

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

ISSN 0233-7673

3 ' 91



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

А. Д. Бугров, В. Я. Волков, В. М. Гордиенко, В. Н. Запорожан, П. А. Калиман, В. В. Лемешко, В. Д. Мануильский, В. А. Моисеев, А. С. Попов, Н. Г. Соломонов, Ю. С. Суханов, В. В. Шенталь, М. И. Шраго

EDITORIAL BOARD

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

EDITORIAL COUNCIL

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

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ОТДЕЛЕНИЕ ФИЗИОЛОГИИ

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ
И ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

ВСЕСОЮЗНЫЙ

НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ОСНОВАН В 1985 ГОДУ
ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

КИЕВ НАУКОВА ДУМКА 1991

3 1991

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

- Загоруйко Г. Е. Последовательность структурных изменений миокарда при тотальной ишемии сердца в условиях нормо- и глубокой гипотермии 3
- Каранова М. В., Андреев А. А., Петропавлов Н. Н., Щипакина Т. Г. Антифризные белки сыворотки трески *Gadus morrhua*: выделение, очистка и характеристика 11
- Львова С. П. Содержание липидных компонентов в крови и кетоновых тел в ткани сусликов при искусственной гипотермии и зимней спячке 16
- Абдуллаев Р. А., Эмирбеков Э. З. Активность аргиназы головного мозга и печени сусликов при зимней спячке 21
- Бринкевич В. Н., Мяделец О. Д. Количественные изменения периферической крови при пролонгированной гипотермии 25

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

- Кирпатовский В. И. Защитное действие α -токоферола при криоконсервации почки крысы 29
- Хватов В. Б., Бабийчук Л. А., Маркова О. А., Сенянская Н. Л., Кулагин И. Н., Рябова С. С., Бурыкина И. А., Аорикосов Е. Ю., Лапинская Н. Н. Криоконсервирование эритроцитов кадаверной крови 36
- Штайн Г. Криоконсервация гамет рыб 42
- Янгуюлов Ш. У., Дранов И. Ю., Терентьев А. Н., Кадетов В. В. Влияние различных криозащитных сред на жизнеспособность криоконсервированных лимфобластоидных клеточных линий 46
- Новиков А. Н., Олейник С. Т., Липина О. В., Черныш Е. Н. Влияние поверхностной активности криопротекторов на сохранность биообъектов при криоконсервировании 49

КРИОМЕДИЦИНА

- Киндзельский Л. П., Злочевская Л. Л., Захарычев В. Д., Цыганок Т. В. Влияние криохирургического метода на естественную киллерную активность больных раком легкого 52

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- Козин Ю. И. Результаты бактериологических и электронномикроскопических исследований зоны криотермодеструкции при санации инкапсулированных инфекционных образований в почках 55



ХРОНИКА

ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИЙ

CONTENTS

THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

<i>Zagoruyko G. E.</i> The sequence of structural changes in myocardium upon total heart ischemia under normothermia and deep hypothermia	3
<i>Karanova M. V., Andreyev A. A., Petropavlov N. N., Shchipakina T. G.</i> Antifreeze proteins of <i>Gadus morrhua</i> serum: isolation, purification and description . . .	11
<i>Luova S. P.</i> The content of ground squirrel blood lipid components and tissue ketone bodies under artificial hypothermia and hibernation	16
<i>Abdullayev R. A., Emirbekov E. Z.</i> The activity of brain and liver arginase in hibernating ground squirrels	21
<i>Brinkevich V. N., Myadelets O. D.</i> Quantitative changes in the peripheral blood during prolonged hypothermia	25

CRYOPRESERVATION OF BIOLOGICAL SYSTEMS

<i>Kirpatovsky V. I.</i> The protective action of α -tocopherol in rat kidney cryopreservation	29
<i>Khvatov V. B., Babiychuk L. A., Markova O. A., Senyanskaya N. L., Kulagin I. N., Ryabova S. S., Burykina I. A., Abrikosov E. Yu., Lapinskaya N. N.</i> Cryopreservation of cadaver erythrocytes	36
<i>Stein H.</i> Cryopreservation of fish gametes	42
<i>Yangulov Sh. U., Dranov I. Yu., Terentiyev A. N., Kadetov V. V.</i> The effect of different cryoprotective media on the viability of freeze-thawed lymphoblastoid cell lines H—9 and U—9	46
<i>Novikov A. N., Oleynik S. T., Lipina O. V., Chernysh E. N.</i> The influence of the cryoprotectant surface activity on the biological systems subject to cryopreservation	49

CRYOMEDICINE

<i>Kindzelsky L. P., Zlochevskaya L. L., Zakharychev V. D., Tsyganok T. V.</i> The effect of cryosurgery on the natural killer activity of patients with pulmonary cancer	52
---	----

SHORT COMMUNICATIONS

<i>Kozin Yu. I.</i> The results of bacteriological and electron microscopy studies on the cryodestruction area on treating encapsulated infectious formations in kidneys	55
--	----

CHRONICLE

DEFENSE OF THESES

Адрес редакции:

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

Научный редактор А. М. Белоус

Редактор З. В. Линевиц

Технический редактор В. Н. Волкова

Сдано в набор 12.04.91. Подп. в печать 18.06.91. Формат 70×108¹/₁₆. Бум. тип. № 1. Выс. печ. Усл. печ. л. 4,9. Усл. кр. отт. 5,6. Уч. изд. л. 5,34. Тираж 660 экз. Зак. 1-161. Цена 1 р. 20 к. Отпечатано с матриц Харьковской книжной фабрики им. М. В. Фрунзе в Харьковской типографии № 16. 310093, Харьков-3, ул. Университетская, 10. Зак. 771.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

УДК 616.127—018.63

Г. Е. Загоруйко

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ МИОКАРДА ПРИ ТОТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ СЕРДЦА В УСЛОВИЯХ НОРМО- И ГЛУБОКОЙ ГИПОТЕРМИИ

На изолированных сердцах крыс-самцов Вистар в возрасте 2,5 мес. с помощью методов электронной микроскопии и морфометрии изучены закономерности структурных изменений стромы и паренхимы миокарда при длительной тотальной ишемии (ТИ) в условиях 37 °С и глубокой гипотермии (ГГ) при 0 °С. Выявлены 3 стадии ТИ миокарда: стадия обратимых ишемических изменений, $T \{ 0-2 \text{ ч при } 37 \text{ °С и } T \{ 0-5 \text{ ч при } 0 \text{ °С}$; стадия накопления необратимых ишемических повреждений, $T \{ 2-5 \text{ ч при } 37 \text{ °С и } T \{ 5-12 \text{ ч при } 0 \text{ °С}$; стадия развития тотального некроза миокарда, $T \geq 5 \text{ ч при } 37 \text{ °С и } (T \geq 12 \text{ ч}) \text{ при } 0 \text{ °С}$. Установлено, что при ТИ миокарда миофибрилярно-митохондриальный комплекс кардиомиоцитов (КМЦ) осуществляет функцию «насоса» по направленному перемещению внутриклеточной жидкости сначала в межклеточное пространство, а затем в обратном направлении в гиалоплазму и, преимущественно, в митохондрии КМЦ. ГГ при 0 °С способствует сохранению на более длительный срок (в 2,5 раза дольше) жизнеспособности клеточных элементов миокарда.

Известно, что острая тотальная ишемия миокарда развивается во время оперативных вмешательств на «сухом сердце», в процессе пересадки органа от одного индивида другому, при хранении и перевозке сердца в изолированном виде на большие расстояния, а также в клинике при генерализованных нарушениях гемодинамики в организме [1, 6, 11, 12]. Поэтому изучение структурных и метаболических повреждений миокарда при тотальной ишемии является актуальной задачей экспериментальной кардиологии. В последние годы пристальное внимание уделяется изучению морфологических типов гибели кардиомиоцитов при ишемической болезни сердца, в условиях моделирования ишемических, токсических, гипоксических повреждений миокарда [7, 8, 10]. Проводятся исследования и накоплен определенный клинко-экспериментальный материал, свидетельствующий о кардиозащитном эффекте гипотермии при острых нарушениях деятельности сердечно-сосудистой системы [3, 6]. Результаты этих исследований однозначно свидетельствуют о том, что гипотермия является эффективным немедикаментозным средством защиты миокарда при ишемических, гипоксических, реперфузионных повреждениях, а также при консервировании донорского сердца [1, 13—15]. Исходя из актуальности проблемы защиты миокарда от ишемических повреждений, целью работы явилось изучение закономерностей структурных изменений миокарда при длительной тотальной ишемии изолированного сердца в условиях нормо- и глубокой гипотермии.

Эксперимент проведен на изолированных сердцах крыс-самцов Вистар в возрасте 2,5 мес. Длительную тотальную ишемию (ТИ) миокарда осуществляли путем погружения изолированных сердец в герметично запаенных полиэтиленовых мешочках в физиологический раствор. Первая группа наблюдений — ТИ миокарда при температуре раствора 37 °С. Вторая группа — ТИ миокарда при температуре раствора (0÷0,5 °С). Продолжительность эксперимента 24 ч. Через 30, 60, 90, 120 мин, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 15, 20, 24 ч после начала эксперимента в каждой группе наблюдений из 3 изолированных сердец вырезали свободную стенку левого желудочка. Для электронно-микроскопических исследований из стенки левого желудочка иссекали кусочки миокарда и обрабатывали по общепринятым методам [5]. В серии не-

гатов (60—80) ультратонких срезов миокарда, полученных при увеличении 2000 с помощью механического устройства [4] путем наложения на них тест-системы ($N_0 = 384$ точки), определяли объемные доли: стромального компонента ($V_v^{стр}$), основного вещества соединительной ткани ($V_v^{об}$), клеточных элементов соединительной ткани ($V_v^{кст}$), капилляров ($V_v^{кап}$); в кардиомиоцитах — относительные объемы митохондрий ($V_v^{мх}$) и гиалоплазмы ($V_v^{гп}$), в %. Статистическую обработку результатов измерений проводили с помощью графико-аналитического метода [2].

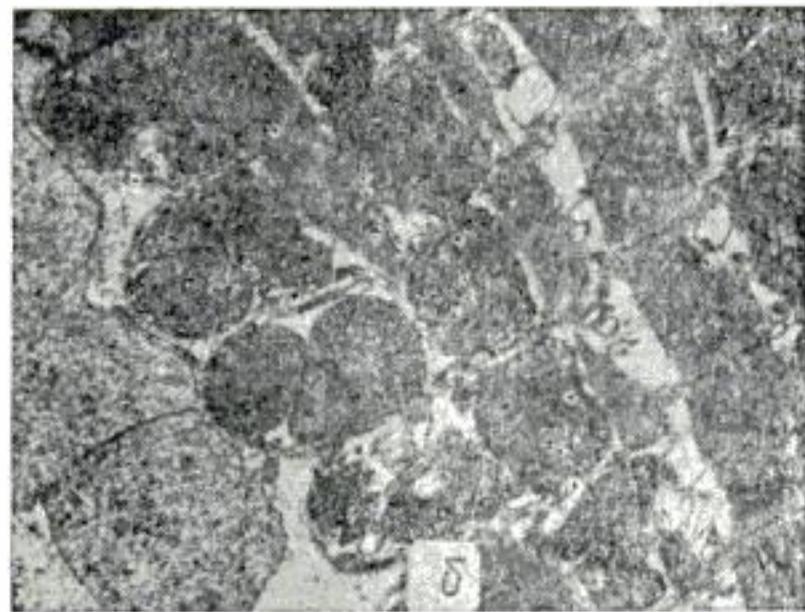
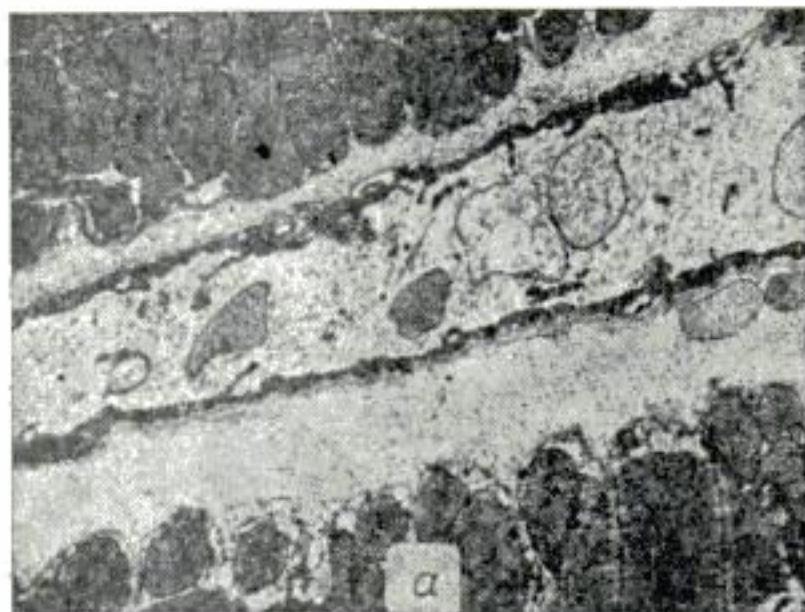


Рис. 1. Ультраструктура миокарда при 30 мин ТИ (37 °С): а — перикапиллярный отек, мембранные структуры в просвете капилляра. Х4000; б — набухание элементов саркоплазматического ретикулума, исчезновение гранул гликогена из цитоплазмы КМЦ. Х8000

Уже через 30 мин ТИ при 37 °С в миокарде определяются умеренный интерстициальный отек, структурные изменения капилляров в виде истончения маргинальных участков цитоплазмы эндотелиоцитов (Эн), десквамации микроворсин на люминальной поверхности Эн, появления в просвете капилляров многочисленных мембранных фрагментов, что приводит к ок-

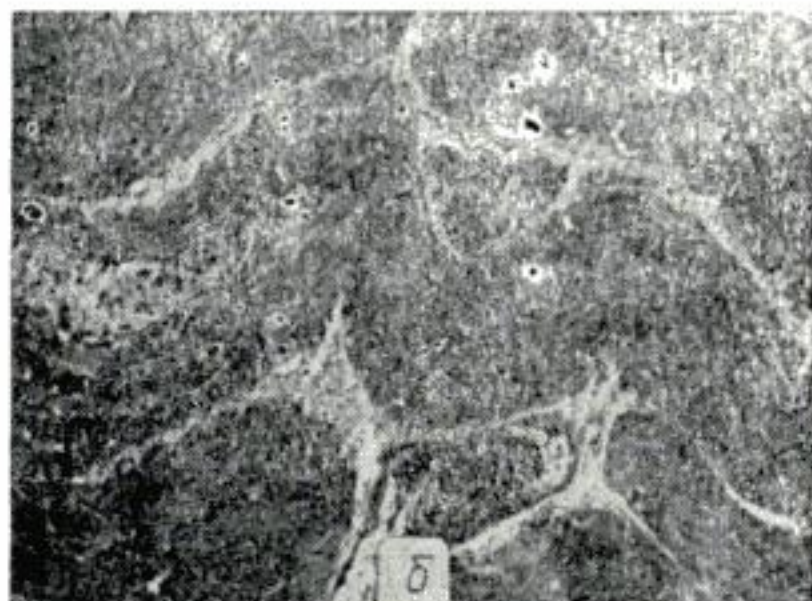
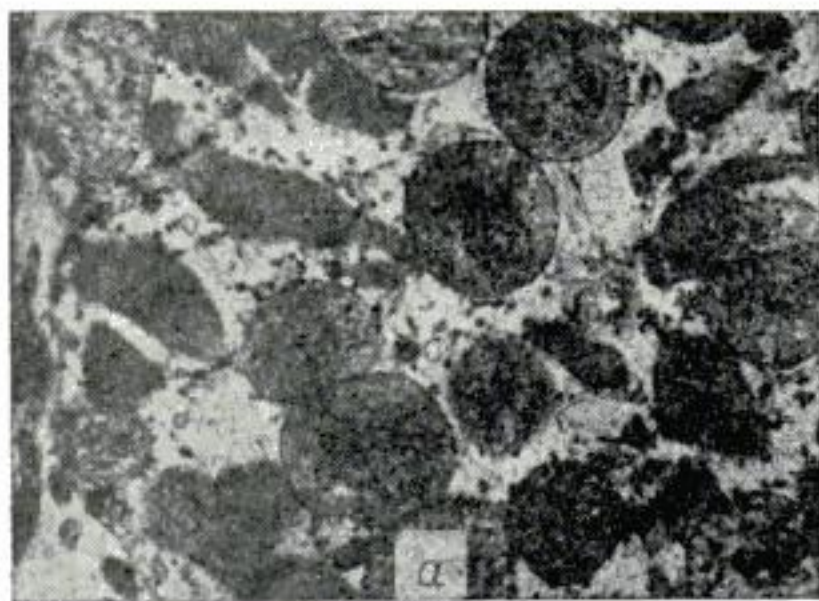


Рис. 2. Ультраструктура миокарда при 2 ч ТИ: а — условия нормотермии (37 °С). Гомогенизация и разрушение крист митохондрий КМЦ, образование «стреловидных» внутрикристных осадков, лизис миофибрилл. Х9000; б — условия ГГ (0 °С). Умеренное обезвоживание КМЦ, сокращение миофибрилл, темные митохондрии. Х2000

клюзии сосудов гемомикроциркуляторного русла (рис. 1,а). В кардиомиоцитах (КМЦ) определяются локальные участки разрыхления и фрагментации миофибрилл, в митохондриях — просветление матрикса, появление крист сетчатой формы, умеренное набухание отдельных органелл. Увеличиваются размеры элементов саркоплазматической сети, в гиалоплазме исчезают гранулы гликогена (рис. 1,б). В условиях глубокой гипотермии (ГГ) при 0 °С ультраструктура миокарда изолированного сердца в пределах нормы.

Через 2 ч ТИ (37 °С) в миокарде развивается резко выраженный интерстициальный отек, уменьшается просвет капилляров вследствие увеличе-

ния гидростатического давления жидкости основного вещества. В паренхиме миокарда определяются светлые (с) и темные (т) КМЦ. Последние характеризуются более плотной упаковкой внутриклеточных структур, наблюдается умеренная дегидратация цитоплазмы этих клеток и контрактура миофибрилл. В с-КМЦ органеллы расположены более свободно. Встречаются участки отека периферической зоны КМЦ, разрывы плазмалеммы, миофибриллы часто разрыхлены, местами повреждены. В митохондриях наблюдается везикуляция и разрушение крист, определяются «стреловидные» внутрикристные осадки, мелкие осмиефильные включения (рис. 2,а). Такие

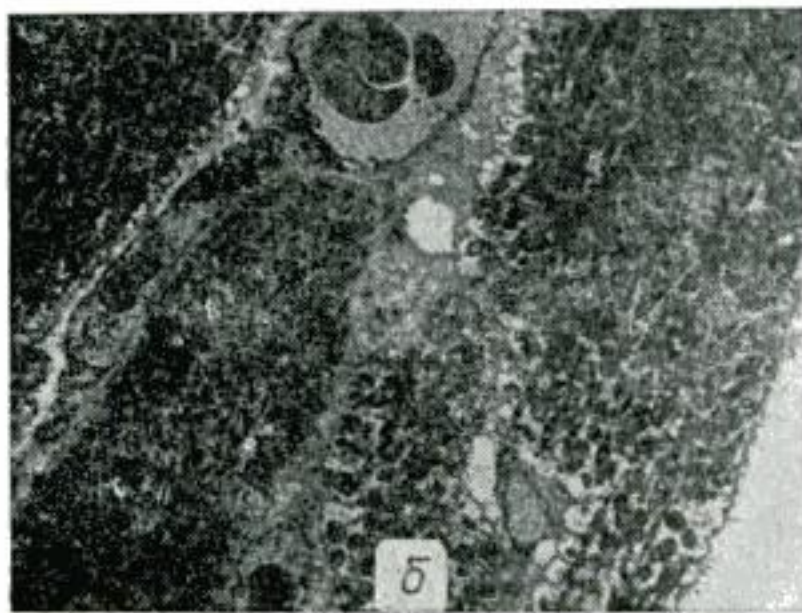


Рис. 3. Ультраструктура миокарда при 5 ч ТИ: а — условия нормотермии (37° С). Тотальное набухание митохондрий КМЦ. X10000; б — условия ГГ (0 °С). Умеренный отек периферических участков цитоплазмы КМЦ. X2000.

изменения органелл КМЦ рассматривают как структурный эквивалент развивающихся необратимых ишемических повреждений [7]. В условиях ГГ при 0 °С ультраструктура миокарда мало отличается от таковой, характерной для нормы (рис. 2,б). Определяется лишь умеренное обезвоживание КМЦ и отсутствие в цитоплазме гранул гликогена. Митохондрии и мио-

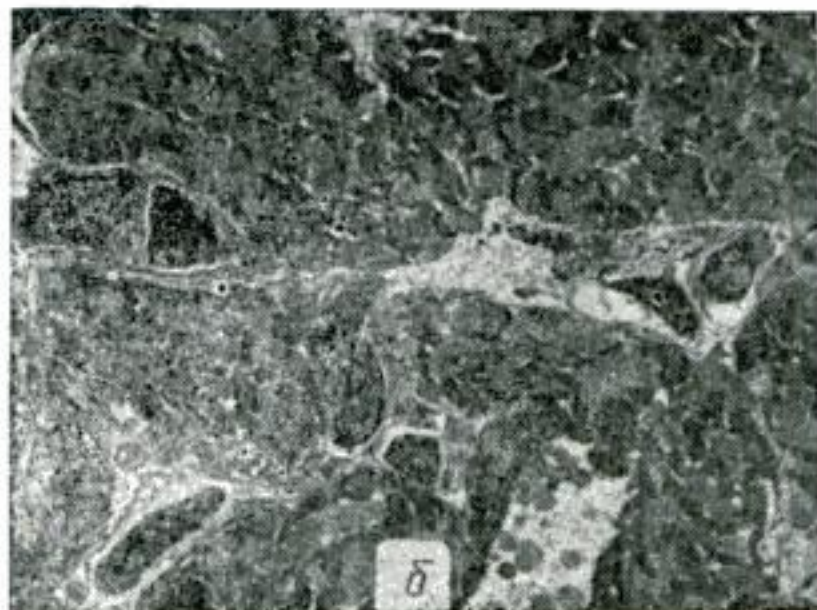
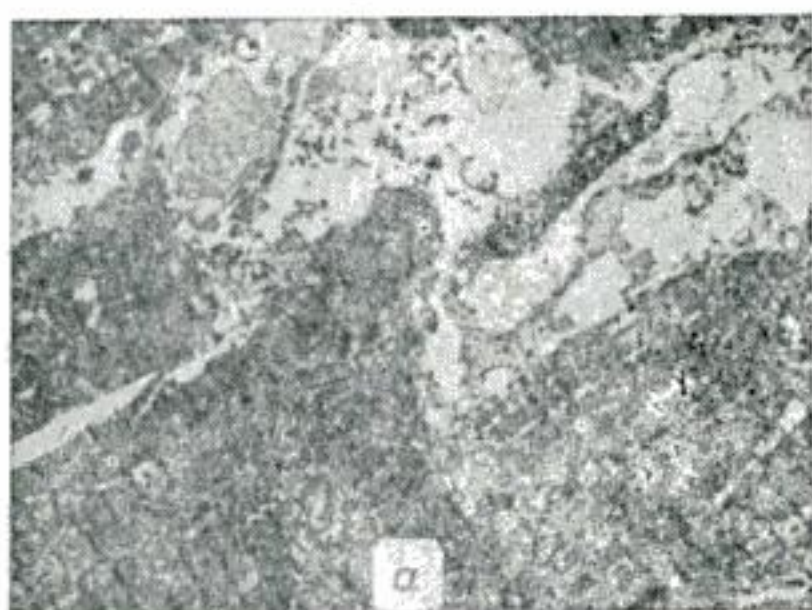


Рис. 4. Ультраструктура миокарда при длительной ($T > 12$ ч) ТИ: а — условия нормотермии (37 °С). Интерстициальный отек, некротические изменения клеточных элементов стромы и паренхимы. X2000; б — условия ГГ (0 °С). Умеренное тотальное набухание митохондрий КМЦ, фрагментация миофибрилл, обширный перинуклеарный отек. X2000

фибриллы в основном без видимых структурных повреждений. Эн капилляров заметно истончены, в просвете микрососудов выявляются везикулы, деформированные эритроциты, хлопьевидные образования.

Через 5 ч ТИ при 37 °С в миокарде не выявляется интерстициальный отек. В КМЦ определяется тотальное набухание митохондрий (рис. 3,а). В цитоплазме мышечных клеток встречаются миелиноподобные образования, разрушенные митохондрии. В матриксе многих органелл расположены темные осадки, мелкие плотные включения. Кристы в основном гомогенизированы, повреждены. В условиях ГГ при 0 °С в миокарде изолирован-

ного сердца определяется выраженный интерстициальный отек, выявляются т- и с-КМЦ (рис. 3,б). В т-КМЦ миофибриллы умеренно сокращены. Для с-КМЦ характерно разрыхление структуры клетки, вероятно, вследствие умеренного отека цитоплазмы. Выявляются набухшие митохондрии, локальные участки повреждений миофибрилл и плазмалеммы. Встречаются отечные фибробласты и макрофаги.

В течение последующих 12—24 ч ТИ при 37 °С в миокарде определяются интерстициальный отек и многочисленные некротически измененные клеточные элементы стромы и паренхимы (рис. 4,а). В условиях ГГ при 0 °С к 12 ч ТИ в миокарде не выявляется интерстициальный отек. В КМЦ определяется умеренное тотальное набухание митохондрий, обнаруживаются участки разрыхления и повреждения миофибрилл, плазмалеммы, выявляется обширный перинуклеарный отек (рис. 4,б).

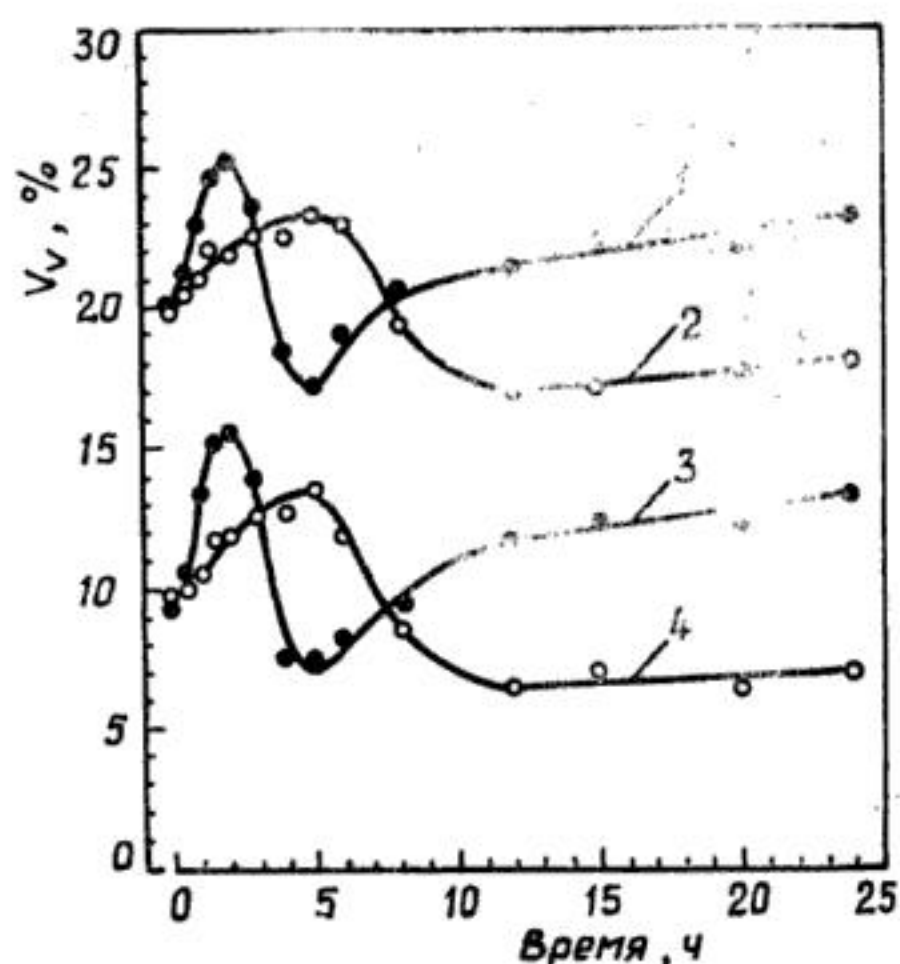


Рис. 5. Кинетики изменений объемных долей: стромального компонента миокарда при 37 °С ТИ (1) и при 0 °С ТИ (2), основного вещества соединительной ткани миокарда при 37 °С ТИ (3) и при 0 °С ТИ (4)

монотонный рост цифровых значений показателя $V_v^{стр}$ от 17,50 % до 23,00 %. В условиях ГГ при 0 °С в миокарде также наблюдается волнообразный процесс роста и убыли объемной доли стромального компонента (рис. 5, кривая 2). Однако при ГГ происходит значительное замедление процесса развития ТИ миокарда. Как оказалось, максимальное значение относительного объема стромы (23,50 %) в миокарде при 0 °С достигается к 5 ч, а минимальное значение (17,20 %) — к 12 ч ТИ. Волнообразное изменение объемной доли стромы миокарда при ТИ (37 °С) обусловлено синхронно протекающим процессом роста и убыли относительного объема основного вещества соединительной ткани (рис. 5, кривая 3). В первом временном интервале $T_1 \in 0—2$ ч цифровые значения показателя $V_v^{об}$ возрастают от 9,50 % в норме до 15,50 % ($\epsilon = \pm 0,30$ %). Во втором временном интервале $T_2 \in 2—5$ ч объемная доля основного вещества убывает от 15,50 до 7,50 %, а затем, в интервале времени $T_3 \in 5—24$ ч, цифровые значения показателя $V_v^{об}$ вновь возрастают от 7,50 до 13,50 % ($\epsilon = \pm 0,30$ %). В условиях ГГ при 0 °С в ишемизированном миокарде также наблюдается синхронизация процессов роста и убыли объемных долей стромы и основного вещества соединительной ткани (рис. 5, кривые 2 и 4). При 0 °С максимальное значение показателя $V_v^{об}$, равное 13,50 %, достигается к 5 ч, а минимальное (6,50 %) — к 12 ч ТИ миокарда ($\epsilon = \pm 0,30$ %). В дальнейшем

Проведенный морфометрический анализ позволил выявить закономерности структурных изменений миокарда при ТИ изолированных сердец в условиях их длительного хранения при 37 и 0 °С. Установлено, что в процессе ТИ при 37 °С в миокарде наблюдается последовательное чередование во времени стадий роста и убыли относительного объема стромального компонента (рис. 5, кривая 1). В интервале времени $T_1 \in 0—2$ ч в миокарде наблюдается интенсивный рост объемной доли стромы с 20,00 % в норме до 25,20 % ($\epsilon = \pm 0,30$ %). Во втором временном интервале $T_2 \in 2—5$ ч происходит значительная убыль относительного объема стромального компонента от 25,20 % до 17,50 % ($\epsilon = \pm 0,30$ %), а в третьем временном интервале $T_3 \in 5—24$ ч вновь

происходит медленный монотонный рост цифровых значений показателя $V_v^{об}$ от 6,50 % (12 ч) до 7,20 % (24 ч). В связи с тем, что фибриллярный компонент основного вещества соединительной ткани в процессе длительной ТИ изолированного сердца не претерпевает существенных структурных и биомеханических изменений [9], динамика цифровых значений показателя $V_v^{об}$ обусловлена исключительно колебанием количества межклеточной жидкости в ишемизированном миокарде.

