КРИОБИОЛОГИЯ И КРИОМЕДИЦИНА

ISSN 0130—2663

11

1983

Матеріал, захищений авторським правом

Матеріал захищений авторським правом

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ И КРИОМЕДИЦИНЫ

КРИОБИОЛОГИЯ И КРИОМЕДИЦИНА

РЕСПУБЛИКАНСКИЙ МЕЖВЕДОМСТВЕННЫЙ СБОРНИК

Основан в 1975 г.

ВЫПУСК
11

КИЕВ НАУКОВА ДУМКА 1983

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043

В сборнике приведены статьи, посвященные различным вопросам криобиологии и криомедицины, действию физических факторов на клетки крови и костного мозга, свойствам криопротекторов, а также обзорные статьи по изучению механизмов лабилизации лизосом при замораживании—оттаивании. Освещены вопросы по низкотемпературному консервированию и трансплантации щитовидной железы с привлечением клинических наблюдений. Представлены данные по структуре и функции миокарда при экспериментальном инфаркте и краниоцеребральной гипотермии.

Для биологов и медиков, занятых в области криобиологии и криомедицины.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

Редакция межведомственных сборников

КРИОБИОЛОГИЯ И КРИОМЕДИЦИНА

Выпуск 11

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

Редактор *А. Н. Шадрина*. Художественный редактор *В. И. Мелашенко*. Технический редактор *С. Г. Максимова*. Корректоры *Е. А. Михалец, Р. С. Коган*

Информ. бланк № 3700.

Сдано в набор 02. 02. 82. Подп. в печ. 10. 03. 83. БФ 01655. Формат 70×108/16. Бум. тип. № 1. Лит. гарн. Выс. печ. Усл. печ. л. 8,4. Усл. кр.-отт. 8,93. Уч.-изд. л. 8,09. Тираж 1000 экз. Заказ 3177. Цена 1 р. 20 коп.

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

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

К $\frac{4106000000\text{-}154}{M221(04)\text{-}83}$ 462-82

© Издательство «Наукова думка», 1983

Матеріал, захищений авторським правом

I. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

УДК 57.043.576.311.34.591.044.3

В. И. Луговой, Л. П. Кравченко

МЕХАНИЗМЫ ЛАБИЛИЗАЦИИ ЛИЗОСОМ ПРИ ЗАМОРАЖИВАНИИ—ОТТАИВАНИИ

Многочисленными экспериментальными исследованиями установлено, что замораживание — оттаивание, которому подвергаются клеточные суспензии, ткани и органы в процессе низкотемпературного консервирования, вызывает значительные нарушения структурно-функциональных свойств различных биологических мембран и связанных с ними ферментов и ферментных комплексов [16, 26, 62].

Значимость этих нарушений в общем механизме криоповреждений клетки очевидна, поскольку именно целостность и функциональная надежность мембранных образований и ферментных систем прежде всего определяют устойчивость и способность к репарации клетки в условиях воздействия на нее различных повреждающих факторов, в том числе низких температур.

Существенную роль в этих процессах играют лизосомы, дестабилизация которых при замораживании — оттаивании сопровождается выходом в окружающую среду высокоактивных гидролитических ферментов, способных оказывать разрушающее воздействие на многие клеточные компоненты. Поэтому в криобиологическом плане обоснованным с теоретической и практической точек зрения является изучение конкретных механизмов криоповреждения лизосомальных мембран и поиски возможных подходов к их стабилизации при криоконсервировании биологического материала.

В данной статье систематизированы имеющиеся к настоящему времени литературные сведения и собственные исследования по данной проблеме.

Краткая характеристика структурно-функциональных свойств лизосом. Достаточно обобщающее и в то же время информативное, на наш взгляд, представление об основных морфологических свойствах и физиологических функциях лизосом дано в одном из обзоров, посвященных изучению структуры и функции этих органелл: «Лизосомы представляют собой сложную, в высшей степени гетерогенную популяцию цитоплазматических структур, имеющих на первый взгляд сравнительно простое, напоминающее ваокуоль строение и образующих ваокулярный аппарат клетки. С позиций настоящего времени полиморфизм лизосом легко объясняется функциональной предназначенностью этих структур — выполнением функции своеобразной пищеварительной системы, отличительными чертами которой является дискретный характер, постоянная изменчивость в процессе жизнедеятельности свойств ее компонентов и их «непрерывное взаимодействие» [10].

Показано также, что кроме функции внутриклеточного пищеварения лизосомы участвуют в таких важных физиологических процессах, как пиноцитоз, фагоцитоз, процессы переноса веществ через клетку, секреции белков-ферментов, конъюгации половых клеток, делении, дифференцировке и старении клеток [9, 10, 27, 29, 79].

Матеріал, захищений авторським правом

Характерным для лизосом является высокое содержание в них гидролитических ферментов [18]. Лизосомы окружены липопротеиновой мембраной, препятствующей доступ находящихся снаружи субстратов к заключенным внутри органелл ферментам, которые, таким образом, находятся в латентном состоянии [29]. Согласно мнению де Дюва [29], гидролитические ферменты изолированных лизосом проявляют свою активность только при повреждении их мембран каким-либо воздействием. Показано, что такими повреждающими факторами могут быть замораживание [29, 75], механическое разрушение [63], гипотонический шок [45], тепловая лабилизация [24], действие детергентов [7], влияние органических растворителей, облучение, перекисное окисление липидов [1, 2, 25].

Вопреки мнению де Дюва о том, что внутри лизосом ферменты находятся в активном состоянии и лишь мембрана предохраняет цитоплазму клетки от их разрушающего действия, Коенджи и Джибрил [46] предложили другую модель латентности лизосомальных гидролаз, которая предполагает химическую природу этого явления. Эти авторы считают, что в составе лизосом основные аминогруппы гидролаз соединены ионными связями с кислыми группами липопротеинового матрикса. Таким образом, кислые липопротеины матрикса лизосом служат своего рода ингибиторами лизосомальных гидролаз. Активация лизосомальных ферментов при крайних значениях pH обусловлена, очевидно, снижением ионизации анионных групп липопротеинового матрикса и соответственно катионных групп ферментов.

Предполагается, что мембрана лизосом может существовать в виде сплошной бимолекулярной оболочки, состоящей из двух слоев фосфолипидов со слоем адсорбированных на них протеинов, а также в виде глобулярных мицелл, которые представляют собой цепочку, состоящую из отдельных шаровидных комплексов молекул фосфолипидов, чередующихся с глобулярными молекулами белка. Между мицеллярным и бимолекулярным состоянием мембран лизосом существует динамическое равновесие, которое сдвигается в ту или иную сторону в зависимости от состояния внутриклеточной среды [52].

Проводилось много исследований по изучению характера и уровня структурно-метаболических нарушений, вызванных активацией лизосомальных гидролаз после выхода их в цитоплазму клетки [10, 29, 73, 75]. Было показано, что митохондрии подвергаются ступенчатому разрушению под действием лизосомальных гидролаз: вначале наблюдается набухание митохондрий, что вызывает разобщение дыхания и окислительного фосфорилирования, а затем происходит дезорганизация их мембран с освобождением структурных белков и ферментов [75]. Необходимо отметить, что под действием лизосомальных гидролаз подобному разрушению подвергаются практически все мембранные структуры клетки и биомакромолекулы [75, 77, 79]. Так, в частности, под влиянием катепсинов могут полностью гидролизоваться белки клетки. Первоначально белок гидролизуется катепсинами Д и Е, а образовавшиеся в результате этого гидролиза пептиды в дальнейшем расщепляются катепсинами А и В, что приводит к появлению конечного продукта гидролиза — аминокислот [30, 35, 55]. Гидролиз нуклеиновых кислот клеток осуществляется кислыми рибонуклеазой и дезоксирибонуклеазой [17, 47], а фосфатазы катаболизируют многие важные фосфат-содержащие компоненты клеток, главным образом нуклеотидфосфаты [76]. Лизосомы содержат также полный набор необходимых ферментов для гидролиза липидов и гликолипидов, таких, как липаза триглицеридов, кислые фосфолипазы, сфинголипидгидролазы [33, 34, 76].

Лабилизация лизосомальных мембран при действии низких температур. Обладая однослойной липопротеиновой мембраной, с которой

Матеріал, захищений авторським правом

ассоциированы гидролитические ферменты, лизосомы в условиях замораживания могут резко менять свою проницаемость либо подвергаться механическому разрыву, в результате чего вышедшие внутрь клетки ферменты вступают во взаимодействие с основными ее компонентами [29, 61]. Латентность лизосомальных ферментов и увеличение их активности при замораживании — оттаивании органелл была впервые отмечена де Дювом с сотрудниками [29], а в дальнейшем более подробно изучена в лаборатории Таппеля [75]. После десятикратных циклов замораживания — оттаивания суспензии лизосом и последующего их разделения на мембранную и растворимую фракции наблюдалось освобождение ряда гидролаз в среду замораживания: арилсульфатазы и глюкуронидазы на 100%, РНК-азы — на 73%, кислой фосфатазы — на 55%. При контакте дышащих митохондрий с лизосомальными гидролазами отмечалось уменьшение поглощения кислорода и разобщение дыхания и окислительного фосфорилирования, а также появление выраженных ультраструктурных изменений мембран.

Изучая зависимость между уровнем активности кислой фосфатазы в среде замораживания и степенью клеточных повреждений клеток костного мозга в процессе криоконсервирования, Персидский и Эллет [67] обнаружили обратную корреляцию между свободной активностью фермента и уровнем дыхания клеток. Эти же авторы [66] установили, что замораживание клеток костного мозга до —196°С, сопровождавшееся нарушением мембран лизосом и выходом в среду замораживания кислых гидролаз, приводит к снижению функции белоксинтезирующего аппарата клеток.

В работе Дайяна и Рове [23] показано, что после быстрого замораживания тромбоцитов до —196°С происходит увеличение свободной активности кислой фосфатазы, β-глюкуронидазы, катепсинов. Из трех изученных ферментов β-глюкуронидаза оказалась наиболее чувствительным индикатором лизосомальных повреждений, обусловленных изменением осмотического окружения мембран.

В почке, по данным накопления парааминогиппурата и потребления кислорода, после ее гипотермической перфузии и хранения при низких температурах (+2°С), а также после замораживания при —40°С наблюдается значительное изменение указанных параметров при одновременном нарушении структурной целостности лизосом [48]. В последующей работе в подобных экспериментальных условиях автор наряду с определением функциональных показателей почки исследовал также уровень активности кислых рибонуклеазы и фосфатазы в ткани органа. При этом была выявлена непосредственная корреляция снижения жизнеспособности органа со степенью освобождения указанных ферментов из лизосом [49].

После замораживания — отогрева с различными скоростями клеток растений отмечено, что минимальные криоповреждения структур клетки происходят при быстрых скоростях охлаждения. При скорости оттаивания 150—180°С/мин наблюдается резкое увеличение активности кислой фосфатазы, что, по мнению авторов, свидетельствует о повреждении лизосомальных мембран [15].

Криохирургическое вмешательство на печени сопровождается значительным увеличением активности β-глюкуронидазы в сыворотке крови больных, что свидетельствует о криодеструкции лизосомальных мембран гепатоцитов [59].

Из приведенных литературных данных видно, что дестабилизация лизосомальных мембран является довольно ранним и чувствительным ответом на низкотемпературное воздействие, в связи с чем уровень активности лизосомальных ферментов может быть объективным показателем характера и глубины возникающих повреждений клеток при действии низких температур. Однако в этой литературе отсутствуют

Матеріал, захищений авторським правом

данные о непосредственной взаимосвязи обнаруживаемых нарушений лизосомальных мембран с конкретными факторами криоповреждения (концентрационными эффектами, явлениями кристаллизации и дегидратации и др.).

В связи с этим мы изучили стабильность изолированных лизосом в широком диапазоне температур (0 — —196°С) при медленном замораживании со скоростью 1—2°С/мин до температур —30, —70, —140, —196°С (рис. 1).

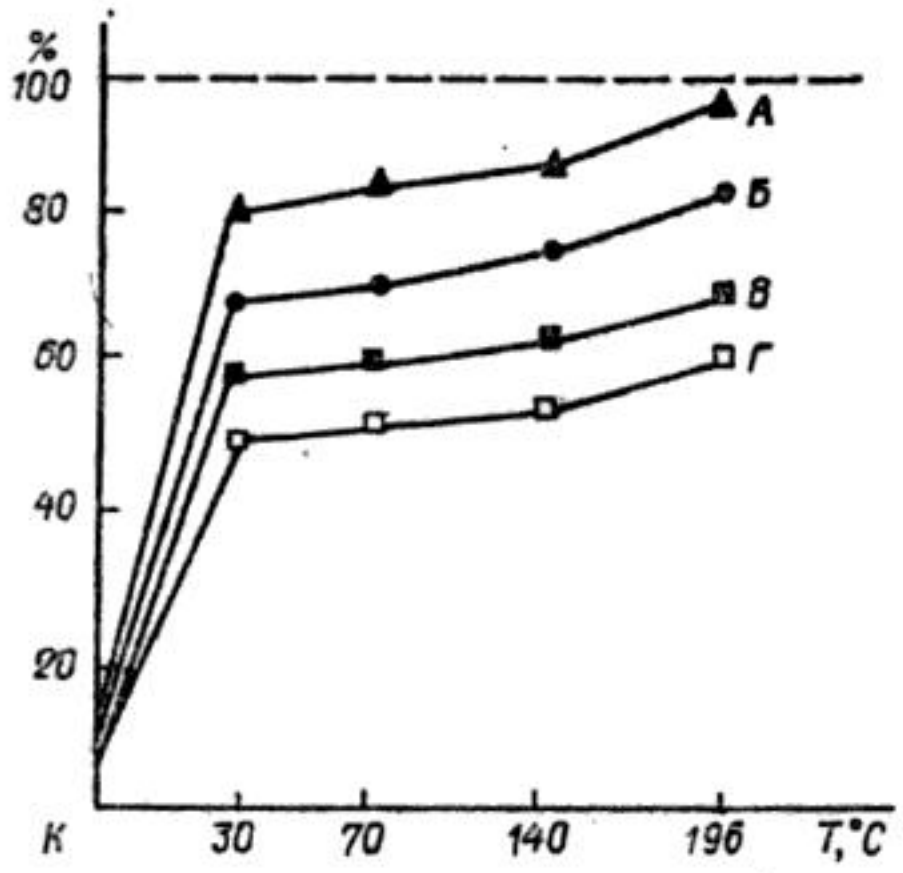


Рис. 1. Уровень неседиментируемой активности гидролитических ферментов при замораживании лизосом до различных температур:

А, Б, В, Г — кислые РНК-аза, ДНК-аза, катепсин Д, фосфатаза соответственно.

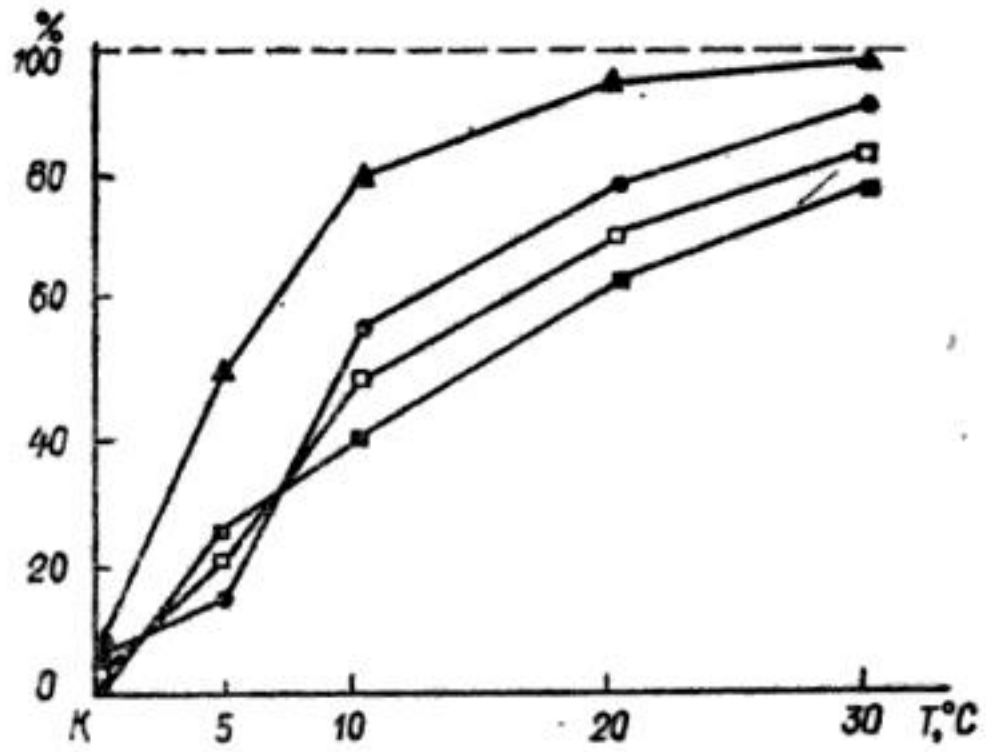


Рис. 2. Неседиментируемая активность кислых гидролаз на различных этапах медленного охлаждения лизосом до —30°С.

Установлено, что в диапазоне температур 0 — —30°С происходит наиболее значительная солюбилизация всех изучавшихся гидролаз. На последующих этапах замораживания до —70°С и —140°С не отмечалось дополнительного увеличения уровня неседиментируемой активности ферментов, а в диапазоне температур от —140 до —196°С вновь наблюдалось некоторое повышение уровня солюбилизации всех ферментов, более выраженное для кислой РНК-азы ($p<0{,}01$). При электронно-микроскопическом исследовании лизосом было видно, что в процессе медленного замораживания до —196°С наиболее значительные нарушения наблюдаются в диапазоне температур 0 — —30°С с последующим углублением этих повреждений в интервале от —140°С до —196°С. Эти изменения характеризовались увеличением объема органелл и просветлением их внутреннего содержимого. Наряду с разбухшими органеллами наблюдались везикулы с разрушенными мембранами.

Таким образом, при биохимическом и электронно-микроскопическом исследованиях было видно, что в процессе медленного замораживания лизосом до —196°С наиболее значительные нарушения наблюдаются в диапазоне от 0 до —30°С.

С целью детального выяснения механизма криоповреждения лизосом в наиболее повреждающем диапазоне температур было проведено исследование стабильности органелл при медленном охлаждении (0,3—0,5°С/мин) до различных температур в этом интервале: —5°С, —10, —21, —30°С (рис. 2).

Оказалось, что повышение уровня неседиментируемой активности всех изученных ферментов было пропорционально снижению температуры охлаждения. Наиболее выраженное увеличение уровня изученных гидролаз наблюдалось в период кристаллизации свободной воды

Матеріал, захищений авторським правом

и в точке эвтектики NaCl (—21°С). Обнаруженная динамика увеличения активности ферментов свидетельствует о том, что дестабилизация мембран лизосом зависит от кристаллизационных явлений, происходящих в среде. Согласно современным представлениям, основными факторами криоповреждения биологических структур в условиях медленных скоростей охлаждения являются увеличение концентрации электролитов и метаболитов в растворах вследствие вымораживания воды, явления дегидратации клеток и клеточных структур, осмотические эффекты [12, 32, 38, 50, 54].

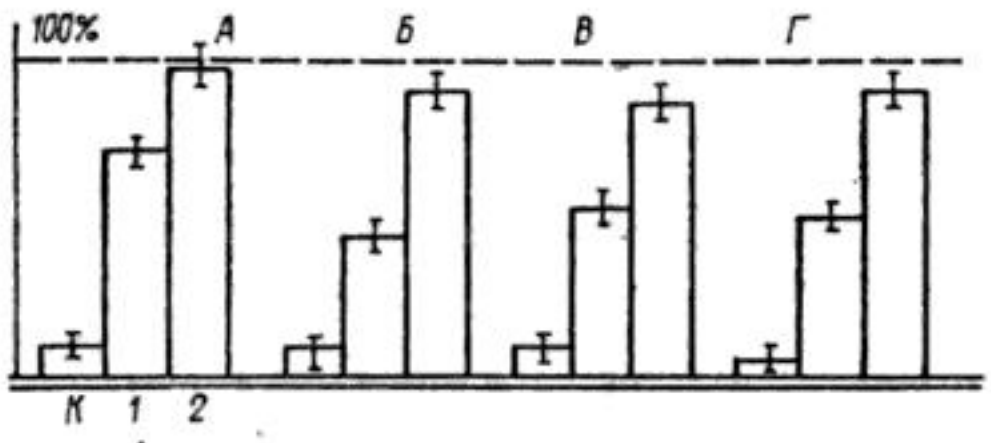


Рис. 3. Влияние скорости отогрева проб на уровень неседиментируемой активности кислых гидролаз в среде замораживания:

1 — быстрое замораживание — быстрое оттаивание; *2* — быстрое замораживание — медленное оттаивание.

Поскольку наблюдавшееся повышение уровня неседиментируемой активности гидролаз коррелировало с уменьшением объема жидкой фазы раствора в процессе замораживания и достигало максимальных величин в точке эвтектики NaCl, можно предполагать, что основными факторами повреждения, действующими на мембраны лизосом в интервале температур от 0 до —30°С, являются указанные физико-химические процессы, возникающие в среде при медленном замораживании суспензии лизосом. В то же время трудно определить, какой из факторов является ведущим в механизме криоповреждения мембран лизосом.

С целью уточнения роли концентрационных факторов в нарушении целостности мембран лизосом было изучено освобождение лизосомальных гидролаз в среду при использовании двух программ замораживания и отогрева проб. Эти программы отличались только скоростью отогрева проб (быстро — в водяной бане при +37°С и медленно — на воздухе при +18°С), тогда как замораживание в обоих случаях проводилось со скоростью 300—400°С/мин до —196°С. Таким образом, в подобной постановке опыта явления кристаллообразования были выражены в одинаковой мере, в то время как экспозиция лизосом в гипертоническом растворе NaCl была разной вследствие вариации скорости отогрева (рис. 3).

