К. В. Криотерапия лейкоплакии слизистой оболочки полости рта и губ: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Киев, 1978. — 25 с.

8. Дробязко А. В., Моргулян В. Б. Применение криотерапии для лечения эрозий шейки матки. — *Акушерство и гинекология*, 1974, № 10, с. 35—36.
9. Иорданов Д., Николов П., Бойченов А. Фитотерапия. — *София: Медицина и физкультура*, 1968. — 342 с.
10. Кодола Н. А., Геращенко О. А., Тарсис Э. Г., Центило Т. Д. В кн.: Хирургия и ортопед. стоматология. Киев: Здоров'я, 1978, № 8, с. 40—43.
11. Никитин В. А. Изменения в мукополисахаридном комплексе при различных формах воспаления пульпы зуба. — В кн.: Актуальные вопросы гастроэнтерологии. Харьков, 1971, с. 102—105.
12. Никитин В. А., Григорьева К. В., Реусова Е. П., Воронина Л. И. Экспериментально-клиническое обоснование криотерапии лейкоплакии. — *Стоматология*, 1974, № 5, с. 25—27.
13. Никитин В. А., Григорьева К. В., Реусова Е. П., Воронина Л. И. Криотерапия лейкоплакии. — В кн.: Терапевтическая стоматология. Киев: Здоров'я, 1975, № 10, с. 83—86.
14. Никитин В. А., Медведев Е. М., Мурунец-Маркович Б. Н. и др. Стоматологический криозонд. — *Криобиология и криомедицина*, 1975, вып. 1, с. 141—143.
15. Никитин В. А., Воронина Л. И., Катурова Г. Ф., Точилловская Р. В. Криотерапия хейлитов. — В кн.: Механизмы криоповреждения и криозащиты биологических структур. Киев: Наук. думка, 1977, с. 74—75.
16. Путилин Н. И., Геращенко О. А., Карпенко В. Г., Чимисов Ю. М., Горбань Е. Н., Хрипко П. Л. А. с. 298841 (СССР). Дифференциальный калориметр для медико-биологических исследований. — Оpubл. в Б. И., 1971, № 11.
17. Сало В. С. Зверобой. — *Наука и жизнь*, 1971, № 11, с. 95—96.
18. Старостенко Н. Т. Применение лапчатки прямостоячей при выраженном асците у больных с атрофическим циррозом печени. — *Здравоохранение*, 1968, № 2, с. 20—22.
19. Точилловская Р. В. Криотерапия хронических эрозивных поражений слизистой оболочки полости рта. — В кн.: Механизмы криоповреждения и криозащиты биологических структур. Киев: Наук. думка, 1977, с. 83—84.

Украинский
институт усовершенствования
врачей МЗ СССР

Поступила в редколлегию
10.07.79

УДК 57.043:616.36—089.85.832.9

Н. И. Коцько, М. Г. Шенберг

ОБОСНОВАНИЕ КРИОРЕЗЕКЦИИ ПЕЧЕНИ

Современный уровень развития анестезиологии и хирургической техники позволяет шире применять оперативное лечение при различных заболеваниях и повреждениях печени, необходимость которых связана с ростом заболеваний этого органа неопластического и травматического генеза [2—4]. Атипические резекции печени по сравнению с анатомическими имеют свои преимущества, так как являются более экономными и показания для них шире, чем для анатомических резекций. Однако проблема остановки гемо- и холестаза при этом виде резекции окончательно не решена.

Эффективность лечебного применения низких температур при оперативном вмешательстве доказана в нейрохирургии, онкологии, дерматологии работами ряда авторов [1,5—7]. Отмечено, что при проведении криохирургических операций наблюдается гемостатический эффект, а образование крионекроза не оказывает ощутимого отрицательного воздействия на организм в целом [8].

Цель настоящей работы — совершенствование методов борьбы с кровотечением и холеррагией на основе использования низких температур в сочетании с другими физическими факторами. В данной статье приводятся результаты экспериментальных исследований, выполненных на кроликах, которым под наркозом производилась лапаротомия, левая доля печени выводилась в рану и подвергалась атипической резекции с использованием разных вариантов гемо- и холестаза (табл. 1).

В 1-й серии опытов предполагаемая линия резекции прошивалась П-образными кетгутовыми швами, дистальнее которых печеночная ткань

отсекалась. В 6-й серии опытов производилась резекция печени без наложения швов и криовоздействия, что служило контролем переносимости животными операции без проведения гемостаза. Во 2, 3, 4 и 5-й сериях опытов по предполагаемой линии резекции производились последовательные криоаппликации, для чего использовался аппликатор диаметром 12 мм с температурой на воздухе около -190°C при экспозиции в

Т а б л и ц а 1
Характеристика экспериментального материала

Воздействие на раневую поверхность печени при ее резекции	Номер серии	Количество экспериментов
П-образные швы	1	28
Криорезекция печени без наложения швов	2	29
Криорезекция печени с наложением единичных лигатур	3	30
Криоультразвуковая резекция печени с наложением единичных лигатур	4	25
Криорезекция печени с последующей электрокоагуляцией сосудов	5	25
Резекция печени без наложения швов	6	25

каждой точке 2 мин. Количество аппликаций — две-три в зависимости от ширины доли печени. Ширина замороженной зоны печени после криовоздействия составляла 20—22 мм, в дальнейшем через середину замороженной зоны дистальная часть печени отсекалась, объем резекции при этом составлял 6—8% массы печени. Во 2-й серии опытов производилась криорезекция печени без наложения швов; в 3-й серии на кровоточащие сосуды накладывались единичные капроновые лигатуры; в 4-й — после криовоздействия дистальная часть печени отсекалась с помощью ультразвукового скальпеля, а на крупные кровеносные сосуды накладывались единичные капроновые лигатуры; в 5-й серии после отсечения дистальной части печени выполнялась электрокоагуляция сосудов крупного и среднего диаметра.

При проведении оперативных вмешательств изучались следующие показатели: масса животного, ректальная температура до и после операции, величина кровопотери, особенности раны печени. На 1, 7, 14, 28 и 60-е сут после операции исследовались динамика массы животных, состояние органов брюшной полости, прилежающих к зоне резекции, ширина зоны некроза при различных видах воздействий на ткань печени, ее общая масса, состояние органного сосудистого и желчевыводящего русла. В эти же сроки изучались морфологические изменения в ткани печени методом световой микроскопии и биохимически определялись некоторые ферменты — аланиновая и аспарагиновая трансаминазы, щелочная и кислая фосфатазы, лактатдегидрогеназа и рибонуклеаза в сыворотке крови и гомогенате ткани печени.

При проведении операции с криовоздействием и без него во всех сериях опытов отмечено достоверное снижение ректальной температуры примерно на $0,5^{\circ}$, что связано с адинамией фиксированных животных.

Динамика массы животных (рис. 1) достоверно указывает на ее уменьшение в 1-е сут и нормализацию к 28-му дню во всех сериях опытов, однако в 4-й и 5-й сериях животные лучше переносили операцию и уже к 7-м сут их масса возвращалась к исходному уровню.

Величина кровопотери (рис. 2) была максимальной при выполнении атипической резекции печени по линии криовоздействия без использова-

ния дополнительных средств гемостаза, что связано с возобновлением кровотока из сосудов среднего и крупного диаметра по линии резекции. Уменьшение операционной кровопотери достигалось применением совместно с низкими температурами единичных лигатур, ультразвукового скальпеля и электрокоагуляции.

Локальная реакция тканей печени на различные методы обработки раны, выражавшаяся в вариациях ширины зоны некроза, представлена

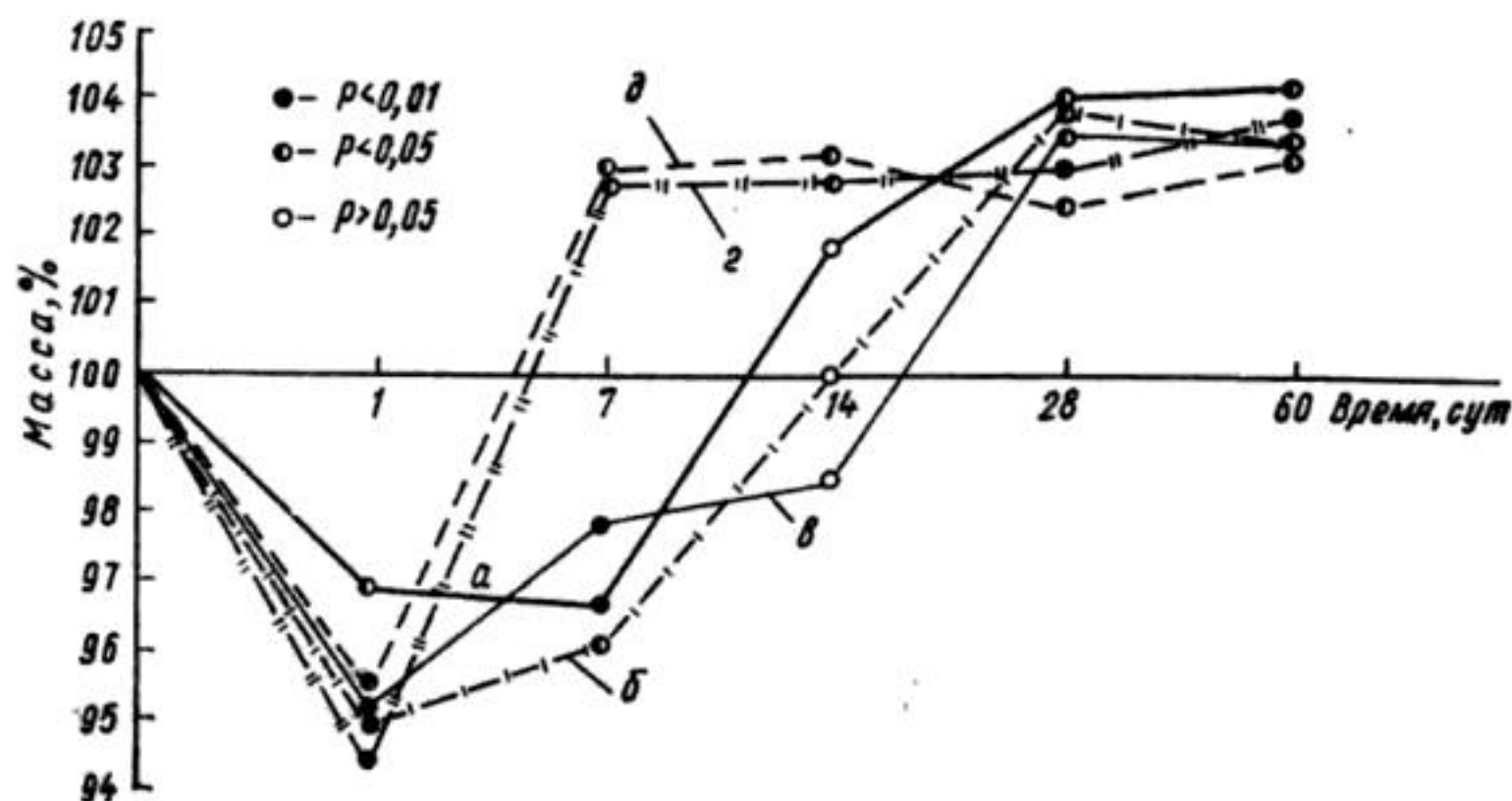


Рис. 1. Динамика массы животных после операции.
Серия опытов: а — 1-я, б — 2-я, в — 3-я, г — 4-я, д — 5-я. Масса животных до операции принята за 100%; $n=162$.

на графике (рис. 3). Исходная величина зоны крионекроза уже с 1-х сут имела тенденцию к уменьшению (местная реакция вокруг очага поражения была минимальной), к 14-м сут уменьшалась практически в два раза, а на 60-е сут имела вид тонкого послеоперационного рубца. В экспериментах, где накладывались традиционные кетгутовые швы, за счет конусовидного пережатия сосудов, расположенных проксимальнее линии швов, на 1-е сут зона некроза увеличивалась более чем в 2 раза и удерживалась в пределах 9—10 мм до 28-х сут и только к 60-м сут приближалась к исходному уровню.

