

ISSN 0233-7673

КРИОБИОЛОГИЯ

3|85



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Грищенко В. И. (главный редактор), Белоус А. М. (зам. гл. редактора)
Благой Ю. П., Бразников А. М., Бутенко Р. Г., Вепринцев Б. Н.,
Гольданский В. И., Луговой В. И., Осташко Ф. И., Панков Е. Я.,
Пирузян Л. А., Пушкарь Н. С., Сandomirский Б. П., Снурников А. С.,
Сытник К. М., Утевский А. М., Федотенков А. Г., Цуцаева А. А.,
Шумаков В. И., Юрченко Т. Н.

EDITORIAL BOARD

Grishchenko V. I. (Editor-in Chief), Belous A. M. (Associated Editor),
Blagoj Yu. P., Brazhnikov A. M., Butenko R. G., Veprintsev B. N.,
Goldansky V. I., Lugovoj V. I., Ostashko F. I., Pankov E. Ya.,
Piruzyan L. A., Pushkar N. S., Sandomirsky B. P., Snurnikov A. S.,
Sytnik K. M., Utevsky A. M., Fedotenkov A. G., Tsutsayeva A. A.,
Shumakov V. I., Yurchenko T. N.

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Аксенов С. И. (Москва), Бакрадзе Н. Г. (Тбилиси), Бекер М. Е. (Рига),
Белошицкий П. В. (Киев), Гродзинский Д. М. (Киев), Запорожан В. Н. (Одесса),
Калакуцкий Л. В. (Пушино, Моск. обл.), Курбатов А. Д. (Ленинград),
Наер В. А. (Одесса), Никитин В. А. (Харьков), Пинаев Г. П. (Ленинград),
Сергеев Г. Б. (Москва), Соловьева М. А. (Киев), Соломонов Н. Г. (Якутск),
Тимофеев Н. Н. (Москва), Чередниченко В. М. (Харьков), Шенталь В. В. (Москва),
Эмирбеков Э. З. (Махачкала).

EDITORIAL COUNCIL

Aksenov S. I. (Moscow), Bakradze N. G. (Tbilisi), Beker M. E. (Riga),
Beloshitsky P. V. (Kiev), Grodzinsky D. M. (Kiev), Zaporozhan V. N. (Odessa),
Kalakutsky L. V. (Pushchino, Moscow region), Kurbatov A. D. (Leningrad),
Naer V. A. (Odessa), Nikitin V. A. (Kharkov), Pinayev G. P. (Leningrad),
Sergeyev G. B. (Moscow), Solovyova M. A. (Kiev), Solomonov N. G. (Yakutsk),
Timofeyev N. N. (Moscow), Cherednichenko V. M. (Kharkov), Shental V. V. (Moscow),
Emirbekov E. Z. (Makhachkala).

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ОТДЕЛЕНИЕ ФИЗИОЛОГИИ

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ
И ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

КРИОБИОЛОГИЯ

3 1985

НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ОСНОВАН В 1985 ГОДУ
ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

КИЕВ НАУКОВА ДУМКА 1985

СОДЕРЖАНИЕ

ШУМАКОВ В. И., ОНИЩЕНКО Н. А., КИРПАТОВСКИЙ В. И., ЛУБЯКО А. А. Значение фармакологической адаптации к низким температурам при консервации органов в условиях гипотермии и глубокого замораживания	3
ШРАГО М. И., НОВИКОВ А. Н., ХАНИНА Л. А., ЛИННИК Т. П., КОМПАНИЕЦ А. М., БРЕДИХИНА Л. П., ОЛЕЙНИК С. Т. Криопротекторы и криоконсерванты (основные направления исследований)	8
КУРБАТОВ А. Д. Низкотемпературное хранение спермы птиц	13
ВОРОТИЛИН А. М. Замораживание клеток крови до —196 °С под защитой низкомолекулярных гликолей и глицерина. Повышение эффективности криоконсервации	15
ЦЫМБАЛ Л. В., ГАВРИЛОВА И. И., МОИСЕЕВ В. А. Исследование влияния полиспиртов на динамическую структуру биологических мембран методом спиновых зондов	20
ГУЛЕВСКИЙ А. К., РЯЗАНЦЕВ В. В., БЕЛОУС А. М. Транспот одновалентных катионов в эритроцитах при инкубации в защитных средах	24
ГАВРИЛЮК Б. К. Устойчивость к пониженной температуре культур клеток и тканей, выделенных из органов зимоспящих животных	28
РУДЕНКО С. В. Нарушение планарной упаковки плоского липидного бислоя при взаимодействии с глицерином	30
БОЙКО Н. М. Влияние тоничности среды и температуры на свойства клеточной поверхности	32
КУРАКСА В. М. Определение повреждения эритроцитов в герметичных контейнерах объемом 150 и 300 мл	35
ГОЛЬЦЕВ А. Н., ЦУЦАЕВА А. А., ДУБРАВА Т. Г., ОСТАНКОВА Л. В. Функциональная активность КОЕ _с консервированного костного мозга, обработанного оксимо-чевиной и ³ Н-тимидином	38
ГОРДИЕНКО Е. А., ВОИНОВА М. В. Физико-математическая модель латерального перераспределения липидов при изотермической деформации замкнутой бислойной мембраны	43
КАПРЕЛЬЯНЦ А. С., СЛОБОДСКОЙ Р. Б., ПАНКОВ Е. Я., САМОЙЛЕНКО Ю. Б., КИДАНОВ Ю. А. Новая система для компьютерной стереометрии тканевых, клеточных и субклеточных элементов	48
КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ	
ЛОЕВСКИЙ М. М. Особенности транспорта катионов в размороженных клетках	50
НИКОЛЕНКО А. В. Низкотемпературное консервирование тромбоцитов под защитой соединений ряда амидов	51



МХИТАРЬЯНЦ А. М. К обоснованию положений медико-технических требований к криоинструментам	52
Рефераты	54

CONTENTS

SHUMAKOV V. I., ONISHCHENKO N. A., KIRPATOVSky V. I., LUBYAKO A. A. Significance of pharmacologic adaptation to low temperatures during organ preservation under conditions of hypothermia and deep freezing	3
SHRAGO M. I., NOVIKOV A. N., KHANINA L. A., LINNIK T. P., KOMPANIETS A. M., BREDIKHINA L. P., OLEYNIK S. T. Cryoprotectants and cryoconservants (basic approaches)	8
KURBATOV A. D. Cryopreservation of fowl semen	13
VOROTILIN A. M. Blood cell freezing to -196°C under protection of low molecular weight glycols or glycerol. Increasing the efficiency of cryopreservation	15
TSYMBAL L. V., GAVRILOVA I. I., MOISEYEV V. A. Examination of the effect of polyalcohols on the dynamic structure of biological membranes using spin probes	20
GULEVSKY A. K., RYAZANTSEV V. V., BELOUS A. M. Transport of monovalent cations in erythrocytes during incubation in protective media	24
GAVRILUK B. K., Resistance of cultures of cells and tissues isolated from hibernator's organs to low temperatures.	28
RUDENKO S. V. Perturbations in packing a planar lipid bilayer induced by glycerol	30
BOYKO N. M. The effect of medium tonicity and temperature on the properties of cell surface	32
KURAKSA V. M. Estimation of erythrocyte damage in sealed containers of 150 ml and 300 ml	35
GOLTSEV A. N., TSUTSAYEVA A. A., DUBRAVA T. G., OSTANKOVA L. V. Functional activity of CFU _s of preserved bone marrow treated with oxyurea and ^3H -thymidine	38
GORDIENKO E. A., VOINOVA M. V. Physico-mathematical model of lateral redistribution of lipids in a closed bilayer membrane subjected to isothermal deformation	43
KAPRELYANTS A. S., SLOBODSKOY R. B., PANKOV E. Ya., SAMOYLENKO Yu. B., KIDANOV Yu. A. A new system for computer stereometry of tissue, cellular and sub-cellular elements	48
<i>SHORT COMMUNICATIONS</i>	
LOYEVSKY M. M. Peculiarities of cation transport in thawed cells	50
NIKOLENKO A. V. Low temperature preservation of thrombocytes under protection of amide series compounds.	51
MKHITARYANTS A. M. To the substantiation of regularities of medical and technical requirements for cryoinstruments	52
Abstracts	54

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

Научные редакторы В. И. ЛУГОВОЙ, А. С. СМУРНИКОВ
Ответственный секретарь редакции Ф. А. ПРИХОДЬКО
Редактор З. В. ЛИНЕВИЧ
Технический редактор В. Н. ВОЛКОВА

Сдано в набор 23.05.85. Подписано в печать 04.07.85. БЦ 16928. Формат $70 \times 108/16$.
Уч.-изд. л. 5,53. Усл. краскоот. 5,60. Усл. печ. л. 4,90 Тираж 1000 экз. Заказ № 5-1219.

Отпечатано с матриц Харьковской книжной фабрики им. М. В. Фрунзе в Харьковской городской типографии № 16
310003, Харьков, Университетская, 16. Зак. 1124.

В. И. Шумаков, Н. А. Онищенко, В. И. Кирпатовский, А. А. Лубяко

ЗНАЧЕНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АДАПТАЦИИ К НИЗКИМ ТЕМПЕРАТУРАМ ПРИ КОНСЕРВАЦИИ ОРГАНОВ В УСЛОВИЯХ ГИПОТЕРМИИ И ГЛУБОКОГО ЗАМОРАЖИВАНИЯ

Гипотермия ($0 \div +10^\circ\text{C}$) является эффективным фактором защиты изолированных органов от ишемического повреждения перед трансплантацией. Однако наряду с положительным влиянием (снижение термодинамической нестабильности тканей) гипотермия оказывает и неблагоприятное воздействие на ткани изолированных органов, особенно при их длительном хранении.

В основе повреждающего действия гипотермии лежат температурозависимые фазовые переходы в макромолекулярных структурах белок—липид—вода [1, 13, 14], вызывающие дискоординацию метаболических процессов в клетках, нарастание гипоксии в тканях и их повреждение. Ослабление приспособительных реакций в изолированном органе из-за нарушения регуляторных связей и ограниченного запаса необходимых субстратов способствует ускоренному расходованию энергетических резервов клетки, что еще более сокращает сроки гипотермического хранения органов [5]. В результате сроки допустимой консервации в условиях гипотермии не превышают 24 ч для сердца и 72 ч для почек [3, 7, 9, 10].

В последние годы все большее внимание привлекает к себе изучение возможностей метода низкотемпературного хранения изолированных органов [11, 12], который позволяет снизить скорость метаболизма в клетках. Однако до настоящего времени не удается добиться надежного сохранения жизнеспособности целого органа при замораживании из-за обширного повреждения клеточных структур в результате изменения фазового состояния воды (кристаллизации), составляющей около 80 % массы клетки.

Для уменьшения повреждающего действия низких температур используют консерванты, содержащие мембраностабилизирующие, энзимомодифицирующие и криопротекторные соединения, которые способствуют адаптивной перестройке клеточных структур [3, 6]. Для усиления защитного действия консервантов нами широко применяется и совершенствуется комплексный метод подготовки органов к низкотемпературной консервации, включающий предварительную фармакологическую подготовку организма донора с целью создания благоприятных энергетических условий для выработки приспособительных реакций в клетках, сообщающих им повышенную устойчивость к низким температурам.

Настоящая работа посвящена исследованию возможностей комплексного использования криопротекторов и консервантов для предварительной подготовки донорских органов при их гипотермическом хранении и замораживании.

Эксперименты проводили на почках и сердцах крыс и собак. Для гипотермической консервации органы промывали охлажденным ионсбалансированным гиперкалиевым раствором [6]. Функциональное состояние сердца изучали по сократимости полоски миокарда или по динамике нарастания напряжения покоя миокарда [2], почек, после их аутотрансплантации на подвздошные сосуды, — по степени восстановления почечного кровотока, регистрируемого с помощью электромагнитного флуориметра «Nihon Kohden».

В почках исследовали азотовыделительную функцию, концентрацию молочной кислоты, адениннуклеотидов, активность ферментов лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и глутаматдегидрогеназы (ГлДГ) с помощью наборов реактивов фирмы «Boehringer» и содержание K^+ и Na^+ в тканях методом пламенной фотометрии.

В экспериментах по криоконсервации почек крыс в части опытов готовили срезы толщиной 1 мм и инкубировали их в растворе НИИТиО-2 [6] с добавлением различных концентраций диметилсульфоксида (ДМСО) при $0-4^\circ C$ в течение 4 ч. В других опытах выделяли почки блоком с аортой и нижней поллой веной и через катетер, введенный в дистальную часть аорты, проводили их перфузию раствором НИИТиО-2 с постепенным добавлением 10% ДМСО (или без него) в течение 30 мин при температуре $+16 \div +18^\circ C$. Почки замораживали со скоростью $1-3^\circ C/\text{мин}$ до $-60^\circ C$ и через 30—60 мин отогревали в водяной бане при $+40^\circ C$. После оттаивания почки перфузировали 30—45 мин раствором НИИТиО-2 с добавлением 750—800 мМ маннитола, постепенно снижая его концентрацию до осмолярности раствора 290—300 мосм/л. Степень развившегося повреждения оценивали по тем же показателям метаболизма, что и в опытах с гипотермической консервацией, а также по изменению внелизосомальной активности ДНКазы II в ткани почек [4] и по интенсивности хемилюминесценции перфузата. Животным вводили ДМСО в дозе 0,5—1,0 г/кг за 1—24 ч до эксперимента. Защитное действие ДМСО сравнивали с защитным действием α -токоферола, применяемого в дозе 200 мг/кг за 4—6 ч до опыта. Статистическую обработку проводили по методу Стьюдента.

Комплексное использование криопротекторов при гипотермической консервации. В настоящей работе нами изучены возможности применения ДМСО в растворах для защиты органов при гипотермическом хранении. Выяснилось (табл. 1), что увеличение содержания ДМСО в консервирующем раст-

Таблица 1. Влияние введения ДМСО в консервирующий раствор на метаболизм почек, консервированных 24 ч бесперфузионным методом при $0 \div 4^\circ C$

Показатель	Почки	Срок консервации, ч	Содержание ДМСО в растворе, %				
			0	0,5	2	4	6
Концентрация лактата в ткани, мкмоль/г	крыс	0	91 ± 7	—	—	—	—
		24	218 ± 22	—	$181 \pm 14^*$	237 ± 32	$190 \pm 13^*$
	собак	0	67 ± 6	—	—	—	—
		24	150 ± 11	128 ± 10	—	—	—
в консервирующем растворе, ммоль/л	крыс	0	$15,75 \pm 1,12$	—	$15,61 \pm 1,35$	$14,88 \pm 1,70$	$11,01 \pm 0,72^*$
		24	$2,61 \pm 0,18$	$2,25 \pm 0,16^*$	—	—	—
	собак	0	$1,25 \pm 0,10$	$1,56 \pm 0,07^*$	—	—	—
		24	$4,76 \pm 0,38$	$4,08 \pm 0,31$	—	—	—
Концентрация адениннуклеотидов, мкмоль/г	крыс	0	$2,94 \pm 0,15$	$3,63 \pm 0,29^*$	—	—	—
		24	$2,94 \pm 0,15$	$3,63 \pm 0,29^*$	—	—	—
суммарное содержание	крыс	0	$4,76 \pm 0,38$	$4,08 \pm 0,31$	—	—	—
		24	$2,94 \pm 0,15$	$3,63 \pm 0,29^*$	—	—	—
Активность ЛДГ перфузата, МЕ/г/л.	крыс	0	456 ± 51	—	314 ± 30	299 ± 63	$221 \pm 31^*$
		24	166 ± 10	$86 \pm 7^*$	—	—	—

Примечание. Достоверность разницы результатов — * $p < 0,05$, — не определяли воре от 0 до 6 % при 24-часовой консервации почек крыс оказывает возрастающее защитное действие. При этом в почке снижается содержание молочной кислоты, а также выход ЛДГ и лактата в перфузат. В опытах на почках собак выраженный защитный эффект был обнаружен уже при концентрации ДМСО в перфузате 0,5 %. При этом через 24 ч также достоверно уменьшалось накопление тканевого лактата, тормозился распад адениннуклеотидов

в почечной ткани и выход ЛДГ в перфузат. Однако при реваскуляризации таких почек скорость кровотока в них существенно снижалась, составляя через 30 минут реперфузии 25 % от исходного уровня (рис. 1). Причиной снижения скорости кровотока в консервированных почках, очевидно, является более медленное вымывание ДМСО из почечной ткани, что приводит к повышению тканевого осмотического давления и отеку органа. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что положительный эффект криопротекторов на метаболические и гемодинамические характеристики консервируемых органов проявляется при добавлении их в консервант в низких концентрациях. Однако при снижении концентрации криопротектора уменьшается защитное действие консервирующего раствора, поэтому для усиления эффекта криозащиты мы предварительно вводили донору адаптирующую дозу криопротектора или мембранотропного препарата.

Нами установлено, что после предварительной подготовки донора преднизолоном, лидокаином, α -токоферолом или тренталом можно добиться снижения температуры фазовых переходов в тканевых макромолекулярных структурах за счет изменения состава клеточных липидов (накопления непредельных жирных кислот), а также энергозависимой перестройки клеточного метаболизма [6]. Поэтому предварительная активация адаптивных приспособительных клеточных реакций с помощью мембранотропных соединений способствует повышению резистентности клеток к гипотермическим условиям консервации.

В опытах на сердцах крыс установлено, что ишемическая контрактура миокарда при гипотермической ($+16^\circ\text{C}$) консервации сердца развивается медленнее всего в том случае, когда донору предварительно вводят ДМСО и в последующем иссеченное сердце сохраняют в кардиоплегическом растворе с 0,2 % ДМСО (рис. 2).

В литературе в последнее время появились сообщения о целесообразности добавления криопротекторов в консервирующие растворы при гипотермической консервации органов. Отмечено увеличение клиренса креатинина почек кролика, консервированных 4 и 24 ч методом гипотермической перфузии при добавлении в перфузат глицерина или пропиленгликоля в концентрации 0,3 М [8]. Достигнута высокая сохранность функционального состояния сердца после 24 ч гипотермической консервации перфузирующим раствором, который содержал глицерин в концентрации 0,136 М [10].

Наши исследования показывают, что предварительной подготовкой донора криопротекторами можно ослабить их неблагоприятные эффекты в консерванте и, очевидно, за счет этого усилить защитное действие при использовании гипотермических способов консервации.

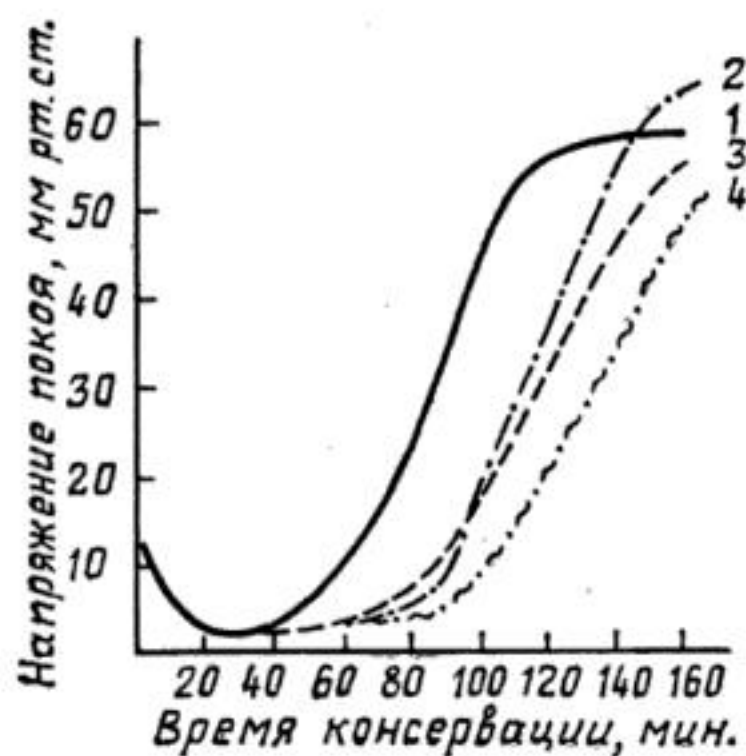


Рис. 2. Изменение напряжения покоя миокарда при кардиоплегической остановке сердца ($+16^\circ\text{C}$) без (1) и на фоне предварительной подготовки миокарда ДМСО, 1 г/кг, (2), α -токоферолом, 200 мг/кг (3), а также сочетанного введения ДМСО, 1 г/кг, и добавления 0,2 % ДМСО в консервирующий раствор (4).

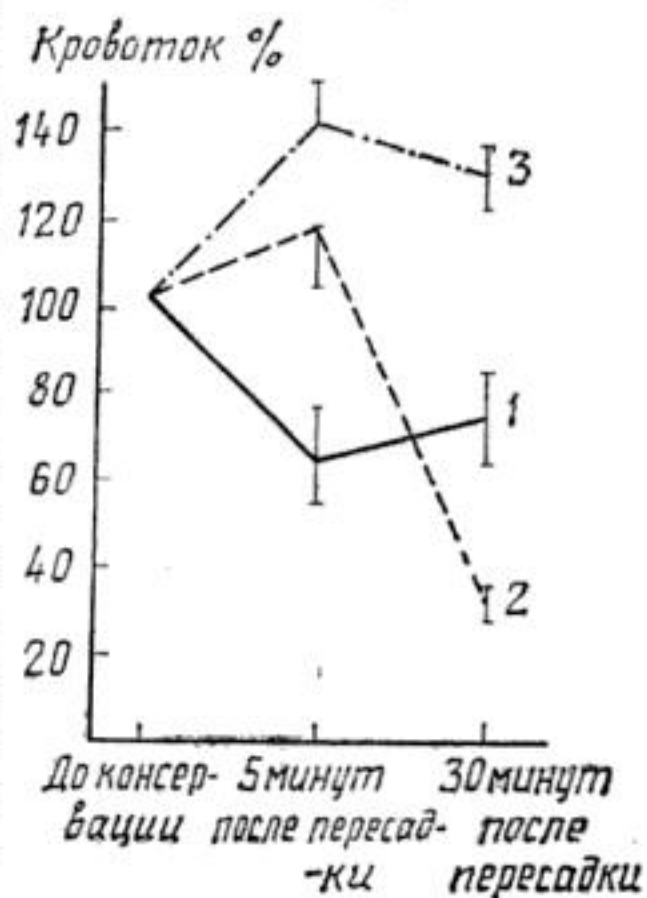


Рис. 1. Динамика кровотока через почки собак, ауто-трансплантированные после 24-часовой бесперфузионной гипотермической консервации. 1— в растворе НИИТиО—2; 2— в растворе НИИТиО—2 с 0,5 % ДМСО; 3— в растворе НИИТиО—2 с предварительным введением донору ДМСО 1 г/кг за 3 часа до опыта.

Комплексное использование криопротекторов при криоконсервации. Вопрос о фармакологическом усилении эффективности средств защиты органов от криоповреждения практически не изучен. В условиях субнулевых темпе-

Таблица 2. Влияние предварительного введения ДМСО животным на показатели клеточного повреждения при инкубации срезов почки крысы в растворе с разной концентрацией криопротектора в течение 4 ч при $0 \div 4^\circ\text{C}$

Показатель	Без введения ДМСО					С введением ДМСО				
	Концентрация ДМСО в растворе, %					Концентрация ДМСО в растворе, %				
	0	10	20	30	50	0	10	20	30	50
Концентрация лактата в ткани, мкмоль/г	92 ± 3	96 ± 3	90 ± 6	—	—	82 ± 6	—	71 ± 5	—	—
Концентрация лактата в растворе, ммоль/л	$5,6 \pm 0,4$	$7,0 \pm 0,3^*$	$11,7 \pm 0,8^{**}$	—	—	$4,0 \pm 0,3$	—	$4,0 \pm 0,4$	—	—
Активность ЛДГ в растворе, МЕ/г/л	113 ± 5	—	$231 \pm 55^*$	$218 \pm 6^{**}$	—	118 ± 12	—	165 ± 21	—	—
Активность ДНКазы II в ткани, мкмоль АМФ/г/мин	$0,24 \pm 0,08$	$0,83 \pm 0,11^{***}$	$1,63 \pm 0,09^{***}$	$0,91 \pm 0,16^{***}$	$0,944 \pm 0,19^{***}$	$0,32 \pm 0,07$	$0,34 \pm 0,13$	$0,32 \pm 0,09$	$0,21 \pm 0,08$	—

Примечание. Достоверность разницы результатов — * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; — не определяли

ратур насыщение органа криопротектором позволяет несколько уменьшить степень развивающегося повреждения. Однако высокие концентрации препаратов, которые приходится для этого использовать, сами по себе оказы-

Активность ДНК-азы II
мкмоль АМФ/г/мин

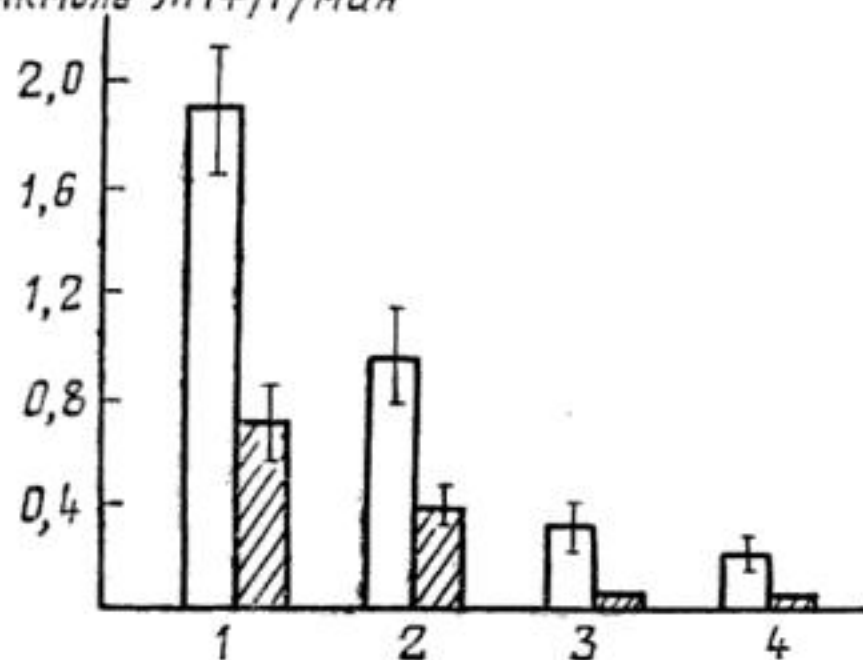


Рис. 3. Влияние предварительного введения крысам ДМСО (1 г/кг) на активность ДНКазы II после замораживания — отогрева почек. □ — ткань почки; ■ — консервирующий раствор. 1 — замораживание без защиты; 2 — замораживание под защитой 10 % ДМСО в консерванте; 3 — замораживание на фоне предварительного введения ДМСО; 4 — замораживание в условиях предварительного введения ДМСО донору и добавления 10 % ДМСО в консервант.

макологической подготовки. Защитный эффект проявлялся как при замораживании в присутствии 10 % ДМСО, так и без криопротектора (рис. 3).

При замораживании целых почек крыс предварительное введение α -токоферола значительно уменьшало степень метаболических расстройств, развивающихся после отогрева органов: уменьшался выход ГлДГ в перфузат,

оказывают токсическое действие. Наши эксперименты на срезах почек крыс показали, что уменьшить токсическое действие высоких концентраций криопротекторов можно путем предварительного введения донору ДМСО в дозе 0,5—1,0 г/кг, после чего уменьшается накопление молочной кислоты и выход ее в окружающий раствор, уменьшается также выход ДНКазы II за пределы лизосом и ЛДГ — за пределы клетки (табл. 2).

Предварительное введение ДМСО или других фармакологических препаратов уменьшает и степень низкотемпературного повреждения. При замораживании срезов почек крыс, которым предварительно вводили ДМСО (1 г/кг) за 24 ч до опыта, внелизосомальная активность ДНК-азы II после отогрева увеличивалась в значительно меньшей степени, чем в опытах без фар-

сохранялась более высокая концентрация K^+ и Na^+ в ткани, в меньшей степени менялись перфузионные характеристики почек (табл. 3). При замораживании—оттаивании существенно увеличивалась как спонтанная, так и индуцированная H_2O_2 хемилюминесценция по сравнению с периодом до замораживания. Предварительное введение α -токоферола или обработка почек 10 % раствором ДМСО достоверно снижает интенсивность хемилюминесценции перфузата в период подготовки почек к криоконсервации и препятствует возрастанию ее интенсивности после отогрева. Сочетанное применение обоих видов криозащиты полностью ингибировало этот процесс.

Таблица 3. Влияние предварительного введения α -токоферола на показатели сохранности почек крыс, подвергнутых криоконсервации.

Показатели	Использование криопротектора	Без введения α -токоферола			С введением α -токоферола		
		До замораживания	После отогрева		До замораживания	После отогрева	
			5 мин	30 мин		5 мин	30 мин
Поток перфузии, мл/мин/г сухого веса	—	$4,0 \pm 0,5$	$9,6 \pm 1,2^{**}$	$9,6 \pm 0,7^{**}$	$2,6 \pm 0,3$	$6,3 \pm 0,7^*$	$7,2 \pm 0,6^{**}$
	+	$2,8 \pm 0,9$	$9,6 \pm 2,1^*$	$7,5 \pm 2,0^*$	$2,5 \pm 0,6$	$4,3 \pm 0,5^*$	$5,4 \pm 1,0^*$
Активность ГЛДГ в перфузате, МЕ/мл/мин/г сухого веса	—	$0,015 \pm 0,002$	$0,865 \pm 0,104^{***}$	$0,141 \pm 0,024^{**}$	$0,013 \pm 0,002$	$0,418 \pm 0,051$	$0,087 \pm 0,011^*$
	+	0	$0,531 \pm 0,060^{***}$	$0,095 \pm 0,012^{***}$	$0,007 \pm 0,002$	$0,196 \pm 0,061^{**}$	$0,021 \pm 0,004^*$
Тканевая концентрация K^+ , мэкв/кг	—	$79,2 \pm 2,6$	—	$57,6 \pm 2,1^{***}$	—	—	$65,0 \pm 1,6^{***}$
	+	—	—	$59,3 \pm 1,2^{***}$	—	—	$52,7 \pm 2,2^{***}$
Тканевая концентрация Na^+ , мэкв/кг	—	$71,8 \pm 2,9$	—	$51,9 \pm 2,4^{**}$	—	—	$58,4 \pm 2,0^{***}$
	+	—	—	$52,7 \pm 2,2^{**}$	—	—	$44,0 \pm 3,4^{***}$
Интенсивность спонтанной хемилюминесценции перфузата, имп/мл/мин/г сухого веса	—	436 ± 98	$2544 \pm 682^{**}$	$1404 \pm 347^*$	126 ± 41	798 ± 109	$341 \pm 94^*$
	+	27 ± 5	$628 \pm 355^*$	411 ± 332	5 ± 4	$136 \pm 82^*$	12 ± 10
Интенсивность индуцированной хемилюминесценции перфузата, 10^6 имп/мл/мин/г сухого веса	—	$1,9 \pm 0,2$	$5,8 \pm 1,1^{**}$	$3,3 \pm 0,3^*$	$0,8 \pm 0,1$	$4,8 \pm 0,6^{***}$	$3,3 \pm 1,0^*$
	+	$1,0 \pm 0,3$	$1,4 \pm 0,4$	$1,2 \pm 0,8$	$0,7 \pm 0,3$	$0,7 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,3$

Примечание. Достоверность разницы результатов — * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, — не определяли.