На рис. 6 приведены графики изменений относительных объемов капилляров и клеток соединительной ткани в миокарде при ТИ. В условиях нормотермии (37 °С) наблюдается убыль относительного объема капилляров (кривая 1) от 7,00 % в норме до 4,50 % ($\epsilon = \pm 0,30$ %) к 5 ч ТИ, а затем в интервале времени $T \in 5-24$ ч — стабилизация цифровых значений этого показателя. В условиях ГГ при 0 °С убыль объемной доли капилляров в ишемизированном миокарде происходит значительно медленнее (кривая 2) от 7,00 % в норме до 5,40 % ($\epsilon = \pm 0,30$ %) к 12 ч ТИ, а затем ($T > 12$ ч)

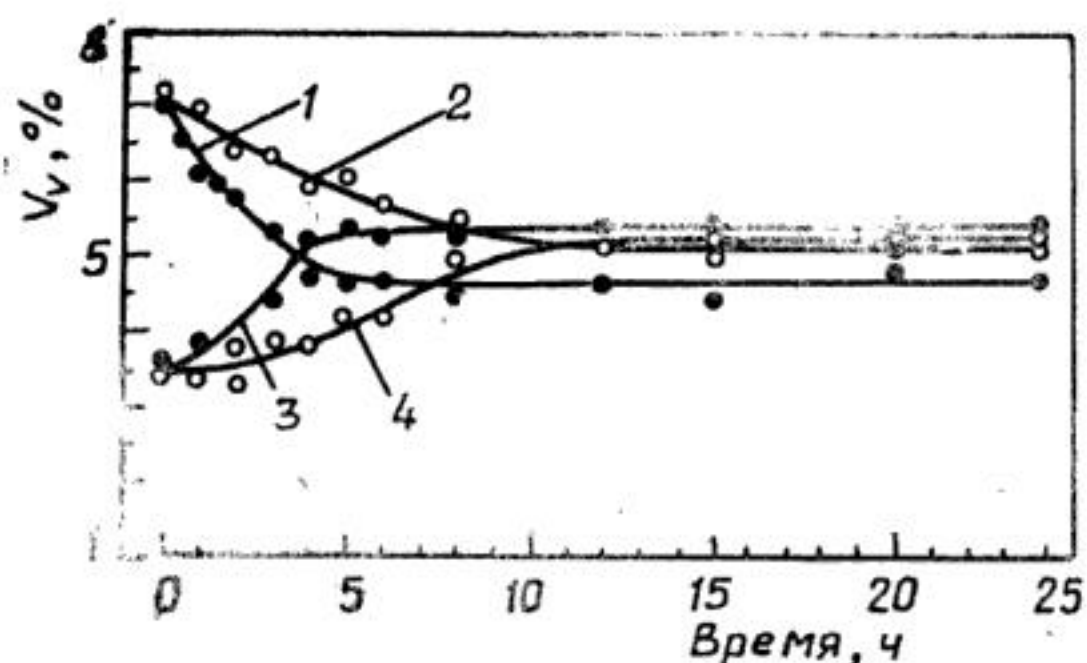


Рис. 6. Кинетики изменений объемных долей: капилляров миокарда при 37 °С ТИ (1) и при 0 °С ТИ (2), клеток соединительной ткани миокарда при 37 °С ТИ (3) и при 0 °С ТИ (4)

цифровые значения этого показателя, в пределах погрешности измерений, остаются постоянными. В процессе ТИ в миокарде крыс наблюдается достоверный рост относительного объема клеток соединительной ткани. В условиях нормотермии (37 °С) цифровые значения показателя $V_v^{кст}$ возрастают от 3,50 % в норме до 5,50 % ($\epsilon \pm 0,30$ %) к 5 ч ТИ, а затем в интервале времени $T \in 5-24$ ч, наблюдается стабилизация цифровых значений этого показателя (кривая 3). В условиях ГГ при 0 °С увеличение относительного объема клеток соединительной ткани происходит значительно медленнее, от 3,50 % в норме до 5,60 % ($\epsilon = \pm 0,30$ %) к 12 ч ТИ. В дальнейшем ($T > 12$ ч) цифровые значения этого показателя практически не изменяются (кривая 4). Следует отметить, что уменьшение объемной доли капилляров в миокарде при ТИ обусловлено в значительной мере редукцией кровенаполнения сосудов и интерстициальным отеком, а увеличение относительного объема клеток соединительной ткани — набуханием их цитоплазмы, оргanelл, в результате некоторого увеличения количества мононуклеарных клеток в строме миокарда. Вероятно, в процессе длительной ТИ происходит диапедез небольшого количества форменных элементов крови, в том числе мононуклеаров, из спавшегося сосудистого русла во внеклеточное пространство миокарда. Приведенные данные свидетельствуют о том, что изменения относительных объемов капилляров и клеток соединительной ткани в миокарде при ТИ в условиях нормо- и глубокой гипотермии практически нивелируют друг друга и, следовательно, не оказывают существенного влияния на динамику цифровых значений объемной доли стромального компонента.

Возникает вопрос, откуда появляется дополнительное количество межклеточной жидкости в строме миокарда и в каких структурах она затем депонируется в процессе длительной ТИ изолированного сердца? По условиям эксперимента приток жидкости в миокард из раствора исключен, следовательно, источником дополнительного количества жидкости в интерстиции

ишемизированного миокарда могут быть только кардиомициты, гиалоплазма и митохондрии которых содержат значительное количество воды. С целью проверки данного предположения, нами проведен морфометрический анализ ультраструктуры КМЦ в разные периоды ТИ миокарда.

На рис. 7 представлены графики изменений объемной доли гиалоплазмы КМЦ ишемизированного миокарда в условиях нормотермии (37 °C) — кривая 1 и при ГГ (0 °C) — кривая 2. Как оказалось, в течение 2 ч ТИ при 37 °C в паренхиме миокарда наблюдается процесс обезвоживания КМЦ, объемная доля гиалоплазмы этих клеток уменьшается от 10,00 % в норме до 4,20 % ($\varepsilon = \pm 0,30$ %). Эта внутриклеточная жидкость поступает в интерстициальное пространство миокарда и вызывает развитие отека соединительной ткани. Происходит сдавливание капилляров, уменьшение их просвета и, как следствие, убыль относительного объема микрососудов. В интервале времени $T \in 2-24$ ч наблюдается постепенное увеличение объемной доли гиалоплазмы КМЦ, от 4,20 до 9,20 %. В условиях ГГ при 0 °C

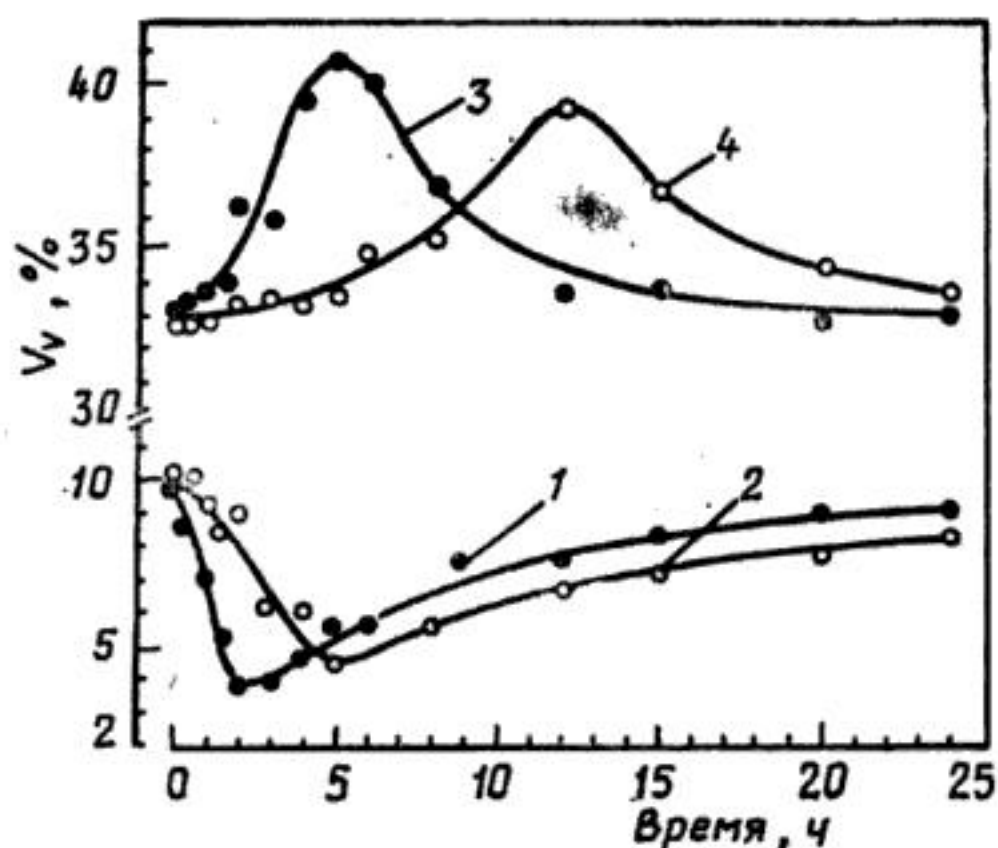


Рис. 7. Кинетики изменений объемных долей: гиалоплазмы КМЦ при 37 °C ТИ миокарда (1) и при 0 °C ТИ (2), митохондрий КМЦ при 37 °C ТИ миокарда (3) и при 0 °C ТИ (4)

в паренхиме миокарда также определяется процесс дегидратации КМЦ. Однако при 0 °C минимальное значение относительного объема гиалоплазмы КМЦ (4,80 %) наблюдается к 5 ч ТИ миокарда, а затем происходит постепенное увеличение объемной доли гиалоплазмы до 8,50 % ($\varepsilon = \pm 0,30$ %) к 24 ч, кривая 2. Следовательно, начальная стадия ТИ миокарда характеризуется наличием причинно-следственной связи между изменениями объемных долей гиалоплазмы КМЦ и одновременно основного вещества соединительной ткани (СТ). Эту зависимость можно изобразить следующим образом:

$$v_v^{gp} \downarrow (\text{КМЦ}) \rightarrow v_v^{ov} \uparrow (\text{СТ}), \quad (1)$$

здесь стрелки ($\downarrow$) и ($\uparrow$) обозначают соответственно убыль и рост цифровых значений морфометрических показателей. Вероятно, одним из возможных механизмов, способствующих процессу обезвоживания КМЦ, является умеренная тотальная контрактура миофибрилл, уменьшение объема клеток. Ранее нами установлено (рис. 5), что при ТИ миокарда вслед за возрастающим интерстициальным отеком наблюдается обратный процесс — умеренное обезвоживание стромального компонента, значительное уменьшение объемной доли основного вещества СТ. Результаты проведенного морфометрического анализа позволили установить, что при ТИ сердца обезвоживание СТ миокарда одновременно сопровождается процессом тотального набухания митохондрий КМЦ. На рис. 7 представлены графики изменений объемных долей митохондрий КМЦ при ТИ миокарда в условиях нормотермии (37 °C) — кривая 3 и при ГГ (0 °C) — кривая 2. Как оказалось, при ТИ миокарда (37 °C) наблюдается рост относительного объема митохондрий КМЦ от 33,00 % в норме до 40,70 % ($\varepsilon = \pm 0,30$ %) к 5 ч эксперимента, а затем — уменьшение цифровых значений показателя V_v^{mx} до 33,00 % (24 ч). В условиях ГГ при 0 °C максимальное значение объемной доли митохондрий КМЦ (39,50 %) наблюдается к 12 ч ТИ миокарда. В дальнейшем ($T > 12$ ч) происходит убыль относительного объема митохондрий КМЦ до 33,40 % (24 ч). Следовательно, второй отличительной особенностью процесса ТИ миокарда является наличие причинно-следственной связи между изменени-

ями относительных объемов митохондрий КМЦ и основного вещества СТ. Эту зависимость можно изобразить следующим образом:

$$V_v^{mx} \downarrow (\text{КМЦ}) \rightarrow V_v^{ov} \uparrow (\text{СТ}). \quad (2)$$

Анализ и сопоставление кинетических кривых изменений во времени цифровых значений показателей $V_v^{стр}$, V_v^{ov} , $V_v^{кап}$, $V_v^{кст}$, $V_v^{гп}$, V_v^{mx} миокарда крыс при ТИ позволили выявить общие для всех графиков три точки экстремума на временной шкале: $T_1 = 2$ ч, $T_2 = 5$ ч, $T_3 = 12$ ч. В этих точках наблюдается последовательное чередование во времени процессов роста и убыли цифровых значений морфометрических показателей, характеризующих динамику структурной организации миокарда при ТИ изолированного сердца. Следовательно, точки экстремума на временной шкале являются естественными границами последовательных стадий развития ТИ миокарда.

Суммируя вышеизложенное, а также выявленные основные зависимости вида (1 и 2), предлагаем следующую морфометрическую характеристику последовательных стадий (S) развития процесса ТИ миокарда.

1. *Стадия обратимых ишемических изменений.* S_1 , $T \in 0-2$ ч, $V_v^{гп} \downarrow$ (КМЦ), $V_v^{ov} \uparrow$ (СТ), ($T = 37^\circ\text{C}$); в условиях ГГ S_1 , $T \in 0-5$ ч, ... ($T = 0^\circ\text{C}$). Основной процесс — обезвоживание КМЦ и отек СТ. В этот период ТИ в миокарде происходит:

— увеличение объемной доли стромы от 20,00 до 25,50 %, в условиях ГГ — до 23,50 %;

— увеличение относительного объема основного вещества СТ от 9,50 до 15,50 %, в условиях ГГ — до 13,50 %;

— увеличение объемной доли клеток СТ от 3,50 до 4,20 %, в условиях ГГ — до 3,70 %;

— увеличение относительного объема митохондрий КМЦ от 33,00 до 36,00 %, в условиях ГГ — до 33,30 %;

— уменьшение объемной доли гиалоплазмы КМЦ от 10,00 до 4,20 %, в условиях ГГ — до 4,80 %;

— уменьшение относительного объема капилляров от 7,00 до 5,80 %, в условиях ГГ — до 6,50 %;

2. *Стадия накопления необратимых ишемических повреждений.* S_2 , $T \in 2-5$ ч, $V_v^{mx} \uparrow$ (КМЦ), $V_v^{ov} \downarrow$ (СТ), ($T = 37^\circ\text{C}$); в условиях ГГ S_2 , $T \in 5-12$ ч, ... ($T = 0^\circ\text{C}$). Основной процесс — тотальное набухание митохондрий КМЦ и обезвоживание СТ. В этот период ТИ в миокарде происходит:

— уменьшение относительного объема стромы от 25,20 до 17,50 % в условиях ГГ от 23,50 до 17,20 %;

— уменьшение объемной доли основного вещества СТ от 15,50 до 7,50 %, в условиях ГГ 13,50 до 6,50 %;

— уменьшение относительного объема капилляров от 5,80 до 4,70 %, в условиях ГГ от 6,80 до 5,20 %;

— увеличение объемной доли клеток СТ от 4,20 до 5,40 %, в условиях ГГ от 3,70 до 5,20 %.

— увеличение относительного объема митохондрий КМЦ от 36,00 до 40,70 %, в условиях ГГ от 33,30 до 39,50 %;

— увеличение объемной доли гиалоплазмы КМЦ от 4,20 до 5,40 %, в условиях ГГ от 4,80 до 6,80 %.

3. *Стадия развития некроза миокарда.* S_3 , $T \in 5-24$ ч, $V_v^{mx} \downarrow$ (КМЦ), $V_v^{ov} \uparrow$ (СТ), ($T = 37^\circ\text{C}$); в условиях ГГ S_3 , $T \in 12-24$ ч, ... ($T = 0^\circ\text{C}$). Основной процесс — уменьшение отека митохондрий КМЦ и увеличение содержания межклеточной жидкости. В этот период ТИ в миокарде происходит:

- увеличение относительного объема стромы от 17,50 до 23,20 % в условиях ГГ от 17,20 до 18,20 %;
- увеличение объемной доли основного вещества СТ от 7,50 до 13,30 %, в условиях ГГ от 6,50 до 7,20 %;
- постоянство относительного объема капилляров (4,70 %), в условиях ГГ (5,40 %);
- постоянство объемной доли клеток СТ (5,80%), в условиях ГГ (5,40 %);
- увеличение относительного объема гиалоплазмы КМЦ от 5,40 до 9,20 %, в условиях ГГ от 6,80 до 8,50 %;
- уменьшение объемной доли митохондрий КМЦ от 40,70 до 33,00 %, в условиях ГГ от 39,50 до 34,00 %.

В стадии S_3 наблюдается тотальный некроз структурно-функциональных элементов ишемизированного миокарда.

Таким образом, при ТИ миокарда миофибрилярно-митохондриальный комплекс КМЦ осуществляет функцию «насоса» по направленному перемещению внутриклеточной жидкости сначала в межклеточное пространство, а затем в обратном направлении — в гиалоплазму и митохондрии КМЦ. Независимо от температуры хранения изолированного сердца $T \in 0-37^\circ\text{C}$ развиваются 3 последовательные стадии ТИ миокарда. Глубокая гипотермия при 0°C значительно замедляет процесс развития ишемических повреждений миокарда, способствуя сохранению на более длительный срок (почти в 2,5 раза дольше) жизнеспособности клеточных элементов сердечной мышечной ткани.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биленко М. В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов.— М.: Медицина, 1989.— 368 с.
2. Загоруйко Г. Е. Графико-аналитический метод в морфометрическом анализе ультраструктур мышечных клеток сердца // Научно-технический прогресс в кардиологии.— Харьков: Б. и., 1986.— С. 11—14.
3. Загоруйко Г. Е. Закономерности структурной перестройки стромы миокарда при адаптации к тканевой гипоксии и краниocereбральной гипотермии // Кробиология.— 1990.— № 2.— С. 3—10.
4. Загоруйко Г. Е., Офицеров В. Н. Механическое устройство для морфометрического и ориентационного анализа биологических структур // Бюл. эксперим.биологии.— 1979.— 88, № 11.— С. 625—626.
5. Каруну В. Я. Электронная микроскопия.— Киев: Вища школа, 1984.— 208 с.
6. Мешалкин Е. Н., Верещагин И. П. Окклюзии в условиях неглубокой гипотермической защиты.— Новосибирск: Наука, 1985.— 197 с.
7. Шаров В. Г. Возможные механизмы гибели кардиомиоцитов // Арх. патологии.— 1985.— 57, № 3.— С. 3—14.
8. Шперлинг И. Д. Морфологические типы гибели кардиомиоцитов при остром инфаркте миокарда у больных ишемической болезнью сердца // Арх. патологии.— 1987.— № 9.— С. 62—67.
9. Яблчанский Н. И., Шляховер В. Е., Загоруйко Г. Е., Бурлак Ю. П. Ультраструктурные основы прочности сердечной мышцы при тотальной ишемии // Кардиология.— 1987.— 28, № 8.— С. 89—90.
10. Armiger L. C., Ian S. W. M. Contraction-band necrosis: patterns of distribution in the myocardium and their diagnostic usefulness in sudden cardiac death // Pathology.— 1986.— 18, N 3.— P. 289—295.
11. Cabrol C. La transplantation cardiaque en 1987 // Presse med.— 1987.— 16, N 8.— P. 371—372.
12. McGregor Ch. G. A. Current state of heart transplantation // Brit. J. Hosp. Med.— 1987.— 37, N 4.— P. 310—318.
13. Swanson D. K., Pasaoglu I., Berkoff H. A. et al. Improved heart preservation with UW preservation solution // J. Heart Transplant.— 1988.— 7, N 6.— P. 456—457.
14. Takami Hirashi, Matsuda Hikaru, Hirose Hajime et al. Myocardial energy metabolism in preserved heart: comparison of simple storage and hypothermic perfusion // J. Heart Transplant.— 1988.— 7, N 3.— P. 205—212.
15. Wicomb W. N., Cooper D. K. S., Novitzky D. An airstream pump device for low pressure perfusion storage of the isolated heart // Cryobiology.— 1985.— 22, N 5.— P. 401—408.

Харьковский НИИ терапии

Поступила 24.08.90

THE SEQUENCE OF STRUCTURAL CHANGES IN MYOCARDIUM UPON TOTAL HEART ISCHEMIA UNDER NORMOTHERMIA AND DEEP HYPOTHERMIA

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

The regularities of structural changes in myocardium stroma and parenchyma were studied under prolonged ischemia (TI) at 37 °C and deep hypothermia (DH) at 0 °C on isolated hearts of male Wistar rats aging 2.5 months using methods of electron microscopy and morphometry. Three stages of myocardium TI have been revealed: a stage of reverse ischemic changes $T \in 0-2$ hr at 37 °C and $T \in 0-5$ hr at 0 °C; a stage of accumulation of irreversible changes $T \in 2-5$ hr at 37 °C and $T \in 5-12$ hr at 0 °C; a stage of the development of myocardium total necrosis $T \geq 5$ hr at 37 °C and $T \geq 12$ hr at 0 °C. It has been found that the myofibrillar — mitochondrial complex of cardiomyocytes (CM) works as a pump to direct the intracellular liquid firstly to the extracellular space and then to the opposite direction to hyaloplasm and predominantly to CM mitochondria. DH at 0 °C favors the maintainance of the viability of myocardium cellular elements for a longer period (by 2.5-fold).

УДК 57.043:577.217

М. В. Каранова, А. А. Андреев, Н. Н. Петропавлов, Т. Г. Щипакина

АНТИФРИЗНЫЕ БЕЛКИ СЫВОРОТКИ ТРЕСКИ

GADUS MORRHUA:

ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И ХАРАКТЕРИСТИКА

Из сыворотки трески *Gadus morrhua* в результате внесения изменений в традиционную методику очищены антифризные белки с молекулярными весами 18 500, 25 100, 31 500 и 33 900 дальтон, депрессирующие температуру замерзания неколлигативным способом. В концентрации 2 или 3 мг/мл эти белки соответственно на 38 и 25 % подавляли выживаемость свободноживущих амёб *Acanthamoeba proteus borokensis*. По мере увеличения содержания белка в инкубационной среде выживаемость амёб резко уменьшалась.

В сыворотке крови и в цитоплазме почти всех клеток морских рыб обитающих в районе полярного круга, присутствуют белки, обладающие способностью понижать температуру замерзания жидкостей их организма [3, 4]. Это свойство повышает возможность выживания этих рыб в условиях, когда в окружающей их воде присутствуют кристаллы льда, проникновение которого через жабры и покровы вызывает замерзание жидкостей тела даже при переохлаждении всего на 0,1 °C. Благодаря присутствию таких антифризных белков (АФБ) полярные рыбы в присутствии льда замерзают при охлаждении жидкостей тела до -2,2 °C, в то время как большинство рыб тропического и умеренного пояса — уже при охлаждении до -0,8 °C [2]. АФБ с молекулярными весами от 2600 до 33700 дальтон были впервые выделены из рыб подотряда нототениевых А. Де Фризом с соавт. [2]. Это гликопептиды, молекула которых состоит из повторяющихся единиц трипептида, каждая из которых образована остатками из трех аминокислот (два — аланина и один — треонина) и дисахаридом, ковалентно связанным с треонином [2]. В некоторых из этих гликопептидов остатки аланина заменены остатками пролина, но в основном они отличаются друг от друга лишь размерами молекулы и антифризной активностью. Позже белки с аналогичной функцией, но с совершенно иной структурой молекулы были выделены из многих других видов полярных рыб [1, 5—7, 11, 12]. Из камбалы, например, были очищены белки, не содержащие углеводного компонента, но включающие в свой состав большое количество аланина [5], из атлантической волосатки — белки, не содержащие углеводов, включающие небольшое количество (в процентном отношении) аланина и одновременно харак-

теризующиеся присутствием других аминокислот, в том числе и цистеина [12].

Из атлантической трески *Gadus morrhua* Хью с соавт. также были выделены антифризные гликопротеины, структура которых была идентична «классическим антифризам», выделенным Де Фризом из широколобика [7]. Особенностью таких АФБ является их способность хорошо растворяться в кислоте — свойство, которое используется при выделении и очистке этих белков. Обычно для этой цели к сыворотке добавляется равный объем 20 %-ной трихлоруксусной кислоты (ТХУ) — большая часть белков при этом выпадает в осадок и после центрифугирования в супернатанте остаются только белки, растворяющиеся в ТХУ, включая и АФБ. Однако, как следует из нашего опыта строгого следования методу Хью и соавт. [7], при добавлении раствора ТХУ непосредственно к сыворотке получается большой объем материала, из которого при концентрировании супернатанта обра-

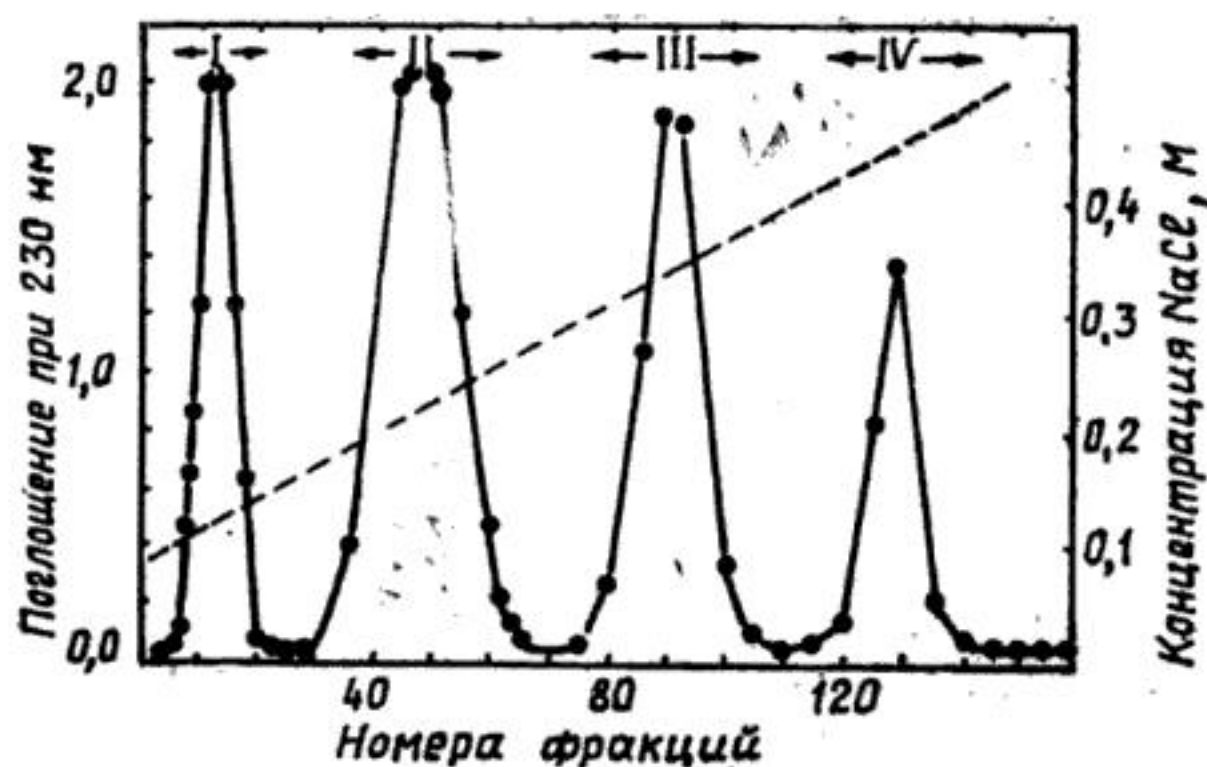


Рис. 1. Фракционирование ТХУ-растворимых белков сыворотки трески хроматографией с ДЭАЭ-целлюлозой: колонка (2 × 8 см) уравновешена 5 мМ Трис-НСl, рН 9,6; элюирование градиентом NaCl (0,1—0,5 н) в 5 мМ Трис-НСl, рН 9,6; объем каждой фракции 1 мл; фракции объединяли в следующем порядке: I — (3—37), II — (38—68), III — (74—106), IV — (120—140); антифризная активность фракции при концентрации белка 5 мг/мл: I — (−0,08 °С), II — (−0,3 °С), III — (−0,35 °С), IV — (−1,5 °С); пунктиром указана концентрация NaCl

зуется густой маслянистоподобный раствор белка в очень сконцентрированной ТХУ. Этот материал плохо поддается диализу и по причине слишком высокого содержания ТХУ использование колонки с Сефадексом G-25 для освобождения от ТХУ недостаточно эффективно.

В связи с вышесказанным мы предприняли попытку выделить и очистить АФБ из сыворотки трески *Gadus morrhua*, внося некоторые существенные для наших условий изменения в метод Хью и соавт. [7], а также испытали суммарную фракцию выделенных АФБ на возможную токсичность в инкубационных средах амёб *Amoeba proteus borokensis* как на объектах, весьма чувствительных к различным воздействиям.