При гистологическом исследовании ткани печени во всех сериях опытов на 1-е сут четко различимы три зоны: 1-я зона — участок некротизированной ткани, 2-я — граничащая с ней и содержащая инфильтрат, представленный полиморфноядерными лейкоцитами, 3-я — без видимых изменений тканей печени.

В дальнейшие сроки наблюдения 1-я зона характеризуется рубцовой соединительной тканью, однако и через 60 сут этот процесс полностью еще не закончен. Наличие очаговой воспалительной инфильтрации в ряде серий опытов отмечается и на 28-е сут. В рубцовой соединительной ткани, а также и в паренхиме печени встречаются кровоизлияния различной степени давности. Очень резко выражены кровоизлияния в течение всех сроков наблюдений в 1-й и особенно в 6-й сериях опытов. В 5-й и особенно в 4-й сериях опытов следует отметить на 7-е сут отсутствие или слабое проявление лейкоцитарной инфильтрации, расположен-

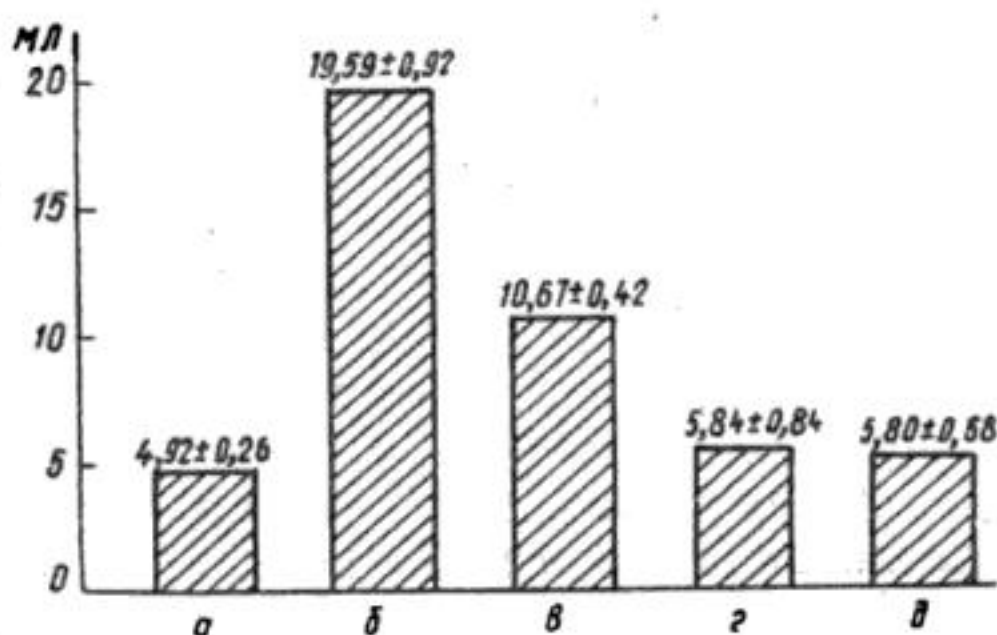


Рис. 2. Величина кровопотери во время операции. Условные обозначения те же, что на рис. 1.

ной обычно по демаркационной линии. В этих сериях редко встречаются кровоизлияния в 3-й зоне, однако сидерофаги, одиночные или группами, располагаются в рубцовой ткани на границе со 2-й зоной и через 28—60 сут.

Летальные осложнения (табл. 2) в результате выполняемых манипуляций имели место в 1-й серии опытов, где одно животное пало на

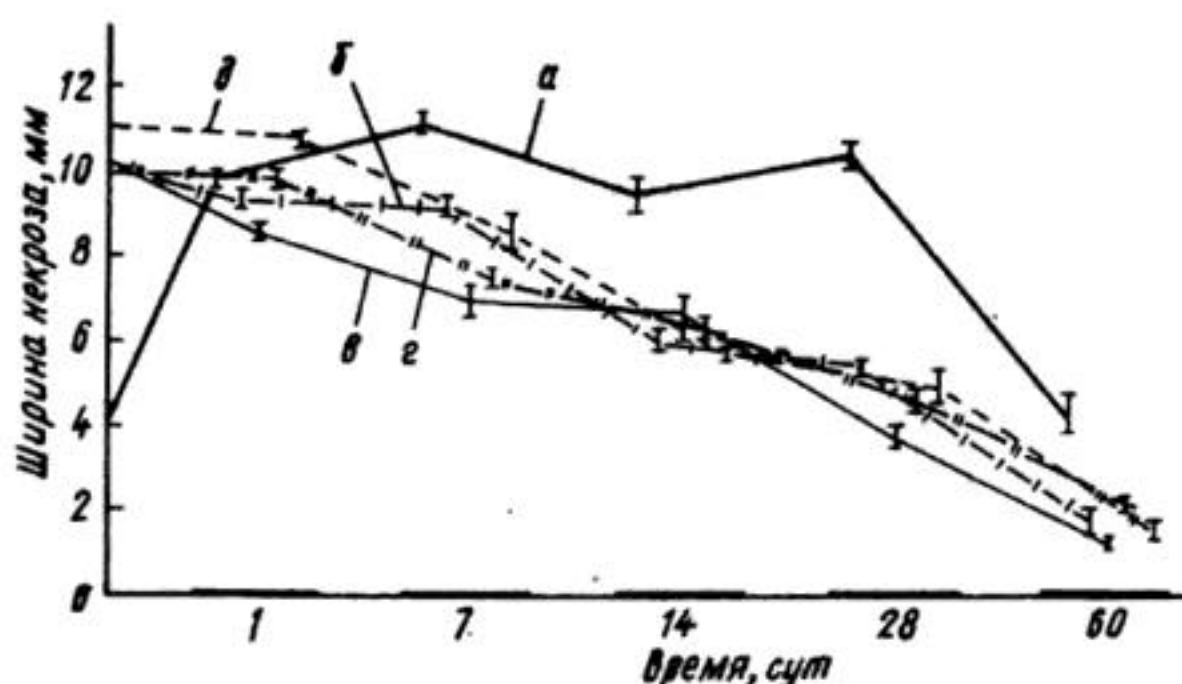


Рис. 3. Динамика величины зоны некроза после операции. Условные обозначения те же, что на рис. 1.

ния швов и криовоздействия). Летальность у этой группы от кровопотери в течение 3 ч составила около 60%.

Наибольшее количество осложнений в зоне резекции и брюшной полости имело место в 1-й серии опытов, где остановка кровотечения производилась наложением кетгутовых швов, зона резекции характеризовалась усиленной воспалительной реакцией, наличием реактивного выпота в 1—7-е сут, последующим развитием в этой области обширного спаечного процесса, формированием подпеченочных абсцессов. Гематомы в зоне резекции, реактивный выпот в брюшной полости имели место и во 2-й серии, что, вероятно, обусловлено возобновлением кровотечения из сосудов среднего и крупного диаметра после оттаивания льда. Однако через 15—20 мин в зоне резекции формировался кровяной сгусток и кровотечение самостоятельно останавливалось.

Архитектоника сосудистого русла и желчных ходов печени изучалась с помощью рентгеноконтрастных методов исследования, приготовления коррозивных препаратов печени и тушь-желатиновой наливки в сроки 30 мин, 1 и 2 ч после операции. При этом обнаружено отсутствие проходимости мелких сосудов через 20 мин после криовоздействия.

Определение активности ранее перечисленных ферментов в сыворотке крови и гомогенате печени не выявило дополнительных нарушений функции печени при выполнении атипической резекции с применением низких температур в сочетании с другими способами гемостаза.

Таким образом, совместное использование криохирургии и традиционных методов не сопровождается дополнительным усилением воспалительно-деструктивной реакции тканей на травму. В то же время криохирургическое воздействие на ткань печени позволяет выполнять атипические резекции в любых участках органа и обеспечивает в ранние сроки после операции хороший паренхиматозный гемостаз и предотвращает холеррагию.

1. Кандель Э. И. Криохирургия. — М.: Медицина, 1974. — 301 с.
2. Петерсон Б. Е. Хирургическое лечение злокачественных опухолей. — М.: Медицина, 1976. — 367 с.
3. Хирургия печени и желчных протоков / Под ред. А. А. Шалимова. — Киев: Здоров'я, 1975. — 405 с.
4. Шапкин В. С., Гриненко Ж. А. Закрытые и открытые повреждения печени. — М.: Медицина, 1977. — 181 с.

Характеристика детальных осложнений

Осложнение	1-я серия, 28 больных	2-я серия, 29 больных	3-я серия, 30 больных	4-я серия, 25 больных	5-я серия, 25 больных	6-я серия, 25 больных
Кровотечение в сроки до 3-х ч после операции	—	2	—	—	—	16
Гематома в зоне резекции	—	4	—	—	—	2
Реактивный выпот в брюш- ной полости	7	3	—	1	1	3
Абсцесс в зоне резекции печени	4	1	—	—	—	4
Обширный спаечный процесс	4	—	—	—	—	5
Пневмо- ния	—	2	1	1	—	—
Всего ослож- нений	15 54±10%	12 43±10%	1 3±3%	2 8±6%	1 4±4%	30*
Причина смерти						
кровотечение	—	2 7±5%	—	—	—	16 64±10%
абсцесс пневмония	1 4±4%	— 2 7±5%	— 1 3±3%	— 1 4±4%	— —	— —

* В данном случае достоверность не определялась из-за нескольких осложнений у одного животного.

5. Cahan W. J. Cryosurgery of malignant and benign tumors. — Fed. Proc., 1965, 24, p. 241—248.
6. Cooper G. S. Cryogenic surgery for cancer. — Fed. Proc., 1965, 24, p. 237—240.
7. Green N. A. Cryosurgery of the prostate gland in the unfit. — Subject Bult. J. Urol., 1970, 1, p. 10—20.
8. Helpap B., Breining H., Minderjang A., Lymberopoulos S. Die Wundheilung nach Kryonecrose an der Niere. — Virchows Arch., 1974, 363, N 2, S. 123—133.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
26.02.80

УДК 57.043

В. Ф. Криворотько

КРИОВОЗДЕЙСТВИЕ НА ОПУХОЛИ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В УСЛОВИЯХ ИНФИЛЬТРАЦИИ НОВОКАИНОМ И ЗАЩИТЫ ОКРУЖАЮЩИХ ТКАНЕЙ И ОРГАНОВ РАСТВОРАМИ КРИОПРОТЕКТОРОВ

Криодеструкция опухолей предстательной железы в свете имеющихся достижений [1—5] нуждается в дальнейшем совершенствовании методики криовоздействия и расширенной клинической апробации. Прежде всего необходима защита парапростатических тканей и органов, а также

мочевом пузыря от холодового повреждения. Для этого нами предложено использовать растворы криопротекторов. Вместе с тем остается неизученным вопрос о действии низких температур на опухоли предстательной железы в условиях ее инфильтрации раствором новокаина.

В настоящей работе рассматриваются клинические данные о больных, подвергавшихся криовоздействию в условиях инфильтрации опухолей предстательной железы раствором новокаина, а также криозащиты нормальных окружающих тканей криопротекторами поливинилпирролидоном (ПВП) и полиэтиленоксидом с молекулярной массой 400 (ПЭО-400) при введении в мочевой пузырь 60%-ного глицерина.

В составе группы был 31 больной, у 4 из них отмечен рак и у 27 — аденома предстательной железы. При этом 22 больным раньше был наложен надлобковый свищ мочевого пузыря в связи с острой задержкой мочи.

По возрасту больные распределялись следующим образом: 51—60 лет — 1, 61—70—9; 71—80—17; старше 80 лет — 4.

Общее состояние больных отягощалось сочетанием основной и сопутствующей патологии (табл. 1).

Среди больных, страдающих атеросклерозом и гипертонией, у 7 отмечены тяжелые формы сердечно-сосудистой и сердечно-легочной недостаточности, у 2 — повторные инфаркты миокарда, у 3 — выраженное нарушение ритма сердечной деятельности и у 1 — явления гемипареза после инсульта. В группе больных с хронической патологией легких у одного выявлен хронический диссеминированный туберкулез в фазе инфильтрации и у 2 — тяжелые формы пневмосклероза. У 3 больных имелась терминальная фаза хронической почечной недостаточности. Среди больных с хроническими заболеваниями других органов и систем выявлены сахарный диабет (у 6 больных), тяжелые формы колитов, гепатохолестита. У 3 больных имелись тяжелые обменные полиартриты, у 2 — шизофрения и у одного — старческое слабоумие.