Таким образом, комплексное фармакологическое воздействие на консервируемый орган (введение в организм донора и добавление в консервирующий раствор) позволяет повысить устойчивость его клеток к повреждающему действию низких температур (как положительных, так и отрицательных). Добавление криопротекторов в консервирующие растворы усиливает их защитные свойства при использовании гипотермических методов консервации. Для уменьшения повреждения органа низкими температурами следует продолжить разработку средств и методов более эффективной адаптивной перестройки в системах клеточной гомеостатической регуляции.

1. Кольтовер В. К., Блюменфельд Л. А. Термические конформационные переходы в электропереносащих биологических мембранах. — Биофизика, 1973, 18, № 5, с. 827—833.
2. Лубяко А. А., Кирпатовский В. И., Онищенко Н. А. Механизмы защиты и повреждения миокарда при действии кардиоплегических растворов. — Кардиология, 1983, 23, № 7, с. 51-55.

3. Онищенко Н. А., Медикаментозная противошоковая защита почек при трансплантации: Автореф. дисс... д-ра мед.-наук.— М., 1938.— 42 с.
4. Покровский А. А., Арчаков А. И., Любимцева О. Н. Особенности солиubilизации ферментов лизосом и саркоплазматической сети сердца крыс.— Биохимия, 1967, 32, вып. 5, с. 824—827.
5. Хаскин В. В. Энергетика теплообразования и адаптация к холоду.— Новосибирск: Наука, 1975.— 200 с.
6. Шумаков В. И., Онищенко Н. А., Курпатовский В. И. Фармакологическая защита трансплантата.— М.: Медицина, 1983.— 232 с.
7. Belzer F. O., Hoffman N. M., Miller D. T. et al. A new perfusate for kidney preservation.— Transplant. Proc., 1984, 16, № 1, p. 161—163.
8. Collins G. M., Wicomb W. N., Halasz N. A. Beneficial effect of low concentration of cryoprotective agent on short term rabbit kidney preservation.— Cryobiology, 1984, 21, N 2, p. 246—249.
9. Cooper D. K. C., Wicomb W. N., Boyd S. T. et al. Orthotropic and heterotropic heart transplantation: aspects of the Cape Town experience. — Transplant. Proc., 1983, 15, N 1, p. 1232—1247.
10. Cooper D. K. C., Wicomb W. N., Rose A. G., Barnard C. N. Orthotropic allotransplantation and autotransplantation of baboon heart following 24 hr storage by a portable hypothermic perfusion system.— Cryobiology, 1983, 20, N 4, p. 385—394.
11. Hoffman R. M., Southard J. H., Lutz M. et al. Synthetic perfusate for kidney preservation.— Arch. Surg., 1983, 118, N 1 p. 919—921.
12. Jacobsen I. A., Pegg D. E. Cryopreservation of organs. A review.— Cryobiology, 1983, 20, N 6, p. 698.
13. Mendler N., Struck E., Sebening F. Orthotropic canine heart transplantation after 24 hours cold perfusion.— Transplant. Proc., 1984, 16, N 1, p. 173—176.
14. Toledo-Pereyra L. H. Organ freezing.— J. Surg. Res., 1982, 32, N 1, p. 75—84.
15. Towers N. R., Raison J. K., Kellerman G. M., Linnane A. M. Effect of temperature-induced phase change in membranes on protein synthesis by bound ribosomes.— Biochim. Biophys. Acta, 1972, 287, N 1, p. 301—311.
16. Wiggins P. M. Thermal anomalies in ion distribution in rat kidney slices and in a model system.— Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., 1975, 2, N 2, p. 171—176.

НИИ трансплантологии и искусственных
органов, г. Москва

Поступила 10.12. 84.

УДК 615.015 : 547.422

**М. И. Шраго, А. Н. Новиков, Л. А. Ханина, Т. П. Линник,
А. М. Компаниец, Л. П. Бредихина, С. Т. Олейник**

КРИОПРОТЕКТОРЫ И КРИОКОНСЕРВАНТЫ (ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ)

Дальнейший прогресс криобиологии, в частности, совершенствование методов криоконсервирования биологических объектов в значительной степени зависит от успехов в создании криозащитных сред (криоконсервантов).

Современные криоконсерванты представляют собой многокомпонентные растворы, в которых универсальным растворителем является вода, а основной составной частью — криопротекторы. Последние, главным образом, определяют эффективность криозащиты, и потому интерес криобиологов к их разработке и совершенствованию не ослабевает. Актуальность проблемы создания криоконсервантов обусловлена тем, что все известные защитные среды далеки от оптимальных. Некоторые из них проявляют недостаточную криозащитную активность в отношении ряда биологических объектов, например, нейтрофильных лейкоцитов и тромбоцитов крови человека, спермы млекопитающих и рыб, изолированных органов, эмбрионов. Нередко возникают технологические затруднения при осуществлении метода (например, многократное отмывание размороженных клеток), которые усложняют внедрение его в практику и повышают стоимость процесса криоконсервирования. Химические соединения, являясь криопротекторами для одних биологических объектов, не обладают универсальным действием и могут повреждать другие еще на стадии эквilibрации.

В исследованиях криозащитных сред в настоящее время определились два основных направления: первое — получение более эффективных крио-

протекторов, второе — усиление их защитного действия путем включения в криоконсервант добавок для уменьшения возможного побочного влияния на живые структуры, смягчения стрессорных воздействий на этапах криоконсервирования, а также стимулирования восстановительных процессов в деконсервированном материале.

Создание криоконсервантов требует обоснованности природы компонентов, их совместимости, физико-химических свойств, характеризующих взаимодействие биологического объекта со средой в криобиологической системе и в процессе замораживания—оттаивания, а также всесторонней оценки криопротекторной активности и токсичности защитной среды. Выяснение взаимосвязи между этими факторами является базисом для получения веществ с заданными свойствами и формирования рациональных композиций криоконсервантов. Подчеркнем, что корреляция химической структуры веществ с их эффективностью является общепринятым приемом при получении препаратов направленного действия — лекарственных веществ, ядохимикатов, красителей и т. п. Указанный принцип положен нами в основу дальнейшего изучения криопротекторов, постановки фундаментальных исследований, посвященных выяснению взаимосвязи между химическими, физико-химическими и криопротекторными свойствами веществ, испытания действия соединений в эксперименте на объектах, обладающих различными биологическими характеристиками. Для решения поставленной задачи следовало определить круг веществ, изучение действия которых может дать необходимую информацию. Следует отметить, что влияние модификации структуры на криопротекторные свойства вещества прежде было наглядно показано при сравнении действия диметилсульфоксида и диметилсульфона [1].

На первых этапах работы предметом изучения явились ряды производных известных криопротекторов, их гомологов, изомеров и продуктов направленного синтеза с включением определенных функциональных групп. Предварительная классификация соединений, обладающих криопротекторной активностью, позволила выбрать для исследования те из них, в рядах которых находится наибольшее число криопротекторов: многоатомные спирты (этиленгликоль, глицерин) и алифатические амиды.

О криопротекторных свойствах соединений ряда этиленгликоля в специальной литературе имеется большое количество сообщений, причем исследован как сам диол, так и его оксиэтильные производные [8]. Показана зависимость характера биологического действия вещества от степени полимеризации. Присоединение этоксильных групп к этиленгликолю изменяет основной механизм его криопротекторного действия, лишает его способности проникать в клетки и таким образом переводит в разряд экзоцеллюлярных криопротекторов. Увеличение степени полимеризации усиливает дегидратирующее влияние вещества на клетки и его сродство к плазматической мембране, что отрицательно сказывается на объектах в восстановительном периоде после оттаивания [3]. В то же время в ряду олигомеров полиэтиленоксида (ПЭО) отмечается снижение показателей токсичности на уровне смертельных доз при увеличении молекулярной массы.

Влияние длины гидрофобного радикала на свойства олигомера можно видеть из сравнения криопротекторной активности замещенных полиэтиленоксида. Введение в молекулу ПЭО метильной группы не снижает эффект криозащиты, этильная группа приводит к небольшому его снижению. Присоединение более тяжелых радикалов того же гомологического ряда (пропил-, изопропил-), также как ароматического (фенил-), полностью лишает производные ПЭО криозащитных свойств. Влияние указанных групп в молекуле полиэтиленоксида зависит от степени полимеризации и наблюдается в значительной мере у олигомеров с невысокой молекулярной массой [9].

При оксиэтилировании глицерина нам удалось получить ряд оригинальных криопротекторов (ОЭГ), биологическое действие которых сходно с действием олигомеров ПЭО и зависит от молекулярной массы полимера. Так,

криоконсервирование клеток культуры СПЭВ наиболее эффективно с полимергомологом ОЭГ степени полимеризации $n = 3$, клеток костного мозга и тромбоцитов — с полимергомологом $n = 5$, а эритроцитов — с ОЭГ $n = 30-35$ [1, 4, 7].

Состав продуктов оксиэтилирования глицерина и пропиленгликоля менее однороден по химической структуре по сравнению с олигомерами окиси этилена, так как указанные полиолы наряду с первичными гидроксильными группами содержат и вторичный радикал. Ввиду сложности состава продуктов оксиэтилирования глицерина, получаемых на катализаторах различной природы (кислотные, щелочные), можно говорить лишь о преимущественном содержании в смеси компонентов определенной структуры [11]. При исследовании этоксилатов глицерина оказалось, что криопротекторными свойствами обладают только продукты присоединения оксида этилена по первичным группам (щелочной катализатор). Наличие же в смеси изомера, продукта присоединения по вторичному радикалу, делает ее токсичной и выводит из класса криопротекторов. Подобные различия биологического действия отмечены и на изомерах пропиленгликоля: в то время как α -пропиленгликоль малотоксичен и является активным криопротектором для эритроцитов человека [5], β -пропиленгликоль — более токсичное соединение.

В ряду алифатических амидов исследованы формамид, ацетамид, N,N-диметилацетамид, N,N-диэтилацетамид, N,N-диметилформамид, N-ацетилморфолин, N,N-(β -диоксиэтил)ацетамид.

В качестве тест-объекта выбраны тромбоциты человека, для которых установлена высокая криопротекторная активность N,N-диметилацетамида [6]. Изучение влияния соединений ряда амидов на этапе эквilibрации выявило различную степень их воздействия на специфические функции и морфологию тромбоцитов. Установлена токсичность для тромбоцитов N,N-диэтилацетамида и N,N-(β -диоксиэтил)ацетамида: после экспозиции с растворами этих веществ кровяные пластинки утрачивали дисковидную форму, способность к агрегации, ретракции, реакции на гипотонический шок. Наименее выраженное влияние на морфофункциональные свойства тромбоцитов оказывали N,N-диметилацетамид, N-ацетилморфолин и формамид.

Испытание криопротекторных свойств веществ ряда амидов показало, что наиболее эффективен как криопротектор для тромбоцитов N,N-диметилацетамид. Тромбоциты, замороженные под защитой N,N-диэтилацетамида и N,N-(β -диоксиэтил)ацетамида, полностью утрачивали функциональную активность, большая часть кровяных пластинок после оттаивания была разрушенной. Выявлена близкая к N,N-диметилацетамиду криопротекторная активность N-ацетилморфолина.

Оксиэтилированные производные морфолина проявляют криопротекторную активность при консервировании клеточных культур (СПЭВ) [2]. Применение этих производных в составе криоконсервантов становится возможным в результате понижения основности морфолина при оксиэтилировании либо ацилировании. Исходный амин, насыщенное высокоосновное циклическое производное, криопротекторными свойствами не обладает. Таким образом, показано, что одним из свойств веществ, определяющих криопротекторную активность, является их основность.

При изучении криопротекторных свойств веществ ряда алифатических амидов на эритроцитах человека установлено, что степень, в которой данные соединения предотвращают гемолиз замороженных клеток, прямо коррелирует с их растворимостью и теплотой смешения с водой.

Изучение физико-химических параметров в разработках проблемы криоконсервирования биологических объектов занимает значительное место и проводится в различных направлениях. К ним, по мере усложнения объектов, относятся: сами криопротекторы, их водные растворы, многокомпонентные криоконсерванты, сложные системы, содержащие клетки, а также феномены, развивающиеся в процессе охлаждения и отогрева. Разумеется, что в таких условиях значительные трудности представляет не только вы-

бор и исследование отдельных показателей, но и трактовка полученных результатов, необходимых для вскрытия механизмов криозащиты живых структур. В связи с этим объем физико-химических исследований продолжает расширяться за счет привлечения более информативных методов, их сочетаний, выработки новых подходов. Стремление объяснить криозащитные свойства веществ отдельными физико-химическими показателями оказалось малоперспективным, и такой путь исследования не дал возможности решить поставленную задачу [12].

При исследовании физико-химических свойств криозащитных веществ наряду с показателями, необходимыми для описания самих соединений, остановились на моделирующих их поведение в криобиологической системе. Изучаемые свойства разделили на две группы. К первой группе отнесли те, которые описывают взаимодействие с водой: теплота смешения вещества с водой, коррелирующая с энергией его гидратации; число гидратации; температура кипения вещества, относительно характеризующая самоассоциацию его молекул, что может в равной мере влиять и на энергетические характеристики связи молекул воды и вещества, и на его реакционную способность; молекулярная рефракция, пропорциональная поляризуемости молекул веществ, также в некоторой степени характеризующая реакционную способность.

Ко второй группе отнесли свойства веществ, моделирующие их взаимодействия с биологическими мембранами: относительный размер молекул веществ, характеризующий проницаемость через мембрану; коэффициент распределения вещества в системе вода — хлороформ, определяющий относительную способность молекул растворяться в липидах мембраны; поверхностная активность, моделирующая способность молекул адсорбироваться на поверхности биомембраны. Кроме того, изучали свойства, описывающие взаимодействия криопротекторов с физиологическими солями — относительные константы диссоциации хлоридов натрия и калия в водном растворе, а также вязкость водных растворов веществ при 0 °С, влияющую на скорость массо- и теплообмена в системе.

С целью выяснения взаимосвязи физико-химических свойств веществ и их криозащитной активности применен метод линейной многофакторной корреляции. С помощью ЭВМ рассчитывали зависимости вида.

$$Y = Ax_1 + Bx_2 + \dots Nx_n,$$

где Y — жизнеспособность биологического объекта до и после замораживания; x_i — исследуемые физико-химические свойства веществ; $A, B, \dots, N$ — коэффициенты корреляции.

В уравнениях такого типа влияние каждого исследуемого фактора на изучаемый биологический эффект количественно оценивается величиной (степень влияния) и знаком (направление влияния) соответствующего коэффициента корреляции. Для получения зависимостей с сопоставимыми величинами коэффициентов использовали метод кодирования натуральных значений физико-химических свойств аналогично применяемому в планируемых многофакторных экспериментах [10]. Метод многофакторной корреляции применен при изучении криопротекторной активности соединений ряда алифатических амидов на сперме карпа. Соединения подобраны таким образом, чтобы можно было проследить влияние вводимых гидрофобных и гидрофильных групп на физико-химические свойства и биологические характеристики на разных этапах криоконсервирования. Анализ полученных корреляционных уравнений зависимости повреждающего действия амидов до замораживания и их криопротекторной активности от физико-химических свойств позволил высказать предположение о причинах токсичности амидов и их слабой криопротекторной активности в отношении данного биологического объекта. С помощью метода многофакторной корреляции определено возможное направление модификации структуры ацетамида с целью усиления криопротекторных свойств в отношении спермы карпа.

Наряду с созданием криопротекторов в криобиологических экспериментах, посвященных долгосрочному хранению живых структур в жизнеспособном состоянии, в настоящее время получили признание и более доступные разработки, направленные на формирование композиций криоконсервантов. Интерес к многокомпонентным криоконсервантам объясняется еще и тем, что введением в консервант рациональных добавок удастся не только повысить уровень сохранности объекта низкотемпературного хранения, но и понизить одновременно концентрацию криопротектора в защитной среде, ослабить ее побочное действие (осмотические перепады, токсичность) и упростить, в случае необходимости, процедуру удаления.

В наших исследованиях используются два основных пути совершенствования криоконсервантов: 1) включение компонентов, устраняющих либо ослабляющих действие криопротектора на объект замораживания; 2) введение добавок, действие которых направлено, в первую очередь, на коррекцию в желаемом направлении физико-химических феноменов, сопутствующих процессу криоконсервирования, в частности, фазовых переходов «вода — лед».

Подтверждением целесообразности первого подхода явилось включение в криоконсервант для эритроцитов натрия цитрата с целью дезагрегации клеток, ингибирования процесса свертывания, восстановления электрокинетических параметров клеток, и холина хлорида, обладающего стабилизирующим влиянием на клеточную мембрану. Это дало возможность улучшить результат криоконсервирования при снижении концентрации криопротектора в среде, повысить устойчивость деконсервированных эритроцитов, нормализовать их реологические свойства.

Второй подход к совершенствованию криоконсерванта основан на введении в его состав модификаторов фазового перехода «вода — лед». К этой группе веществ относятся инициаторы льдообразования во внеклеточной среде (пассиваторы внутриклеточной кристаллизации, вещества, влияющие на скорость роста, форму и размер образующихся кристаллов льда) и вещества, оказывающие влияние на рекристаллизационные процессы типа «кристалл — кристалл» и «стеклофаза — кристалл» в процессе замораживания — оттаивания. Правомерность такого подхода доказана при криоконсервировании спермы карпа.

Таким образом, подтверждена эффективность комплексных разработок проблемы криоконсервантов и перспективность проведения дальнейших исследований в указанных направлениях.

1. *Актуальные проблемы криобиологии*/Под общ. ред. Н. С. Пушкаря и А. М. Белоуса.— Киев: Наук. думка, 1981.— 608 с.
2. А. с. 1089090 (СССР). N-оксипиперидин-(оксипиперидин)морфолин в качестве криопротектора /Л. А. Ханина, Т. П. Линник, М. И. Шраго и др. — Оpubл. в Б. И., 1984, № 16.
3. Белоус А. М., Бондаренко В. А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении.— Киев: Наук. думка, 1982.— 256 с.
4. Белоус А. М., Шраго М. И., Пушкарь Н. С. Криоконсерванты. — Киев: Наук. думка, 1979.— 198 с.
5. Воротилин А. М., Гучок М. М., Гучок В. М. и др. Сравнительное изучение эффективности криоконсервации эритроцитов под защитой 1,2-пропандиола (α -пропиленгликоля) и глицерина.— Пробл. гематологии и переливания крови, 1982, № 10, с. 15—19.
6. Криоконсервирование клеточных суспензий/ А. А. Цуцаева, В. А. Аграненко, Л. И. Федорова и др. — Киев: Наук. думка, 1983.— 240 с.
7. Лубяный В. Г., Бредихина Л. П., Шраго М. И. Криопротекторная активность олигомеров ОЭГ в низкотемпературном консервировании эритроцитов.— Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 8, с. 34—40.
8. Пушкарь Н. С., Шраго М. И., Белоус А. М., Калугин Ю. В. Криопротекторы.— Киев: Наук. думка, 1978.— 204 с.
9. Топчиева И. Н. Применение полиэтиленгликоля в биохимии.— Успехи химии, 1980, № 3, с. 494—517.
10. Хартман К. Планирование эксперимента в исследовании технологических процессов.— М.: Мир, 1977.— 552 с.
11. Шенфельд Н. Поверхностно-активные вещества на основе оксида этилена.— М.: Химия, 1982.— 748 с.

12. Nash T. Chemical constitution and physical properties of damage due to freezing and thawing.— In: Cryobiology/Ed. by H. T. Meryman. London; New York: Acad. Press, 1966, p. 179—213.

Институт проблем криобиологии и
криомедицины АН УССР, г. Харьков

Поступила 15.04.85

УДК 57.043 : 575.014.41

А. Д. Курбатов

НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЕ ХРАНЕНИЕ СПЕРМЫ ПТИЦ

Проблема криоконсервации спермы сельскохозяйственных животных имеет большое народнохозяйственное значение. Создание низкотемпературных банков замороженной спермы элитных пород животных позволит сохранить ценный генофонд.

В 1937 г. советские ученые А. Д. Бернштейн и В. В. Петропавловский заморозили сперму петуха и селезня до -21°C под защитой глицерина, в 1941 г. [13] получено потомство после осеменения кур деконсервированной спермой. В дальнейшем разрабатывались методы криоконсервации спермы птиц до -79 или -196°C под защитой глицерина [10, 12], этиленгликоля, [2, 6, 14, 15] и диметилсульфоксида [7, 16]. Однако после осеменения кур, индеек и уток криоконсервированной спермой оплодотворяемость яиц и вывод молодняка оставались на низком уровне (от 0 до 58 %). В других работах [11, 12, 17] получены лучшие результаты (72—78,5 % оплодотворяемости), но воспроизводимость была трудной из-за того, что криоконсервация осуществлялась многоэтапно. Оплодотворяемость удалось повысить до 92,6 % [11], однако замораживание и деконсервация спермы проводились по весьма сложной технологии, оплодотворение кур, отобранных по воспроизводительной способности осуществляли методом внутриматочного осеменения. Ватанабе и Терадо [18] сообщают об оплодотворяющей способности спермы петухов от 30 до 50 % после хранения в течение 1—9 лет при температуре -196°C .

Наша методика замораживания спермы петухов под защитой этиленгликоля в виде гранул детально описана ранее [4]. Отогрев спермы вели в металлических конусах при температуре $42-45^{\circ}\text{C}$ или во флаконах при $55-75^{\circ}\text{C}$. Оплодотворяемость яиц при таком способе консервации колебалась от 40,6 до 41,2 %, в отдельных случаях повышалась до 70 %, хотя полученные результаты не всегда хорошо воспроизводились. В дальнейшем разработана методика [7, 8] криоконсервации спермы петухов под защитой диметилацетамида (ДМА), которая осуществлялась следующим образом.

Семя петухов помещали в спермоприемник при температуре $15-20^{\circ}\text{C}$, через 10 мин разливали во флаконы по 0,5 мл и добавляли по 0,5 мл среды ЛКС-1, состоящей из фруктозы (0,8 г), глутамата натрия (1,92 г), ацетата калия безводного (0,5 г), поливинилпирролидона м.м. 10 000 (0,3 г), протаминсульфата (0,032 г) и дистиллированной воды (100 мл). Флаконы с разбавленным семенем в закрытом виде помещали в холодильник на 40—60 мин при температуре $2-8^{\circ}\text{C}$. В охлажденный материал микропипеткой добавляли ДМА по 0,08 мл в каждую пробу, флаконы осторожно встряхивали и помещали в криостат, предварительно охлажденный до -80°C . Перемешивание с криопротектором, наслаивание спермы на стенки флаконов и следующий этап охлаждения осуществляли в камере криостата при температуре $-60 \div -80^{\circ}\text{C}$ путем вращения флаконов в течение четырех мин со скоростью 12—13 об/мин. Замораживание осуществляли погружением флаконов в жидкий азот. Отогревали сперму двухэтапно: на первом этапе из флаконов с замороженной спермой удаляли жидкий азот и выдерживали 30—40 сек при комнатной температуре, на втором этапе флаконы погружали на 7—10 сек в водяную баню при температуре $60-70^{\circ}\text{C}$.

Удаление криопротектора из размороженной спермы выполняли следующим методом. Флакон с оттаянной спермой помещали в холодильник при температуре 2—8 °С и через каждые 30—60 сек в пробы добавляли пипеткой по 0,1, 0,3 и 0,6 мл охлажденного разбавителя ЛКС-1 (без криопротектора). Разбавленную сперму переливали в пробирки и центрифугировали при 5 °С и 700 g в течение 10—15 мин. Надосадочную жидкость сливали и в каждую пробу добавляли по 0,3 мл охлажденного разбавителя ЛКС-1 (без криопротектора). Сперму ресуспендировали, оценивали ее подвижность и сливали в пенициллиновые флаконы, помещенные в термос со льдом, покрытым слоем ваты. Использо-

вать такую сперму для осеменения кур можно в течение одного часа. Для осуществления предложенного способа замораживания и оттаивания спермы петухов не требуется холодная комната, все манипуляции выполняются при комнатной температуре.

В период с 1981 по 1984 гг. нами проведено замораживание спермы петухов породы Леггорн и осеменение кур (результаты исследований приведены в таблице). Как видно, криоконсервация спермы петухов по разработанной нами технологии обеспечивает высокий уровень оплодотворяемости (от 80 до 94,4%) яиц и вывода цыплят.

В 1984 г. на Западно-Сибирской зональной опытной птицеводческой станции проведена проверка разработанной технологии. После осеменения кур породы «белый плимутрок» криоконсервированной спермой процент оплодотворения яиц составлял 88,7 %, вывода цыплят — 83,3 %. В контроле эти показатели равнялись соответственно 91,9 % и 82,4 %.

Аналогичные результаты получены при осеменении кур криоконсервированной спермой на Дубоссарском племенном заводе. Предложенным методом эффективно замораживали сперму селезней и индеек. После осеменения уток спермой, криоконсервированной со средой ЛКС-1 и

Т а б л и ц а. Результаты искусственного осеменения кур замороженной-оттаянной спермой по ленинградскому способу [4]

Проникну- бированных яиц, шт.	Оплодотво- ренных яиц, шт	Оплодотво- ренность яиц, %	Выход молодняка, %	Выводимость яиц, %
Без удаления криопротектора из оттаянной спермы				
66	55	83,33	*	88,5
208	175	84,13	74,5	
133	107	80,0	*	
253	226	90,35	*	
71	66	92,96	*	96,31
112	106	94,4	*	
141	123	87,23	*	
235	217	92,34	88,93	
135	109	80,8	84,5	95,1
71	63	88,7		
107	91	85,04	*	97,8
327	273	84,09	*	
306	274	91,5	87,9	
190	171	90,0	*	
Итого 2355	2056	87,30		

Примечание. * — Инкубация яиц до получения эмбрионов

ДМА, оплодотворяемость яиц достигла уровня 75—83%. В других опытах после осеменения гусынь спермой, криоконсервированной в виде гранул и пайет со средой ИГГКФ, в состав которой входил ДМА, оплодотворяемость достигала 81,7 — 89,9 % и вывод гусят 73,3 — 75,2 %. Положительные результаты [9] были получены при использовании криопротектора ДМА для замораживания спермы индюков, что позволило получить оплодотворяемость яиц и вывод индюшат соответственно 89,0 и 65,3%. При замораживании спермы петухов с ДМА [19] также было получено до 70 % оплодотворенных яиц.

В нашей стране (Краснодарская опытная показательная птицефабрика) создан банк семени гусей на 320 тысяч спермодоз, создаются банки спермы петухов на Дубоссарском племенном заводе, Белорусской и Западно-Сибирской зональных опытных птицеводческих станциях.

Для усовершенствования методики криоконсервации спермы домашней птицы следует продолжить поиски и испытание других криопротекторов и защитных сред. Осеменение гусынь проводилось спермой, консервированной в присутствии диметилформамида (ДМФ), оплодотворяемость яиц находилась на уровне 67,5 %, вывод гусят 41,9 %. При осеменении от-

таянной спермой, из которой ДМФ удаляли, процент оплодотворенных яиц достигал 85,1 %, вывод молодняка 54,0 %. Хотя эти показатели еще не могут полностью удовлетворить птицеводов, дальнейшая разработка технологии криоконсервации позволит значительно улучшить результаты осеменения.

1. Бернштейн А. Д., Петропавловский В. В. Влияние неэлектролитов на переживание сперматозоидов. — Бюл. эксперим. биологии и медицины, 1937, вып. 1, с. 21—25.
2. Курбатов А. Д., Нарубина Л. Е., Иванов Б. И. и др. А. с. 586908 (СССР). (Среда для замораживания спермы птиц. — Оpubл. в Б. И., 1978, № 1.
3. Курбатов А. Д., Нарубина Л. Е., Иванов Б. И., Бубляева Г. Б. А. с. 656621 (СССР). Способ замораживания спермы. — Оpubл. в Б. И., 1979, № 14.
4. Курбатов А. Д., Нарубина Л. Е., Бубляева Г. Б. и др. Низкотемпературная консервация спермы петухов. — В кн.: Криоконсервация гамет и эмбрионов сельскохозяйственных животных. Пушино: Б. и., 1983, с. 18—22.
5. Курбатов А. Д., Царенко Р. Г., Мавродина Т. Г., Попов И. И. Методические рекомендации по искусственному осеменению гусей замороженной-оттаянной спермой. — Л.: Б. и., 1982. — 23 с.
6. Курбатов А., Нарубина Л., Бубляева Г., Целюпин К. Новый способ замораживания спермы петухов. — Птицеводство, 1984, № 11, с. 7—8.
7. Мавродина Т. Г. Разработка способа замораживания и использования спермы гусак для искусственного осеменения: Автореф. дис. ... канд. сельскохозяйств. наук. — Л., 1984. — 18 с.
8. Сахацкий Н. И. Низкотемпературная консервация спермы гусей и уток: Метод. рекомендации. — Пушино, 1984. — 23 с.
9. Царенко Р. Г., Курбатов А. Д., Мавродина Т. Г. А. с. 965429 (СССР). Способ замораживания спермы гусей. — Оpubл. в Б. И., 1982, № 38.
10. Lake P. E., Stewart T. M. Preservation of fowl semen in liquid nitrogen — an improved method. — Poultry Sci., 1978, 19, № 1, p. 187—194.
11. Lake P. E., Ravie O., McAdam M. Preservation of fowl semen in liquid nitrogen; application to breeding programmes. — Brit. Poultry Sci., 1981, 22, № 1, p. 71—77.
12. Lake P. E., Ravie O. An exploration of cryoprotective compounds for fowl spermatozoa. — Brit. Poultry Sci., 1984, 25, № 1, p. 145—150.
13. Shaffner C. S., Henderson E. W., Card C. C. Viability of spermatozoa of the chicken under various environmental conditions. — Poultry Sci., 1941, 20, № 3, p. 256—265.
14. Schramm G. P. Fortschritte bei der Kurzzeitkonservierung von Putensperma. — Mh. vet. Med., 1981, 36, № 6, S. 853—856.
15. Schramm R. Qualität von Puteneinzelejakulaten in originarem, verdünntem äquilibrium und gefrier-getantem Zustand und Brutergebnis nach Insemination des getauten Spermas. — Arch. Tierzucht, 1980, 23, № 5/6, S. 13—18.
16. Sexton T. J. Studies on fertility of frozen fowl semen. — In: 8th Intern. Congr. Anim. Reprod. Art. Insem. (Krakow, oct., 1976), vol. 4. Krakow, p. 1079—1081.
17. Tanaka K., Tomita T., Okamoto S. Studies on deep freezing of fowl semen. — Jap. J. Zootechn. Sci., 1966, 37, № 4, p. 134—138.
18. Watanabe M., Terada T. Fertility of frozen fowl semen stored for long term (9 years). — Appl. Biol. Sci. (Hiroshima Univ.), 1980, 19, № 2, p. 155—159.