Треску отлавливали в первой половине октября в западном секторе Баренцева моря в районе острова Медвежий при температуре воды 8 °С. В полученную кровь, освобожденную от фибрина и отцентрифугированную при 1 000 g 10 мин, добавляли этанол до концентрации 10 % и в охлажденном виде после прибытия корабля на материк доставляли в лабораторию. Сыворотку получали путем дополнительного центрифугирования при 12000 g 20 мин. Затем в течение 4 ч подвергали диализу против 5 мМ Трис-НСl, рН 7,5, и добавляли до насыщения сульфат аммония. Выпавший в осадок белок отделяли центрифугированием при 10000 g 15 мин. После диализа к осадку добавляли 10 % ТХУ. После центрифугирования супернатант пропускали через колонку с Сефадексом G-25. Полученный материал (суммарная фракция АФБ) концентрировали на роторном испарителе, затем наслаивали на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой, уравновешенную 5 мМ Трис-НСl, рН 9,6. Элюирование проводили 0,1—0,5 н градиентом NaCl; далее, после повторной рехроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе, наиболее активные

фракции лиофилизировали, обессоливали на колонке с Сефадексом G-25 или диализом, вновь лиофилизировали и наслаивали на колонку с Сефадексом G-100, уравновешенную 5 мМ Трис-НСI буфером. Фракции, элюированные этим же буфером, объединяли, как указано в примечаниях к рис. 3, измеряли на осмометре антифризную активность и лиофилизировали.

Электрофоретический анализ полученных фракций проводили методом Лэмли в 15 %-ном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия [8].

Белок определяли на спектрофотометре СФ-16 при 230 нм.

Антифризную активность измеряли на осмометре ОМКА ИЦ-01, предусматривающем автоматическое определение точки замерзания.

Амеб *Amoeba proteus borokensis* культивировали в среде Прескотта [10].

Результаты разделения ТХУ-экстракта с помощью ионообменной хроматографии представлены на рис. 1, из которого видно, что белок при элюировании градиентом NaCl выходит четырьмя пиками с максимальным содержанием в III пике. Хотя антифризная активность выявлялась во всех фракциях, во II и III она была существенно выше, чем в I и IV, а поскольку и белка в этих фракциях также выходило больше, именно их подвергали дальнейшей очистке с помощью рехроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе (рис. 2). Как видно из рисунка, после рехроматографии от основной фракции (II

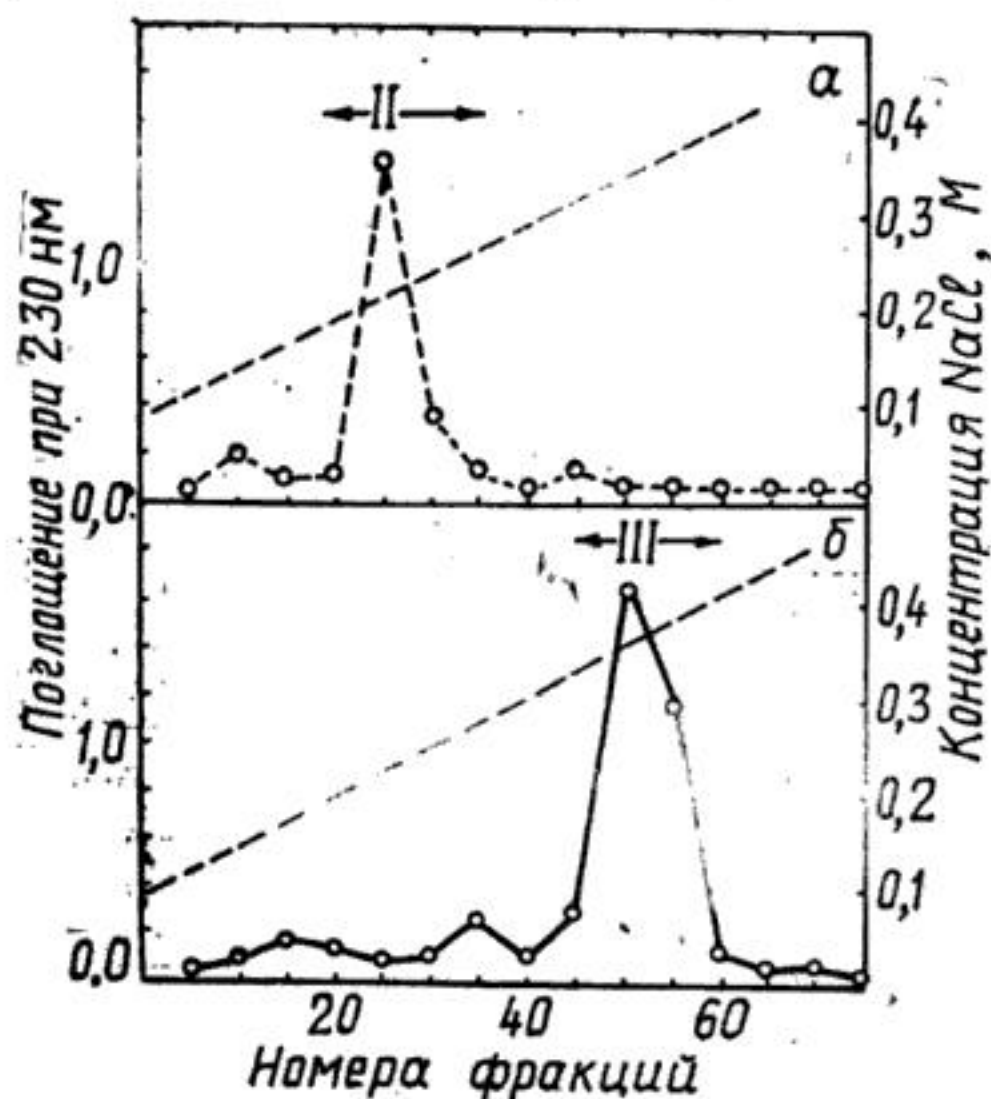
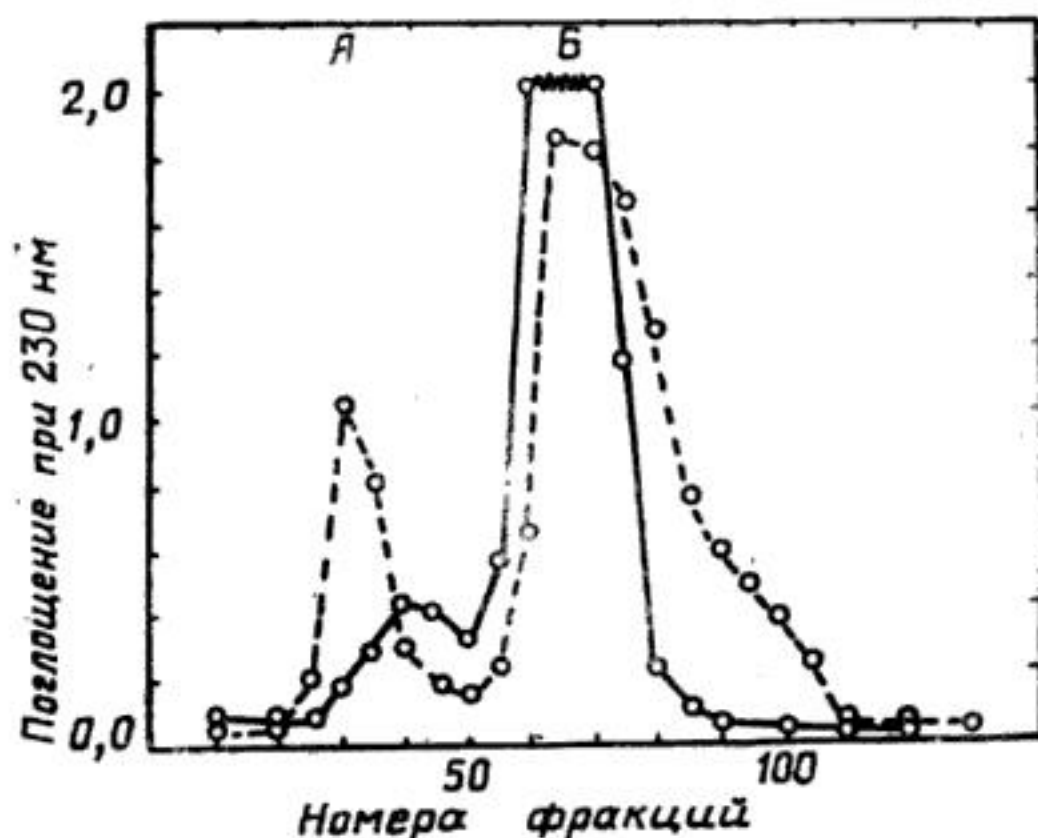


Рис. 2. Рехроматография II и III фракций на ДЭАЭ-целлюлозе: а — элюирование пика II; б — пика III; см. примечания к рис. 1

Рис. 3. Разделение АФГП на Сефадексе G-100: фракции II и III, полученные после рехроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе, лиофилизировали, обессоливали на колонке с Сефадексом G-25, вновь лиофилизировали и наслаивали на колонку с Сефадексом G-100 (1,6 × 90 см); объем каждой фракции — 1 мл; —○—○— фракция II; ○—○— фракция III; элюированные фракции объединяли в следующем порядке: IIA — (10—48), IIB — (52—90), IIIA — (20—50), IIIB — (52—85); активность фракций при 5 мг белка в мл: IIA — (—0,32 °C), IIB — (—0,25 °C), IIIA — (—0,4 °C), IIIB — (—0,2 °C)



и III) отделилось небольшое количество белка, которое мы в связи с его ограниченным количеством не использовали в дальнейшей работе. Фракции II и III после дальнейшей очистки гель-фильтрацией с Сефадексом G-100 (рис. 3) разделились вновь на два белковых пика, в каждом из которых белок обладал способностью понижать температуру замерзания (см. примечание к рис. 3).

Электрофоретическое разделение полученных препаратов показало, что белки фракций IIA, IIIA, IIB, IIIB имеют молекулярные веса, равные

соответственно 31 500, 33 900, 25 1000 и 18 500 (рис. 4). Следует отметить, что молекулярные веса семи АФБ, выделенных из трески Хью с соавт. [7], находятся в пределах от 2 500 до 33 000. В использованной нами методике очистки АФБ из трески, отличающейся от метода Хью и соавт., на какой-то стадии очистки белки с молекулярными весами 2 500, 5 000 и 6 700 или теряются, или же, что более вероятно, не идентифицируются в связи с тем,

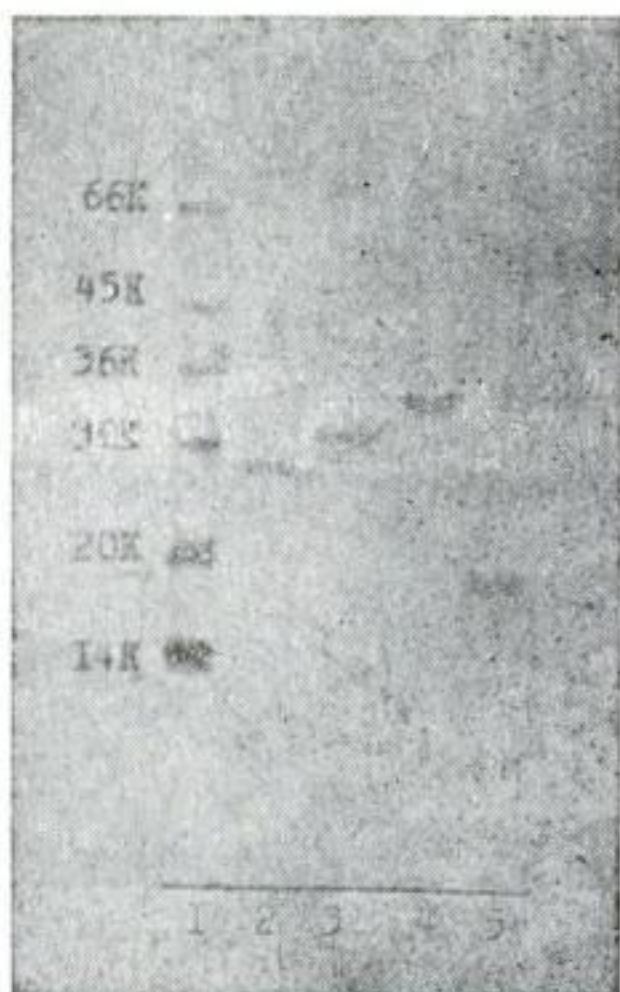


Рис. 4. Электрофорез в 15 %-ном полиакриламидном геле АФГП трески: 1-я полоса — электрофоретический паттерн белков-маркеров (66К — бычий сывороточный альбумин, 66 000 дальтон, 45К — яичный альбумин, 45 500, 36К — пепсин, 36 000, 30К — карбоангидраза, 3000, 20К — ингибитор трипсина, 20000, 14К — лактальбумин, 14000; 2-я — фракция IIБ, (25 100 дальтон), 3-я — фракция IIA (31.500), 4-я — IIIA (33.900), 5-я — IIБ (18.500); разделение шло при силе тока 10 мА на гель в течение 4 ч; гели окрашивали кумасси синим

что мы, в отличие от вышеупомянутых авторов, на последней стадии очистки не применяли метода газожидкостной хроматографии, позволяющего дополнительно идентифицировать и очистить исследуемые белки. Кроме того, эти «утерянные» нами белки могли присутствовать во фракциях I и IV, полученных после разделения на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой и не использованными нами для дальнейшей

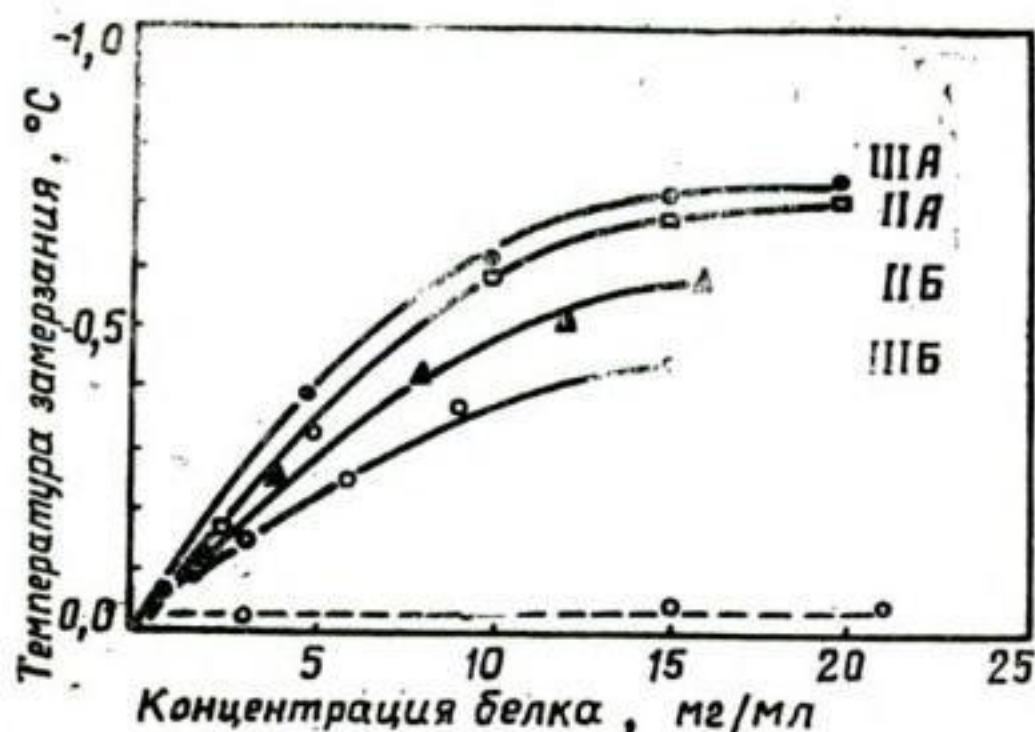


Рис. 5. Депрессия температуры замерзания различными концентрациями АФГП трески: —□— фракция IIA; —▲— IIБ; —●— IIIA; —○— IIБ; — — — — — альбумин

ходили (рис. 5). Белки с большим молекулярным весом в большей степени понижали температуру замерзания, чем низкомолекулярные. Такая же закономерность отмечалась ранее и другими исследователями в отношении АФБ, выделенных как из трески [7], так и из других представителей костистых рыб. Так, 1 мМ растворы гликопротеинов, выделенных из антарктической трески и имеющих молекулярные веса 7 900, 10 500 и 28 000 дальтон, замерзали соответственно при температуре $-0,37$, $-0,7$ и $-1,2$ °C. [11] Смесь растворов гликопротеинов «1—5» (молекулярные веса от 10 500 до 34 000) и «7—8»

очистки ввиду наличия в них не очень высокой антифризной активности (рис. 1).

Как показали результаты, полученные при измерении антифризной активности с помощью осмометра, выделенные нами АФБ понижали температуру замерзания дистиллированной воды, в которой они были растворены, неколлигативным способом, т. е. не зависящим от количества частиц или молекул, присутствующих в растворе, поэтому снижение температуры замерзания при концентрации белка выше, чем 20 мг в мл, не проис-

(2 600 и 3 500 дальтон), выделенных из классического объекта широколобика, при концентрации 16 мг/мл замерзает соответственно при $-0,8$ и $-0,4^{\circ}\text{C}$ [9]. Следует также добавить к вышесказанному, что альбумин, испытанный нами ради сравнения с исследуемыми АФБ трески, даже при концентрации 25 мг в мл замерзал практически при 0°C (см. рис. 5), что подчеркивает специфичность проявляемого антифризными белками свойства.

Ввиду предполагаемого нами в дальнейшем использования очищенных препаратов АФБ для лабораторных целей в качестве компонента криоконсервирующих сред мы проверили чувствительность свободноживущих амёб *Amoeba proteus borokensis* к присутствию в инкубационной среде различных количеств суммарной фракции АФБ (таблица). Как видно из таблицы, при концентрации 2—3 мг/мл выживает от 62 до 75 % амёб, но дальнейшее повышение концентрации оказывается губительным для их существования, и уже при 5 мг/мл погибают все амёбы. Такой результат кажется нам вполне приемлемым, так как дозы 2—3 мг/мл даже превышают предполагаемые нами в дальнейших лабораторных исследованиях. Кроме того, мы можем допустить, что препарат АФГП, который мы использовали в этих экспериментах, мог содержать хотя бы ничтожную примесь ТХУ, оставшуюся в нем после прохождения через колонку с Сефадексом G-25 и являющуюся веществом, весьма токсичным для всех живых организмов. Однако, не исключая и возможность специфического воздействия на амёбы исследуемых АФБ, мы также допускаем, что ингибирование их жизнедеятельности могло быть вызвано присутствием других белков, возможно, присутствующих в препарате суммарной фракции АФБ.

Влияние суммарной фракции АФГП на выживаемость амёб *Amoeba proteus borokensis* (примечания см. в тексте)

Количество белка, мг/мл	Количество амёб	Количество выживших амёб	Выживание %
2	160	100	62
3	40	30	75
4	40	20	50
5	80	0	0
10	40	0	0

Суммируя все вышеизложенные результаты нашей работы, мы вправе сделать следующее обобщение. Изменения, которые мы осуществили в методе выделения и очистки АФБ из сыворотки трески, дали нам возможность получить препараты нужного нам белка, ингибирующие кристаллообразование льда в водных растворах и имеющие молекулярные веса от 18 500 до 31 500. При этом на каком-то этапе очистки произошла потеря низкомолекулярных компонентов АФБ, которая (в связи с их меньшей, чем у высокомолекулярных белков, антифризной активностью, и, по-видимому, более низким количественным содержанием) не должна быть столь существенной для наших целей. Терпимость амёб к присутствию в инкубационной среде АФБ в достаточно высоких концентрациях дает нам обнадеживающую возможность использования этих белков в криоконсервирующих средах. О результатах предстоящих исследований в этом направлении мы доложим в ближайшем будущем.

Выражаем глубочайшую благодарность и признательность А. В. Калининной за предоставленную нам культуру амёб, а также Борису Николаевичу Вепринцеву за внимание и интерес, проявленный к данной работе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ananthanarayanan V. S., Slaughter D., Hew C. L., Antifreeze proteins from the ocean pout, *Macrozoarces americanus* // Biochem. Biophys. Acta.— 1986.— 870, N 1.— P. 154—159.
2. De Vries A. Glycoproteins as biological antifreeze agents in antarctic fishes // Science.— 1971.— 172, N 3988.— P. 1152—1155.
3. De Vries A. L. Antifreeze peptides and glycopeptides in cold-water fishes // Ann. Rev. Physiol.— 1983.— 45, N 2.— P. 245—260.
4. Feeney R. E. Biological antifreeze // Amer. Sci.— 1974.— 62.— P. 712—719.

5. Fournery R. M., Joshi S. B., Kao M. H., Hew C. L. Heterogeneity of antifreeze polypeptides from the Newfoundland winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus* // Can. J. Zool.—1984.— 62, N 1.— P. 28—33.
6. Hew C. L., Fletcher G. L., Ananthanarayanan V. S. Antifreeze proteins from the shorthorn sculpin, *Myoxocephalus scorpius*: isolation and characterization // Can. J. Biochem.—1980.— 58, N 3.— P. 377—383.
7. Hew C. L., Slaughter D., Fletcher G. L., Joshi S. B. Antifreeze glycoproteins in the plasma of Newfoundland Atlantic cod (*Gadus morrhua*) // Can. J. Zool.—1981. 59, N 11.— P. 2186—2192.
8. Laemli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4 // Nature.—1970.— 227, N 5259.— P. 680—685.
9. Lin Y., Duman J. G., De Vries A. L. Studies on the structure and activity of low molecular weight glycoproteins from an antarctic fish // Biochem. Biophys. Res. Commun.—1972.— 46, N 1.— P. 87—92.
10. Prescott D. M., Carrier R. F. Experimental procedures and culture methods for *Enplotes enristomus* and *Amoeba proteus* // Methods in Cell Biology.— New York: Acad. Press, 1967.— Vol. 1.— P. 85—95.
11. Schrag J. D., O'Grady S. M., De Vries A. L. Relationship of amino acid composition and molecular weight of antifreeze glycopeptides to non-colligative freezing point depression // Biochem. Biophys. Acta.—1982.— 717, N 3.— P. 322—326.
12. Slaughter D., Fletcher G. L., Ananthanarayanan V. S., Hew C. L. Antifreeze proteins from the Sea Raven, *Hemitripterus americanus*.— J. Biol. Chem.—1981.— 256, N 4.— P. 2022—2026.

Ин-т биофизики АН СССР,
г. Пущино

Поступила 31.07.90

M. V. KARANOVA, A. A. ANDREYEV, N. N. PETROPAVLOV, T. G. SHCHIPAKINA
ANTIFREEZE PROTEINS OF *GADUS MORRHUA* SERUM: ISOLATION,
PURIFICATION AND DESCRIPTION

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

Antifreeze proteins of molecular weights 18500, 25100, 31500 and 33900 D which depressed the freezing point in a non-colligative manner were purified from the serum of *Gadus morrhua* by the routine method with modifications. The proteins in concentrations 2 and 3 mg/ml decreased the viability of free-living *Amoeba proteus borokensis* by 38 and 25 %, respectively. The viability of amoebae dropped with increasing the protein content in the incubation medium.

УДК 676.344:599.322:612.57:591.543.42

С. П. Львова

СОДЕРЖАНИЕ ЛИПИДНЫХ КОМПОНЕНТОВ В КРОВИ
И КЕТОНОВЫХ ТЕЛ В ТКАНЯХ СУСЛИКОВ
ПРИ ИСКУССТВЕННОЙ ГИПОТЕРМИИ И ЗИМНЕЙ СПЯЧКЕ

Изучали содержание холестерина, фосфолипидов, свободных жирных кислот в крови и кетонových тел в печени, крови, миокарде, скелетных мышцах, мозге сусликов при искусственной гипотермии (30,20 °C) и зимней спячке (1, 7, 30 дней, 3 мес.). Количество фосфолипидов в крови при гипотермических состояниях снижается. При гибернации увеличивается доля эфиров холестерина и отношение ацетоацетат / β оксисубутират. Количество кетонových тел достоверно возрастает при пробуждении.

Зимоспящим животным свойственна эволюционно выработанная тканевая резистентность к действию низких температур, которая особенно хорошо проявляется в зимний период [6]. Процессы адаптации животных к холоду в значительной мере связаны с изменением мембранных и запасных липидов и их обмена [3, 5]. Целью данной работы явилось изучение содержания ряда липидов в крови (которые в значительной мере отражают изменения липидов в органах и тканях), а также кетонových тел в органах сусликов при искусственной и физиологической (зимняя спячка) гипотермии.

Определяли содержание свободных жирных кислот [3], холестерина, фосфолипидов [2] в сыворотке крови, кетоновых тел [1] в печени, крови, мозге, миокарде, скелетных мышцах малых сусликов (*Citellus pygmaeus Pallas*). Эксперименты по искусственной гипотермии проводили в июне—июле. Животных охлаждали до ректальной температуры 30 и 20 °С. Опыты по гибернации проводили в октябре—марте. Животных брали в опыт в 1-ый день непрерывной спячки (температура тела 15—17 °С), через неделю непрерывной спячки (10 °С), через 1 и 3 мес. спячки (10 °С), а также при естественном пробуждении (март) от длительной зимней спячки. Контролем служили бодрствующие нормотермические животные в этот же сезон года.

Найдено (табл. 1, 2), что содержание исследованных липидов в крови сусликов достоверно выше, чем у незимоспящих млекопитающих [1, 2, 4], близких в систематическом плане к сусликам (белые крысы, мыши, кролики). Это же относится и к уровню кетоновых тел в тканях, особенно в миокарде и мозге, в которых количество кетоновых тел у сусликов в 1,7—2 раза выше, чем у белых крыс. Значительное увеличение липидных компонентов в крови и кетоновых тел в тканях наблюдалось в наших экспериментах и у крыс, адаптированных к многократным охлаждениям [6]. Таким образом, между сусликами и адаптированными к охлаждениям крысами в динамике исследованных липидов прослеживается определенный параллелизм, отражающий интенсификацию липидного обмена.

Начальные этапы гипотермии (30 °С) сопровождаются значительным усилением распада запасных жиров. Уровень жирных кислот в крови сусликов увеличивается при этом в 2,5 раза (табл. 1). Одновременно в крови значительно возрастает количество хиломикрон, вследствие чего сыворотка становится похожей на молоко. Последующий гидролиз жиров, содержащихся в хиломикронах, приводит к локальному увеличению концентрации жирных кислот и их диффузии в ткани [4]. Жирные кислоты являются не только высококалорийным энергетическим субстратом, но и эффективным разобщителем дыхания и фосфорилирования [4], что увеличивает теплообра-

Таблица 1

Содержание липидных компонентов в сыворотке крови сусликов при искусственной гипотермии и зимней спячке ($M \pm m$)

Вариант опыта	Холестерин, мг%			Фосфолипиды, мг%	Жирные кислоты, мкэкв/мл
	общий	свободный	эстерифицированный		
Искусственная гипотермия					
Контроль, лето	401±12	201±10	200±5	375±19,6	0,40±0,02
Гипотермия, 30 °С	538±19,9*	276±20,3*	262±22,7*	237±1,7*	1,02±0,23*
Гипотермия, 20 °С	355±14,9*	194±11,8	161±22,4	202±10,7*	0,46±0,04
Самосогревание, 37 °С	458±17*	295±12,3*	163±13,2	200±10,2	0,83±0,08*
Гибернация					
Контроль осень	338±9,7	113±4,2	225±6,4	255±3,8	0,46±0,01
Зимняя спячка:					
1 день, 15÷17 °С	320±17	100±4,9	220±20,3	112±12,8*	0,33±0,004*
7 дней, 10 °С	299±18	115±7,9	184±10,8*	125±18*	0,65±0,052*
1 мес., 10 °С	368±11	130±8,4	238±5,2	140±12*	0,56±0,04*
3 мес., 10 °С	461±5*	267±9,3*	194±18	130±9,9*	0,48±0,09
Начало пробуждения, 15÷17 °С	689±10,9*	213±12*	477±7,7*	115±13,5*	0,50±0,02
Полное пробуждение, 37 °С	755±33*	243±13,8*	532±18*	85±7*	0,91±0,001

Примечание: Каждая величина — среднее из 6—8 опытов. Здесь и в табл. 2 звездочкой обозначены достоверные ($P < 0,05$) различия по сравнению с соответствующим контролем.

Содержание кетоновых тел в тканях сусликов при искусственной гипотермии и зимней спячке, мг % ($M \pm m$)

В а р и а н т о п ы т а	Печень		Кровь		Мышцы		Миокард		Мозг	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Искусственная гипотермия										
Контроль, лето	3,64 $\pm 0,48$	11,43 $\pm 0,77$	1,21 $\pm 0,14$	2,25 $\pm 0,21$	3,0 0,26	8,65 $\pm 0,41$	5,38 $\pm 0,42$	8,9 $\pm 0,48$	2,72 $\pm 0,92$	8,25 $\pm 0,36$
Гипотермия, 30 °С	2,88 $\pm 0,25$	6,96 $\pm 0,35^*$	0,5 $\pm 0,04^*$	1,56 $\pm 0,17^*$	1,44 $\pm 0,02^*$	6,02 $\pm 0,46^*$	1,0 $\pm 0,01^*$	4,32 $\pm 0,28^*$	0,65 $\pm 0,05^*$	5,23 $\pm 0,48^*$
Гипотермия, 20 °С	2,81 $\pm 0,15$	12,0 $\pm 0,79$	1,21 $\pm 0,13$	3,15 $\pm 0,3^*$	1,86 $\pm 0,19^*$	9,32 $\pm 0,46$	2,9 $\pm 0,32^*$	5,52 $\pm 0,47^*$	1,54 $\pm 0,17^*$	6,75 $\pm 0,55$
Самосогревание, 37 °С	3,78 $\pm 0,6$	11,3 $\pm 0,57$	0,55* $\pm 0,002$	2,82 $\pm 0,26$	1,6* $\pm 0,002$	7,69 $\pm 0,68$	1,41 $\pm 0,16^*$	5,74 $\pm 0,57^*$	0,72 $\pm 0,05^*$	6,76 $\pm 0,68$
Зимняя спячка										
Контроль, осень	1,11 $\pm 0,11$	10,2 $\pm 0,9$	0,32 $\pm 0,035$	0,94 $\pm 0,06$	1,3 $\pm 0,1$	4,8 $\pm 0,13$	0,78 $\pm 0,11$	4,6 $\pm 0,26$	3,4 $\pm 0,37$	3,1 $\pm 0,21$
3-месячная спячка, 10 °С	2,3 $\pm 0,27^*$	7,2 $\pm 0,55^*$	1,16 $\pm 0,12^*$	1,6 $\pm 0,16^*$	2,1 $\pm 0,16^*$	3,5 $\pm 0,16^*$	1,63 $\pm 0,17^*$	5,0 $\pm 0,34$	2,16 $\pm 0,2^*$	6,3 $\pm 0,42^*$
Пробуждение, 37 °С	4,9 $\pm 0,53$	7,0 $\pm 0,4^*$	3,2 $\pm 0,3^*$	2,4 $\pm 0,026^*$	2,8 $\pm 0,4$	6,0 $\pm 0,24^*$	3,7 $\pm 0,21^*$	8,6 $\pm 0,3^*$	3,6 $\pm 0,54$	7,0 $\pm 0,11^*$

Примечание. 1 — ацетоацетат, 2 — β -оксипутират.