Как видно из представленных данных, при медленном отогреве проб уровень неседиментируемой активности всех изученных гидролаз был значительно выше, чем при быстром. Следует полагать, что в первом случае существенная роль в криоповреждении мембран лизосом принадлежит концентрационным эффектам NaCl, которые с наибольшей вероятностью могут проявляться при медленных скоростях отогрева суспензии лизосом.

Дополнительным доказательством повреждающего влияния гипертонических растворов солей, в частности NaCl, на лизосомы являются результаты исследования уровня неседиментируемой активности ферментов после часовой инкубации фракции изолированных органелл в гипертонических растворах. В опытах применялись такие концентрации NaCl, которые соответствуют условиям солевой среды на указанных выше этапах охлаждения суспензии лизосом до —30°С. Расчет концентрации растворов соли проводился на основании известных диаграмм плавления изотонических растворов хлористого натрия при температурах ниже 0°С [72].

Было установлено, что концентрации раствора NaCl, равной 2,6 М, было достаточно для того, чтобы вызвать значительное увеличение солюбилизации ферментов, кроме ДНК-азы, в среде замораживания. Возможно, что повреждающее действие концентрированных солевых

Матеріал, захищений авторським правом

растворов на мембрану лизосом обусловлено главным образом «хаотропным» влиянием анионов, в данном случае — хлорида. Хорошо известно, что повышение концентрации анионов оказывает существенное влияние на мембраны, лабилизируя липид-липидные и липид-белковые взаимодействия. При этом они увеличивают экстрактивность липидов и изменяют каталитическую активность мембраносвязанных белков-ферментов [37].

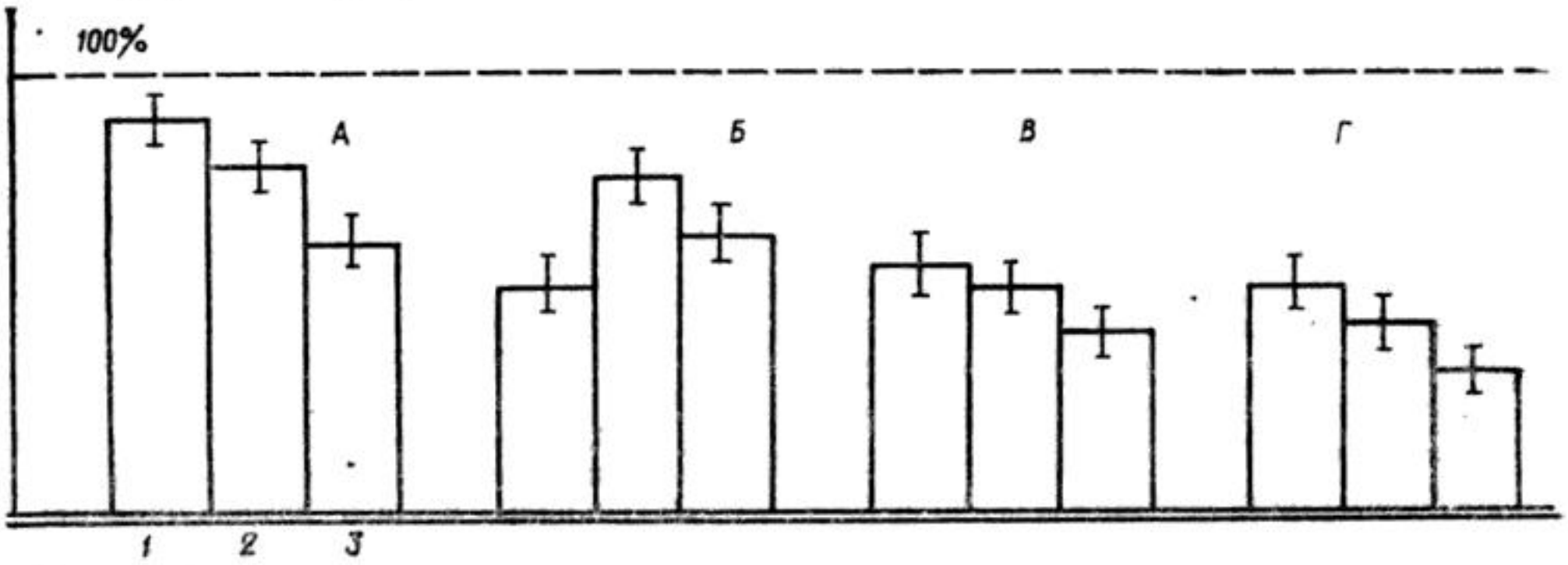


Рис. 4. Сравнительная характеристика уровня неседиментируемой активности кислых гидролаз лизосом печени крыс при двухэтапных и быстрой программах замораживания:
1 — быстрое замораживание — быстрое оттаивание; *2* — медленное замораживание до —21° С, затем быстрое — до —196° С. Оттаивание при +42° С; *3* — медленное замораживание до —10° С, затем быстрое до —196° С. Оттаивание при +42° С.

Таким образом, повышенные концентрации электролитов могут быть одной из причин повреждения лизосомальных мембран в условиях низкотемпературного воздействия, хотя при этом нельзя исключить из механизма криоповреждения и другие факторы, возникающие в процессе замораживания. Так, следует обратить внимание на то, что при использовании быстрых программ замораживания (см. рис. 3) уровень неседиментируемой активности гидролаз по сравнению с контролем был все же достаточно высоким. Подобное явление может быть результатом того, что быстрые и сверхбыстрые скорости охлаждения могут вызывать появление дополнительных факторов, оказывающих повреждающее действие на мембраны, например, процессов внутрилизосомальной кристаллизации и рекристаллизации [6, 68].

Важным условием уменьшения криоповреждения клеточных структур при низкотемпературной консервации органов и тканей является выбор оптимальной программы замораживания — отогрева, в результате которой сводились бы к минимуму неблагоприятные влияния кристаллов льда, концентрационных и осмотических градиентов, эффектов дегидратации и других факторов, возникающих в процессе глубокого охлаждения.

В настоящее время в практике низкотемпературной консервации различных клеток и тканей широкое применение нашли варианты двухэтапных программ замораживания, для которых характерно сочетание быстрых и медленных скоростей охлаждения [11]. При исследовании стабильности лизосом, охлажденных по двухэтапной программе, было обнаружено (рис. 4), что применение скорости охлаждения на первом этапе (до —21°С) 1—2°С/мин, а затем (до —196°С) — 300—400°С/мин не приводило к уменьшению уровня солюбилизации маркерных ферментов по сравнению с быстрой программой замораживания. По-видимому, при использовании указанной двухэтапной программы невозможно избежать повреждающего влияния эффектов гипертонических растворов и других факторов, дестабилизирующих мембраны в период медленного охлаждения на первом этапе замораживания. В связи с этим представлялось целесообразным изучить эффективность другой

Матеріал, захищений авторським правом

двухэтапной программы, согласно которой время первого этапа охлаждения (медленного) сокращалось за счет начала второго этапа (быстрого) от середины периода кристаллизации раствора —10°С, а не от точки эвтектики NaCl. Эта программа оказалась более эффективной, чем предыдущая, о чем свидетельствует более низкий по сравнению с быстрой программой уровень неседиментируемой активности кислых РНК-азы, фосфатазы и катепсина Д.

Таким образом, основную роль в нарушении мембран лизосом при низкотемпературном воздействии играет комплекс физико-химических изменений, возникающих в среде замораживания, причем ведущее значение того или иного фактора криоповреждения определяется скоростью охлаждения и отогрева суспензии органелл.

Стабилизация лизосомальных мембран криопротекторами и другими фармакологическими веществами. К настоящему времени известно большое количество веществ, которые обладают криопротективными свойствами в отношении различных клеток и тканей при их низкотемпературной консервации: глицерин, диметилсульфоксид, поливинилпирролидон, полиэтиленоксиды, пропиленгликоли, декстраны и другие соединения [4, 5, 11, 28, 51, 56]. Многие из этих веществ способны предохранять лизосомальные мембраны от повреждений, которые возникают при действии на них низких температур, что приводит к значительному уменьшению выхода маркерных ферментов из этих органелл [23, 48, 49, 66, 67].

Так, диметилсульфоксид в 10%-ной концентрации в значительной мере предупреждает освобождение кислой фосфатазы в окружающую среду при замораживании клеток костного мозга [66]. Автор объясняет этот факт проникновением криопротектора в клетку и стабилизирующим влиянием его на мембраны лизосом.

При использовании 10%-ного диметилсульфоксида можно получить более высокую выживаемость срезов почки при замораживании их до —40°С. При этом в значительной мере сохранялась функциональная активность срезов почки (поглощение парааминогиппурата и дыхание), что коррелировало с уменьшением в среде замораживания уровня кислых гидролаз — фосфатазы и рибонуклеазы [48].

Применение глицерина при замораживании—оттаивании тромбоцитов частично предупреждает освобождение β-глюкуронидазы и катепсинов из клеток и не влияет на уровень освобождения кислой фосфатазы [23].

Мы исследовали защитные свойства полиэтиленоксида-400, глицерина, оксиэтилированного глицерина и диметилсульфоксида при замораживании изолированных лизосом по различным программам: 1) быстрое замораживание со скоростью 300—400°С/мин до —196°С, отогрев при +42°С в водяной бане; 2) быстрое замораживание со скоростью 300—400°С/мин до —196°С, отогрев при +42°С на воздухе. Предварительно изучалось влияние этих криопротекторов на изолированные лизосомы в условиях инкубации при +20°С в течение 30 мин. Было установлено, что все криопротекторы (в 10%-ной концентрации) не вызывали нарушения проницаемости мембран и выхода гидролаз в среду инкубации. Более того, по сравнению с контролем уровень солюбилизации маркерных ферментов в присутствии криопротекторов был значительно ниже или приближался к контрольному. Подтверждением того, что данные криопротекторы проявляли стабилизирующее влияние на мембраны лизосом, а не ингибирующее действие на лизосомальные ферменты, явились данные по изучению влияния криопротекторов на активность растворимых гидролаз в условиях инкубации при +20°С. Отмечено, что все изученные криопротекторы в указанной концентрации не изменяли каталитическую активность маркерных белков-ферментов.

Матеріал, захищений авторським правом

При замораживании суспензии лизосом в присутствии криопротекторов по программе 1 были получены данные, свидетельствующие о различной эффективности криопротекторов в отношении сохранности лизосом. Так, только ПЭО-400 и ОЭГ предупреждали выход в среду замораживания всех изученных ферментов. Глицерин снижал выход в среду замораживания РНК-азы, катепсина Д и кислой фосфатазы, не предотвращая выхода ДНК-азы, а ДМСО значительно снижал вы-

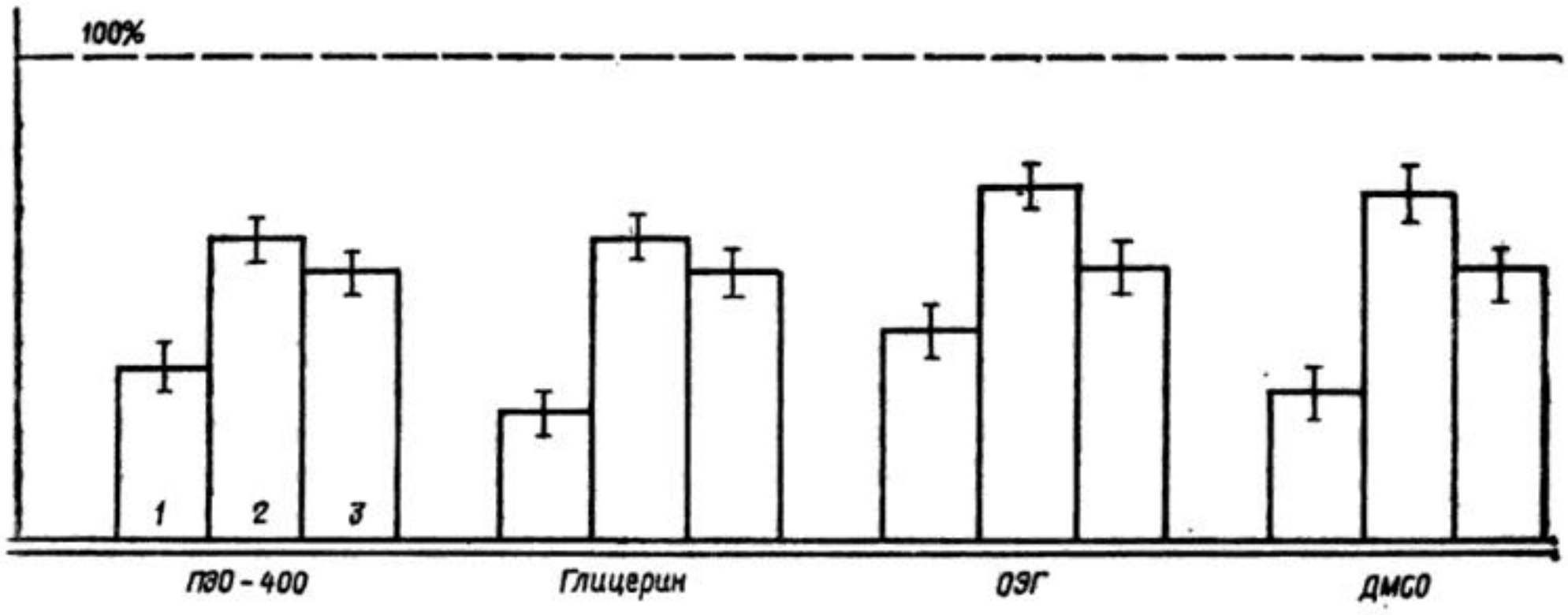


Рис. 5. Сравнительная характеристика показателей эффективности криопротекторов (ПК) при различных программах замораживания:

ПК= $\frac{\Sigma_a - \Sigma_k}{\Sigma_k}$ ×100, где a — процент высвобождения ферментативной активности в присутствии криопротектора, k — то же в пробах без криопротектора; *1, 2* — программы замораживания (см. рис. 3); *3* — медленное замораживание до —30°С.

ход кислой фосфатазы и катепсина Д, не предупреждая освобождения из лизосом кислых нуклеаз.

Несколько другие результаты были получены при замораживании лизосом в присутствии криопротектора по программе 2. Отличие этой программы от предыдущей, как уже отмечалось, заключается в медленном отогреве проб. В данном случае криопротекторы оказывали более выраженный защитный эффект на мембраны, снижая уровень солюбилизации всех изученных ферментов. Такой факт свидетельствует о том, что применявшиеся соединения проявляют свой защитный эффект в большей степени в условиях медленного отогрева, когда в значительной мере проявляется влияние на лизосомы «эффектов раствора» [56].

В связи с этим возникла необходимость исследовать защитный эффект криопротекторов в условиях медленного охлаждения лизосом (со скоростью 1—2°С/мин) до —30°С, когда действие «эффектов раствора» проявлялось бы в максимальной степени. В этом случае полученные результаты также свидетельствуют о том, что все изученные криопротекторы оказывали выраженное защитное действие на лизосомы: уровень неседиментируемой активности всех изученных гидролаз был значительно ниже по сравнению с уровнем, характеризующим образцы, замороженные без криопротектора.

Таким образом, все применявшиеся криопротекторы проявляют максимум защитных свойств при медленных скоростях замораживания — отогрева суспензии лизосом (рис. 5). Эти результаты являются подтверждением известной точки зрения о том, что механизм защитного действия криопротекторов обусловлен прежде всего способностью этих веществ выполнять функцию противосолевых буферов в условиях медленного замораживания и отогрева клеток и тканей [53, 69]. В проведенных экспериментах не удалось выявить достаточно четкой взаимосвязи между способностью криопротектора проникать через мембрану лизосом и эффективностью защитного действия. Такой факт, по-ви-

Матеріал, захищений авторським правом

димому, может служить еще одним доказательством того, что криозащитные свойства криопротекторов в отношении мембран лизосом обусловлены главным образом коллигативным механизмом их действия, который характерен для эндоцеллюлярных и экзоцеллюлярных защитных веществ.

Необходимо обратить внимание на то, что защитный эффект криопротекторов при замораживании лизосом по всем программам не был полным, поскольку уровень неседиментируемой активности в среде замораживания во всех случаях оставался относительно высоким. Кроме того, криопротекторы были неэффективны для предупреждения повреждений лизосом, развивающихся в деконсервационном периоде: как было установлено в отдельной серии опытов, уровень неседиментируемой активности гидролаз через 3 ч после оттаивания суспензии органелл оказался значительно выше по сравнению с данными, полученными сразу после оттаивания проб.

В последние годы с целью предупреждения нарушений клеточных мембран при различных повреждающих воздействиях, в том числе при замораживании, начали испытывать многие вещества, которые оказывают влияние на физико-химические свойства мембран и способствуют стабилизации их структур. Эти вещества, относящиеся к различным классам химических соединений (общие наркотики, местные анестетики, противовоспалительные препараты и др.), получили название мембранотропных или мембранстабилизирующих веществ [71]. Отдельную группу составляют соединения, которые оказывают влияние (стабилизирующее или лабилизирующее) на мембраны лизосом, в связи с чем они были названы де Дювом лизосомотропными агентами.

Среди веществ, стабилизирующих мембраны лизосом, наиболее изучены в этом отношении стероидные гормоны и их производные, нестероидные противовоспалительные вещества, антигистаминные препараты и др. [3, 14, 27, 31, 39—41, 60, 63, 74, 81, 82]. Конкретный молекулярный механизм стабилизирующего влияния этих веществ на лизосомальную мембрану окончательно не выяснен. К настоящему времени проведено небольшое количество исследований, посвященных данному вопросу. По мнению исследователей, изучавших фармакологическое действие мембранотропных соединений стероидного строения на лизосомальные мембраны, механизм действия их на уровне компонентов мембран реализуется путем изменения текучести фосфолипидного бислоя, что отражается на мембранной проницаемости. Предполагается, что стероидные гормоны, проникая в гидрофобную область углеводородных цепей фосфолипидов, уменьшают их мобильность и тем самым снижают проницаемость фосфолипидного слоя, уплотняя и стабилизируя его [13, 20, 80, 81].

Влияние различных противовоспалительных и других лизосомотропных веществ на устойчивость лизосом in vitro подробно изучено в работах Игнарро с соавторами [39—41]. Было показано, что лизосомы из печени кролика в условиях теплового повреждения хорошо стабилизируются хлороквином, гидрокортизоном, фенилбутазоном, флюфенаминовой кислотой, индометацином. Однако ни одно из указанных веществ не стабилизировали лизосомы, которые были получены из лейкоцитов кролика и крысы. Большинство из этих веществ заметно лабилизировало эти органеллы, что проявлялось увеличением выхода кислой фосфатазы и β-глюкуронидазы в среду инкубации. Лизосомы, выделенные из полиморфноядерных лейкоцитов кролика, стабилизировались только хлороквином и глюкокортикоидами, тогда как фенилбутазон, индометацин, ацетилсалициловая и флюфенаминовая кислоты вызывали значительную лабилизацию лизосомальной мембраны. После экспозиции суспензии лизосом, выделенных из полиморфноядерных лейкоцитов морской свинки при +37°С и нейтральном значении pH с

Матеріал, захищений авторським правом

хлороквином, гидрокортизоном, фенилбутазоном, оксифенилбутазоном, ацетилсалициловой кислотой, индометацином и флюфенаминовой кислотой, наблюдалось торможение освобождения арилсульфатазы, β-глюкуронидазы и β-галактозидазы в инкубационную среду. При этом ни одно из испытанных веществ не изменяло каталитической активности ферментных белков, что свидетельствует о непосредственном стабилизирующем воздействии их на мембраны лизосом.

Изучая тормозящий эффект противовоспалительных веществ на освобождение ферментов из лизосом полиморфноядерных лейкоцитов кролика, Наганиши [60] отмечал, что как стероидные (преднизолон, гидрокортизон), так и нестероидные вещества (фенилбутазон, солянокислый тинoридин) оказывают мембранстабилизирующее влияние на лизосомы. Сравнивая влияние этих веществ на изменение уровня активности кислой фосфатазы, арилсульфатазы как ферментов-маркеров целостности лизосом при их инкубации при +37°С, были получены данные, свидетельствующие, что ингибирование выхода лизосомальных ферментов в среду инкубации при использовании нестероидных веществ является кратковременным, тогда как положительный эффект гидрокортизона и преднизолона сохраняется более длительное время.

По данным некоторых авторов [42, 58], ацетилсалициловая кислота, гидрокортизон и хлороквин оказывают стабилизирующее влияние на лизосомы в условиях их тепловой лабилизации (+37°С), что проявлялось снижением степени солюбилизации кислой фосфатазы и β-глюкуронидазы в среду.

Танака [74], исследуя влияние различных нестероидных противовоспалительных веществ, обнаружил их неодинаковое действие на стабильность лизосомальных мембран в зависимости от среды инкубации органелл. Так, ацетилсалициловая кислота, фенилбутазон, флюфенаминовая кислота значительно снижали выделение кислой фосфатазы и β-глюкуронидазы из клеток печени, если эти клетки были предварительно суспендированы при +37°С в буферном растворе, содержащем 0,25 М сахарозу и ацетат натрия (pH 7,4—7,8). Эти же соединения, использованные в той же среде, но с кислым значением pH (6,0) значительно повышали уровень освобождения кислой фосфатазы из лизосом.

В работе Брауна, Шварца [21] было установлено, что кортизон и индометацин в сочетании с 1%-ным ДМСО оказались неэффективными добавками для предотвращения выхода из изолированных лизосом β-глюкуронидазы в условиях их тепловой лабилизации (+45°С). Фенилбутазон и ацетилсалициловая кислота, наоборот, ингибировали освобождение этого фермента из состава органелл.

Многие противовоспалительные вещества оказывают стабилизирующий эффект на лизосомальную мембрану не только в условиях тепловой лабилизации, но и при других воздействиях, например, рентгеновском или ультрафиолетовом облучении, гипотермическом хранении органов и тканей [44, 63, 64].