Всесоюзный НИИ разведения и генетики
сельскохозяйственных животных, г. Москва

Поступила 04.02. 85

УДК 57.043:612.111:538.48

А. М. Воротилин

ЗАМОРАЖИВАНИЕ КЛЕТОК КРОВИ ДО — 196 °С ПОД ЗАЩИТОЙ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ГЛИКОЛЕЙ И ГЛИЦЕРИНА. ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

Для длительного хранения эритроцитов при низких температурах в СССР и за рубежом используют в основном способы консервации под защитой глицерина. К недостаткам этих способов относится их трудоемкость и высокая стоимость (большой расход реактивов) многоэтапного (двух-, четырехкратного) процесса деглицеринизации размороженных эритроцитов перед трансфузией. Разрешенный к применению способ криоконсервации эритроцитов под защитой поливинилпирролидона также требует удаления криопротектора из размороженной крови перед трансфузией путем трехкратного отмывания [8]. Эти недостатки являются одной из причин

ограниченного использования криоконсервированных эритроцитов в лечебных учреждениях.

Наши исследования были направлены на разработку более совершенных и более доступных для клинического использования способов криоконсервации эритроцитов.

Выбор криопротектора. При выборе защитного вещества мы учитывали, что совершенный криопротектор должен обладать следующими свойствами: хорошо растворяться в воде, растворах электролитов и обладать высокой гидратационной способностью; его растворы должны иметь низкую эвтектическую температуру, чтобы сократить температурный интервал воздействия твердой фазы на клетку в процессе замораживания и отогрева; вязкость растворов при низких температурах должна быть высокой, чтобы при замораживании в каналах, где концентрируются клетки, раствор переходил в аморфное состояние

Таблица 1. Эвтектические показатели растворов криопротекторов

Система	Мол. масса	Эвтектическая температура, °C	Эвтектическая концентрация, %
Метанол — H ₂ O	32	—138	77
Этанол — H ₂ O	46	—125	92,5
Диметилформамид — H ₂ O	73	—100	80
Диметилсульфоксид — H ₂ O	58	—66	70
Этиленгликоль — H ₂ O	62	—63	76
Пропиленгликоль — H ₂ O	76	—57 (60% раствор)	—
Глицерин — H ₂ O	92	—46,5	66,7

при относительно низких концентрациях криопротектора и солей; быть нетоксичным в высоких концентрациях; быстро проникать и удаляться из клеток, чтобы уменьшить осмотические эффекты при насыщении криопротектором, замораживании—отогреве и удалении его из размороженных клеток.

Наши исследования по выбору эффективных криозащитных соединений были начаты с анализа эвтектических характеристик их растворов. Изучение диаграмм плавления систем «вода—криопротектор» показало, что для различных классов защитных соединений эвтектическая температура, как правило, понижается с уменьшением молекулярной массы вещества. В табл. 1 перечислены соединения, растворы которых имеют низкие эвтектические температуры. Как видно из таблицы, наиболее низкие эвтектические температуры у растворов метанола и этанола. Однако эти вещества оказывают деструктурирующее действие на клетки и в относительно низких концентрациях (5—10 %) экстрагируют компоненты мембран, повышая их проницаемость для ионов и молекул [7], поэтому этанол и метанол не могут выполнять функцию криопротектора. Диметилформамид с эвтектической температурой — 100 °C относится к соединениям с сильным токсическим действием [4]. В исследованиях ряда авторов, посвященных замораживанию эритроцитов под защитой диметилсульфоксида (эвтектическая температура — 66 °C), не установлено его преимущества перед глицерином [10.] Кроме того, ДМСО — нестойкое соединение, разрушающееся при хранении.

Из других соединений, относящихся к криопротекторам, наиболее низкие эвтектические температуры у этиленгликоля (ЭГ) и пропиленгликоля (ПГ). ЭГ с эвтектической температурой — 63 °C не оказывает повреждающего действия на эритроциты, не нарушает ионного равновесия между вне- и внутриклеточной средой в высоких концентрациях [9]. ПГ с эвтектической температурой ниже — 57 °C относится к нетоксичным соединениям [5]. ЭГ и ПГ обладают высокой гидратационной способностью. Растворы этих соединений в концентрации вблизи эвтектической при охлаждении переходят в аморфное состояние. Нами установлено, что после добавления к эритромассе криоконсервантов на основе ПГ или ЭГ или отмывочного раствора равновесная концентрация в суспензиях устанавливается не позднее, чем через 30 с. Проведенные нами сравнительные исследования показали, что ЭГ и ПГ, как и глицерин, являются эффективными криопротекторами в отношении эритроцитов человека.

Криоконсервация с ЭГ. Установлено, что 35 % раствор ЭГ с включением 3 % сахарозы и 0,9 NaCl является оптимальным криозащитным раствором для эритроцитов. После отделения плазмы эритроциты в соотношении 1 : 1 смешивают с этим раствором и замораживают в алюминиевых контейнерах конструкции ЦНИИГПК по двухэтапной программе: со средней скоростью 25 °С/мин, погружая контейнер в хладагент с температурой — 50 ÷ — 55 °С на 3—4 мин, затем со скоростью 18—22 °С/мин до — 150 ÷ — 170 °С погружением в жидкий азот в чехле и хранят при — 196 °С [3].

Криоконсервация с ПГ. В отличие от замораживания с ЭГ, консервируется эритромаасса, а замораживание — одноэтапное. Ограждающий раствор включает: пропиленгликоль (370 мл), сахарозу (32, 0 г), NaCl (6,0 г) и H₂O (до 1 000 мл). После удаления плазмы на плотный осадок эритромаассы наслаивают при 20—25 °С криоконсервант в соотношении 1:1 и переворачиванием флакона 8—10 раз осуществляют быстрое перемешивание. Смесь центрифугируют при 2 400 — 2 600 об/мин при 4 °С в течение 25—30 мин. После удаления надосадка эритромаассу переливают в алюминиевый контейнер, помещенный в металлический чехол, и погружением в жидкий азот замораживают со скоростью 12—14 °С/мин [2].

Преимущество ПГ и ЭГ перед глицерином заключается в возможности одноэтапного удаления их из размороженных клеток перед переносом в изотоническую среду. После размораживания эритроцитов в водяной бане (+42 ÷ 45 °С) ЭГ и ПГ удаляют из клеток добавлением к размороженному объему суспензии (или эритромаассы) одного объема раствора, содержащего 10 % сахарозы и 1,5 % NaCl, и двух объемов 3 %-ного раствора сахарозы в 0,9 % NaCl. После центрифугирования удаляют надосадочную жидкость и клетки в соотношении 1 : 1 смешивают со средой ЦОЛИПК-8в. Методами ЯМР и радиоактивной метки установлено, что в полученных суспензиях клеток остается 1,0 — 1,5 % крипротектора. Величина гемолиза после размораживания составляет 2—3 %, а свободного гемоглобина в отмытой эритроцитарной массе 60—80 мг %.

Выделение наиболее устойчивых к замораживанию эритроцитов. Эритроциты донорской крови имеют разные качественные характеристики. С возрастом клетки теряют заряд и изменяют структуру мембраны, что, по-видимому, отражается на их устойчивости к замораживанию. Как показали исследования, эритроциты можно разделить на более и менее устойчивые к низким температурам фракции. После смешивания с криоконсервантом (ЭГ, ПГ, глицерин) взвесь клеток центрифугировали, удаляли надосадок, а оставшийся столб эритромаассы делили на n слоев. Каждый слой, начиная с верхнего, отбирали в отдельную пробирку, считали количество клеток в единице объема и замораживали. Оказалось, что чем ниже слой, тем больший в нем гемолиз после размораживания. В зависимости от крипротектора и числа фракций величина гемолиза в придонном слое была в 4—8 раз большей, чем в поверхностном. Следовательно, при криоконсервации эритромаассы нецелесообразно использовать для замораживания самый нижний слой центрифугата.

Оптимальная форма контейнера для замораживания. Определенную роль в повышении сохранности клеток в процессе замораживания играет форма контейнера. Так, при погружении сосуда цилиндрической формы с клетками в жидкий азот в замораживаемом материале образуется область жидкой фазы, окруженная замерзшей суспензией. Кристаллизация оставшейся жидкой фазы при дальнейшем охлаждении приводит к появлению в среде механических напряжений, которые дополнительно травмируют клетки. Этот повреждающий фактор устраняется, если замораживание осуществляется в контейнерах, удовлетворяющих следующему требованию: хладоприток dQ к элементу замораживаемого объема dV должен уменьшаться с приближением к поверхностному слою суспензии, т. е. $dQ/dV < 0$ или $dP/dS < 0$, где P — периметр сечения, параллельного поверхностному слою суспензии; S — площадь сечения. Этому условию отвечают формы, полученные вращением монотонно возрастающей кривой вокруг оси, где сече-

ния, перпендикулярные оси, есть окружности и $P/S = 2/r$. С приближением к поверхностному слою r возрастает и $dP/dS < 0$. К этим формам относятся некоторые сечения сферы, параболоида, гиперboloида, эллипсоида и др., в частности клин и конус [1].

Увеличение сохранности эритроцитов после двухэтапного размораживания. В настоящее время в банках крови для деконсервации эритроцитов, хранившихся при -196°C , используют одноэтапное размораживание в водяной бане при $+42 \div +45^\circ\text{C}$. Анализ физических процессов, протекающих в замороженных растворах при изменении температуры, позволил сделать вывод о предпочтительности двухэтапного размораживания. На первом этапе, в условиях медленного отогрева до температуры начала фазовых превращений в замороженном растворе ($-100 \div -80^\circ\text{C}$), устраняется повреждающее действие термомеханических напряжений на клетки. При быстром же отогреве на первом этапе при переносе контейнера из жидкого азота (-196°) в водяную баню ($+45^\circ\text{C}$) механические напряжения в замороженном материале возникают из-за неравномерного объемного расширения внешних и внутренних слоев вследствие наличия градиента температур в размораживаемом образце. На втором этапе, начиная с температуры $-100 \div -80^\circ\text{C}$ (в зависимости от состава криоконсерванта), необходимо быстрое размораживание клеток в водяной бане. При этом клетки меньше повреждаются, поскольку в меньшей степени проявляются фазовые превращения и процессы рекристаллизации в окружающей клетки среде, снижается время их контакта с концентрированными растворами в процессе таяния льда [6]. Гемолиз эритроцитов, консервированных под защитой ЭГ, ПГ и глицерина при -196°C , при двухэтапном размораживании уменьшается в 1,5—2 раза в сравнении с одноэтапным. В наибольшей степени этот эффект проявляется при размораживании больших объемов клеток (100 — 250 мл).

Увеличение срока хранения размороженных эритроцитов в криозащитном растворе. Согласно существующим методам, из размороженных эритроцитов сразу же удаляют криопротектор и хранят их в различных суспендирующих средах до момента трансфузии. Однако допустимый срок хранения в наиболее широко используемой среде ЦОЛИПК-8в не превышает трех—пяти суток из-за быстрого нарастания гемолиза и снижения в клетках уровня основных показателей жизнеспособности (АТФ) и кислород-транспортной функции (3,2 ДФГ).

Нами установлено, что при хранении размороженных эритроцитов в криозащитной среде на основе ПГ отсутствует интенсивное увеличение гемолиза. Поэтому было проведено сравнительное исследование полноценности размороженных эритроцитов при хранении в указанной среде и среде ЦОЛИПК-8в. В табл. 2 представлены результаты хранения размороженных эритроцитов в среде ПГ и растворе ЦОЛИПК-8в. Уже через 5 суток хранения в среде ЦОЛИПК-8в значения АТФ и 2,3 ДФГ в клетках снижаются на 40—50 %, а гемолиз увеличивается в 4—5 раз по сравнению с исходным. Подобные показатели имеют клетки, хранившиеся в криозащитном растворе на основе ПГ в течение 14—16 суток. Как следует из табл. 2, независимо от сроков хранения в криозащитной среде, потеря клеток при отмывании от криопротектора не превышает 1 %. Гемолиз отмытых клеток в среде суспендирования ЦОЛИПК-8в остается на уровне 0,5—0,9 %. Осмотическая хрупкость эритроцитов после переноса из среды ЦОЛИПК-8в в 0,9 % NaCl (1 : 50) во всех случаях не превышает 1 %. По истечении двух недель хранения в защитной среде эритроциты, отмытые от ПГ и помещенные в плазму, имеют форму дискоцитов и около 90 % клеток собираются в «монетные столбики», что свидетельствует об их функциональной полноценности. Через три недели хранения форма дискоцитов сохраняется и около 50 % клеток образуют «монетные столбики». Клетки, помещенные в плазму, через десять дней хранения в среде ЦОЛИПК-8в не образуют «монетных столбиков». На основании полученных результатов можно предположить, что сохранение функционально значимых органических фосфатов в эритроцитах на достаточно высоком уровне при длительном гипотермическом хранении в среде

Таблица 2. Показатели структурно-функциональной полноценности размороженных эритроцитов в процессе хранения при +4 °С

n = 6

Показатели, %		Дни хранения					
		0	3	5	10	14	21
Хранение в криозащитном растворе на основе ПГ	Гемолиз при хранении в криозащитной среде	1,7 ±0,3	2,0 ±0,3	2,2 ±0,4	3,0 ±0,5	4,1 ±0,6	5,2 ±1,1
	Общий гемолиз при хранении в криозащитной среде и отмывке	2,0 ±0,5	2,2 ±0,4	2,7 ±0,5	4,0 ±0,6	4,9 ±0,8	6,1 ±1,1
	Гемолиз при перенесении в среду ЦНИИГПК-8в	0,5 ±0,2	0,7 ±0,2	0,8 ±0,2	0,7 ±0,2	0,6 ±0,2	0,5 ±0,2
	Уровень АТФ в эритроцитах (4,38 мкМ/г Hb)	100 ±5,6	98,7 ±5,6	93,6 ±6,3	81,4 ±4,9	76,8 ±4,8	56,7 ±5,3
	Уровень 2,3 ДФГ в эритроцитах (11,8 мкМ/г Hb)	100 ±6,2	99,3 ±6,2	101,0 ±7,3	84,3 ±7,1	52,0 ±5,2	40,0 ±4,5
	Внутриклеточный K ⁺ (94,8 мэкв/л крови)	100 ±3,7	86,6 ±3,7	74,8 ±1,2	65,3 ±5,1	60,2 ±4,7	56,0 ±4,9
Хранение в среде ЦНИИГПК-8в	Общий гемолиз при замораживании и отмывке			2,0 ± ±0,5			
	Гемолиз при хранении в среде ЦНИИГПК-8в	0,5 ±0,2	1,7 ±0,4	2,3 ±0,7	4,3 ±0,9	8,2 ±2,4	—
	Уровень АТФ в эритроцитах (4,38 мкМ/г Hb)	100 ±6,2	83,0 ±6,2	61,0 ±7,4	53,2 ±5,7	51,4 ±4,9	—
	Уровень 2,3 ДФГ в эритроцитах (11,8 мкМ/г Hb)	100 ±5,1	75,6 ±5,1	48,3 ±4,7	37,2 ±3,6	22,7 ±3,8	—
	Внутриклеточный K ⁺ (94,8 мэкв/л крови)	100 ±5,2	87,1 ±5,2	78,4 ±4,2	72,5 ±5,4	61,2 ±4,3	—

криопротектора обусловлено ингибированием большими концентрациями ПГ ферментных систем, участвующих в утилизации АТФ и 2,3 ДФГ. После замораживания эритроцитов с глицерином и последующего хранения размороженных клеток без удаления криопротектора наблюдается более интенсивное нарастание гемолиза (до 10 % за 14 суток) и быстрое снижение уровня ДФГ (до 55 % через 7 суток), чем в среде, содержащей ПГ.

Таким образом, на основании анализа эвтектических характеристик криопротекторов и учета других требований, предъявляемых к ним, установлено, что ЭГ и ПГ являются эффективными криопротекторами в отношении эритроцитов человека. Показано, что ПГ по защитному эффекту не уступает глицерину, а предложенный способ консервации клеток имеет ряд практических преимуществ: допускает одно- и двухэтапное удаление криопротектора из размороженных клеток (глицерин из размороженной эритро-массы удаляется в четыре этапа), позволяет длительное время хранить размороженные клетки в криозащитной среде. Удаление из обработанной криоконсервантом эритро-массы клеток с повышенной чувствительностью к замораживанию, выбор оптимальной формы контейнера для замораживания, двухэтапное размораживание и возможность длительного хранения размороженных клеток в криозащитной среде повышают эффективность криоконсервации.

1. Воротилин А. М. О выборе формы контейнера для консервации биологического материала при низких температурах. — В кн.: Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины. — Киев: Наук. думка, 1974, с. 151—154.
2. Воротилин А. М., Гучок М. М., Гучок В. М., Лоевский М. М. Сравнительное изучение эффективности криоконсервации эритроцитов под защитой 1,2-пропанди-

- ола (α -пропиленгликоля) и глицерина.— Пробл. гематологии и переливания крови, 1982, № 10, с. 15—19.
3. Воротилин А. М., Корчиков С. Д., Цымбал Л. В. Сохранение эритроцитов при замораживании с этиленгликолем.— В кн.: Совершенствование процессов, машин и аппаратов холодильной и криогенной техники и кондиционирования воздуха: Всесоюз. конф. по холоду (Ташкент, окт., 1977 г.). Ташкент: Б. и., 1977, с. 13.
 4. Вредные вещества в промышленности. т. 1./Под ред. Н. В. Лазарева.— Л.: Химия, 1976.— 590 с.
 5. Гучок В. М., Зборовская Э. А. О токсичности α -пропиленгликоля. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 8, с. 46—49.
 6. Зинченко А. В. Исследование фазовых переходов и физических состояний водных растворов многоатомных спиртов в диапазоне температур — $150^{\circ} \div 0^{\circ} \text{C}$: Автореф. дис. ... канд. физ.-мат. наук.— Киев, 1983.— 20 с.
 7. Кейтис М. Техника липидологии.— М.: Мир, 1975.— 322 с.
 8. Клиническое применение криоконсервированных эритроцитов донорской крови, лейкоцитов донорской и фибринолизной крови:— Метод рекоменд./МЗ УССР.— Киев, 1978.— 28 с.
 9. Meryman H. T. Cryoprotective agents.— Cryobiology, 1971, 8, № 2, p. 173—183
 10. Tokyo N. Application of low temperatures in medicine.— Refrigeration, 1982, 57, N 656, p. 535—537.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР, г. Харьков.

Поступила 14.05.84

УДК 57.043 : 577.352.33 : 611.018.51

Л. В. Цымбал, И. И. Гаврилова, В. А. Моисеев

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПОЛИСПИРТОВ НА ДИНАМИЧЕСКУЮ СТРУКТУРУ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН МЕТОДОМ СПИНОВЫХ ЗОНДОВ

Существующие гипотезы о механизме криозащиты клеток [7, 9] не рассматривают мембрану как сложную систему, изменяющуюся не только при фазовых переходах, но и в результате взаимодействия с компонентами среды. Одним из важнейших аспектов этой проблемы является вопрос о характере взаимодействия между криозащитными веществами и мембранами. Сведения, имеющиеся в литературе по этим вопросам, немногочисленны [5, 6, 8] и относятся в основном к области высоких температур. Исследование взаимодействия мембран с криопротекторами при температурах ниже физиологической могут прояснить некоторые аспекты механизма криозащиты.

Нативные эритроциты донорской крови, отмытые от консервирующего раствора трехкратным центрифугированием при десятикратном разбавлении изотоническим раствором NaCl, ресуспендировали в небольшом количестве физиологического раствора и исследовали состояние и взаимодействие мембранных компонентов в разных условиях методом спиновых зондов. Использовали липидные спиновые зонды: 2,2,6,6-тетраметил-пиперидинил-4-амид пальмитиновой кислоты (I), прегн-4-ен-3,20-дион [17 α , 16 α , δ]-2',2'-диметилноксазолидиннитроксид (II), N-оксил-4,4-диметилноксазолидинового производное 6-кетостеариновой кислоты (III) и водорастворимый зонд 1-оксил-2,2,6,6-тетраметил-4-оксопиперидин.

Локализацию свободных радикалов определяли методом добавочного уширения [2]. В качестве уширяющих агентов использовали $0,001 \div 0,1 \text{M}$ растворы NiCl_2 и $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. Липидные радикалы вводили в мембраны в виде спиртовых растворов (10^{-4}M зонда и 1 % спирта в образце). Спектры ЭПР регистрировали на спектрометре ER100Д «Bruker» (ФРГ) с термоприставкой. Точность термостатирования $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Изучали влияние на клетки 1—15 %-ных растворов следующих криопротекторов: глицерина (ГЛ), этиленгликоля (ЭГ), α -пропиленгликоля (ПГ) и полиэтиленгликоля с молекулярной массой 300 и 2 000 (ПЭГ-300, 2 000), приготовленных на физиологическом растворе. Образцы меченых эритроцитов смешивали в соотношении 1 : 1 с раствором криопротектора.

Динамическое состояние мембраны оценивали по параметрам вращательной подвижности $h_0/h_{\pm}$ и анизотропии вращения зондов ϵ , характеризующим микровязкость окружения нитроксила и несферичность вращения зонда, связанные с текучестью и структурной упорядоченностью мембраны (h_0 и $h_{\pm}$ — значения интенсивности центральной и боковых компонент спектра ЭПР). В ряде случаев рассчитывали время корреляции вращательной подвижности зонда (τ_c) [3]. Целостность мембраны определяли по методу, описанному ранее [1]. Влияние на мембраны низких температур исследовали на образцах, замороженных и оттаянных в резонаторе спектрометра со скоростью 1 — 2 град/мин.

Поверхность мембраны эритроцитов исследовали с помощью меченого в S_1 положении амида пальмитиновой кислоты (I). Этот зонд, совершающий быстрое анизотропное вращение в мембране ($\tau_c \sim 10^{-9}$ с), локализуется, по-видимому, в свободных липидах.

Нитроксильный остаток зонда находится в области полярных головок фосфолипидов и малодоступен ионам $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. Спектр ЭПР зонда I эффективно уширяется при добавлении в эритро-массу ионов Ni^{2+} , что указывает на существование отрицательного заряда вблизи поверхности мембраны [4]. Добавление уширителя в различных концентрациях

Таблица 1. Влияние криопротекторов на параметры спектров ЭПР липидных зондов в мембране эритроцитов

ЗОНД III $\epsilon_K = 0,321 \pm 0,02$ $\tau_K = (2,76 \pm 0,23) \times 10^9$ с $n = 9$			ЗОНД II $\epsilon_K = 0,23 \pm 0,03$ $\tau_K = (1,16 \pm 0,15) \times 10^9$ с $n = 7$		
Раствор крио- протектора	ϵ	$\tau_c \times$ $\times 10^9$ с	Раствор крио- протектора	ϵ	$\tau_c \times$ $\times 10^9$ с
5 % ГЛ	0,268	2,91	10 % ГЛ	0,214	1,12
5 % ПЭГ—300	0,267	3,45	10 % ПГ	0,251	0,875
5 % ПЭГ—2000	0,303	3,03	10 % ПЭГ—300	0,268	0,807
			10 % ПЭГ—2000	0,365	0,677

заметно сказывается на параметрах спектров, изменяя анизотропию вращения и увеличивая частоту вращательной подвижности зонда. Эти данные свидетельствуют о влиянии электростатических взаимодействий на динамику поверхностных областей мембраны. Стероидный зонд (II) имеет определенное сродство к мембране, вследствие чего перераспределяется между липидным бислоем и примембранными областями. Добавление уширяющего внеклеточный сигнал агента «проявляет» сигнал ЭПР от зонда, локализованного в липидах, представляющий собой суперпозицию иммобилизованного ($\tau_c \sim 10^{-8}$ с) и сравнительно расторможенного сигналов ($\tau_c \sim 10^{-9}$ с). Эффективность уширения, зависящая от глубины локализации нитроксила в мембране, выше для положительно заряженного уширителя. Перераспределение спин-меченого стероида между аннулярным и свободным липидом характеризует определенную жидкость мембраны [3]. Вид спектра ЭПР зонда (III), меченого в S_6 положении, свидетельствует о значительной несферичности вращения нитроксила, что обусловлено анизотропией самой мембраны.

При исследовании действия криопротекторов на мембраны эритроцитов при 37 °С установлено, что добавление 1—5 % раствора криопротектора слабо влияет на структуру мембраны вблизи ее поверхности, отмечается лишь тенденция к увеличению микровязкости в районе фосфолипидных головок липидов. В более гидрофобных областях мембраны (зонд III) также наблюдается некоторое увеличение микровязкости липидов, сопровождаемое изменением несферичности вращения зонда, по-видимому, в результате взаимодействия молекул криопротектора с липидами (табл. 1). Повышение концентрации криопротекторов в эритро-массе до 15 % приводит, напротив, к увеличению вращательной подвижности жирнокислотных зондов. Спектры ЭПР при этом соответствуют появлению в мембране областей с различной

микровязкостью липидов и перераспределению в них молекул зонда. Резкая трансформация спектров ЭПР спин-меченого стероида наблюдается уже при 10 % содержании криопротектора в суспензии клеток (табл. 1). Увеличение интенсивности вращения нитроксидов в области свободных липидов сопровождается уменьшением доли иммобилизованных липидов. Сравнение вязкостных зависимостей параметров спектров и эффективности уширения сигнала ЭПР в растворах криопротекторов с параметрами спектров в мембранах, находящихся в тех же условиях, позволяет сделать вывод о том, что в присутствии криопротекторов стероидный зонд локализуется как в мембране, так и в примембранном слое. Кроме того, резкое отличие параметра анизотропии вращения зонда в суспензии эритроцитов, содержащей криопротекторы (кроме глицерина), от значений этого параметра в соответствующих растворах криопротекторов свидетельствует об их взаимодействии с мембраной. Возможно, уменьшение микровязкости бислоя происходит вследствие «встраивания» молекул криопротекторов в мембраны.

Сравнительный анализ действия различных криопротекторов на мембрану позволяет распределить исследованные вещества в порядке увеличения степени эффекта: ГЛ, ПЭГ-300, ПЭГ-2000, ПГ (зонд I); ГЛ, ПЭГ-2000, ПЭГ-300 (зонд III); ГЛ, ЭГ, ПГ, ПЭГ-300, ПЭГ-2000 (зонд II). Как видно, зависимость степени влияния криопротектора от его молекулярной массы наблюдается лишь для спин-меченого стероида, что объясняется его перераспределением между мембраной и примембранной областью. Для жирнокислотных зондов отмечается более сложная зависимость, свидетельствующая о роли в модификации мембраны не только размеров молекулы криопротектора, но и его гидрофобности [4].

При понижении температуры действие криопротекторов на мембраны эритроцитов проявляется в большей степени. Анализ температурных зависимостей параметров спектров ЭПР показывает, что увеличение структурированности мембраны при охлаждении сопровождается изменением энергии активации вращения зондов, что, по-видимому, отражает изменение взаимодействия между мембранными компонентами. В присутствии криопротекторов в мембране эритроцитов изменяется характер термоиндуцированных перестроек. Сглаживание перехода при 30 °С сопровождается увеличением энергии активации вращения жирнокислотных зондов в интервале температур 37 — 25 °С (рис. 1). Структурная перестройка мембраны в районе 23 °С приводит к разным изменениям динамических параметров в зависимости от локализации зондов. Вблизи поверхности мембраны переход при 20 °С свидетельствует о дальнейшей иммобилизации липидов (рис. 2). В более гидрофобных областях при увеличении структурированности происходит, вероятно, увеличение гетерогенности липидного бислоя и, как следствие, вытеснение молекул зонда в области с меньшей микровязкостью. Общей тенденцией влияния криопротекторов на термотропные переходы в липидах мембраны является уменьшение изменений энергии активации вращения зондов в интервале температур перехода. Следует отметить, что наиболее заметно сглаживает структурные перестройки в мембране ПГ (рис. 2). Эти данные коррелируют с полученными при исследовании действия криопротектора на мембрану при физиологической температуре. Параметр несферичности вращения зонда, связанный с анизотропией мембраны, более чувствителен к охлаждению до 0 °С и, в отличие от параметра подвижности, изменяется необратимо.

Резкая трансформация спектра ЭПР зондов происходит при температуре кристаллизации внеклеточной воды. Низкомолекулярные криопротекторы заметно сглаживают действие обезвоживания на подвижность липидов вплоть до температуры затвердевания цитозоля (рис. 3).

При размораживании суспензии клеток, содержащих криопротекторы, наблюдается изменение динамики липидного бислоя. Температура структурной перестройки смещается в область более низких температур (рис. 1). Размороженные мембраны в отсутствие криопротекторов характеризуются некоторым увеличением микровязкости свободных липидов (зонд II). Присут-

ствие в эритроmasse глицерина способствует уменьшению изменений этого параметра вследствие замораживания-оттаивания. Однако криопротектор не предотвращает резкого увеличения анизотропии вращения зонда (на 40 %), которое характеризует изменение пространственной упорядоченности микроокружения нитроксидов. Необходимо отметить, что спектр ЭПР спин-меченого стероида в размороженных образцах мембран заметно уширен, возможно, в результате концентрирования нитроксидов в липидах мембраны вследствие уменьшения ее жидкости.