Приведенные данные указывают на высокую частоту сочетания основного заболевания с различной сопутствующей патологией, заметно отягощающей общее состояние больных.

Данные ректального, инструментального и рентгенологического обследования показали, что у подавляющего числа больных (у 26) опухоль была сравнительно крупного размера (5—8 см), причем большей частью плотноэластической консистенции.

Из 31 больного криовоздействие под общим обезболиванием проводилось лишь у 1, у остальных 30 оно выполнялось под местной анестезией в сочетании с нейрорептаналгезией.

Частота выполнения элементов предлагаемой методики перед криовоздействием следующая:

Элемент методики	Число наблюдений
Заполнение мочевого пузыря 60%-ным раствором глицерина	27
Заполнение мочевого пузыря кислородом	4
Инфильтрация опухоли 0,25—0,5%-ным раствором новокаина	7
Инфильтрация криопротектором (6%-ным раствором ПВП или 15%-ным раствором ПЭО-400) парапростатической клетчатки	19
околопузырной клетчатки	14

Насыщение раствором криопротекторов околопузырной клетчатки проводилось в случаях, когда криовоздействие осуществлялось без предварительно наложенного надлобкового свища мочевого пузыря или у больных с микроцистостомой.

Целесообразность обеспечения защиты парапростатических тканей с

помощью криопротекторов получила обоснование в эксперименте и дала более устойчивые результаты в клинике.

В условиях криопротекции повышался градиент температур замораживаемой опухоли и парапростатических тканей, выравнивался фронт замораживания, что практически исключало развитие местных флеботромбозов. Это позволило использовать криокатетер новой конструкции с повышенной хладопроизводительностью, удлинить экспозицию криовоздействия до 15 мин, использовать двухразовое замораживание крупных опухолей, что определяло выраженность повреждающего эффекта.

При таком подходе у 21 больного первичное замораживание до затвердевания опухоли продолжалось 8—14 мин, затем в течение 5—12 мин производилось отогревание, после чего — повторное замораживание в течение 9—15 мин.

Из 10 больных, замораживание которым производилось однократно, у 5 через 21—37 дней в связи с отсутствием функционального эффекта осуществлялось повторное замораживание, у 4 — по двукратной программе.

Динамический контроль за ходом отторжения аденомы проводили методом повторного пальпаторного ректального исследования с привлечением данных инструментального (у 4 больных) и рентгенологического (у 9 больных) исследования. Были выявлены определенные закономерности анатомо-морфологических изменений опухоли после криовоздействия, в частности более ранняя и энергичная секвестрация, а также формирование U-образного дефекта в области опухоли.

Клиническое течение периода после криовоздействия у больных этой группы было различным: при имеющемся свище мочевого пузыря и без него.

Из 9 больных, криовоздействие которым производилось без ранее наложенного надлобкового свища (1-я подгруппа), у 6 спонтанное мочеиспускание появилось в ранние сроки (на 3—10-е сут). Восстановление спонтанного мочеотделения мимо катетера являлось показанием к удалению последнего. Период ранней секвестрации у этих больных протекал сравнительно спокойно, цвет мочи постепенно приобретал обычную окраску, гнойно-некротический осадок уменьшался, снижалось количество остаточной мочи.

У 3 больных первой подгруппы возникала «непереносимость» постоянного катетера уже на 1—2-е сут после криовоздействия. У них катетер был удален и опорожнение мочевого пузыря обеспечивалось повторными катетеризациями. При этом появлявшееся спонтанное мочеотделение было неадекватным — отмечались резкое истончение струи, затрудненное мочеотделение, мочеиспускание малыми порциями, дизурические явления, стойкое сохранение остаточной мочи, периодически возникающие острые задержки мочи и признаки интоксикации. Этим

Т а б л и ц а 1

**Распределение больных по характеру
сопутствующей патологии**

Характер сопутствующей патологии	Численность случаев	
	всего выявлено	являлась доминирующей
Общий атеросклероз с преимущественным поражением сосудов мозга, сердца и нижних конечностей	29	15
Гипертоническая болезнь	11	5
Хроническая патология органов дыхания	14	3
Сочетание аденомы и рака предстательной железы с другими заболеваниями органов мочеполовой системы	17	3
Хронические заболевания органов желудочно-кишечного тракта, опорно-двигательного аппарата, психические заболевания и др.	16	5
Всего	87	31

Таблица 2

Характеристика общих и местных осложнений у 9 больных первой подгруппы

Характер осложнений	Количество больных	Срок возникновения осложнений	Лечение	Исход
Уретрит	2	На 3-й день	Удален катетер	Выздоровление
Орхоэпидидимит	3	Через 12—14 дней	Консервативное	„
ранний	2	Через 2, 5 и 6 мес	Консервативное и хирургическое	„
поздний			Длительное комбинированное	„
Остеит лобковых костей (паравезикальный инфильтрат с нижним парапарезом)	1	Через 1,5 мес.		
Недержание мочи	3	Через 1—1,5 мес.	Консервативное	Улучшение
Стриктура уретры	1	Через 2,5 мес.	Бужирование	Выздоровление
Сенильный психоз	1	Через 2 мес.	Симптоматическое	Улучшение
Всего	13			

больным по срочным показаниям на 7-, 11- и 14-й день произведено наложение надлобкового свища мочевого пузыря: у 2 из них свищ зажил на 38-е и 59-е сут и у одного в последующем произведено вылушивание аденомы.

Течение периода после криовоздействия у этой подгруппы больных без предварительно наложенного надлобкового свища мочевого пузыря и при использовании инфильтрации окружающих тканей растворами криопротекторов, а также при одномоментном двухразовом замораживании отличалось интенсивной секвестрацией и нормализацией акта мочеиспускания в сравнительно более ранние сроки: все больные 1-й подгруппы с восстановившимся мочеиспусканием были выписаны на 21—39-й день в удовлетворительном состоянии. Однако течение периода после криовоздействия у больных первой подгруппы требовало постоянного динамического наблюдения и коррекции; отмечен ряд осложнений, характер которых представлен в табл. 2.

Данные таблицы свидетельствуют о сравнительно высокой частоте осложнений, которые в ранние сроки представлены местными гнойно-некротическими процессами, а позже — явлениями фиброза с вторичными функциональными нарушениями.

У 22 больных с имевшимся надлобковым свищем (2-я подгруппа) секвестрация начиналась на 5—6-й день и протекала довольно интенсивно. Отмечено, что в случаях использования методики двухразового одномоментного замораживания опухолей крупных размеров (10 больных) секвестрация протекала более энергично, в сравнительно короткие сроки и с отхождением более крупных секвестров. В группе больных с надлобковым свищем также возникала закупорка дренажа, но она не вызывала указанных общих и местных осложнений. По свищу нередко и довольно легко рождались секвестры, причем у 6 из 22 — по нескольку раз. На основании перечисленных данных следует считать предпочтительным проведение криовоздействия при надлобковом свище. При изучении у этой подгруппы особенностей клинического течения периода после криовоздействия оказалось, что при замораживании по обычной программе (одноразово) период интенсивной секвестрации продолжался от 4 до 6 недель, при двухразовом замораживании — около 3 недель, в особенности если ткань аденомы перед криовоздействием инфильтрировали раствором новокаина. В дальнейшем секвестрация продолжалась, но уже более мелкими кусочками. У 2 больных отхождение секвестров продолжалось от 47 до 60 дней. Это были больные с тяжелыми формами сердечно-сосудистой и сердечно-легочной недостаточности в.

стадии декомпенсации при явно сниженных реактивных способностях организма.

Опыт показывает, что полученный после деструкции просвет уретры в ряде случаев оказывается недостаточным и акт мочеиспускания не восстанавливается. Из 22 больных анализируемой группы свищ зажил лишь у 12 (у 8 из них произведено одномоментное двухразовое замораживание и у 4 — одноразовое). Сроки заживления свища у этих больных оказались практически идентичными для замораживания по обеим программам (28—64 дней), однако если учесть, что двухразовое замораживание производилось больным с крупными опухолями, то указанное совпадение свидетельствует в пользу этого приема.

Одной из причин длительного незаживания свища являлась недостаточная экспозиция криовоздействия и вследствие этого ограниченная ее секвестрация: из 10 больных с незажившим свищем у 5 в последующем выполнена аденомэктомия, при которой выявлена частичная фрагментация долей аденомы, оказавшаяся недостаточной для обеспечения клинического эффекта.

Отмечено, что повторное криовоздействие при вялотекущей секвестрации заметно ее активизирует, одновременно обостряя местные гнойно-септические процессы (цистит, восходящий пиелонефрит) с явлениями интоксикации, что ограничивает показания для повторного криовоздействия из-за опасности развития острых форм пиелонефрита и уросепсиса. Вместе с тем повторное криовоздействие в поздние сроки при закончившейся секвестрации и фиброзе тканей вокруг уретры уже не обеспечивает эффективного отторжения оставшихся участков опухоли, что, по-видимому, обусловлено указанными изменениями ее к этому времени.

У 16 больных второй подгруппы отмечены осложнения, причем в ранние сроки у 7 отмечены: обострение явлений декомпенсации сердечно-сосудистой и сердечно-легочной недостаточности, гипостатическая пневмония, уретрит и отек полового члена. В более поздний период, т. е. через 1 мес и больше, возникали: инфильтрат у корня полового члена, абсцесс передней брюшной стенки, относительное недержание мочи и незаживающий надлобковый свищ. Обращает на себя внимание относительно высокий процент (у 5 больных из 31) недержания мочи. Возникновение этого осложнения мы связываем с холодовым повреждением сфинктера мочевого пузыря или его вторичными изменениями на почве местных гнойно-воспалительных процессов. Из 31 больного в стационаре умер один больной при явлениях уросепсиса, развившегося при обострении фибринозно-гнойного цистита, восходящего пиелонефрита, абсцесса передней брюшной стенки в области эпицистостомы. После выписки умерло 4 больных в сроки от 4 до 6 мес: двое — от фибринозно-гнойного цистита, восходящего пиелонефрита, уросепсиса; один — от прогрессирующей легочно-сердечной недостаточности и один — от повторного инфаркта миокарда.

Таким образом, проведенные исследования показывают, что использование предлагаемой методики криовоздействия позволяет избежать флеботромбоза в парапростатической клетчатке и обеспечить более устойчивые клинические результаты лечения.

1. *Bellows J. G.* Cryosurgical instruments. Theoretical and clinical considerations. — *Int. Surg.*, 1967, 47, N 5, p. 416—424.
2. *Garancy G.* Engineering aspects of cryosurgery. — In: *Cryosurgery*. Springfield, Ill., 1968, p. 186.
3. *Hausen R. J.* Cryotherapy in urology. — *Acta urol. belg.*, 1970, 38, N 1, p. 61—62.
4. *Leibundgut B.* Erfahrungen mit der Kriochirurgischen Behandlung von Prostatuerkrankungen. — *Helv. chir. acta*, 1974, 41, N 4, p. 435—437.
5. *Megalli M. R., Gursel E. O., Venena R. J.* Closed perineal cryosurgery in prostatic cancer. New probe and technique. — *Urology*, 1974, N 4, p. 220—222.

Украинский институт
усовершенствования врачей МЗ СССР

Поступила в редколлегию
25.10.79

Б. П. Сандомирский, В. Ю. Васильовский

НАРУШЕНИЕ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ ПОСЛЕ ЛОКАЛЬНЫХ ТЕМПЕРАТУРНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ

Вопросы микроциркуляции имеют большое значение для теории и практики криомедицины. С одной стороны, они позволяют решать теоретические проблемы воспаления [2, 4, 5], с другой — искать пути коррекции нарушений на уровне функционально-структурных единиц микроциркуляторного русла органов и тканей.