Согласно современным представлениям, механизм повреждения органов при длительной консервации методом гипотермической перфузии и поверхностного охлаждения во многом определяется развитием тканевой гипоксии, которая способствует лабилизации лизосом и активирует выделение лизосомальных гидролаз, играющих важную роль в разрушении клетки [8, 22]. Поэтому с целью стабилизации лизосом широкое экспериментальное и клиническое применение нашли кортикостероиды при гипотермической консервации некоторых органов и тканей: печени, легких, поджелудочной железы, сердца, сосудов, почек [19, 22, 48, 57, 78].

Менее изучен вопрос о возможности использования веществ, стабилизирующих лизосомы в условиях консервации биологического ма-

Матеріал, захищений авторським правом

териала методом глубокого замораживания, хотя имеющиеся сведения указывают на целесообразность такого подхода. Так, Персидский [65], применив при замораживании клеток костного мозга в качестве стабилизаторов гидрокортизон, ацетилсалициловую кислоту в сочетании с 10%-ным диметилсульфоксидом, обнаружил снижение уровня кислой фосфатазы в среде замораживания клеток. При этом из указанных стабилизирующих агентов ацетилсалициловая кислота была более эффективным средством в отношении снижения освобождения фермента в среду замораживания.

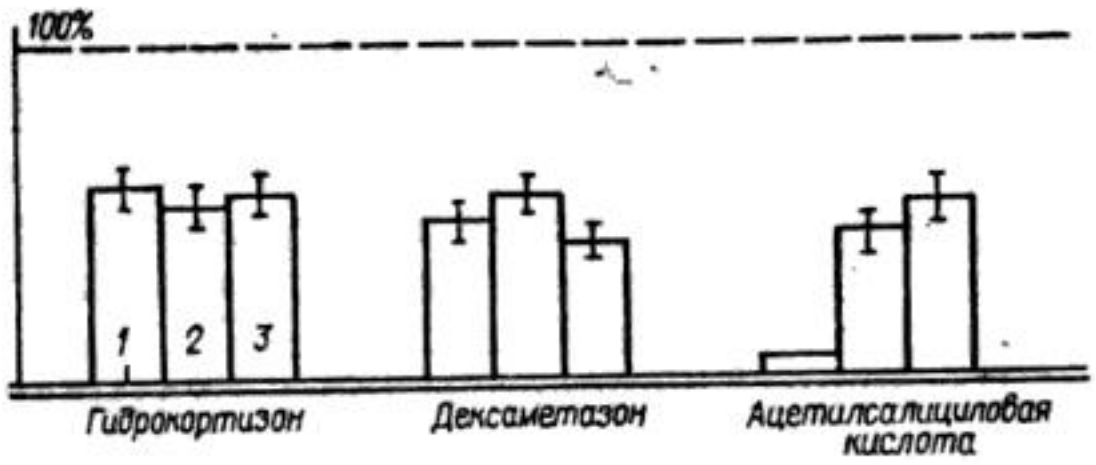


Рис. 6. Сравнительная характеристика показателей эффективности стабилизаторов (ПС) при различных программах. Расчет данного показателя производился согласно формуле для показателей криозащиты (см. рис. 5):

1—3 — программы замораживания (см. рис. 5).

Для уменьшения солюбилизации гидролаз, вызывающих необратимую деструкцию клеток костного мозга при замораживании, Горин с соавторами [36] предлагает наряду с применением криопротекторов (глицерин, ДМСО) применять также стабилизаторы лизосом — гидрокортизон, ацетилсалициловую кислоту, хлороквин.

Мы провели изучение эффективности гидрокортизона, дексаметазона, ацетилсалициловой кислоты в сочетании с криопротектором ПЭО-400 в отношении стабилизации лизосом при замораживании — оттаивании изолированных органелл по различным программам.

Предварительно было установлено, что 30-минутная инкубация суспензии лизосом с растворами этих веществ при +20°С не вызывала повышения уровня неседиментируемой активности изученных ферментов, что свидетельствовало об отсутствии лабилизирующего эффекта их на мембраны лизосом. При замораживании суспензии лизосом в присутствии ПЭО-400 и мембранотропных веществ по программе 1 было установлено, что гидрокортизон и дексаметазон (10^{-4} М) способствуют значительному снижению уровня неседиментируемой активности кислой РНК-азы, ДНК-азы и катепсина Д без изменения уровня кислой фосфатазы. Ацетилсалициловая кислота в таких концентрациях не оказывала влияния на уровень солюбилизации ферментов. При изучении комбинированного действия ПЭО-400 и мембранотропных соединений в условиях замораживания лизосом по программе 2 установлено, что эффект стероидных препаратов оставался примерно на уровне, отмеченном в случае применения программы 1, в то время как ацетилсалициловая кислота в сочетании с криопротектором в подобных условиях замораживания — отогрева оказывала более выраженный стабилизирующий эффект. При медленном замораживании суспензии лизосом в присутствии криопротектора и мембранотропных соединений (10^{-4} М) до —30°С обнаружено, что гидрокортизон вызывал снижение уровня неседиментируемой активности кислой РНК-азы, ДНК-азы и кислой фосфатазы, а дексаметазон — кислых нуклеаз, ацетилсалициловая кислота — кислой РНК-азы, ДНК-азы и катепсина Д.

Таким образом, на основании изучения комбинированного действия ПЭО-400 и мембранотропных соединений в различных условиях замораживания можно сделать заключение о том, что подобное сочетание оказывает значительный защитный эффект в отношении мебран лизосом, степень проявления которого зависит от типа мембранотропного соединения и применяемой программы замораживания (рис. 6).

Следовательно, имеющиеся к настоящему времени данные свидетельствуют о том, что лизосомы являются достаточно лабильными

Матеріал, захищений авторським правом

структурами, нарушение целостности которых может быть результатом воздействия различных повреждающих факторов, в том числе замораживания — оттаивания. В последнем случае механизм повреждения лизосомальных мембран непосредственно связан с физико-химическими явлениями, которые возникают в процессе кристаллизации внутриклеточной и внеклеточной воды, главным образом с эффектом концентрирования солей, оказывающих, по-видимому, денатурирующее влияние на белок-липидные комплексы мембран, и нарушения осмотического равновесия на мембранных структурах. Нельзя исключить также значения в общем механизме холодового повреждения лизосом других факторов криоповреждения — изменений pH среды, дегидратации молекул, температурнозависимых перестроек мембран. Однако вопрос относительно вклада этих факторов в процесс лабилизации лизосомальных мембран при действии низких температур остается почти не изученным, в связи с чем дальнейшие исследования в данном направлении могут быть целесообразны и полезны.

Различные криопротекторы оказывают стабилизирующее влияние в отношении сохранности структурной целостности лизосом при замораживании — оттаивании, причем этот эффект в большей мере проявляется в условиях медленных скоростей охлаждения и отогрева, т. е. при максимальном проявлении повреждающего действия отмеченного выше комплекса физико-химических факторов на мембраны. Более эффективная криозащита лизосом при замораживании — оттаивании наблюдается в случае сочетанного применения криопротекторов и мембранстабилизирующих фармакологических соединений, что дает основание считать дальнейший поиск и изучение подобных веществ весьма перспективным для нужд практической криобиологии.

1. *Алексеенко А. В., Биленко М. В., Бурлакова Е. Б. и др.* Изучение уровня перекисей и антиоксидантов в ишемизированных и консервированных почках. — Вестн. АМН, СССР, 1976, № 8, с. 61—67.
2. *Владимиров Ю. А., Арчаков А. И.* Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М. : Наука, 1972. — 272 с.
3. *Касавина Б. С.* Роль гормонов в регуляции ферментативной активности лизосом тканей глаза. — В кн.: Механизм действия гормонов. Ташкент, Изд-во Фан, 1976, с. 91—95.
4. *Киселев А. Е.* Важнейшие направления развития трансфузиологии в ближайшие годы. — Пробл. гематологии, 1970, № 11, с. 3—9.
5. *Лаврик С. С.* Консервирование костного мозга. — Киев : Здоров'я, 1975. — 126 с.
6. *Лозина-Лозинский Л. К.* Очерки по криобиологии. — Л. : Наука, 1972. — 288 с.
7. *Нечаева Г. А.* Влияние осмотического фактора на устойчивость лизосом клеток различных отделов головного мозга крыс. — Цитология, 1974, **16**, № 8, с. 993—998.
8. *Панченко Л. Ф., Асоян Г. А., Герасимов В. А. и др.* Лабилизация мембран лизосом и пероксисом в почках, консервированных трансорганной газовой перфузией. — Вопр. мед. химии, 1976, 22, вып. 6, с. 778—784.
9. *Покровский А. А.* Мембранотоксины. — Вестн. АМН, СССР, 1976, № 9, с. 79—88.
10. *Покровский А. А., Тутельян В. А.* Лизосомы. — М. : Наука, 1976. — 382 с.
11. *Пушкарь Н. С.* Консервирование глубоким охлаждением (—196°С) костного мозга и его использование в клинических целях: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Харьков, 1968. — 38 с.
12. *Пушкарь Н. С., Белоус А. М.* Введение в криобиологию. — Киев : Наук. думка, 1975. — 343 с.
13. *Сергеев П. В.* Биологические мембраны. — М. : Медицина, 1973. — 230 с.
14. *Тринус Ф. П., Мохорт Н. А., Клебанов Б. М.* Нестероидные противовоспалительные средства. — Киев : Здоров'я, 1975. — 239 с.
15. *Anderson J., Nath J.* The effect of freeze—preservation on some pollen enzymes. — Cryobiology, 1975, **12**, N 2, p. 160—168.
16. *Araki Tadashi.* Inactivation of mitochondrial 2-oxuglutaratdehydrogenase complex as a result of phospholipid degradetion induced by freeze—thawing. — Biochem. et biophys. acta, 1977, **496**, N 2, p. 532—546.
17. *Arsenis G., Gordon J., Fouste O.* Degradation of nucleic acids by lysosomal extracts of rat liver and Ehrlich ascites tumour cells. — J. Biol. Chem., 1969, **244**, № 1, p. 205—208.
18. *Barrett A.* Lysosomal enzymes. — In: Lysosomes. laboratory : Handbook / Ed. *J. Dingle.* — Amsterdam; London : North—Holland publ. co, 1972, p. 46—136.

Матеріал, захищений авторським правом

19. *Belzer F., Ashby B., Huang J., Dunphy J.* Etiology of rising perfusion pressure in isolated organ perfusion. — Ann. Surg., 1968, **168**, N 3, p. 382—387.
20. *Brinkman A., Van der Molen H.* Localization and charactirization of steroid binding sites of human red blood cells. — Biochim. et biophys. acta, 1972, **275**, N 2, p. 370—381.
21. *Brown J., Schwarts N.* Interaction of lysosomes and anti-inflammatory drugs. — Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1969, **131**, p. 614—620.
22. *Mo Cabe R., Stevens F., Fitpatric H.* Corticosteroids in preservations organs. — Transplantat. Proc., 1975, **7**, N 1, p. 113—116.
23. *Dajan G., Rowe A.* Activation of lysosomes in human platelets during cryopreservation. — Cryobiology, 1970, **7**, N 6, 576 p.
24. *Davidson S., Song S.* A thermally induced alteration in lysosome membranes: salt permeability at O and 37°C. — Biochem. et biophys. acta, 1975, **375**, N 2, p. 274—275.
25. *Desai J., Sawant P., Tappel A.* Peroxidative and radiation damage to isolated lysosomes. — Biochim. et biophys. acta, 1964, **86**, N 2, p. 277—285.
26. *Dickinson D., Misch M., Drury R.* Dimethyl sulfoxide protects tightly coupled mitochondria from freezing damage. — Science, 1967, **156**, p. 1738—1740.
27. *Dingle J.* The extracellular secretion of lysosomal ehzymes. — Lysosomes Biol. and Pathol., 1969, N 2, p. 421—435.
28. *Doebbler C.* Cryoprotective compounds. Review and discussion of structure and function. — Cryobiology, 1966, **3**, N 2, p. 2—11.
29. *De Duve C.* Lysosomes a new group of subcellular particles. — In: Subcellular particles / Ed. by T. Hayashi. NrY. Roland press, 1959, p. 128—135.
30. *De Duve C., Wattiaux R., Baunhuin P.* Distribution of enzymes between subcellular fractions in animal tissues. — Adv. Enzymol., 1962, **24**, p. 291—354.
31. *Ennis R., Granda J., Posner A.* Effect of gold salt and other drugs on the release and activity of lysosomal hydrolases. — Arthrit. and Rheum., 1968, **81**, N 6, p. 756—764.
32. *Farrant J.* Mechanism of cell damage during freezing and thawing and its prevention. — Nature, (London), 1965, **205**, N 4978, p. 1284—1287.
33. *Fowler S., de Duve C.* Digestive activity of lysosomes. III. The digestion of lipids by extracts of rat liver lysosomes. — J. Biol. Chem., 1969, **244**, N 2, p. 471—478.
34. *Gatt S.* Enzymatic hydrolysis of sphingolipids. — Biochim. et biophys. acta, 1967, **137**, N 1, p. 192—195.
35. *Gordon A.* The role of lysosomes in protein catabolism. — Lysosomes in Biol. and Pathol., 1973, N 3, p. 89—137.
36. *Gorin N., Duhamel G.* La congelation de moelle osscuse. — Rev. franc. transfus., 1975, **18**, N 3, p. 289—300.
37. *Hatefi Y., Hanstein W.* Lipid oxidation in biological membranes. — Arch. Biochem. and Biophys., 1970, **138**, p. 73—81.
38. *Heber U.* Freezing injury in relation to loss of enzumes activities and protection against freezing. — Cryobiology, 1968, **5**, N 3, p. 188—201.
39. *Ignarro L.* Dissimilar effects of anti-inflammatory drugs on stability of lysosomes from peritoneal and circulating leucocytes and liver. — Biochem. Pharmacol., 1971, **20**, N 10, p. 2861—2870.
40. *Ignarro L.* Effects of anti-inflammatory drugs on the stability of rat liver lysosomes in vitro. — Ibid., p. 2847—2860.
41. *Ignarro L.* Glucocorticosteroid inhibition of nonphagocytic discharge of lysosomal enzyme from human neutrophils. — Arthritis and Rheum., 1977, **20**, N 1, p. 73—83.
42. *Kalczak M., Siceinski W.* The effects of hydrocortisone, acetylsalicylic acid and ultraviolet of rat liver cells in vitro. — Folia histochem. et cytochem., 1968, **6**, N 1, p. 107—112.
43. *Karow A.* Cryoprotectants — a new class of drugs. — J. Pharm. and Pharmacol., 1969, **21**, N 4, p. 209—229.
44. *Kinoshita A.* Release of acid hydrolytic enzymes from lysosomal particles in the epidermis. — J. Kurume. Med. Assoc., 1974, **37**, N 8/9, p. 420—437.
45. *Koenig G.* Lysosomes in the nervous system. — Lysosomes in Biol. and Pathol., 1969, N 2, p. 111—162.
46. *Koenig G., Jibril D.* Acidic glycolipids and the role of ionic bonds in the structure linked latency of lysosomal hydrolases. — Biochim. et biophys. acta, 1962, **65**, p. 543—551.
47. *Lehman I.* The deozyribonuclease of Escherichia coli. — J. Biol. Chem., 1960, **235**, N 5, p. 1479—1487.
48. *Lotke P.* Lysosome stabilizing agents for hypotermic kidney preservation. — Nature, London, 1966, **212**, N 5064, p. 512—513.
49. *Lotke P., Schwarta S.* Studies on the functional and biochemical changes during kidney preservation. — Surgery, 1970, **67**, N 3, p. 488—492.
50. *Lovelock J.* Denaturation of lipid-protein complex as a cause of damage by freezing. — Proc. Roy. Soc. Med., London, 1957, **147**, p. 427—433.
51. *Lovelock J., Bishop W.* Prevention of freezing damage of living cells by dimethylsulphoxide. — Nature, (London), 1959, **183**, N 4664, p. 1394—1395.

Матеріал, захищений авторським правом

52. *Lucy S.* Lysosomal membrane. — Lysosomes in Biol. and Pathol., 2969, N 2, p. 313—341.
53. *Luyet B., Gehenio P.* The mechanism of injury and death by low temperature. — Biodynamica, 1940, **60**, N 3, p. 33—39.
54. *Mahadevan S., Dillards G., Tappel A.* Degradation of polysacharides, mucopolysacharides and glycoprotein by lysosomal glycocidases. — Arch. Biochem. and Biophys., 1969, **129**, p. 525—529.
55. *Malinin F.* Iniyry of human polymorphonuclear granulocytes frozen in the presence of cryoprotective agents. — Cryobiology, 1972, **9**, N 2, p. 123—130.
56. *Maryman H.* Modified model for the mechanism of freezing injury in erythrocytes. — Nature, 1968, **218**, N 5139, p. 333—336.
57. *Miller H., Alexander S.* Protective effect of methylprednisolone against ischemic injury to the kidney. — Transplantation, 1973, **16**, N 1, p. 57—60.
58. *Miller W., Smith J.* Effect of acetylsalicylic acid on lysosomes. — Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1966, **122**, p. 634—636.
59. *Nagasue N.* Release of lysosomal enzyme glycoronidase after hepatic cryosurgery. — Arch. Surg., 1975, **110**, N 6, p. 713—716.
60. *Nakanishi M., Goto K.* Inhibitory effects by anty-inflammatory drugs on enzyme release from rabbit polymorphonuclear leukocyte lysosomes. — Biochem. Pharmacol., 1975, **24**, N 3, p. 421—424.
61. *Novikoff A.* Lysosomes in the physiology of cell: Contribution of staining methods. — In: Lysosomes. Ciba. Foundat. symp. / Eds A. V. S. de Reuck, M. P. Cameron : London, 1963, p. 36—77.
62. *Osborne L., Morris G., Lee D.* Freezing of rat liver lysosomes to —196°C in the presence and absence of dimethylsulfphoxide. — Eur. J. Biochem., 1973, **35**, p. 443—449.
63. *Ottlecz A., Horpacsy G., Karady J.* A Chloroquinkezeles ket phasisu hatasa a lysosomalis enzymek aktivitas voltozasaza tourniquet shockban. — Kiserl. osvostud., 1971, 23, N 1, p. 87—91.
64. *Paris J., Brandes D.* Effects of X-irradiation on the functional status of lysosomal enzymes of mouse mammary glan carcino mas. — Cancer Res., 1971, **31**, N 4, 392—401.
65. *Persidsky M.* Lysosomes as a target of cryoinjury. — Cryobiology, 1970, **7**, N 3, p. 582—583.
66. *Persidsky M.* Lysosomes as a first target of cryoinjury. — Ibid., 1971, **8**, N 3, p. 482—488.
67. *Persidsky M., Ellet M.* Lysosomal involvement in cryoinjury. — Ibid., 1969, **6**, N 2, p. 280.
68. *Rey L.* Conservation de la vie par le Froid. — Paris : Hermani, 1959. — 186 p. — (Actual. sci. industr.; N 1279).
69. *Rinfret A.* Cryobiology — some fundamentals in surgical covtext. — In: Cryosurgery / Ed. by R. Rand, A. Rinfret. — New York : Acad. press, 1968, p. 19—28.
70. *Sawant P., Desai J., Tappel A.* Factors affecting the lysosomal membrane and availability of enzymes. — Arch. Biochem. and Biophys., 1964, **165**, p. 247—253.
71. *Seeman Ph.* The membrane actions of anesthetics and tranquilizes. — Pharmacol. Revs, 1972, **24**, N 4, p. 584—632.
72. *Smith A.* Biological effects of freezing and supercoling. — London : Arnold LTD, 1961. — 505 p.
73. *Straus W.* Lysosomes, phagosomes and related particles. — In: Enzyme cytology / Ed. D. Roodyn. — New York; London : Acad. press, 1968, p. 239—247.
74. *Tanaka K.* Suppression of enzyme release from isolated rat liver lysosomes by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. — Biochem. Pharmacol., 1968, **17**, p. 2023—2032.
75. *Tappel A.* Effects of low temperatures and freezing on enzymes and enzyme systems. — In: Cryobiology / Ed. by H. Meryman. New York; London : Acad. press, 1966, p. 163—176.
76. *Tappel A.* Lysosomal enzymes and pathology. — Lysosomes in Biol. and Pathol., 1969, N 2, p. 207—240.
77. *Vaes G.* Digestive capacity of lysosomes. — In: Lysosomes and storage diseases. New York; London, 1973, p. 43—74.
78. *Veith F., Koerner S., Sprayregen G. et al.* Corticosteroids in clinical and experimental lung transplantation. — Transplant. Proc., 1975, **7**, N 1, p. 99—103.
79. *Weissmann G.* Structure and function of lysosomes. — Reumatol. Ann. Rev., 1967, **1**, p. 4—28.
80. *Weissmann G.* Effect of corticosteroids on the stability and function of biochem membranes. — In: Physiology immunopharmacology, and treatment. New York; London, 1975, p. 221—230.
81. *Weissmann G.* Corticosteroids and membrane stabilization. — Circulation, 1976, **53**, N 3, p. 171—172.
82. *Weissmann G., Thomas A.* Labilisation and stabilisation of lysosomes. — Fed. Proc., 1964, **23**, p. 1038—1045.

Институт проблем криобиологии и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию 04.12.80

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043.615.361.014.41

А. М. Бражников, Ю. А. Иткин

НАУЧНЫЕ ОСНОВЫ ТЕХНОЛОГИИ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ КЛЕТОЧНЫХ СУСПЕНЗИЙ

В настоящее время криоконсервирование клеточных суспензий вышло за рамки научных исследований и приобрело промышленное значение. Для внедрения методов криоконсервирования на уровне мировых стандартов необходима научно обоснованная разработка технологического процесса криоконсервирования. Создание такого технологического процесса позволит наиболее рационально достигнуть определенной цели, удовлетворяющей конкретные потребности человека.