зование и препятствует снижению температуры тела. Содержание общего холестерина в крови суслика при умеренной гипотермии возрастает на 34 % без изменения соотношения свободной и эстерифицированной формы. Количество кетоновых тел в тканях охлажденных до 30 °С сусликов снижается в 1,5—2 раза, причем уменьшение уровня ацетоацетата в тканях, кроме печени, выражено в большей мере, чем понижение количества β -оксибутирата. Низкий уровень кетоновых тел в тканях сусликов при умеренной гипотермии, видимо, связан с быстрой утилизацией в цикле Кребса ацетил-КоА, необходимого для кетогенеза.

При углублении гипотермии до 20 °С интенсивность окислительных процессов в тканях значительно понижается [6]. Концентрация жирных кислот в крови сусликов при этом возвращается к уровню контроля. Понижается по сравнению с предыдущим этапом гипотермии также содержание всех форм холестерина, фосфолипидов в крови, а количество кетоновых тел в тканях растет.

При самостоятельном согревании сусликов после глубокой гипотермии наблюдается значительное усиление термогенеза и динамика изученных липидных компонентов сходна с таковой при умеренной гипотермии.

Наши результаты показывают, что наибольшим изменениям при гипотермии и самосогревании подвергается содержание жирных кислот и кетоновых тел, играющих энергетическую роль. Изменения содержания липидов, выполняющих преимущественно пластические функции (холестерин, фосфолипиды), менее выражены. Это связано с тем, что умеренная гипотермия и самосогревание предъявляют особые требования к энергетическому обеспечению усиленного термогенеза. Потребности же в пластических материалах, в том числе для репарации мембран, менее значительны.

Осенью, перед зимней спячкой, содержание исследованных липидов у бодрствующих сусликов достоверно изменяется (табл. 1, 2). Содержание общего холестерина понижается по сравнению с летом на 15,7 %, свободного — на 43,7 %. Преобладающим становится эстерифицированный холестерин. Существенное понижение количества холестерина отмечено также в плазме крови перед зимовкой ящериц [7]. Снижение выработки холестерина перед спячкой, видимо, можно рассматривать как защитное приспособление, препятствующее «затвердеванию» мембранных липидов при низких температурах тела, характерных для спячки. Повышение доли эфиров холестерина в крови сусликов перед спячкой, по-видимому, связано со снижением использования жирных кислот в энергетических целях в результате снижения двигательной активности животных и интенсивности окислительных процессов в тканях [6]. При подготовке к спячке наблюдается также снижение, по сравнению с летом, концентрации фосфолипидов в крови (на 32 %) и особенно кетоновых тел в тканях. Наименее выражено снижение содержания кетоновых тел в печени (в 1,33 раза), наиболее — в крови и миокарде (соответственно в 3 и 2,6 раза). Соотношение между ацетоацетатом и β -оксибутиратом сдвигается в сторону увеличения доли восстановленной формы, видимо, вследствие снижения окислительных процессов в тканях.

Зимняя спячка млекопитающих, как известно, сопровождается периодическими пробуждениями через каждые 7—14 дней. При кратковременной (1 и 7 дней) непрерывной спячке статистически достоверных изменений содержания общего холестерина, а также существенных изменений его форм не происходит. Однако даже однодневная спячка в 2,2 раза снижает содержание фосфолипидов в крови, что, очевидно, связано с замедлением процесса их биосинтеза. Низкий уровень фосфолипидов сохраняется в крови сусликов и при более длительной спячке. Длительная, 1- и 3-месячная гибернация приводит к некоторому росту (на 36,4 %) уровня холестерина в крови по сравнению с осенним контролем. Доля эфиров холестерина при этом снижается с 67 до 42 %. Видимо, это связано с уменьшением активности лецитинхолестеринацилтрансферазы, ответственной за эстерификацию плазменного холестерина, а также, возможно, с понижением уровня жирных

кислот в крови. Что касается количества кетоновых тел, то их суммарное содержание при 3-месячной спячке сусликов в большинстве исследованных тканей не подвергается существенным изменениям, за исключением крови, в которой уровень кетоновых тел возрастает в 2,2 раза. Повышение доли окисленной формы (ацетоацетата), видимо, свидетельствует об отсутствии при гибернации, в отличие от искусственной гипотермии, гипоксических явлений.

Одной из особенностей зимоспящих млекопитающих является их способность к быстрому самосогреванию и восстановлению функций при выходе из спячки. Важная роль в этом принадлежит липидам. Уже на начальных этапах пробуждения животных после 3-месячной зимней спячки, когда температура тела поднимается от 10 до $15 \div 17^\circ\text{C}$, содержание общего холестерина в крови повышается по сравнению с гибернацией на 49,4 %, эстерифицированного — на 147 %. Эти изменения нарастают при полной нормализации (37°C) температуры тела. Количество общего холестерина при этом в 2,3 раза превышает уровень контроля. Наблюдаемые изменения свидетельствуют об усилении в период выхода из спячки синтеза холестерина и его эфиров в печени с последующим их поступлением в кровь. Видимо, эти изменения связаны с интенсификацией пластических процессов, в которых участвует холестерин, в частности, с усилением его включения в клеточные мембраны. Содержание свободных жирных кислот в крови на начальном этапе пробуждения не меняется, а на заключительном увеличивается почти в 2 раза. Это позволяет заключить, что начальный этап пробуждения не связан с усилением липолиза в белой жировой ткани, а идет за счет термогенеза в БЖТ. Заключительный же этап самосогревания (от 20 до 37°C) ведет к значительной интенсификации утилизации как запасных липидов, так и углеводов [6]. При пробуждении сусликов существенно увеличивается содержание кетоновых тел в тканях, особенно в крови и миокарде. Это увеличение идет, за исключением скелетных мышц, главным образом за счет ацетоацетата. Кетоновые тела, отличающиеся хорошей растворимостью в воде, легко проникают из крови в ткани. Они являются не только калорийными энергетическими субстратами, но активно участвуют [4] в пластических процессах, в частности в биосинтезе липидов.

Таким образом, результаты исследования показали наличие как черт сходства, так и различия в характере изменения содержания липидов при искусственной и естественной гипотермии сусликов. Сходство заключается в одинаковой направленности изменения холестерина и фосфолипидов при непрерывной зимней спячке и глубокой гипотермии, различия — в динамике липидов, выполняющих преимущественно энергетические функции (свободные жирные кислоты, кетоновые тела), а также в изменении отношения ацетоацетат/ β -оксибутират.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баев В. И., Булах Е. И. Определение кетоновых тел в крови и тканях // Лаб. дело. 1974. — № 9. — С. 545—546.
2. Колб В. Г., Камышников В. С. Клиническая биохимия. — Минск: Беларусь, 1976. — 311 с.
3. Крепс Е. М. Липиды клеточных мембран. — Л.: Наука, 1981. — 339 с.
4. Ньюсхолм Э., Спарт К. Регуляция метаболизма. — М.: Мир, 1977. — 407 с.
5. Хаскин В. В. Энергетика теплообразования и адаптация к холоду. — Новосибирск: Наука, 1975. — 199 с.
6. Эмирбеков Э. З., Львова С. П. Механизмы биохимических изменений при низких температурах тела. — Ростов-на-Дону: Изд-во РГУ, 1985. — 79 с.
7. Afroz H., Ishag M., Ali S. Seasonal changes in plasma lipid distribution of a hibernating lizard (*Uromastix hardwiski*) // Pakistan J. Sci. and Ind. Res. — 1979. — 22, N 3. — P. 138—142.
8. Duncimbe W. G. The colorimetric micro-determination of non-esterified fatty acids in plasma // Clin. chimica acta. — 1964. — 9, N 2. — P. 122—125.

Дагестанский гос. ун-т
им. В. И. Ленина,
г. Махачкала

Поступила 21.11.88

THE CONTENT OF GROUND SQUIRREL BLOOD LIPID COMPONENTS AND TISSUE KETONE BODIES UNDER ARTIFICIAL HYPOTHERMIA AND HIBERNATION

V. I. Lenin State University of Dagestan, Makhachkala

The contents of blood cholesterol, phospholipids, free fatty acids and ketone bodies in ground squirrel liver, blood, myocardium, skeletal muscles, brain were studied under artificial hypothermia (30, 20 °C) and hibernation (1, 7, 30 days, 3 months). The content of blood phospholipids decreased during hypothermia. The fraction of cholesterol esters and the acetoacetate / β -oxibutirate ratio increased during hibernation. The content of ketone bodies increased reliably in arousal.

УДК 612.822.1:612.57

Р. А. Абдуллаев, Э. З. Эмирбеков

АКТИВНОСТЬ АРГИНАЗЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА И ПЕЧЕНИ СУСЛИКОВ ПРИ ЗИМНЕЙ СПЯЧКЕ

Показано, что содержание мочевины в больших полушариях мозга и печени сусликов, сниженное в условиях зимней спячки, увеличивается до контрольного уровня перед выходом из нее и при периодических пробуждениях. У спящих животных активность аргиназы, измеренная при температурах инкубации 8 и 37 °C, в стволовой части мозга повышается, а в печени снижается. При спонтанных пробуждениях, перед выходом и через 10 сут после выхода из зимней спячки активность аргиназы печени, в отличие от ткани мозга, по сравнению с таковой у спящих сусликов, повышается. На этапах зимней спячки и пробуждения энергия активации (E_a) аргиназной реакции в печени сусликов снижается, а в исследуемых отделах мозга существенно не изменяется.

Зимняя спячка является уникальной формой адаптации к низкой температуре. С физиологической и биохимической точек зрения спячка представляет собой динамический процесс, для которого характерны периодическое спонтанное пробуждение и засыпание — бауты [10]. В поддержании зимней спячки на первое место выходят регуляторно-адаптивные процессы. Аргиназа (КФ 3.5.3.1), которая регулирует содержание эндогенных метаболитических протекторов — аргинина и мочевины в мозге и при низких температурах, выполняет адаптагенную функцию [3, 7]. В то же время активность аргиназы мозга и других тканей у гетеротермных животных при прерывистости зимней спячки практически не изучена, а встречающиеся единичные работы по содержанию мочевины неоднозначны [8, 9], что, по-видимому, связано с периодическими пробуждениями спящих животных во время гибернации.

В связи с вышеизложенным в задачу нашего исследования входило изучение активности аргиназы и содержания мочевины в отделах мозга и в печени сусликов на различных этапах спячки и спонтанного пробуждения.

Опыты проводили на малых сусликах *Citellus pygmaeus Pallas* весом 200—250 г, отловленных на низменной части Дагестана летом 1987 г. С момента отлова до октября животных содержали в условиях вивария. Осенью им создавали условия, сходные с естественными, помещая в индивидуальные клетки, установленные в темной комнате с температурой $6 \div 8$ °C. Всего в экспериментах использовали 85 сусликов. Зимняя спячка сусликов сопровождалась периодическими пробуждениями: через 5—6 дней в начальные сроки спячки (октябрь, ноябрь), через 13—16 дней в середине спячки (январь, февраль) и через 3—4 дня перед естественным пробуждением (март, апрель). Длительность периодов состояния спячки или баутов контролировали методом «опиловой пробы». Сусликов исследовали в осенние и зимние месяцы в середине баута (температура тела $6 \div 8$ °C) и при спонтанном пробуждении (температура тела $32 \div 34$ °C), весной перед естественным про-

буждением при температуре тела 15 °С, а также на 10-е сутки после пробуждения (температура тела 37 °С). В качестве контроля использовались летние бодрствующие суслики, подготовленные к зимней спячке и адаптированные к условиям вивария.

Активность аргиназы определяли по методике, описанной В.С. Щугалей, Л. С. Козиной [7]. Проба, в которой определяли активность аргиназы, содержала 50 мг ткани мозга или 0,2 мг ткани печени, 5 мкМ $MnCl_2$, 20 мкМ L-аргинина в 1,5 мл 0,65 М глицинового буфера. Контрольные образцы предварительно инактивировали 12 %-ным раствором ТХУ и параллельно с опытными инкубировали при температурах 8, 15, 37 °С в течении 45 мин (мозг) или 15 мин (печень). Об активности фермента в тканях судили по количеству образовавшейся мочевины. Мочевину определяли калориметрически по цветной реакции с диацетилмонооксидом [2]. Активность аргиназы выражали в микромолях мочевины на 1 г ткани. Величину энергии активации фермента (E_a) вычисляли по уравнению Аррениуса после соответствующих преобразований.

Таблица 1

Содержание мочевины в отделах головного мозга и печени сусликов на этапах зимней спячки и спонтанного пробуждения (мкМ/г ткани; $n = 9-10$)

Состояние животного	Температура тела, °С	Большие полушария мозга	Ствол мозга	Печень
Бодрствование	37	$4,88 \pm 0,20$	$3,86 \pm 0,17$	$5,06 \pm 0,18$
Начало зимней спячки:				
спячка	8	$4,23 \pm 0,21^*$	$3,66 \pm 0,16$	$3,96 \pm 0,17^*$
пробуждение	34	$5,30 \pm 0,22^{**}$	$4,80 \pm 0,21^{**}$	$5,43 \pm 0,24^{**}$
Середина зимней спячки:				
спячка	6	$4,18 \pm 0,17^*$	$3,66 \pm 0,17$	$3,80 \pm 0,20^*$
пробуждение	32	$5,17 \pm 0,18^{**}$	$4,80 \pm 0,22$	$5,32 \pm 0,27^{**}$
Перед выходом из спячки	15	$6,30 \pm 0,23^{**}$	$5,91 \pm 0,24^{**}$	$6,70 \pm 0,31^{**}$
Через 10 суток после выхода из спячки	37	$4,86 \pm 0,19$	$4,43 \pm 0,19$	$4,92 \pm 0,31$

Примечание: Здесь и в табл. 2 одной звездочкой обозначены достоверные различия ($P < 0,05$) по отношению к бодрствующим животным, двумя — по отношению к спящим животным.

По нашим данным (табл. 1), у спящих сусликов как на начальном этапе, так и в середине зимней спячки содержание мочевины в больших полушариях головного мозга и печени снижается соответственно на 14 и 22 %. При спонтанном пробуждении этих животных, когда температура их тела повышается от $6 \div 8$ до $32 \div 34$ °С, количество мочевины в исследуемых тканях, по сравнению со спящими животными, увеличивается в среднем на 30—35% и несколько превышает уровень, характерный для бодрствующих животных. По сравнению со спящими животными, высокое содержание мочевины найдено в исследуемых органах у сусликов перед выходом из состояния зимней спячки и через 10 сут после пробуждения.

Как видно из табл. 2, у животных, находящихся в состоянии зимней спячки, в исследуемых органах истинная активность аргиназы, измеренная при температуре инкубации, соответствующей температуре их тела (8 °С), существенно снижается. В то же время у этой группы животных активность фермента, измеренная при температуре инкубации 37 °С, по сравнению с таковой у бодрствующих сусликов, в больших полушариях мозга не изменяется, в стволе мозга повышается на 35 %, а в печени снижается на 25 %.

Повышенная активность аргиназы в стволовой части мозга, найденная у спящих зверьков при температурах инкубации 37 и 8 °С, при спонтанных пробуждениях снижается до уровня, характерного для бодрствующих сусликов и остается без изменения как у животных перед выходом, так и через

Таблица 2

Активность аргиназы в отделах головного мозга (мкМ мочевины/г ткани за 45 мин) и печени (мкМ/мочевины/г ткани, мин) сусликов на этапах зимней спячки и спонтанного пробуждения ($n=9-10$)

Состояние животного	Температура, °C		Большие полушария мозга	Ствол мозга	Печень
	тела	инкубации ткани			
Бодрствование	37	37 15 8	$13,48 \pm 0,62$ $2,9 \pm 0,21$ $2,12 \pm 0,10$	$8,90 \pm 0,43$ $2,48 \pm 0,17$ $2,00 \pm 0,10$	$416,6 \pm 30,6$ $130,3 \pm 16,3$ $81,9 \pm 9,7$
Начало зимней спячки:	8	37	$14,40 \pm 0,80$	$12,01 \pm 0,37^*$	$314,1 \pm 18,7^*$
спячка		8	$2,20 \pm 0,05$	$2,40 \pm 0,11^*$	$81,2 \pm 8,6$
пробуждение	34	37 8	$12,50 \pm 0,60$ $2,90 \pm 0,05$	$9,08 \pm 0,34^{**}$ $2,00 \pm 0,09^{**}$	$417,1 \pm 19,7^{**}$ $106,1 \pm 7,5$
Середина зимней спячки:	6	37	$13,41 \pm 0,41$	$12,30 \pm 0,33^*$	$311,4 \pm 16,5^*$
спячка		8	$2,21 \pm 0,10$	$2,23 \pm 0,33^*$	$87,2 \pm 7,7$
пробуждение	32	37 8	$14,81 \pm 3,96$ $2,40 \pm 0,23$	$10,60 \pm 0,37^{**}$ $2,00 \pm 0,09$	$408,6 \pm 21,5^{**}$ $107,2 \pm 9,3$
Перед выходом из спячки	15	37 15	$13,80 \pm 0,71$ $3,73 \pm 0,27$	$10,60 \pm 0,41^{**}$ $3,06 \pm 0,17^*$	$463,5 \pm 23,9^{**}$ $149,3 \pm 11,7$
Через 10 сут после выхода из спячки	37	37 15 8	$13,78 \pm 0,69$ $2,96 \pm 0,22$ $2,14 \pm 0,11$	$9,21 \pm 0,27$ $2,71 \pm 0,14$ $2,07 \pm 0,09$	$430,6 \pm 29,6$ $141,3 \pm 9,8$ $101,9 \pm 11,0$

10 сут после выхода из зимней спячки. В отличие от ткани мозга, активность аргиназы печени при этом, по сравнению с таковой у спящих сусликов, повышается в среднем на 40 %. Аналогичное повышение интенсивности аргиназной реакции характерно и для печени животных, исследованных перед выходом из зимней спячки с температурой тела 15 °C.

Известно, что аргиназа печени, в отличие от аргиназы мозга, активируется гормонами гипофизарноадренокортикальной системы кортизоном и АКТГ [6], содержание которых в крови спящих сусликов резко падает с последующим повышением при периодических пробуждениях в короткие периоды гомеотермии. В связи с этим повышение активности аргиназы в печени сусликов на этапах спонтанного пробуждения, по сравнению с активностью фермента у спящих животных, может быть обусловлено индукцией фермента тиреоидными и кортикостероидными гормонами.

Таким образом, если снижение содержания мочевины в исследуемых органах у животных во время зимней спячки можно объяснить угнетением азотистого метаболизма [4], то повышение ее количества как в мозге, так и в печени при периодических пробуждениях и перед выходом из спячки связано не только с усилением азотистого обмена [1], но и с активацией синтеза мочевины печеночной аргиназой в цикле Кребса—Хензеляйта. Вместе с тем необходимо отметить, что у спящих животных содержание мочевины в исследуемых отделах мозга поддерживается на более высоком уровне, чем в ткани печени. При этом отсутствие прямой корреляции между содержанием мочевины в отделах мозга и печени, по-видимому, свидетельствует об автономности синтеза мочевины в мозге и о важности поддержания ее высокой концентрации как адаптогена [3].

Установлено, что во время зимней спячки у грызунов 90 % расходуемой энергии связано с периодическими пробуждениями и согреванием организма [5]. Физиологическая роль этих пробуждений, вероятно, заключается в том, что в эти промежутки времени происходит очистка организма от вредных продуктов обмена. Почти одинаковая активность аргиназы и одинаково повышенный уровень мочевины в печени сусликов во время спонтанных пробуждений в начале и в середине зимней спячки, найденные в наших опытах (табл. 1, 2), подтверждают биологический смысл спонтанных пробуждений.

закрывающийся в активном синтезе мочевины и снижении уровня преформированного аммиака. Об этом же свидетельствует тот факт, что во время зимней спячки, независимо от ее длительности и на этапах пробуждения, в отличие от ткани мозга, энергия активации (E_a), отражающая эффективность аргиназной реакции в печени сусликов, снижается в среднем на 21 %. Кроме того, увеличение количества мочевины в мозге и печени сусликов при пробуждении, когда у них резко повышаются температура тела, уровень обмена веществ и функциональная активность организма, по-видимому, способствует регуляции скоростей реакций, генерирующих свободные радикалы, стабилизирует мембраны лизосом, поддерживает процессы катаболизма белков на определенном стационарном уровне [3].

Таким образом, наши данные свидетельствуют об активации синтеза мочевины в печени зимоспящих животных при периодическом выходе из состояния гибернации, что обеспечивает, с одной стороны, нейтрализацию токсического продукта азотистого обмена — аммиака, а с другой — сохранение нативной конформации клеточных белков, липидов и их комплексов. При этом относительно высокое содержание мочевины в исследуемых отделах мозга животных на всех этапах зимней спячки подтверждает протективное значение системы аргинин — аргиназа — мочевина в функционировании нервных клеток в условиях низких температур.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жегунов Г. Ф. Активация синтеза белка в тканях сусликов на начальном этапе пробуждения от зимней спячки // Криобиология. — 1988. — № 1. — С. 45—46.
2. Колб В. Г., Камышникова В. С. Определение мочевины в сыворотке крови и в моче по цветной реакции с диацетилмонооксимом // Клиническая биохимия. — Минск: Беларусь, 1976. — 311 с.
3. Кричевская А. А., Лукаш А. А., Шугалей В. С., Бондаренко Т. И. Аминокислоты, их производные и регуляция метаболизма // Ростов-на-Дону: Изд-во Ростовского ун-та, 1983. — 110 с.
4. Палладин А. В., Белик Я. В., Полякова Н. М. Белки головного мозга и их обмен. — Киев: Наук. думка, 1972. — 312 с.
5. Хочачка П., Сомеро Дж. Биохимическая адаптация. — М.: Мир, 1988. — 567 с.
6. Шварева Н. В., Невретдинова З. Г. Содержание гормонов гипофизарно-адренокортикальной системы в крови сусликов в различные сезоны года // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. — 1988. — № 2. — С. 188—195.
7. Шугалей В. С., Козина Л. С. Содержание мочевины и активность аргиназы в органах крыс при акклиматизации к холоду // Физиол. журн. СССР. — 1977. — № 8. — С. 1199—1202.
8. Шугалей В. С., Шортанова Т. Х., Самойлик Н. И., Головина Т. Н. Некоторые показатели азотистого обмена и интенсивность спонтанного перекисного окисления в тканях зимоспящих сусликов // Криобиология. — 1988. — № 1. — С. 43—45.
9. Эмирбеков Э. З., Львова С. П. Нейрохимические изменения при зимней спячке // Нейрохимия. — 1984. — № 3. — С. 306—317.
10. Wang L. C. H. Hibernation and the endocrines // Hibernation and Torpor in Mammals and Birds. — London: Acad. Press, 1982. — P. 206—236.

Дагестанский гос. ун-т
им. В. И. Ленина,
г. Махачкала

Поступила 02.11.89

R. A. ABDULLAYEV, E. Z. EMIRBEKOV

THE ACTIVITY OF BRAIN AND LIVER ARGINASE IN HIBERNATING GROUND SGUIRRELS

V. I. Lenin State University of Dagestan, Makhachkala

It has been shown that the low urea content in liver and cerebral hemispheres of hibernating ground squirrels increased to the control values just before arousals including temporal ones. The arginase activity measured at the incubation temperatures 8 and 37°C increased in truncus cerebri and decreased in livers of hibernating animals. The arginase activity in liver of hibernating animals, in contrast to brain tissue, increased during spontaneous arousals, before arousal and 10 days after arousal. At the hibernation stages and during arousals, the activation energy of the arginase reaction decreased in ground squirrel liver and remained unchanged in studied brain tissues.

В. Н. Бринкевич, О. Д. Мяделец

КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ПРОЛОНГИРОВАННОЙ ГИПОТЕРМИИ

Гипотермия приводила к увеличению числа нейтрофилов на глубине охлаждения, а также через 6—12 ч и 14 сут после него. В это же время уменьшалось число лимфоцитов. Изменения со стороны других клеток крови были недостоверными. Гипобиоз вызывал схожие, но более выраженные изменения со стороны нейтрофилов и лимфоцитов а также приводил к длительному снижению числа эозинофилов.

Моделирование гипотермических состояний в эксперименте может иметь огромное значение для медицинской практики [9]. Поэтому необходимо тщательное и всестороннее изучение всех изменений, которые происходят в организме при этих формах ходового воздействия. В особенности это относится к системам гомеостаза, в том числе и системе крови. При этом большой интерес представляют изменения морфологического состава крови, в первую очередь популяции лейкоцитов, осуществляющих защитные реакции организма. Изучению этого вопроса посвящен ряд исследований [4, 5, 6, 11 и др.]. Однако в этих исследованиях содержатся иногда противоречивые сведения. Так, например, Е. В. Майстрах [5] отмечает, что при гипотермии в крови животных происходит значительное увеличение числа лейкоцитов. Другие авторы [4, 6, 11] наблюдали отчетливую и выраженную лейкопению. Следует также отметить, что в большинстве исследований по действию гипотермии на морфологический состав крови наблюдения проводились в момент охлаждения [6] и в ближайшие сутки после него [11]. Результаты более отдаленных наблюдений отсутствуют. Отсутствуют также сведения о зависимости степени изменений лейкоцитов периферической крови от продолжительности гипотермического состояния организма.

Целью настоящего исследования явилось изучение изменений количества лейкоцитов и лейкоцитарной формулы периферической крови белых крыс при пролонгированной гипотермии разной продолжительности и в постгипотермическом периоде.

Эксперименты выполнены на 176 белых крысах обоего пола массой 210—320 г. При моделировании гипотермии за 40 мин до начала охлаждения внутрибрюшинно вводили орнид в дозе 25 мг/кг массы, а за 10 мин — нембутал в дозе 40 мг/кг. При 24- и 48-часовой гипотермии доза орнида была уменьшена до 10 мг/кг массы. Охлаждение до ректальной температуры 20 °С проводили в морозильной камере либо в ванне со смесью «вода — лед» на полиэтиленовой пленке за период времени около 90 мин со скоростью 1 °С за 4—6 мин. После достижения этой температуры (температура пролонгации) животных помещали в специальную термокамеру и выдерживали при этой же ректальной температуре 6, 24 и 48 ч. Восстановление температуры тела осуществлялось либо самостоятельно при температуре воздуха 25 °С (наступало через 5—6 ч после помещения крыс в клетку), либо путем согревания животных лампой-рефлектором (24-часовая пролонгация). Методика охлаждения подробно описана ранее [1, 2]. В серии опытов с 6-часовой пролонгацией декапитацию животных производили в момент достижения температуры пролонгации, сразу после завершения эксперимента, а также через 6, 12, 24 ч, 3, 7, 14 и 28 сут после него. В серии экспериментов с 24-часовой пролонгацией крыс забивали сразу после опыта, а также через 1, 3 и 7 сут после него. При 48-часовой гипотермии исследования производили только в момент завершения эксперимента (после согревания животных). Исследовали также животных, погибавших несколько раньше завершения 48-часовой гипотермии (в интервале 40—48 ч). Контролем служили интактные крысы и крысы, которым вводили фармпрепараты по той же схеме, что и экспериментальным. Время взятия материала от контрольных и опытных животных совпадало. Кровь забирали из надреза хвоста и общеизвестными

методами подсчитывали количество лейкоцитов и лейкоцитарную формулу. Полученные цифровые данные обрабатывали статистически с использованием критерия *U* Вилкоксона—Манна—Уитни.

Установлено, что введение фармпрепаратов, не влияя на общее число лейкоцитов, приводило к кратковременному, но достоверному и выраженному снижению процентного числа лимфоцитов и возрастанию процентного числа нейтрофилов. Нормализация происходила через 7 ч после введения, в последующие сроки достоверных изменений не было. При гипотермическом воздействии продолжительностью 6 ч часть животных (14 %) погибала от отека легких. У выживших крыс сразу после достижения температуры пролонгации наблюдались нейтрофилез и лимфопения, но эти изменения были значительно менее выраженными, чем при введении одних фармпрепаратов. После согревания показатели нормализовались, а через 6 ч после эксперимента выявлялись повторные, резко выраженные нейтрофилез и лимфопения, которые сохранялись и спустя 12 ч, но в меньшей степени. (табл. 1). Через 1—7 сут после опыта показатели лейкоцитарной формулы практически не отличались от контроля, а через 14 сут происходило еще одно, но менее выраженное изменение лейкоцитарной формулы описанного характера. Следует особо подчеркнуть, что нейтрофилез никогда не сопровождался увеличением числа молодых форм нейтрофилов. Изменения со стороны моноцитов и эозинофилов были невыраженными за исключением монопении через 3 сут после опыта. Численность лейкоцитов достоверно не изменялась на протяжении всего наблюдения.

Т а б л и ц а 1

Изменения в лейкоцитарной формуле при пролонгированной гипотермии (6 ч) и в постгипотермическом периоде (приведен только достоверные изменения), %

Показатель		Период наблюдения			
		Гипотермия	Постгипотермия		
		20 °C (9 ч)	6 ч (15 ч)	12 ч (3 ч)	14 сут (15 ч)
Нейтрофильные лейкоциты	0	30,0	69,2	53,9	34,4
	K_1	15,3	23,4	18,5	21,0
	K_2	49,2	25,0	24,7	—
	P_1	<0,05	<0,01	<0,01	<0,05
	P_2	<0,05	<0,01	—	—
	P_3	<0,01	>0,05	—	—
Лимфоциты	0	64,9	29,3	42,1	63,6
	K_1	80,5	74,0	70,6	73,8
	K_2	45,3	70,3	—	—
	P_1	<0,05	<0,01	<0,01	<0,05
	P_2	<0,05	<0,01	—	—
	P_3	<0,01	>0,05	—	—

П р и м е ч а н и я. 0 — опытные крысы; K_1 — интактные крысы; K_2 — контроль с фармпрепаратами; P_1 — достоверность изменений 0 по отношению к K_1 , P_2 — 0 по отношению к K_2 , P_3 — K_1 по отношению к K_2 . В скобках приведено время взятия крови.