Действие температурного фактора на ткани — предмет широкого экспериментального исследования в течение последних 10 лет, причем особое внимание уделено ожогам [1, 6, 7]. Работами, проведенными в Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР, выработаны параметры охлаждения термических ожогов и косвенными данными установлено влияние охлаждения на перфузию тканей в зоне температурного воздействия [3]. Последующими работами [8] также показан благоприятный эффект охлаждения обожженных тканей защечного мешка золотистого хомяка, что выражалось в улучшении микроциркуляции и уменьшении деструкции.

Цель настоящей статьи — сравнительное изучение нарушений микроциркуляторного звена после действия положительных и отрицательных температур, а также их сочетания.

Методика исследования. Объектом исследования служили защежные мешки золотистых хомяков массой 150—200 г, у которых производилась контактная биомикроскопия с помощью микроскопа «Люам К-1» ЛОМО.

На 32 животных под внутрибрюшинным тиопенталовым наркозом производилось криовоздействие аппликатором диаметром 11 мм с охлаждением тканей до -146°C на протяжении 45 с, у 12 животных вызывали ожоги на защежном мешке точечным аппликатором с температурой 100°C при такой же экспозиции. Семи животным после описанного ожога делалось криовоздействие.

Результаты и их обсуждение. Нами, как и другими исследователями [9], в экспериментах показано, что температурные воздействия, производимые на защежном мешке, не вызывают нарушений кровообращения в микрососудах симметричного органа (рис. 1).

Характер нарушений местной микроциркуляции после криовоздействия выглядит следующим образом. В зоне под аппликатором возникают необратимые изменения, выражающиеся в полном прекращении кровообращения. По периферии, на расстоянии 2 мм, в первые 30 с наблюдаются сужение артериол и венул, ускорение кровотока в капиллярах. Соотношение артериол и венул, составляющее в норме 1 : 3, уменьшается до 1 : 2. Дистальнее этой зоны перфузия тканей также нарушена. Наблюдаются дилатация всех компонентов микроциркуляторного русла, ускорение кровотока, но соотношение артериол и венул остается нормальным. В дальнейшем, в сроки до 3 мин в зоне I, вблизи аппликатора, спазм сменяется дилатацией, кровоток замедляется, образуются пристеночные агрегаты, белые тромбы, объем которых увеличивается, и они могут полностью закрыть просвет сосуда (рис. 2), после чего кровоток осуществляется лишь в направлении еще функционирующих сосудов. В последующем появляется маятникообразное движение крови, преимущественно в веноулярном звене, увеличивается диаметр тромбов, капилляры запустевают.

Во второй зоне, на удалении более 2 мм от края аппликатора по периферии, сохраняется ускоренное кровообращение. В сроки до 3 ч в

зоне I происходит полное тромбирование венул, тогда как во второй зоне за это время дальнейших изменений не наблюдается.

После ожога, непосредственно под горячим аппликатором, определяется гомогенная ткань без всяких признаков структуры сосудов. По периферии на расстоянии 4—6 мм отмечаются лишь контуры сосудов

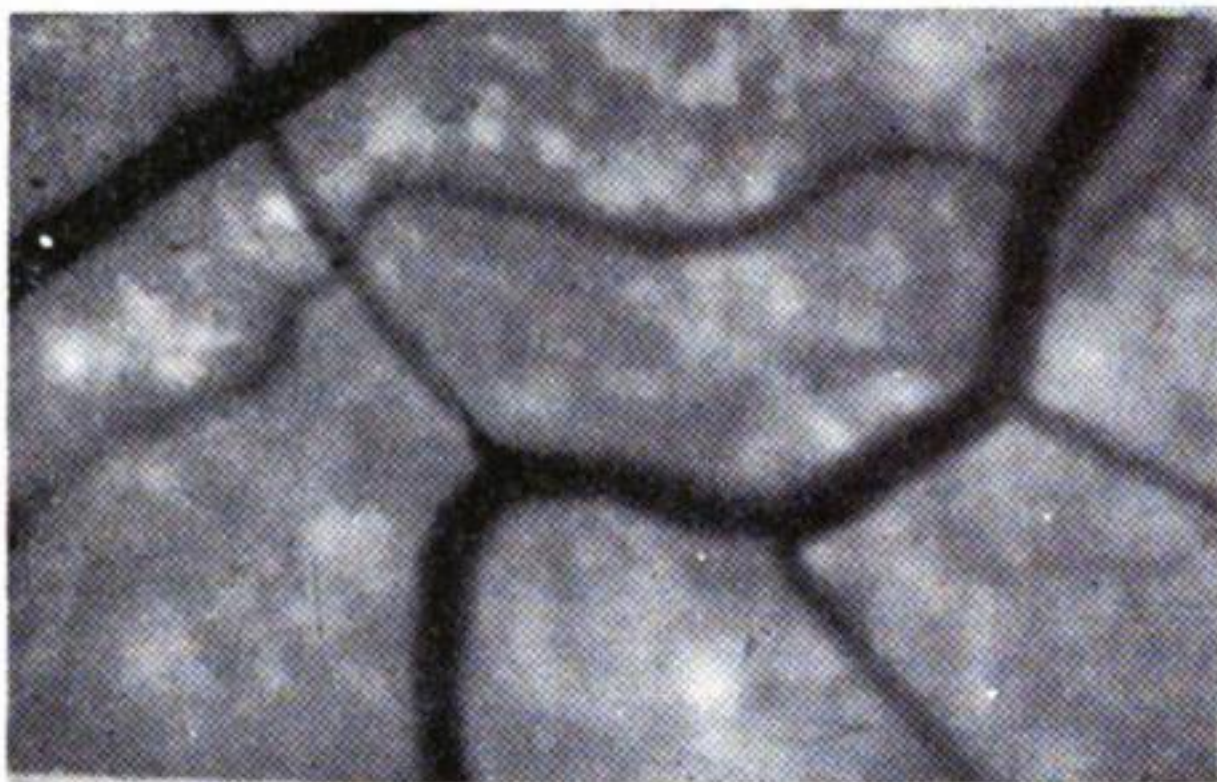


Рис. 1. Микрососуды защечного мешка хомяка при криовоздействии на симметричном органе; $\times 175$.

без кровообращения и с выходом в межсосудистое пространство гемолизированной плазмы. Вокруг этой зоны интенсивность кровотока увеличивается и наблюдается спазмирование артериол и венул, в которых в дальнейшем идут сладжирование и постепенное тромбирование с преимущественным поражением венозных сосудов.

При проведении криоаппликации на фоне ожога под аппликатором, который захватывает всю зону наиболее выраженных первичных изме-

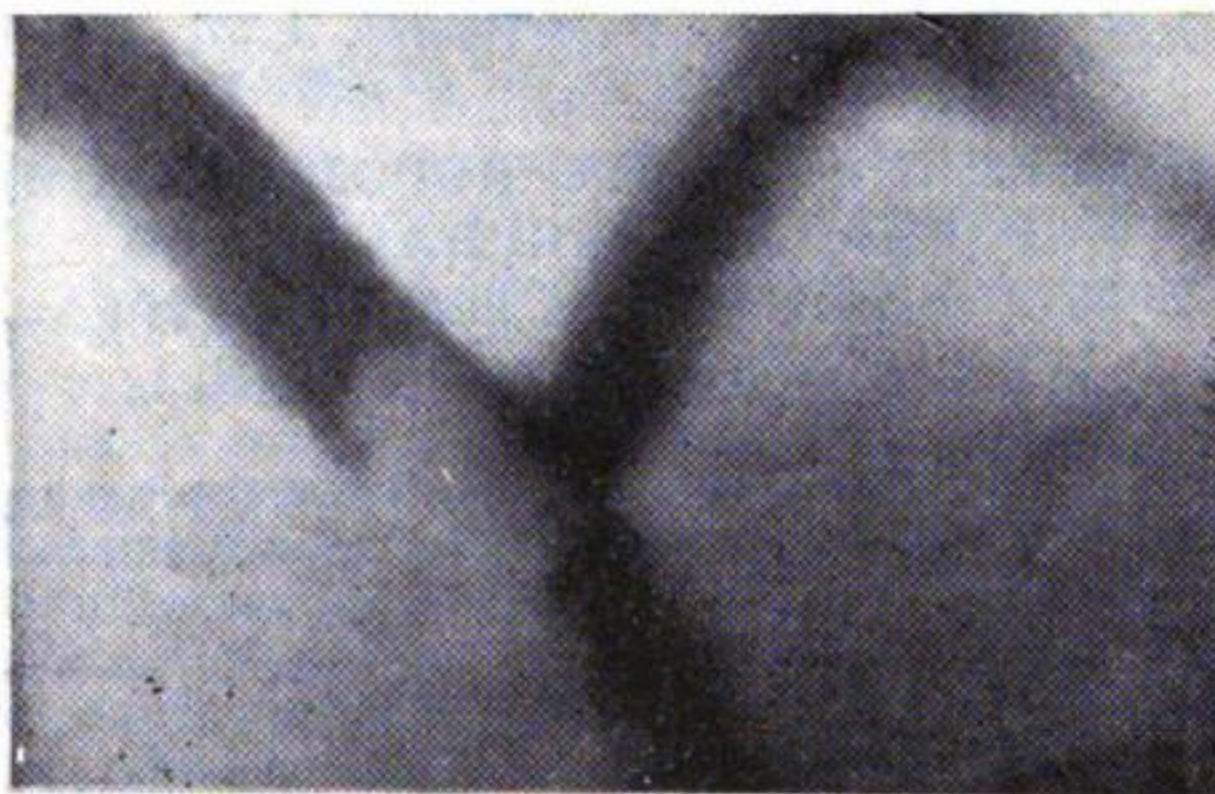


Рис. 2. Формирование белого тромба в венуле во время криовоздействия; $\times 750$.

нений, не определяются гемолизированные экстравазаты и сохраняются единичные, слабофункционирующие венулы и артериолы, хотя капиллярное кровообращение отсутствует. Характер изменений по периферии зоны контакта аппликатора с тканью такой же, как и при чистом криовоздействии. С течением времени до 3 мин венозные сосуды тромбируются и лишь изредка наблюдаются функционирующие артериолы.

Выводы. Полученные данные показывают количественные различия в нарушении местного кровообращения после деструкции ткани положительными и отрицательными температурами, что выражается в мень-

шем объеме выключенного кровообращения вокруг зоны криовоздействия в сравнении с таковым объемом при ожоге. Кроме того, охлаждение замедляет необратимые процессы нарушения местной гемоциркуляции, обусловленные положительными температурами. Качественные изменения при ожогах и криовоздействиях сходны, однако темп и объем перифокальных нарушений после ожогов существенно выше, чем после криодеструкций.

1. Кочетыгов Н. И. Ожоговая болезнь (очерки по патологической физиологии). — Л.: Медицина, 1973. — 246 с.
2. Куприянов В. В., Караганов Я. Л., Козлов В. И. Микроциркуляторное русло. — М.: Медицина, 1975. — 213 с.
3. Пекарський Д. Р., Сандомирський Б. П., Белоусова Е. В., Воліна В. В., Волкова Н. О., Ісаєв Ю. І. Кріовплив у лікуванні опіків шкіри. — Вісн. АН УРСР, 1978, № 11, с. 42—49.
4. Чернух А. М., Александров П. Н., Алексеев О. В. Микроциркуляция. — М.: Медицина, 1975. — 455 с.
5. Чернух А. М. Воспаление (очерки патологии и экспериментальной терапии). — М.: Медицина, 1979. — 448 с.
6. Штыхно Ю. М., Иванов Л. С. Состояние терминального кровотока после ожогов разной тяжести. — В кн.: Микроциркуляция. Функция и структура: Материалы I Всесоюз. конф. по микроциркуляции. М., 1972, с. 230—231.
7. Ross D. C., Diller K. R. An experimental investigation of burn injury in living tissue. — J. Heat Trans., 1976, N 2, p. 292—296.
8. Ross D. C., Diller K. R. Therapeutic effects of postburn cooling — J. Biomech. Eng., 1978, 100, N 3, p. 149—152.
9. Jacarian S. A. Cryosurgery of tumors the sein and oral cavity. — Springfield, 1973. — 293 p.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
29.02.80

УДК 57.043.617.7

*В. М. Чередниченко, Т. Н. Юрченко, Т. М. Шарлай,
А. Л. Демин, П. А. Бездетко*

ОПЫТ КЛИНИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РОГОВИЧНЫХ ТРАНСПЛАНТАТОВ, КОНСЕРВИРОВАННЫХ ПРИ ТЕМПЕРАТУРЕ —196°С В ПОЛИЭТИЛЕНОКСИДЕ-400

Среди актуальных проблем офтальмологии пересадка роговицы занимает важное место. Особое значение имеет тектоническая пересадка при заболеваниях роговицы, угрожающих перфорацией или при уже образовавшихся фистулах. В этих случаях кератопластика имеет urgentный характер и является единственным средством, спасающим глаз от неминуемой гибели [5, 10]. При таких обстоятельствах очень важно иметь заблаговременно заготовленный биологически полноценный донорский материал.