Прежде чем обсуждать возможные перспективы и проблемы криобиологической технологии, так же как и взаимосвязь криобиологической технологии с другими технологиями, попытаемся осмыслить само понятие «технология». Это тем более интересно, что, несмотря на большое количество работ, относящихся к частным (отраслевые технологии) и общим (технология и природа) технологическим проблемам, само понятие технологии остается неопределенным.

Известный польский писатель-фантаст и ученый Станислав Лем определил технологию как «обусловленные состоянием знаний и общественной эффективностью, способы достижения целей, поставленных обществом» [5]. Это достаточно пространное и общее определение все же дает некоторые основания для анализа собственно технологии как некоторого искусственного феномена.

Прежде всего отметим, что искусственность технологических систем и внешняя прагматичность технологии (ведь цели, стоящие перед технологией, ставятся обществом) побуждает некоторых исследователей рассматривать технологию как феномен, принципиально отличный от науки.

А. Е. Левин указывает: «...специфика научной деятельности, что необходимо еще раз подчеркнуть, лежит в плане выбора путей, ведущих к достижению определенных результатов, технологию же интересуют сами результаты. Технологическое мышление альтернативно научному именно в своей «аметодологичности». Технологический подход к реальности не нуждается в иных обоснованиях кроме прямой результативности...» [4].

Действительно, если считать, что функцией науки является объяснение сущности явлений и построение моделей этих явлений, то технология, базируясь в значительной степени на достижениях науки, таковой не является в силу того, что технологии являются только «способы достижения целей, поставленных обществом».

«Вынесение» технологий «за скобки» науки еще не определяет ее места и значения в системе человеческого общества.

Одним из отличительных признаков, выделяющих человека из окружающего животного мира, является возможность целенаправленного изменения им среды своего обитания.

Если живая природа в процессе своей эволюции изменяется таким образом, что изменения происходят внутри самого живого вещества, поддерживая некоторое динамическое равновесие между живым веществом и окружающей средой, то человек изменяет окружающую среду, приспосабливая ее к своим потребностям.

П. Л. Капица отмечает: «Хорошо известно, что люди в отличие от животных строят свое благосостояние, преобразуя природу, а не приспособливаясь к ней, как остальной животный мир. Это всегда делалось коллективно, и таким образом возникло общество» [3].

Матеріал, захищений авторським правом

Таким образом, мы приходим к пониманию технологии вообще, как некоторого механизма, обеспечивающего воздействие человеческого общества на окружающую среду и снабжающего каждого члена общества предметами потребления в самом широком смысле этого слова.

Рассмотрим с изложенных позиций криобиологическую технологию. Консервирование биологических объектов холодом уже вышло за пределы чисто познавательных интересов и, будучи направленным на практические цели, является по существу технологией. Способы консервирования биологических объектов холодом, посредством которых осуществляются преобразования биологического сырья в продукты потребления, составляют таким образом технологию, развивающуюся и совершенствующуюся согласно целям общества и достигнутому уровню знаний. Несмотря на некоторую специфичность консервируемых биообъектов как «продуктов потребления», они, безусловно, таковыми являются. Эффективность криобиологической технологии, как, впрочем, и любой другой технологии, определяется в конечном счете успехом практической реализации, а корректность приемов демонстрируется почти исключительно прямым сопоставлением с опытом.

Попытаемся рассмотреть криобиологическую технологию в целом как некий феномен и проследить ее развитие во взаимосвязи с наукой и другими технологиями.

Каждый из отдельных технологических процессов холодильного консервирования биологических объектов имеет свою физико-химическую основу и, в принципе, свою некую теорию — технология же в целом является, видимо, нечто большее, чем совокупность отдельных технологических процессов.

Современная криобиологическая технология постоянно включает в себя достижения различных фундаментальных наук, от биологии до физики, однако одно и то же явление — производство консервированных биологических продуктов потребления — оказывается всякий раз иным в зависимости от того, с помощью какого понятийного аппарата оно изучается и с каких позиций описывается (биохимия, биофизика, морфология, теплофизика, конструирование аппаратуры, техника измерения и автоматизация и пр.).

Следовательно, возникает комплекс взаимосвязанных проблем, составляющих предмет криобиологической технологии: выработка общих представлений относительно процесса производства консервированных биологических объектов потребления. Такие общие представления могут быть выработаны только на основе выхода за пределы самой проблемы. Нужен взгляд на технологию консервирования биообъектов «сверху» и «со стороны». Необходим поиск посторонней базы, которая стоит над технологией консервирования, с тем, чтобы найти взаимосвязь между различными технологиями: определение «пределов возможного» криобиологической технологии, эта проблема сводится к прогнозированию уровня сложности объектов, которые можно консервировать холодом в массовом порядке: исследование возможности построения криобиологической технологии как дедуктивной системы с четко определенной совокупностью понятий, с предварительными постулатами и определенными способами абстрактных рассуждений.

Биологические продукты потребления удовлетворяют чисто биологические потребности человека и представляют, если можно так выразиться, отложенные, временно не нужные конкретному индивидууму потребности.

Таким образом, криобиологическая технология занимается как бы массовыми изъятиями из экологического цикла абстрактно необходимых биологических материалов с тем, чтобы вернуть их конкретному индивиду в нужный момент времени. Осуществление всех этапов холо-

Матеріал, захищений авторським правом

дильного консервирования биообъектов связано с затратой значительных материальных и энергетических ресурсов. Так, если замораживание биообъектов осуществляют с помощью жидкого азота, то на 1 кг замороженной массы расходуется только на собственно процесс замораживания 5 кВт·ч электроэнергии.

С точки зрения экологии, а только такая точка зрения может отражать реалистический подход к любой из развивающихся технологий, криобиологическая технология имеет наиболее оптимистические перспективы развития. По этой причине криобиологическая технология представляется нам одной из наиболее выгодных сфер вложения энергетических, материальных, трудовых и финансовых ресурсов. Попробуем показать, что это действительно так.

Можно считать установленным, что одним из основных ограничителей развития любой технологии является возможность природных процессов нейтрализовать технологические отходы. Степень использования природного сырья составляет 5—10%, а остальные 90—95% изымаемого из природы вещества безвозвратно теряются. По этому критерию существующие технологии крайне расточительны [6].

Одной из действенных мер преодоления этого наиболее существенного недостатка технологий является ограничение потребностей, так же как и числа вариантов, удовлетворяющих одну и ту же потребность. По этим причинам правомерно деление потребностей человеческого общества на первичные, или необходимые, и вторичные, или престижные.

Не останавливаясь сейчас на классификации технологий по принципу иерархии потребностей, которая сама по себе представляет крайне сложную научную проблему, отметим, что с точки зрения общества в целом, видимо, следует для удовлетворения престижных потребностей производить товары с максимальным сроком пользования и ограниченного ассортимента (например, на наш взгляд неоправданно завышен ассортимент наручных и иных часов, транзисторных радиоприемников, бытовых холодильников и пр.), направляя основную часть ресурса на удовлетворение первичных потребностей человека. Очевидно, что при любых мысленных критериях оценки первичных и вторичных потребностей биологические продукты потребления, производимые криобиологической технологией, следует отнести к первичным, наиболее необходимым продуктам.

Следовательно, рассмотрение криобиологической технологии с некоторых внешних по отношению к собственно технологии позиций приводит к формулированию ее двух отличительных особенностей.

1. Задачей (практической целью) криобиологической технологии является изъятие из экологического цикла некоторых биологических объектов, их сохранение в течение периода разумной длительности и возвращение к конкретному индивиду в нужный для этого индивида момент времени. Поскольку для данного, конкретного индивида, нуждающегося в биологическом объекте, удовлетворение этой его потребности представляется процессом **принципиально** отличным от природного процесса, криобиологическую технологию можно рассматривать как одну из технологий искусственного. Общим для всех технологий «искусственных продуктов» (к технологиям искусственного, видимо, можно отнести производство искусственных продуктов питания, создание искусственного интеллекта) является меньшая степень взаимодействия с окружающей средой.

2. Криобиологическая технология удовлетворяет наиболее насущные потребности человека и принципиально отличается от всех других технологий тем, что продукт криобиологической технологии, видимо, никогда не будет продуктом престижного потребления. Следует отметить, что даже пищевая технология производит некоторое количество

Матеріал, захищений авторським правом

престижного продукта (табачные изделия, алькогольные напитки, деликатесы).

Наконец, если смотреть с точки зрения, согласно которой технология является некоторым механизмом, обеспечивающим воздействие человека на окружающую природу, то криобиологическая технология в конечном счете создает возможности, пусть пока принципиальные, конструктивного воздействия индивида на самого себя.

Рассмотрим теперь проблему, связанную с определением «пределов возможного» криобиологической технологии. Прежде всего нам следует рассмотреть некоторую классификацию криобиологических объектов согласно уровню сложности их консервирования.

I группа — объекты, состоящие из отдельных элементов, взаимозаменяемых как один относительно другого, так и по положению в системе. I группа — суспензии клеток и субклеточных элементов. В виде суспензий замораживаются клетки крови, костного мозга, половых продуктов, микроорганизмов, клетки культуры ткани и прочие биологические объекты.

Принципиальную возможность холодильного консервирования объектов этой группы можно считать установленной. Поэтому возможность холодильного консервирования объектов I группы в случае их массового, а не «штучного» производства определяется качеством технологических решений, заключающихся в возможности многократного воспроизведения разработанных режимов консервирования (введение криопротектора, отвода тепла, хранение, восстановление, освобождение от криопротектора) в контролированных условиях.

II группа — плотные ткани, костная, хрящевая ткань, эндокринные железы, нервные волокна, мышечная ткань, сердечные клапаны, роговица кожи и др. Указанные ткани являются компактными структурами различной плотности.

III группа — органы, имеющие автономную систему кровоснабжения и иннервации, требующие перфузии в процессе консервации.

Возможность консервирования холодом таких органов изучается на уровне поискового эксперимента и обсуждение каких-либо технологических решений является преждевременным. Мы также полагаем преждевременным (разумеется для целей криобиологической технологии, но не криобиологии) заниматься классификацией более сложных биологических объектов.

Анализируя изложенное, можно наметить направления исследований, выполнение которых необходимо для практической реализации криобиологической технологии в рамках «пределов возможного».

Исследование реодинамики биологических суспензий (как искусственных, так и естественных) при их перемещении в технологических системах. Существующие данные по реологии биологических суспензий относятся к поведению естественных биологических суспензий в организме. При массовом консервировании биологических суспензий возникают проблемы (например, заполнение и опорожнение контейнеров, течение суспензий при их фракционировании), для технического решения которых необходимо располагать данными об их реологических свойствах.

Исследование физических (в том числе тепло- и электрофизических) свойств биологических суспензий. Такие данные необходимы как опорные для разработки инженерных методов расчета соответствующего оборудования.

Исследования основных процессов криобиологической технологии с учетом специфики обрабатываемых объектов.

К основным процессам криобиологической технологии можно отнести следующее:

фракционирование (отстаивание, фильтрация, центрифугирование);

Матеріал, захищений авторським правом

введение в суспензию криопротектора и его равномерного распределения (перемешивание); заполнение и опорожнение контейнеров (истечение суспензий из насадок); отвод тепла (замораживание по программе), обезвоживание (сублимационная и конвективная сушка); восстановление; разделение восстановленной суспензии и криопротектора; санитарная обработка контейнеров.

Перечисленные процессы достаточно подробно изучены особенно в пищевой и холодильной технологиях, однако специфика объекта заставляет рассмотреть эти процессы прежде всего с точки зрения влияния характера их повреждения на жизнеспособность объекта. Нежелательные изменения могут иметь место на всех стадиях его обработки.

Особенностью процессов криобиологической технологии является отличная от многих технологий целевая функция процесса. Если для большинства технологий (в том числе и пищевой) основной задачей значительного числа составляющих ее процессов является их интенсификация, то для криобиологической технологии основная целевая функция — сохранение жизнеспособности реконсервированных материалов. По этой причине процессы криобиологической технологии должны изучаться не с точки зрения их возможной интенсификации, а с точки зрения сохранения жизнеспособности.

Рассмотрим теперь возможность построения криобиологической технологии как системы с четко определенной совокупностью понятий. Построение криобиологической технологии как дедуктивной системы возможно лишь на основе количественных представлений о качестве биообъектов, подвергаемых холодильному консервированию. Здесь мы рассмотрим лишь самые общие вопросы.

Исследования, направленные на построение количественной модели качества биообъекта, подвергаемого холодильному консервированию, можно проводить в двух направлениях: создание универсальной модели, которая была бы эффективна на всех уровнях управления технологией консервирования биообъектов; создание системы взаимоподчиненных «целевых» моделей, каждая из которых может быть использована лишь на определенном уровне оценки качества [1].

Первый путь является наиболее заманчивым, однако для его реализации необходимо оперировать показателями, которые можно было бы измерять инженерными средствами и которые одновременно имели бы глубокий биологический смысл.

Развиваемая многими исследователями термодинамическая теория жизни [2] дает определенные основания рассматривать в качестве такого показателя удельную скорость теплопродукции живых организмов. Вместе с тем сама термодинамическая теория жизни нуждается в серьезном биологическом основании, а возможность использования удельной скорости теплопродукции как универсального показателя — в тщательной экспериментальной проверке.

В настоящее время, видимо, более эффективным является второй путь — путь создания «целевых» моделей, каждая из которых имеет вполне определенную и ограниченную сферу применения. Всю криобиологическую технологию в целом (в самом общем виде) можно описать системой «целевых» моделей качества.

1. Государственное управление качеством биообъектов, консервированных холодом. 2. Клиническое применение реконсервированных биоматериалов. 3. Конструирование криобиологической аппаратуры и проектирование банков для хранения криобиологического материала. 4. Исследование процессов криоконсервирования биообъектов с целью определения оптимальных условий проведения процессов.

Предложенная система «целевых» моделей — пока лишь принцип и должна рассматриваться только в этом смысле.

Матеріал, захищений авторським правом

Технологическая линия по низкотемпературному консервированию клеточных суспензий

Матеріал, захищений авторським правом

Для комплексной оценки качества на первом уровне предлагается следующая формула:

$$K_1 = F_x F_c \left[L_ж \frac{M_ж}{M_ж} + L_ф \frac{M_ф}{M_ф} \right],$$

где K_1 — безразмерное значение показателя качества реконсервируемого объекта; $M_ж$ — показатель, характеризующий жизнеспособность восстановленного биообъекта; $M_ж$ — эталонное или базовое значение этого показателя; $M_ф$ — показатель, характеризующий функциональные свойства реконсервируемого объекта; $M_ф$ — эталонное или базовое значение этого показателя; $L_ж$ и $L_ф$ — «весовые» коэффициенты, определяющие степень влияния $M_ж$ и $M_ф$ на комплексную оценку качества биообъектов (находятся методом экспертных оценок); $L_ж + L_ф = 1$; F_x, F_c — соответственно функции «вето», регламентирующие невозможность использования реконсервируемого материала либо вследствие токсикологических изменений в процессе хранения (F_x), либо вследствие нарушения санитарных правил (F_c). Функции «вето» могут принимать значения либо 1 (значение соответствующих показателей находится в допустимых пределах), либо 0 (значение показателей вышло за допустимые пределы).

Показатель качества биоматериалов М является сложной комплексной характеристикой биоматериала. При оценке качества на первом уровне мы полагаем возможным рассматривать показатель качества как «единое свойство» (например, жизнеспособность). Оценивая же качество на более низких уровнях, необходимо рассматривать каждый показатель как сложную функцию отдельных свойств.

Таким образом, чем ниже уровень рассмотрения, тем более узко, но зато и более глубоко следует оценивать качество биообъекта (это основное достоинство «целевых» моделей).

В заключение следует обратить внимание еще на одну особенность объектов криобиологической технологии — индивидуальность оценки характеристик — и, как следствие, нечеткость характеристик биообъектов. Это обстоятельство затрудняет необходимую для эффективного функционирования любой технологии стандартизацию.

В качестве примера построим технологическую схему криоконсервирования клеточных суспензий на основе данных, имеющихся в настоящее время, по методам и аппаратуре для проведения полного процесса криоконсервации, обеспечивающей высокую производительность и морфофункциональную сохранность клеток.

1. *Бражников А. М.* Инженерные методы исследования в криобиологии. — В кн.: Консервирование иммунокомпетентной ткани. Киев : Наук. думка, 1979, с. 166—176.
2. *Зотин А. И.* Термодинамический подход к проблемам роста, развития и старения. — М. : Наука, 1974. — 175 с.
3. *Капица П. Л.* Влияние современных научных идей на общество. — Вопр. философии, 1979, № 1, с. 61—72.
4. *Левин А. Е.* Миф. Технология. Наука. — Природа, 1977, № 3, с. 89—93.
5. *Лем С.* Сумма технологии. — М. : Наука, 1968. — 150 с.
6. *Олдак П. Г.* Глобальная стратегия. — Химия и жизнь, 1979, № 5, с. 11—17.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
12.11.80

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043.547.422.426.1:615.9

В. М. Гучок, В. Ф. Козлова

О КУМУЛЯТИВНЫХ СВОЙСТВАХ 1,2-ПРОПАНДИОЛА, ГЛИЦЕРИНА И ОКСИЭТИЛИРОВАННОГО ГЛИЦЕРИНА МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ 1412 И ВЫНОСЛИВОСТИ К НИМ КРЫС

1,2-Пропандиол (1,2-ПД), глицерин и оксиэтилированный глицерин молекулярной массы 1412 (ОЭГ-1412) при однократном их введении в организм представляют собой малотоксичные вещества [2, 4, 5, 8, 11] и являются активными криопротекторами [4, 6, 8].

Однако нельзя оценивать токсичность тех или иных веществ только по результатам острых экспериментов, так как при их хроническом воздействии многие интоксикации имеют иной патогенез, чем патогенез острого отравления. Известно немало примеров (бензол, тринитротолуол, свинец, ртуть, марганец и многие другие), когда в остром эксперименте вещество проявляет себя как малотоксичный агент, а при хроническом воздействии в малых дозах (концентрациях) оказывается высокоопасным ядом [7].

В доступной литературе данных о количественной оценке кумулятивных свойств 1,2-ПД и глицерина и выносливости к ним животных при хроническом воздействии нет. ОЭГ-1412 вообще не изучался в этом плане.

Цель настоящего исследования — количественное определение кумулятивных свойств 1,2-ПД, глицерина, ОЭГ-1412 и выносливости к ним животных в субхронических экспериментах.

Методы исследования. Для оценки кумулятивных свойств изучаемых веществ и выносливости к ним животных нами применен тест «субхронической токсичности», предложенный Лим и др. [10] и предусматривающий ежедневное введение исследуемого вещества в течение 24±4 дней. В первые четыре дня вводится 0,1 от ранее установленной для данного вида животных однократной $ДЛ_{50}$. На пятый день и через каждые последующие четыре дня дозу увеличивают в 1,5 раза. Результаты исследования оценивают величиной коэффициента кумуляции — отношением величин $ДЛ_{50}$ субхронического и острого действий.

Кроме того, учитывается абсолютная величина суммарной $ДЛ_{50}$, наклон прямой смертельных доз, суммарные минимальные смертельные дозы, сроки начала гибели животных.

Патологоанатомическое вскрытие, гистологический и гистохимический анализ (окраска целлоидин-парафиновых срезов внутренних органов гематоксилин-эозином, пикрофуксином по ван Гизону, альциановым синим и реактивом Шиффа по Моури, избирательное окрашивание замороженных срезов печени и надпочечников на липиды суданом III и IV, а также суданом черным В) использованы для изучения изменений, развившихся во внутренних органах животных, получивших очень большую суммарную дозу исследуемых веществ. Патологоанатомическое вскрытие выживших животных производилось после их декапитации через двое суток и остальных — через две недели после завершения введения веществ.

Эксперименты выполнены на 38 белых беспородных крысах массой 177—234 г. 1,2-ПД, глицерин и ОЭГ-1412 вводили внутрибрюшно в 20%-ных растворах, приготовленных на 0,9%-ном растворе NaCl.

Результаты и их обсуждение. Основные показатели субхронической токсичности исследуемых веществ, полученные с помощью метода Лим и др. [10], представлены в табл. 1. Следует отметить, что Лим с соавторами, предлагая свой метод, исходили из возможности выявления кумуляции и привыканий. По мнению авторов метода, коэффициент

Матеріал, захищений авторським правом

кумуляции меньше 1 свидетельствует о наличии кумулятивных свойств, более 1 — о повышенной выносливости к изучаемым веществам. Такого же мнения придерживаются и другие исследователи, в настоящее время широко применяющие в своих исследованиях метод Лим и соавторов [1, 7].

Величины коэффициентов кумуляции для всех изученных нами веществ в 10—17,9 раз более 1 (см. табл. 1), что убедительно свиде-

Таблица 1. **Некоторые показатели острой и субхронической токсичности 1,2-пропандиола, глицерина и ОЭГ-1412 для крыс**

Криопротектор	Среднесмертельные дозы и их доверительные границы				Коэффициент кумуляции	Суммарная доза, введенная в субхроническом опыте		Суммарная минимальная доза, вызвавшая гибель части животных	
	Однократное введение		Суммарные в субхроническом опыте						
	г/кг	моль/кг	г/кг	моль/кг		г/кг	моль/кг	г/кг	моль/кг
1,2-пропандиол	18,22 (14,0—22,44)	0,239 (0,184—0,295)	184,09	2,419	10,23	188,64	2,479	52,2	0,686
Глицерин	6,66 (5,92—7,4)	0,072 (0,064—0,08)	95,05	1,032	14,27	84,715	0,919	21,578	0,234
ОЭГ-1412	7,9 (6,23—9,57)	0,0056(0,0044—0,0068)	141,65	0,1	17,9	146,51	0,1037	33,496	0,024

тельствует об отсутствии или о крайне слабой степени выраженности кумулятивного эффекта в их действии.

Полученные данные хорошо согласуются с результатами других наших подострых экспериментов по изучению влияния трехнедельного ежедневного внутрибрюшинного введения 1,2-ПД и четырехнедельного интермитирующего введения ОЭГ-1412 крысам в неизменной дозе, равной 1/20 $ДЛ_{50}$. В этих опытах не выявлено ни функциональных, ни структурных патологических сдвигов в организме подопытных животных, что также свидетельствует об отсутствии проявлений кумулятивного процесса в указанных условиях эксперимента.