При 24-часовом гипотермическом воздействии выявлены несколько иные данные (табл. 2). Доля погибших в ходе эксперимента животных возрастала (19 %). Установлено, что лимфопения и нейтрофилез наблюдались на протяжении всего наблюдения, причем наиболее выраженными они были к концу пролонгации. Достоверное увеличение молодых форм нейтрофилов отмечалось лишь сразу после опыта. Отмечалось также прогрессивное падение доли эозинофилов вплоть до практически полного их исчезновения. Численность моноцитов была снижена через 3 сут после эксперимента.

Таблица 2

Изменения в лейкоцитарной формуле при пролонгированной гипотермии (24 ч) и в постгипотермическом периоде (приведены только наиболее выраженные изменения), %

Показатель	Контроль	Гипотермия 20 °С	Постгипотермический период		
			1 сут	3 сут	7 сут
Нейтрофильные лейкоциты	18,0	52,0 $P < 0,001$	27,4 $P < 0,05$	37,0 $P < 0,01$	43,4 $P < 0,001$
Лимфоциты	76,0	42,0 $P < 0,001$	69,0 $P < 0,05$	59,0 $P < 0,01$	52,6 $P < 0,001$
Эозинофильные лейкоциты	1,6	1,1 $P > 0,05$	0,28 $P < 0,05$	0,1 $P < 0,05$	0,01 $P < 0,001$

Гипотермия (48 ч), не влияя на общий характер направленности описанных изменений, еще более усиливала степень их проявления. У животных, погибших до завершения 48-часовой пролонгации, изменения были теми же, что и у животных, выживших к моменту завершения эксперимента. Показатель общего числа лейкоцитов был достоверно снижен только через 1 сут после 24-часовой гипотермии, в другие сроки, а также при 48-часовой гипотермии достоверно от контроля не отличался.

Из приведенных данных следует, что реакция лейкоцитов крови на гипотермическое воздействие несколько отличается от их классической реакции на стрессорное воздействие. При разнообразных стрессорных воздействиях нейтрофилез и лимфопения сохраняются не более 24 ч после их прекращения [3]. В наших исследованиях они наблюдались на протяжении нескольких суток, причем 6-часовая гипотермия приводила к волнообразному характеру изменений в лейкоцитарной формуле с периодами нормализации показателей между волнами повышения числа нейтрофилов и понижения числа лейкоцитов. Волнообразность изменений показателей морфофункционального состояния организма отмечается при действии самых разнообразных экстремальных факторов [10], и, очевидно, ее следует рассматривать как проявление адаптивных перестроек. На этом основании 6-часовую гипотермию следует рассматривать как приемлемую модель гипотермического воздействия. В то же время при 24-часовой гипотермии отсутствовали периоды нормализации показателей лейкоцитарной формулы. Это может свидетельствовать о значительно более выраженных нарушениях в системе крови, что может иметь отрицательные последствия для организма. В наших исследованиях в этой серии экспериментов наблюдалось увеличение смертности животных.

Второе отличие заключается в том, что мы не наблюдали лейкоцитоза, который встречается обычно при типичной стресс-реакции [3]. Более того, в большинстве работ по исследованию реакции лейкоцитов периферической крови на охлаждение организма исследователями описывается лейкопения [4, 6, 11 и др.], и лишь в одной работе [5] отмечен лейкоцитоз. В наших исследованиях лейкопения отмечалась лишь при 24-часовой пролонгации спустя 1 сут после эксперимента. Это также может свидетельствовать о достаточной корректности 6-часовой гипотермии.

Вместе с тем выраженные лимфопения и нейтрофилез свидетельствуют о том, что гипотермия является достаточно сильным стресс-фактором. В связи с этим интерес представляют изменения показателей белой крови при действии фармпрепаратов. Лимфопения и нейтрофилез при этом были значительно более выраженными, чем при гипотермическом воздействии на фоне фармпрепаратов. Из данных литературы известно [7, 11], что наркотические и нейроплегические вещества не всегда снижают проявление стресс-реакции, а часто сами являются стресс-факторами. Таким образом, создается впечатление, что гипотермическое воздействие снижает степень проявления стресс-реакции, вызванной введением фармпрепаратов. Подтверждением этому предположению являются данные, полученные нами при исследовании других органов (тимус, надпочечники): при гипотермическом воздействии с введением фармпрепаратов увеличение массы надпочечников и внутритимическая гибель лимфоцитов были менее выраженными, чем при воздействии одних фармпрепаратов [2]. Известно также, что гипотермия усиливает связь глюкокортикоидов с транскортином крови, тем самым частично выключая их влияние и уменьшая степень стрессорных повреждений тканей и органов [8]. Сказанное скорее относится к 6-часовому гипотермическому воздействию. Напротив, увеличение времени пролонгации до 24 ч и тем более до 48 ч приводит, наоборот, к проявлению стрессорного эффекта гипотемии и к резкому изменению показателей белой крови.

Таким образом, степень выраженности изменений морфологического состава клеток белой крови зависит от продолжительности гипотермического воздействия и может быть связана с тем, что при увеличении времени воздействия снижаются превентивные и проявляются стрессорные эффекты гипотермического воздействия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Борисов В. А., Мяделец О. Д., Бринкевич В. Н. Методика глубокой гипотермии на мелких лабораторных животных // Криобиология. — 1989. — № 4. — С. 49.
2. Бринкевич В. Н., Мяделец О. Д., Борисов В. А. Техника моделирования гипобиотических состояний и некоторые реакции организма в этих условиях. — Витебск, 1989. — 13 с. Рукопись деп. в ВИНТИ. № 6277—В 89 ДЕП.
3. Горизонтов П. Д., Белоусова О. И., Федотова М. И. Стресс и система крови. — М.: Медицина, 1983. — 239 с.
4. Клименко В. Н. Изменения периферической крови при гипотермии // Вопросы гипотермии в патологии: Тр. кафедры патофизиологии. — Киев: Госмедизд-во УССР, 1959. — С. 239—249.
5. Майстрах Е. В. Гипотермия и анабиоз. — Л.: Наука, 1964. — 327 с.
6. Мурский Л. И. Физиология гипотермии. — Ярославль: Б. и., 1959. — 237 с.
7. Петров И. Р. Роль центральной нервной системы, аденогипофиза и коры надпочечников при кислородной недостаточности. — Л.: Медицина, 1967. — 211 с.
8. Сааков Б. А., Еремин С. А., Мешера Э. П. Содержание II-ОКС, катехоламинов и серотонина в крови и тканях собак в динамике гипотермии // Теорет. проблемы действия низких температур на организм. — Владимир: Б. и., 1972. — С. 154—162.
9. Тимофеев Н. Н. Искусственный гипобиоз. — М.: Медицина, 1983. — 179 с.
10. Хайдарлиу С. Х. Функциональная биохимия адаптации. — Кишинев: Штиинца, 1984. — 270 с.
11. Щупак С. Н., Литвинчук Л. И. К вопросу об изменении морфологического состава крови при гипотермии // Вопросы гипотермии в патологии: Тр. кафедры патол. физиологии. — Киев: Госмедизд-во УССР, 1959. — С. 249—263.

Витебский мед. ин-т

Поступила 24.11.89

V. N. BRINKEVICH, O. D. MYADELETS

QUANTITATIVE CHANGES IN THE PERIPHERAL BLOOD DURING PROLONGED HYPOTHERMIA

Medical Institute of Vitebsk

Hypothermia resulted in an increase of the number of neutrophils at the depth of cooling and 6—12 hr and 14 days later with a simultaneous increase in number of lymphocytes. Changes in other blood cells were not reliable. Hypobiosis induced similar but more pronounced changes in neutrophils and lymphocytes and led to a long-term decrease in number of eosinophils.

ЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ α -ТОКОФЕРОЛА ПРИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ ПОЧКИ КРЫСЫ

В опытах на 40 белых беспородных крысах осуществляли криоконсервацию почки при -60°C после ее предварительной перфузии раствором НИИТиЮ-2 с 15 % ДМСО и 2 % альбумина. За 3—4 или 18—24 ч до опыта животным внутрибрюшинно вводили 200 мг/кг α -токоферил-ацетата в виде 30 %-ного масляного раствора. Подготовка α -токоферолом незначительно меняла динамику накопления ДМСО в почке при ее перфузии раствором криопротектора, но достоверно увеличивала объемную скорость перфузии. Введение препарата за 18—24 ч до опыта достоверно уменьшало нарушения водно-электролитного баланса (степень отека, тканевая концентрация K^+ и Na^+) и потерю клетками белка и ЛДГ как после перфузии органа раствором криопротектора, так и после замораживания и отогрева. Введение препарата за 3—4 ч до опыта существенно не уменьшало степень повреждения почки, но в значительной степени сохраняло репаративный потенциал клеток: после нормотермической инкубации срезов криоконсервированной почки в среде Cross-Taggart нарушения электролитного баланса резко уменьшались. Замораживание почек, защищенных введением α -токоферола без ограждающего раствора (на воздухе), сопровождалось минимальными сдвигами изученных параметров, тогда как при замораживании почек, погруженных в защитный раствор, они повреждались значительно сильнее.

Нарушение барьерных свойств клеточных мембран, ведущее к неспособности клетки поддерживать свой гомеостаз, лежит в основе потери жизне-способности органа после его криоконсервации. Фазовые превращения мембранных липидов, вызывая нарушение белок-липидных внутримембранных взаимодействий, приводят к перераспределению липидов и белков в мембране, появлению участков обнаженных липидов и трансмембранных дефектов [2], что создает предпосылки к активации мембранодеструктивных процессов (перекисное окисление мембранных липидов (ПОЛ), гидролиз фосфолипидов фосфолипазой A_2) после их отогрева. Доказательства активации этих процессов после замораживания и отогрева имеются в работах [10, 13]. Эти механизмы деструкции клетки являются фактором перехода криповреждения в необратимое состояние.

В этом плане возможные пути профилактики мембранного повреждения могут быть связаны: 1) со снижением температуры замерзания мембраносвязанной воды, стабилизирующей структуру мембраны; 2) с повышением жидкостных свойств липидов мембран для снижения температуры их фазового перехода; 3) с ингибированием процессов ПОЛ и фосфолипазного механизма повреждения мембран.

Использование традиционных криопротекторов, в частности ДМСО, в известной степени оказывает защитное действие по всем 3 этим направлениям [11], но недостаточно.

В литературе имеется много данных о том, что α -токоферол, введенный заблаговременно в организм животного, способствует увеличению антиоксидантного резерва клеток и тормозит процессы ПОЛ. При этом отмечают, что после введения этого препарата выявляется увеличение степени ненасыщенности мембранных липидов, что, видимо, связано с их защитой α -токоферолом от переокисления [5]. Таким образом, α -токоферол может увеличивать устойчивость клеточных мембран к криповреждению не только за счет ингибирования ПОЛ, но и путем увеличения жидкостных свойств мембранных липидов.

Первый опыт включения α -токоферола в схему подготовки почки к криоконсервации выявил положительное влияние этого препарата [6]. В связи с этим возникла необходимость более подробного исследования влияния α -токоферола на эффективность криоконсервации почек.

Опыты проведены на 40 белых беспородных крысах массой 240—300 г. Под гексеналовым наркозом выделяли брюшную аорту и нижнюю полую вену выше и ниже почек, проксимальный отдел аорты пережимали и канюлировали. После перевязки инфраренального отдела аорты почки промывали охлажденным раствором НИИТиО-2 (KH_2PO_4 — 1,02, K_2HPO_4 — 3,8, Na HCO_3 — 0,84, Na цитрат — 0,3, Na сукцинат — 0,5, маннит — 38,0 г/л), затем выделяли из жировой капсулы и удаляли блоком с аортой и нижней полую вену, предварительно перевязав, если было необходимо, 1—2 поясничные артерии, отходящие от задней поверхности аорты вблизи почек. Удаленный блок почек подключали к перфузионной установке и начинали перфузию оксигенированным раствором НИИТиО-2 с 2 %-ным альбумином при 18 или 10 °С. Через 10—15 мин начинали добавление в перфузат ДМСО с постоянной скоростью и в течение 35—40 мин доводили концентрацию криопротектора в перфузате до 15 %. После этого перфузию продолжали еще 30 мин.

После полного завершения процесса насыщения почки помещали в металлический контейнер, содержащий небольшое количество перфузата, так что орган был полностью погружен в раствор, и замораживали в камере программного замораживателя ЗПБ 01.00 со скоростью 1—3 °С/мин до —60 °С. В отдельной серии опытов почки замораживали в пустом контейнере без перфузата (на воздухе). После хранения 1—7 дней почки отогревали в водяной бане при 37 °С до полного отогрева органа (3—4 мин).

Отогретые почки вновь подключали к перфузионной системе и начинали перфузировать оксигенированным раствором Хенкса с добавлением 5 % ДМСО и 5 % маннитола при 18 или 10 °С. Через 10—15 мин перфузии начинали постепенную замену перфузата стандартным раствором Хенкса, плавно снижая осмолярность до 300—350 мосм/л в течение 45—50 мин. После этого перфузию продолжали стандартным раствором Хенкса еще 30 мин.

В процессе перфузии до и после замораживания измеряли объемную скорость потока перфузата путем сбора оттекающего от почки раствора за единицу времени и брали пробы перфузата на входе и на выходе для определения концентрации ДМСО и белка, а также активности ЛДГ. Концентрацию ДМСО определяли по осмолярности раствора, измеренной на осмометре «Эдванс Диги Мэтик Осмометр 3DII» (США), путем пересчета полученных значений по калибровочной кривой. Из разницы концентрации криопротектора в притекающем к почке и оттекающем растворах рассчитывали поглощение ДМСО органом и скорость этого процесса. Концентрацию белка в перфузате определяли методом Лоури, а активность ЛДГ — с помощью наборов реактивов фирмы «Берингер» (ФРГ).

Перед замораживанием и в конце опыта брали пробы ткани для определения отека органа (определяли путем высушивания до постоянного веса и расчета тканевого содержания воды) и тканевой концентрации K^+ и Na^+ (определяли методом пламенной фотометрии). Для характеристики степени обратимости электролитных нарушений, развившихся после криоконсервации почки, срезы коркового вещества инкубировали в течение 1 ч в оксигенированной среде Cross—Taggart при 25 °С [12], в них также определяли тканевую концентрацию K^+ и Na^+ . По данным [12, 14], восстановление соотношения K^+/Na^+ до значений, близких к норме, коррелирует с хорошим восстановлением функции почки после консервации. Поэтому этот тест служил также косвенным показателем функциональной сохранности почки. Вводили α -токоферол в виде масляного раствора α -токоферолацетата (30 %) внутрибрюшинно в дозе 200 мг/кг однократно за 3—4 или 18—24 ч до опыта.

Весь цифровой материал обрабатывали статистически по методу Стьюдента с использованием критерия t .

Исследование динамики накопления ДМСО в перфузируемой почке показало, что предварительное введение α -токоферола существенно не влияет на этот процесс. Лишь при перфузии почек при 10 °С отмечено, что в опы-

тах с α -токоферолом была более высокая скорость насыщения почки криопротектором с 10 по 20 мин (рис. 1). В этих экспериментах получена четкая двухфазная кривая насыщения почки ДМСО, отражающая неравномерность во времени проникновения криопротектора во внеклеточное и внутриклеточное пространство [7]. Суммарное содержание ДМСО в почке к концу периода насыщения в опытах с фармакологической подготовкой донора и без нее существенно не различались, составляя (425 ± 35) и (421 ± 39) мг/г для опытов с перфузией при 18°C и (329 ± 36) и (327 ± 43) мг/г для опытов с перфузией при 10°C соответственно.

Более высокая скорость насыщения в начальный период перфузии в опытах с введением α -токоферола могла быть связана с достоверно более высокой объемной скоростью перфузии в этот период (рис. 2). К концу насы-

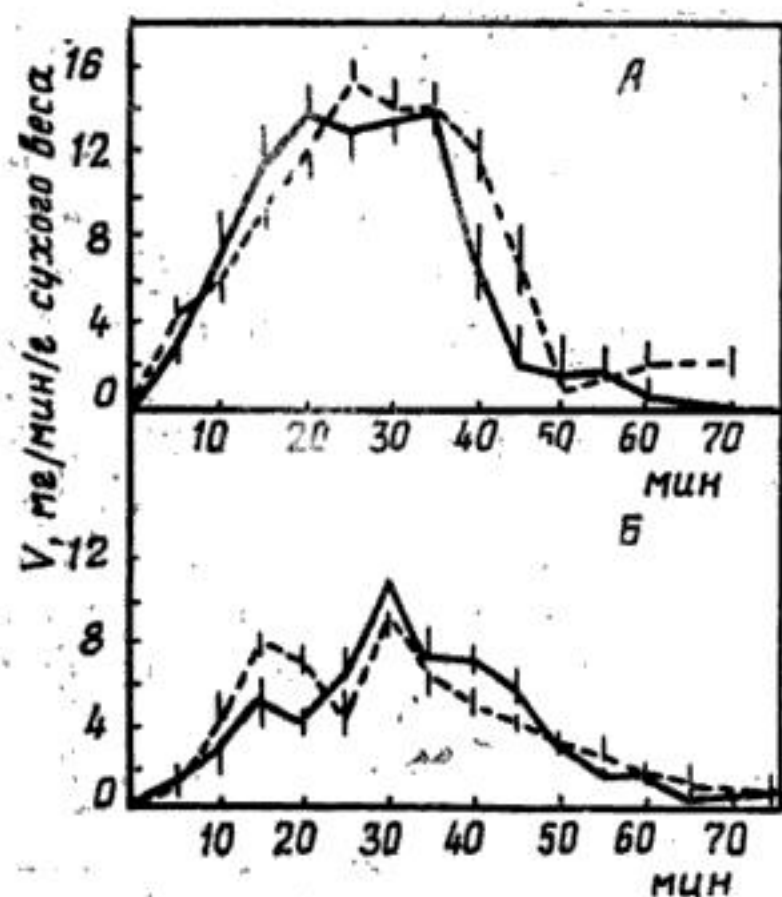


Рис. 1. Влияние α -токоферола на динамику скорости накопления ДМСО в почке в процессе ее перфузии 15 %-ным раствором криопротектора при 18°C (А) или при 10°C (Б): — — без введения α -токоферола (контроль); — — предварительное введение α -токоферола

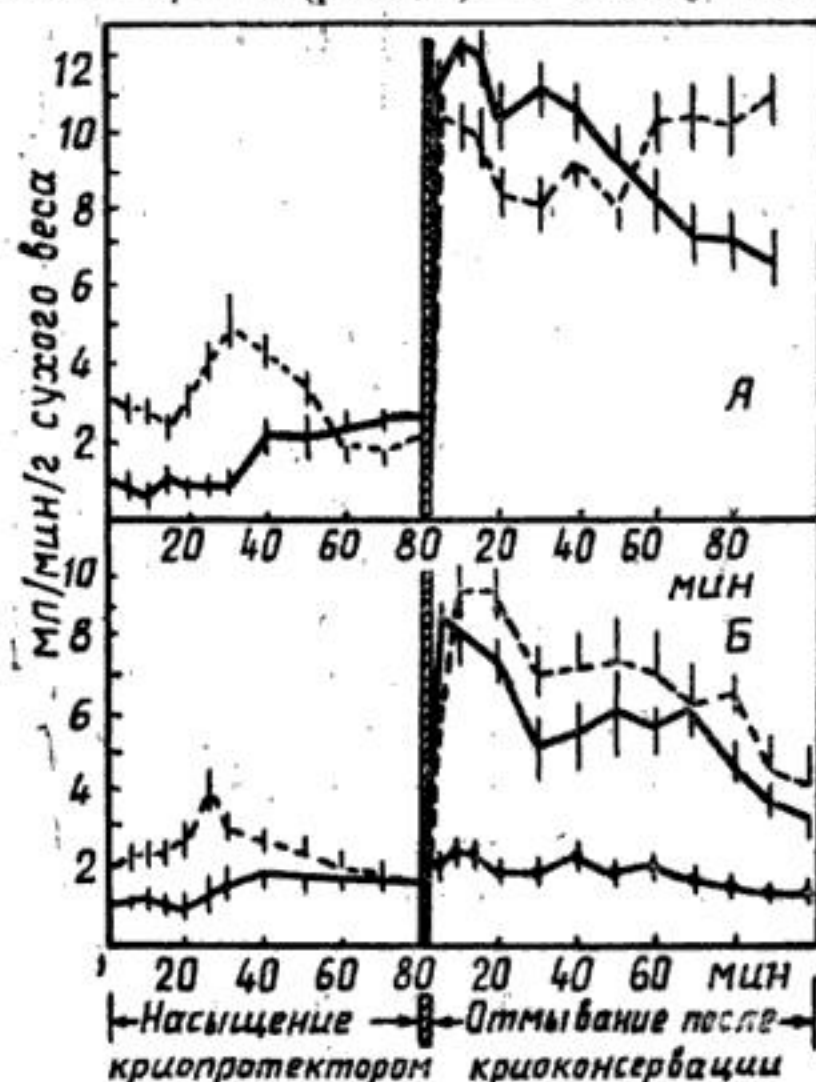


Рис. 2. Динамика объемной скорости перфузии почки при ее насыщении криопротектором и после криоконсервации: А — перфузия при 18°C ; Б — перфузия при 10°C ; — — без введения α -токоферола (контроль); — — предварительное введение α -токоферола; — предварительное введение α -токоферола + замораживание почки на воздухе

щения криопротектором величины объемной скорости перфузии в опытах с предварительным введением α -токоферола и без него достоверно не различались.

Введение α -токоферола оказывало существенное влияние на показатели метаболического состояния почек к концу периода насыщения, причем эффект зависел от сроков введения препарата (табл. 1). Если его вводили за 3—4 ч до опыта, то к концу перфузии криопротектором отмечали достоверно больший отек органа по сравнению с контролем; тканевая концентрация K^+ была снижена, а Na^+ — значительно повышена. Выход ЛДГ в перфузат несколько уменьшался, но недостоверно. При введении α -токоферола за 18—24 ч, напротив, отмечали достоверно более высокую концентрацию K^+ , более низкую концентрацию Na^+ , а также уменьшение выхода ЛДГ из клеток почки в перфузат. После перфузии при 10°C в этих опытах тканевое содержание электролитов достоверно не отличалось от нормальных значений.

После криоконсервации в контрольных опытах выявлено существенное повреждение почек, которое проявлялось в резком нарушении сосудистого тонуса и росте объемной скорости перфузии, массивном выходе из клеток почки в перфузат белка и ЛДГ, значительных электролитных нарушениях

Таблица 1

Метаболические показатели сохранности почек после их перфузии 15 % ДМСО

Серия опытов	Температура перфузии, °C	Отек, %	Тканевая концентрация K ⁺ , мэкв/кг сухого веса	Тканевая концентрация Na ⁺ , мэкв/кг сухого веса	K ⁺ /Na ⁺	Выход ЛДГ в перфузат, МЕ/мин/г сухого веса
Контроль (без введения α-токоферола)	18	7±5	227±9	187±15	1,2±0,1	0,16±0,03
	10	17±3	307±10	185±24	1,7±0,2	0,20±0,05
Введение α-токоферола за 3—4 ч до опыта	10	32±3*	231±11*	495±11***	0,5±0,2*	0,10±0,01
Введение α-токоферола за 18—24 ч до опыта	18	16±2	305±15**	160±5	1,9±0,2*	0,07±0,02*
	10	16±3	343±9*	135±19	2,5±0,2*	0,04±0,01*
Интактные почки	—	—	333±12	104±4	3,2±0,2	—

Примечание. Достоверность разницы результатов по отношению к контролю при соответствующей температуре: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$.

(рис. 2, табл. 2, 3). Если перфузию почки до и после замораживания проводили при 10 °C, выраженность повреждения была достоверно меньше. Предварительное введение α-токоферола, хотя не уменьшало изменений объемной скорости перфузии после отогрева криоконсервированной почки (рис. 2), но достоверно уменьшало потерю клетками белка через перфузат (табл. 2). Наименьшие значения этих показателей были отмечены в опытах с предварительным введением α-токоферола за 18—24 ч и перфузией при 10 °C. На выход ЛДГ из клеток введение α-токоферола существенно не влияло. При замораживании почек, защищенных α-токоферолом, без раствора изменений потока перфузии практически не происходило, а выход белка и ЛДГ в перфузат был минимальным.

Таблица 2

Влияние условий криоконсервации на выход белка и ЛДГ из почки в перфузат

Серия опытов	Температура перфузии, °C	Выход белка, мкг/мин/г сухого веса			Выход ЛДГ, МЕ/мин/г сухого веса		
		5 мин перфузии	30 мин перфузии	90 мин перфузии	5 мин перфузии	30 мин перфузии	90 мин перфузии
Контроль (без введения α-токоферола)	18	20,5±1,3	8,0±1,0	1,7±0,4	11,8±0,8	2,0±0,6	0,6±0,1
	10	11,6±1,7	2,6±0,3	2,3±0,2	19,8±3,9	2,8±0,4	1,3±0,1
Введение α-токоферола за 3—4 ч до опыта	10	13,1±1,6	2,6±0,2	0,9±0,1**	21,4±3,7	2,6±0,5	1,5±0,2
Введение α-токоферола за 18—24 ч до опыта	18	15,2±1,3*	2,4±0,4**	0,6±0,2*	9,7±1,3	1,6±0,4	0,6±0,1
	10	10,0±1,1	1,7±0,1*	0,9±0,1**	26,4±3,6	4,9±0,8	1,3±0,3
Замораживание без раствора с введением α-токоферола за 18—24 ч	10	2,4±0,3***	1,8±0,6	0,8±0,1***	3,4±1,6**	1,6±0,2*	1,3±0,4

Достоверность разницы результатов как в таблице 1.

Влияние α-токоферола на отек почки и тканевое содержание электролитов после криоконсервации оказалось неоднозначным (табл. 3). Введение препарата за 3—4 ч увеличивало развитие отека, но способствовало лучшему сохранению K⁺ в клетках. При введении его за 18—24 ч защитный эффект был более выражен, если перфузию проводили при 10 °C. При этом достоверно уменьшался отек и увеличивалось тканевое содержание K⁺. Концентрация Na⁺ в почке после криоконсервации во всех этих опытах была примерно одинаковой. При замораживании почек без раствора все показатели водно-электролитного баланса были более благоприятными, чем в других сериях опытов.

Таблица 3

Влияние условий криоконсервации почки на показатели водно-электролитного баланса

Серия опытов	Температура перфузии, °C	Отек, %	Тканевая концентрация электролитов, мэкв/кг сухого веса					
			После отмывания от криопротектора			После инкубации в среде Cross — Taggart		
			K+	Na+	K+/Na+	K+	Na+	K+/Na+
Контроль (без введения α -токоферола)	18 10	72,3 $\pm$ 2,0 57,2 $\pm$ 4,5	92 $\pm$ 7 117 $\pm$ 10	910 $\pm$ 23 828 $\pm$ 37	0,10 $\pm$ 0,01 0,14 $\pm$ 0,02	— 182 $\pm$ 16	— 796 $\pm$ 34	— 0,23 $\pm$ 0,02
Введение α -токоферола за 3—4 ч до опыта	10	85,7 $\pm$ 3,2*	143 $\pm$ 6*	829 $\pm$ 31	0,17 $\pm$ 0,03	472 $\pm$ 21***	265 $\pm$ 22***	1,78 $\pm$ 0,10***
Введение α -токоферола за 18—24 ч до опыта	18 10	75,0 $\pm$ 8,8 42,3 $\pm$ 1,1*	134 $\pm$ 7* 170 $\pm$ 15*	998 $\pm$ 46 986 $\pm$ 49	0,13 $\pm$ 0,01 0,17 $\pm$ 0,02	— 264 $\pm$ 22*	— 838 $\pm$ 45	— 0,32 $\pm$ 0,03*
Замораживание без раствора с введением α -токоферола за 18—24 ч	10	18,2 $\pm$ 4,0	140 $\pm$ 11*	587 $\pm$ 71	0,24 $\pm$ 0,03**	281 $\pm$ 17*	508 $\pm$ 36***	0,55 $\pm$ 0,05**

Достоверность разницы результатов как в таблице 1.

После инкубации срезов криоконсервированной почки в оксигенированной среде Cross—Taggart в контрольных опытах отмечали некоторое увеличение тканевого содержания K^+ и уменьшение содержания Na^+ , что свидетельствовало о некоторой сохранности процессов активного транспорта. Отношение K^+/Na^+ увеличивалось с 0,14 до 0,23. Предварительное введение α -токоферола приводило к более выраженным сдвигам: при введении препарата за 3—4 ч отношение K^+/Na^+ увеличивалось до 1,78, а при его введении за 18—24 ч — до 0,32. В опытах с замораживанием почек без раствора этот показатель возрастал до 0,55.

Таким образом, проведенные эксперименты еще раз подтвердили, что включение α -токоферола в схему подготовки почки к криоконсервации оказывает существенное защитное действие на сохранность клеточного метаболизма. Его положительное влияние выявлено как на подготовительном этапе (уменьшение токсического действия криопротектора), так и после замораживания — отогрева.

Обращает на себя внимание, что, хотя положительный эффект выявляется при введении α -токоферола за 3—4 и за 18—24 ч, механизм реализации защиты при разных сроках введения, видимо, различен. Так, при введении препарата за 3—4 ч метаболическое состояние органа после его насыщения криопротектором не улучшалось, а даже было больше нарушено, чем в контроле. После криоконсервации и отмывки от ДМСО показатели метаболических нарушений были сравнимы с таковыми в контрольных опытах. Однако после инкубации срезов криоконсервированной почки в среде Cross—Taggart отмечали почти полное восстановление показателей электролитного гомеостаза. То есть, при этом сроке введения α -токоферол не предупреждает развитие криоповреждения, а способствует быстрой репарации мембранных дефектов в раннем постконсервационном периоде.

При введении α -токоферола за 18—24 ч до опыта отмечено менее выраженное повреждение как после перфузии почки ДМСО, так и после ее замораживания — отогрева. После инкубации срезов криоконсервированной почки в среде Cross—Taggart отношение K^+/Na^+ восстановилось в большей степени, чем в контроле, но все же существенно меньше чем при введении препарата за 3—4 ч. Видимо, в этом случае проявляется прямой мембраностабилизирующий эффект препарата, связанный с его встраиванием в клеточные мембраны и с реализацией антиоксидантного действия.