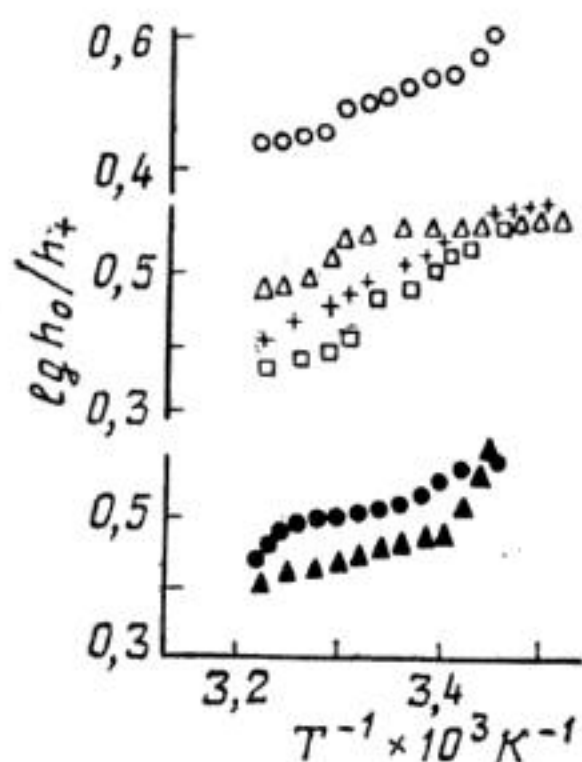


Рис. 1

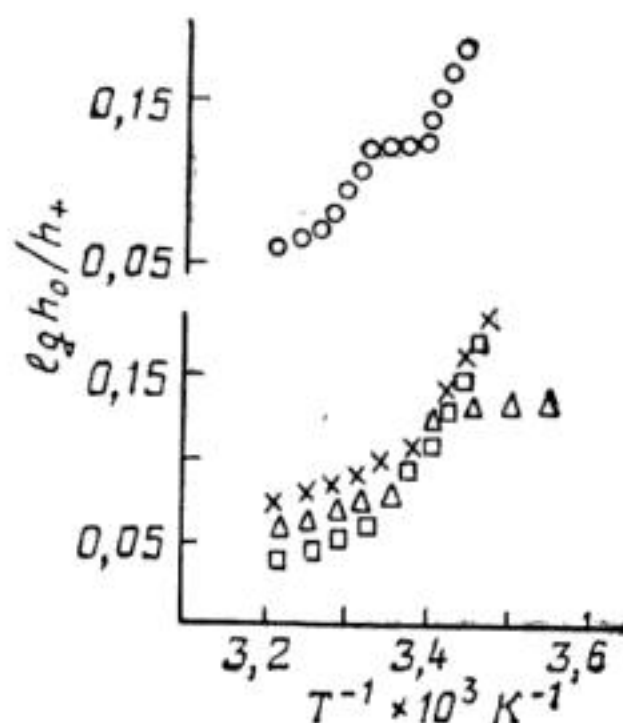


Рис. 2

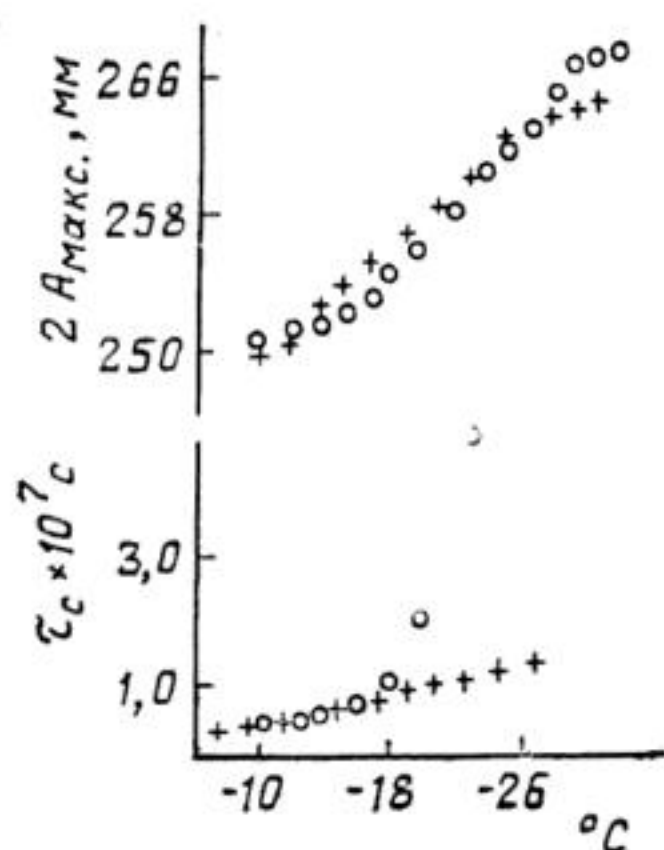


Рис. 3

Рис. 1. Аррениусовы зависимости для параметра подвижности зонда III в мембране эритроцитов в присутствии криопротекторов (15 %): контроль (○), ПГ (+), ПЭГ—300 (△, ▲), ПЭГ—2000 (□). Значки, относящиеся к размораживанию, зачернены.

Рис. 2. Аррениусовы зависимости для параметра подвижности зонда I в мембране эритроцитов в присутствии 10 % концентрации криопротекторов: контроль (○), глицерин (×), ПЭГ—300 (△), ПЭГ—2000 (□).

Рис. 3. Температурная зависимость параметра максимального расщепления спектров ($2A_{\text{макс}}$) и времени корреляции вращательной подвижности зонда III в мембране эритроцитов без (○) и в присутствии 15 % ПГ (+).

На основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы. Малые концентрации криопротекторов в суспензии клеток вызывают увеличение липид-липидных взаимодействий в мембране эритроцитов. Увеличение молекулярной массы криопротектора или его содержания в эритроmasse приводит к увеличению возмущения структуры мембраны и уменьшению микровязкости липидов в результате взаимодействия молекул криопротектора с липидами мембраны. Определенную роль во встраивании криопротекторов в бислой может играть стерическое соответствие молекул вещества размерам динамических дефектов бислоя. Присутствие криопротекторов в суспензии эритроцитов приводит к необратимости температурозависимых структурных перестроек мембраны.

1. Иванов Л. В., Моисеев В. А., Гаврилова И. И. и др. Способ определения степени деструкции клеток. А. С. 1049808 (СССР). — Оpubл. в Б. И., 1983, № 39.
2. Лихтенштейн Г. И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии. — М.: Наука, 1974. — 210 с.
3. Метод спиновых меток: Теория и применение. /Под. ред. Л. Берлинер. — М.: Мир 1979. — 639 с.

4. Черницкий Е. А., Воробей А. В. Структура и функции эритроцитарных мембран.— Минск: Наука и техника, 1981.— 216 с.
5. Kruw J., Lepock G. R., Keith A. D. The effect of fluidity of membrane lipids on freeze-thaw survival of yeast.— *Cryobiology*, 1978, 15, № 1, p. 73—79.
6. McGann L. S. Differing actions of penetrating and nonpenetrating cryoprotective agents.— *Cryobiology*, 1978, 15, № 4, p. 382—390.
7. Rule G. S., Friun J., Thompson J. E. et al. The effect of membrane lipid perturbors on survival of mammalian cells to cold.— *Cryobiology*, 1978, 15, № 4, p. 408—414.
8. Strauss G., Ingenito E. P. Stabilization of liposome belayers to freezing and thawing: effects of cryoprotective agents and membrane proteins.— *Cryobiology*, 1980, 17, № 5, p. 508—515.
9. Williams R. J., Shaw S. K.. The relationship between cell injury and osmotic volume reduction: red cell lysis correlates with cell volume rather than intracellular salt concentration.— *Cryobiology*, 1980, 17, № 6, 530—539.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР,
г. Харьков.

Поступила 21.03.85

УДК 612.014.9 : 534.121.2

А. К. Гулевский, В. В. Рязанцев, А. М. Белоус

ТРАНСПОРТ ОДНОВАЛЕНТНЫХ КАТИОНОВ В ЭРИТРОЦИТАХ ПРИ ИНКУБАЦИИ В ЗАЩИТНЫХ СРЕДАХ

Наряду с изменением физико-химических свойств среды механизм криозащитного действия криопротекторов связан с модификацией структурно-функциональных свойств плазматических мембран [9]. В результате воздействия криопротекторов проникающего и особенно непроникающего типа происходит изменение свойств их поверхности [2], структурной упорядоченности липидов [7], конформации периферических и интегральных белков [10]. Менее изучены вопросы функциональных перестроек биологических мембран в криозащитных средах, в частности касающихся изменения характеристик транспорта ионов, роль которых в реакции клеток на охлаждение, судя по имеющимся данным [4], достаточно велика.

Целью настоящего исследования является изучение состояния транспорта ^{22}Na и ^{86}Rb в эритроцитах донорской крови в растворах глицерина и полиэтиленгликоля с молекулярным весом 1500.

В опытах использована донорская кровь со сроком хранения не более 1—3 дней. Для накопления в эритроцитах ^{22}Na (отечественного производства, уд. акт. 2,4 Ки/ммоль) их инкубировали при 4 °С 2—3 суток в среде, содержащей 150 мМ NaCl (х. ч.), 10 мМ *трис*-HCl, pH 7,4 (фирмы Calbiochem), 3,7 мМ аденозина (фирмы Calbiochem). После инкубации внеклеточный ^{22}Na отмывали холодным раствором А, содержащим 150 мМ NaCl, 2 мМ MgCl_2 (о. с. ч.), 10 мМ *трис*-HCl, pH 7,4, и 5 мМ глюкозы. Клетки суспендировали в растворе Б: 150 мМ NaCl, 10 мМ KCl (о. с. ч.), 2 мМ MgCl_2 , 10 мМ *трис*-HCl, pH 7,4, 5 мМ глюкозы, а также глицерина (х. ч.) или ПЭГ-1500 (фирмы Loba) и инкубировали 1 ч при 37 °С. Для определения пассивного транспорта ^{22}Na в отдельные пробы вносили оуабайн (фирмы Calbiochem). После инкубации пробы охлаждали в ледяной бане и центрифугировали на холоде. Для определения ^{22}Na , содержащегося в межклеточном пространстве до начала инкубации, суспензию эритроцитов сразу же после внесения в инкубационную среду центрифугировали на холоде. Радиоактивность в насадочной жидкости определяли с помощью сцинтиллятора ЖС-7 (100 г нафталина, 5 г РРО, 1 л. диоксана) в сцинтилляционном счетчике ZS7800 Векман. Для изучения входа ^{86}Rb (отечественного производства, уд. акт. 23 мКи/мМ) изотоп добавляли в среду Б из расчета 1 мКи/мл и инкубировали в условиях, описанных выше. Радиоактивность проб в надосадке измеряли после предварительного отмывания клеток от внеклеточного ^{86}Rb холодным раствором А, лизиса клеток в дистиллированной воде и осаждения белков 5 %-ным раствором ТХУ.

Выделение белых теней эритроцитов и определение связывания ^3H -оуабайна (фирмы Amersham, уд. акт. 33 Ки/мМ) осуществляли как описано ранее [8, 11]. Эритроциты реконструировали и исследовали в них гидролиз АТФ по методу Виттама и др. [12]. Содержание внутриклеточного Na^+ исследовали методом пламенной фотометрии. Гематокрит проб определяли на микрогематокритной центрифуге Adams Readocrit. Статистическую обработку данных осуществляли по методу Фишера — Стьюдента.

Как известно, полиэтиленгликоль-1500 (ПЭГ-1500), в отличие от глицерина, не проникает внутрь клеток [1], что позволяет исследовать зависимость изменения ионного транспорта от присутствия криопротектора по обе стороны мембраны.

Приведенные на рис. 1 данные свидетельствуют о том, что по мере повышения концентрации в среде как глицерина, так и ПЭГ-1500, происходит

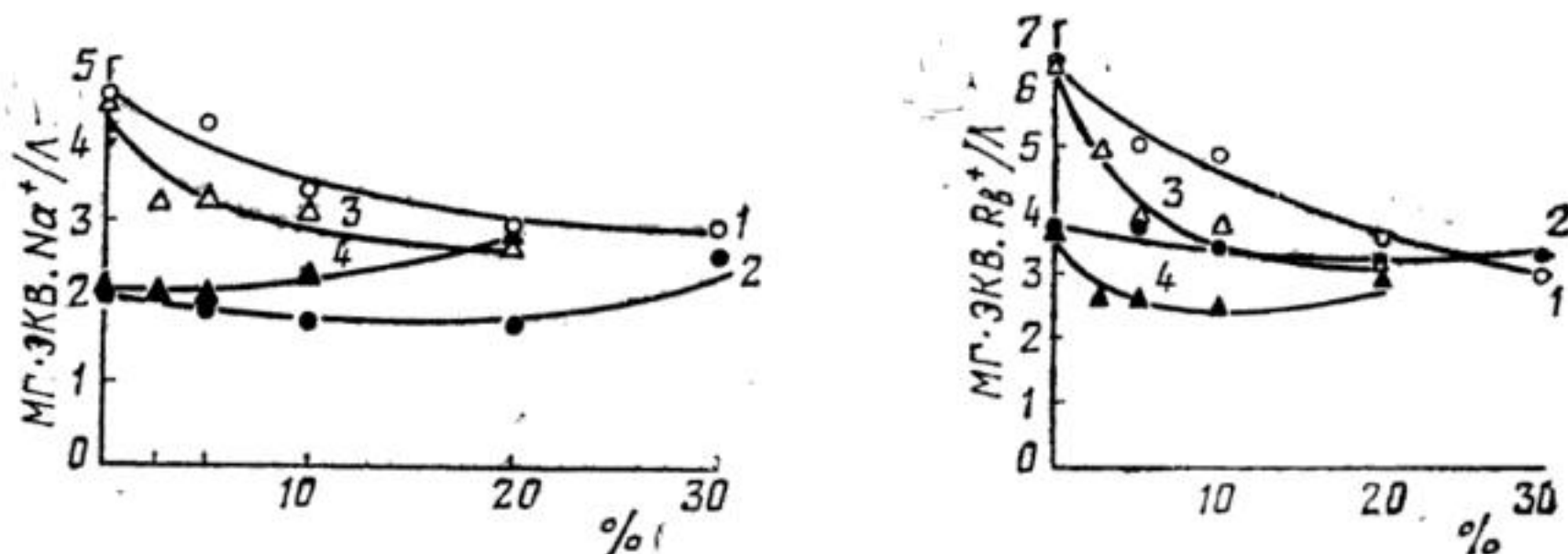


Рис. 1. Зависимость транспорта ^{22}Na из эритроцитов от содержания глицерина и ПЭГ—1500 в инкубационной среде. По оси ординат — выход ^{22}Na из эритроцитов после инкубации на протяжении 1 часа в мг-экв Na^+ на 1 л клеток. По оси абсцисс — содержание криопротектора. Инкубационная среда Б дополнительно содержала: 1) глицерин; 2) глицерин, $1 \cdot 10^{-6}$ М оуабайна; 3) ПЭГ—1500; 4) ПЭГ—1500, $1 \cdot 10^{-6}$ М оуабайна.

Рис. 2. Зависимость транспорта ^{86}Rb в эритроциты от содержания глицерина и ПЭГ—1500 в инкубационной среде. По оси ординат — вход ^{86}Rb в эритроциты после инкубации на протяжении 1 часа в мг-экв Rb^+ на 1 л клеток. По оси абсцисс — содержание криопротектора. Инкубационная среда Б дополнительно содержала: 1) глицерин; 2) глицерин, $1 \cdot 10^{-6}$ М оуабайна; 3) ПЭГ-1500; 4) ПЭГ-1500, $1 \cdot 10^{-6}$ М оуабайна.

примерно одинаковое уменьшение общего выхода ^{22}Na из клеток. Характерно то, что в обоих случаях наибольшие изменения имеют место в растворах криопротекторов с начальной концентрацией 5—10 %. В дальнейшем, несмотря на существенное увеличение содержания в растворе глицерина и ПЭГ-1500, поток внутриклеточного ^{22}Na стабилизируется. Иной характер имели изменения, выявленные при исследовании выхода ^{22}Na в присутствии $1 \cdot 10^{-6}$ М оуабайна. В данном случае наибольший выход катиона наблюдали при максимальном содержании глицерина и полиэтиленгликоля в инкубационной среде.

В последующих экспериментах, где в качестве аналога K^+ использовали ^{86}Rb [5], наблюдались изменения, сходные с описываемыми выше. Из рис. 2 видно, что в растворах глицерина, как и в растворах ПЭГ-1500, при повышении содержания криопротектора достоверно уменьшается общий вход ^{86}Rb , причем, как и для ^{22}Na , наиболее выраженные изменения происходят в растворах с начальной концентрацией глицерина и ПЭГ-1500. Это явление особенно характерно для растворов, содержащих ПЭГ-1500. В растворах глицерина уменьшение трансмембранного переноса катионов с ростом концентрации криопротектора происходит более плавно. При исследовании оуабайн-независимого входа ^{86}Rb было показано, что эти изменения носят двухфазный характер. На первом этапе, когда концентрация глицерина или ПЭГ в растворе не превышает 10—20 %, наблюдается тенденция к уменьшению входа ^{86}Rb , тогда как при дальнейшем увеличении концентрации криопротектора наблюдается тенденция к повышению исследуемого показателя. Поскольку оуабайн-независимый выход ^{22}Na и вход ^{86}Rb в извест-

ной мере отражает состояние пассивного транспорта [5] катионов, полученные результаты могут свидетельствовать об интенсификации этого процесса в криозащитной среде с большой концентрацией криопротектора. Однако имеется и альтернативное объяснение этого факта. Возможно, повышенный уровень транспорта катиона в растворах глицерина и ПЭГ-1500, содержащих оуабайн, обусловлен неполным ингибированием Na^+ -насоса вследствие конкуренции молекул глицерина и ПЭГ-1500 с гликозидом за места связывания с Na^+ - K^+ -АТФазой, что снижает эффективность его ингибирующего действия. Подобную конкуренцию за связывание с активным центром между глицерином и субстратом ряда ферментов наблюдали Мосолов и др. [6]. Можно предположить, что ложное увеличение пассивного транспорта приводит к наблюдаемому уменьшению показателя оуабайн-зависимой ком-

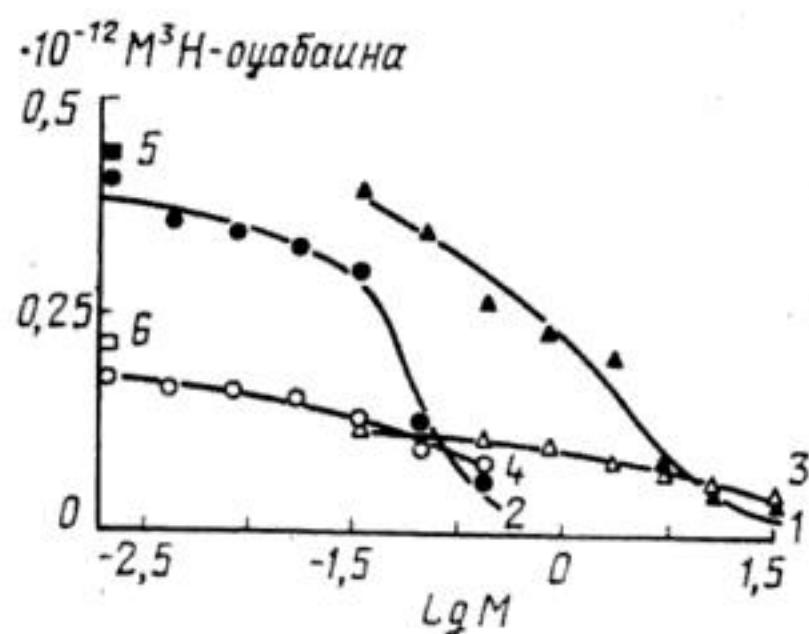
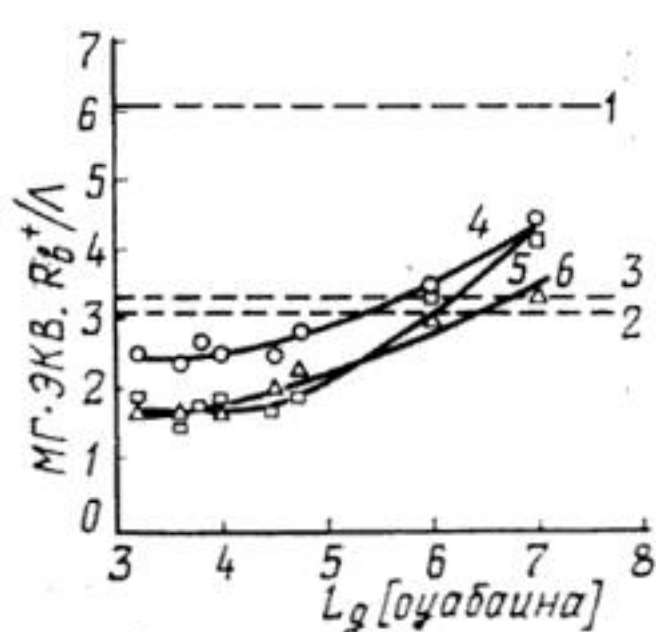


Рис. 3. Зависимость транспорта ^{86}Rb в эритроциты, суспендированные в криозащитной среде, от содержания оуабайна. По оси ординат — вход ^{86}Rb в эритроциты после инкубации на протяжении 1 часа в мг-экв Rb^+ на 1 л клеток. По оси абсцисс — содержание оуабайна. Общий вход: 1) контроль; 2) в присутствии 30 %-ного глицерина; 3) в присутствии 20 %-ного ПЭГ—1500. Среда содержала 10^{-7} — 10^{-3} М оуабайна: 4) контроль; 5) в присутствии 30 %-ного глицерина; 6) в присутствии 20 %-ного ПЭГ—1500.

Рис. 4. Связывание ^3H — оуабайна мембранами эритроцитов в криопротекторных средах. По оси абсцисс — логарифм концентрации криопротектора. Связывание ^3H -оуабайна по типу I, среда инкубации: 40 мМ NaCl ; 10 мМ трис- HCl , pH 7,4; 0,25 мМ ЭГТА, 2 мМ MgCl_2 , 0,5 мкКи ^3H -оуабайна [8] и глицерин (1) или ПЭГ—1500 (2); по типу II среда инкубации дополнительно содержала 2 мМ АТФ [8] и глицерин (3) или ПЭГ—1500 (4); контроль, I тип (5); контроль, II тип (6).

поненты, оцениваемой по разнице между значениями общего и оуабайн-независимого транспорта и отсждествляемой с величиной активного переноса катионов [5].

Высказанное предположение хорошо подтверждается экспериментами (рис. 3), в которых клетки инкубировали в криозащитных средах с различным содержанием оуабайна. Полученные результаты свидетельствуют о том, что увеличение концентрации гликозида в среде, содержащей как глицерин, так и ПЭГ-1500, приводит к значительно большему уменьшению величины оуабайн-независимой компоненты, чем в контроле, и соответствующему росту оуабайн-зависимой компоненты.

На возможность конкурентных взаимоотношений между оуабайном и исследуемыми соединениями указывает уменьшение связывания гликозида с рецепторами I и II типа мембран белых теней при увеличении содержания в растворе глицерина или ПЭГ-1500 (рис. 4). Показано [11], что связывание ^3H -оуабайна рецепторами типа I является неспецифическим, в то время как АТФ-зависимое связывание типа II — специфическим. Из приведенных данных видно, что ПЭГ-1500 в эквимоллярных концентрациях более эффективно подавляет связывание ^3H -оуабайна, чем глицерин. Однако не исключено, что обнаруженное угнетение специфического и неспецифического связывания оуабайна мембранами эритроцитов в криозащитных средах обусловлено также нарушениями гидрофобных взаимодействий, которые, как полагают [5], играют первостепенное значение во взаимодействии гли-

козида с оуабайн-связывающими центрами фермента. В этом отношении полученные данные раскрывают перспективность используемого подхода для оценки вклада различных физических сил в механизм связывания оуабайна.

Таким образом, полученные результаты показывают, что для анализа активного и пассивного транспорта катионов в криозащитных средах на основе глицерина или полиэтиленгликоля требуется концентрация ингибитора $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATФазы}$ оуабайна не менее $1 \cdot 10^{-5}\text{M}$. При исследовании транспорта ^{86}Rb в этих условиях установлено, что наблюдаемое угнетение этого процесса обусловлено как ингибированием Na^+ -насоса, так и снижением пассивной диффузии катиона (рис. 3). По-видимому, глицерин и ПЭГ-1500 вступают в конкурентные взаимоотношения с субстратами $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATФазы}$ (катионы Na^+ , K^+ , АТФ и др.) за места связывания с активными центрами либо изменяют их доступность для субстратов, модифицируя структуру воды, что приводит к неспецифическому ингибированию Na^+ -насоса. В частности, как видно

из рис. 5, инкубация реконструированных эритроцитов в присутствии возрастающих концентраций глицерина приводит к почти линейному уменьшению АТФазной активности. В среде ПЭГ-1500 наиболее интенсивные изменения АТФазной активности отмечаются в области небольших концентраций криопротектора, что указывает на различный механизм ингибирующего действия исследуемых соединений. Ингибирование $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATФазы}$, активность кото-

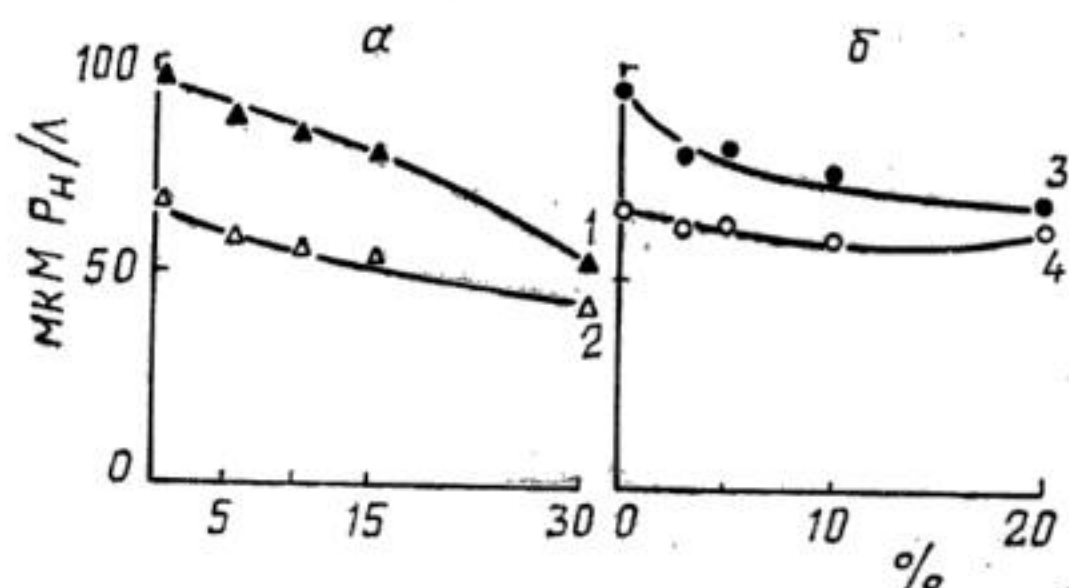


Рис. 5. Гидролиз АТФ в реконструированных эритроцитах при инкубации в криозащитной среде содержащей глицерин (а) или ПЭГ—1500 (б). 1, 3 — среда инкубации без оуабайна; 2, 4 — среда инкубации содержала $1 \cdot 10^{-5}\text{M}$ оуабайна.

рой оценивается по разнице между общей АТФазной активностью и АТФазной активностью в присутствии оуабайна, существенно изменяется под влиянием глицерина, начиная лишь с 15 %-ной концентрации. ПЭГ-1500 достоверно подавляет $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATФазу}$, как и общую АТФазную активность, даже в 5 %-ной концентрации.

Суммируя результаты проведенного исследования, можно прийти к выводу о сохранности основных механизмов транспорта одновалентных катионов при инкубации клеток в средах, содержащих значительное количество глицерина и полиэтиленгликоля. Однако при повышении концентрации криопротектора происходит ингибирование Na^+ -насоса и пассивной диффузии катионов, что обусловлено нарушением взаимодействия $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATФазы}$ с субстратами и регуляторными молекулами.

1. Белоус А. М., Шраго М. И., Пушкарь Н. С. Криоконсерванты. — Киев: Наук. думка, 1979. — 197 с.
2. Бойко Н. М., Бондаренко В. А., Белоус А. М. Влияние криопротекторов на свойства поверхности мембран митохондрий, определяемых по распределению в двух-фазных системах. — Биохимия, 1982, 47, № 5, с. 773—777.
3. Брандтс Д. Конформационные переходы белков в воде и смешанных растворителях. — В кн.: Структура и стабильность макромолекул. М.: Мир, 1973, с. 174—261.
4. Кочережская И. А. Электрические и структурные параметры эритроцитов в криозащитных растворах, содержащих полиэтиленоксид: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Харьков, 1984. — 24 с.
5. Лишко В. К. Натриевый насос биологических мембран. — Киев: Наук. думка, 1977. — 144 с.
6. Мосолов В. В., Соколова Е. В. Взаимодействие гликолей и глицерина с активным центром трипсина и химотрипсина. — Докл. АН СССР, 1972, 207, № 1, с. 18—25.
7. Boni L. T., Stewart T. B., Alderfer I. Z., Hui S. U. Lipid-polyethylene glycol interactions. II. Formation of defects in bilayers. — J. Membrane Biol., 1982, 62, N 1—2, p. 71—77.

8. Heller M., Beck S. Interactions of cardiac glycosides with cells and membranes.— Biochim. Biophys. Acta, 1978, 514, N 2, p. 332—347.
9. Pribor P. B. PVP contrasted with dextran and a multifactor theory of cryoprotection.— Cryobiology, 1974, 11, № 1, p. 60—72.
10. Pricam C., Fisher K. A., Friend D. S. Intramembranous particle distribution in human erythrocytes: effects of lysis by glutaraldehyde and poly-L-lysine.— Anat. Res., 1977, 189, N 4, p. 595—608.
11. Steck T. L. Preparation of impermeable inside-out and right-side-out vesicles from erythrocyte membranes.— In: Methods in Membrane Biology. New York; London: Plenum Press, 1974, p. 245—281.
12. Whittam R., Ager M. Vectorial aspects of adenosine triphosphatase activity in erythrocyte membranes.— Biochem. J., 1964, 93, № 2, p. 337—347.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР,
г. Харьков

Поступила 18.02.85.

УДК 536.62

Б. К. Гаврилюк

УСТОЙЧИВОСТЬ К ПОНИЖЕННОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ КУЛЬТУР КЛЕТОК И ТКАНЕЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ОРГАНОВ ЗИМОСПЯЩИХ ЖИВОТНЫХ

Согласно данным [1], в которых суммированы материалы по механизму возникновения гибернативного процесса, у зимоспящих животных появляются в крови факторы, регулирующие вход и выход из состояния зимней спячки. Однако механизмы клеточной гибернации у зимоспящих животных изучены в недостаточной степени.