Об исследовании подобного характера без количественной оценки процесса сообщили Браун и Картланд [9], которые после ежедневного перорального введения пропиленгликоля кроликам в дозе 8 мл/кг, в течение 50-ти дней не выявили кумулятивного эффекта.

Исходя из наличия в действии изученных криопротекторов чрезвычайно слабо выраженного кумулятивного процесса и для выявления возможных различий в степени его выраженности, построили прямые смертельных доз по данным субхронической токсичности. При этом мы исходили из представлений И. В. Саноцкого и И. П. Улановой [7] о том, что по величине наклона прямой смертельных доз подострого опыта можно судить о степени кумулятивного процесса. Авторы работы [7] считают, что, чем круче прямая, тем (при прочих равных условиях) кумулятивнее вещество, тем слабее адаптационно-компенсаторные процессы организма, и наоборот. Из рис. 1 четко видно, что прямая смертельных доз для глицерина оказалась наиболее крутой. Прямые смертельных доз для 1,2-ПД и ОЭГ-1412 имеют практически одинаковый наклон. Следовательно, если исходить из наличия в действии изученных веществ кумулятивного процесса, то кумулятивнее других оказывается глицерин. Этот вывод подтверждается также динамикой массы крыс в ходе эксперимента (табл. 2).

Вместе с тем коэффициенты кумуляции, определяемые при режиме введения веществ с непрерывным повышением их дозы, получаются при предельном напряжении адаптационных, а при больших дозах, особенно в конце опыта, и компенсаторных возможностей организма.

Матеріал, захищений авторським правом

Установленные нами большие коэффициенты кумуляции для 1,2-ПД, глицерина и ОЭГ-1412 (см. табл. 1) позволяют утверждать, что у подопытных крыс развивается повышенная резистентность («привыкание») к этим криопротекторам. Коэффициенты кумуляции для 1,2-ПД, глицерина и ОЭГ-1412 настолько значительны, что не дают основания для сомнений в правомерности наших суждений, даже если учесть замечание Е. И. Люблиной [1] о том, что метод с нарастающими дозами, провоцируя усиление адаптации, в какой-то мере занижает степень кумуляции.

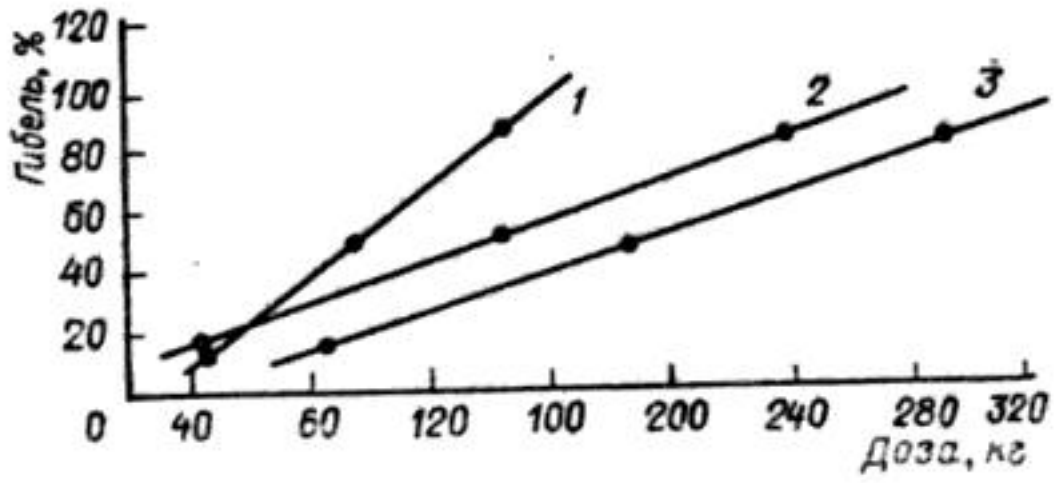


Рис. 1. Смертельные дозы 1,2-пропандиола (*3*), глицерина (*1*) и ОЭГ-1412 (*2*) для крыс в субхроническом опыте.

Отсутствие или крайне слабо выраженная степень кумуляции в действии изученных веществ и развитие к ним повышенной резистентности у подопытных крыс подтверждаются также величинами суммарных минимальных смертельных и среднесмертельных доз (см. табл. 1).

При сравнении степени повышения резистентности («привыкания») животных к исследуемым криопротекторам по величинам коэффициентов кумуляции можно расположить их в порядке нарастания выносливости в следующий ряд: 1,2-ПД, глицерин, ОЭГ-1412. Однако такое решение в нашем случае, по-видимому, было бы ошибочным, так как оно не учитывает абсолютных величин доз изученных веществ. Между

Таблица 2. **Динамика массы крыс в ходе изучения кумулятивных свойств 1,2-пропандиола, глицерина и ОЭГ-1412**

Вещество	Масса животных в процентах к исходному уровню, принятому за 100%					
	Дни определения массы					
	5-й	9-й	13-й	17-й	21-й	25-й
1,2-Пропандиол	106,82	106,85	111,64	120,0	120,71	124,22
Глицерин	97,7	103,87	101,67	103,72	103,6	102,2
ОЭГ-1412	101,76	104,08	102,11	107,12	108,8	117,11

тем, по данным Г. Н. Красовского и С. А. Шиган [3], большие дозы вещества могут парализовать адаптационные механизмы организма. Добавим к этому, что очень большие дозы (и тем более смертельные) парализуют адаптационные и компенсаторные процессы организма. В течение последней трети нашего эксперимента в организм животных 1,2-ПД вводился в больших и смертельных или близких к ним (от 9,11 г/кг до 20,4 г/кг) дозах. В таких дозах вещество не могло не оказать негативного, в том числе и парализующего влияния на адаптационно-компенсаторные процессы подопытных крыс, что, начиная с момента применения именно этих доз, и проявилось развитием признаков интоксикации с гибелью части подопытных животных.

Дозы глицерина и ОЭГ-1412, вводимые в этот период эксперимента, в абсолютных выражениях были в несколько раз меньшими, чем дозы 1,2-ПД. Они колебались от 3,33 до 7,44 г/кг для глицерина и от 3,95 до 8,84 г/кг — для ОЭГ-1412. По-видимому, именно это обстоятельство явилось причиной менее значительного влияния этих криопротекторов на адаптационно-компенсаторные процессы крыс в рассматриваемый период эксперимента, что и задержало на один-два дня начало гибели животных и уменьшило на 10% количество погибших животных, а также соответствующим увеличением коэффициентов кумуляции.

Матеріал, захищений авторським правом

Патоморфологическим исследованием установлено, что после введения 1,2-ПД, глицерина и ОЭГ-1412 в очень больших суммарных дозах (соответственно 188,64; 84,715 и 146,51 г/кг или 10,35; 12,7 и 18,54 однократных $ДЛ_{50}$) во внутренних органах подопытных крыс развиваются дистрофические, гипертрофические и гиперпластические процессы, наиболее выраженные в тканях почек, печени, селезенки и надпочечников, в меньшей мере — в структурах сердца, легких, головного мозга, желудка, тонкого и толстого отделов кишечника, а также в брюшине.

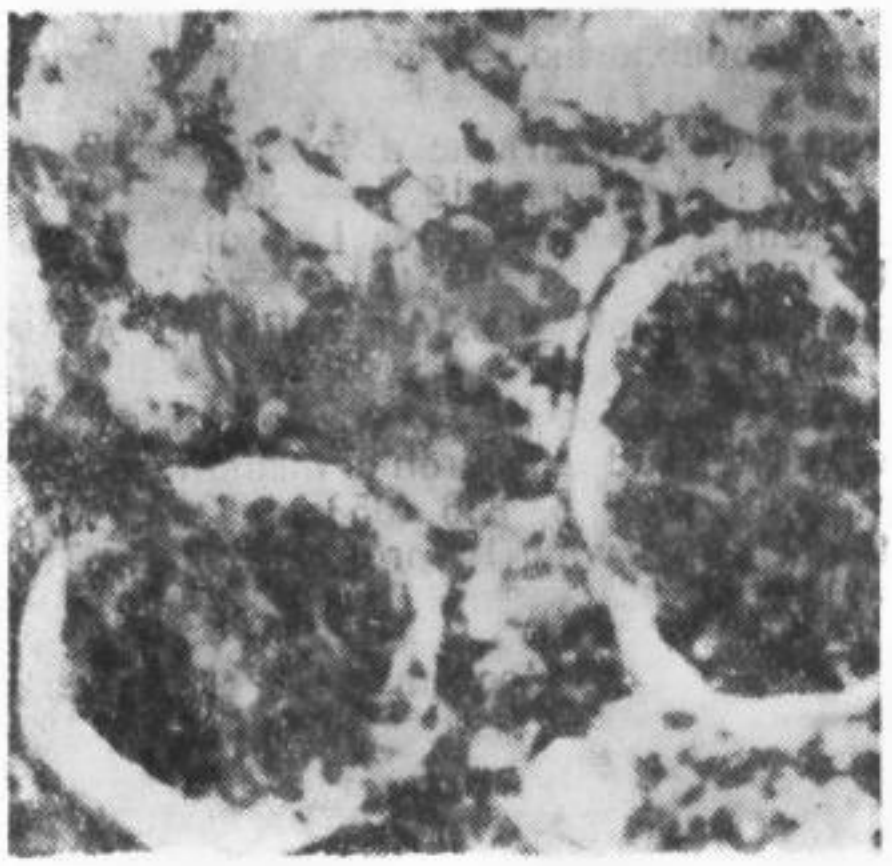


Рис. 2. Гидропическая дистрофия эпителия извитых канальцев почек крыс после введения растворов глицерина в суммарной дозе 84,71 г/кг (12,7 $ДЛ_{50}$).

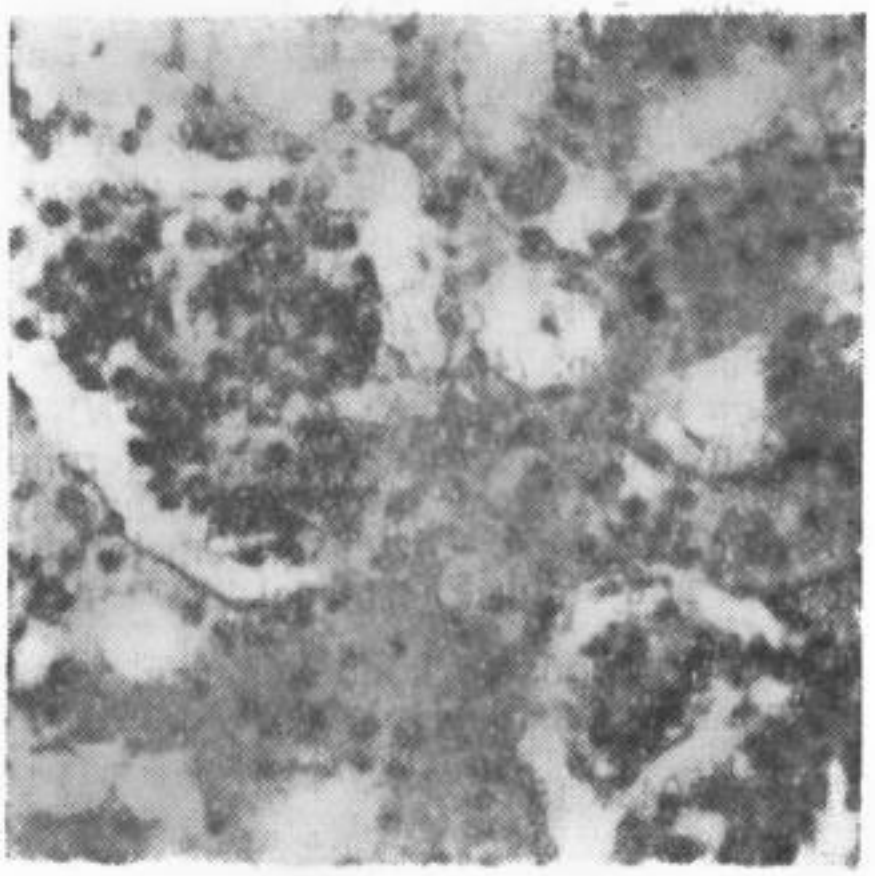


Рис. 3. Зернистая дистрофия эпителия извитых канальцев почек крыс после введения растворов 1,2-пропандиола в суммарной дозе 188,64 г/кг (10,3 $ДЛ_{50}$).

Альтеративные изменения в тканях органов в основном носят характер зернистой и гидропической дистрофии и наиболее выражены в эпителии проксимальных извитых канальцев почек. Необходимо, однако, отметить, что после воздействия 1,2-ПД эти изменения, в том числе и в почках, менее выявляются и, по-видимому, обратимы (рис. 2, 3). У животных этой группы в большей мере отмечается умеренное обезвоживание тканей, проявляющееся некоторым уплотнением и уменьшением объема эпителия дистальных извитых и прямых канальцев, собирательных трубок и структурных компонентов сосудистых клубочков почек, а также клеток печени и других органов.

Кроме того, у животных всех групп имеет место гипертрофия гепатоцитов и звездчатых эндотелиоцитов печени, кардиомиоцитов и эпителия пучковой зоны коры надпочечников, а также гиперплазия некоторых соединительнотканных элементов внутренних органов, появление периваскулярно молодых альцианофильных лаброцитов, что свидетельствует о развитии адаптационно-компенсаторных реакций у животных в ответ на введение очень больших доз исследуемых веществ.

Характер и степень выраженности развившихся в организме животных морфологических изменений, выявленных после введения очень высоких суммарных доз изученных веществ, хорошо согласуются с другими приведенными выше данными, свидетельствующими о чрезвычайно слабой степени выраженности или даже полном отсутствии кумулятивных процессов и четко выраженном повышении резистентности крыс к этим криопротекторам.

Выводы. 1,2-пропандиол, ОЭГ-1412 и глицерин в зависимости от условий их применения следует отнести к веществам с чрезвычайно слабой кумулятивной активностью или к вовсе некумулирующим химическим агентам. В изученном ряду веществ кумулятивнее других является глицерин. Повторное многократное введение 1,2-пропандиола, ОЭГ-1412 и глицерина повышает выносливость к ним животных.

Матеріал, захищений авторським правом

1. *Голубев А. А., Люблина Е. И., Толоконцев Н. А. и др.* Количественная токсикология. — Л. : Медицина. Ленингр. отд-ние, 1973. — 287 с.
2. *Гучок М. М., Гучок В. М.* Сравнительное исследование токсичности некоторых криопротекторов. — В кн.: I Укр. съезд гематологов и трансфузиологов : Тез. докл. Киев, 1980, с. 176.
3. *Красовский Г. Н., Шиган С. А.* К оценке механизма кумулятивного действия токсических веществ. — Гигиена и санитария, 1970, № 7, с. 17—21.
4. *Криопротекторы* / Н. С. Пушкарь, М. И. Шраго, А. М. Белоус, Ю. В. Калугин. — Киев : Наук. думка, 1978. — 201 с.
5. *Крышень П. Ф., Рафес Ю. И.* Сорбит, ксилит, глицерин и их применение в медицине. — Киев : Наук. думка, 1979. — 292 с.
6. *Пушкарь Н. С., Белоус А. М.* Введение в криобиологию. — Киев : Наук. думка, 1975. — 343 с.
7. *Саноцкий И. В., Уланова И. П.* Критерии вредности в гигиене и токсикологии при оценке опасности химических соединений. — М. : Медицина, 1975. — 328 с.
8. *Шраго М. И., Гучок М. М., Калугін Ю. В.* Спрямований синтез і комплексне вивчення кріопротекторів. — Вісн. АН УРСР, 1980, № 9, с. 35—40.
9. *Braun H. A., Cartland J. F.* Toxicity of propylene glycol. — J. Amer. Pharm. Assoc., 1936, **25**, p. 746—749.
10. *Lim K. S., Rink K. G., Glass H. G. et al.* A method for the evaluation of cumulation and tolerance by the determination of acute and subchronic median effective doses. — Arch. Intern. Pharmacodyn. Ther., 1961, **130**, p. 336—353.
11. *Ruddick J. A.* Toxicology, metabolism, and biochemistry of 1,2-propanediol. — Toxicol. and Appl. Pharmacol., 1972, **21**, p. 102—111.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
25.12.80

УДК 57.043:615

А. С. Капрельянц

ЭЛЕКТРОННО-ЦИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АТФ-АЗНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ ПРИ ОХЛАЖДЕНИИ

Общие закономерности изменения структуры и ультраструктуры клетки при действии низких температур исследовались многими авторами [6, 7]. Однако ультраструктурно-метаболические аспекты клеточных реакций при охлаждении остаются еще мало изученными. Цель настоящей статьи — изучение с помощью метода электронно-микроскопической цитохимии активности Mg — активируемой АТФ-азы, как интегрального показателя, осуществляющего связь между обменом веществ и обменом энергии в клетках печени в норме и при глубоком охлаждении.

Материалы и методы. Белые крысы массой 200—280 г умерщвлялись путем декапитации, после этого вскрывалась брюшная полость. С помощью биопсийной иглы извлекались кусочки ткани печени цилиндрической формы диаметром 1,4 мм и высотой 1 мм, которые прополаскивали в физиологическом растворе и охлаждали до —196°С со скоростью 1°С/мин. Для электронно-цитохимического определения Mg-активируемой АТФ-азой в клетках печени был использован свинцовый метод Вахштейн и Майзел [2]. Образцы фиксировали в параформальдегиде и после инкубации обезвоживали и заливали в смесь эпон-аралдит. Ультратонкие срезы изготавливали на ультрамикротоме УМТП-3М и просматривали в электронном микроскопе ЭВМ-100А при ускоряющем напряжении 75 кВ.

Результаты и их обсуждение. Mg-активируемая АТФ-азная активность в нативных клетках печени представляется электронно-оптически плотным осадком в виде мелких гранул и обнаруживалась в ядре и цитоплазме. В ядре АТФ-азная активность выявляется в ядрышке, в местах локализации хроматина, в межхроматиновых гранулах (рис. 1). В цитоплазме активность фермента определяется в плазматической мембране и митохондриях (см. рис. 1, 2). При этом отмечается в целом

Матеріал, захищений авторським правом

равномерный характер распределения АТФ-азной активности в цитоплазме. Описанная локализация ферментативной активности соответствует литературным данным по электронно-цитохимическому изучению Mg-зависимой АТФ-азы в нормальных гепатоцитах [3].

При охлаждении до — 196°С АТФ-азная активность обнаруживается в виде скопления электронно-оптически плотных гранул преимущественно в цитоплазме клеток — митохондриях и плазматической мембране (рис. 3—5). В ядре продукт электронно-цитохимической реакции почти не обнаруживается. АТФ-азная активность в охлажденных клетках печени располагается не на всем протяжении плазматической мембраны, а в определенных, чередующихся между собой зонах, в виде очаговых скоплений мелких электронно-оптически плотных гранул (см. рис. 3). При сравнении распределения продукта электронно-цитохимической реакции, связанного с плазматической мембраной, отмечается, что при охлаждении происходит изменение характера локализации осадка в сторону увеличения его количества в отдельных участках (см. рис. 1, 3).

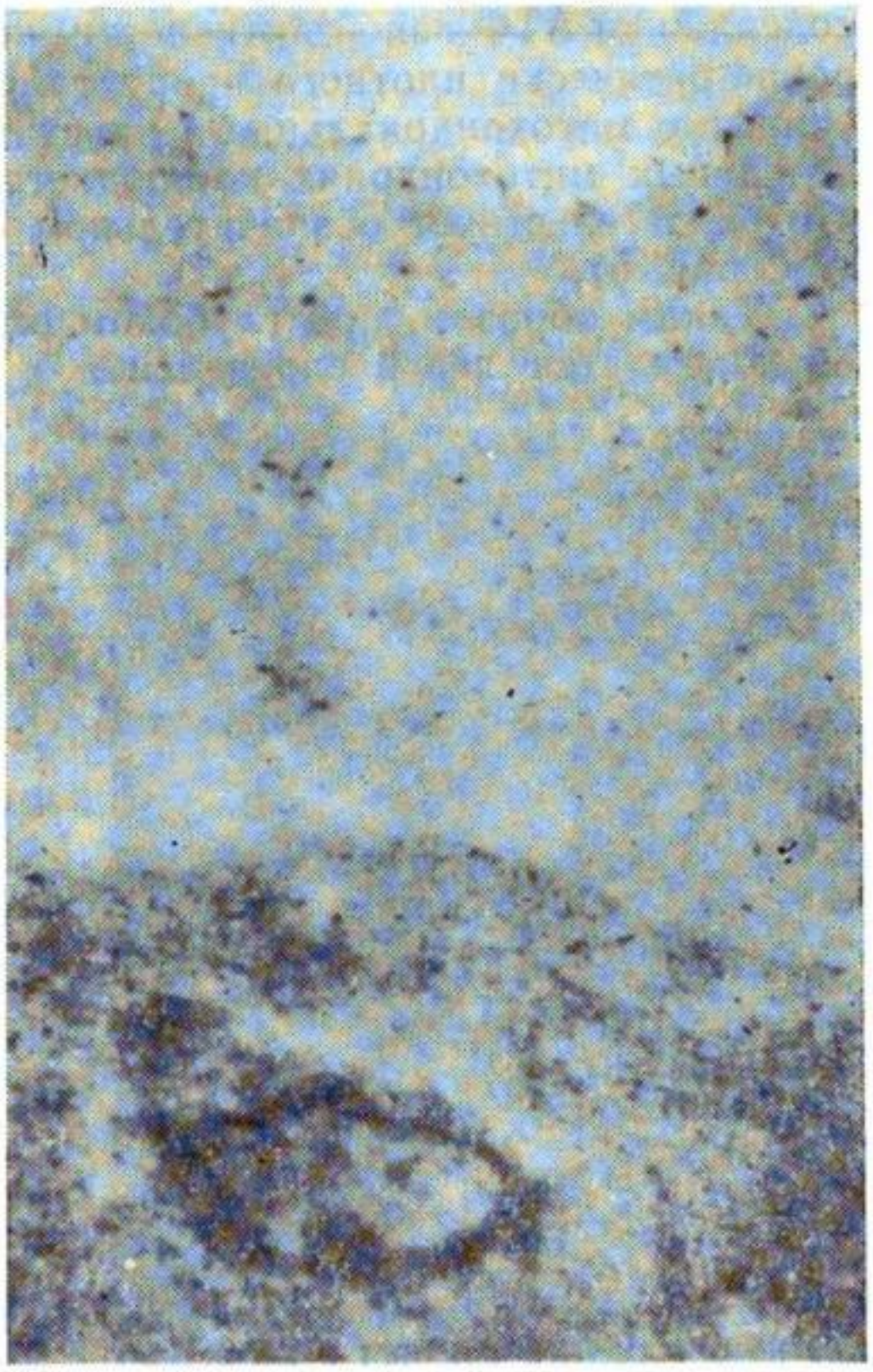


Рис. 1. Участок нативного гепатоцита: Mg - зависимая АТФ-аза определяется в виде мелких электронно-оптических гранул, связанных с плазматической мембраной митохондриями, ядерной мембраной, хроматином ядра и ядрышком. ×10 000.