Возможно, такое значительное различие в действии α -токоферола обусловлено различными процессами, индуцируемыми в клетке этим препаратом, в различные периоды времени после его введения в организм. Вводя масляный раствор антиоксиданта, мы одновременно вводим в организм значительное количество триглицеридов, имеющих в своем составе преимущественно ненасыщенные жирные кислоты. Всасывание в кровь этих липидов, а также свободных ненасыщенных жирных кислот должно способствовать включению ненасыщенных кислот в состав липидов клеточных мембран. Этот процесс реализуется быстро и по времени опережает встраивание в мембрану самого α -токоферола, максимум накопления которого в тканях наступает лишь через 18 ч после введения [1]. Поэтому в первые часы после инъекции α -токоферола в масле должно преобладать увеличение ненасыщенности мембранных липидов на фоне умеренного возрастания антиоксидантного резерва. Следствием этого является увеличение жидкостных свойств липидов мембран и их некоторая лабильность. Именно эти сдвиги могут объяснять некоторое возрастание степени повреждения почек, защищенных введением α -токоферола за 3—4 ч, после насыщения криопротектором. Но в то же время именно такие сдвиги способствуют быстрой репарации мембранных повреждений, развивающихся после зимней спячки гибернирующих животных [4], а также после замораживания — отогрева клеток и субклеточных органелл [9].

В более поздние сроки после введения α -токоферола отмечается преимущественно мембраностабилизирующий эффект от встраивания витамина

в мембрану, что сопровождается значительным увеличением антиоксидантного резерва клетки. Эти сдвиги в большей степени способствуют предупреждению развития криоповреждения, но не их репарации.

Проведенные эксперименты подтверждают также важную роль фактора механического повреждения клеток льдом при криоконсервации объемных органов. Замораживание почек, погруженных в консервирующий раствор, оказывало намного более выраженное повреждающее действие, чем замораживание органа без раствора (на воздухе). Причинами увеличения криоповреждения, по-видимому, являются возрастание гидростатического давления на клетки органа, полностью окруженного льдом [3], и увеличение напряжений деформации, которые могут вызвать микротравматизацию паренхимы [8]. С увеличением объема органа значение этого фактора должно еще больше возрастать.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аристархова С. А., Бурлакова Е. Б., Храпова Н. Г. Влияние введенного токоферола на его метаболизм в липидах и на уровень природных антиоксидантов // Липиды в организме животных и человека.— М., 1974.— С. 20—22.
2. Белоус А. М., Бондаренко В. А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении.— Киев: Наук. думка.— 1982.— 256 с.
3. Бронштейн В. Л., Исерович П. Г. Гипербарическая теория повреждения клеток при замораживании // Достижения и перспективы развития криобиологии и криомедицины: Тез. докл. междунар. конф.— Харьков, 1988.— С. 11—12.
4. Жегунов Г. Ф., Белоус А. М. Роль липидов и ионотранспортирующих систем биомембран в процессах адаптации животных к низким температурам // Криобиология и криомедицина.— 1983.— Вып. 13.— С. 3—12.
5. Журавлев А. И. Развитие идей Б. Н. Тарусова о роли цепных процессов в биологии // Биоантиоксиданты в регуляции метаболизма в норме и патологии.— М.: Наука, 1982.— С. 3—36.
6. Кирпатовский В. И. Повышение эффективности защитного действия криопротекторов на криоконсервированную почку с помощью предварительного введения фармакологических средств // Криобиология.— 1987.— № 3.— С. 25—31.
7. Кирпатовский В. И. Динамика насыщения срезов почки крысы диметилсульфоксидом при различных его концентрациях и температурных условиях // Криобиология.— 1988.— № 2.— С. 8—14.
8. Куракса В. М., Милешкин М. Б. Сравнительная оценка механических нарушений структуры твердой фазы при неравновесном замораживании и отогреве жидкостей // Криобиология и криомедицина.— 1983.— Вып. 13.— С. 32—36.
9. Петренко А. Ю. Изучение репарации мембран митохондрий после замораживания — отогрева // Криобиология.— 1987.— № 2.— С. 24—29.
10. Чогошвили А. С. Дегградация фосфолипидов внешних и внутренних мембран митохондрий при низкотемпературном воздействии // Сообщ. АН ГССР.— 1982.— 107, № 3.— С. 597—600.
11. Чуйко В. А. Механизм криозащитной эффективности и фармакологические свойства ДМСО // Криобиология.— 1989.— № 1.— С. 3—10.
12. Clark P., Fahy G. M., Karrow A. M. Factors influencing renal cryopreservation. 11. Toxic effects of three cryoprotectants in combination with three vehicle solutions in nonfrozen rabbit cortical slices // Cryobiology.— 1984.— 21, N 3.— P. 274—284.
13. Matthes G., Hackensellner H. A., Richter E. The role of lipid peroxidation as a factor of cryoinjury // Ibid.— 1983.— 20, N 6.— P. 726.
14. Southard J. H., Kuniyoshi M., Lutz M. F. et al. Comparison of the effects of 3- and 5-day hypothermic perfusion of dog kidneys on metabolism of tissue slices // Ibid.— 1984.— 21, N 3.— P. 285—295.

НИИ урологии Минздрава РСФСР,
г. Москва

Поступила 2.10.89

V. I. KIRPATOVSKY

THE PROTECTIVE ACTION OF α -TOCOPHEROL IN RAT KIDNEY CRYOPRESERVATION

Research Institute of Urology, Moscow

Kidneys of 40 inbred white rats were preserved at -60°C after preliminary perfusion with NIITiO-2 solution containing 15 % DMSO and 2% albumin. The animals were pretreated with 200 mg/kg (α -tocopherol acetate (a 30 % oleosae solution) 3—4 or

18—24 hr prior to the experiment. The pretreatment with α -tocopherol changed insignificantly the dynamics of DMSO accumulation in the kidney during perfusion and increased reliably the flow rate. The administration of the drug 18—24 hr before the experiment diminished reliably changes in water-electrolyte balance (swelling, tissue concentration of K^+ and Na^+) and leakage of protein and LDH both after perfusion with cryoprotectants and after freeze-thawing. The administration of the drug 3—4 hr before the experiment did not decrease the kidney injury but maintained the cell reparative potential, i. e. changes in electrolyte balance sharply diminished after normothermic incubation of cryopreserved kidney slices in a Cross-Taggart medium. Freezing of the kidney pretreated with α -tocopherol without protective solution (in air) was accompanied by minor changes in parameters studied, while freezing in the protective medium caused a more pronounced damage.

УДК 57.043

**В. Б. Хватов, Л. А. Бабийчук, О. А. Маркова,
Н. Л. Сенянская, И. Н. Кулагин, С. С. Рябова,
И. А. Бурыкина, Е. Ю. Абрикосов, Н. Н. Лапинская**

КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЕ ЭРИТРОЦИТОВ КАДАВЕРНОЙ КРОВИ

Разработаны медико-технические условия заготовки и консервирования эритроцитов кадаверной крови в условиях лаборатории тканей многопрофильного стационара скорой помощи. Проведена сравнительная оценка двух криоконсервантов: ЦНИИГПК II₄ и ПЭО-1500. Сравнительная характеристика биологических свойств как донорских, так и кадаверных эритроцитов до и после криоконсервирования показала их идентичность, высокую сохранность биохимических, биофизических, морфологических параметров, отражающих функциональную пригодность эритроцитомассы посмертной крови для трансфузии при неотложных состояниях.

Инфузионно-трансфузионная терапия является эффективным средством оказания экстренной помощи больным и пострадавшим. Наряду с использованием донорской крови и ее компонентов определенное место занимает созданная С. С. Юдиным [20] новая трансфузионная среда: кровь внезапно умерших людей, нашедшая применение при лечении неотложных состояний [14, 16, 21]. Следует подчеркнуть, что при массивных и обменных переливаниях посмертная кровь по сравнению с донорской вызывает меньше реакций и осложнений в силу своей однородности (до 3 л крови от одного трупа), отсутствия в ней фибриногена, цитрата натрия. Отмеченные особенности и большой опыт клинического использования такой крови позволяют считать ее важным резервом при чрезвычайных ситуациях. Это определяет необходимость создания запасов крови, особенно редких групп. Решение такой задачи возможно лишь при долгосрочном хранении клеток в жизнеспособном состоянии [3]. Проблему криоконсервирования эритроцитов донорской крови в определенной степени удалось решить [1]. Получило развитие использование компонентов посмертной крови: фибринолитически активной плазмы [14, 17], тромбомассы [9], лейкоцитомассы [5, 13], эритроцитомассы [7, 14]. Разрабатываются способы длительного хранения клеток кадаверной крови [10, 15], однако увеличение объема (до 4—5 л) заготовки такой крови [18], а также использование ее эритроцитов как дезинтоксикационного средства [19] требуют дальнейшего совершенствования методов криоконсервирования с учетом особенностей крови внезапно умерших людей.

Целью настоящей работы явилась оптимизация методов криоконсервирования эритроцитов кадаверной крови и оценка их функциональной полноценности для клинического использования.

В работе использована эритроцитомасса крови 10 доноров и 66 внезапно умерших мужчин. В качестве криоконсервантов использованы растворы ЦНИИГПК II₄ и 30 %-ный раствор ПЭО-1500, приготовленный на физиологическом растворе хлорида натрия. Криоконсервирование кадаверной эритроцитомассы с раствором ЦНИИГПК II₄ проводили, в соответствии с методиче-

скими рекомендациями [1], с ПЭО-1500 по методу холодной обработки, включающему дозированное добавление раствора ПЭО-1500 к эритроmasсе при низкой положительной температуре в соотношении 1 : 1 по объему. Затем взвесь переносили в алюминиевые контейнеры и замораживали погружением в жидкий азот. Оттаивание производили на водяной бане при температуре 42 ÷ 44 °С. Контролем служили эритроциты донорской крови, криоконсервированные аналогичными способами.

Определяли содержание АТФ люцеферин-люцифразным методом [2], 2, 3-ДФГ [12], свободный гемоглобин [6], общий гемоглобин — цианметгемоглобиновым методом [11], остаточный глицерин — колориметрическим способом [4], реологические свойства эритроцитов [23], их деформируемость и агрегационную активность [20]; проводили трансмиссионную и растровую микроскопию эритроцитов [8].

Сравнительная характеристика биологических свойств эритроцитов донорской и кадаверной крови до и после криоконсервирования с раствором ЦНИИГПК II₄ представлена в табл. 1. Полученные данные свидетельствуют о том, что состав взвеси деглицериновых размороженных эритроцитов из донорской и кадаверной крови существенно не отличаются и соответствуют

Т а б л и ц а 1

Функциональная полноценность эритроцитов донорской и кадаверной крови до и после стандартного криоконсервирования ($M \pm m$)

Параметр	Эритроциты крови					
	донорской			кадаверной		
	1	2	Δ%	1	2	Δ%
2,3 — ДФГ, мкмоль/г гемоглобина	13,0±1,2	12,5±0,9	—3,8	9,9±1,3	9,6±0,9	— 3,0
АТФ, мкмоль/г гемоглобина	5,1±0,5	4,2±0,4	—17,6	2,6±0,4	2,5±0,5	—3,8
Внеклеточный калий, ммоль/л	4,1±0,4	7,6±0,7	+85,4*	12,5±1,3	19,9±1,3	+59,2*
Калий эритроцитов, ммоль/л	74,6±3,0	63,0±2,0	—15,5*	77,4±1,9	58,7±3,1	—24,2*
Внеклеточный натрий, ммоль/л	146±5	528±31	+262 ¹	153±3	628±39***	+310
Натрий эритроцитов, ммоль/л	23,1±2,7	15,1±1,7	—34,6*	18,9±2,1	14,5±1,5	—23,3*
Объем эритроцитов, мк ²	92±4	87±2	—5,4	101±2	105±3	+4,0
Толщина эритроцитов, мк	2,39±0,12	2,27±0,04	—5,0	2,63±0,08	2,72±0,09	+3,4
Динамическая вязкость крови при: 18,2 дин/см ²	5,14±0,30	6,17±0,20	+20,0*	4,65±0,51	5,38±0,72	+15,7
1,52 дин/см ²	7,43±0,30	5,49±0,53	—26,1*	6,01±0,56	7,25±0,70	+20,6
Коэффициент деформации эритроцитов	0,075±0,01	0,103±0,01	+37,3*	0,072±0,01	0,123±0,03	+70,8*
Агрегация эритроцитов, индуцированная полиглокином, усл. ед.	17,6±1,2	16,0±0,8	—9,1	17,8±1,0	17,0±0,6	—4,5
Осмотическая хрупкость эритроцитов, %		4,9±1,0			6,9±0,9	
Свободный гемоглобин, мг%	0,62±0,05	62±3	×100**	4,2±0,4	79±3	×18,8**

Примечание. 1 — до, 2 — после криоконсервирования; * $P < 0,05$ — сравнение до и после криоконсервирования соответственно донорских и кадаверных эритроцитов; ** кратность увеличения; *** содержание Na⁺ в криоконсерванте

требованиям, предъявляемым службой крови к эритроцитам, предназначенным для клинического использования. Остаточный глицерин не превышал допустимых нормативных величин, 150—200 мг %, и составлял в среднем (87 ± 6) мг %.

Таблица 2

Функциональная полноценность эритроцитов донорской и кадаверной крови до и после криоконсервирования с использованием ПЭО — 1500

Параметр	Эритроциты крови					
	донорской			кадаверной		
	1	2	$\Delta\%$	1	2	$\Delta\%$
2,3-ДФГ, мкмоль/г гемоглобина	$10,0 \pm 1,2$	$8,8 \pm 0,9$	-12,0	$7,9 \pm 1,0$	$6,9 \pm 0,9$	-12,6
АТФ, мкмоль/г гемоглобина	$5,1 \pm 0,5$	$4,2 \pm 0,4$	-17,6	$2,6 \pm 0,4$	$2,3 \pm 0,3$	-11,5
Внеклеточный калий, ммоль/г	$4,1 \pm 0,4$	$15,8 \pm 3,0$	+285*	$12,8 \pm 1,6$	$21,7 \pm 1,3$	+69,5*
Калий эритроцитов, ммоль/л	$76,1 \pm 1,6$	$67,0 \pm 3,3$	-12,0*	$74,6 \pm 0,6$	$66,3 \pm 1,4$	-11,1*
Внеклеточный натрий, ммоль/л	147 ± 5	143 ± 4	-2,7	152 ± 4	139 ± 7	-8,5
Натрий эритроцитов, ммоль/л	$18,4 \pm 4,0$	$21,3 \pm 3,0$	+15,8	$16,1 \pm 1,0$	$19,5 \pm 1,5$	+21,1
Объем эритроцитов, мк ³	92 ± 4	65 ± 4	-29,3	101 ± 2	74 ± 3	-26,7
Толщина эритроцитов, микроны	$2,39 \pm 0,12$	$1,69 \pm 0,15$	-29,3*	$2,63 \pm 0,08$	$1,93 \pm 0,04$	-26,6*
Динамическая вязкость крови (сП) при:						
18,2 дин/см ²	$5,14 \pm 0,30$	$8,23 \pm 0,18$	+60,1*	$4,65 \pm 0,51$	$9,04 \pm 0,91$	+94,4*
1,52 дин/см ²	$7,43 \pm 0,30$	$7,45 \pm 0,09$	+0,3	$6,01 \pm 0,56$	$8,11 \pm 0,80$	+34,9*
Коэффициент деформации эритроцитов	$0,075 \pm 0,01$	не определялся		$0,072 \pm 0,01$	не определялся	
Агрегация эритроцитов, индуцированная полиглюкином, усл. ед.	$17,6 \pm 1,2$	не определялся		$17,8 \pm 1,0$	не определялась	
Свободный гемоглобин, мг %	$0,62 \pm 0,05$	108 ± 4	$\times 174^{**}$	$4,2 \pm 0,4$	134 ± 7	$\times 31,9^{**}$

Примечание. 1 — до, 2 — после криоконсервирования; * $P < 0,05$ — сравнение до и после криоконсервирования соответственно донорских и кадаверных эритроцитов; ** кратность увеличения.

Необходимо отметить, что уровни АТФ и 2,3-ДФГ в эритроцитах кадаверной крови несколько ниже таковых в эритроцитах донорской крови. Однако, как следует из представленных данных, процесс криоконсервирования не вызывает уменьшения АТФ и 2,3-ДФГ как в донорских, так и в кадаверных эритроцитах, что свидетельствует о сохранении их функциональной полноценности.

Выявлен ряд особенностей при исследовании вязкостных характеристик эритроцитов. Так, криоконсервирование с добавлением глицерина и последующим отмыванием его вызывали у донорских эритроцитов разнонаправленные изменения: динамическая вязкость в среднем увеличивалась на 20 % при силе напряжения 18,2 дин/см² и снижалась в среднем на 26 % при 1,52 дин/см² (от $7,43 \pm 0,30$ до $5,49 \pm 0,53$ сП). Динамическая вязкость кадаверных эритроцитов при различных напряжениях сдвига увеличивалась в среднем соответственно на 15,7 и 20,6 %, однако эти изменения статистически не значимы (табл. 1) и отражают более выраженную однородность популяций кадаверных эритроцитов.

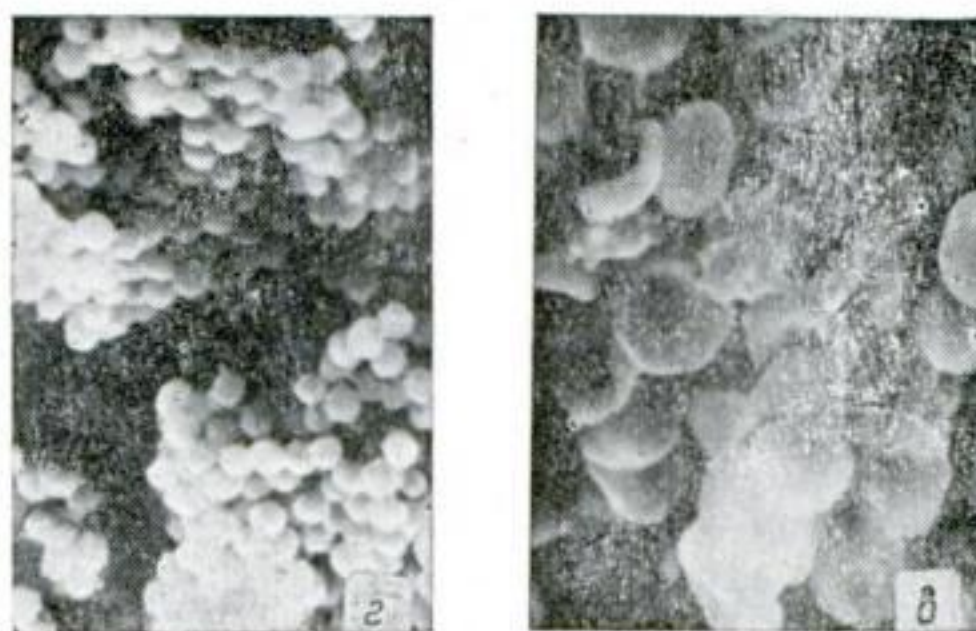
Толщина и объем донорских и кадаверных эритроцитов после криоконсервирования варьировали в пределах физиологических колебаний, хотя исходные параметры эритроцитов посмертной крови превышали таковые эритроцитов донорской крови.

Исследование деформирующих свойств эритроцитов после криоконсервирования показало повышение коэффициента деформации, причем в кадаверных эритроцитах он увеличивался более значительно (на 70,8 %), чем в донорских (на 37,3 %) по сравнению с таковым до криоконсервирования (табл. 1).

Исходя из вышеизложенного, можно заключить, что криоконсервирование с последующим отмыванием способствует элиминации слабых малоустойчивых форм эритроцитов кадаверной крови (искусственный и положительный для целей трансфузии отбор), сохраняя наиболее устойчивые популяции клеток, обладающие большей функциональной активностью, проявляющейся в повышении вязкостных характеристик.



Рис. 1. Морфология эритроцитов кадаверной крови до замораживания: а, б — кадаверные эритроциты без консерванта; а — округлая форма, равномерная насыщенность гемоглобином, электронограмма $\times 10000$; б — тутовая форма, растровая микроскопия — $\times 4000$; в, г — кадаверные эритроциты с криоконсервантом ЦНИИГПК II₄, округлая форма, равномерная насыщенность гемоглобином; в — электронограмма — $\times 7000$; г — растровая микроскопия — $\times 500$; д — кадаверные эритроциты, заготовленные с ПЭО-1500, двояковогнутые и выпукло-вогнутые дискоциты, растровая микроскопия — $\times 1500$



Отметим, что для существующих в настоящее время способов криоконсервирования эритроцитов, общим является необходимость удаления криопротектора из деконсервированных клеток. Это весьма усложняет и удорожает метод криоконсервирования для широкого клинического использования, ограничивает применение криоконсервированной эритроцитомассы в практике скорой помощи. В связи с этим нами применен криопротектор ПЭО молекулярной массы 1500 (ПЭО-1500), не требующий удаления из клеток после размораживания.

Сравнительная характеристика биологических свойств эритроцитов донорской и кадаверной крови до и после криоконсервирования с криопротектором ПЭО-1500 представлена в табл. 2. Как следует из представленных данных, морфофункциональная активность эритроцитов как донорской, так и кадаверной крови при криоконсервировании ПЭО-1500 существенно не отличается от таковой при использовании в качестве ограждающего раствора ЦНИИГПК II₄ (табл. 1). Тем не менее ряд особенностей выявлен. Добавление ПЭО-1500 к эритроцитам до криоконсервирования вызывало

существенные изменения как размеров клеток, так и их вязкостных характеристик. Эти изменения связаны с уменьшением объема (для донорских эритроцитов на 29,3 %, для кадаверных — на 26,7 %) и толщины (для донорских — от 2,39 до 1,69 мк, для кадаверных — от 2,63 до 1,93 мк) клеток. Уменьшение размеров эритроцитов под действием ПЭО-1500 связано с тем, что он является непроникающим в клетку криопротектором, вызывает их дегидратацию, что может являться важным фактором в механизме повышения устойчивости клеток к последующему замораживанию — отогреву [22].

Важным показателем, отражающим структурную и функциональную полноценность клеток является их форма. Поэтому проведены морфологиче-

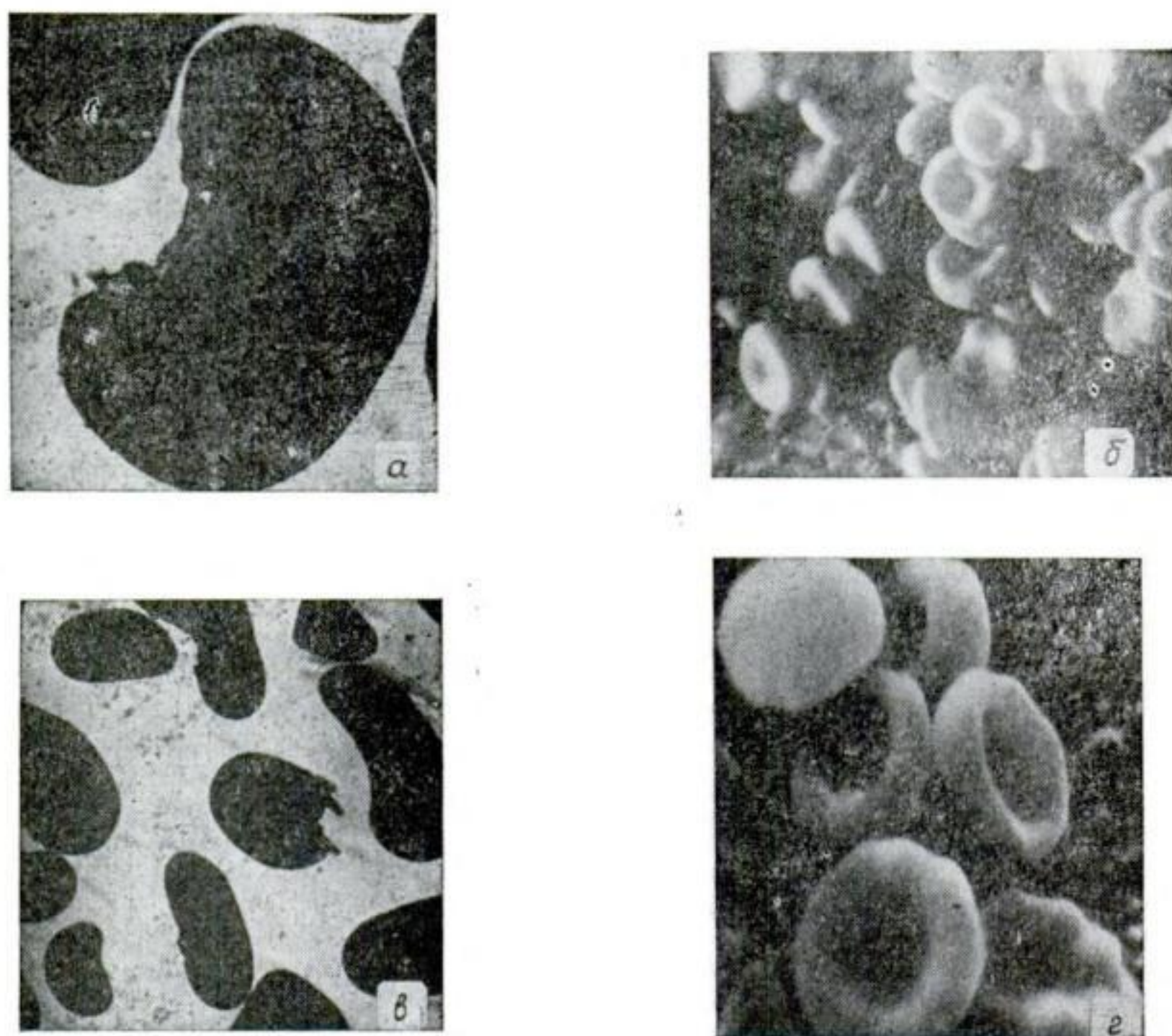


Рис. 2. Морфология размороженных эритроцитов кадаверной крови: а, б — трансмиссионная и растровая электронная микроскопия эритроцитов с криоконсервантом ЦНИИГПК II₄. Двояковогнутые, выпукло-вогнутые, слегка набухшие дискоциты, равномерно насыщенные гемоглобином с небольшими субмембранными очагами просветления; а — $\times 15000$, б — $\times 1300$; в, г — трансмиссионная и растровая электронная микроскопия эритроцитов, заготовленных с ПЭО-1500. Двояковогнутые, выпукло-вогнутые дискоциты равномерно насыщенные гемоглобином; в — $\times 2100$, г — $\times 4000$

ские исследования эритроцитов кадаверной крови до и после криоконсервирования с глицерином и ПЭО-1500 (рис. 1 и 2). Электронномикроскопически кадаверные эритроциты до криоконсервирования имели округлую форму с выраженными признаками набухания (рис. 1), что согласуется с данными объема и толщины этих клеток. Сканирующая микроскопия выявила преобладание тутовой формы эритроцитов, имеющих цитоплазматические выросты различных размеров (рис. 1,б).

С криоконсервантом ЦНИИГПК II₄ кадаверные эритроциты имели овальную двояковогнутую и выпукло-вогнутую формы, слегка набухшие. В некоторых случаях отмечалось незначительное увеличение степени гемолиза эритроцитов, проявляющееся в снижении интенсивности их окрашивания с образованием единичных теней. Электронномикроскопически при

этом обнаруживалось небольшое количество хлопьев гемоглобина между эритроцитами (рис. 1, в, г). Сканирующая микроскопия выявила восстановление формы эритроцитов, заготовленных с ПЭО-1500 до двояковогнутых, выпукло-вогнутых дисков с минимальными признаками гемолиза и сохранением единичных тутовых форм (рис. 1, д).

Морфологическое исследование эритроцитов после криоконсервирования с ЦНИИГПК II₄ позволило обнаружить многообразие их форм. Основную массу составили двояковогнутые и выпукло-вогнутые диски, реже встречались сфероциты и клетки неправильной формы. В дискоцитах выявлено нормальное содержание гемоглобина и сохранность наружной плазматической мембраны (рис. 2, а, б). Увеличение степени гемолиза отмечалось лишь в набухших овальных и округлых эритроцитах, в которых обнаружено равномерное снижение осмофильности или образование субмембранных зон разрешения гемоглобина. В некоторых клетках имелись разрывы наружной плазматической мембраны с выходом содержимого в окружающее пространство.

Размороженные эритроциты с ПЭО-1500 сохранили в основном форму двояковогнутых и выпукло-вогнутых дисков с минимальными признаками набухания и гемолиза (рис. 2, в, г). Лишь в единичных набухших клетках обнаруживались зоны повреждения наружной плазматической мембраны.

На основании проведенного морфологического исследования кадаверных эритроцитов до и после криоконсервирования можно заключить о сохранности форм и внутренней структуры основной массы клеток, в особенности заготовленных с криоконсервантом ПЭО-1500, что подтверждает данные о функциональной полноценности эритроцитов и сохранении ими исходных функций.