Цель настоящей работы — выяснить различия в устойчивости к пониженной температуре изолированных клеток и тканей зимоспящих в сравнении с такими же клетками и тканями незимоспящих животных. Известно, что температура зимоспящих во время спячки опускается до $+4^{\circ}\text{C}$ и ниже, этот процесс связывается обычно только с механизмом центрального происхождения или с появлением в крови животных специфических веществ, перестраивающих все системы органов и тканей организма. Литературные данные о способности изолированных тканей и клеток зимоспящих переносить пониженные температуры практически отсутствуют.

В опытах использованы ткани различных органов 22-х зимоспящих длиннохвостых сусликов, находящихся в состоянии спячки и бодрствования. Устойчивость тканей зимоспящих к низкой температуре исследовали на фрагментах размером 2—4 мм³, которые инкубировали в среде Игла, содержащей 10 % сыворотки быка, и выдерживали при температуре $5 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Каждые две недели часть фрагментов забирали для определения их жизнеспособности. Взятые фрагменты ткани обрабатывали 0,25 % раствором трипсина в течение 14—16 ч при температуре $+5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ и взвесь клеток засевали в среду Игла с 10 % сыворотки крови быка во флаконах Карреля.

Во второй серии опытов изучали свойства клеток, полученных из тканей и органов 30 крапчатых и 25 длиннохвостых сусликов. Биоматериал измельчали на фрагменты величиной 2—3 мм, промывали раствором Хенкса и заливали 0,25 %-ным раствором трипсина на ночь. Полученные клетки разводили средой Игла с добавлением 10 % сыворотки крови быка до концентрации 200 тыс в 1 мл, вносили во флаконы Карреля и культивировали при 37°C в течение 6—7 суток. После образования монослоя биоматериал экспонировали при температуре $+5 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Для сравнения в качестве контроля использовались культуры клеток тканей и органов крысы, кролика, эмбриона человека, а также культуры перевиваемых клеток ВНК-21 и HeLa, которые готовили по описанной выше методике. Культуры перевиваемых клеток, полученные из Института вирусологии им. Ивановского АМН СССР, пересевались по принятой методике путем снятия с исходных флаконов смесью 0,25 % трипсина (1 часть)

и 0,02 % версена (4 части) и последующего посева в соотношении 1 : 3 в среде Игла или среде 199 с 10 % сыворотки крови быка. Во всех экспериментах использовались среды, изготовленные в Институте полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР.

Нами установлено, что ткани органов зимоспящих животных обладают значительно большей устойчивостью к существованию при пониженной температуре, чем ткани других животных. При трипсинизации ткани, проводимой после трех месяцев существования при $+5 \pm 1^\circ\text{C}$, была обнаружена возможность получения жизнеспособных клеток, которые при культивировании при 37°C могли размножаться и давать монослой. Ткани других животных такой способностью не обладали и гибли через 1—2 недели. Ткани зимоспящих животных, взятые в период бодрствования, обладали несколько меньшей жизнеспособностью по сравнению с тканями, взятыми у животных в период спячки. Монослойные культуры тканей, полученные из клеток органов зимоспящих, по сравнению с аналогичными культурами обычных животных, также показали способность к более длительному выживанию при пониженной температуре. Если клеточные культуры обычных животных и перевиваемых линий могли существовать при температуре $+5^\circ\text{C}$ лишь в течение 1 мес, то культуры клеток зимоспящих существовали в аналогичных условиях до 4 месяцев и более (таблица).

Полученные данные свидетельствуют о наличии в клетках замоспящих определенного самостоятельного механизма, обеспечивающего устойчивость клеток к пониженной температуре независимо от гуморальных факторов или регулирующего влияния центральной нервной системы.

Для выявления особенностей влияния гуморальных факторов на клетки в организме зимоспящих нами проделаны опыты со средой, содержащей вместо сыворотки крови быка сыворотку крови зимоспящих, взятую в период спячки и бодрствования. В опытах на клетках перевиваемой линии ВНК-21, помещенных в среду, содержащую сыворотку крови крапчатых сусликов, отмечалось ее сильное преципитирующее и токсическое воздействие. При культивировании клеток ВНК-21 при 37°C в среде Игла с 10 % сыворотки крови бодрствующего длиннохвостого суслика рост клеток происходил так же, как в обычной среде с сывороткой крови быка. Если к среде добавляли сыворотку спящего длиннохвостого суслика, то характер роста клеток изменялся — клетки прикреплялись к поверхности стекла, растягивались и теряли способность к размножению. Следовательно, в сыворотке крови спящих животных отсутствуют ростовые факторы, содержащиеся в организме бодрствующих животных. Очевидно, в организме животных, находящихся в состоянии спячки, эти факторы не синтезируются или синтезируются в крайне незначительном количестве. Клетки ВНК-21 в среде с сывороткой спящего суслика переживали в таком состоянии значительно более длительный срок, чем в среде с обычной сывороткой (до 3 недель при 37°C , до 6 недель при $+5^\circ\text{C}$), а в среде с сывороткой быка соответственно 2 и 4 недели. Отсутствие ростовых факторов в сыворотке сусликов, пребывающих в состоянии спячки, способствует стабилизации клеток и более длительному их переживанию. Мы полагаем, что это связано с переходом клеток в фазу $G_1—G_0$ клеточного цикла.

Т а б л и ц а. Сравнительные сроки переживания клеточных культур, полученных из органов зимоспящих и обычных животных при $+5^\circ\text{C} \pm 1^\circ$

Вид животного	Вид клеточной культуры	Сроки переживания, дни
Крапчатый суслик	Эпителий почек	120 ± 14
	фибробласты легких	120 ± 14
Длиннохвостый суслик	Эпителий почек	120 ± 14
	фибробласты почек	120 ± 14
Белая крыса	Эпителий почек	20 ± 5
	фибробласты легких	22 ± 5
Кролик	Эпителий почек	24 ± 5
Эмбрион человека	Эпителий почек	20 ± 5
	фибробласты легких	21 ± 7
Перевиваемые линии клеток	ВНК—21	25 ± 7

Таким образом, установлена способность тканей, выделенных из различных органов зимоспящих животных и полученных из них клеточных культур, длительно переносить пониженную температуру ($+5 \pm 1^\circ\text{C}$). Ткани, изолированные из организма зимоспящих животных, остаются жизнеспособными после хранения при пониженной температуре ($+5^\circ\text{C}$) до трех месяцев. Культуры клеток, полученные из органов и тканей зимоспящих, остаются жизнеспособными после хранения при пониженной температуре до 4-х и более месяцев.

Способность клеток и тканей зимоспящих оставаться жизнеспособными после хранения при пониженной температуре ($+5^\circ \pm 1^\circ\text{C}$) свидетельствует о наличии у зимоспящих животных клеточных механизмов, которые наряду с гуморальными факторами играют важную роль в их адаптации к пониженным температурам.

Pivovun E. Mammalian hibernation.—Comp. Biochem. Physiol., 1977, 58 A, N 1, p. 125—131.

Институт биологической физики
АН СССР, г. Пущино

Поступила 26.09.83

УДК 57.043 : 577.352.26.547.426.1

С. В. Руденко

НАРУШЕНИЕ ПЛАНАРНОЙ УПАКОВКИ ПЛОСКОГО ЛИПИДНОГО БИСЛОЯ ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С ГЛИЦЕРИНОМ

Глицерин относится к одному из наиболее распространенных и эффективных криопротекторов, предохраняющих биообъекты от повреждения при глубоком замораживании [2]. Однако механизм его действия на мембранном уровне не совсем ясен. Известно, что глицерин слабо влияет на свойства поверхности липидных монослоев [5] и термодинамические характеристики фазовых переходов гель—жидкий кристал в насыщенных лецитинах [6], однако оказывает определенное действие на структуру мембраны. Глицерин в высоких концентрациях приводит к формированию новой гелевой фазы, в которой углеводородные хвосты липидов противоположных монослоев проникают друг в друга [6], и значительно снижает удельную емкость плоского липидного бислоя (ПЛБ), содержащего холестерин [4]. Последнее свидетельствует также о крупномасштабных перестройках в структуре бислоя при его взаимодействии с глицерином, что важно для понимания механизмов криозащиты. В данной работе методом световой микроскопии изучались структурные перестройки ПЛБ, индуцированные глицерином.

Бислои формировали из яичного лецитина (х. ч.) и холестерина (1 : 1) на отверстии в лавсановой пленке диаметром 0,6 мм в 10 мМ растворе NaCl, pH 5,8—6,0. После добавления с одной стороны ПЛМ глицерина в конечной концентрации 2,0 М емкость бислоя, как показано [4], начинала уменьшаться. Этот процесс сопровождался появлением на гладкой поверхности ПЛБ макроскопических образований типа выпячиваний или пузырьков — пузырьковых структур (ПС) (рисунок), появление которых происходило синхронно с уменьшением емкости бислоя. Как правило, образование ПС начинается у периферии ПЛБ, захватывая сначала область, прилегающую к тору и сам тор, и далее постепенно заполняя большую часть поверхности мембраны. Граница между зоной ПС и зоной свободного бислоя, имеющая сначала довольно правильные очертания окружности, по мере роста ПС приобретает вид ломаной линии, форма которой в значительной степени зависит от условий перемешивания растворов в ячейке. Емкость ПЛБ в процессе роста ПС изменялась в 10 и более раз, а удельная электрическая

емкость ПС, вычисленная для полностью заросшего ПЛБ, равнялась $0,25 \times 10^{-3} \text{ Ф/м}^2$, в то время как его исходная емкость составляла $0,5 \cdot 10^{-2} \text{ Ф/м}^2$. ПС представляют собой достаточно лабильные образования. Они могут быть разобраны добавлением с противоположной стороны бислоя равного или большего количества глицерина, увеличением ионной силы среды



а



б



в



г



д

Последовательные фазы формирования пузырьковых структур на поверхности ПЛБ (а—г) и их разборки при добавлении 0,6 М NaCl (д).

или добавлением некоторых других веществ (1,2-пропандиола, сахарозы). Механические возмущения, например интенсивная вибрация, также приводит к частичной разборке ПС. Разборка ПС происходит несколько иначе, чем их формирование (рисунок). При добавлении агента, приводящего к разборке, происходит образование свободной зоны бислоя в центральных областях ПЛБ, как правило, в виде довольно узкой и длинной

щели. В дальнейшем происходит ее расширение и фрагментация на отдельные зоны чистого бислоя. Наблюдения ПЛБ в отраженном свете как со стороны глицерина, так и с противоположной ему стороны, где находится электролит, показывают, что картина зон ПС почти одинакова. Это, по-видимому, свидетельствует о расположении ПС по обе стороны ПЛБ. Следует отметить, что образование ПС происходит только в определенных условиях. Для мембран из яичного лецитина необходимо наличие градиента глицерина, т. е. глицерин должен находиться только с одной стороны мембраны, ионная сила среды (до 100 мМ) — относительно низкое значение, а содержание в мембране холестерина — не менее 33 мол.%. В других условиях

структурные нарушения ПЛБ не происходят. ПС, как видно из рисунка, имеют определенное сходство с линзами растворителя, часто присутствующими в ПЛБ [2]. Однако такие факты, как отсутствие колец Ньютона на ПС, растекание ПЛБ в условиях градиента глицерина и существование ПС на торе мембраны свидетельствуют о том, что наблюдаемые ПС не являются линзами растворителя. Возможно, они представляют собой везикулярную структуру (мульти- и моноламеллярные липосомы), которая формируется в ПЛБ за счет дополнительного липидного материала, находящегося в торе мембраны. При этом ПЛБ преобразуется в систему, в которой плоские участки сосуществуют с областями довольно крупных контактирующих друг с другом липосом. Значительное уменьшение емкости ПЛБ и малая удельная емкость ПС свидетельствуют о многослойности ПС, поскольку при контакте ПЛБ с монослойными везикулами суммарная емкость бислоя изменяется незначительно [1].

Таким образом, нами установлено, что при взаимодействии глицерина с ПЛБ, содержащим холестерин, происходят изменения в структуре ПЛБ, которые можно рассматривать как один из вероятных механизмов криозащитного действия глицерина. Строение пузырьковых структур, механизм их возникновения и роль инициирующих факторов требуют дальнейшего исследования.

1. Бабунашвили И. Н., Зильберштейн А. Я., Ненашев В. А. Анализ взаимодействия липосом с плоскими бислойными липидными мембранами методом блокирования ионофора. — Докл. АН СССР, 1981, 259, № 5, с. 1243—1246.
2. Криопротекторы/Н. С. Пушкарь, М. И. Шраго, А. М. Белоус, Ю. В. Калугин. — Киев: Наук. думка, 1978. — 204 с.
3. Кругляков А. М., Ровин Ю. Г. Физико-химия черных углеводородных пленок. — М.: Наука, 1978. — 183 с.
4. Руденко С. В., Гапченко С. Д., Бондаренко В. А. Влияние глицерина на емкость и проводимость бислойных липидных мембран. — Биофизика, 1984, 29, вып. 2, с. 223—226.
5. Demel D. A., Kruijff B. The function of sterol in membranes. — Biochim. Biophys. Acta, 1976, 457, № 2, p. 109—132.
6. McDaniel R. V., McIntosh T. J., Simon S. A. Nonelectrolyte substitution for water in phosphatidylcholine bilayers. — Biochim. Biophys. Acta, 1983, 731, № 1, p. 97—108.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР,
г. Харьков

Поступила 25.01.85

УДК 612.111 : 352.3

Н. М. Бойко

ВЛИЯНИЕ ТОНИЧНОСТИ СРЕДЫ И ТЕМПЕРАТУРЫ НА СВОЙСТВА КЛЕТОЧНОЙ ПОВЕРХНОСТИ

Биологические мембраны представляют собой динамические структуры, способные перестраиваться в ответ на действие различных физико-химических факторов. Сохранность клеток при замораживании в значительной степени определяется целостностью плазматической мембраны, сохранением ее функций и способностью перестраиваться в ответ на изменение условий среды. Клетка реагирует на действие такого фактора среды, как гипертония, уменьшением объема и изменением формы [1, 6]. Эти процессы сопровождаются динамическим перераспределением компонентов мембраны и могут играть важную роль в молекулярных механизмах криоповреждения клеток.

В работе изучалось состояние одного из основных белков эритроцитарной мембраны — белка полосы 3, который участвует в трансмембранном обмене сахаров и анионов, в частности хлоридов [7]. Его структура и функция контролируются спектрином, одним из важных компонентов цитоске-

лета [2]. В эксперименте оценивали динамическое поведение участков транс-мембранного белка полосы 3, расположенных на внешней поверхности мембраны. Поскольку этот белок является рецептором конканавалина А [4], изменение его доступности определяли по способности клеток агглютинировать под действием лектина в зависимости от температуры и тоничности среды. При этом параллельно контролировали изменение формы и объема клеток.

Эритроциты свежей донорской крови II группы со сроком хранения не более двух суток исследовали после трехкратного отмывания изотоническим раствором хлористого натрия, приготовленным на 10 мМ фосфатном буфере, рН 7,4. Суспензию эритроцитов инкубировали в средах с концентрацией хлористого натрия от 0,15 до 1,2 М при температуре 0 и 37 °С в течение 20 мин. Степень агглютинации эритроцитов под действием конканавалина А определяли по методу Синджера и Моррисона [9] с поправкой на гемолиз [8]. Клетки с конканавалином А в концентрации 130 мкг/мл инкубировали при перемешивании в течение 120 мин. Пробы фиксировали 0,1 %-ным раствором глutarового альдегида и методом фазово-контрастной микроскопии подсчитывали количество клеток и их форм в камере Горяева. Гематокрит определяли на микроцентрифуге МГЦ-8.

Данные, представленные на рис. 1, свидетельствуют о том, что инкубация эритроцитов человека в гипертонических солевых средах приводит к изменению способности клеток к агглютинации под действием конканавалина А. При этом наблюдается определенная закономерность, выражающаяся в том, что по мере увеличения тоничности среды до 0,45 ÷ 0,75 М NaCl резко снижается способность клеток к агглютинации под действием лектина. Обращает на себя внимание тот факт, что в условиях изотонии и небольшой гипертонии (0,3 ÷ 0,75 М NaCl) нет существенных различий между клетками, инкубированными при температуре 0 и 37 °С. Вместе с тем имеются данные о том, что клетки при 0 °С агглютинируют хуже, чем при более высоких температурах [9]. Очевидно, различия в характере агглютинации обусловлены тем, что в указанном исследовании [9] клетки инкубировали при 0 °С в течение 3 ч, в то время как в нашей работе — всего 20 мин.

Как видно из рис. 2 и показано в работах, посвященных исследованию морфологии эритроцитов [1, 6], в средах с концентрацией хлористого натрия от 0,3 до 0,75 М увеличивается число клеток эхиноцитарной формы. Значения гематокрита в указанном диапазоне концентраций хлористого натрия снижаются для эритроцитов, выдержанных как при 0 °С, так и при 37 °С (рис. 3). Возможно, уменьшение объема клеток, увеличение степени деформации мембраны и сопутствующая ей транслокация белков [6] приводят к нарушению доступности рецепторов (белок полосы 3) для конканавалина А, что, очевидно, способствует снижению степени агглютинации клеток под действием лектина в средах, содержащих хлористый натрий в концентрации 0,45—0,75 М при разных температурах инкубации. Повышение в среде концентрации хлористого натрия от 0,9 до 1,2 М позволяет выявить различия в характере агглютинации клеток, инкубированных при 0 и 37 °С (рис. 1).

Изучение морфологических особенностей эритроцитов в средах с повышенной тоничностью (рис. 2) показало, что число сфероэхиноцитов уменьшается в диапазоне концентраций электролита 0,9 — 1,05 М, а при количественном подсчете клеток выявлено незначительное количество этих форм именно в растворе 1,05 М NaCl. Кроме того, как следует из рис. 3, наблюдается увеличение объема клеток, инкубированных при 37 °С в средах с концентрацией хлористого натрия более 0,9 М, обусловленное набуханием клеток вследствие нарушения барьерной функции мембраны.

Увеличение в среде количества клеток с гладкой или близкой к гладкой поверхностями, образовавшихся в результате нарушения структуры плазматической мембраны и, возможно, ее частичной везикуляции, приводит к демаскированию белковых рецепторов и повышению вероятности контакта клеток друг с другом. Это, очевидно, и является причиной более

Высокой степени агглютинации, наблюдаемой в случае клеток, подвергнутых инкубации при 37 °С в среде, содержащей 1,05 М NaCl.

Характер агглютинации эритроцитов, инкубированных при 0 °С, отличается от картины агглютинации клеток после инкубации при 37 °С. Это, вероятно, связано с разными нарушениями белок-белковых и липид-белковых взаимодействий при 0° и 37 °С в условиях гипертонии, которые могут быть обусловлены, по крайней мере, двумя факторами: изменением заряда

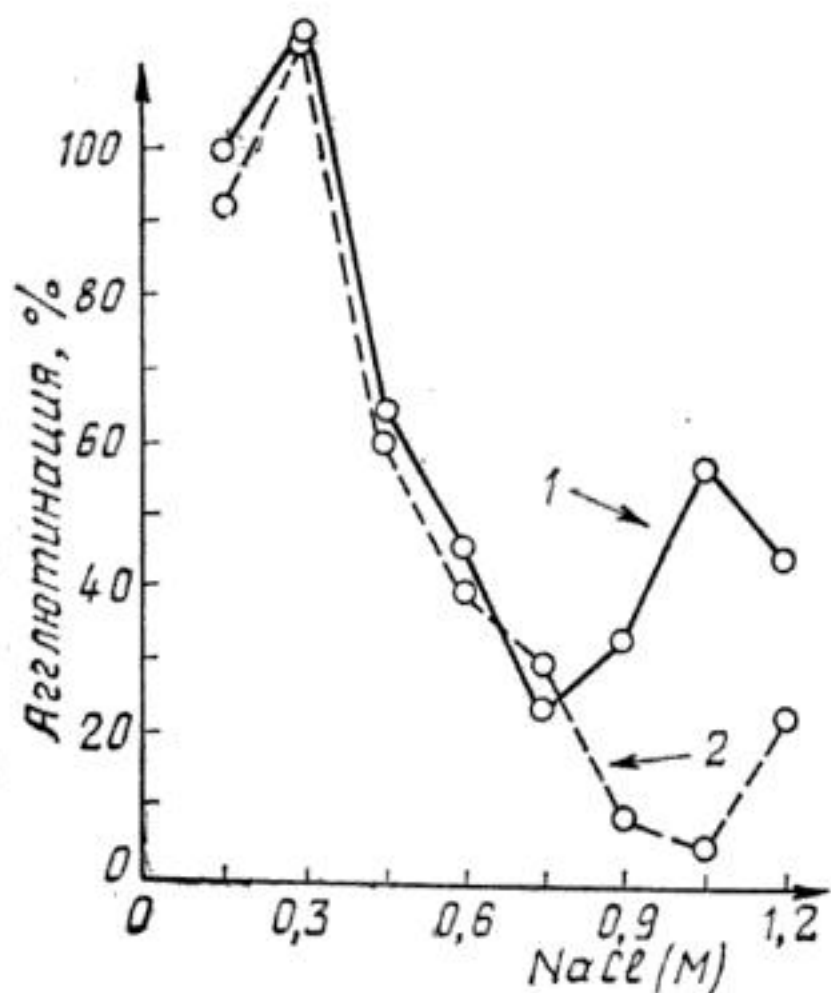


Рис. 1

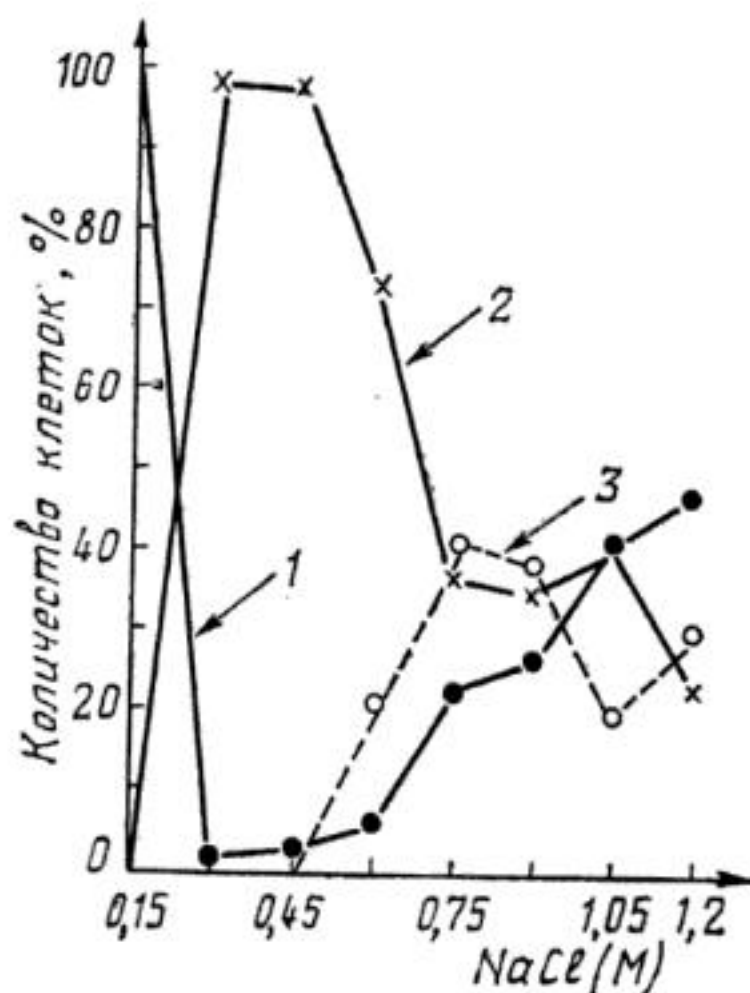


Рис. 2

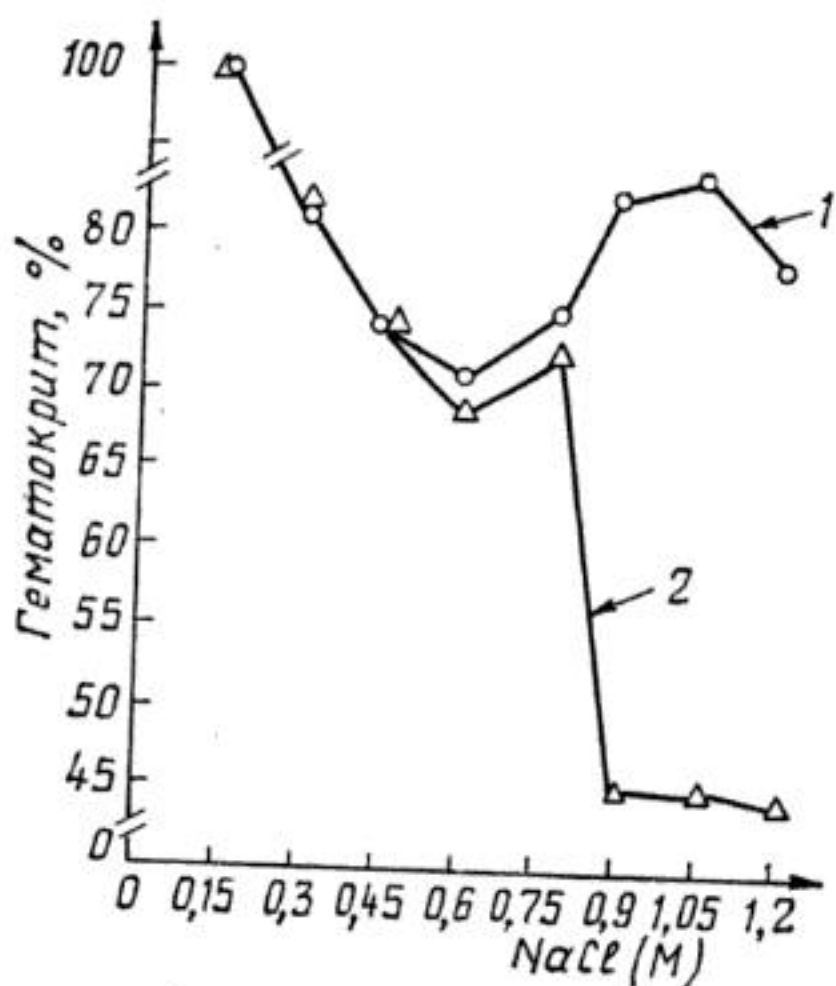


Рис. 3

Рис. 1. Действие различных концентраций хлористого натрия на степень агглютинации эритроцитов, инкубированных при 37 °С (1) и при 0 °С (2). За 100 % принята агглютинация клеток в среде с 0,15 М NaCl при 37 °С.

Рис. 2. Изменение формы эритроцитов в результате увеличения концентрации хлористого натрия в процессе инкубации при 37 °С: 1 — гладкие формы, 2 — эхиноциты, 3 — сфероэхиноциты.

Рис. 3. Изменение гематокрита эритроцитов, инкубированных в растворах с разной концентрацией хлористого натрия при 37 °С (1) и при 0 °С (2).

мембраны под действием высоких концентраций электролитов либо дестабилизирующим влиянием солей на молекулярную структуру воды, поддерживающую нативную конформацию биополимеров. Подобные нарушения, очевидно, быстрее происходят при 37 °С, чем при 0 °С. Кроме того, в области 17—20 °С в эритроцитарной мембране наблюдается изменение состояния белковых компонентов мембраны в результате, вероятно, модификации белка [3] либо структурных переходов липидов [5].

1. Белоус А. М., Бондаренко В. А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. — Киев: Наук. думка, 1982. — 256 с.
2. Benett V., Stenbuck P. J. The membrane attachment protein for spectrin in associated with band 3 human erythrocyte membranes. — Nature, 1979, 280, № 5722, p. 468—473.

3. *Brahm J.* Temperature-dependent changes of chloride transport kinetics in human red cells.— *J. Gen. Physiol.*, 1977, **70**, № 3, p. 283—306.
4. *Findlay J.* The receptor protein for concanavalin A and Lens culinaris PHA of the erythrocyte membranes.— *J. Biol. Chem.*, 1974, **249**, № 13, p. 4398—4403.
5. *Gottlieb M. H., Eanes E. D.* On phase transitions in erythrocyte membranes and extracted membrane lipids.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1974, **373**, N 3, p. 519—522.
6. *Marikovsky G., Weinstein R. S.* Lateral mobility of red cell surface charge sites. — *J. Cell. Biol.*, 1975, **67**, N 2, part 2, p. 260.
7. *Passow H., Fasold H., Lepke S., Pring M., Schuhman B.* Chemical and enzymatic modification of membrane proteins and anion transport in human red blood cells. — In: *Membrane Toxicity*/Eds. M. W. Miller and A. E. Shemoo. New York: Plenum Press, 1977, p. 353—379.
8. *Singer J. A., Morrison M.* Effect of metabolic state on phytohemagglutinin P agglutination of normal human erythrocytes.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1975, **406**, № 4, p. 553—563.
9. *Singer J. A., Morrison M.* Effect of metabolic state on agglutination of human erythrocytes by concanavalin A.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1976, **426**, N 1, p. 121—131.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР,
г. Харьков

Поступила 21.11.83

УДК 57.043 : 612.111.32

В. М. Куракса

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ В ГЕРМЕТИЧНЫХ КОНТЕЙНЕРАХ ОБЪЕМОМ 150 и 300 мл

Криоконсервация эритроцитарной массы, с учетом объема переливаемой крови, осуществляется в стальных или алюминиевых герметичных контейнерах объемом 150—500 мл [2, 4]. Известно, что повреждение клеток при криоконсервации зависит от скорости замораживания-отогрева, а также от вида и концентрации криопротектора [8]. Оптимальные скорости замораживания-отогрева, при использовании которых повреждения клеток минимальны, определяют для каждого вида и концентрации криопротектора, применяя экспериментальные контейнеры объемом в несколько миллилитров [3, 5]. Поддерживать режим, выбранный для замораживания малых объемов, при криоконсервации эритроцитов объемом 150—500 мл затруднительно, так как с увеличением объема и массы материала изменяются условия отвода и подвода тепла, что влияет на скорость изменения температуры в процессе замораживания-отогрева. Для сохранения оптимальных условий консервирования в современных контейнерах стремятся увеличивать боковую поверхность и уменьшать расстояние между стенками. В таких контейнерах существует большой температурный градиент между частями замораживаемой суспензии, находящимися в центре и прилегающими к стенкам контейнера. Таким образом, в различных участках объема скорости изменения температуры в процессе криоконсервирования неодинаковы, а объем материала, находящийся в той или иной температурной зоне, в реальных контейнерах на два порядка больше, чем в экспериментальных. Обычно сохранность клеток, как в реальных, так и в экспериментальных контейнерах, определяют только после полного размораживания всего объема криоконсервируемого материала. При этом предполагается, что повреждение клеток одинаково во всех частях объема контейнера. Влияние процедуры замораживания — отогрева на целостность эритроцитов в различных частях объема криоконсервируемой суспензии до настоящего времени не определяли.