В цитоплазме, в ряде митохондрий, также отмечается повышенное

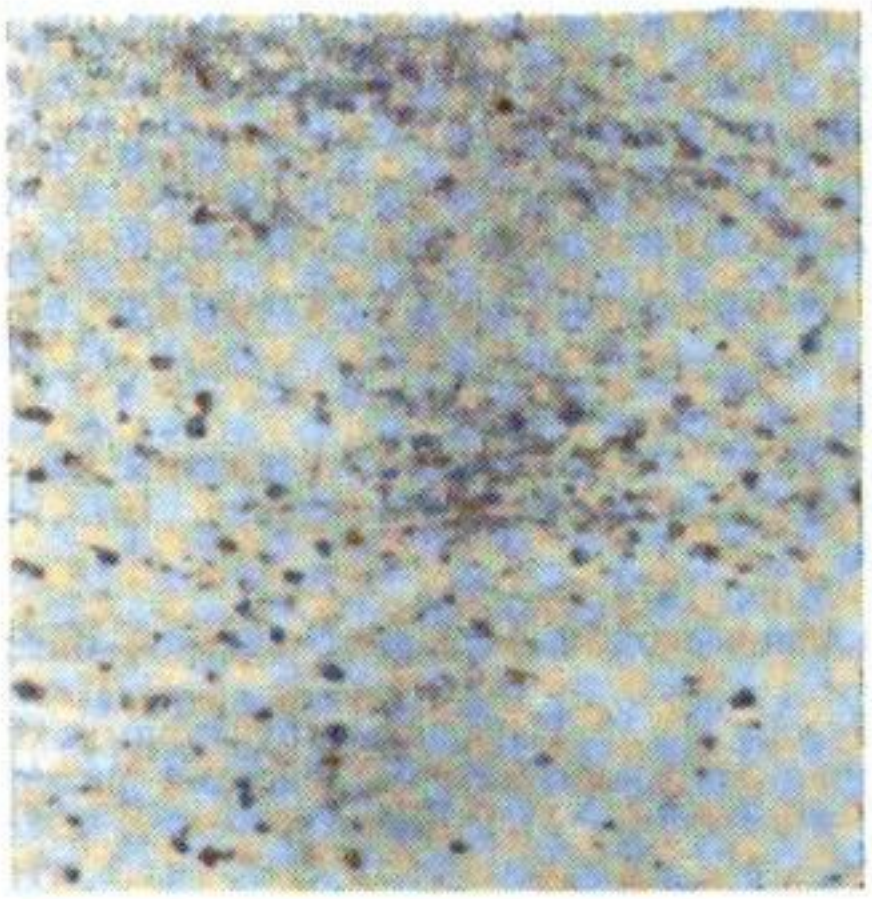


Рис. 2. Митохондрии нативного гепатоцита:

электронно-оптически плотные гранулы — места локализации Mg - зависимой АТФ-азы. ×30 000.

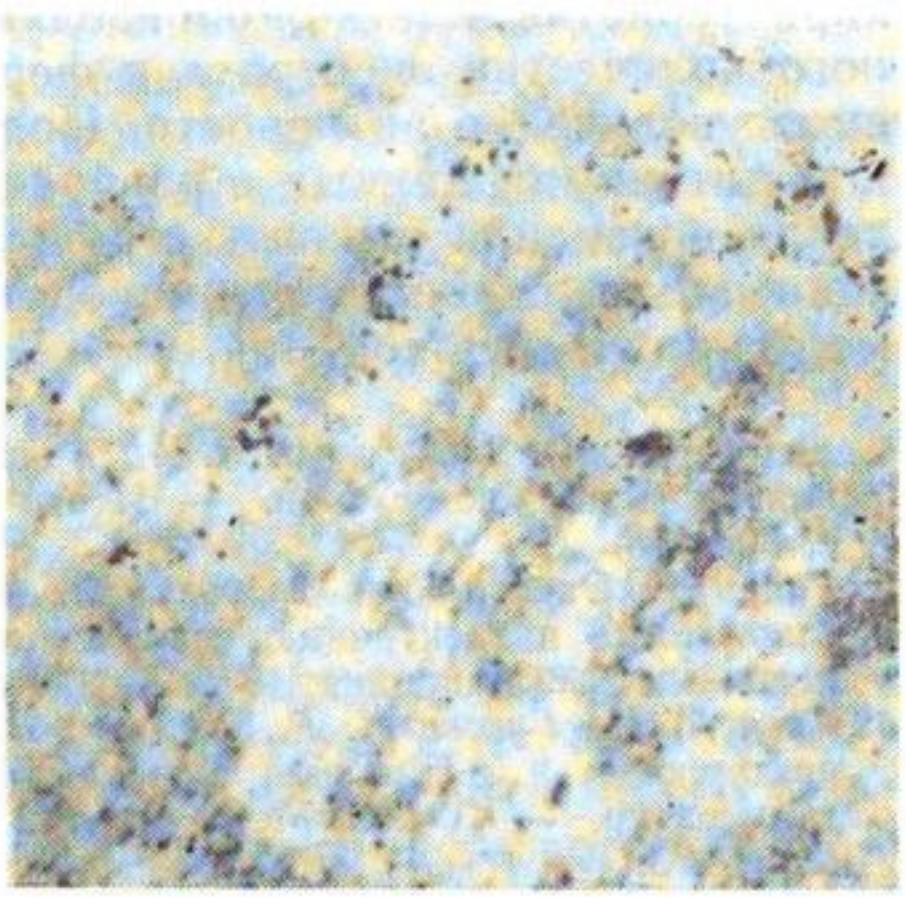


Рис. 3. Участок гепатоцита, охлажденного до —196°С:

продукт электронно-цитохимической реакции в виде дискретных скоплений мелких гранул располагается по ходу плазматической мембраны. ×10 000.

Матеріал, захищений авторським правом

содержание АТФ-азной активности, на что указывают скопления электронно-оптически плотного продукта реакции, по всей видимости связанные с митохондриальными кристами (см. рис. 4). В то же время в отдельных митохондриях наблюдается отложение единичных гранул, что свидетельствует о значительном снижении активности фермента (см. рис. 5).

Таким образом, при глубоком охлаждении (—196°С) клеток печени отмечается перераспределение и увеличение Mg-зависимой АТФ-

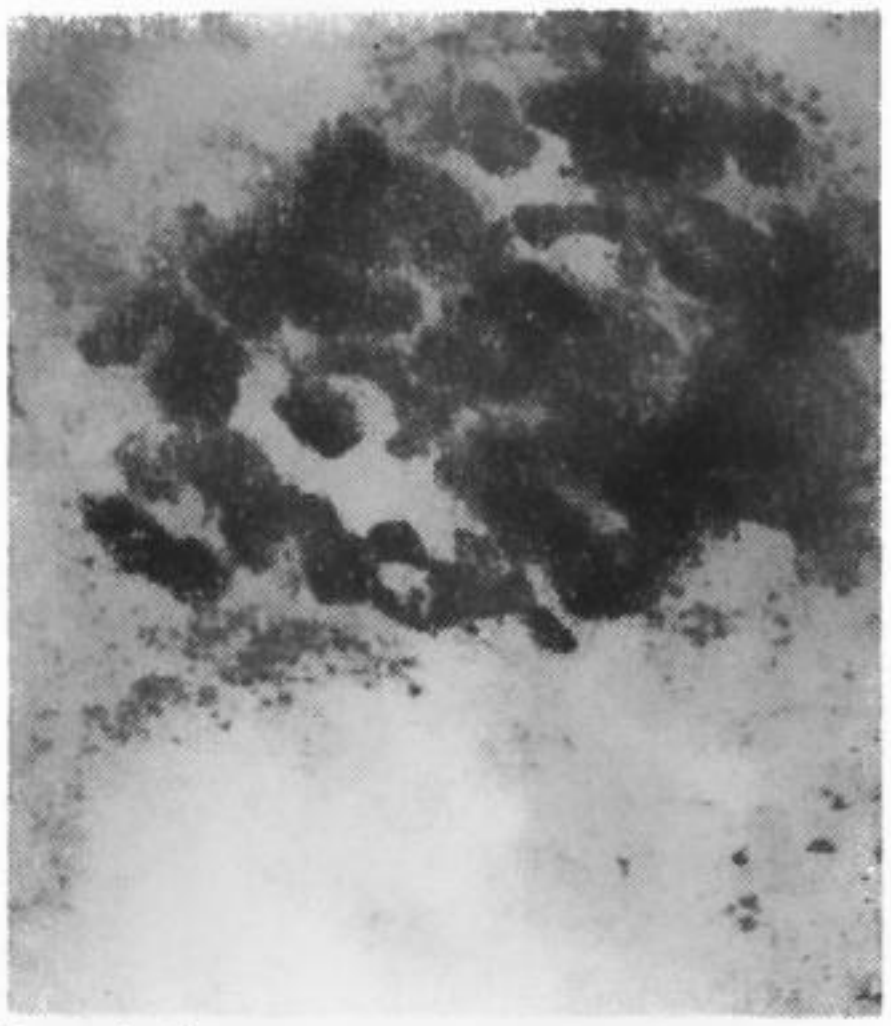


Рис. 4. Скопление электронно-оптически плотного продукта реакции в митохондрии охлажденного гепатоцита. ×30 000.

Рис. 5. Отдельные мелкие гранулы продукта реакции в митохондрии гепатоцита, охлажденного до —196°С. ×30 000.

азы, связанной с плазматической мембраной и митохондриями, что согласуется с результатами биохимических исследований АТФ-азной активности при действии низких температур [4, 5].

Учитывая ведущую роль фазовых переходов липидов в динамике образования криоповреждений мембран и регуляции активности АТФ-азы [1, 8], можно предположить, что обнаруженные сдвиги являются следствием изменения при охлаждении структурно-компартаментных характеристик клетки, определяющих возможность доступа повышенного количества субстрата к ферменту, что и обусловливает наблюдаемое увеличение активности. Полученные с помощью метода электронной цитохимии данные о распределении АТФ-азы в клетке при охлаждении позволили выявить структурно-метаболические перестройки, связанные с выраженной функциональной гетерогенностью плазматической мембраны и митохондрий.

1. *Белоус А. М., Бондаренко В. А., Бондаренко Т. П.* Молекулярные механизмы криоповреждений биомембран. — Итоги науки и техники. Сер. Биофизика, 1978, **9**, с. 80—113.
2. *Гайер Г.* Электронная гистохимия. — М.: Мир, 1974. — 292 с.
3. *Гистохимия* и электронная микроскопия в клинической и экспериментальной онкологии. — М.: Медицина, 1975. — 290 с.
4. *Грек А. М., Гусева Н. Р., Луговой В. И., Белоус А. М.* Изучение структурных характеристик и АТФ-азной активности мембран эритроцитов при действии низких температур. — В кн.: Международ. конгр. по холоду. М.: Внешторгиздат, 1975, с. 69—73.
5. *Грек А. М.* Изучение некоторых биофизических механизмов низких температур и криопротекторов на эритроциты: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 1979. — 18 с.
6. *Панков Е. Я., Шенберг М. Г., Маркова О. П., Капрельянц А. С.* Структурная характеристика криоповреждений и криозащиты клеток и тканей. — Probl. Hematol. Transfus. Transplant., 1976, **3**, N 3, s. 156—161.

Матеріал, захищений авторським правом

7. *Пушкарь Н. С., Капрельянц А. С., Панков Е. Я.* Ультраструктура клетки при низких температурах. — Киев: Наук. думка, 1978. — 140 с.
8. *Bertoli E., Finean J. B., Griffiths D. E.* The role of lipid in regulation of mitochondrial adenosine triphosphatase. — FEBS Lett., 1976, **61**, N 2, p. 163—165.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
22.09.80

УДК 57.043.621.372.852.6

А. С. Черепнев, Е. Л. Пиротти, В. М. Ушаков

РАССЕЯНИЕ ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫХ ВОЛН НА ЭЛЛИПСОИДАЛЬНОЙ НЕОДНОРОДНОСТИ В ЦИЛИНДРИЧЕСКОМ ВОЛНОВОДЕ

Одним из наиболее сложных вопросов низкотемпературной консервации органов животных и человека является их разогрев. С этой целью можно использовать СВЧ поля. Разогрев может производиться внутри волновода и резонатора. При этом необходимо знать электромагнитные поля внутри разогреваемого объекта, чтобы контролировать весь процесс и не допустить чрезмерных температурных градиентов. Рассмотрим случай волноводного разогрева.

Как известно, электрические и магнитные поля, рассеянные на эллипсоидальной неоднородности, можно определить с помощью векторов Герца [1]:

$$\vec{E}_{\text{расс}} = (\text{grad div} + k^2 \varepsilon_1 \mu_1)\,\vec{\Pi}_d^{\text{э}} - ik\mu_1 \,\text{rot}\,\vec{\Pi}_d^{\text{м}},$$
$$\vec{H}_{\text{расс}} = (\text{grad div} + k^2 \varepsilon_1 \mu_1)\,\vec{\Pi}_d^{\text{м}} + ik\varepsilon_1 \,\text{rot}\,\vec{\Pi}_d^{\text{э}}, \qquad (1)$$

где $\vec{\Pi}_d^{\text{э}}$ и $\vec{\Pi}_d^{\text{м}}$ в приближении квазистатики имеют вид

$$\vec{\Pi}_d^{\text{э}} = \hat{f}_1 \vec{d}_1, \quad \vec{\Pi}_d^{\text{м}} = \hat{f}_2 \vec{d}_2, \qquad (2)$$

а $\vec{d}_1$ и $\vec{d}_2$ — электрический и магнитный дипольные моменты эллипсоида; $\hat{f}_1$ и $\hat{f}_2$ — соответствующие им аффинорные функции Грина; $k = \frac{2\pi}{\lambda}$

ε_1 и μ_1 — электрическая и магнитная проницаемости среды, окружающей неоднородности. Поскольку разогреваемые биообъекты в большинстве случаев близки к эллипсоидальной форме, предложенная методика приемлема для решения поставленной задачи. В приведенных выражениях дипольные моменты определяются посредством нахождения внутренних полей эллипсоида из интегро-дифференциальных уравнений [2, 3]. Аффинорная функция Грина находится из волнового уравнения с дельтообразной правой частью

$$\Delta \hat{f}_{1,2} + k^2 \varepsilon_1 \mu_1 \hat{f}_{1,2} = -4\pi\delta(\vec{r} - \vec{r}_0)\hat{I}, \qquad (3)$$

где $\hat{I}$ — единичный тензор.

В прямоугольной системе координат это уравнение решается просто, все составляющие в нем разделяются и получается значение функции Грина для X, У и Z-компонент. В цилиндрической системе это сделать невозможно. Поэтому для решения векторного волнового уравнения в цилиндрической системе координат вектор поля записывается в виде суммы трех векторов [2]

$$\vec{L} = \text{grad}\,\varphi, \quad \vec{M} = \vec{e}_t^{\,0} \times \text{grad}\,\psi, \quad \vec{N} = k\vec{\chi}\vec{e}_t^{\,0} + \frac{1}{k}\text{grad}\left(\frac{\partial\chi}{\partial t}\right), \qquad (4)$$

Матеріал, захищений авторським правом

представляющих продольную и поперечную его части. Тогда аффинорные функции Грина можно представить в следующем виде:

$$\hat{f}_1(\vec{r}, \vec{r}_0) = \sum_{n,l} \{[\vec{e}_z^0 \times \operatorname{grad} \psi_{n,l}] \vec{F}^1_{n,l}(z, \vec{r}_0) + \vec{e}_z^0 \chi_{n,l} \vec{G}^1_{n,l}(z, \vec{r}_0) + \\ + \operatorname{grad} \chi_{n,l} \vec{H}^1_{n,l}(z, \vec{r}_0)\},$$

$$\hat{f}_2(\vec{r}, \vec{r}_0) = \sum_{n,l} \{[\vec{e}_z^0 \times \operatorname{grad} \chi_{n,l}] \vec{F}^2_{n,l}(z, \vec{r}_0) + \vec{e}_z^0 \psi_{n,l} \vec{G}^2_{n,l}(z, \vec{r}_0) + \\ + \operatorname{grad} \varphi_{n,l} \vec{H}^2_{n,l}(z, \vec{r}_0)\}. \qquad (5)$$

Для определения векторов $\vec{F}^{(1,2)}_{n,l}$, $\vec{G}^{(1,2)}_{n,l}$, $\vec{H}^{(1,2)}_{n,l}$ необходимо домножить функцию Грина на соответствующий каждому вектору множитель, подставить ее в волновое уравнение и проинтегрировать его по поперечному сечению волновода. В результате получим

$$\hat{f}_1(\vec{r}, \vec{r}_0) = 4i \sum_{n,l} \left\{ \frac{[\vec{e}_z^0 \times \operatorname{grad} \psi_{nl}(\rho, \psi)] * [\vec{e}_z^0 \times \operatorname{grad} \psi_{nl}(\rho_0, \varphi_0)]}{\beta^{\text{TE}}_{nl} [(\alpha'_{nl})^2 - n^2] I_2^n(\alpha'_{nl})} e^{i\beta^{\text{TE}}_{nl} z} + \right.$$

$$+ \frac{1}{\beta^{\text{TM}}_{nl} R^2 [I'_n(\alpha_{nl})]^2} [\vec{e}_z^0 * \vec{e}_z^0 \varkappa_{nl}(\rho, \varphi) \varkappa_{nl}(\rho_0 \varphi_0) +$$

$$\left. + \frac{R^2}{\alpha^2_{nl}} \operatorname{grad} \chi_{nl}(\rho, \varphi) * \operatorname{grad} \chi_{nl}(\rho_0 \varphi_0)] e^{i\beta^{\text{TM}}_{nl} z} \right\}, \qquad (6)$$

$$\hat{f}_2(\vec{r}, \vec{r}_0)\, 4i \sum_{n,l} \left\{ \frac{[\vec{e}_z^0 \times \operatorname{grad} \chi_{nl}(\rho, \varphi)] * [\vec{e}_z^0 \times \operatorname{grad} \chi_{nl}(\rho_0, \varphi_0)]}{\alpha^2_{nl} \beta^{\text{TM}}_{nl} [I'_n(\alpha_{nl})]^2} e^{i\beta^{\text{TM}}_{nl} z} + \right.$$

$$+ \frac{1}{\beta^{\text{TE}}_{nl} \left[1 - \left(\frac{n}{\alpha'_{nl}}\right)^2\right] I_n^2(\alpha'_{nl})} [\vec{e}_z^0 \times \vec{e}_z^0 \psi_{nl}(\rho, \varphi) \psi_{nl}(\rho_0 \varphi_0) +$$

$$\left. + \frac{R^2}{(\alpha'_{nl})^2} \operatorname{grad} \psi_{nl}(\rho, \varphi) * \operatorname{grad} \psi_{nl}(\rho_0 \varphi_0)] e^{i\beta^{\text{TE}}_{nl} z} \right\}.$$

Здесь знак * обозначает аффинорное умножение векторов; функции ψ_{nl} и χ_{nl} *имеют* следующий вид:

$$\psi_{nl} = I_n\left(\alpha'_{nl} \frac{\rho}{R}\right) \cos n\varphi, \quad \chi_{nl} = I_n\left(\alpha_{nl} \frac{\rho}{R}\right) \cos n\varphi. \qquad (7)$$

Рассмотрим частный случай рассеяния электромагнитных волн на хорошо проводящем сфероиде. Так как большинство биообъектов обладает высокой проводимостью, эта модель соответствует ряду прикладных задач. Кроме того, полученные в этом случае результаты легко проверить экспериментально.