Таким образом, проведенные исследования показали, что эритроциты кадаверной крови, подвергнутые различным методам криоконсервирования, сохраняют физиологическую пригодность для трансфузии и могут определять один из эффективных компонентов трансфузионного пособия больным и пострадавшим с неотложными состояниями.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аграненко В. А., Виноград-Финкель Ф. Р., Федорова Л. И. и др. Методы долгосрочного хранения в замороженном состоянии эритроцитов, предназначенных для трансфузии // Метод. рекомендации. — М., 1980. — 47 с.
2. Атауллаханов Ф. И., Пичугин А. В. Модификация люциферин-люциферазного метода определения концентрации АТФ в эритроцитах // Биофизика. — 1981. — № 1. — С. 86—88.
3. Белоус А. М., Гордиенко Е. А., Розанов Л. Ф. Замораживание и криопротекция. — М.: Высшая школа, 1987. — 80 с.
4. Виноградов В. Л., Федорова Л. И. Калориметрический метод определения остаточного глицерина в размороженных отмытых эритроцитах // Пробл. гематологии и переливания крови. — 1980. — № 1. — С. 47—49.
5. Гарина М. М. Метод заготовки лейкоцитарной массы из фибринолизной крови // Там же. — 1962. — № 5. — С. 46—48.
6. Дервиз Г. В., Бялко Н. К. Уточнение метода определения гемоглобина, растворенного в плазме крови // Лаб. дело. — 1966. — № 8. — С. 461—464.
7. Жукова О. Т., Лифлинский Д. В., Мейтина Р. А. О возможности использования фибринолизной крови в искусственном кровообращении // Эксперим. хирургия и анестезиология. — 1974. — № 2. — С. 62—65.
8. Крымский Л. Д., Настайко С. В., Рабалов А. Г. Растровая электронная микроскопия сосудов и крови. — М.: Медицина, 1976. — 165 с.
9. Левин Г. Я. Гемокоагуляционные свойства и клиническое применение плазмы и тромбоцитов кадаверной крови: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — М., 1978. — 31 с.
10. Лубский В. Н. Разработка метода длительного консервирования эритроцитов трупной крови в замороженном состоянии: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 1971. — 21 с.
11. Лабораторные методы исследования в клинике / Под ред. В. В. Меншикова. — М.: Медицина, 1987. — 108 с.
12. Мешкова Н. П., Алексахина Н. В. Раздельное определение кислотнорастворимых фосфорных соединений // Успехи биол. химии. — 1954. — 2, № 2. — С. 291.
13. Морозов И. А., Кононов Ю. В., Вакуленко С. А. Трансфузия криоконсервированных

- лейкоцитов фибринолизной крови // Гематология и переливание крови.— 1981.— Вып. 16.— С. 105—107.
14. Пафомов Г. А. Биологическая характеристика крови внезапно умерших людей и ее использование в хирургической практике: Автореф. дис. ... докт. мед. наук.— М., 1971.— 35 с.
 15. Симкин Д. С., Селезнева О. М., Куноф В. К. Фракционирование фибринолизной крови и криоконсервирование ее компонентов для клинического применения // Метод рекомендации.— Киров, 1988.— 14 с.
 16. Симонян К. С., Гутцонтова К. П., Цуринова Е. Г. Посмертная кровь в аспекте трансфузиологии.— М.: Медицина.— 1975.— 271 с.
 17. Хватов В. В., Платонова Т. К., Маркова О. А. и др. Перфузат сосудов — новый источник получения фибринолитического средства // Гематология и трансфузиология.— 1986.— № 3.— С. 51—54.
 18. Хватов В. В. Препараты фибринолитического и антипротейного действия из плазмы крови внезапно умерших людей: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук.— М., 1984.— 41 с.
 19. Хватов В. В., Ляшенко Ю. Н. Современные принципы инфузионной коррекции гомеостаза в неотложной хирургии // Реанимация и интенсивная терапия в неотложной хирургии // Реанимация и интенсивная терапия в неотложной хирургии: Республ. сб. науч. тр. НИИСП им. Н. В. Склифосовского.— М., 1987.— С. 22—34.
 20. Шестаков В. А., Александрова Н. П. Агрегация эритроцитов у больных тромбоэмболическими поражениями магистральных сосудов // Кардиология.— 1974.— № 4.— С. 103—107.
 21. Юдин С. С. Переливание посмертной крови // Вопр. военно-полевой хирургии и переливания посмертной крови.— М.: Б. и., 1960.— С. 309—545.
 22. Babiychuk L. A., Zemlyanskikh N. A. The mechanism of structural and osmotic adaptation of erythrocytes to cryopreservation // Cryobiology and Freeze-drying.— Sofia, 1989.— P. 31—33.
 23. Suda T., Kon K., Maeda N. The correlation among blood viscosity, the shape of erythrocyte and membrane fluidity // J. Physiol. Soc. Jap.— 1980.— 42, N 8—9.— P. 347—353.

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

Поступила 10.11.89

V. B. KHVATOV, L. A. BABIYCHUK, O. A. MARKOVA, N. L. SENYANSKAYA,
I. N. KULAGIN, S. S. RYABOVA, I. A. BURYKINA, E. Yu. ABRIKOSOV,
N. N. LAPINSKAYA

CRYOPRESERVATION OF CADAVER ERYTHROCYTES

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

Medical and technical conditions for preparation and preservation of cadaver erythrocytes have been developed in the laboratory of emergency hospital. The comparative analysis of two cryoprotective media TSNIIGP II₄ and PEO-1500 has been performed. Biological properties of both donor and cadaver erythrocytes before and after cryopreservation have been found to be similar. They maintained biochemical, biophysical, morphological parameters reflecting the functional quality of cadaver erythrocytes for transfusion in emergency.

УДК 57.043

Г. Штайн

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ ГАМЕТ РЫБ

Приводятся литературные данные и результаты собственных экспериментов по криоконсервированию спермы и яйцеклеток лососевых рыб. Криоконсервация снижает оплодотворяющую способность спермы лососевых на разных этапах в среднем на 15—20 %.

Первые эксперименты по искусственному осеменению лососевых (*Salmo salar*) и форели (*Salmo trutta forma fario*) провел Джакоби в 1765 г. Примерно через сто лет этот метод усовершенствовали Реми, Гехин и Врасски.

С тех пор методом искусственной инсеминации получено потомство рыб различных видов. Большой интерес представляет криоконсервация гамет некоторых видов рыб.

Подавляющее большинство рыб на практике разводят с помощью внешнего оплодотворения. Такая стратегия разведения особей связана с характеристиками спермы и яйцеклеток, которые значительно отличаются от таковых у высших позвоночных. Поэтому всегда следует учитывать эти различия при разработке методов криоконсервации репродуктивных клеток рыб.

Ниже приводятся результаты собственных экспериментов и данные других авторов по криоконсервированию половых продуктов лососевых.

Криоконсервация сперматозоидов

Сперматозоиды рыбы имеют структуру, типичную для спермиев позвоночных, т. е. содержат головку, тело и длинный хвост. Поскольку сперматозоид свободно проникает через мембрану яйцеклетки, в его составе акросома

Таблица 1

Длина головки и хвоста сперматозоида, плотность и объем спермы некоторых видов лососевых

Вид	Головка *, мк	Хвост *, мк	Плотность **, млн/мм ³	Объем **, см ³
<i>Thymallus thymallus</i>	3,2	47	5	1
<i>Salmo trutta forma fario</i>	3,4	39	20	5
<i>Salmo gairdneri</i>	3,9	35	15	10
<i>Coregonus spec.</i>	4,0	37	12	1

* Данные Штайна [6]; ** аппроксимированные значение для одного образца спермы, повторный забор в сезон метания икры.

отсутствует. Сперма активируется при разведении в воде, а время подвижности клеток зависит от вида рыбы и некоторых экзогенных факторов (табл. 1, 2). Подвижность кратковременно подавляется KCl и более длительное время NaCl.

После первых экспериментов по криоконсервации спермы рыб [1] опубликовано достаточное число работ по данной проблеме [2, 4, 8, 9].

Для замораживания спермы в любом случае следует разводить сразу после забора. Наилучшие результаты были получены нами при использовании среды, содержащей 100 мл дистиллированной воды, 750 мг NaCl, 200 мг NaHCO₃, 100 мг глюкозы, 40 мг KCl и 20 мл яичного желтка. Пиронен [5] консервировал сперму *Coregonus muksun* в среде, содержащей только 0,3 М глюкозы.

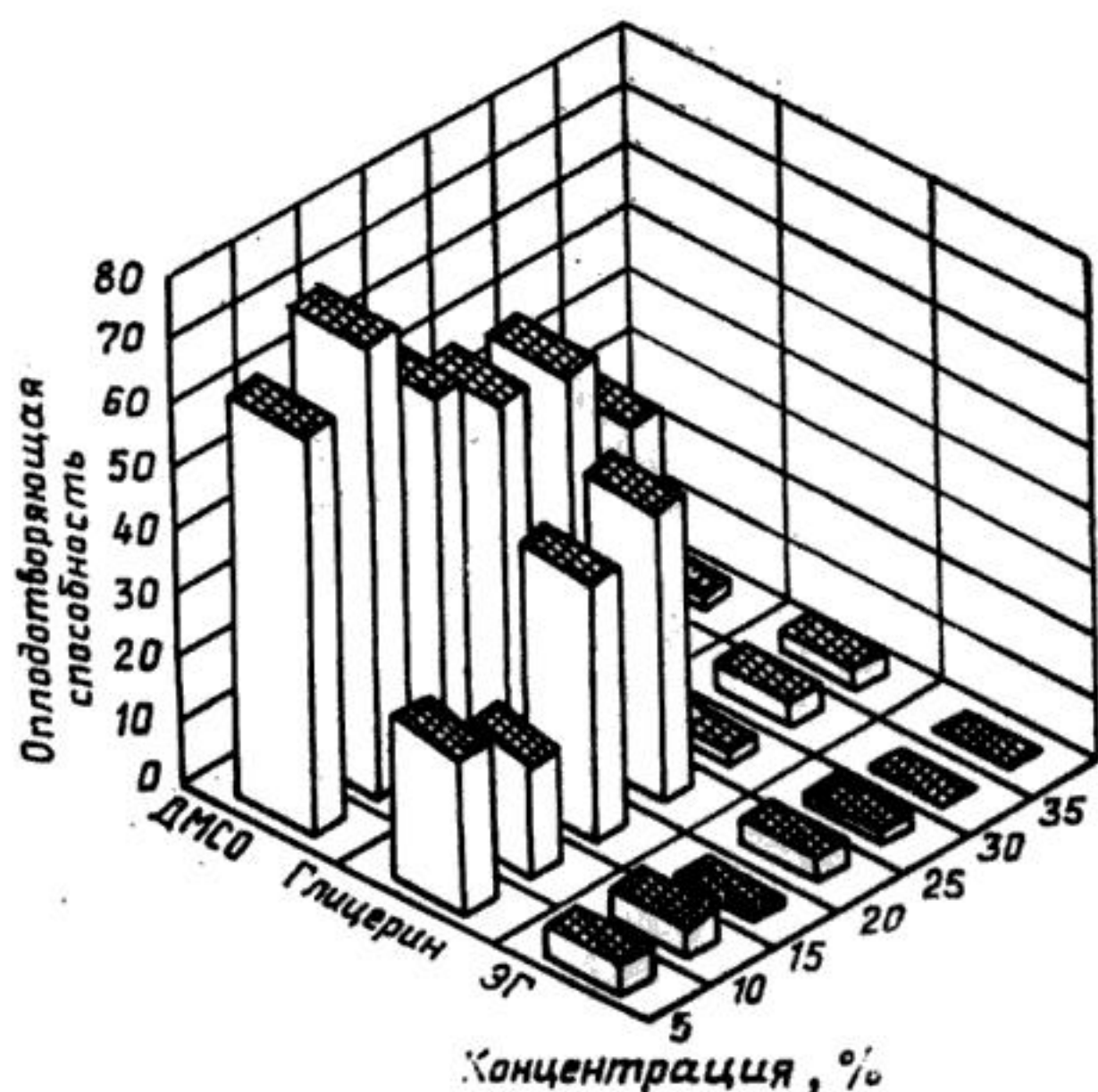
ДМСО в 10 %-ной концентрации оказался наиболее эффективным криопротектором для криоконсервации большинства видов половых продуктов (рис. 1). Однако при криоконсервации лососевых глицерин (20 %) оказывал лучшее действие, чем ДМСО [5].

Таблица 2

Время подвижности сперматозоида радужной форели (*Salmo gairdneri*) в воде и разных растворах (разведение в соотношении 1 : 70)

Среда	n	Время подвижности, с	
		$\bar{x}$	$\pm s$
Вода дистиллированная	3	55	0,7
NaCl (0,85 %)	3	82	0,4
NaCl (1,2 г, KCl (0,3 г), вода дистиллированная (1000 мл)	3	100	0,8
NaCl (6 г), CaCl ₂ (0,2 г), мочевины (4,5 г), вода дистиллированная (1000 мл)	3	958	1,5

После разведения спермы в соотношении 1 : 3 ее можно замораживать в соломках или ампулах в парах жидкого азота или в гранулах на сухой углекислоте. Во всех случаях большие скорости замораживания давали лучшие результаты оплодотворения (табл. 3).



Оплодотворяющая способность криоконсервированной спермы *Salmo trutta forma fario* в присутствии ДМСО, глицерина и этиленгликоля (ЭГ) (n=4)

Таблица 3
Влияние скорости замораживания на оплодотворяющую способность спермы форели

Скорость замораживания, °С/мин	Количество образцов	Оплодотворяющая способность	
		$\bar{x}$	$\pm s$
10	5	69	11
5	5	59	14
2	5	43	8

Таблица 4
Влияние размера гранул на оплодотворяющую способность спермы форели

Размер гранул, мл	n	Оплодотворяющая способность	
		$\bar{x}$	$\pm s$
0,05	4	43	6
0,10	4	75	8
0,20	4	74	7
0,30	4	61	15
0,40	4	55	20

в основном для генетических целей, гибридизации и сохранения вымирающих видов рыб.

При замораживании в объеме 0,2 мл в гранулах была получена более высокая оплодотворяющая способность, чем после криоконсервирования в соломках или ампулах (табл. 4).

Гранулы оттаивали в 10 мл 1 %-ного раствора NaHCO_3 , примерно при 30 °С (табл. 5) при интенсивном встряхивании. Поскольку оттаянные сперматозоиды активируются в среде, инсеминацию нужно осуществить за несколько секунд. Все яйцеклетки необходимо покрыть смесью спермы и раствора. При этом число яйцеклеток форели ограничивается 500 клеток на образец, а соотношение сперматозоид — яйцеклетка составляет $10^6:1$.

Примерно через 30 с яйцеклетки «закаливались» в воде и через 20 мин их отмывали и переносили в среду для разведения.

Криоконсервация снижает оплодотворяющую способность спермы на разных этапах (табл. 6) на 15—20 %.

До настоящего времени криоконсервированные сперматозоиды используют

Таблица 5

Влияние температуры раствора оттаивания на оплодотворяющую способность спермы форели [7]

Температура, °C	Время оттаивания, с	n	Оплодотворяющая способность	
			$\bar{x}$	$\pm s$
5	31	3	57	4
20	11	3	80	4
30	9	3	88	7
40	8	3	83	4

Таблица 6

Оплодотворяющая способность свежей, разведенной и криоконсервированной спермы радужной форели

Сперма	n	Оплодотворяющая способность	
		$\bar{x}$	$\pm s$
Свежая	8	94	3
Разведенная	8	78	6
Замороженная на сухой углекислоте	8	62	21
Замороженная в жидком азоте	8	50	23

Криоконсервация яйцеклеток и эмбрионов

По сравнению с млекопитающими у рыб образуются крупные яйцеклетки с высоким содержанием воды (табл. 7). Поэтому до настоящего времени не получен реальный успех криоконсервации. Точка замерзания для яйцеклеток лососевых находится около -7°C . Нами яйцеклетки переохлаждались до -20°C . Однако при этом они теряли способность к оплодотворению. Аналогичные результаты получены и при замораживании эмбрионов. Все же предварительные результаты свидетельствуют о том, что возможно криоконсервировать эмбриональные клетки на стадии бластулы для их последующей трансплантации в нативные неоплодотворенные яйцеклетки.

Таблица 7

Диаметр, количество и содержание воды яйцеклеток разных видов лососевых [3, и собственные данные]

Вид	Диаметр, мм		Количество/кг веса тела	Вода, %
	$\bar{x}$	$\pm s$		
Радужная форель	5,5	0,4	2000—3000	58,2
Кумжа	5,7	0,3	2000—3000	58,5
Ручьевая форель	4,7	0,2	2500—4000	63,8
Хариус	3,7	0,2	6000—8000	—

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Blaxter J. H. C. Sperm storage and cross fertilization of spring and autumn spawning herring // Nature.— 1953.— 172.— P. 1189—1190.
2. Fredrich F. Spermakonservierung bei Salmoniden // Z. für die Binnenfischerei der DDR.— 1984.— 31.— S. 24—31.
3. Ginsburg A. S. Fertilization in fish and the problem of polyspermy // Israel Program of Scientific Translations.— 1989.
4. Horton H. F., Ott A. G. Cryopreservation of fish spermatozoa and ova // J. Fish. Res. Bd. Can.— 1976.— 33.— 995—1000.
5. Piironen J. Factors affecting fertilization rate with cryopreserved sperm of whitefish (*Coregonus muksun* Pallas) // Aquaculture.— 1987.— 66.— P. 347—357.
6. Stein H. Licht- und elektronenoptische Untersuchungen an den Spermatozoen verschiedener Süß wasser Knochenfische // Z. Angewandte Zool.— 1981.— 68.— S. 183—198.
7. Stein H. Einfluss verschiedener Gefrier- und Auftaugeschwindigkeiten auf die Befruchtungsfähigkeit von tiefgefrorenem Forellensperma // Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.— 1984.— 97.— S. 138—139.
8. Stein H., Bayerle H. Cryopreservation of the sperm of some freshwater teleosts // Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.— 1978.— 18.— P. 1073—1076.
9. Stein H., Bayerle H. Gameten- und Embryonenkonservierung bei Salmoniden // Bay. Landw. Jahrbuch.— 1985.— 62.— S. 236—245.

Технический ун-т,
г. МюнхенПеревод с англ. З. В. Линевиц
Поступила 21.03.88

CRYOPRESERVATION OF FISH GAMETES

Technical University of Munich, FRG

Literature data and own results on cryopreservation of semen and eggs of different salmon species are presented. The average loss of fertilization rate in salmonids is about 10 to 15 %.

УДК 578.828.57.086.13:57.086.835

Ш. У. Янгулов, И. Ю. Дранов, А. Н. Терентьев, В. В. Кадетов

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ КРИОЗАЩИТНЫХ СРЕД НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ЛИМФОБЛАСТОИДНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ *H-9* и *U-937*

Описывается влияние различных криозащитных сред на жизнеспособность перевиваемых лимфобластоидных клеточных линий *H-9* и *U-937*, наиболее часто используемых для изоляции и поддержания вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). Приводится режим замораживания и отогрева. Проведена оценка жизнеспособности клеточных линий.

В последние годы в связи с интенсификацией работ, связанных с использованием перевиваемых клеточных линий, особое место занимают вопросы их криоконсервирования и создание банков долгосрочного хранения [1, 2, 6].

В процессе длительного поддержания клеточных линий путем последовательных пассажей невозможно обеспечить абсолютно идентичные условия культивирования, что является причиной изменения их морфофункциональных свойств. Кроме того, при постоянных пересевах повышается опасность контаминации клеток вирусами и микоплазмами, что может привести к потере клеточной линии [3, 4, 5].

Особую актуальность в настоящий момент представляют работы по изучению вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), для выделения и накопления которого используются перевиваемые лимфобластоидные клеточные линии, и в частности *H-9* и *U-937*. В литературе отсутствуют сведения об оптимальных условиях криоконсервирования линий *H-9* и *U-937*.

Целью настоящей работы является оптимизация условий криоконсервирования перевиваемых лимфобластоидных клеточных линий *H-9* и *U-937*, наиболее часто используемых для изоляции и поддержания ВИЧ путем изучения влияния различных криозащитных сред на их жизнеспособность и пролиферативную активность.

Использованы клеточные линии: *H-9* — клон линии *HT*, полученной от больного лимфоидной лейкемией [7], и *U-937*, полученная из клеток человеческой лимфомы [8]. Клетки выращивали в пластиковых флаконах («Костар», США) на среде следующего состава: *RPMI-1640* («Флоу», Англия) 10мМ буфера Хепес («Серва», ФРГ), 4 г/л глюкозы, 2 мМ глутамина, 5×10^{-5} М меркаптоэтанол.

Подсчет количества выращенных клеток и определения их жизнеспособности проводили в камере Горяева, используя краситель трипановый синий в концентрации 0,2 %.

Суспензию клеток, находящуюся в логарифмической фазе роста, центрифугировали в течение 5 мин при 1000 об/мин. Надосадочную жидкость сливали, а осадок суспендировали в одной из сред замораживания, доводя клеточную плотность до $2 \cdot 10^6$ клеток/мл. В качестве среды замораживания использовалась ростовая среда, содержащая 50 %-ную эмбриональную телячью сыворотку, а также одну из следующих криозащитных сред: 10 % глицерин, 10 % диметилсульфоксид (ДМСО), 10 % сахарозно-

желатиновую среду в сочетании с 5 % ДМСО с молекулярной массой 78,1, 15 % полиэтиленоксид с молекулярной массой 400 (ПЭО-400), 10 % поливинилпирролидон (ПВП) с молекулярной массой 25000.

В качестве контроля использовали как саму среду *RPMI*-1640, так и с 50 %-ной эмбриональной телячьей сывороткой.

Подготовленную таким образом суспензию клеток разливали по 1,0 мл в стерильные пробирки для микропроб одноразового использования объемом 1,5 см³ производства Ленинградского завода медицинских полимеров, запаивали раскаленным скальпелем и выдерживали в холодильнике 20 мин при температуре 4 °С.

Время с момента внесения защитной среды до начала охлаждения не превышало 20 мин. После этого пробы подвергали замораживанию. Для замораживания был использован наиболее часто применяемый двухэтапный способ [2, 5]. Пробы опускали в горловину заполненного жидким азотом сосуда Дьюара на глубину, гарантирующую скорость замораживания 1 °С/мин. Измерение температуры образца осуществляли с помощью датчика ТСМ-6-22 и самописца КСП-4. Через два часа пробы погружали непосредственно в жидкий азот и хранили в нем в течение 2-х недель (срок наблюдения).

После извлечения из жидкого азота пробы быстро оттаивали на водяной бане при 37 °С в течение 3-х минут. Пробирки вскрывали, содержимое переносили в центрифужные пробирки и объем каждой пробы доводили до 10 мл с помощью фосфатного буфера, лишенного ионов Са⁺⁺ и Mg⁺⁺ («Флоу», Англия). После центрифугирования клетки суспендировали в среде указанного состава с добавками и выращивали при 37 °С в атмосфере с 5 % СО₂. Жизнеспособность клеток определяли с помощью красителя. В течение 5 дней проводилась оценка пролиферативной активности клеточных линий с помощью индекса пролиферации. Полученные результаты обрабатывали статистически по методу Стьюдента.

Полученные данные подтверждают положение о том, что не все криопротекторные среды и их сочетания могут применяться для криоконсервирования различных клеточных линий, в частности лимфобластоидных (табл. 1) [2, 4].

Влияние различных криозащитных сред на жизнеспособность криоконсервированных лимфобластоидных клеточных линий H-9 и U-937

Состав криозащитной среды	H-9		U-937	
	Процент жизнеспособных клеток	Индекс пролиферации	Процент жизнеспособных клеток	Индекс пролиферации
<i>RPMI</i> + 50 % эмбриональная телячья сыворотка + 10 % глицерин	82,3 ± 2,1	4,5	81,5 ± 1,1	5,0
<i>RPMI</i> + 50 % эмбриональная сыворотка + 10 % ДМСО	78,0 ± 1,7	3,8	79,9 ± 1,3	4,0
<i>RPMI</i> + 50 % эмбриональная сыворотка + 10 % сахарозно-желатиновая среда	60,1 ± 1,6	1,5	57,7 ± 2,5	1,3
<i>RPMI</i> + 50 % эмбриональная сыворотка + 5 % ДМСО + 10 % сахарозно-желатиновая среда	69,7 ± 1,9	1,8	70,2 ± 2,1	1,4
<i>RPMI</i> + 50 % эмбриональная сыворотка + 15 % ПЭО-400	70,9 ± 3,2	1,3	74,4 ± 3,3	1,1
<i>RPMI</i> + 50 % эмбриональная сыворотка + 10 % ПВП	67,5 ± 2,7	1,7	68,9 ± 1,4	1,8
<i>RPMI</i> + ДМСО 10 % без сыворотки	11,5 ± 6,2	0,5	9,3 ± 4,6	0,6
<i>RPMI</i> без криопротектора (контроль)	0	0	0	0
<i>RPMI</i> + 50 % эмбриональная сыворотка без криопротектора (контроль)	0	0	0	0

Наиболее оптимальными протективными средами оказались глицерин или ДМСО в концентрации 10 % в сочетании с 50 %-ной эмбриональной сывороткой, введенной в ростовую среду. Крипротекторная активность глицерина и ДМСО показана для многих перевиваемых клеточных линий, так же как и для различных клеток крови [2].

Следует отметить, что при использовании ДМСО получены несколько худшие результаты, что связано, вероятно, с более высокой общей токсичностью ДМСО. По сравнению с ДМСО глицерин более физиологичен, так как он обнаруживается в плазме крови и тканях как в свободном, так и в связанном состоянии.

Кроме того, при использовании ДМСО отмечены некоторые морфофункциональные изменения клеток, проявляющиеся в сморщивании клеточной оболочки и появлении зернистости цитоплазмы. Индекс пролиферации таких клеток был снижен.

Другие использованные в работе защитные среды обладали заметно более низким протективным эффектом, делающим невозможным их применение в данном случае.

Поливинилпирролидон-25000, а также ПЭО-400 обладают высокой криозащитной активностью, однако эффект от их применения выражен слабее, чем при использовании глицерина.

Среды замораживания, не содержащие крипротективные вещества, не могут быть использованы для консервирования ультразамораживанием указанных клеточных линий, так как даже сохранив жизнеспособность, они имеют значительные морфологические изменения.

ВЫВОДЫ

1. Оптимальной крипротективной средой ультранизкотемпературного консервирования клеточных линий *H-9* и *U-937*, обеспечивающей сохранность их морфофункциональных характеристик и эффективное восстановление, является 10 % глицерин в сочетании с 50 %-ной эмбриональной телячьей сывороткой на среде *RPMI-1640*.

2. Приведенный двухэтапный режим замораживания с использованием отобранной криозащитной среды прост, легкодоступен, не требует особых затрат и может быть использован практически в любой лаборатории, где ведутся работы с клеточными линиями *H-9* и *U-937*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Залюбовская Н. П., Кисилева Р. И. Криоконсервирование клеток культур тканей методом глубокого замораживания // *Вопр. вирусологии*.— 1975.— Вып. 6.— С. 734—738.
2. Криоконсервирование клеточных суспензий / Под ред. А. А. Цуцаевой.— Киев: Наук. думка, 1983.— 240 с.
3. Новохатский А. С., Михайлова Г. Р., Царева А. А. Проблема контаминации клетками и новые подходы к контролю перевиваемых линий // *Вопр. вирусологии*.— 1977.— Вып. 4.— С. 396—408.
4. Пушкарь Н. С., Шраго М. И., Белоус А. М., Калугин Ю. В. Крипротекторы.— Киев: Наук. думка, 1978.— 204 с.
5. Цуцаева А. А., Петренко Т. Ф. Криоконсервация культивируемых клеток животных // *Методы культивирования клеток*.— Л.: Наука, 1987.— С. 63—69.
6. Coriell L., Greene A. E., Silver R. K. Historical development of cell and tissue culture freezing // *Cryobiology*.— 1964.— N 1.— P. 72—79.
7. Popovic M., Sarngadharan M. G., Read E., Gallo R. C. Detection, isolation and continuous production of cytopathic retroviruses (*HTLV-III*) from patients with AIDS and Pre-AIDS // *Science*.— 1984.— 4, N 224.— P. 497—500.
8. Sundstrom C., Nilsson K. Establishment and characterization of a human histiocytis lymphoma cell line (*U-937*) // *Int. J. Cancer*.— 1976.— N 17.— P. 565—577.

Ростовский Ордена Трудового
Красного Знамени научно-исслед.
противочумный ин-т,
г. Ростов-на-Дону

Поступила 14.04.89

SH. U. YANGULOV, I. Yu. DRANOV, A. N. TERENTIYEV, V. V. KADETOV
THE EFFECT OF DIFFERENT CRYOPROTECTIVE MEDIA ON THE
VIABILITY OF FREEZE-THAWED LYMPHOBLASTOID CELL LINES
H-9 AND U-9

Order of the Red Banner of Labour Antiplaque Research Institute
of Rostov-on-Don

The effects of different cryoprotective media on the viability of reinoculated lymphoblastoid cell lines which are commonly used to isolate and maintain HIV are described. The regimen of freezing and thawing is presented. The viability of cell lines is estimated.

УДК 57043:578.088

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

**ВЛИЯНИЕ ПОВЕРХНОСТНОЙ АКТИВНОСТИ
КРИОПРОТЕКТОРОВ НА СОХРАННОСТЬ
БИООБЪЕКТОВ ПРИ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИИ**

Исследовано влияние криопротектора ПЭО-1500 на прочность мембран эритроцитов человека, предварительно подвергнутых различным температурным воздействиям. Отмечается упрочнение мембран эритроцитов в присутствии ПЭО-1500, не подвергавшихся холодовому воздействию или подвергавшихся, но без льдообразования. При холодовом воздействии с льдообразованием влияние ПЭО-1500 на мембрану проявляется в снижении ее прочности.

Поверхностная активность криопротекторов и влияние ее на сохранность биобъектов при низкотемпературном консервировании исследованы явно недостаточно, хотя роль ее несомненна, так как это свойство криопротекторов определяет их взаимодействие с поверхностью клетки.

Ранее нами [1] изучена поверхностная активность криопротекторов ряда ПЭО с молекулярной массой 100—6000 в модельных системах. Показано, что исследованный ряд криопротекторов — поверхностноактивные вещества, характеризующиеся практически мономолекулярным характером адсорбции на границе раздела полярная — неполярная среда.

Последствия адсорбционного взаимодействия криопротекторов с биомембраной исследованы на примере ПЭО-1500 и эритроцитов человека по критерию прочности их мембран после воздействия в различных температурно-временных условиях. Прочность мембран эритроцитов оценивалась по данным гемолиза после прокачки их суспензии по замкнутому контуру перистальтическим насосом.

В первой серии опытов изучено влияние ПЭО-1500 на прочность мембран эритроцитов без холодового воздействия в условиях прокачки суспензии при 37 °С (табл. 1). Данные, приведенные в табл. 1, свидетельствуют о значительном упрочнении мембран эритроцитов в присутствии ПЭО-1500 при подобном механическом воздействии на них. Объяснить это можно утолщением мембраны адсорбционным слоем молекул ПЭО-1500, приводящим к упрочнению мембраны при механическом воздействии.

Во второй серии опытов изучено влияние ПЭО-1500 на прочность мембраны эритроцитов, находившихся при пониженных температурах (до —3,6 °С), в том числе и в контакте с растущими кристаллами льда

Т а б л и ц а 1
Влияние присутствия ПЭО-1500 на прочность мембран эритроцитов без холодового воздействия

Среда	Гемолиз, мг %	
	До прокачки	Через 300 мин прокачки
10 % ПЭО-1500	7,0	70,0
Контроль	10,0	154,0

(табл. 2). Данные табл. 2 свидетельствуют, что охлаждение эритроцитов в присутствии ПЭО-1500 до $-3,6^{\circ}\text{C}$ без льдообразования не приводит к значительному уменьшению прочности их мембран. Охлаждение же со льдообразованием до $-0,5 \div -1,0^{\circ}\text{C}$ способствует уменьшению их прочности и более значительно в присутствии ПЭО-1500.