Как показали работы многих исследователей [2, 6, 7, 9, 10—14], длительное сохранение биологически полноценной донорской роговицы возможно в условиях низких температур при применении различных криопротекторов, в частности глицерина и диметилсульфоксида. Однако эти вещества обладают известной токсичностью по отношению к клеткам роговицы и при их применении требуется тщательное отмывание трансплантата перед операцией, что может привести к повреждению эндотелия и ухудшить исход операции.

В эксперименте на животных был разработан способ низкотемпературной консервации роговицы с помощью полиэтиленоксида-400 [8] — криозащитного вещества, которое не требует отмывания и используется

для низкотемпературной консервации некоторых других биологических объектов [1, 3, 4].

Материалы и их обсуждение. В настоящем сообщении представлены результаты 22 послойных пересадок криоконсервированной в ПЭО-400 роговицы. Среди оперированных мужчин было 4, женщин — 18. Возраст больных от 1 года до 70 лет. 18 больным операция была произведена по поводу грыжи роговицы, из них у 12 были фистулы роговицы, в том числе у 6 с выпадением радужки. Причиной грыж и фистул послужили язвы роговицы в 8 случаях, герпетические кератиты — в 7, нейродистрофические кератиты — в 3 случаях. 4 операции были сделаны по поводу дистрофии роговой оболочки. Все операции производились под микроскопом. Трансплантаты укреплялись непрерывными или узловатыми перлоновыми швами, которые удалялись на 16—20 день. По показаниям в послеоперационном периоде проводилась соответствующая общая и местная медикаментозная терапия (антибиотики, кортикостероиды, мидриатики и др.).

Трансплантаты прижили у всех 22 больных при минимальной реакции со стороны глаза реципиента. Ни у одного из оперированных не наблюдалось отторжения трансплантата, что свидетельствует о достаточной жизнеспособности консервированной в ПЭО-400 роговицы. Приживление было прозрачным у 8 больных, полупрозрачным — у 11 и мутным — у 3. В последних трех случаях отмечена выраженная васкуляризация трансплантата.

У всех 12 больных с фистулами роговицы удалось закрыть дефект, в результате чего восстановилась передняя камера глаза и нормализовалось низкое до операции внутриглазное давление. В остальных 6 случаях грыж роговицы также получен хороший результат — прочное срастание трансплантата с тканью роговицы хозяина и устранение выпячивания.

Результаты 4 послойных трансплантаций криоконсервированной в ПЭО-400 роговицы больным с дистрофическими заболеваниями роговой оболочки были следующими: прозрачное приживление у одной больной и полупрозрачное — у трех. Однако в отдаленном периоде (через 2 мес) отмечено значительное просветление одного из трансплантатов, поначалу прижившегося полупрозрачным. У всех прооперированных больных поверхность трансплантатов была гладкой, покрытой ровным блестящим слоем прозрачного эпителия.

Наши операции не преследовали цели достичь высокого оптического эффекта. Задача состояла в том, чтобы в кратчайший срок закрыть дефект роговицы, угрожающий гибелью глаза. Тем не менее у 18 из 22 оперированных отмечено повышение зрения. Так, у больной с дистрофией роговой оболочки типа Гренува зрение улучшилось с 0,1 до 0,8, у трех других — с 0,01 до 0,1. У 14 больных с грыжами и фистулами роговицы зрение повысилось по сравнению с исходным на 0,01—0,05. Не улучшилось зрение у 4 больных, из них у 2 — с фистулами роговицы и выпадением радужки и у 2 — с грыжами в центральной зоне роговицы.

Следует, однако, заметить, что после ликвидации опасной ситуации, связанной с перфорацией роговицы, эти больные в последующем могут быть подвергнуты повторной кератопластике уже с оптической целью.

Прооперированные нами больные прослежены в сроки от 6 мес до 3 лет. Ни в одном случае не было поздних осложнений, связанных с операцией (отторжения, изъязвления или помутнения трансплантата). У двух больных отмечено просветление первоначально мутно прижившейся роговицы.

Наш опыт трансплантации роговицы, длительно консервированной при -196°C в ПЭО-400, показал ее пригодность для клинических целей, в частности для urgentных послойных тектонических пересадок.

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют о пригодности для клинических целей роговицы, длительно консервированной в ПЭО-400 при -196°C .

1. Воротилин А. М. Применение полиэтиленоксидов для замораживания эритроцитов человека, механизм их повреждения и физиологическое состояние после действия низких температур : Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Харьков, 1970. — 21 с.
2. Протасов А. И. Пересадка роговицы, длительно консервированной глубоким охлаждением : Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Куйбышев, 1969. — 18 с.
3. Пушкарь Н. С. Консервирование глубоким охлаждением (-196°C) костного мозга и его использование в клинических целях : Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Харьков, 1968. — 24 с.
4. Пушкарь Н. С., Белоус А. М. Введение в криобиологию. — Киев : Наук. думка, 1975. — 343 с.
5. Пучковская Н. А., Бархаш С. А., Бушмич Д. К., Войно-Ясенецкий В. В., Мучник С. Р. Основа пересадки роговой оболочки. — Киев : Здоров'я, 1971. — 277 с.
6. Савушкина Н. М. Пересадка роговой оболочки, сохраненной при низких температурах. — Вестн. офтальмологии, 1962, № 5, с. 36—42.
7. Стукалов С. Е. Иммунологические исследования при пересадке роговицы. — Вестн. офтальмологии, 1964, № 1, с. 28—31.
8. Чередниченко В. М., Юрченко Т. Н., Шарлай Т. М. К методике низкотемпературной консервации тканей глаза. — В кн.: Трансплантация органов и тканей : Материалы VI Всесоюз. конф. по пересадке органов и тканей. Рига, 1972, с. 493.
9. Eastcott H. H. G., Cross A. J., Leigh A. J., North D. P. Preservation of corneal by freezing. — Lancet, 1954, 273, N 1, p. 237—239.
10. Günter J. Zur indication und über komplikationen bei der keratoplastik. — In: Keratoplastik — Symp. Haale, 1957, S. 127—140.
11. Kaufman H. E. Preserved corneal tissue for transplantation. — J. Cryosurg., 1968, N 1, p. 199—201.
12. Muller F. O., Casey T. A., Trevor-Roper P. D. Use of deep-frozen human corneas in full-thickness grafts. — Br. Med. J., 1964, N 2, p. 372—375.
13. Mueller F. O., Smith A. U. Some Experiments on grafting frozen corneal tissue in rabbits. — Exp. Eye Res., 1963, N 2, p. 237—246.
14. Polack F. M., Kudo T., Takahashi J. H. Viability of human eye bank cornea. — Arch. Ophthalmol., 1968, 79, N 2, p. 205—210.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
14.03.80

КРИОГЕННАЯ ТЕХНИКА

УДК 57.043.621.565.4

В. В. Королев, А. И. Скребцов, Э. Син, О. А. Гайдук

ПРОГРАММНОЕ ОХЛАЖДЕНИЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЖИВОТНОГО ЧЕРЕЗ НАРУЖНЫЕ ПОКРОВЫ ГОЛОВЫ

Методы охлаждения головного мозга через наружные покровы головы давно нашли применение для лечения целого ряда заболеваний [1, 2]. В настоящее время для этой цели применяются устройства и аппараты [3], предназначенные для охлаждения и согревания головного мозга, содержащие шлем, систему автоматики, систему измерения и индикации. Однако такие устройства и аппараты не обеспечивают программного охлаждения головного мозга, т. е. подвод хладоносителя с различными заданными скоростями к наружным покровам головы или другим участкам тела человека или животного отсутствует. Поверхность головы в зависимости от индивидуальных особенностей пациента каждый раз охлаждается с разной скоростью, которая зависит от времени выхода холодильной фреоновой системы на режим, поэтому охлаждение происходит по разным экспонентам, что не обеспечивает повторяемости заданных характеристик охлаждения, тем более если необходимо экстренное охлаждение с большой заданной скоростью, например при травмах головы и др.

В опытном производстве Института проблем криобиологии и криомедицины АН УССР разработан аппарат для программного охлаждения головного мозга и других участков тела человека или животного. Основным отличием аппарата является введение программного устройства, которое обеспечивает двухэтапное программное охлаждение поверхности тела с заданными скоростями. Аппарат обеспечивает режим стабилизации температуры на поверхности тела в рабочем интервале от $+28^{\circ}\text{C}$ до -40°C с дискретностью 1°C .

Этап	Температурный интервал, $^{\circ}\text{C}$	Скорость охлаждения, $^{\circ}\text{C}/\text{мин}$
I	от $+40$ до -40°C	0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 10
	От любой температуры в интервале от $+40$ до -40°C	10; 15; 20; 25; 30

Система сигнализации обеспечивает световую и звуковую индикацию режимов работы. С помощью аппарата, разработанного в опытном производстве Института проблем криобиологии и криомедицины АН УССР, возможна отработка методик (алгоритмов), при которых организм имел бы наибольшую толерантность к охлаждению при лечении ряда заболеваний. При этом с помощью аппарата возможно осуществить как кранио-церебральную, так и локальную гипотермию.

Система регулирования аппарата позволяет производить подключение не только шлема, но и других охлаждающих приспособлений. Аппарат может найти широкое применение в научно-исследовательских институтах и клиниках.

1. Волколаков Я. В., Лацис А. Т. Глубокая гипотермия в кардиохирургии детского возраста. — Л.: Медицина, 1977. — 152 с.
2. Мурский Л. И. Кранио-церебральная гипотермия (в эксперименте). — М.: Медицина, 1975. — 245 с.
3. Радиоэлектронные медицинские аппараты и приборы: Аннот. каталог / М-во здравоохранения СССР, в/о Союзмедтехника. — Владимир, 1975. — 102 с.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
22.02.80

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

<i>Белоус А. М., Бондаренко В. А.</i> Механизмы развития холодового повреждения мембран клеток	3
<i>Бондаренко В. А., Белоус А. М., Дубур Г. Я.</i> Влияние антиоксидантов на уровень перекисного окисления липидов в мембранах митохондрий после замораживания-отогрева	17
<i>Глушко Т. А.</i> Характер действия криопротекторов на митотический режим клеточных культур	22
<i>Говоруха Т. П., Скорняков Б. А.</i> Ультраструктура лейкоцитов крови после инкубации с полиэтиленоксидом-400 и оксигилированным глицерином	25
<i>Гордиенко Е. А., Гордиенко О. И., Иткин Ю. А.</i> Термодинамическая модель пассивного переноса многокомпонентной жидкости через замкнутую избирательно проницаемую мембрану	29
<i>Гучок М. М., Гучок В. М., Мазалов В. К.</i> Сравнительное исследование токсичности этиленгликоля, α -пропиленгликоля и глицерина	36
<i>Мануильский В. Д., Пушкарь Н. С., Манк В. В., Сытник К. М.</i> Криорезистентность зародышей семян фасоли	43
<i>Новиков А. Н., Пичугин Ю. И., Кулешова Л. Г.</i> Влияние ряда криопротекторов на процесс зародышеобразования льда в плазме крови человека	47
<i>Репко О. В.</i> Иммунолюминесцентное исследование роговицы кролика после частичной сквозной аутотрансплантации	50
<i>Черепнев А. С.</i> Проблема автоматизированной обработки данных электронно-микроскопических исследований	53

КОНСЕРВИРОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

<i>Белоконь В. С., Герус Г. Б., Берус П. Т., Глушко Т. А., Маркова О. П.</i> Митотический режим культивируемых клеток СПЭВ после длительного хранения при -196°C под защитой ДМСО	61
<i>Скорняков Б. А., Вишневский В. И., Новиков А. Н., Стусь Л. К., Гордеева Т. Ф.</i> Влияние магнитного поля на процесс замораживания эритроцитов	65

КРИОМЕДИЦИНА

<i>Бездетко П. А.</i> О влиянии ПЭО-3000 на внутриглазное давление и гемодинамику глаза у кроликов	70
<i>Бем Ф., Праус Р., Дворжак Р.</i> Использование включения радиоактивного сульфата как критерия жизнеспособности кожного лоскута после замораживания до -196°C в присутствии криопротекторных веществ	73
<i>Волкова Н. А.</i> Органное культивирование кожи и его применение в трансплантологии	77
<i>Кодола Н. А., Павлик С. А., Центило Т. Д.</i> Реабилитация больных после криодеструкции патологически измененных тканей пародонта и слизистой оболочки полости рта	84
<i>Коцько Н. И., Шенберг М. Г.</i> Обоснование криорезекции печени	87
<i>Криворотько В. Ф.</i> Криовоздействие на опухоли предстательной железы в условиях инфильтрации новокаином и защиты окружающих тканей и органов растворами криопротекторов	91
<i>Сандомирский Б. П., Васильевский В. Ю.</i> Нарушение микроциркуляции после локальных температурных воздействий	96
<i>Чередниченко В. М., Юрченко Т. Н., Шарлай Т. М., Демин А. Л., Бездетко П. А.</i> Опыт клинического использования роговичных трансплантатов, консервированных при температуре -196°C в полиэтиленоксиде-400	98

КРИОГЕННАЯ ТЕХНИКА

<i>Королев В. В., Скребцов А. И., Син Э., Гайдук О. А.</i> Программное охлаждение головного мозга животного через наружные покровы головы	101
---	-----

CONTENTS

THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

<i>Belous A. M., Bondarenko V. A.</i> Mechanisms of the Cell Membrane Cold Injury Development	3
<i>Bondarenko V. A., Belous A. M., Dubur G. Ya.</i> The Effect of Antioxidants on the Level of Lipid Peroxidation in Mitochondria Membranes After Freezing-Thawing	17
<i>Glushko T. A.</i> The Character of Cryoprotectant Effect on the Mitotic Rate of Cell Cultures	22
<i>Govorukha T. P., Skorniyakov B. A.</i> Blood Leucocyte Ultrastructure After Incubation with Polyethylene Oxide-400 and Oxyethylated Glycerol	25
<i>Gordienko E. A., Gordienko O. I., Itkin Yu. A.</i> A Thermodynamic Model of Passive Transfer of a Multicomponent Liquid Through a Closed Membrane with Selective Permeability	29
<i>Guchok M. M., Guchok V. M., Mazulov V. K.</i> A Comparative Study of Toxicity of Ethylene Glycol, α -Propylene Glycol and Glycerol	36
<i>Manuilsky V. D., Pushkar N. S., Mank V. V., Sytnik K. M.</i> Cold Resistance of French Bean Seed Germs	43
<i>Novikov A. N., Pichugin Yu. I., Kuleshova L. G.</i> The Effect of Some Cryoprotectants on Ice Nucleation in Human Blood Plasma	47
<i>Repko O. V.</i> Immunoluminescent Investigation of Rabbit Cornea After a Partial Penetrating Autotransplantation	51
<i>Cherepnev A. S.</i> A Problem of Electron Microscopic Data Automatic Processing	54

PRESERVATION OF BIOLOGICAL SYSTEMS

<i>Belokon V. S., Gerus G. B., Berus P. T., Glushko T. A., Markova O. P.</i> The Mitotic Rate of Pig Embryo Cultivated Renal Cells After Prolonged DMSO-Protected Storage at -196°C	61
<i>Skorniyakov B. A., Vishnevsky V. I., Novikov A. N., Stus L. K., Gordeyeva T. F.</i> The Magnetic Field Effect on the Process of Freezing of Erythrocytes	65

CRYOMEDICINE

<i>Bezdetko P. A.</i> On the Effect of PEO-3,000 on Intraocular Pressure and Hemodynamics of the Eye in Rabbits	70
<i>Böhm F., Praus R., Dvořák R.</i> The Use of Radioactive Sulphate Incorporation as a Criterion of Skin Graft Survival After Freezing to -196°C in the Presence of Cryoprotectants	73
<i>Volkova N. A.</i> Organ Cultivation of Skin and Its Application in Transplantology	77
<i>Kodola N. A., Pavlik S. A., Tsentilo T. D.</i> Rehabilitation of Patients After Cryodestruction of Pathologically Changed Tissues of Parodontium and Mucosa of Oral Cavity	84
<i>Kotsko N. I., Shenberg M. G.</i> Argumentation in Favour of Hepatic Cryoresection	87
<i>Krivorotko V. F.</i> Cryodestruction of Prostatic Tumours Under Conditions of Infiltration with Novocain and Protection of Surrounding Tissues and Organs with Cryoprotectant Solutions	91
<i>Sandomirsky B. P., Vasilovsky V. Yu.</i> Microcirculation Disturbances Resulted from Local Temperature Effects	96
<i>Cherednichenko V. M., Yurchenko T. N., Sharlay T. M., Demin A. L., Bezdetko P. A.</i> Clinical Application of Cornea Grafts Preserved at -196°C with Polyethylene Oxide-400	98

CRYOGENIC TECHNIQUE

<i>Korolev V. V., Skrebtsov A. I., Sin E., Gaiduk O. A.</i> Programmed Cooling of the Brain of Animals Through Outer Coverings of the Head	101
--	-----

УДК 57.043.577:576.347

Механизмы развития холодового повреждения мембран клеток / Белоус А. М., Бондаренко В. А. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 9, с. 3—17.

Показаны закономерности развития холодового повреждения клеток в зависимости от температуры и структурных свойств мембран клеток. Освещены механизмы температурозависимых изменений структуры и функции биомембран клеток и субклеточных органелл, значение в этих процессах воды, липидов и липид-белковых комплексов, рассмотрены вопросы криоповреждения мембран как биохимическая патология, предложена гипотеза повреждения клеток при гипотермическом хранении и замораживании.

Ил. 6. Библиогр.: 97 назв.

УДК 57.043.576.3.347

Влияние антиоксидантов на уровень перекисного окисления липидов в мембранах митохондрий после замораживания-отогрева / Бондаренко В. А., Белоус А. М., Дубур Г. Я. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 9, с. 17—22.

Исследовали эффективность ряда синтетических антиоксидантов — производных 1,4-ДГП (дегидропиридина) при медленном замораживании до -25°C митохондрий печени крысы. Установлено, что наиболее эффективно предупреждает развитие перекисного окисления липидов и их деградацию в составе мембраны дилудин-С в концентрации 10^{-3} — 10^{-5} М. Сделан вывод о том, что подобного рода антиокислители целесообразно использовать в составе защитных средств при консервации биоматериалов.

Ил. 3. Табл. 2. Библиогр.: 33 назв.

УДК 541.49:576.3:57.083

Характер действия криопротекторов на митотический режим клеточных культур / Глушко Т. А. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 9, с. 22—25.

Изучено влияние криопротекторов: глицерина, ПЭО-400 и ОЭГ л-5, на митотический режим культивируемых клеток периферической крови человека и фибробластоподобных клеток китайского хомячка. В результате проведенных исследований установлено снижение митотического индекса, последовательное уменьшение количества бластных клеток, снижение, исчезновение и нарастание относительного числа отдельных стадий митоза. Полученные данные показывают, что исследуемые криопротекторы в 5—10% конечных концентрациях при длительном контакте с клетками задерживают их вступление в митоз и способствуют накоплению метафаз, что свидетельствует об антимиотическом и статмокинетическом действии криопротекторов, носящем обратимый характер после отмывания клеточных культур.

Табл. 2. Библиогр.: 5 назв.

УДК 57.043.612.112.014.41

Ультраструктура лейкоцитов крови после инкубации с полиэтиленоксидом-400 и оксиэтилированным глицерином / Говоруха Т. П., Скорняков Б. А. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 9, с. 25—29.

Проведено ультраструктурное изучение лейкоцитов при эквilibрации с ПЭО-400 и ОЭГ. Результаты исследования показали, что ультраструктура лейкоцитов, инкубированных в ЦОЛИПК-76 при $+4^{\circ}\text{C}$, 24 ч, близка к нативной. При взаимодействии с криопротекторами ПЭО-400 и ОЭГ в течение 30 мин при $+4^{\circ}\text{C}$ наблюдаются набухание и разрушение крист митохондрий, складчатости цитоплазматической мембраны с образованием микроворсинок, расширение и частичная вакуолизация эндоплазматического ретикулума. Одной из особенностей эквilibрации с ПЭО-400 является заметное появление числа просветленных клеток, а с ОЭГ — увеличение перинуклеарного пространства. Представлены возможные механизмы повреждения лейкоцитов при действии на них криопротекторов.

Ил. 3. Библиогр.: 11 назв.

УДК 57.043.517:576.314:612.014.43

Термодинамическая модель пассивного переноса многокомпонентной жидкости через замкнутую избирательно проницаемую мембрану / Гордиенко Е. А., Гордиенко О. И., Иткин Ю. А. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 9, с. 29—36.

Построена физико-математическая модель, описывающая процессы массопереноса многокомпонентной жидкости через избирательно проницаемую мембрану. Приведенная в работе система уравнений может быть использована для описания процессов обезвоживания и изменения состава внутриклеточной среды и трансмембранной разности потенциалов на различных этапах цикла низкотемпературного консервирования.

Библиогр.: 9 назв.

УДК 57.043.615.9

Сравнительное исследование токсичности этиленгликоля, α -пропиленгликоля и глицерина / Гучок М. М., Гучок В. М., Мазалов В. К. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 9, с. 36—43.

В острых опытах на белых крысах и мышах установлено, что α -пропиленгликоль при внутривенном и внутрибрюшинном введении в зависимости от способа выражения токсичности, концентрации вещества и пути его введения менее токсичен, чем этиленгликоль и глицерин соответственно в 1,72—4 раза и 1,68—3,25 раза. Неразбавленный глицерин в 1,57—2,34 раза менее токсичен этиленгликоля. Токсичность 20%-ных растворов глицерина и этиленгликоля для крыс и мышей при обоих путях введения веществ приблизительно одинакова.

Выносимость кроликов к α -пропиленгликолю в 2,0—2,4 раза выше, чем к глицерину при введении 20%-ных растворов в вену.

Различия токсичности этиленгликоля, α -пропиленгликоля и глицерина в зависимости от вида и пола животных в ряду мыши, крысы, кролики не выражены.

Ил. 1, табл. 3. Библиогр.: 16 назв.

УДК 57.043:581

Криорезистентность зародышей семян фасоли / Мануильский В. Д., Пушкарь Н. С., Манк В. В., Сытник К. М. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 9, с. 43—47.

Проведено изучение криорезистентности зародышей фасоли при замораживании до температуры жидкого азота (-196°C). Установлено, что при увеличении влажности до 30% зародыши семян сохраняют жизнеспособность, а при более высоких уровнях содержания воды гибнут после замораживания. Интенсивность спектров ЯМР и термограммы охлаждения и отогрева свидетельствуют о том, что при влажности выше 30% одной из причин гибели зародышей является образование кристаллов льда в образце. Обсуждаются другие причины, обуславливающие потерю жизнеспособности зародышей фасоли при замораживании до температуры жидкого азота.

Ил. 3. Библиогр.: 12 назв.

УДК 57.043:548.0:661.073.585

Влияние ряда криопротекторов на процесс зародышеобразования льда в плазме крови человека / Новиков А. Н., Пичугин Ю. И., Кулешова Л. Г. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 9, с. 47—50.

Изучено влияние криопротекторов ПЭО-100, глицерина, ДМСО, ПЭО-400, этиленгликоля, ПЭО-1500, ПВП на процесс зародышеобразования льда в плазме крови человека методом оценки кинетики закристаллизовывания мелких капель исследуемого раствора, находящихся в неполярной среде. Из решения уравнения для описания процесса зародышеобразования в каплях эмульсии получено, что процесс зародышеобразования льда в исследуемой системе практически полностью протекает по гетерогенному механизму. Изучено влияние гидратации криопротекторов на частоту гетерогенного зародышеобразования.