Учитывая, что магнитная проницаемость ткани $\mu = 1$, имеем

$$\vec{d}_1 = a_3 \vec{E}_{\text{пад}}, \quad \vec{d}_2 = 0. \qquad (8)$$

Если заполнение волновода — воздух, то $\varepsilon_1 = \mu_1 = 1$ и рассеянные поля можно представить следующим образом:

$$\vec{E}_{\text{расс}} = a^3 \hat{P} \hat{f}_1 \vec{E}_{\text{пад}}, \quad \vec{H}_{\text{расс}} = ia^3 K \hat{Q} \hat{f}_1 \vec{E}_{\text{пад}}, \qquad (9)$$

где $\vec{E}_{\text{пад}}$ — амплитуда невозмущенного падающего электрического поля в точке с координатами центра неоднородности:

Матеріал, захищений авторським правом

$$\hat{P}=\begin{Vmatrix} \frac{\partial^2}{\partial\rho^2}+\frac{1}{\rho}\frac{\partial}{\partial\rho}-\frac{1}{\rho^2}+k^2 & \frac{1}{\rho}\frac{\partial^2}{\partial\rho\,\partial\varphi}-\frac{1}{\rho^2}\frac{\partial}{\partial\varphi} & \frac{\partial^2}{\partial\rho\,\partial z} \\ \frac{1}{\rho^2}\frac{\partial}{\partial\varphi}+\frac{1}{\rho}\frac{\partial^2}{\partial\rho\,\partial\varphi} & \frac{1}{\rho^2}\frac{\partial^2}{\partial\varphi^2}+k^2 & \frac{1}{\rho}\frac{\partial^2}{\partial\varphi\partial z} \\ \frac{1}{\rho}\frac{\partial}{\partial z}+\frac{\partial^2}{\partial\rho\,\partial z} & \frac{1}{\rho}\frac{\partial^2}{\partial\varphi\partial z} & \frac{\partial^2}{\partial z^2}+k^2 \end{Vmatrix}; \quad (10)$$

$$\hat{Q}=\begin{Vmatrix} 0 & -\frac{\partial}{\partial z} & \frac{1}{\rho}\frac{\partial}{\partial\varphi} \\ \frac{\partial}{\partial z} & 0 & -\frac{\partial}{\partial\rho} \\ -\frac{1}{\rho}\frac{\partial}{\partial\varphi} & \frac{1}{\rho}+\frac{\partial}{\partial\rho} & 0 \end{Vmatrix}; \quad (11)$$

a — радиус неоднородности, помещенной в волновод.

При нахождении рассеянных полей будем рассматривать случай, когда мода падающей и рассеянной волн одинакова, т. е. согласно дисперсионному уравнению все высшие моды затухают, а возможные низшие моды не возбуждаются. Исследуем два случая: случай основной H_{11}-волны и основной электрической E_{01}-волны.

В случае H_{11}-волны матрица падающего электрического поля имеет вид

$$\vec{E}_{\text{пад}}=\begin{pmatrix} E\rho \\ E\varphi \\ 0 \end{pmatrix} \quad (12)$$

Подставляя выражения (10)—(12) в (9), найдем выражения для компонент электрического и магнитного поля и, следовательно, значение коэффициента отражения для H_{11}-волны:

$$\eta_{11}^{\text{те}}=i\frac{4k^2a^3}{\beta_{11}^{\text{те}}\left[(\alpha_{11}')^2-1\right]I_1^2(\alpha_{11}')}\left[\frac{1}{\rho_0^2}I_1^2\left(\alpha_{11}'\frac{\rho_0}{R}\right)\sin^2\varphi_0+\left(\frac{\alpha_{11}'}{R}\right)^2 I_2'^1\left(\alpha_{11}'\frac{\rho_0}{R}\right)\cos^2\varphi_0\right]. \quad (13)$$

Соответственно для E_{01}-волны матрица падающего электрического поля имеет вид

$$\vec{E}_{\text{пад}}=\begin{pmatrix} E_\rho \\ 0 \\ E_z \end{pmatrix} \quad (14)$$

и коэффициент отражения

$$\eta_{01}^{\text{тм}}=i\frac{4a^3}{\beta_{01}^{\text{тм}}\left[I_0'(\alpha_{01})\right]^2}\left(\frac{\alpha_{01}}{R}\right)^2\left[\frac{1}{R^2}I_0^2\left(\alpha_{01}\frac{\rho_0}{R}\right)-\left(\frac{\beta_{01}^{\text{тм}}}{\alpha_{01}}\right)^2 I_0'^2\left(\alpha_{01}\frac{\rho_0}{R}\right)\right]. \quad (15)$$

Таким образом, получена графическая зависимость коэффициента отражения для H_{11} и E_{01}-волн от положения неоднородности в поперечном сечении волновода. Для волны H_{11} угол φ_0 брался равным нулю. Расчет произведен для случая $f=10^{10}$ Гц, диаметр волновода 3,01 см, диаметр сферы 0,3; 0,4; 0,5 см. Такие размеры взяты для облегчения экспериментальной проверки полученных результатов.

Матеріал, захищений авторським правом

На рис. 1 приведена зависимость $|\eta|=F(d)$ для H_{11}-волны. Видно, что поведение коэффициента отражения при перемещении шарика вдоль радиуса совпадает с распределением амплитуды падающего поля. Максимального значения коэффициент отражения достигает при нахождении неоднородности в центре волновода. С увеличением радиуса шарика коэффициент отражения возрастает. Фаза коэффициента отражения остается постоянной и равной $\frac{\pi}{2}$.

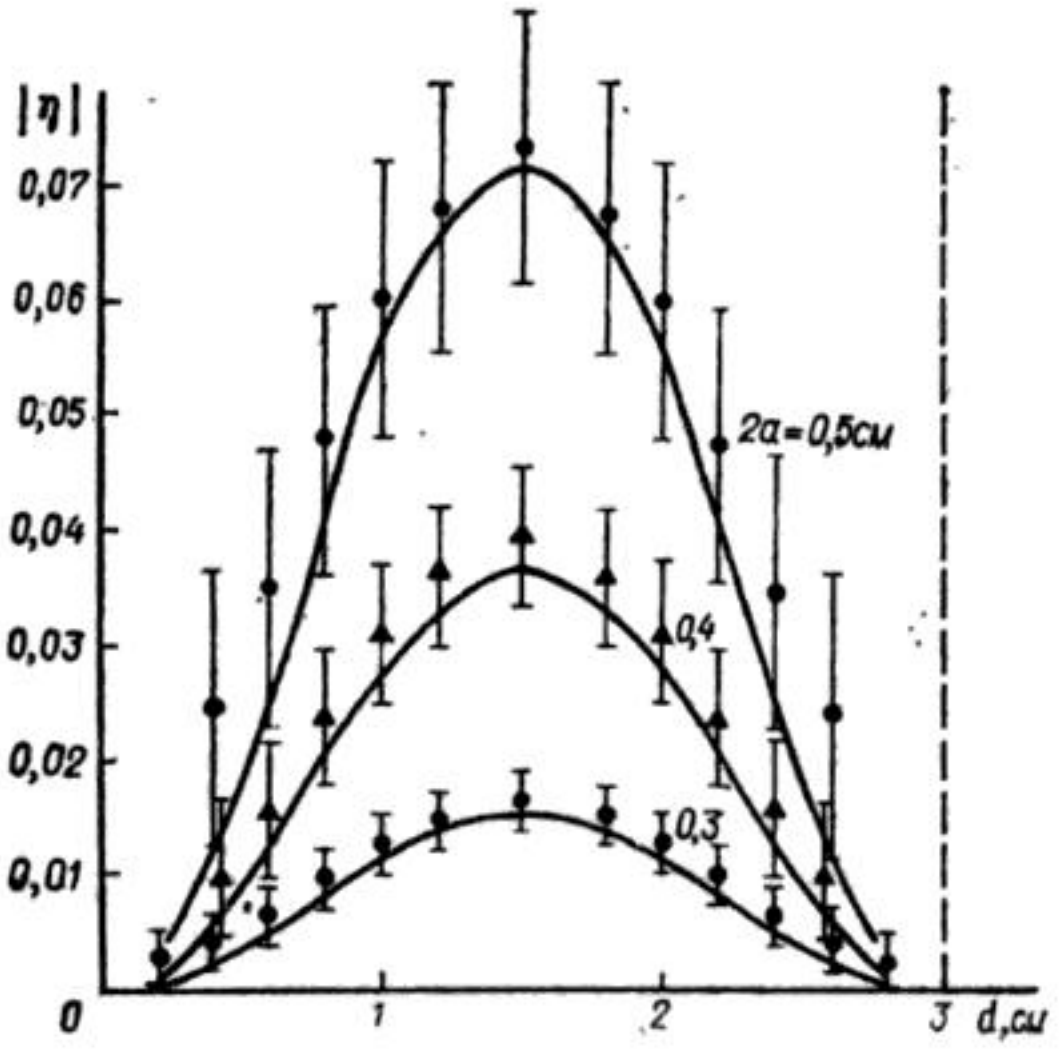


Рис. 1. Зависимость модуля коэффициента отражения от перемещения сферы поперек волновода, H_{11}-волна.

На рис. 2, *а* изображена зависимость $|\eta|=F(d)$ для E_{01}-волны. Максимум $|\eta|$ находится в центре волновода. Затем коэффициент отражения уменьшается, в точках 0,18 d и 0,82 d достигает нуля и вновь увеличивается при приближении к стенкам. На рис. 2, *б* видно, что в момент достижения коэффициентом отражения нуля фаза его переворачивается на 180°С. Это связано с тем, что амплитуды E_ρ и E_z — компонент падающего поля — повернуты одна относительно другой на $\frac{\pi}{2}$. Здесь также представлена зависимость коэффициента отражения от размеров неоднородности.

Было проведено экспериментальное исследование эффекта рассеяния электромагнитных волн типа H_{11} и E_{01} на одной металлической сфере, помещенной в цилиндрический волновод. Для проведения экспериментального исследования использовалась измерительная установка, блок-схема которой приведена на рис. 3. Здесь *1* — генератор стандартных сигналов, *2* — ферритовый вентиль, *3* — аттенюатор, *4* — возбудитель волн типа H_{11} (E_{01}), *5* — измерительная линия на волноводе круглого сечения, 6 — измерительный усилитель, *7* — измерительная секция, *8* — нагрузка на волноводе круглого сечения.

Измерительная секция с неоднородностью представляет собой отрезок стандартного волновода круглого сечения с соединительными фланцами, имеющий два диаметрально противоположных отверстия, расположенных таким образом, что ось, соединяющая эти отверстия, проходит через центр волновода. Для устранения излучения отверстия

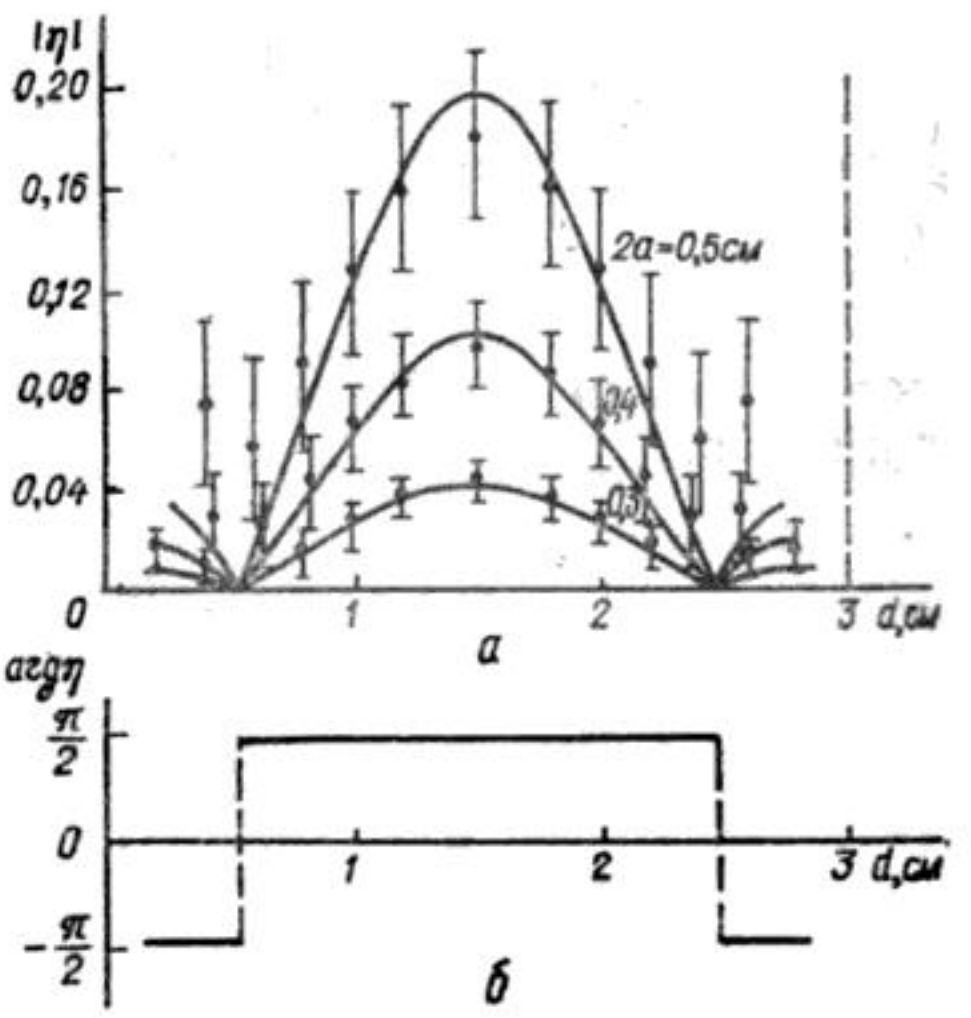


Рис. 2. Зависимость модуля коэффициента отражения от перемещения сферы поперек волновода, E_{01}-волна *(а)*; $\lambda=3$ см, круглый волновод, $2R=3{,}01$ см. Зависимость фазы коэффициента отражения от перемещения сферы поперек волновода *(б)*.

Матеріал, захищений авторським правом

выполнены в виде запредельных волноводов. В качестве неоднородностей использовались сферы, изготовленные из меди. Неоднородность крепилась в волноводе с помощью кварцевой нити.

Точность нахождения коэффициента отражения определяется в основном измерительной линией и точностью установки неоднородности в волноводе.

На данной измерительной установке был замерен коэффициент отражения от единичной сферы диаметром 0,3; 0,4; 0,6 см. Суммарная погрешность измерительной установки не превышала 17%.

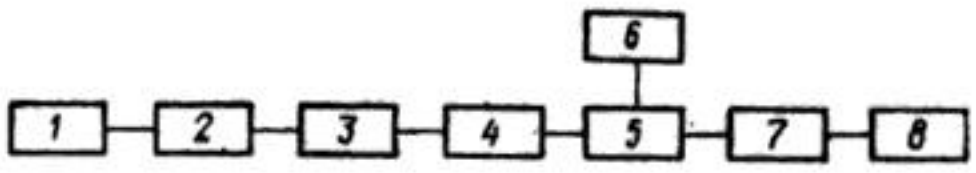


Рис 3. Блок-схема измерительной установки.

Результаты измерений изображены на рис. 1 и 2, *а* в виде точек с усиками, определяющими погрешность установки. Наблюдается хорошее совпадение теоретических и экспериментальных результатов, различие их не превышает 9%. Увеличение расхождения между теорией и экспериментом вблизи стенок волновода объясняется влиянием их на наведенный на неоднородности дипольный момент, что не учтено в теоретических результатах.

Таким образом, на основании изложенного метода выведены частные соотношения для определения рассеяния электромагнитных волн на хорошо проводящих сферах, находящихся внутри волновода круглого сечения. Проведена экспериментальная проверка теоретических соотношений. Расхождение между теоретически и экспериментально полученными данными не превышает 9%, что лежит в пределах погрешности установки.

1. *Левин Л.* Современная теория волноводов. — М.: Изд-во иностр. лит-ры, 1954. — 215 с.
2. *Морс Ф. М., Фешбах Г.* Методы теоретической физики: В 2-х т. — М.: Изд-во иностр. лит-ры. 1960. — Т. 2. 886 с.
3. *Хижняк Н. А.* Функция Грина уравнений Максвелла для неоднородных сред. — Журн. теорет. физики, 28, № 7, 1958, с. 1592—1609.
4. *Хижняк Н. А.* Рассеяние электромагнитных волн на малых телах в волноводах. — Радиотехника, 1967, вып. 4, с. 88—97.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
04.12.80

УДК 57.043

А. С. Черепнев

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЭРИТРОЦИТОВ С ВНЕШНИМ ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫМ ПОЛЕМ

Изучение влияния внешнего электромагнитного поля на клетки крови может представлять существенный интерес в двух аспектах. Во-первых, это исследование характера действия излучения различной интенсивности на структурно-функциональные свойства клеток и, во-вторых, выяснение возможности использования внешнего электромагнитного поля как стабилизатора мембран клеток в процессе их низкотемпературной консервации [1]. Учитывая, что среди клеток крови свойства эритроцитов хорошо изучены [5], в настоящей статье рассматривается математическая модель взаимодействия эритроцитов с внешним электромагнитным полем.

При движении эритроцитов в кровеносном сосуде наблюдается эффект Бернулли, в результате чего скорость движения плазмы является функцией расстояния от оси сосуда. Разность скоростей отдельных слоев плазмы ориентирует эритроциты ортогонально к поперечному сечению сосуда и радиально к его стенкам. В поперечном сечении

Матеріал, захищений авторським правом

сосуда образуются концентрические кольца эритроцитов, следующие друг за другом вдоль оси сосуда. Получается радиально-кольцевая система расположения эритроцитов.

При разности скоростей движения плазмы появляются разности гидродинамических усилий, приложенных к диаметрально противоположным точкам эритроцита, центр которого находится между осью и

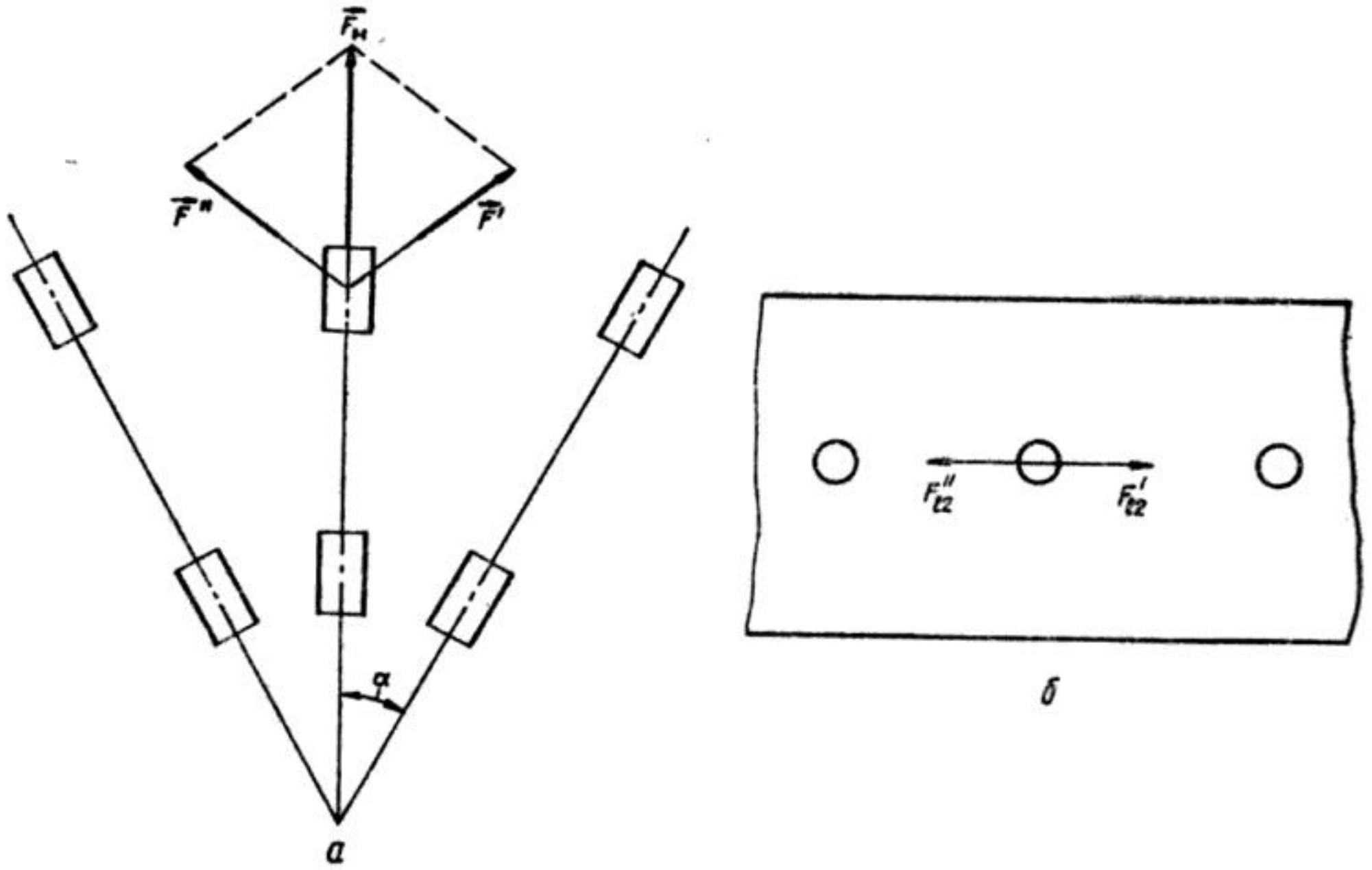


Рис. 1. Схема расположения эритроцитов:
а — поперечное сечение кровеносного сосуда; *б* — продольное сечение.

стенкой сосуда. Эти усилия компенсируются электростатическими и магнитостатическими силами взаимодействия эритроцитов.

Считая эритроциты заряженными дисками, в работе [5] получены выражения для сил электростатического взаимодействия двух эритроцитов F_{11}, находящихся в параллельных плоскостях, и двух эритроцитов F_{12}, находящихся в одной экваториальной плоскости. Там же приводится формула для определения силы магнитного взаимодействия $F_м$ двух эритроцитов, как силы взаимодействия двух круговых токов.

Модель равновесия сил [5], действующих на эритроцит в плазме, требует уточнения. Равнодействующая электростатических сил F_{12}, действующих между соседними эритроцитами в разных концентрических кольцах одного поперечного сечения, экваториальная плоскость которых совпадает, равна нулю и не может компенсировать гидродинамических усилий.

Гидродинамические силы, стремясь передвинуть отдельные эритроциты к оси сосуда, сжимают кольца эритроцитов. Это приводит к уменьшению диаметра кольца и расстоянию между соседними эритроцитами данного кольца, что вызывает быстрое возрастание электростатических сил отталкивания F_{11}. Равнодействующая этих сил и противодействует гидродинамическим усилиям.