Целью данного исследования является определение повреждения эритроцитов в разных частях объема герметичного контейнера.

Материалы и методы. Повреждение эритроцитов при консервации определяли по количеству свободного гемоглобина в надосадке проб после центрифугирования по методу М. А. Рождественской [4]. Криоконсервирование эритроцитарной массы под защитой ПЭО-1500 в 20 %-ной конечной

концентрации проводили по способу, разработанному М. И. Шраго и др. [5], в контейнерах объемом 150 и 300 мл. Для получения данных о повреждении эритроцитов при криоконсервации в различных участках герметичного контейнера в него впаивались металлические герметичные вводы, расположенные на расстоянии 50 мм друг от друга вдоль продольной оси контейнера, симметрично его геометрическому центру (рисунок). После заполнения контейнера суспензией эритроцитов в него через герметичный ввод, представляющий собой корпус 2, в котором расположены центрующие металлические шайбы 3 и герметизирующие резиновые прокладки 4, вводится металлическая игла 5 в эбонитовый корпус 6 на глубину 1 мм и 2 мм по направлению от стенки к центру. Игла фиксируется в корпусе накладной гайкой, которая при закручивании через центрующие шайбы 3 расклинивает резиновые прокладки и обеспечивает герметичность контейнера. При замораживании эритроцитарной

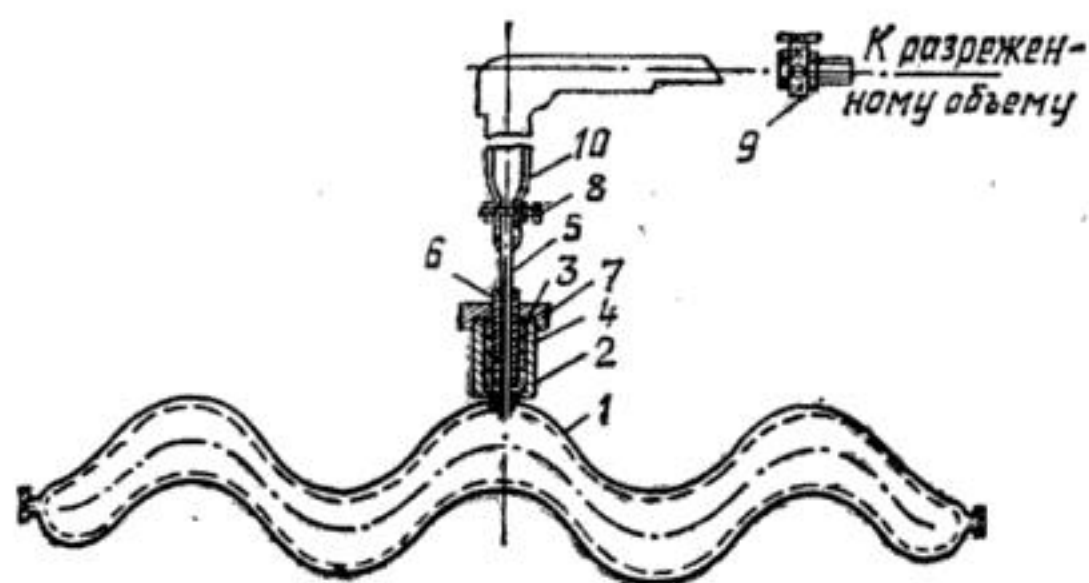


Рис. Устройство для забора проб из разных зон контейнера: 1 — контейнер; 2 — корпус герметичного ввода; 3 — центрующая металлическая шайба; 4 — герметизирующая резиновая прокладка; 5 — заборная металлическая игла; 6 — эбонитовый корпус; 7 — накладная гайка; 8 — стеклянный кран для забора суспензии; 9 — стеклянный кран для сообщения с емкостью с разреженным воздухом; 10 — мерная бюретка.

массы погружением контейнера 1 в жидкий азот кран 8 закрыт. На этапе отогрева, после перенесения контейнера в водяную баню с температурой 42°C , его непрерывно покачивают для обеспечения перемешивания размороженной эритроцитарной массы. После погружения контейнера в водяную баню открывают кран 8 и 9. При этом полость мерной бюретки 10 сообщается с емкостью, давление в которой установлено на уровне 0,8—0,9 атм. В тот момент, когда на уровне конца заборной иглы 5 замороженная суспензия эритроцитов переходит из твердого состояния в жидкое, через иглу происходит всасывание размороженной суспензии эритроцитов за счет разности давлений. Объем взятой пробы контролируется визуально. После набора 1 мл размороженной суспензии краном 8 перекрывают доступ суспензии в бюретку, а краном 9 выравнивают давление в бюретке с атмосферным. Разрежение в 0,1—0,2 атм не приводит к дополнительному повреждению клеток, что проверялось экспериментально. Таким образом последовательно с глубины 1 и 2 мм осуществляли набор проб эритроцитарной массы в процессе размораживания. Набор третьей пробы проводили после полного размораживания всей суспензии. Температура в контейнере измерялась дифференциальной медь-константановой термопарой диаметром 0,1 мм. Термопара вводилась в контейнер так, чтобы на расстоянии 25—30 мм от рабочего спая провода термопары располагались вдоль предполагаемой изотермы контейнера. Известно, что погрешности в измерении температуры вблизи поверхности с интенсивным теплообменом составляют более половины измеряемой величины [6, 7]. Поэтому термопара располагалась вдоль продольной оси контейнера в его центре, но и в этом случае погрешность достигала 30 %.

Результаты и обсуждение. На крови разных доноров в контейнерах объемом 150 и 300 мл были проведены две серии опытов по определению повреждений эритроцитов в разных зонах контейнера, находящихся на расстоянии 1 и 2 мм по направлению от стенки к центру, а также в полностью размороженной суспензии. Результаты исследований приведены в табл. 1 и 2.

Разброс в значениях количества свободного гемоглобина в надосадке проб от опыта к опыту на каждом из выбранных уровней погружения заборной иглы объясняется различием в резистентности крови разных доноров

размораживании эритроцитарной массы погружением контейнера 1 в жидкий азот кран 8 закрыт. На этапе отогрева, после перенесения контейнера в водяную баню с температурой 42°C , его непрерывно покачивают для обеспечения перемешивания размороженной эритроцитарной массы. После погружения контейнера в водяную баню открывают кран 8 и 9. При этом полость мерной бюретки 10 сообщается с емкостью, давление в которой установлено на уровне 0,8—0,9 атм. В тот момент, когда на уровне конца заборной иглы 5 замороженная суспензия эритроцитов переходит из твер-

к замораживанию. Однако в каждом из опытов наблюдается тенденция к увеличению гемолиза во второй зоне контейнера по сравнению с первой зоной и гемолизом в полностью размороженном материале в контейнерах объемом как 150 мл, так и 300 мл. Значимость различий в содержании свободного гемоглобина в надосадке проб на глубине 1 мм, 2 мм, и в контейнере в целом определяли методом парных сравнений с помощью *t*-критерия [11]. Для контейнеров объемом 150 и 300 мл с уровнем значимости 0,05 получены достоверные различия между средними арифметическими значениями свободного гемоглобина на глубине 1 и 2 мм, а также между повреждениями на глубине 2 мм и во всем размороженном материале. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в контейнере объемом 150 мл гемолиз эритроцитов увеличивается по мере удаления от стенки, а затем резко падает. Поскольку на расстоянии более 2 мм от стенок контейнера величина гемолиза

Таблица 1. Содержание свободного гемоглобина в пробах из разных зон и полностью размороженной суспензии клеток в контейнере объемом 150 мл.

Глубина погружения иглы, мм	Уровень свободного гемоглобина, мг %, в пробах по опытам				Средний уровень свободного гемоглобина, мг %, и доверительный интервал $M \pm t \cdot Sx$
	1	2	3	4	
1	68	29	90	155	85 ± 62
2	88	40	117	210	114 ± 84
В размороженной суспензии клеток	46	20	60	70	49 ± 25

Таблица 2. Содержание свободного гемоглобина в пробах из разных зон и полностью размороженной суспензии клеток в контейнере объемом 300 мл

Глубина погружения иглы, мм	Уровень свободного гемоглобина, мг %, в пробах по опытам					Средний уровень свободного гемоглобина, мг %, и доверительный интервал $M \pm t \cdot Sx$
	1	2	3	4	5	
1	93	63	162	160	177	131 ± 47
2	170	260	190	270	240	226 ± 42
В размороженной суспензии клеток	114	135	110	174	132	133 ± 24

уменьшается, то в центральной зоне гемолиз эритроцитов может быть минимальным или близким к нулю, за счет чего и происходит снижение концентрации свободного гемоглобина. Для контейнера объемом 300 мл полученные средние значения гемолиза эритроцитов на расстоянии 1 мм от стенки достоверно отличаются от показателей гемолиза во второй зоне, на расстоянии 2 мм от стенки. Показатели во второй зоне достоверно отличаются от значений гемолиза в контейнере в целом. При имеющемся разбросе различия в показателях гемолиза в первой зоне и в полностью размороженном материале для контейнеров емкостью 150 и 300 мл не значимы. Приведенные данные свидетельствуют о том, что в контейнерах объемом 150 и 300 мл гемолиз увеличивается в направлении от стенки вглубь контейнера, а затем вследствие минимального гемолиза в третьей зоне его общее значение для всей массы эритроцитов приближается к показателям гемолиза вблизи стенки.

Наличие значительных погрешностей в измерении температуры вблизи поверхности с интенсивным теплообменом препятствует корректному сопоставлению данных о повреждении эритроцитов в различных зонах контейнера. С наименьшей возможной погрешностью (30 %) была измерена температура в центре контейнеров емкостью 150 и 300 мл. В табл. 3 приведены данные, полученные при измерении скорости охлаждения в центре этих

контейнеров в различных температурных интервалах вплоть до -170°C . В интервале $-170 \div -196^{\circ}\text{C}$ происходит медленное выравнивание тем-

Таблица 3.
Скорость охлаждения
в центре контейнеров
объемом 150 и 300 мл

Интервал температур, $^{\circ}\text{C}$	Скорость охлаждения, $^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, $V = 150$ мл	Скорость охлаждения, $^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, $V = 300$ мл
$+20 \div -10$	47	46
$-10 \div -16$	16	12
$-16 \div -80$	100	80
$-80 \div -170$	240	229

пературы контейнера с температурой азотной ванны. Из табл. 3 видно, что, в пределах погрешности, скорости охлаждения в центре контейнеров объемом 150 и 300 мл близки по значению.

Таким образом, в стальном герметичном контейнере, расстояние между стенками которого равно 6 мм, существуют три зоны повреждения криоконсервируемых эритроцитов. Величина гемолиза эритроцитов во второй зоне выше, чем в первой, и минимальна в третьей зоне, расположенной в центральной части контейнера. По-видимому, именно в этой зоне достигаются оптимальные условия криоконсервации эритроцитов. Предложенный способ забора криоконсервированных эритроцитов из герметичного контейнера в процессе отогрева позволяет получить данные о повреждении эритроцитов в различных зонах криоконсервируемого объекта. Полученные данные могут быть использованы для выбора оптимальных режимов криоконсервации и конструкции контейнеров.

1. Закс Л. Статистическое оценивание. — М.: Статистика, 1976. — 598 с.
2. Методы долгосрочного хранения в замороженном состоянии эритроцитов, предназначенных для трансфузий: Метод рекоменд./МЗ СССР. — М., 1980. — 25 с.
3. Пушкарь Н. С., Шраго М. И., Бредихина Л. П. и др. А. с. 560613 (СССР). Способ консервирования эритроцитов. — Оpubл. в Б. И., 1977, № 21.
4. Рождественская М. А. Определение гемоглобина в плазме консервированной крови. — Актуальные вопросы переливания крови, М., 1955, вып. 2, с. 55—57.
5. Шраго М. И., Бредихина Л. П., Тимченко В. Г. и др. Полиэтиленоксиды в низкотемпературном консервировании эритроцитов (итоги и перспективы). — Криобиология и криомедицина, 1978, вып. 4, с. 38—45.
6. Baker H. D., Reyder E. A., Baker N. Temperature Measurement in Engineering, vol. 1. — New York: Wiley, 1983. — 187 p.
7. Jakob M. Heat Transfer. vol. 2. — New York: Wiley, 1957. — 230 p.
8. Miller R. H., Mazur P. Survival of frozen-thawed human red cells as a function of cooling and warming velocities. — Cryobiology, 1976, 13, № 4, p. 404—414.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР,
г. Харьков

Поступила 27.10.83

УДК 51.043.615.387 : 547

А. Н. Гольцев, А. А. Цуцаева, Т. Г. Дубрава, Л. В. Останкова

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ КОЕ_c КОНСЕРВИРОВАННОГО КОСТНОГО МОЗГА, ОБРАБОТАННОГО ОКСИМОЧЕВИНОЙ И ³Н-ТИМИДИНОМ

В процессе низкотемпературного консервирования костного мозга отмечается гибель части клеток, формирующих гемопоэтические колонии в селезенке облученных реципиентов, КОЕ_c [3], обусловленная влиянием на них физико-химических факторов низкотемпературного консервирования. Степень этого влияния может зависеть от многих условий: скорости замораживания-оттаивания, вида и концентрации криопротектора, среды замораживания и т. д. [4, 3].

Возможно также, что гибель некоторой части КОЕ_c обусловлена гетерогенностью данной популяции клеток по функциональным свойствам, а именно пребыванием в состоянии пролиферации или покоя. Вступая в клеточный цикл, стволовые клетки приобретают новые физические характеристики [2], и в этой связи возможно изменение их устойчивости к низкотем-

пературному консервированию. Известно, например, что у многих клеточных линий устойчивость к действию радиации зависит от фазы клеточного цикла [8]. Весьма противоречивы данные о такой зависимости для кроветворных клеток [7]. Данные о криочувствительности кроветворных клеток, находящихся в различном исходном состоянии, практически отсутствуют. Целью настоящего исследования было изучение влияния низкотемпературного консервирования на сохранность КОЕ_с в клеточном цикле или в состоянии покоя.

Реципиентами и донорами костного мозга были мыши (СВА × × С57В1)F₁ 8—12-недельного возраста. Получение, криоконсервирование и введение костного мозга проводили по методу, описанному ранее [3]. КОЕ_с, находящиеся в S-фазе клеточного цикла, элиминировали с помощью препарата оксимочевина (ОМ) или ³H-тимидина. В опытах *in vivo* ОМ вводили внутрибрюшинно донорам костного мозга (из расчета 0,8 мг/г веса животного) однократно или двукратно с интервалом 9 ч. Костный мозг извлекали через 9 ч после однократного введения или спустя 2 ч после повторного введения ОМ. Обработку костного мозга *in vitro* проводили ОМ в концентрации 10 мМ на 1 мл суспензии в течение 1,5 ч при 37 °С. В опытах *in vitro* клетки в S-фазе элиминировали методом тимидинового самоубийства [6]. После инкубирования суспензию центрифугировали и ресуспендировали осадок, доводя до необходимой концентрации. Процент клеток в S-фазе определяли по формуле $(A-B)/A \cdot 100 \%$, где A — число колоний после трансплантации костного мозга, не обработанного препаратами, B — обработанного препаратами. Колониеобразующую способность интактного, обработанного ОМ или ³H-тимидином костного мозга определяли по методу Тилла и Мак-Каллоха [9] на 8—9 сутки после трансплантации нативных и на 11—12 сутки — криоконсервированных миелокариоцитов. Полученные данные обработаны статистически по методу Стьюдента—Фишера [1].

После введения костного мозга, криоконсервированного под защитой ПЭО-400, в селезенках реципиентов формировалось достоверно меньшее число гемопоэтических колоний, чем при трансплантации нативного костного мозга. Даже на 10-е сутки процент колоний дифференцированного типа в селезенках реципиентов данной группы был значительно ниже, чем у мышей с нативным миелотрансплантатом на 8-е сутки (70,8 и 86,2 %, соответственно); в большинстве дифференцированные колонии были эритроидного типа; соотношение колоний эритроидно-гранулоцитарного типа составило 4,5 : 1. После обработки суспензии *in vitro* ОМ или ³H-тимидином содержание КОЕ_с в костном мозге снижалось примерно на одну и ту же величину (~17 %) (табл. 1, 2). Число микроколоний, учтенное на гистологических препаратах, снижалось еще в большей степени, на 31 %, что может быть обусловлено содержанием большего числа клеток, формирующих микроколонии в S-фазе клеточного цикла. После трансплантации криоконсервированного костного мозга число визуально определяемых колоний в селезенках реципиентов также уменьшалось по сравнению с теми, которым вводили только обработанный препаратом костный мозг. Процент снижения количества колоний у животных с трансплантатом криоконсервированного и криоконсервированного после обработки Н-тимидином костного мозга был примерно одинаковым (табл. 2). Абсолютное большинство колоний в селезенках мышей с трансплантатом обработанного ³H-тимидином и криоконсервированного костного мозга было недифференцированного типа.

Если суспензию миелокариоцитов перед низкотемпературным консервированием выдерживали при 37 °С с ОМ или без нее в течение 1,5 ч, содержание КОЕ_с после криоконсервирования значительно снижалось и после трансплантации этих суспензий в селезенках реципиентов определялось незначительное число колоний (табл. 1). Снижение числа КОЕ_с подтвердилось и при гистологическом исследовании селезенки. Содержание микроколоний в селезенках реципиентов, которым трансплантировали костный мозг, инкубированный в течение 90 мин до криоконсервирования,

составляло 14—20% от контроля (нативный костный мозг), из которых только 68,5% составляли дифференцированные колонии, преимущественно эритроидного типа. При инкубировании миелокариоцитов в течение 30 мин существенного повышения криочувствительности КОЕ_с не отмечалось. Выраженное снижение числа колоний в селезенке реципиентов с трансплантатом криоконсервированного после предварительной инкубации в течение 90 мин

Таблица 1. Влияние криоконсервирования на содержание КОЕ_с в интактном и обработанном *in vitro* оксимочевинной (ОМ) костном мозге

№ гр.	Условия эксперимента: трансплантация костного мозга	Количество введенных клеток реципиенту ($\times 10^5$)	Количество колоний в селезенке		Изменение содержания КОЕ _с в селезенках реципиентов, %
			М	$\pm \bar{Sx}$	
I.	Нативного	1,5	12,3	0,5	> на 20,0 в сравнении с I-й группой *
II.	Нативного, инкубированного без ОМ **	1,5	14,7	0,9	
III.	Нативного, инкубированного с ОМ	1,5	12,3	0,5	< на 16,4 в сравнении со II-й группой *
IV.	Криоконсервированного	1,5	9,0	0,7	< на 27,8 в сравнении с I-й группой *
V.	Криоконсервированного, предварительно инкубированного без ОМ	1,5	3,0	0,3	< на 79,6 в сравнении со II-й группой *
VI.	Криоконсервированного, предварительно инкубированного с ОМ	1,5	2,2	0,3	< на 82,1 в сравнении с III-й группой *
VII.	Без трансплантата	—	0,2	0,1	—

Примечание. ** — костный мозг инкубировали в течение 1,5 часов при 37 °С.
* — сравниваемые показатели имеют достоверные различия.

Таблица 2. Влияние криоконсервирования на содержание КОЕ_с в интактном и обработанном *in vitro* ³H-тимидином костном мозге

№ гр.	Условия эксперимента: трансплантация костного мозга	Количес- тво вве- денных клеток ($\times 10^5$)	Количество колоний на селезенку		Снижение содержания КОЕ _с в селезенках реципиентов, %
			$M \pm \bar{Sx}$		
1	Нативного	1,5	15,8	1,2	—
2	Нативного, обработанно- го 3H -тимидином	1,5	13,1	0,7	17,1 — в сравнении с I-й груп- пой
3	Криоконсервированного	1,5	10,8	0,9	31,7 — в сравнении с I-й груп- пой *
4	Криоконсервированного, предварительно обрабо- танного 3H -тимидином	1,5	8,4	0,7	35,9 — в сравнении со II-й группой *
5	Без трансплантата	1,5	0,3	0,1	—

Примечание. * — Сравниваемые показатели имеют достоверные различия.

костного мозга нельзя объяснить отрицательным влиянием самого процесса инкубации на КОЕ_с, так как колониеобразующая способность миелокариоцитов не только не снижалась, но даже повышалась (табл. 2).

Параллельно во всех образцах определяли количество сохранных и ядродержащих клеток, а также морфологический состав суспензии. После инкубации костного мозга с ОМ или без нее количество сохранных клеток достоверно не изменялось (табл. 3); число ядерных клеток несколько снижалось в обоих случаях, характер миелограмм при этом не изменялся.

Таблица 3 Влияние криоконсервирования на сохранность клеток костного мозга, инкубированного при 37 °С

Показатель	Костный мозг														
	Нативный (интактный)	Консервированный	% снижения	Инкубированный при 37 °С без ОМ			Инкубированный при 37 °С с ОМ			Инкубированный при 37 °С с криоконсервированием			Инкубированный при -37 °С с ОМ с криоконсервированием		
				до инкубации	после инкубации	% снижения	до инкубации	после инкубации	% снижения	до инкубации	после инкубации	% снижения	до инкубации	после инкубации	% снижения
Количество ядерных клеток на 1 мл ($\times 10^6$)	7,5	7,5	—	5,0	4,8	4	5,0	4,7	6	6,2	6,1	2	6,2	6,2	—
Сохранность (окраска суправитальным красителем), %	95	84	11	88	89	—	88	86	2	91,3	67,7	25,9	86	53	38,4

Примечание. Костный мозг инкубировали при 37 °С в течение 1,5 часов; ОМ — оксимочевина.

Криоконсервирование инкубированного (как с ОМ, так и без нее) костного мозга не вызывало достоверного снижения ядродержащих клеток в суспензии (как и в интактном костном мозге), однако содержание сохранных клеток в этих образцах значительно уменьшалось. При этом, как сказано выше, значительно возрастал процент погибших КОЕ_с (на 35 % при криоконсервировании интактного костного мозга и на 80 % — инкубированного при 37 °С).

В следующей серии экспериментов проводилось сравнительное изучение влияния криоконсервирования на свойства КОЕ_с костного мозга, обработанного ОМ *in vivo*. При трансплантации костного мозга, обработанного ОМ однократно, количество колоний в селезенках реципиентов существенно не отличалось от показателей, полученных при трансплантации интактного костного мозга. Однако после введения костного мозга, обработанного ОМ двукратно, в селезенках реципиентов формировалось значительно меньшее число колоний, чем при трансплантации костного мозга здоровых мышей. Поскольку через 2 ч после введения ОМ в выбранной нами дозе, в костном мозге погибает фракция КОЕ_с, находящихся в S-фазе [10], спустя 9 ч с момента первого введения ОМ содержание КОЕ_с в S-фазе значительно повышается в сравнении с интактным костным мозгом, тогда как его колониеобразующая способность к этому времени не изменяется. По-видимому, увеличение содержания КОЕ_с в S-фазе в общей популяции КОЕ_с не является обязательным условием повышения его колониеобразующей способности, что подтвердилось результатами работ Фринделя [5], в которых автор, изучая кинетику пролиферации КОЕ_с под влиянием костномозговых экстрактов на фоне значительного увеличения (по сравнению с интактным костным мозгом) процентного содержания КОЕ_с в S-фазе в стимулированном костном мозге, не наблюдал повышения его колониеобразующей способности.

После криоконсервирования миелокариоцитов, обработанных *in vivo* ОМ двукратно, количество КОЕ_с достоверно снижалось по сравнению с исходным содержанием этих клеток в суспензии до криоконсервирования (табл. 4). Количество КОЕ_с снижалось также и после криоконсервирования костного мозга, полученного через 9 ч после однократного введения ОМ. В таких условиях криоконсервированию подвергали костный мозг, в котором содержание КОЕ_с в S-фазе цикла было разным. Однако после криоконсервирования каждой суспензии отмечалась гибель примерно равной части КОЕ_с. Результаты гистологических исследований свидетельствуют о том,

Таблица 4. Влияние криоконсервирования на содержание КОЕ_с в интактном и обработанном *in vivo* оксимочевинной (ОМ) костном мозге

№ гр.	Условия эксперимента: трансплантация костного мозга	Количество введенных клеток ($\times 10^5$) ^a	Количество колоний на селезенку $M \pm Sx$		Снижение содержания КОЕ _с в селезенках реципиентов, %
I	Нативного	1,5	15,2	1,1	—
II	Нативного, обработанного ОМ двукратно	1,5	10,4	1,2	31,6 — в сравнении с I группой *
III	Нативного, обработанного ОМ однократно	1,5	16,3	1,9	—
IV	Криоконсервированного	1,5	9,8	0,8	35,5 — в сравнении с группой *
V	Криоконсервированного, предварительно обработанного ОМ двукратно	1,5	6,4	0,9	39,5 — в сравнении со II-й группой *
VI	Криоконсервированного, предварительно обработанного ОМ однократно	1,5	9,2	0,8	42,9 — в сравнении с III-й группой *
VII	Без трансплантации	—	0,4	0,1	—

Примечание. * — Сравнимые результаты имеют достоверные различия.

что после трансплантации миелокариоцитов мышей, которым ОМ вводили дважды, больше половины колоний в селезенках были недифференцированного типа (53,1 %), а дифференцированные колонии на 92,3 % — эритроидного типа. После трансплантации криоконсервированного костного мозга, полученного от доноров, дважды обработанных ОМ, в селезенках реципиентов определялись в абсолютном большинстве недифференцированные колонии.

Таким образом, после криоконсервирования содержание КОЕ_с в суспензии миелокариоцитов снижается в равной степени, независимо от количественного содержания КОЕ_с в S-фазе клеточного цикла, т. е. криочувствительность КОЕ_с, находящихся в S-фазе цикла, существенно не отличается от чувствительности клеток, находящихся в состоянии покоя или длительного G₁-периода. В то же время криочувствительность КОЕ_с может существенно изменяться под влиянием экспозиции суспензии миелокариоцитов при 37 °С в течение 1,5 часов, которая приводит к снижению устойчивости КОЕ_с к действию низких температур и гибели. Наблюдаемый эффект не обусловлен действием ОМ, так как проявляется и при инкубации суспензии без этого препарата. Установление причин, вызывающих изменение криоустойчивости кроветворных клеток, позволит, вероятно, определить структурно-функциональные параметры КОЕ_с, характеризующие популяции клеток, устойчивых к холоду и присутствующих в суспензии миелокариоцитов.

1. Ашмарин И. П., Воробьева П. А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. — Л.: Медгиз, 1962. — 180 с.
2. Козлов В. П., Журавкин И. Н., Цырлова И. Г. Стволовая кроветворная клетка и иммунный ответ. — Новосибирск: Наука, Сибирское отделение, 1982. — 221 с.
3. Криоконсервирование клеточных суспензий/Под ред. А. А. Цуцаевой. — Киев: Наук. думка, 1983. — 240 с.
4. Федотенков А. Г., Данилова Л. А., Алексеева Л. П. Влияние различных режимов замораживания на пролиферативную активность и дифференцировку родоначальных клеток костного мозга. — Пробл. гематологии и переливания крови, 1981, № 8, с. 21—25.
5. Фриндель Э. Факторы, стимулирующие и ингибирующие костномозговые стволовые клетки мышей. — В кн.: Стволовые и иммунокомпетентные клетки в норме и при опухолевом росте. Киев: Наук. думка, 1981, с. 45—53.
6. Becker A., McCulloch E., Siminovich L., Till J. The effect of differing demands for blood cell production on DNA synthesis by hemopoietic colony-forming cells of mice. — Blood, 1965, 26, N 2, p. 296—271.

7. Broxmeyer H. E., Galbraits P., Baker F. Relationship of colony-stimulating activity to apparent kill of human colony forming cells by irradiation and hydroxyurea. — Blood, 1976, 47, № 3, p. 403—411.
8. Iliakis G., Nisse M. Evidence that repair and expression of potentially lethal damage cause variations in cell survival after X-irradiation observed through the cell cycle in Ehrlich ascites tumor cells. — Rad. Res., 1983, 95, N 1, p. 87—107.
9. Till J., McCulloch E. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. — Rad. Res., 1961, 14, N 12, p. 231—233.
10. Vassort F., Winterholer M., Frindel E., Tubiana M. Kinetic parameters of bone marrow stem cells using *in vivo* suicide by tritiated thymidine or by hydroxyurea. — Blood, 1973, 41, N 6, p. 789—796.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР,
г. Харьков

Поступила 04.06.84

УДК 577.37

Е. А. Гордиенко, М. В. Воинова

ФИЗИКО-МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ЛАТЕРАЛЬНОГО ПЕРЕРАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ПРИ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ ДЕФОРМАЦИИ ЗАМКНУТОЙ БИСЛОЙНОЙ МЕМБРАНЫ

В работах В. С. Маркина [5, 6] сформулирована аналитическая модель, описывающая взаимосвязь химического состава и механических свойств многокомпонентной однослойной мембраны. В отличие от указанной, построенная нами модель, во-первых, учитывает тот факт, что липидные мембраны состоят не из одного, а из двух монослоев; во-вторых, то, что площадь, приходящаяся на одну молекулу в какой-либо элементарной области мембранного слоя, изменяется не только за счет деформации, но и вследствие изменения концентрации мембранных компонентов в ней; в-третьих, наша модель не опирается на приемлемое только для монослойной (но не бислойной) мембраны представление о конической форме (спонтанной кривизне) отдельных молекул.

Согласно теории упругости [3], отношение энергии изгиба оболочки, имеющей толщину h_1 , к энергии растяжения — сжатия по порядку величины равно $(h_1 H)^2$, где H — средняя кривизна оболочки в рассматриваемой точке. В связи с чрезвычайно малой толщиной, которая в рамках нашей модели считается нулевой, отдельно взятый молекулярный липидный слой не способен сопротивляться изгибу до тех пор, пока выполняется неравенство $h_1 H \ll 1$, то есть до тех пор, пока физические свойства слоя вдоль его поверхности можно рассматривать как меняющиеся непрерывно. В то же время он оказывает значительное сопротивление изотропному растяжению или сжатию в плоскости слоя.