Ил. 1. Табл. 3. Библиогр.: 7 назв.

УДК 57.043.617.713.089.843:535.37

Иммунолюминесцентное исследование роговицы кролика после частичной сквозной аутотрансплантации / Репко О. В. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 9, с. 51—54.

Представлены результаты исследования связанных иммуноглобулинов роговицы методом люминесцирующих антител в различные сроки после частичной сквозной аутотрансплантации. Показано, что нарушение гематоофтальмического барьера является неантигенным фактором, вызывающим аутоиммунную реакцию, что демонстрируется повышением содержания иммуноглобулинов в различных слоях роговой оболочки.

Ил. 3. Библиогр.: 13 назв.

УДК 57.043

Проблема автоматизированной обработки данных электронно-микроскопических исследований / Черепнев А. С. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 9, с. 54—60

Рассмотрены задачи автоматизированной обработки электронно-микроскопической информации. Предлагается, используя структурно-аналитический метод, классифицировать повреждения ультраструктуры клетки при медленном охлаждении до различных температур.

Ил. 2. Библиогр.: 4 назв.

УДК 57.043:576.3.355

Митотический режим культивируемых клеток СПЭВ после длительного хранения при -196°C под защитой ДМСО / Белоконов В. С., Герус Г. Б., Берус П. Т., Глушко Т. А., Маркова О. П. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 9, с. 61—64.

Изучено влияние процесса замораживание-размораживание и различных сроков хранения при -196°C перевиваемых клеток культуры СПЭВ в среде с 10%-ным ДМСО. Установлено, что клетки СПЭВ криолабильны, могут подвергаться долгосрочному криоконсервированию. Наблюдаемые в первые часы роста реконсервированных клеток изменения — снижение митотического индекса, торможение образования моно-слоя, изменения соотношения фаз митоза, увеличение количества патологических митозов — не зависят от сроков хранения и имеют обратимый характер. Митотический режим и морфологические особенности, характерные для нормальной культуры клеток СПЭВ, восстанавливаются в процессе первых трех пересевов после реконсервации.

Табл. 2. Библиогр.: 6 назв.

УДК 57:536.48.047:538.12:615.387

Влияние магнитного поля на процесс замораживания эритроцитов / Скорняков Б. А., Вишневский В. И., Новиков А. Н., Стусь Л. К., Гордеева Т. Ф. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 9, с. 65—69.

Исследовалось влияние постоянного, квазипеременного, импульсного магнитных полей на процесс замораживания эритроцитов.

Показано, что постоянное, квазипеременное и импульсное магнитные поля изменяют физико-химические свойства суспензий эритроцитов и обуславливают изменения в кинетике процесса их кристаллизации при замораживании.

Ил. 2. Библиогр.: 18 назв.

УДК 57.043.617.7

О влиянии ПЭО-3000 на внутриглазное давление и гемодинамику глаза у кроликов / Бездетко П. А. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 9, с. 70—73.

Изучено влияние полиэтиленоксида с молекулярной массой 3000 на внутриглазное давление и гемодинамику глаза в эксперименте. Установлено, что полиэтиленоксид оказывает на внутриглазное давление гипотензивное действие. При внутривенном введении 20%-ного раствора в дозе 1,5—2,0 г/кг массы животного внутриглазное давление достоверно снижается на 5—6 ч с максимально выраженным эффектом через 30 мин после введения. При пероральном введении 50%-ного раствора в дозе 1,5—2,0 г/кг массы животного офтальмотонус снижается до минимальных цифр через 90 мин после введения и его действие длится более 6 ч. Внутривенное и пероральное введение не влияет на гемодинамические показатели глаза.

Ил. 2. Табл. 2. Библиогр.: 14 назв.

УДК 57.043

Использование включения радиоактивного сульфата как критерия жизнеспособности кожного лоскута после замораживания до -196° в присутствии криопротекторных веществ / Бем Ф., Праус Р., Дворжак Р. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 9, с. 73—76.

Исследовано включение радиоактивного сульфата ($^{35}\text{SO}_4$) в свиной кожный лоскут как тест на его жизнеспособность. При этом выявлено влияние методов обработки кожи, предшествующих ее замораживанию. Установлено, что ДМСО сохраняет более высокий, чем глицерин, уровень включения $^{35}\text{SO}_4$ в свиной кожный лоскут после замораживания до -196°C и последующего размораживания.

Ил. 2. Библиогр.: 22 назв.

УДК 611.77.083:616—089.843

Органное культивирование кожи и его применение в трансплантологии / Волкова Н. А. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 9, с. 77—83.

В обзоре изложены современные представления об особенностях, возможностях и разнообразии органного культивирования кожи человека и некоторых животных как метода научного исследования. Представлены литературные данные о применении кожи, находившейся в условиях органного культивирования, для трансплантологии.

Табл. 1. Библиогр.: 54 назв.

УДК 57.043.616.31—085.832.9—06

Реабилитация больных после криодеструкции патологически измененных тканей пародонта и слизистой оболочки полости рта / Кодола Н. А., Павлик С. А., Центило Т. Д. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 9, с. 84—87.

Стимуляция регенерации слизистой оболочки полости рта после криодеструкции аппаратом «Иней» под воздействием лекарственных средств растительного происхождения — масляные настои зверобоя, календулы, лапчатки прямостоячей была произведена у 93 больных.

Отмечена высокая эффективность применения лекарственных веществ после криодеструкции — сроки заживления сокращены в полтора—два раза.

Табл. 2. Библиогр.: 19 назв.

УДК 57.043:616.36—089.85.832.9

Обоснование криорезекции печени / Коцько Н. И., Шенберг М. Г. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 9, с. 87—91.

Для остановки паренхиматозного кровотечения и желчеистечения при атипических резекциях печени традиционные лигатурные методы сочетались с замораживанием линии отсечения доли печени. На основании полученных данных установлено, что сочетанное использование криохирургии и традиционных методов не сопровождается дополнительным усилением воспалительно-деструктивной реакции ткани печени на травму, обеспечивает хороший паренхиматозный гемостаз и предотвращает холеррагию.

Ил. 3. Табл. 2. Библиогр.: 8 назв.

УДК 57.043

Криовоздействие на опухоли предстательной железы в условиях инфильтрации новокаином и защиты окружающих тканей и органов растворами криопротекторов / Криворотько В. Ф. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 9, с. 91—95.

Приведены результаты криовоздействия на опухоли предстательной железы при их инфильтрации 0,25—0,5%-ным раствором новокаина, а также при защите окружающих тканей криопротекторами (6%-ный поливинилпирролидон, 15%-ный полиэтиленоксид с M_n 400) и заполнении мочевого пузыря 60%-ным раствором глицерина.

Применение криопротекторов обеспечивало более выраженную анемизацию опухоли, что способствовало более полному ее разрушению за счет повышения градиента температур на границе опухоли и окружающих тканей. Криопротекторы, иницированные в ткани, хорошо предохраняли стенку мочевого пузыря и устьев мочеточников от холодового воздействия.

Табл. 3. Библиогр.: 5 назв.

УДК 57.043:612.135:615.832.9

Нарушение микроциркуляции после локальных температурных воздействий / Сандомирский Б. П., Василевский В. Ю. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 9, с. 96—98.

Представлены данные о нарушениях микроциркуляции после локальных температурных воздействий положительными ($+100^\circ\text{C}$), отрицательными (-146°C) температурами и их сочетанием.

В экспериментах на защечных мешках золотистых хомяков методом контактной биомикроскопии выявлены качественные и количественные различия нарушений местного кровообращения, а также показано, что охлаждение замедляет нарушения перфузии тканей, обусловленные высокими температурами.

Ил. 2. Библиогр.: 9 назв.

УДК 57.043:617.7

Опыт клинического использования роговичных трансплантатов, консервированных при температуре -196°C в полиэтиленоксиде-400 / Чередниченко В. М., Юрченко Т. Н., Шарлай Т. М., Демин А. Л., Бездетко П. А. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 9, с. 98—100.

Представлены клинические результаты 22 тектонических послойных пересадок длительно консервированной при -196°C в 15%-ном растворе ПЭО-400 роговицы. Показаниями служили грыжи, фистулы и дистрофические заболевания роговой оболочки. Операции производились в ургентном порядке. Прозрачное приживление улучшилось у 18 больных. Отдаленные результаты прослежены до 3 лет. Полученные результаты свидетельствуют о пригодности для клинического применения роговицы, длительно консервированной в ПЭО-400 при -196°C .

Библиогр.: 14 назв.

УДК 57.043.621.565.4

Программное охлаждение головного мозга животного через наружные покровы головы / Королев В. В., Скребцов А. И., Син Э., Гайдук О. А. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 9, с. 101—102.

В статье описан макет аппарата, который служит для создания как кранио-церебральной, так и локальной гипотермии при охлаждении мозга через наружные покровы головы и других участков тела человека или животного. Он обеспечивает охлаждение поверхности по заданной программе (с заданными скоростями и стабилизацией температуры в рабочем интервале температур от $+28^{\circ}\text{C}$ до -40°C с дискретностью 1°C). С помощью аппарата возможна отработка методик (алгоритмов), при которых организм имел бы наибольшую толерантность к охлаждению при лечении ряда заболеваний с помощью гипотермии.

Табл. 1. Библиогр.: 3 назв.

UDC 57.043.577:576.347

Mechanisms of the Cell Membrane Cold Injury Development / Belous A. M., Bondarenko V. A. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1981, iss. 9, p. 3—17.

The peculiarities in the development of cell cold injury are shown to be dependent on the temperature and structural properties of cell membranes. The mechanisms of the temperature-dependent changes in the structure and function of cell and subcellular organelle membranes and a hypothesis of cell injury in hypothermic storage and freezing are suggested. The role of water, lipids and lipid-protein complexes is discussed in terms of the mechanism of temperature-dependent changes in biomembranes, and membrane cryoinjuries are considered in terms of biochemical pathology.

6 figs. Refs: 97 titles.

UDC 57.043.576.3.347

The Effect of Antioxidants on the Level of Lipid Peroxidation in Mitochondria Membranes After Freezing-Thawing / Bondarenko V. A., Belous A. M., Dubur G. Ya — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1981, iss. 9, p. 17—22.

The effectiveness of a number of synthetic antioxidants 1,4-DHP (dihydropyridine) derivatives, is studied at slow freezing of rat liver mitochondria to -25°C . Diludine-C in 10^{-3} - 10^{-5} M concentration is shown to be the most effective in preventing the development of peroxidation and degradation of lipids contained in the membranes. It is suggested that antioxidants of this type should be included into the composition of protective compounds used for preservation of biological materials.

3 figs, 2 tables. Refs: 33 titles.

The Character of Cryoprotectant Effect on the Mitotic Rate of Cell Cultures / Glushko T. A. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1981, iss. 9, p. 22—25.

The paper deals with the effect of cryoprotectants, glycerol, PEO-400, OEG $n=5$, on the mitotic rate of human peripheral blood cells and fibroblast-like Chinese hamster cells in culture. The results of the study show a decrease in the mitotic rate, a gradual reduction in the number of blast cells, a decrease, disappearance and an increase in the relative number of individual stages of mitosis. The data obtained demonstrate that the cryoprotectants under investigation in 5-10% final concentrations inhibit the onset of mitosis and promote metaphase accumulation, which testifies to the antimitotic and stathmokinetic effect of the cryoprotectants that is repaired on washing-out the cell suspensions.

2 tables. Refs: 5 titles.

UDC 57.043.612.112.014.41

Blood Leucocyte Ultrastructure After Incubation with Polyethylene Oxide-400 and Oxyethylated Glycerol / Govorukha T. P., Skorniyakov B. A. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1981, iss. 9, p. 25—29.