Таблица 2

Влияние присутствия ПЭО-1500 и условий холодого воздействия на прочность мембран эритроцитов

Условия холодого воздействия	Содержание ПЭО-1500, %	Гемоллиз, мг %	
		До прокачки	Через 100 мин прокачки
Экспозиция при $-3,6^{\circ}\text{C}$ в течение 12 мин без образования льда	10,0	2,0	23,0
Экспозиция при -1°C в течение 12 мин с образованием льда	10,0	82,0	118,0
Экспозиция при $-0,5^{\circ}\text{C}$ в течение 12 мин с образованием льда	—	16,0	46,0
Без холодого воздействия	10,0	2,0	18,0

Если бы взаимодействие ПЭО-1500 с мембраной проявлялось только в образовании его адсорбционных слоев, то должно было бы наблюдаться упрочнение мембраны (как в первой серии). Следовательно, в этих условиях преобладает иной характер взаимодействия ПЭО-1500 с мембраной, приводящий к уменьшению прочности последней.

Представить этот повреждающий механизм действия ПЭО-1500 на мембрану можно следующим образом.

В условиях контакта эритроцитов с растущими кристаллами льда на их мембраны действует осмотический напор воды и механические воздействия, которые при соответствующей величине могут привести к возникновению в мембране микротрещин. Молекулы ПЭО-1500, находящиеся в адсорбционном слое мембраны, могут мигрировать в подобные микротрещины и этим способствовать их развитию. Образовавшиеся таким образом микротрещины при воздействии деформирующих факторов (например при прокачке) способствуют разрушению мембран.

Прочность мембраны может уменьшаться и вследствие экранирования сил сцепления стенок микротрещин молекулами ПЭО-1500, что приводит к затруднению их «залечивания». Механизм подобного влияния поверхностно-активных веществ при разрушении твердых тел разработан в трудах П. А. Ребиндера [2] и широко применяется в технике.

Теория адсорбционного понижения прочности твердых тел предполагает, что это явление должно в достаточной мере проявляться при содержании поверхностно-активного вещества, необходимого для заполнения адсорбционного монослоя границы раздела, т. е. при очень низких концентрациях. В нашем случае, по данным изотермы адсорбции ПЭО-1500 в модельной системе [1], содержание ПЭО-1500 в растворе, при котором должен проявиться эффект снижения прочности мембран эритроцитов, должно быть 0,05—0,1 %. Экспериментальная проверка этого предположения осуществлена в третьей серии опытов.

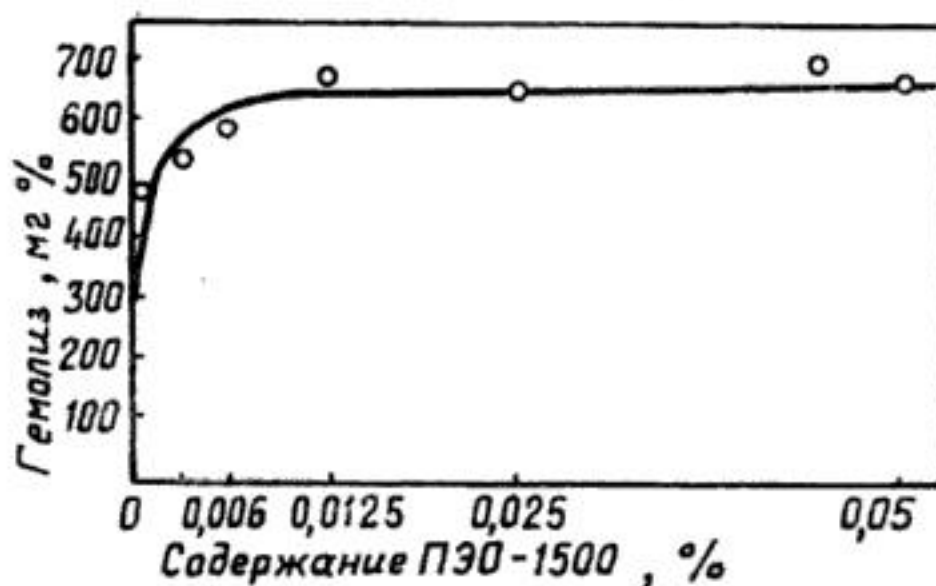
Содержание ПЭО-1500 в суспензии эритроцитов варьировалось в пределах 0—0,05 %, охлаждение с льдообразованием доводилось до температуры $-12,5^{\circ}\text{C}$. Характер полученной зависимости (рисунок) действительно подтверждает, что основное снижение прочности мембран эритроцитов происходит при весьма малом содержании ПЭО-1500, порядка 0,005 %. Это и однотипность полученной зависимости с изотермой адсорбции ПЭО-1500 на границе раздела «вода — гептан» являются веским доказательством предло-

женного нами механизма разрушающего действия ПЭО-1500 на биомембраны.

Итак, результат действия криопротектора, обладающего поверхностной активностью на поверхности биомембраны, может быть двояким. В присутствии значительных осмотических и механических нагрузок на мембрану, не приводящих к образованию в ней микротрещин, адсорбционный слой криопротектора упрочняет мембрану. При значительных механических нагрузках появляется и преобладает механизм адсорбционного понижения ее прочности. Это весьма нежелательно и может быть серьезным препятствием при использовании поверхностно-активных криопротекторов в практике. Поэтому важен выбор условий, снижающих или предотвращающих эффект понижения прочности биомембраны криопротекторами. Предположительно это можно осуществить следующим образом.

1. Предотвращением образования микротрещин на мембране путем снижения деформирующих нагрузок на нее при криоконсервировании.

2. Замедлением диффузии молекул поверхностно-активного криопротектора в микротрещины биомембраны. Достичь этого можно уменьшением времени контакта, в том числе и за счет повышения скорости замораживания — отогрева, снижением температуры экспозиции, повышением вязкости среды. Одним из возможных способов этого может быть присутствие в криозащитной среде небольшого количества (0,2—0,5 %) более поверхностно-активного вещества с большим размером молекул, не способных проникать в микротрещины, например ПЭО с молекулярной массой 20000.



Зависимость степени гемолиза эритроцитов как меры прочности их мембран от содержания ПЭО-1500

3. Отмывание биообъекта от поверхностно-активного криопротектора после его деконсервирования. Перспективность этого способа мала, так как он исключает возможность безотмывочного варианта и трудоемок в реализации. Так, чтобы удалить ПЭО-1500 с поверхности мембраны эритроцитов до допустимой величины, необходимо достичь содержания его в суспензии 0,001 %. При начальной концентрации ПЭО-1500 в криоконсерванте 10 % и отмывании разбавлением порциями 1 : 1 необходимо провести 13—14 отмывающих операций. С учетом свойства ПЭО-1500 хорошо растворяться в неполярных средах ($KP = 3,5$) процесс отмывки может оказаться еще более трудоемким, так как растворенный в биомембране ПЭО-1500 будет служить резервом для поступления в адсорбционный слой.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Новиков А. Н., Липина О. В., Олейник С. Т. Адсорбционная активность этиленгликоля и криопротекторов ряда ПЭО // Криобиология и криомедицина. — 1983. — Вып. 13. — С. 39—42.
2. Ребиндер П. А., Шрейнер Л. А., Жигач К. Ф. Понижители твердости при бурении. — М.: АН СССР, 1944. — 87 с.

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

Поступила 24.10.88

THE INFLUENCE OF THE CRYOPROTECTANT SURFACE ACTIVITY ON THE BIOLOGICAL SYSTEMS SUBJECT TO CRYOPRESERVATION

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

The effect of cryoprotectant PEO-1500 on human erythrocyte membranes treated by different temperatures was studied. Strengthening of erythrocyte membranes not treated by cold or cooled without nucleation has been found in the presence of PEO-1500.

КРИОМЕДИЦИНА

УДК 616—006.6—092.9—085.832.9

*Л. П. Киндзельский, Л. Л. Злочевская, В. Д. Захарычев,
Т. В. Цыганок*

ВЛИЯНИЕ КРИОХИРУРГИЧЕСКОГО МЕТОДА ЛЕЧЕНИЯ НА ЕСТЕСТВЕННУЮ КИЛЛЕРНУЮ АКТИВНОСТЬ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО

Получены данные о стимулирующем действии криодеструкции опухоли с последующим спонтанным ее оттаиванием на естественную киллерную активность больных. Введение иммуномодулятора продигиозана повышает естественную резистентность организма как у больных с оперативным вмешательством, так и больных, получавших комбинированное лечение с субоперационным криовоздействием.

Известно, что криохирургический метод лечения злокачественных опухолей вызывает нарушение иммунобиологических реакций в организме [1, 4, 6]. В настоящее время большое значение приобретает изучение клеточного иммунитета и механизмов естественной противоопухолевой защиты. Среди опухолевых реакций большой интерес представляет феномен лизиса опухолевых клеток естественными киллерными клетками (ЕКК) [7]. Наиболее полно функциональные нарушения ЕКК могут быть охарактеризованы при использовании известного теста на цитотоксичность [5]. Поэтому исследование естественной киллерной активности (ЕКА) может быть использовано для оценки состояния естественной резистентности организма больных раком легкого после комбинированного лечения с использованием субоперационного криовоздействия. Вместе с тем показано [8], что активность ЕКК в значительной мере зависит от синтеза и содержания в организме интерферона. В настоящей работе рассматривалась возможность усиления активности ЕКК при помощи продигиозана, препарата, усиливающего образование эндогенного интерферона.

Исследование проведено у 20 практически здоровых людей (первичных доноров Киевской городской станции переливания крови — контрольная группа); первую группу составили больные с доброкачественным процессом в легких, подвергшиеся хирургическому лечению ($n = 10$); вторую — больные бронхолегочным раком, которым проводилось только хирургическое лечение ($n = 15$); третью — раковые больные, которым кроме оперативного вмешательства вводили продигиозан ($n = 10$); четвертую — больные бронхолегочным раком, получавшие комбинированное лечение с субоперационным криовоздействием ($n = 12$); пятую группу — больные, которые получали точно такое же лечение, как и вышеуказанная группа, но с введением продигиозана ($n = 10$). Продигиозан вводили внутримышечно в дозе 50 мкг на 1 кг массы тела больного 4 раза с 4-го дня после операции и с промежутками 3 дня. Возраст больных составлял 42—70 лет.

Для определения естественной цитотоксичности мононуклеаров периферической крови применяли радиометрический метод [1]. Мононуклеары получали из венозной гепаринизированной крови в стандартном (1,076—1,078) градиенте плотности фиколл-ферографина, трижды отмывали физиологическим раствором с помощью центрифугирования в течение 5 мин при 1,5 тыс. об/мин, суспендировали в среде 199 с добавлением 10 %-ной инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, подсчитывали в камере Горяева. При постановке реакции соотношение эффектор — мишень составило 25 : 1 (соответственно $5 \cdot 10^5$ и $2 \cdot 10^4$ клеток). В качестве клеток-мишеней использовали клеточную культуру K-562, которую культивировали в среде RPMI — 1640 с добавлением 10 %-ной инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки; $2 \cdot 10^4$ этих клеток метили ^{51}Cr (1,85МБк) в течение 4 ч при 37 °С, трижды отмывали с помощью центрифугирования в большом объеме среды (по 5 мин) при 1 тыс. об/мин, ресуспендировали в среде RPMI-1640 с 10 %-ной инактивированной эмбриональной сывороткой. Реакцию ставили в 96-луночных планшетах. Культивирование продолжалось на протяжении 14—16 ч при 37 °С в атмосфере, содержащей 5 % CO_2 . Радиоактивность надосадочной жидкости определяли на гамма-счетчике «SEAPLE 1175 R». Процент ЕКА рассчитывали по формуле:

$$\text{Процент ЕКА} = \frac{\text{Опыт (ЕКА) лизиса} - \text{контроль спонтанного лизиса}}{\text{Максимальный лизис} - \text{контроль спонтанного лизиса}} \times 100.$$

Учет спонтанного лизиса мишеневых клеток производили в пробах, в которые кроме мишеневых клеток вносили 0,15 мл культуральной среды; для получения максимального лизиса использовали 3 %-ный раствор ЭДТА. Все пробы осуществлялись в триплетах. Результаты обрабатывали статистически, используя критерий Стьюдента.

Криодеструкцию опухоли осуществляли после торакотомии с помощью криохирургической установки «Криоэлектроника-2». Диаметр и форма аппликаторов соответствовали размеру опухоли. Криовоздействие производили больным с периферической (морфологически верифицированной) формой рака (опухоль 2,5—10 см в диаметре). Использовали повторные циклы замораживания — оттаивания. Оптимальное время одного цикла замораживания составляло 5—8 мин после достижения температуры $-170 \div -180$ °С на шкале прибора установки. Оттаивание было спонтанным.

В таблице представлены результаты изучения ЕКА у доноров и больных легочными заболеваниями в динамике. У группы доноров активность ЕК равнялась ($20,6 \pm 1,7$) %. ЕКА у больных с доброкачественным или злокачественным процессами при поступлении была различной. Так, у группы больных с доброкачественным процессом ЕКА хотя и была значительно ниже этих показателей у группы доноров, но все же была выше в среднем на 35 % изучаемых показателей всех групп больных со злокачественным процессом. ЕКА у групп раковых больных не зависела от стадии процесса.

ЕКА периферической крови у больных легочными заболеваниями в динамике

Группа больных	Количество больных	При поступлении	Непосредственно перед операцией	1—2 сут после операции	13—14 сут после операции
		ЕКА (% от максимального лизиса)	ЕКА (% от максимального лизиса)	ЕКА (% от максимального лизиса)	ЕКА (% от максимального лизиса)
1	10	$6,6 \pm 0,7^*$	$11,5 \pm 3,1^*$	$2,3 \pm 3,1^*$	$6,4 \pm 2,1^*$
2	15	$4,1 \pm 0,6^*$	$10,8 \pm 1,0^*$	$3,9 \pm 1,0^*$	$2,3 \pm 0,4^*$
3	10	$4,9 \pm 1,1^*$	$12,9 \pm 2,1^*$	$1,5 \pm 0,5^*$	$6,8 \pm 1,6^*$
4	12	$3,6 \pm 1,2^*$	$12,8 \pm 2,0^*$	$2,5 \pm 0,8^*$	$10,4 \pm 2,0^*$
5	10	$4,3 \pm 1,0^*$	$12,7 \pm 1,1^*$	$3,9 \pm 1,0^*$	$13,8 \pm 1,4^*$

$p^* < 0,05$ по отношению к группе доноров; $p^* < 0,05$ по отношению к группе больных с доброкачественным процессом.

Активность ЕКА непосредственно перед операцией во всех группах была значительно выше активности у больных при поступлении, но ниже активности группы доноров. Активность ЕК в 1-й исследуемой группе была на 43 % выше активности при поступлении; во 2-й группе на 62 % активности при поступлении; в 3-й группе также была выше на 62%; в 4-й на 72 %; в 5-й группе выше на 66 %.

Возможно, что в период умеренного эмоционального стресса активизируются антиоксидантные факторы, которые снижают стрессорное действие на организм и тем самым способствуют нормализации и даже активации его защитных сил [2]. По данным Г. Т. Сухих, Ф. З. Меерсон [3], короткое стрессовое воздействие активизирует систему ЕКК.

На 1—2-е сутки после операции во всех исследуемых группах ЕКА была очень низкой и в 1—5 группах соответственно составляла $(2,3 \pm \pm 0,7) \%$, $(3,9 \pm 1) \%$, $(1,5 \pm 0,5) \%$, $(2,5 \pm 0,8) \%$, $(3,9 \pm 1,0) \%$. Полученные данные коррелируют с данными ряда авторов [9, 10] о резком снижении активности ЕКК после оперативного вмешательства.

Различные данные были получены при исследовании больных на 13—14-е сутки после лечения. Так, в группе больных, которым проводилось только оперативное лечение, активность ЕК была низкой и равнялась $(2,3 \pm \pm 0,4) \%$, у группы оперированных больных и принимавших продигозан она увеличивалась до $(6,8 \pm 1,6) \%$ и была на уровне показателей больных с доброкачественным процессом. У 4-й и 5-й групп больных ЕКА была относительно высокой, хотя и достоверно ниже показателей групп доноров, и соответственно равнялась $(10,4 \pm 2,0) \%$, $(13,8 \pm 1,4) \%$.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о стимулирующем действии криодеструкции опухоли с последующим спонтанным ее оттаиванием на естественную киллерную активность больных. Введение иммуномодулятора продигозана повышает естественную резистентность организма как у больных с оперативным вмешательством, так и больных, получавших комбинированное лечение с субоперационным криовоздействием.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зарецкая Ю. М. Клиническая иммуногенетика.— М.: Медицина, 1983.— 208 с.
2. Меерсон Ф. З. Адаптация, стресс и профилактика.— М.: Наука, 1981.— 278 с.
3. Сухих Г. Т., Меерсон Ф. З. Подавление активности нормальных киллеров при эмоционально-болевым стрессе и устранение этого явления индуктором интерферона.— Бюл. эксперим. биологии и медицины.— 1983.— № 11.— С. 84—86.
4. Ablin R. J., Foutana G. I., Holpap B. Cryoimmunotherapy: a conference report // J. Nat. Cancer Inst.— 1981.— 67, N 5.— P. 1173—1176.
5. Beron M., Hansson M., Kiessling R. Human natural killer cells inhibit clonogenic growth of fresh leukemic cell // Blood.— 1983.— 61, N 3.— P. 596—599.
6. Gursel E., Roberts M., Veeneman R. I. Regression of prostatic cancer following sequential cryotherapy to the prostata // J. Urol.— 1972.— 108.— P. 928—932.
7. Herberman R. B. Natural killer cells and tumor immunity // Year Immunol.— 1986.— 186, N 2.— P. 254—260.
8. Kuma gai Katsuo, Suzuki Ryuji et al. Interleukin-2-induced differentiation of natural killer cells to activated killer cells // Natural Immun. Cancer and Biol Response Modif. 1st Int; Symp., Honolulu.— 1985, Nov. 10—12.— Basel e. a.— 1986.— P. 131—142.
9. Pollock R. E., Lotzova E., Stanford S. D., Romsdahl M. N. Effect of surgical stress on murine natural killer cell cytotoxicity // J. Immunol.— 1987.— 138, N 1.— P. 171.
10. Wing M. G., Goepel J. R., Jacob G., Rogers K. Comparison of excision versus cryosurgery of an HSV-2-induced fibrosarcoma // Cancer Immunol. Immunother.— 1988.— 26, N 1.— P. 161—168.

Киевский НИИ онкологии МЗ УССР;
Киевский гос. ин-т усовершенствования
врачей МЗ СССР

Поступила 16.10.89

**L. P. KINDZELSKY, L. L. ZLOCHEVSKAYA, V. D. ZAKHARYCHEV,
T. V. TSYGANOK**

THE EFFECT OF CRYOSURGERY ON THE NATURAL KILLER ACTIVITY OF PATIENTS WITH PULMONARY CANCER

**Research Institute for Oncology of Kiev; State Institute for Doctors's
Advancement of Kiev**

The data on the stimulating action of tumor cryodestruction with further thawing on the natural killer activity of the patients have been obtained. The administration of immunomodulator prodigiozan increased the natural resistivity of patients subject to surgery and those receiving a combined therapy with a suboperative cryoapplication.

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 616.61/63—002.5—089; 57.043

Ю. И. Козин

РЕЗУЛЬТАТЫ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИХ И ЭЛЕКТРОННОМИКРОСКОПИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ЗОНЫ КРИОТЕРМОДЕСТРУКЦИИ ПРИ САНАЦИИ ИНКАПСУЛИРОВАННЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ ОБРАЗОВАНИЙ В ПОЧКАХ

Повышение в последние годы заболеваемости и смертности от внелегочных форм туберкулеза и рост удельного веса патологии, не поддающейся эффективной хирургической и терапевтической санации, распространение фиброзно-кавернозных форм нефротуберкулеза потребовали поиска новых методов гарантированного абациллирования кавернозных образований в почках [1, 3, 4].

Лабораторно-бактериологическое изучение 789 суспензий микобактерий туберкулеза (МБТ), подвергнутых замораживанию и отогреву при разных скоростях, температурах и экспозициях воздействия выявило возможность их гарантированного разрушения при соблюдении определенных параметров воздействия [2]. Это явилось основанием для перехода к модельному эксперименту на животных.

Экспериментальная модель кавернозного нефротуберкулеза создана нами на одной из почек у 141 беспородной собаки по разработанному способу [5]. Для бактериологического контроля мочи на стороне заражения мочеточник интубировался и через контраппертуру выводился на кожу. Абациллирование за счет внутрикавернозного орошения остатков некротических масс и стенок парожидкостными струями хладагентов (азотом, закисью азота и фреоном-12) выполнено у 78 животных и путем криотермоаппликационного воздействия с помощью аппаратуры, разработанной ФТИНТ АН УССР, еще у 42 животных.

Бактериологический контроль проводился до и после криотермовоздействия и в ходе трех-четырехмесячного послеоперационного наблюдения при эвтаназии животных. Посевы мочи и гомогенатов почечной ткани из очагов специфического воспаления, подвергнутых криотермоабациллированию, проводились одновременно на три питательные среды: Левенштейна — Йенсена, Финн-11 и Огава.

Эффективность абациллирования зависела от способа и методики воздействия. Криоорошение парожидкостными струями азота одно- и двукратно с экспозициями 60 с (16 случаев) и 120 с (8 случаев) с помощью аппарата КАС-01-V.1.2 приводило к абациллированию очагов лишь в 41,7 % случаев. При сочетании туберкулиотерапии (0,3 ТЕ/кг подкожно один раз в 3 дня) с предваряющим криовоздействием орошением стенок остаточной полости 10 %-ным раствором натрия хлорида [6]. Эффективность санации повышалась при последующем воздействии парожидкостными струями фреона-12 и закиси азота до 54,2 % и при орошении азотом до 72,2 %. Использование у 22 животных после криоорошения азотом принудительного нагрева тканей струей горячего воздуха ($T = 44 \pm 1^\circ\text{C}$) [7] позволило достигнуть гарантированного абациллирования

в 90,9 % случаев. При аппликационном криотермоабациллинировании с помощью криодиатермозонда к аппарату КАС-01—V.4.2 и работающего в автоматическом режиме аппарата для локальной криотермодеструкции урологического (АЛКУ-01) положительные результаты получены соответственно в 84,6 и 93,1 % случаев.

Электронно-микроскопическое исследование клеточных гомогенатов из 16 внутрипочечных инфекционно-объемных образований (каверн) после внутрикавернозного криотермовоздействия на них, позволило уточнить степень ультраструктурных нарушений в клетках МБТ, обильно содержащихся в казеозно-некротических тканях. Ткань, полученная путем соскоба из центра и периферии казеозно-некротических масс, фиксировали в 2,5 %-ном глутаральдегиде, а затем в четырехокиси осмия по общепринятым методикам и заливали в смесь эпон + аралдит. Ультратонкие срезы готовили на ультрамикротоме УМТП-4, контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца по Рейнольдсу. Препараты просматривали и фотографировали МБТ на электронном микроскопе ЭМВ-100В при ускоряющем напряжении 75 кВ.

После циклов крио- и термовоздействия, как правило, происходили значительные изменения ультраструктуры МБТ, которые зависели от примененной методики. При использовании у 4-х собак перед циклами криоорошения каверн туберкулинотерапии и орошения стенок остаточных полостей 10 %-ным раствором натрия хлорида микобактериальные клетки имели деформированную фестончатую клеточную стенку с выпячиваниями. Цитоплазма имела зоны уплотнения, чередующиеся с зонами разрежения в виде пустотелых ячеек с размерами около 0,03—0,04 мм. При принудительном отогреве ($T = 44 \pm 1^\circ\text{C}$) и повторном термоциклировании «замораживание — нагрев» еще у 4-х животных электронномикроскопически бактериальные клетки становились более плотными, сморщенными с деформированной складчатой клеточной стенкой. Внутри клеток возникали перегородки, ограничивающие многочисленные разнокалиберные полости с размерами от 0,06 до 0,1 мм с глубокими фракционными гребнями. Цитоплазма между ними непрозрачная, плотная и темная.

После аппликационного криотермовоздействия криодиатермозондом-насадкой к аппарату КАС-01—V.4.2 у 4-х собак ультраструктурные изменения МБТ характеризовались гранулированностью цитоплазмы с множественными большими полостями в ней (ячейки размерами более 0,1 мм). Клеточная стенка и цитоплазматическая мембрана деформированы с зонами набухания и лизиса. Наиболее резкая деструкция бактериальных клеток отмечена после применения у 4-х животных криотермоциклирования аппаратом АЛКУ-01. Микрокапсула и трехслойная клеточная стенка теряли свою целостность. Цитоплазматическая мембрана местами лизировалась. Цитоплазма — с выраженной вакуолизацией или полным ее лизисом с органоидами. Разрушение бактериальных клеток происходило по типу фрагментации.

Результаты бактериологических исследований и установленное при электронной микроскопии выраженное разрушение структурных элементов МБТ показали эффективность предлагаемых способов криотермоабациллинирования кавернозных форм нефротуберкулеза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Камышан И. С., Погребинский В. М. Туберкулез мочевых органов. — Киев: Здоров'я, 1987. — 184 с.
2. Козин Ю. И. Криотермовоздействие на инкапсулированные инфекционно-воспалительные образования почек. Бактериологическое исследование. — Харьков, 1989. — 48 с. (Препринт / ФТИНТ АН УССР; 21—89).
3. Оперативная урология (Руководство) / Под ред. Н. А. Лопаткина, И. П. Шевцова. — М.: Медицина, 1986. — С. 81—86.
4. Струков А. И., Соловьев И. П. Морфология туберкулеза в современных условиях. — 2-е изд. — М.: Медицина, 1986. — 232 с.
5. А. с. 1443019 СССР, МКИ⁴ G 09 B 23/28. Способ моделирования деструктивного туберкулеза почек / Ю. И. Козин. — Оpubл. 7.12.88, Бюл. № 45.
6. А. с. 1516099 СССР, МКИ⁴ A 61 B 17/36. Способ хирургического лечения объемных инкапсулированных образований / Ю. И. Козин, Т. Н. Юрченко, В. Ф. Козлова, Л. Ю. Дмитриева. — Оpubл. 23.10.89, Бюл. № 39.
7. А. с. 1447355 СССР, МКИ⁴ A 61 B 17/00. Способ лечения инфекционных полостных образований почек / Ю. И. Козин. — Оpubл. 30.12.88, Бюл. № 48.

Харьковский мед. ин-т МЗ УССР

Поступила 28.01.90

ХРОНИКА

МЕЖДУНАРОДНОЕ ЗАСЕДАНИЕ ПО КРИОБИОЛОГИИ

Центр исследований по криогенике Калькутского университета (Индия) провел Международное заседание по криобиологии с 26 июня по 12 июля 1990 г. под эгидой ЮНЕСКО и Индийского Совета по криогенике. На заседании рассмотрены теоретические проблемы истории развития криогеники, криобиологии, процессов равновесной и неравновесной термодинамики, структуры и функции биологических объектов. Обсуждались проблемы тепломассопереноса и основные принципы криоконсервации биоматериалов, используемых в сельском хозяйстве, пищевой промышленности и при разведении животных. Большое внимание уделено вопросам трансплантации, криоконсервации и создания банка органов, клеток и тканевых культур, забора и хранения тканей доноров, трупов и животных для применения в медицинской практике. Рассмотрены перспективы проведения экспериментальных исследований в аспекте молекулярной биологии, изучения влияния низких температур на биологические мембраны. Сделаны доклады по новым разработкам в области криогенной техники. Всего прочитано 34 лекции ведущими специалистами из различных институтов и университетов Индии и других стран. Заседание было организовано проф. П. Сенгуптой, главным координатором по проведению криобиологических исследований.

ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИИ

В специализированном совете при Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР защищены диссертации на соискание степени кандидата биологических наук. С. Е. Гальченко в работе «Особенности криоконсервирования биологических объектов с применением больших скоростей охлаждения» показал, что использование в качестве твердых теплопроводников порошков металлов, оксидов металлов, их сплавов и смесей позволяет управлять скоростью охлаждения биологического материала при замораживании его с большими скоростями охлаждения. Экспериментальным путем установлено, что одним из основных повреждающих факторов при замораживании биологических объектов с большими скоростями охлаждения может быть разность осмотических давлений вне и внутри клетки, возникающая из-за резкого роста концентраций солей во внеклеточной среде, что происходит при быстром вымораживании внеклеточной воды.

В работе С. В. Репиной «Особенности термoinдуцированных структурных перестроек мембран эритроцитов гомойотермного и гетеротермного организмов» было установлено, что нарушение цитоскелетной системы эритроцитов человека повышает чувствительность мембранной структуры к действию низких температур. При изучении особенностей термoinдуцированных перестроек компонентов мембран и цитозоля эритроцитов зимоспящего суслика показано, что переход животного из состояния гибернации к бодрствованию сопровождается структурными модификациями клеточных компонентов, в частности, изменением текучести липидного бислоя, конформации мембранных белков, морфологии мембранной поверхности, микровязкости цитозоля. В основе структурных модификаций могут лежать изменения взаимодействия интегральных компонентов с элементами мембранного скелета.

НЕ ЗАБУДЬТЕ
оформить подписку на журнал
«ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ»

Замечания, пожелания, предложения об улучшении издания присылайте по адресу:

310015 Харьков, 15,
ул. Переяславская, 23
Институт проблем криобиологии и криомедицины
АН УССР, редакция

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

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

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

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

Our journal Problemy Kriobiologii (PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY) formerly KRIOBIOLOGIYA (CRYOBIOLOGY) is published by Naukova Dumka Publ. Co. in Russian with abstracts in English. The journal provides basic information to researchers investigating the various phenomena involved in the interaction between low temperatures and living cells or tissue, as well as to clinicians who are undertaking trials of hypothermia. Particular emphasis is laid upon ongoing research on topics which are of utmost importance with regard to preservation of cells, tissues and organs, cell damage caused by freezing, cold acclimation and hardiness in plants, mechanisms of cold survival in animals and microorganisms. The journal draws from diverse related disciplines such as morphology, physiology, genetic molecular biology, pathology, biochemistry, immunology, pharmacology and pharmaceuticals, low temperature techniques and equipment.