Обозначим через K_i поверхностный модуль изотермического сжатия i -го компонента, определяющийся соотношением

$$\sigma = K_i \Delta s_i / \tilde{s}_i, \quad (1)$$

где $\tilde{s}_i$ — площадь, которую занимает в мембранном монослое молекула i -го сорта при отсутствии внешних сил; Δs_i — изменение площади молекулы i -го сорта под влиянием всестороннего сжатия или растяжения σ в плоскости слоя. Здесь и в дальнейшем волной отмечены величины при отсутствии напряжений в слое, а отклонение какой-либо величины A от значения, которое она имела в этом состоянии, обозначается через $\Delta A = A - \bar{A}$. В соотношении (1) не учитывается то обстоятельство, что деформация слоя может появляться вследствие перераспределения частиц, из которых он состоит, даже при отсутствии внешних сил. Учитывая это, вместо (1) имеем

$$\sigma = K_i \Delta s_i / \tilde{s}_i + \sum_{j=1}^{n-1} \alpha_{ij} \Delta c_j, \quad (2)$$

где

$$\alpha_{ij} = -K_i \frac{\partial \tilde{s}_i}{\partial c_j} / \tilde{s}_i, \quad c_j = n_j/N$$

— молекулярная концентрация j -го компонента; n_j и N — число молекул j -го сорта и общее количество молекул на единице площади монослоя. Из (2) с помощью соотношения

$$\Delta s = \sum_{j=1}^{n-1} \frac{\partial \tilde{s}}{\partial c_j} \Delta c_j = \sum_{i=1}^n c_i \Delta s_i = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^{n-1} \tilde{c}_i \frac{\partial \tilde{s}_i}{\partial c_j} \Delta c_j, \quad (3)$$

где S — средняя площадь, приходящаяся на одну молекулу в мембранном монослое, с точностью до членов первого порядка относительно Δc_i получаем закон Гука в следующем виде

$$\sigma = K' \left[\frac{\Delta s}{\tilde{s}} - \sum_{j=1}^{n-1} \frac{1}{\tilde{s}} \frac{\partial \tilde{s}}{\partial c_j} \Delta c_j \right], \quad (4)$$

где

$$K' = 1 / \sum_{i=1}^n \frac{c_i \tilde{s}_i}{\tilde{s} K_i}$$

— эффективный модуль упругости монослоя, состоящего из молекул n сортов. Плотность свободной энергии деформации монослоя определяется как

$$F'_{\text{деф}} = \frac{1}{2} \sigma \frac{\Delta s}{\tilde{s}} = \frac{K'}{2} \frac{\Delta s}{\tilde{s}} \left[\frac{\Delta s}{\tilde{s}} - \frac{1}{\tilde{s}} \sum_{j=1}^{n-1} \frac{\partial \tilde{s}}{\partial c_j} (c_j - \tilde{c}_j) \right]. \quad (5)$$

Плотность свободной энергии деформации бислоя является суммой свободных энергий деформации внешнего и внутреннего монослоев:

$$F''_{\text{деф}} = \frac{K'_{\text{ext}}}{2} \frac{\Delta s_{\text{ext}}}{\tilde{s}_{\text{ext}}} \left[\frac{\Delta s_{\text{ext}}}{\tilde{s}_{\text{ext}}} - \frac{1}{\tilde{s}_{\text{ext}}} \sum_{j=1}^{n-1} \frac{\partial \tilde{s}_{\text{ext}}}{\partial c_j} (c_j^{\text{ext}} - \tilde{c}_j^{\text{ext}}) \right] + \frac{K'_{\text{in}}}{2} \frac{\Delta s_{\text{in}}}{\tilde{s}_{\text{in}}} \left[\frac{\Delta s_{\text{in}}}{\tilde{s}_{\text{in}}} - \frac{1}{\tilde{s}_{\text{in}}} \sum_{j=1}^{n-1} \frac{\partial \tilde{s}_{\text{in}}}{\partial c_j} (c_j^{\text{in}} - \tilde{c}_j^{\text{in}}) \right], \quad (6)$$

где индексы ext и in относятся к величинам внешнего и внутреннего слоев мембраны. В качестве начального недеформированного состояния естественно принять состояние, в котором концентрации компонентов во внешнем и внутреннем монослоях плоского бислоя одинаковы и постоянны вдоль плоскости слоев. Тогда

$$\tilde{c}_j^{\text{ext}} = \tilde{c}_j^{\text{in}} = \tilde{c}, \quad \frac{\partial \tilde{s}^{\text{ext}}}{\partial c_j} = \frac{\partial \tilde{s}^{\text{in}}}{\partial c_j} = \frac{\partial \tilde{s}}{\partial c_j}, \\ \tilde{s}^{\text{ext}} = \tilde{s}^{\text{in}} = \tilde{s}$$

Изогнем бислой так, как показано на рис. 1. При этом элемент внешнего монослоя, который в начальном состоянии был равен $d\tilde{s}$, растянется и станет равным [7]

$$d\tilde{s}^{\text{ext}} = ds(1 + 2h^{\text{ext}}H), \quad (7)$$

а элемент внутреннего монослоя сожмется и станет равным

$$ds^{\text{in}} = d\tilde{s}(1 - 2h^{\text{in}}H), \quad (8)$$

где через h^{ext} и h^{in} обозначены расстояния от внешнего и внутреннего монослоя (которые в рамках формулируемой модели рассматриваются как не

имеющие толщины двумерные поверхности) до так называемой нейтральной поверхности в рассматриваемой точке (нейтральная поверхность на рис. 1 показана пунктирной линией); H — средняя кривизна нейтральной поверхности в рассматриваемой точке. Если элемент площади нейтральной поверхности $d\tilde{s}$ остается таким же, как и в недеформированном начальном состоянии, то деформация бислоя в этом случае называется изгибанием. Положение нейтральной поверхности, касательная плоскость которой является плоскостью действия натяжения для бислоя в целом, определяется условием:

$$K_{\text{ext}}h_{\text{ext}} = K_{\text{in}}h_{\text{in}} \quad (9)$$

С учетом (7), (8) и (9) поверхностную плотность свободной энергии деформации изгиба можно представить в виде:

$$F''_{\text{деф}} = \frac{1}{2} h^2 K'' \left[H^2 - \frac{H}{h} \sum_{j=1}^{n-1} \frac{1}{\tilde{s}} \frac{\partial \tilde{s}}{\partial c_j} (c_j^{\text{ext}} - c_j^{\text{in}}) \right], \quad (10)$$

где

$$h = 2(h_e + h_i),$$

а

$$\frac{1}{K''} = \sum_{j=1}^n \frac{\tilde{s}_j (c_j^{\text{ext}} + c_j^{\text{in}})}{\tilde{s} K_j}. \quad (11)$$

Если ξ — смещение точек нейтральной поверхности при деформации по внешней нормали к ней, то H определяется формулой

$$H = \Delta^s \xi, \quad (12)$$

где Δ^s — двумерный (поверхностный) оператор Лапласа.

Неравенство

$$hH \ll 1 \quad (13)$$

нарушается только в том случае, когда радиус кривизны поверхности бислоя оказывается того же порядка, что и толщина бислоя. Однако в этом случае мы не можем рассматривать бислойную мембрану как непрерывную среду не только в направлении толщины, но и вдоль монослоев [1]. Поскольку энергия изгиба мала по сравнению с энергией растяжения, то, если данная оболочка допускает деформации без растяжения или сжатия нейтральной поверхности, именно такие деформации и будут реально осуществляться при воздействии на нее произвольных внешних сил [3]. Например, в процессе обезвоживания первоначально сферической клетки форма ее мембраны не будет оставаться сферической, поскольку тогда мембрана в целом должна была бы сильно сжаться. Ей энергетически выгоднее принимать такие формы, при которых знак кривизны в разных частях мембраны становится разным, а площадь нейтральной поверхности мембранного бислоя остается такой же, как в исходном, недеформированном состоянии. Это важное обстоятельство иногда не учитывается при построении криобиологических моделей. Так, Мэнсури [8], пытаясь усовершенствовать известную модель Мейзура [9], описывающую процесс обезвоживания клеток при замораживании биологической суспензии, вместо допущения Мэйзура о неизменности площади клеточной мембраны при уменьшении объема клетки принял заведомо неверное предположение о том, что первоначально сферическая клетка в процессе обезвоживания сохраняет сферическую форму.

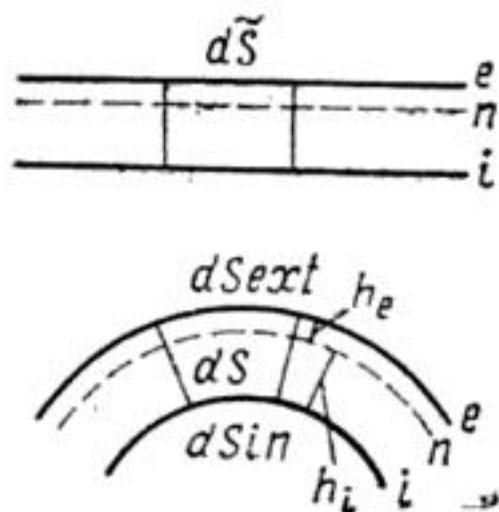


Рис. 1. Растяжение внешнего (e) и сжатие внутреннего (i) монослоев при изгибе мембраны.

Полная свободная энергия единицы поверхности бислоя F'' помимо энергии изгиба в качестве слагаемого содержит еще обычные члены:

$$\left(\sum_{i=1}^n c_i^{\text{ext}} \mu_i^{\text{ext}} + \sum_{i=1}^n c_i^{\text{in}} \mu_i^{\text{in}} \right) N,$$

где μ_i — химический потенциал i -го компонента. Равновесная форма везикулы и распределение липидных компонентов вдоль ее мембранных слоев соответствуют минимуму энергии бислоя [1, 3]:

$$\delta \left(\int_s F'' ds - \int_s p \delta \xi ds \right) = 0, \quad (14)$$

где p — действующая на единицу площади поверхности бислоя сила, направленная по внешней нормали к нему.

Вариационный принцип (14) приводит к следующим уравнениям, описывающим форму замкнутого бислоя и распределение компонентов вдоль поверхности внешнего и внутреннего монослоев:

$$\Delta^s \left\{ h^2 K'' \left[H - \frac{1}{2h} \sum_{j=1}^{n-1} \frac{1}{\tilde{s}} \frac{\partial \tilde{s}}{\partial c_j} (c_j^{\text{ext}} - c_j^{\text{in}}) \right] \right\} - p = 0; \quad (15)$$

$$\begin{aligned} \mu_j^{\text{ext, in}} \mp \frac{h}{2N} K'' H \frac{1}{\tilde{s}} \frac{\partial \tilde{s}}{\partial c_j} + \frac{1}{2N} h^2 \frac{\partial K''}{\partial c^{\text{ext, in}}} \left[H^2 - \frac{H}{hN} \sum_{j=1}^{n-1} \frac{1}{\tilde{s}} \frac{\partial \tilde{s}}{\partial c_j} \times \right. \\ \left. \times (c_j^{\text{ext}} - c_j^{\text{in}}) \right] = \tilde{\mu}_j^{\text{ext, in}}, \\ j = 1, 2, \dots, n-1. \end{aligned} \quad (16)$$

Рассмотрим несколько наиболее простых частных случаев. Во-первых, будем считать, что мембрана бислоем везикулы состоит из двух компонентов, модули упругости которых одинаковы ($K_1 = K_2 = K_0$). Тогда равновесное распределение мембранных компонентов определится условиями:

$$\frac{hH}{c_1^{\text{ext, in}} - \tilde{c}_1} = \pm \frac{2 \left(\frac{kT}{\tilde{c}_1} + \gamma \right) \tilde{s}N}{\frac{\partial \tilde{s}}{\partial c_1} K_0}. \quad (17)$$

В этих соотношениях знак величины $d\tilde{s}/dc_1$ может быть как положительным, так и отрицательным. Из (18) следует, что в тех точках внешнего и внутреннего монослоев, где растяжение максимально, преимущественно сосредоточиваются частицы другого сорта. Деформация мембраны, как и изменение температуры, является физической причиной сепарации мембранных компонентов. Таким образом, из анализа условий равновесия, (17) согласуется с принципом Ле-Шателье [4], который утверждает, что любое внешнее воздействие стимулирует в системе процессы, ослабляющие результаты этого воздействия.

Рассмотрим другой частный случай. Будем считать, что $d\tilde{s}/dc_1 = 0$, но модули упругости компонентов, из которых состоит мембрана везикулы, различны. Тогда условия равновесия (16) принимают вид

$$kT \ln \frac{c_1^{\text{ext, in}}}{\tilde{c}_1} + \gamma (c_1^{\text{ext, in}} - \tilde{c}_1) + \frac{\frac{1}{2} h^2 H^2 K^2 \left(1 - \frac{K_2}{K_1} \right)}{\left[1 - \left(1 - \frac{K_2}{K_1} \right) \frac{(c_1^{\text{ext}} + c_1^{\text{in}})^2}{2} \right]^2 N} = 0. \quad (18)$$

Обратим внимание, что уравнение

$$kT \ln \frac{c_1^{\text{ext, in}}}{\tilde{c}_1} + \gamma (c_1^{\text{ext, in}} - \tilde{c}_1) = 0 \quad (19)$$

имеет два решения при $\gamma\tilde{c}_1 > kT$ (рис. 2). В этом случае начальное (плоское) состояние, по отношению к которому измеряется деформация, оказывается неоднородным: области, в которых концентрация молекул первого сорта равна $\tilde{c}_1$, сосуществуют с областями, в которых содержание второго компонента $(1 - c')$ оказывается повышенным. Для первой из указанных областей условия равновесия (18) принимают вид

$$\frac{h^2 H^2}{\left[1 - \left(1 - \frac{K_2}{K_1}\right) c_1^{\text{ext in}}\right]^2 (c_1^{\text{ext in}} - \tilde{c}_1)} = - \frac{8 \left(\frac{kT}{\tilde{c}_1} + \gamma\right) N}{K_2 \left[1 - \frac{K_2}{K_1}\right]}, \quad (20)$$

откуда видно, что в точках мембраны, где по абсолютной величине кривизна мембраны больше, преимущественно скапливается компонент с меньшим модулем упругости растяжения — сжатия. Как и в предыдущем случае, процесс удовлетворяет принципу Ле-Шателье. В отличие от предыдущего случая, эффект не зависит от знака кривизны, в наиболее острых точках (и на выступах и на впадинах, и во внешнем и во внутреннем монослое) концентрируются наиболее «мягкие» компоненты. Именно эти «мягкие» точки, по всей вероятности, становятся зародышами спикул, которые образуются, например, на эхиноцитах. В качестве гипотезы можно предположить следующий механизм образования эхиноцитов. Как известно [2], коллоидное осмотическое давление гемоглобина в эритроцитах значительно превышает коллоидное осмотическое давление плазмы крови. Клетка компенсирует градиент концентрации белков, поддерживая соответствующие градиенты концентрации электролитов, для чего требуются непрерывные запреты метаболической энергии. Поэтому прекращение обмена веществ, например в результате длительного хранения эритроцитов при положительных температурах, приводит к такому же эффекту, как и контакт эритроцитов с гипотонической средой. При этом наиболее мягкие точки мембраны первоначально обезвоженной клетки выдуваются больше других и образуют спикулы.

Подчеркнем, что равенство (20) выполняется за счет наличия в мембране доменов с повышенным содержанием компонента 2. Свободная энергия домена, состоящего из молекул второго сорта и занимающего площадь a , как следует из наших результатов и работы [4], определяется выражением ($d\tilde{s}/dc_1 = 0$):

$$F_a = \frac{aK_2}{8} \left(1 - \frac{K_2}{K_1}\right) h^2 H^2. \quad (21)$$

Таким образом, под действием силы

$$aK_2 \left(\frac{K_2}{K_1} - 1\right) \frac{h^2}{4} H \nabla H \quad (22)$$

домены, обогащенные мембранным компонентом, который менее легко растягивается и сжимается, перемещаются в область меньшей по абсолютной величине кривизны.

Обратим внимание на следующее обстоятельство. Если при самопроизвольном выделении эритроцитами липидных везикул определяющую роль играют процессы сепарации, обусловленные различной упругостью компонентов ($K_1 \neq K_2$, $d\tilde{s}/dc_1 = 0$), то мембрана отщепляющейся от эритроцита липидной везикулы должна содержать преимущественно «мягкие» липиды, а асимметрия между составом внешнего и внутреннего монослоев должна

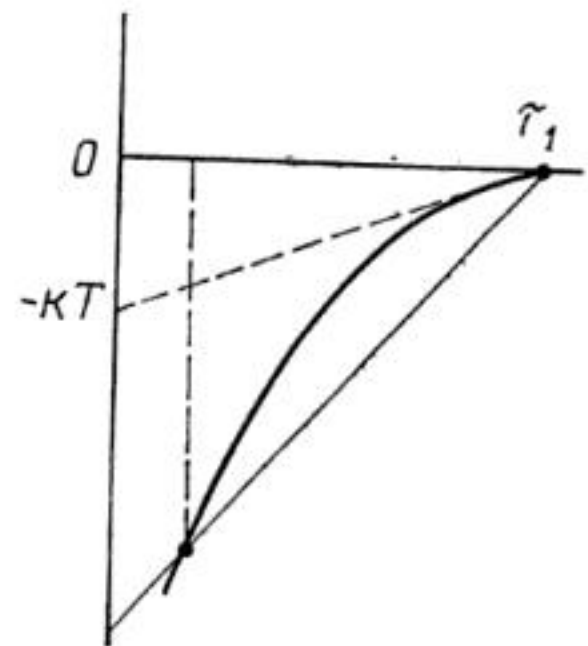


Рис. 2. Графическое решение уравнения (20). При $\gamma c_1 < kT$ имеется одно решение, а при $\tilde{c}_1 < kT$ — два.

отсутствовать. В другом из рассмотренных нами случае ($K_1 = K_2$, $d\tilde{s}/dc_1 \neq 0$) асимметрия между внешним и внутренним монослоями должна иметь место.

1. Ивенс И., Скейлак Р. Механика и термодинамика биологических мембран.— М.: Мир, 1982.— 304 с.
2. Лайтфут Э. Явления переноса в живых системах.— М.: Мир, 1970.— 520 с.
3. Ландау Л. Д., Лифшиц Е. М. Теория упругости.— М.: Наука, 1965.— 204 с.
4. Ландау Л. Д., Лифшиц Е. М. Статистическая физика.— М.: Наука, 1967.— 568 с.
5. Маркин В. С. Организация мембран в плоскости слоя и форма клеток. Статистический подход.— Биофизика, 1980, 25, вып. 5, с. 941—951.
6. Маркин В. С. Организация мембран в плоскости слоя и форма клеток. Биологические следствия теории.— Биофизика, 1981, 26, вып. 1, с. 158—167.
7. Смирнов В. И. Курс высшей математики. т. 2.— М.: Наука, 1974.— 656 с.
8. Mansoori C. A. Kinetics of water loss from cells at subzero centigrade temperatures.— Cryobiology, 1975, 12, N 1, p. 34—45.
9. Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and likelihood of intracellular water.— J. Gen. Physiol., 1963, 47, N 2, p. 347—369.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР,
г. Харьков

Поступила 12.11.84

UDC 573.22

**А. С. Капрельянц, Р. Б. Слободской, Е. Я. Панков,
Ю. Б. Самойленко, Ю. А. Киданов**

НОВАЯ СИСТЕМА ДЛЯ КОМПЬЮТЕРНОЙ СТЕРЕОМЕТРИИ ТКАНЕВЫХ, КЛЕТОЧНЫХ И СУБКЛЕТОЧНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ

Стереометрический анализ, который находит все большее применение в различных областях биологии и медицины, осуществляется чаще всего с помощью импортных автоматизированных систем [1], например «IBAS» (фирма «ОПТОН», ФРГ), «Leitz T. A. S. plus» (фирма «Лейц», ФРГ), «Magiscan» (фирма «Викерс», Англия), «Omnicon 3000» (фирма «Буш и Ломб» США), «Cardio 90» (фирма «Контрон», Швейцария). Эти приборы можно разделить на две группы: для анализа реальных микроизображений и для анализа фотографий, негативов и других носителей информации. На наш взгляд, приборы последнего типа в первую очередь необходимы широкому кругу морфологов, поскольку они просты в эксплуатации и экономически выгодны. Системы первой группы имеют более сложную конструкцию, громоздки и включают, как правило, ТВ-устройства съемки, преобразования и анализа, что значительно затрудняет их настройку, эксплуатацию и увеличивает их стоимость. Для обслуживания приборов необходим квалифицированный технический персонал, не всегда имеющийся в штате морфологической лаборатории.

Предлагаемая нами система компьютерного анализа состоит из микропроцессорного анализатора графической информации и микроЭВМ «Электроника-60 М» с набором периферийного оборудования (рис. 1, а, б). Одним из основных элементов системы является микропроцессорный анализатор графической информации (морфометрический) «МАГИ-М», который выполнен в виде трех конструктивно связанных функциональных устройств: планшеты с блоком считывания и блоком индикации, блока обработки с блоком питания и пульта управления. Планшет имеет каркас, на котором крепится столешница, первая и вторая направляющая с кареткой. На каждой направляющей закреплены кодирующие линейки, а на каретках — обоймы с оптическими электронными преобразователями (рис. 1, а). Устройство «МАГИ-М» позволяет обрабатывать информацию в реальном масштабе времени и получать после обвода оператором контура исследуемого элемента изображения значение площади, периметра (или длины линии), суммы площадей, разности площадей, отношения площадей. Полученные значения отображаются на цифровом индикаторе после нажатия соответствующей

клавиши пульта управления и могут быть использованы для дальнейшего расчета основных стереометрических параметров, в частности объемной доли и площади поверхности различных элементов структуры.

Использование устройства «МАГИ-М» в комплексе с микроЭВМ «Электроника-60 М» позволяет значительно ускорить процесс вычисления этих параметров и получать результаты расчетов в виде распечаток (ЭПМ «Консул 260.1») или индицировать на дисплее (РИН-609). Программа обработки (ASQUANT) предусматривает, кроме получения стереометрических пара-

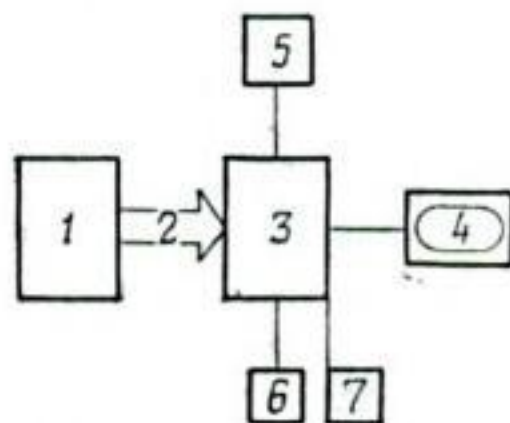
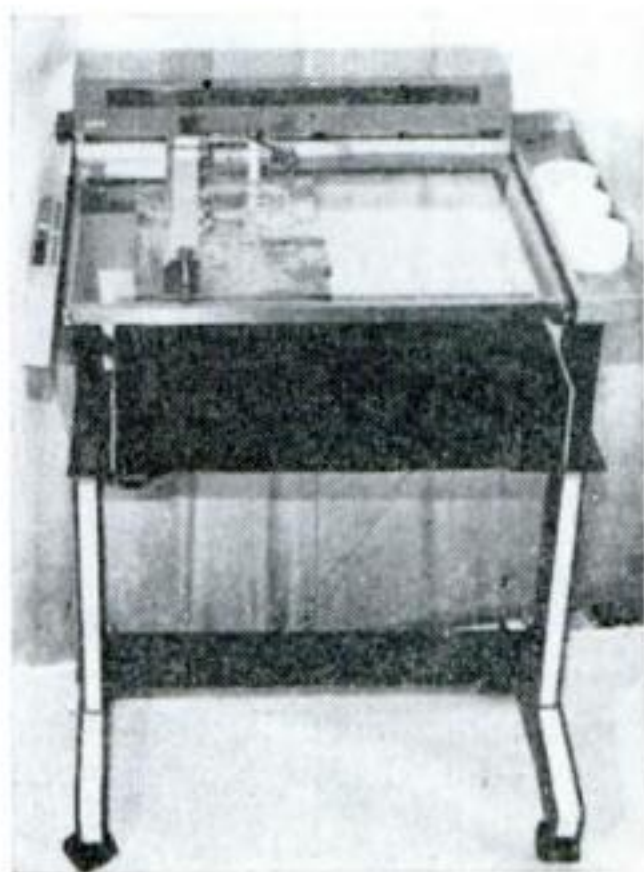


Рис. 1. а — общий вид устройства «МАГИ-М»; б — блок-схема системы для компьютерной стереометрии: 1 — МАГИ-М; 2 — интерфейс; 3 — микро ЭВМ «Электроника-60 М»; 4 — дисплей РИН-609; 5 — ЭПМ «Консул 260.1»; 6 — фотосчитыватель (FS-1501); 7 — перфоратор (ПЛ-150).

метров, их статистическую обработку с последующим проведением корреляционного и регрессионного анализа. Некоторые теоретические вопросы анализа изображений изложены в работе о теоретических вопросах автоматизаций медико-биологических исследований [2]. Программа написана на языке «Квейник» и вводится с помощью перфоленты через фотосчитыватель «FS-1501». Проверку полученных в результате анализа стереометрических параметров проводили с помощью разработанной ранее системы анализа изображений с использованием СМ ЭВМ и УСО «Контур», построенного на базе фототелеграфного аппарата «Штрих-М» (рис. 2). Разница в вычислениях составила величину до 3 %.

В качестве примеров применения системы приводим результаты анализа биологических объектов (рис. 3, а, б) на тканевом, клеточном и субклеточном уровнях организации. Так, анализ микроскопического изображения полутонкого среза печени после длительной интоксикации CCl_4 позволил получить следующие количественные параметры двух основных элементов ткани — клеток печени и синусоидов: величину общей площади анализируемого участка (5163 мм^2), площади, занятой клетками печени ($4947,5 \text{ мм}^2$), объемной доли клеток печени (95,8 %), общей площади расширенных синусоидов ($215,5 \text{ мм}^2$), их объемной доли (4,2 %) и удельной поверхности (0,39). Общие характеристики вычислены на основании анализа отдельных элементов и суммирования данных. Общее время анализа одной фотографии — 5 минут.

Анализ электронно-микроскопического изображения ядра клетки печени после охлаждения до -30°C , показал, что с помощью «МАГИ-М» можно легко определить общую площадь ядра (1626 мм^2), периметр ядра (178,8 мм), удельную поверхность ядра (0,109), площадь, занятую компакт-

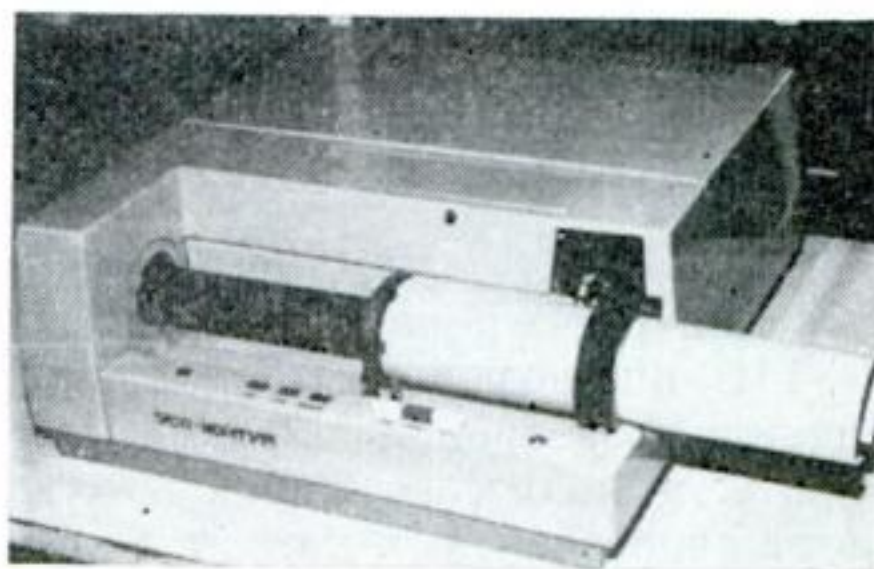


Рис. 2. Устройство связи с СМ ЭВМ «Контур», разработанное на базе фототелеграфного аппарата «Штрих-М» и предназначенное для ввода в ЭВМ графической информации с промежуточных носителей.

ным хроматином (868 мкм^2), его объемную долю (53,3 %), площадь, занятую диффузным хроматином (758 мкм^2) и его объемную долю (46,7 %). Общее время анализа одной фотографии — 10 минут. При необходимости можно определить линейные размеры ядра в любом направлении, их отношение, фактор формы и ряд других показателей.

Полученные конкретные метрические значения элементов изображений свидетельствуют о возможности применения предложенной системы для стереометрического анализа различных биологических структур, что открывает новые перспективы использования специальных микропроцессорных систем в количественной морфологии.

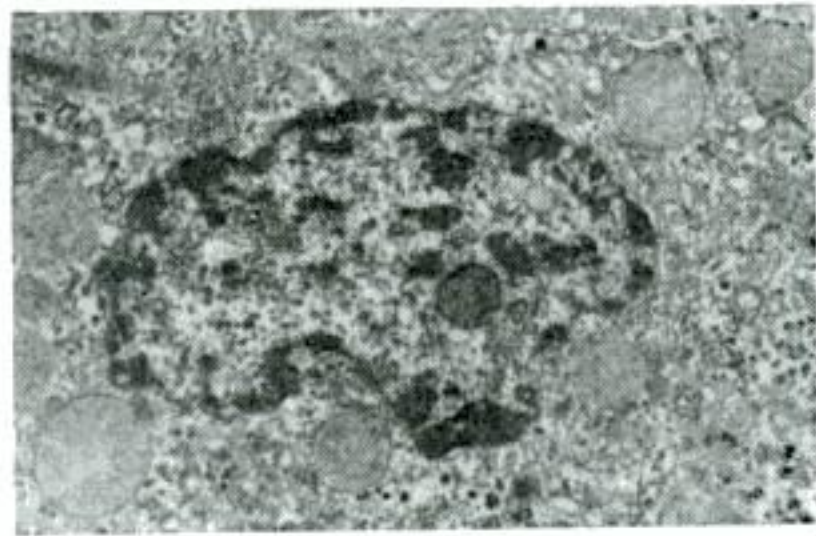
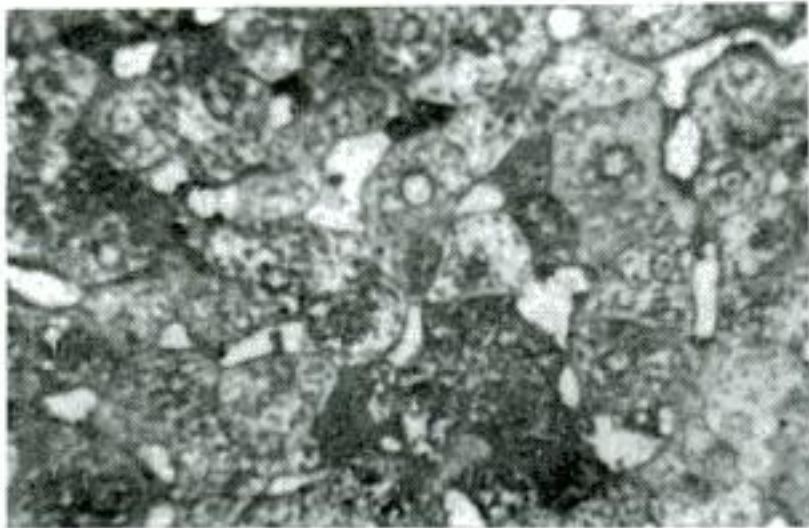


Рис. 3. а — полутонкий срез печени после длительной интоксикации CCl_4 ; б — фотоэлектроннограмма ядра клетки печени после охлаждения до -30°C . Морфометрические показатели приведены в тексте.