The ultrastructural research of leucocytes incubated with PEO-400 and OEG at $+4^{\circ}\text{C}$ for 30 min showed the swelling and destruction of mitochondria cristae, wrinkling of cytoplasmic membrane with the formation of microvilli, dilation and partial vacuolization of endoplasmic reticulum. One of the peculiarities of equilibration with PEO-400 is the appearance of a noticeable number of clarified cells, and with OEG — the enlargement of perinuclear space. The ultrastructure of leucocytes incubated in solution TSOLIPK-7b at $+4^{\circ}\text{C}$ for 24 hours is similar to the native one. Possible mechanisms of leucocyte damage by cryoprotectants are discussed.

3 figs. Refs: 11 titles.

UDC 57.043.517:576.314:612.014.43

A Thermodynamic Model of Passive Transfer of a Multicomponent Liquid Through a Closed Membrane with Selective Permeability / Gordienko E. A., Gordienko O. I., Itkin Yu. A. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1981, iss. 9, p. 29—36.

A physicomathematical model is constructed which describes the processes of mass transfer of a multicomponent liquid through a membrane with selective permeability. The system of equations presented in the paper may be used for defining the dehydration processes and changes in the composition of the intracellular medium and in the transmembrane differences of potentials at different stages of the low-temperature preservation cycle.

Refs: 9 titles.

UDC 57.043.615.9

A Comparative Study of Toxicity of Ethylene Glycol, α -Propylene Glycol and Glycerol / Guchok M. M., Guchok V. M., Mazalov V. K. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1981, iss. 9, p. 36—43.

Acute experiments with albino rats and mice show that α -propylene glycol administered intravenously and intraperitoneally (depending on the way of the toxicity manifestation, concentration and the way of administration) is less toxic than ethylene glycol and glycerol (1.72-4 and 1.68-3.25 times, respectively). The toxicity of undiluted glycerol is 1.57-2.34 times as low as that of ethylene glycol. The toxicity of 20% solutions of glycerol and ethylene glycol for rats and mice is almost the same under both ways of administration.

The tolerance of rabbits to α -propylene glycol is 2.0-2.4 times as high as that to glycerol when 20% solutions were administered intravenously.

Differences are not manifested in the toxicity of ethylene glycol, α -propylene glycol and glycerol depending on the species and sex for such animals as mice, rats and rabbits.

1 fig. 3 tables. Refs: 16 titles.

UDC 57.043:581

Cold Resistance of French Bean Seed Germs / Manuilsky V. D., Pushkar N. S., Mank V. V., Sytnik K. M. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1981, iss. 9, p. 43—47.

The cold resistance was studied for French bean germs at freezing to -196°C . It is found that the seed germs survive the freezing if their moisture content is not higher than 30%, at higher percentage of moisture they do not survive. The intensity of NMR spectra as well as the cooling and thawing thermograms show that the formation of ice crystals in the sample is one of reasons of germ death at moisture values higher than 30%. Other causes of French bean germ death at freezing to -196°C are also discussed.

3 figs. Refs: 7 titles.

UDC 57.043:548.0:661.073.585

The Effect of Some Cryoprotectants on Ice Nucleation in Human Blood Plasma / Novikov A. N., Pichugin Yu. I., Kuleshova L. G. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1981, iss. 9, p. 47—50.

The effect of the cryoprotectants PEO-100, PEO-400, glycerol, DMSO, ethylene glycol, PEO-1,500 and PVP on the process of ice nucleation in human blood plasma is studied by the method of evaluating crystallization kinetics of small droplets of the solution under investigation which are in the non-polar medium. Solution of the equation describing the nucleation process in the emulsion droplets shows that the process of ice nucleation in the system under study is of heterogenous character. The effect of cryoprotectant hydration on the rate of heterogenous nucleation is also studied.

1 fig. 3 tables. Refs: 7 titles.

UDC 57.043.617.713.089.843:535.37

Immunoluminescent Investigation of Rabbit Cornea After a Partial Penetrating Autotransplantation / Repko O. V. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1981, iss. 9, p. 51—54.

The bound immunoglobulins of corneas were studied by the method of luminescent antibodies in different periods after a partial penetrating autotransplantation. It is demonstrated that the disturbance of the haemato-ophthalmologic barrier is a non-antigenic factor resulting in an autoimmune response. This is confirmed by an increase in the amount of immunoglobulins in different layers of corneas.

3 figs. Refs: 13 titles.

UDC 57.043

A Problem of Electron Microscopic Data Automatic Processing / Cherepnev A. S. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1981, iss. 9, p. 54—60.

The paper deals with problems of the automatic processing of electron microscopic studies results. It is suggested that damages to cell ultrastructure at slow cooling down to different temperatures should be classified using the structure-analytical method.

3 figs. Refs: 4 titles.

UDC 57.043:576.3.355

The Mitotic Rate of Pig Embryo Cultivated Renal Cells After Prolonged DMSO-Protected Storage at -196°C / Belokon V. S., Gerus G. B., Berus P. T., Glushko T. A., Markova O. P. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1981, iss. 9, p. 61—64.

The effect of the freezing-thawing process and various terms of storage at -196°C is studied as applied to the inoculation cells of the pig embryo renal cell culture protected by 10% DMSO. The cells are found to be cryolabile but able to withstand a prolonged storage. The changes observed in these cells (a reduction in the mitotic rate, the inhibition of monolayer formation, the alteration in the mitotic phase ratio, an increase in the amount of pathologic mitoses) are independent on the terms of storage and are of a reversible character. The mitotic rate and morphological peculiarities characteristic of the normal cell cultures are restored in the process of the first three reinoculations after thawing.

2 tables. Refs: 6 titles.

UDC 57:536.48.047:538.12:615.387

The Magnetic Field Effect on the Process of Freezing of Erythrocytes / Skorniyakov B. A., Vishnevsky V. I., Novikov A. N., Stus L. K., Gordeyeva T. F. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1981, iss. 9, p. 65—69.

The paper deals with the effect of the permanent, quasi-variable and pulsed magnetic field on the process of freezing of red blood cells (RBC).

It is shown that the permanent, quasi-variable and pulsed magnetic fields alter the physicochemical properties of RBC suspensions and cause changes in the kinetics of the crystallization process of these cells at freezing.

2 figs. Refs: 18 titles.

UDC 57.043.617.7

On the Effect of PEO-3,000 on Intraocular Pressure and Hemodynamics of the Eye in Rabbits / Bezdetko P. A. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1981, iss. 9, p. 70—73.

An experimental study of PEO-3,000 effect on the intraocular pressure and hemodynamics of the eye shows that polyethylene oxide has a hypotensive effect on the intraocular pressure. Intravenous administration of 20% solution in a dose of 1.5-2.0 g/kg of animal weight results in a significant reduction of the intraocular pressure for 5-6 hours with the maximum pronounced effect 30 min after administration. At peroral administration of 50% solution in a dose of 1.5-2.0 g/kg a. w. the ophthalmotonus of the animal is reduced to minimum values 90 min after administration and its action lasts for more than 6 hours. The intravenous and peroral administrations do not affect the hemodynamic indices of the eye.

2 figs. 2 tables. Refs: 14 titles.

UDC 57.043

The Use of Radioactive Sulphate Incorporation as a Criterion of Skin Graft Survival After Freezing to -196°C in the Presence of Cryoprotectants / Böhm F., Praus R., Dvořák R. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1981, iss. 9, p. 73—76.

The incorporation of radioactive sulphate ($^{35}\text{SO}_4$) into the porcine skin graft is studied as a test of its viability. The effect of skin treatment before freezing is also investigated. It is shown that DMSO preserves a higher level of $^{35}\text{SO}_4$ incorporation into the porcine skin graft after freezing to -196°C and subsequent thawing than glycerol does.

2 figs. Refs: 22 titles.

UDC 611.77.083:616-089.843

Organ Cultivation of Skin and Its Application in Transplantology / Volkova N. A. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1981, iss. 9, p. 77—83.

Modern ideas of the peculiarities, possibilities and modifications of culturing human and animal skin as a whole organ are discussed. The experience of the application of skin preserved by the organ culture technique in transplantology is reviewed.

1 table. Refs: 54 titles.

UDC 57.043.616.31—085.832.9—06

Rehabilitation of Patients After Cryodestruction of Pathologically Changed Tissues of Parodontium and Mucosa of Oral Cavity / Kodola N. A., Pavlik S. A., Tsentilo T. D. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1981, iss. 9, p. 84—87.

The stimulation of oral mucosa regeneration after cryodestruction with a home-made «Iney» apparatus under conditions of drug plant treatment with oily infusions of St. John's-wort, calendula and *Potentilla tormentilla* Neck was observed in 93 patients.

A high efficiency of plant application after cryodestruction is emphasized; the period of healing is 1.5-2 times reduced.

2 tables. Refs: 19 titles.

UDC 57.043:616.36—089.85.832.9

Argumentation in Favour of Hepatic Cryoresection / Kotsko N. I., Shenberg M. G. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1981, iss. 9, p. 87—91.

The traditional ligature technique together with freezing along the line of liver lobe resection was employed to stop parenchymatous bleeding and bile outflow in cases of atypical hepatic resections. It is shown that a combined employment of cryosurgical and traditional methods does not cause an additional increase in the inflammatory-destructive response of liver tissue to the trauma, but results in a good parenchymatous hemostasis and prevents cholerrhagia.

3 figs. 2 tables. Refs: 9 titles.

UDC 57.043

Cryodestruction of Prostatic Tumours Under Conditions of Infiltration with Novocain and Protection of Surrounding Tissues and Organs with Cryoprotectant Solutions / Krivorotko V. F. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1981, iss. 9, p. 91—95.

The paper is concerned with the results of cryodestruction of prostatic tumours under conditions of their infiltration with 0.25-0.5% novocain solution and protection of surrounding tissues by means of different cryoprotectants (6% PVP, 15% PEO-400) and filling of the urinary bladder with 60% glycerol solution.

The employment of cryoprotectants resulted in a more pronounced anemization of the tumour, that promoted its more complete destruction due to an increase in the temperature gradient on the boundary between the tumour and surrounding tissues. Cryoprotectants injected into the tissues protected the wall of the urinary bladder and ostium ureteris against cold damage.

3 tables. Refs: 6 titles.

UDC 57.043:612.135:615.832.9

Microcirculation Disturbances Resulted from Local Temperature Effects / Sandomirsky B. P., Vasilovsky V. Y. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1981, iss. 9, p. 96—98.

The paper deals with the data on microcirculation disturbances after local application of positive (+100°C) and negative (−146°C) temperatures and their combined action. Contact biomicroscopy of golden hamster pouches revealed quantitative and qualitative differences in disturbances of local circulation and showed that cooling retarded disturbances of tissue perfusion resulted from high temperatures.

2 figs. Refs: 9 titles.

UDC 57.043:617.7

Clinical Application of Cornea Grafts Preserved at −196°C with Polyethylene Oxide-400 / Cherednichenko V. M., Yurchenko T. N., Sharlay T. M., Demin A. L., Bezdetsko P. A. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1981, iss. 9, p. 98—100.

Clinical results of 22 tectonic graftings of corneas stored at −196°C in 15% solution of PEO-400 for a long time are discussed. Corneal hernias, fistulas and dystrophies were the indications for such operations performed on emergency. The transparent survival was obtained in 8 patients, the semitransparent — in 11 patients, and the opaque one — in 3 patients. In 18 patients the vision improved. The remote results are observed for the time up to three years. The data obtained demonstrate the clinical efficiency of corneas preserved with PEO-400 at −196°C for a long time.

Refs: 14 titles.

UDC 57.043.621.565.4

Programmed Cooling of the Brain of Animals Through Outer Coverings of the Head / Korolev V. V., Skrebtsov A. I., Sin E., Gaiduk O. A. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1981, iss. 9, p. 101—102.

The paper deals with a description of the model of an apparatus for imitating the craniocerebral and local hypothermia by cooling the brain through external coverings of the head and other sites of human or animal body. It permits cooling of the surface according to a predetermined programme (with predetermined rates and temperature stabilization in the working temperature range from $+28^{\circ}$ to -40°C with discreteness of 1°C). The apparatus also allows the technique (algorithm) to be worked out at which the organism would have the highest tolerance to cooling at hypothermic treatment of some diseases.

1 table. Refs: 3 titles.



1 руб. 60 коп.

«НАУКОВА ДУМКА»

Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 9, 1—112 с.