1. Пушкарь Н. С., Капрельянц А. С. Введение в электронно-микроскопическую технику для медико-биологических исследований. — Киев: Наук. думка, 1982. — 189 с.
2. Черепнев А. С., Капрельянц А. С., Попов В. А., Сироджа И. Б. Теоретические вопросы автоматизации медико-биологических исследований. — Киев: Наук. думка, 1982. — 120 с.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР,
г. Харьков.

Поступила 07.07.84

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 57.043 : 612.111.014.41 : 547.422.426.1.

М. М. Лоевский

ОСОБЕННОСТИ ТРАНСПОРТА КАТИОНОВ В РАЗМОРОЖЕННЫХ КЛЕТКАХ

Как было показано ранее [2], гипотермическое хранение эритроцитов ($+4^\circ\text{C}$) в криозащитных средах на основе 1,2-пропандиола (1,2-ПД) или глицерина позволяет значительно продлить сроки хранения размороженных клеток в жизнеспособном состоянии. В настоящей работе изучали транспорт одновалентных катионов в эритроцитах, хранившихся в этих средах при 4°C . Внутриклеточную концентрацию Na^+ и K^+ определяли методом пламенной фотометрии. Для удаления внеклеточного Na^+ и K^+ эритроциты промывали трижды изоосмотическим буфером, содержащим 90 мМ MgCl_2 , 30 мМ *трис*-HCl, pH 7,4. Скорость активного транспорта $^{22}\text{Na}^+$ и K^+ ($^{86}\text{Rb}^+$) определяли по методу Лишко и др. [1] с некоторой модификацией. Для определения пассивной диффузии использовали оуабаин с конечной концентрацией в образце 10^{-4}M . Обнаружено, что при гипотермическом хранении размороженных эритроцитов в среде 1,2-ПД изменения внутриклеточного содержания катионов Na^+ и K^+ были более выражены, чем в отмытых клетках. В меньшей степени нарушения катионной асимметрии отмечались при хранении эритроцитов в криозащитной среде на основе глицерина (ЦОЛИПК-II₄), однако и в этом случае изменения были достоверны. При исследовании транспортных характеристик эритроцитов, подвергнутых гипотермическому хранению в криозащитной среде, содержащей 1,2-ПД,

было установлено повышение пассивной диффузии и активного транспорта $^{22}\text{Na}^+$ и $^{86}\text{Rb}^+$ по отношению к контрольным клеткам.

Гипотермическое хранение эритроцитов в среде, содержащей глицерин, в меньшей степени активизирует работу Na^+ , K^+ -насоса. Таким образом, нарушение ионного состава клеток, происходящее при их хранении в криозащитных средах, приводит при последующем удалении криопротекторов к компенсаторной стимуляции процессов активного транспорта. Полученные результаты свидетельствуют о различном влиянии близких по строению исследуемых криозащитных веществ на структурно-функциональное состояние плазматических мембран, что может быть обусловлено более выраженным мембранотропным действием 1,2-ПД.

1. Лішко В. К., Колчинська Л. І., Пархоменко М. Т. Калій і натрієвий «насос» еритроцитів. — Укр. біохім. журн., 1973, 45, № 1, с. 42—46.
2. Лоевский М. М., Воротилин А. М., Каплун Е. А. Длительное гипотермическое хранение эритроцитов после низкотемпературной консервации под защитой 1,2-пропандиола и глицерина. — В кн.: Тез. докл. Второй всесоюз. конф. по теоретическим и прикладным вопросам криобиологии (Харьков, окт., 1984 г.). т. 1, Харьков: Б. и., 1984, с. 168.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР,
г. Харьков

Поступила 04.04.85

УДК 547.398.1 : 615.387

А. В. Николенко

НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЕ КОНСЕРВИРОВАНИЕ ТРОМБОЦИТОВ ПОД ЗАЩИТОЙ СОЕДИНЕНИЙ РЯДА АМИДОВ

Изучались криопротекторные свойства соединений ряда амидов (формамида, N,N-диметилформамида, ацетамида, N,N-диметилацетамида, N-ацетилморфолина, N,N-диэтилацетамида и N,N-(β-диоксиэтил)ацетамида) в отношении тромбоцитов человека, полученных из донорской крови методом дифференцированного центрифугирования. Образцы тромбоконцентратов, содержащие 5 % исследуемых веществ, замораживали со скоростью 8—10°С/мин до —70°С с последующим погружением в жидкий азот. Морфофункциональные свойства тромбоцитов оценивали до и после криоконсервирования по показателям агрегационной и ретрактивной активности, реакции на гипотонический шок.

В одинаковых условиях криоконсервирования самые высокие показатели сохранности морфофункциональных свойств тромбоцитов получены при использовании в качестве криопротектора N,N-диметилацетамида. После замораживания—оттаивания в тромбоконcentратах сохранялось в среднем 90 % кровяных пластинок, величина их ретрактивной активности составила $70 \pm 3\%$, реакции на гипотонический шок — $45 \pm 4\%$, АДФ-индуцированной агрегации — $20 \pm 4\%$. Установлено, что N-ацетилморфолин по степени криозащитной активности в отношении тромбоцитов приближается к N,N-диметилацетамиду. В тромбоконcentратах, криоконсервированных под защитой N-ацетилморфолина, также сохраняется в среднем 90 % кровяных пластинок, величина их ретрактивной активности составляет $65 \pm 3\%$, реакции на гипотонический шок — $30 \pm 2\%$, АДФ-индуцированной агрегации — $25 \pm 5\%$. Формамид и ацетамид по степени ограждающего действия значительно уступают N,N-диметилацетамиду и N-ацетилморфолину. N,N-диэтилацетамид и N,N-(β-диоксиэтил)ацетамид вызывают необратимые изменения морфофункциональных свойств кровяных пластинок еще на этапе эквilibрации, что свидетельствует о бесперспективности их использования в качестве криопротекторов для тромбоцитов.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР, г. Харьков

Поступила 02.04.85

А. М. Мхитарьянц

К ОБОСНОВАНИЮ ПОЛОЖЕНИЙ МЕДИКО-ТЕХНИЧЕСКИХ ТРЕБОВАНИЙ К КРИОИНСТРУМЕНТАМ

Широкое использование в медицине низких температур как лечебного фактора обуславливает необходимость создания криоинструментов, отвечающих уровню технического прогресса и способствующих решению конкретных клинических задач.

Анализ литературы и наши собственные исследования показали, что наиболее целесообразно создавать криоинструменты узкого назначения. Это связано с тем, что процессы, протекающие в живом организме, характеризуются биофизическими параметрами, например, массопередачей, размером исследуемой системы, составом крови, скоростью кровотока. В каждом конкретном случае необходим индивидуальный подход и в процессе математического моделирования нужно учитывать все эти показатели, так как они определяют степень холодового воздействия, которая зависит от активной реакции ткани, выражающейся в появлении «теплового барьера», блокирующего понижение температуры в участках, удаленных от поверхности, контактирующей с термическим источником дальше некоторого характерного расстояния.

Данное сообщение базируется на опыте отдела экспериментальной криомедицины по использованию имеющихся и созданию новых криоинструментов, предназначенных для экспериментальных и клинических исследований. Нами были проведены эксперименты на желудке и двенадцатиперстной кишке крысы с целью контроля теплофизического состояния органа при криовоздействии [1, 2]. Датчики температур фиксировались на специальной подложке и на определенном расстоянии друг от друга в плоскости. Исследуемый орган располагали на подложке таким образом, чтобы с одной стороны ткани находился первый датчик, а с другой — аппликатор. Все остальные датчики устанавливали на определенном расстоянии от первого. Затем ткань охлаждали и в процессе охлаждения снимали температурные параметры со всех датчиков. Полученные экспериментальные данные показали, что при одной и той же степени охлаждения теплофизическая картина желудка значительно отличалась от теплофизической картины двенадцатиперстной кишки.

Дальнейшее исследование целесообразно направить на то, чтобы сформулировать математическую модель процесса охлаждения живой ткани, т. е. модель теплопереноса в тканях при криовоздействии, когда уменьшается кровоснабжение в зоне замораживания, а также получить приближенное аналитическое решение уравнения теплопереноса, описывающее температурное поле в изучаемом объекте:

$$\rho c \frac{dT}{dt} = \nabla(k \nabla T) + m_b C_b (T_b - T) + S_m,$$

где ρ — плотность ткани; c — теплоемкость ткани; k — коэффициент теплопроводности ткани; S_m — метаболическое тепловыделение; T_b — температура артериальной крови; m_b — массовый расход крови в единице объема ткани; C — теплоемкость крови.

Уравнение служит основой математического моделирования процессов теплообмена в биологической ткани в различных условиях (например, при криовоздействии, гипотермии, ожогах др.) для определения интенсивности кровотока, биофизических параметров живой ткани и теплового взаимодействия организма с окружающей средой. В итоге необходимо найти оптимальную температуру, зависящую от параметров ткани и тщательно контролировать процесс восстановления в конкретном объекте.

Для того чтобы проникнуть в желудочно-кишечный тракт и оказать криовоздействие на язвенный дефект двенадцатиперстной кишки, необходимо было создать зонд с малым диаметром, который бы проводился через

биопсийный канал эндоскопа. Экспериментальным путем были обоснованы температурные режимы, позволившие решить терапевтическую задачу заживления язвы. Распространенные контактные способы термометрии в данном случае не позволяют в достаточной степени описать тепловую картину, а иногда вообще неприменимы. В таких случаях необходимо изучить возможность применения неинвазивных датчиков, которые позволяют определить изменение температуры объекта на определенном расстоянии, сканирование, развертывание информации математическими методами, а также индикацию распределения температур в реальном масштабе времени с целью контроля за охлаждением. На основании полученных температурных параметров, определяющих ускоренное заживление, создается аппаратура, обеспечивающая заданный режим.

Для охлаждения полипа до более низких температур с целью получения некроза ткани пришлось ввести в конструкцию наконечника зонда добавочный элемент, дросселирующий хладагент. Для остановки язвенных кровотечений недостаточно только охлаждения. Необходимо на фоне льда провести прицельную электрокоагуляцию, поэтому к наконечнику зонда был подведен ток высокой частоты, а сам зонд явился электродом. В результате, были выполнены медицинские требования по созданию специализированного криоинструмента, позволяющего осуществлять охлаждение ткани и электрокоагуляцию одновременно.

Таким образом, учитывая взаимосвязь между процессами, протекающими в организме, и действием низких температур, можно проектировать новую криомедицинскую технику, которая повысит терапевтический эффект, а также позволит быстрее и с наименьшими материальными затратами оптимально решать поставленные научные и прикладные задачи.

1. Сандомирский Б. П., Хворостов Е. Д., Писанный О. Е., Мхитарьянц А. М. А. с. 825057 (СССР). Способ лечения язв двенадцатиперстной кишки.— Оpubл. в Б. И., 1981, № 16.

2. Сандомирский Б. П., Мхитарьянц А. М., Писанный О. Е. А. с. 843962 (СССР). Криоэлектрокоагулятор.— Оpubл. в Б. И., 1981, № 25.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР,
г. Харьков

Поступила 02.04.85

РЕФЕРАТЫ

УДК 57.043:615.361.014.41

Значение фармакологической адаптации к низким температурам при консервации органов в условиях гипотермии и глубокого замораживания/Шумаков В. И., Онищенко Н. А., Кирпатовский В. И., Лубяко А. А.— Криобиология, 1985, № 3, с. 3—8.

Показана целесообразность применения мембраностропных препаратов, в том числе и криопротектора ДМСО, для предварительной подготовки донора и добавления в консервант при гипотермической консервации изолированных органов, в частности при криоконсервации почек.

Ил. 3. Табл. 3. Библиогр.: 16 назв.

УДК 615.015:547.422

✓ **Криопротекторы и криоконсерванты (основные направления исследований)/Шраго М. И., Новиков А. Н., Ханина Л. А., Линник Г. П., Компаниец А. М., Бредихина Л. П., Олейник С. Т.— Криобиология, 1985, № 3, с. 8—13.**

Выполнены комплексные исследования рядов соединений (производных этиленгликоля, глицерина, амидов жирных кислот) с целью выяснения взаимосвязи между структурой, физико-химическими и криопротекторными свойствами. Установленные закономерности дали возможность создать новые криопротекторы. Разработаны оригинальные криоконсерванты.

Библиогр.: 12 назв.

УДК 57.043:575.014.41

Низкотемпературное хранение спермы птиц/Курбатов А. Д.— Криобиология, 1985, № 3, с. 13—15.

Сперму домашних птиц, разбавленную средой ЛКС-1, охлаждали при $2 \div 8^\circ\text{C}$ в течение 40—50 мин, замораживали в присутствии диметилацетамида при $-60 \div -80^\circ\text{C}$ в криостате в течение 4 мин и хранили в жидком азоте. Отогревали сперму двухэтапно при комнатной температуре 30—40 сек и в водяной бане при $60 \div 70^\circ\text{C}$ 7—10 сек.

Табл. 1. Библиогр.: 18 назв.

УДК 57.043:612.111:536:48

Замораживание клеток крови до -196°C под защитой низкомолекулярных гликолей и глицерина. Повышение эффективности криоконсервации. /Ворстилин А. М.— Криобиология, 1985, № 3, с. 15—20.

Установлено, что этиленгликоль и пропиленгликоль по защитному эффекту в отношении эритроцитов не уступают глицерину. Показаны преимущества использования пропиленгликоля. Излагаются подходы к повышению эффективности криоконсервации.

Табл. 2. Библиогр. : 10 назв.

УДК 57.043:577.352.33:611.018.51

Исследование влияния полиспиртов на динамическую структуру биологических мембран методом спиновых зондов/Цымбал Л. В., Гаврилова И. И., Моисеев В. А.— Криобиология, 1985, № 3, с. 20—24.

Исследование параметров анизотропии и микровязкости мембран свидетельствует о встраивании молекул криопротектора в липидный бислой. Обнаруженные в присутствии криопротекторов (глицерина и полиэтиленгликолей) изменения термощимированных перестроек мембран при охлаждении говорят о влиянии изученных криопротекторов на липид-липидные взаимодействия. Однако эти вещества не устраняют некоторые необратимые изменения в структуре мембран при охлаждении.

Ил. 3. Табл. 1 Библиогр.: 9 назв.

УДК 612.014.9:534.121.2

Транспорт одновалентных катионов в эритроцитах при инкубации в защитных средах/Гулевский А. К., Рязанцев В. В., Белоус А. М.— Криобиология, 1985, № 3, с. 24—28.

Исследовали пассивный и активный транспорт ^{22}Na и ^{86}Rb в эритроцитах человека при инкубации в 5—30 % глицерине или 2,5—20 % полиэтиленгликоле с молекулярным весом 1500. Показано, что угнетение пассивной диффузии и особенно активного транспорта катионов усиливалось с повышением концентрации криопротекторов. Установлено, что глицерин и ПЭГ-1500 снижают чувствительность Na^{+} -насоса к оубаину, что обусловлено угнетением специфического связывания сердечного гликозида. Оба криопротектора ингибируют Na^{+} - K^{+} -АТФазу. ПЭГ-1500 в эквимольных концентрациях оказывает более выраженное ингибирующее влияние на указанные процессы.

Ил. 5. Библиогр.: 12 назв.

УДК 536.62

Устойчивость к пониженной температуре культур клеток и тканей, выделенных из органов зимоспящих животных/Гаврилюк Б. К.— Криобиология, 1985, № 3, с. 28—30.

Установлено, что ткани органов зимоспящих животных обладают значительно большей устойчивостью к понижению температуры, чем ткани других животных. При трипсинизации ткани, проводимой после трех месяцев существования при $+5 \pm 1^{\circ}\text{C}$, удалось получить жизнеспособные клетки.

Табл. 1. Библиогр.: 1 назв.

УДК 57.043:577.352.26:547.426.1

Нарушение планарной упаковки плоского липидного бислоя при взаимодействии с глицерином/Руденко С. В.— Криобиология, 1985, № 3, с. 30—32.

Показано, что при взаимодействии глицерина, находящегося с одной стороны мембраны, с плоским липидным бислоем (ПЛБ), состоящим из яичного лецитина и холестерина, происходят существенные изменения в структуре ПЛБ, выражающиеся в появлении на гладкой поверхности выпячиваний или пузырьков — пузырьков структур. Формирование и распад этих структур зависят от градиента глицерина, ионной силы среды и содержания холестерина в ПЛБ.

Ил. 1. Библиогр.: 6 назв.

УДК 612.111:352.3

Влияние тоничности среды и температуры на свойства клеточной поверхности/Бойко Н. М.— Криобиология, 1985, № 3, с. 32—35.

Исследованы влияние гипертонических сред ($0,15 \div 1,2 \text{ M NaCl}$) и температуры (0° и 37°C) на способность эритроцитов агглютинировать под действием конканавалина А, морфологические особенности и объем клеток. Обнаружено уменьшение степени агглютинации клеток, инкубированных при 0° и 37°C в средах с содержанием хлористого натрия $0,45 \div 0,75 \text{ M}$. Температуры инкубации 0° и 37°C изменяют структуру мембран эритроцитов в растворах $0,9 \div 1,2 \text{ M NaCl}$ по-разному. Установлена корреляция между способностью клеток агглютинировать под действием лектина и изменением формы и объема эритроцитов.

Ил. 3. Библиогр.: 9 назв.

УДК 57.043:612.111.32

Определение повреждений эритроцитов в герметичных контейнерах объемом 150 и 300 мл/ Куракса В. М. — Криобиология, 1985, № 3 с. 35—38.

Описано устройство для забора эритроцитарной суспензии из различных зон герметичного контейнера в процессе отогрева. Были установлены три зоны повреждения эритроцитов в контейнерах объемом 150 и 300 мл. Повреждение эритроцитов увеличивалось по направлению от стенок вглубь контейнера и уменьшалось в центральной части контейнера.

Ил. 1. Табл. 3. Библиогр.: 8 назв.

УДК 57.043.615.387:547

Функциональная активность КОЕ_с консервированного костного мозга, обработанного оксимочевинной и Н-тимидином/ Гольцев А. Н., Цуцаева А. А., Дубрава Т. Г., Останкова Л. В. — Криобиология, 1985, № 3, с. 38—43.

В работе проведена оценка сохранности и функциональной активности костномозговых колониеобразующих единиц (КОЕ_с), находящихся в разных фазах клеточного цикла, после низкотемпературного консервирования (—196 °С). Установлено, что криоконсервирование в равной степени оказывает отрицательное действие на КОЕ_с, независимо от их исходного функционального состояния — пребывания в клеточном цикле или в состоянии покоя. После криоконсервирования отмечается гибель примерно равной доли КОЕ_с в интактном, «обогащенном» и не содержащем клеток в S-фазе костном мозге.

Табл. 4. Библиогр.: 10 назв.

УДК 577.37

Физико-математическая модель латерального перераспределения липидов при изотермической деформации замкнутой бислойной мембраны/ Гордиенко Е. А., Воинова М. В., — Криобиология, 1985, № 3, с. 43—48.

Построена физическая модель, описывающая явление латерального перераспределения мембранных компонентов в результате изгиба замкнутой многокомпонентной (липидной) мембраны. При заданной форме мембраны в областях с большей по абсолютной величине кривизне как во внешнем, так и во внутреннем монослое концентрируются те компоненты, модуль растяжения—сжатия которых мал.

Ил. 2. Библиогр.: 9 назв.

УДК 573.22

Новая система для компьютерной стереометрии тканевых, клеточных и субклеточных элементов/ Капрельянц А. С., Слободской Р. Б., Панков Е. Я., Самойленко Ю. Б., Киданов Ю. А. — Криобиология, 1985, № 3, с. 48—50.

Описана компьютерная система, предназначенная для стереометрического анализа микроскопических и субмикроскопических структур клеток и тканей. Система состоит из микропроцессорного анализатора графической информации «МАГИ-М» и микроЭВМ «Электроника-60 М» с набором периферийного оборудования. Использование устройства «МАГИ-М» в комплексе с микроЭВМ позволяет значительно ускорить процесс вычисления ряда стереометрических параметров по заранее составленной программе.

Ил. 3. Библиогр.: 1 назв.

UDC 57.043:615.361.014.41

Significance of pharmacologic adaptation to low temperatures during organ preservation under conditions of hypothermia and deep freezing/ Shumakov V. I., Onishchenko N. A., Kirpatovsky V. I., Lubyako A. A. — Kriobiologiya, 1985, N 3, p. 3—8.

Membranotropic drugs such as DMSO have been shown to be useful for pretreating donors and adding to cryoconservants during low temperature preservation of isolated organs, in particular for renal freeze-preservation.

3 figs., 3 tables, 16 refs.

UDC 615.015:547.422

Cryoprotectants and cryoconservants (basic approaches)/Shrago M.I., Novikov A. N., Khanina L. A., Linnik T. P., Kompaniets A. M., Bredikhina L. P., Oleynik S. T.—*Kriobiologiya*, 1985, № 3, p. 8—13.

Complex research of a series of compounds (derivatives of ethylene glycol, glycerol and fatty acid amides) was carried out in order to elucidate the relationship between their structure, physico-chemical properties and cryoprotective qualities. The established regularities allow to create new cryoprotectants. New cryoconservants have been formulated.

12 refs.

UDC 57.043:575.014.41

Cryopreservation of fowl semen/Kurbatov A.D.—*Kriobiologiya*, 1985, № 3, p. 13—15.

Fowl semen extended in a LKS-1 medium was cooled at 2 to 8 °C/min for 40 to 60 min, frozen with dimethyl acetamide in a cryostat at —60 to —80 °C for 4 min and stored in liquid nitrogen. Two-step thawing was performed at room temperature and in a water bath at 60 to 70 °C.

1 table, 18 refs.

UDC 57.043:612.111:536:48

Blood cell freezing to —196 °C under protection of low molecular weight glycols or glycerol. Increasing the efficiency of cryopreservation/Vorotilin A. M.—*Kriobiologiya*, 1985, № 3, p. 15—20.

Ethylene glycol and propylene glycol have been shown to be not worse than glycerol in protecting erythrocytes from freezing injury. Advantages of propylene glycol are demonstrated. Approaches to increasing the efficiency of cryopreservation are presented.

2 tables, 10 refs.

UDC 57 043:577.352.33:611.018.51

Examination of the effect of polyalcohols on the dynamic structure of biological membranes using spin probes/Tsymbal L. V., Gavrilova I. I., and Moiseyev V. A.—*Kriobiologiya*, 1985, № 3, p. 20—24.

The examination of anisotropy and microviscosity parameters of membranes revealed the incorporation of cryoprotectant molecules into the lipid bilayer. Cryoprotectants (glycerol or polyethylene glycols) appeared to affect thermally induced changes in membranes upon cooling, thus indicating the influence of the cryoprotectants on lipid-lipid interactions. However, the compounds do not prevent some irreversible alterations in the membrane structure.

3 figs, 1 table, 9 refs.

UDC 612.014.9:534.121.2

Transport of monovalent cations in erythrocytes during incubation in protective media/Gulevsky A. K., Ryazantsev V. V., Belous A. M.—*Kriobiologiya*, 1985, № 3, p. 24—28.

²²Na and ⁸⁶Rb passive and active transport in human erythrocytes during incubation in 5—30 % glycerol or 2,5—20 % polyethylene glycol of MW 1500 was investigated. It has been demonstrated that inhibition of passive diffusion and especially of active cation transport is augmented due to increase in cryoprotectant concentration. It has been established that glycerol and PEG-1500 reduce Na⁺-pump susceptibility to ouabain due to inhibition of specific glycoside binding. Both cryoprotectants inhibit Na⁺-K⁺-ATPase. In equimolar concentrations PEG-1500 has a more pronounced inhibiting effect on the processes mentioned above.

5 figs., 12 refs

UDC 536.62

Resistance of cultures of cells and tissues isolated from hibernator's organs to low temperatures/Gavriluk B. K.—*Kriobiologiya*, 1985, № 3, p. 28—30.

Organ tissues of hibernators have been found to be more resistant to low temperatures than tissues of non-hibernators. Viable cells were obtained when treating the tissues with trypsin after 3 months exposition at 5 ± 1 °C.

1 fig, 1 table, 1 ref.

UDC 57.043:577.352.26:547.426.1

Perturbations in packing a planar lipid bilayer induced by glycerol/Rudenko S. V.— Kriobiologiya, 1985, № 3, p. 30—32.

Great structural changes expressed in the form of protrusions or vesicles (vesicular structures) on a smooth surface of planar lipid bilayer (PLB) have been shown to occur in PLB consisting of egg lecithin and cholesterol due to glycerol added from one side of PLB. Formation and break-up of the vesicles depended on the glycerol gradient, ionic strength of medium and cholesterol content.

1 fig., 6 refs.

UDC 612.111:352.3

The effect of medium tonicity and temperature on the properties of cell surface/Boyko N. M.— Kriobiologiya, 1985, № 3, p. 32—35.

The effect of hypertonic media (0.15 to 1.2 M NaCl) and temperature (0 °C and 37 °C) on the ability of erythrocytes to agglutinate under the effect of concanavalin A was studied, as well as morphological properties and volume of the cells in media of different tonicity. The agglutination of cells incubated in 0.45 to 0.75 M NaCl solutions appeared to decrease at 0 °C and 37 °C. Temperatures 0 °C and 37 °C induced different changes in the structure of erythrocyte membranes in media of 0.9 to 1.2 M NaCl. The agglutination ability of cells has been found to correlate with changing their shape and volume induced by the lectin.

3 figs., 9 refs.

UDC 57.043:612.111.32

Estimation of erythrocyte damage in sealed containers of 150 ml and 300 ml volume/Kuraksa V. M.— Kriobiologiya, 1985, № 3, p. 35—38.

A device for sampling erythrocyte suspension from different zones of sealed container during thawing is described. Three regions of injury to erythrocytes have been found in containers of 150 ml and 300 ml volume. Erythrocyte damage appeared to increase in the direction from the walls to the depth of container and to decrease in the central part of container.

1 fig., 3 tables, 8 refs.

UDC 57.043.615.387:547

Functional activity of CFU_s of preserved bone marrow treated with oxyurea and ³H-thymidine/Goltsev A. N., Tsutsayeva A. A., Dubrava T. G., Ostankova L. V.— Kriobiologiya, 1985, № 3, p. 38—43.

The viability and functional activity of bone marrow colony forming units (CFU_s) being in different phases of cell cycle after low temperature preservation (—196 °C) has been examined. It was found that cryopreservation produces a negative effect on CFU_s irrespectively of their initial functional state, being in cell cycle or in resting state. Cryopreservation results in death of approximately equal part of CFU_s in intact, «enriched» or S-phase cell-free bone marrow.

4 tables, 10 refs.

UDC 577.37

Physico-mathematical model of lateral redistribution of lipids in a closed bilayer membrane subjected to isothermal deformation/Gordienko E. A., Voinova M. V.— Kriobiologiya, 1985, N 3, p. 43—48.

A physico-mathematical model describing the lateral redistribution of membrane components due to bending a closed multicomponent (lipid) membrane is constructed. At a given shape of the membrane components of low extension-compression modulus appeared to concentrate in the regions of higher absolute value curvature both in the outer and inner monolayers.

2 figs., 9 refs.

UDC 573.22

A new system for computer stereometry of tissue, cellular and subcellular elements/Kaprel'yants A. S., Slobodskoy R. B., Pankov E. Ya., Samoylenko Yu. B., Kidanov Yu. A.— Kriobiologiya, 1985, № 3, p. 48—50.

A computer system for stereometric analysis of microscopic and submicroscopic structures of cells and tissues is described. The system comprises a «MAGI-M» microprocessor analyzer of graphic information and an «Elektronika-60 M» microcomputer provided with subsidiary equipment. Using the «MAGI-M» in combination with a microcomputer allows the calculation of stereometric parameters according to a given program to be accelerated considerably.

3 figs., 1 ref.

В 1986 ГОДУ ПРОДОЛЖАЕТСЯ ВЫПУСК ВСЕСОЮЗНОГО
НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКОГО ЖУРНАЛА «КРИОБИОЛОГИЯ»,
ИЗДАНИЯ ОТДЕЛЕНИЯ ФИЗИОЛОГИИ АН СССР И ОТДЕЛЕНИЯ
БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ И ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ АН УССР

Готовятся публикации по различным аспектам действия охлаждения
и замораживания в биологии, медицине и пищевой промышленности,
работы по гипотермии, замораживанию и сублимационному высуши-
ванию, фармакологическому и защитному действию криопротекторных
веществ, низкотемпературному консервированию клеток и тканей,
по проблемам криохирургии и морозостойкости растений, вопросам
конструирования приборов для криобиологических исследований
и оборудования для низкотемпературного консервирования и крио-
медицины.

Журнал рассчитан на научных работников, преподавателей
и студентов вузов соответствующего профиля, практиков, использу-
ющих методы воздействия холода на биологические объекты.

Периодичность — 4 номера в год. Подписанная цена: на 3 мес.—
65 коп., на 6 мес.— 1 руб. 30 коп., на 12 мес.— 2 руб. 60 коп.
Цена одного номера — 65 коп.

Подписка принимается в агентствах и отделениях «Союз-
печати», отделениях связи и общественными распростра-
нителями печати

*Издательство „Наукова думка“,
Управление «Союзпечать»
Министерства связи УССР*

Журнал «Криобиология», № 3, 1985 г.
Издательство «Наукова думка», г. Киев