Схематическое расположение эритроцитов в поперечном сечении сосуда приведено на рис. 1, *а*. Векторы $\vec{F}'$ и $\vec{F}''$ — сумма электростатических и магнитных сил, действующих на средний эритроцит. Их векторная сумма $\vec{F}$ компенсирует гидродинамическую силу $\vec{F}_н$. При

Матеріал, захищений авторським правом

$\alpha = 17°$ условие равновесия в поперечном сечении сосуда выглядит следующим образом:

$$F_н = 0{,}296\ (F_{t1} - F_м). \tag{1}$$

Условие равновесия в продольном сечении сосуда (см. рис. 1, *б*) сводится к равенству электростатических сил, действующих между двумя соседними эритроцитами

$$F'_{t2} = F''_{t2}\ . \tag{2}$$

Для определения составляющих электромагнитного поля в кровеносном сосуде будем считать его бесконечным цилиндром радиуса b. Диэлектрическая ε_1 и магнитная μ_1 проницаемости этого цилиндра равны диэлектрической и магнитной проницаемости крови. Проницаемости стенок сосуда и окружающей среды — ε и μ. Кровеносный сосуд облучается плоской электромагнитной волной. Система координат правая, ось OZ совпадает с осью кровеносного сосуда.

Строгое решение дифракционной задачи на цилиндре сводится к решению уравнений Максвелла при заданных граничных условиях для составляющей электромагнитного поля на поверхности цилиндра. Рассмотрим два случая поляризации падающей на сосуд волны. В первом случае вектор электрической напряженности поля направлен вдоль оси Z и граничные условия следующие:

$$\dot{E}_{x0} = \dot{E}_0\, e^{ikx};\ \dot{H}_{y0} = \dot{H}_0\, e^{ikx};\ \dot{E}_{x0} = \dot{E}_{y0} = \dot{H}_{x0} = \dot{H}_{z0} = 0.$$

Для этого случая, используя результаты работы [2—4], составляющие электромагнитного поля в цилиндрической системе координат запишутся в виде

$$\dot{E}_z = \sum_{m=-\infty} A_m I_m (k_1, \rho)\, e^{im\varphi}, \tag{3}$$

$$\dot{H}_\varphi = -\sum_{m=-\infty} \frac{i}{z_1} A_m I'_m (k_1 \rho)\, e^{im\varphi}, \tag{4}$$

$$\dot{H}_\rho = -\sum_{m=-\infty} \frac{mc}{\omega\mu'\delta} A_m I_m (k_1, \rho)\, e^{im\varphi}, \tag{5}$$

где

$$A_m = i^m \dot{E}_0 \frac{I_m (k, в) H^{(2)'}_m (k, в) - \frac{1}{k} I'_m (k, в) H^{(2)'}_m (k, в)}{I_m (k_1, в) H^{(2)'}_m (k, в) - \frac{z}{z_1} I'_m (k_1, в) H^{(2)'}_m (k, в)}\ ; \tag{6}$$

$I_m(x)$, $H^{(2}_m$ (x) — функция Бесселя и Ханкеля порядка m; $I'_m(x)$, $H^{(2)'}_m(x)$ — производные функций Бесселя и Ханкеля; $\dot{E}_0$ — комплексная амплитуда электрической напряженности падающей волны; $k_1 = \frac{\omega}{c}\sqrt{\varepsilon_1 \mu_1}$, $k = \frac{\omega}{c}\sqrt{\varepsilon\mu}$ — волновые числа цилиндра и окружающей его среды; ω — круговая частота падающего поля; c — скорость света в вакууме; $z_1 = \sqrt{\frac{\mu_1}{\varepsilon_1}}$ $z = \sqrt{\frac{\mu}{\varepsilon}}$ — волновые сопротивления цилиндра и окружающей его среды.

Во втором случае вдоль оси OZ направлен вектор магнитной напряженности поля и граничные условия следующие:

$$\dot{H}_{z0} = \dot{H}_0\, e^{ikx};\ \dot{E}_{y0} = \dot{E}_0\, e^{ikx};\ \dot{E}_{x0} = \dot{E}_{z0} = \dot{H}_{x0} = \dot{H}_{y0} = 0.$$

Матеріал, захищений авторським правом

Составляющие электромагнитного поля внутри сосуда запишутся в виде

$$\dot{H}_z = \sum_{m=-\infty}^{\infty} A'_m \, I_m(k_1, \rho)\, e^{im\varphi}, \tag{7}$$

$$\dot{E}_\varphi = \sum_{m=-\infty}^{\infty} i z_1 \, A'_m \, I'_m(k_1, \rho)\, e^{im\varphi}, \tag{8}$$

$$\dot{E}_\rho = \sum_{m=-\infty}^{\infty} \frac{mc}{\omega \varepsilon_1 \rho} A'_m \, I_m(k_1 \rho)\, e^{im\varphi}, \tag{9}$$

где

$$A'_m = (i)^m \dot{H}_0 \, \frac{I_m(k, b)\, H_m^{(2)'}(k, b) - \frac{1}{k} I'_m(k, b)\, H_m^2(k, b)}{I_m(k, b)\, H_m^{(2)'}(k, b) - \frac{z_1}{z} I'_m(k, b)\, H_m^{(2)'}(k, b)}, \tag{10}$$

$\dot{H}_0$ — комплексная амплитуда магнитной напряженности падающей волны.

Для определения силы, действующей со стороны электромагнитного поля внутри кровеносного сосуда на эритроцит, воспользуемся формулой [3]

$$\vec{F} = \frac{1}{4\pi} \int_s \{\varepsilon_1 (\vec{E}_s \vec{n})\, \vec{E}_s + \mu_1 (\vec{H}_s \vec{n})\, \vec{H}_s - \frac{1}{2} (\varepsilon_1 E_s^2 + \mu_1 H_s^2) \vec{n}\}\, ds, \tag{11}$$

где интегрирование ведется по поверхности эритроцита, $\vec{F}_s$ и $\vec{H}_s$ — векторы поля на поверхности; $\vec{n}$ — —нормаль к поверхности.

Чтобы найти E_s и H_s, будем считать эритроцит диском радиуса R и высоты $R/2$. Электромагнитные свойства эритроцита определяются его диэлектрической ε_2 и магнитной μ_2 проницаемостями. Найдем внутреннее поле эритроцита через падающее на него поле, а затем с помощью граничных условий вычислим поле на его поверхности.

Так как размеры эритроцита значительно меньше длины падающей на него волны, то можно считать, что эритроцит находится в однородном поле. Внутреннее поле диска-эритроцита также будет однородным.

Для случая, когда $\vec{E}_0$ параллельно оси кровеносного сосуда, внутреннее поле эритроцита, как сплющенного эллипсоида вращения [4], определяется выражениями

$$E_z^l = \frac{E_z}{1 + \frac{I_z}{4\pi}\left(\frac{\varepsilon_2}{\varepsilon_1} - 1\right)}, \tag{12}$$

$$H_x^l = \frac{H\rho}{1 + \frac{I_x}{4\pi}\left(\frac{\mu_2}{\mu_1} - 1\right)}, \tag{13}$$

$$H_y^l = \frac{H_\varphi}{1 + \frac{I_y}{4\pi}\left(\frac{\mu_2}{\mu_1} - 1\right)}, \tag{14}$$

где E_z, H_ρ, H_φ — амплитуды поля, определяемые выражениями (3)—(5);

$$I_z = I_x = 2\pi R^3 \int_0^\infty \frac{ds}{(R^2 + s)(R^2 + 16s)^{1/2}}; \tag{15}$$

Матеріал, захищений авторським правом

$$I_y = 32\pi R^3 \int_0^{\infty} \frac{ds}{(R^2+s)(R^2+16s)^{3/2}} \cdot \qquad (16)$$

Поле на боковой поверхности диска будет

$$\vec{E}_s = E_x \vec{i} + E_z \vec{k} \ , \qquad (17)$$

$$\vec{H}_s = H_x \vec{i} + \vec{H}_y j + \vec{H}_z \vec{k}, \qquad (18)$$

где

$$E_x = \frac{4\pi\sigma}{\varepsilon_1 R} x_1 + E_z^i \frac{1}{R^2}\left(\frac{\varepsilon_2}{\varepsilon_1} - 1\right) x_1 z_1$$

$$E_y = 0;$$

$$E_z = \frac{4\pi\sigma}{\varepsilon_1 R} z_1 + E_z^i \frac{1}{R^2}\left(\frac{\varepsilon_2}{\varepsilon_1} z_1^2 + x_1^2\right);$$

$$H_x = H_x^i \frac{1}{R^2}\left(\frac{\mu_2}{\mu_1} x_1^2 + z_1^2\right);$$

$$H_y = H_y^i;$$

$$H_z = H_x^i \frac{1}{R_2}\left(\frac{\mu_2}{\mu_1} - 1\right) x_1 z_1;$$

$\delta = \dfrac{Q}{2\pi R^2}$ — поверхностная плотность заряда эритроцита.

На торцах диска поле

$$\vec{E}_s = E_z \vec{k} \ , \qquad (19)$$

$$\vec{H}_s = H_x \vec{i} + \vec{H}_y \vec{j}, \qquad (20)$$

где

$$E_z = E_z^i;$$

$$H_x = H_x^i;$$

$$H_y = \frac{\mu_2}{\mu_1} H_y^i;$$

Подставляя выписанные выражения в уравнение (11) и интегрируя, получаем составляющие силы, действующей со стороны поля на эритроцит:

$$F_x = F_y = 0;$$

$$F_z = \frac{R^2}{2\pi}\left\{\frac{(4\pi\sigma)^2}{2\varepsilon_1} + \pi^2 \sigma E_z^i \left(\frac{\varepsilon_2}{\varepsilon_1} + 1\right) + (E_z^i)^2 \left(\frac{\varepsilon_2^2}{3\varepsilon_1} + \right.\right.$$

$$\left.\left. + \frac{\varepsilon^2}{3} - \frac{\varepsilon_1}{6}\right) + (H_x^i)^2 \left(\frac{\mu_2^2}{6\mu_1} - \frac{\mu_2}{3} - \frac{\mu_1}{3}\right) - \frac{\mu^1}{2}(H_y^i)^2\right\}. \qquad (21)$$

Аналогичным образом определяем составляющие силы, действующей на эритроцит, для случая, когда вдоль оси кровеносного сосуда направлен вектор $\vec{H}$. В окончательном виде запишем следующим образом:

Матеріал, захищений авторським правом

$$F_x = 2\pi R^2\sigma\left(\frac{\varepsilon_2}{\varepsilon_1}+1\right)E_x^i;$$

$$F_y = \pi R^2\sigma E_y^i;$$

$$F_z = \frac{R^2}{2\pi}\left\{\frac{(4\pi\sigma)^2}{2\varepsilon_1}+\left(\frac{\varepsilon_2^2}{6\varepsilon_1}-\frac{\varepsilon_2}{3}-\frac{\varepsilon_1}{3}\times\right)\right. \tag{22}$$

$$\left.\times (E_x^i)^2-\frac{\varepsilon_1}{2}(E_y^i)^2+\left(\frac{\mu_2}{3\mu_1}+\frac{\mu_2}{3}-\frac{\mu_1}{6}\right)(H_z^i)^2\right\}.$$

Так как расстояние между соседними эритроцитами очень мало́, то силу F_y следует трактовать как силу притяжения между ними. Она будет уменьшать радиус кольца эритроцитов. Сила F_x будет направлена параллельно гидродинамической силе $F_н$ и условие равновесия (1) в поперечном сечении сосуда запишем в виде

$$F_н - F_x = 0{,}296\ (F_{li} - F_m - F_y). \tag{23}$$

Когда вектор $\vec{H}$ направлен перпендикулярно оси кровеносного сосуда, то из выражения (21) следует, что условие (1) не меняется.

При наличии внешнего поля сила F_z уменьшает одну из электростатических сил F_{l2}, действующих между двумя соседними эритроцитами в продольном сечении сосуда. Вследствие этого условие равновесия (2), справедливое при отсутствии внешнего поля, видоизменяется. В окончательном виде, с учетом выражения E_{l2} (2), запишем следующим образом:

$$\frac{Q^2}{\varepsilon_1[(r+r_1)^2+R_э^2]}\left[1+\frac{3R_э^2}{4[(r+r_1)^2+R_э^2]}\right]=\frac{Q^2}{\varepsilon_1[(r-r_1)+^2R_э^2]}\times$$

$$\times\left[1+\frac{3R_э^2}{4[(r-r_1)^2+R_э^2]}\right]-F_z, \tag{24}$$

где r и r_1 — расстояние между центрами эритроцитов; Q — заряд эритроцита; $R_э$ — радиус диска, являющегося моделью эритроцита.

Условие равновесия эритроцитов в плазме крови при ее облучении и выражения для составляющих поля позволяют рассчитать электрическую напряженность облучающего поля, при которой наблюдается патологическое изменение характера кровотока — слипание эритроцитов. Пользуясь известной формулой связи мощности и напряженности, обычно рассчитываем критическую мощность $P_{кр}$, под которой понимаем плотность потока энергии падающего на кровеносный сосуд поля, вызывающую эффект слипания эритроцитов.

Результаты расчетов, выполненных на машине СМ-1 при определенных параметрах эритроцитов и кровеносного русла, для разных длин волн λ облучающего поля приведены в виде графиков.

На рис. 2 показан график $P_{кр}=f(\lambda)$ для случая, когда вектор $\vec{E}$ направлен вдоль оси кровеносного сосуда. При длинах волн от 0,3 до 5 см наблюдается существенное изменение уровня критической мощности, а при $\lambda>5$ см критическая мощность практически не зависит от длины волны. Это можно объяснить следующим образом.

Силы взаимодействия между соседними эритроцитами вызываются поляризационными эффектами. При помещении эритроцита в электромагнитное поле на его поверхности происходит перераспределение заряда, что приводит к возникновению дипольного момента эритроцита. Ориентация диполей такова, что возникающая между ними сила взаимодействия стремится сблизить эритроциты.

Величина дипольного момента определяется количеством перераспределенного по поверхности эритроцита заряда. Так как скорость

Матеріал, захищений авторським правом

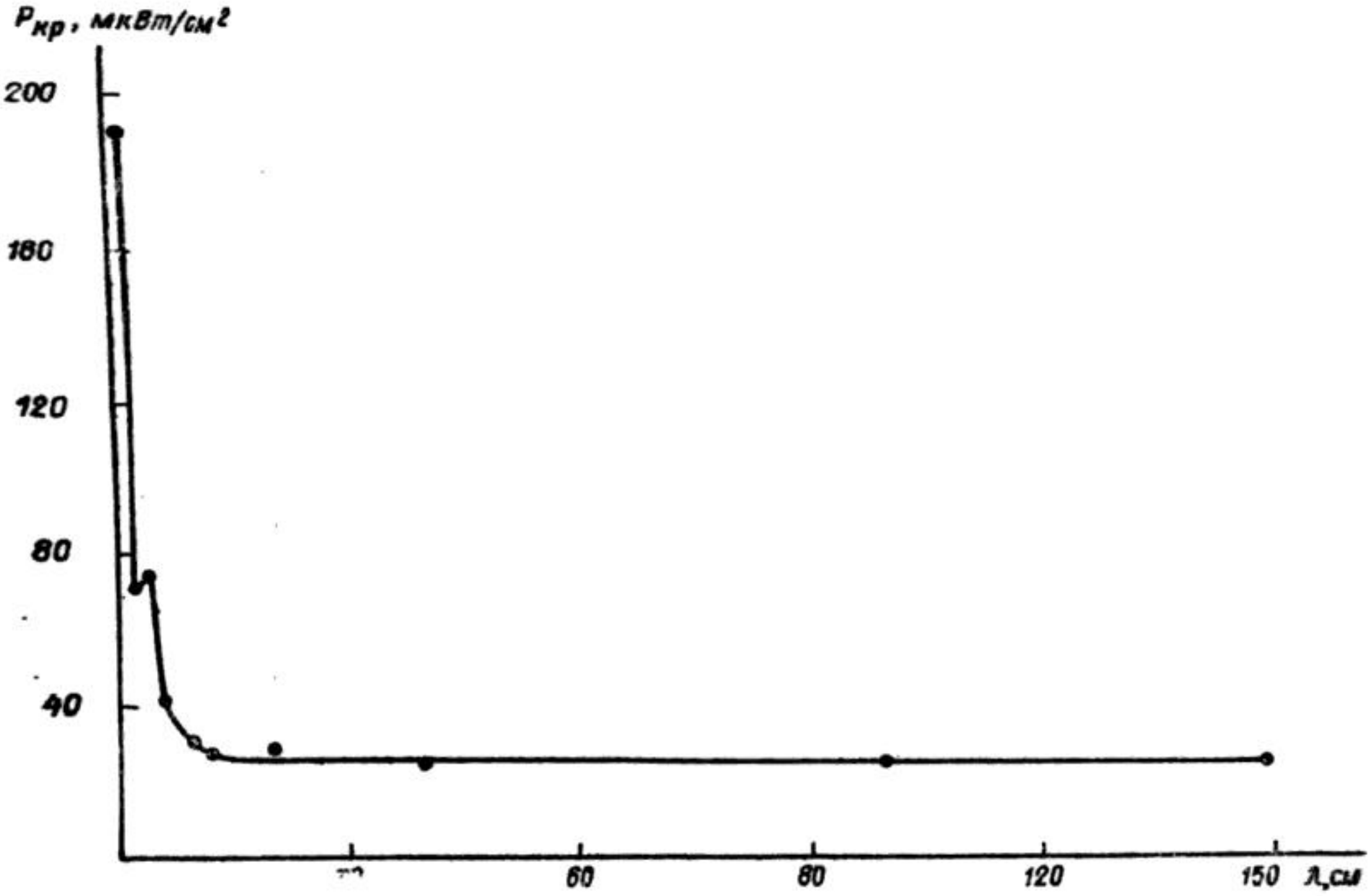


Рис. 2. Зависимость $P_{кр}=f(\lambda)$ для случая $\vec{E}||OZ$.

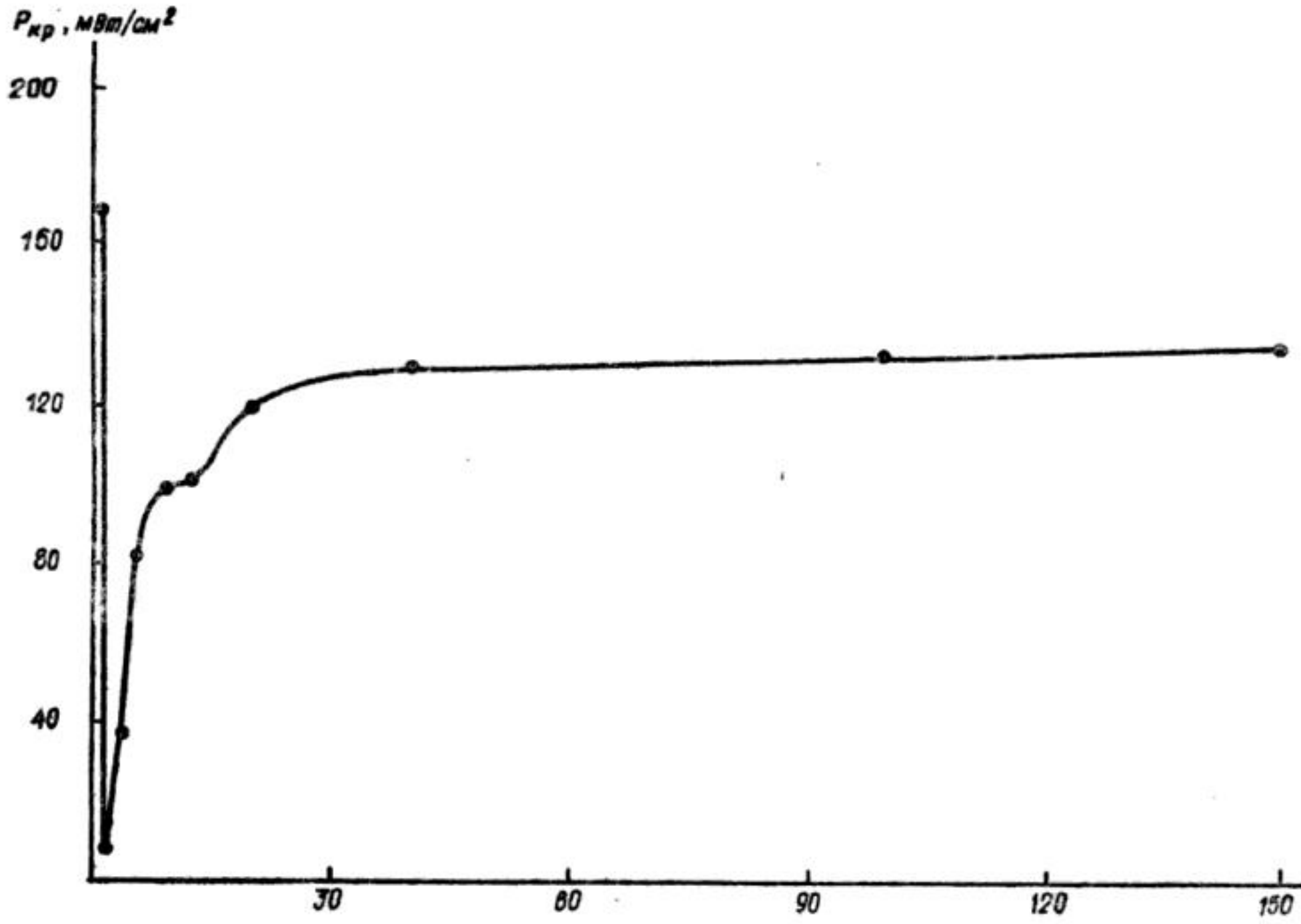


Рис. 3. Зависимость $P_{кр}=f(\lambda)$ для случая $\vec{E}\perp OZ$.

Матеріал, захищений авторським правом

перераспределения поверхностных зарядов конечна, то дипольный момент зависит от частоты падающего поля. Чем она больше, тем меньше момент эритроцита. И для того чтобы сила притяжения между соседними эритроцитами осталась прежней, необходимо увеличить уровень падающей энергии (см. рис. 2), инерционность поляризационных эффектов начинает существенно проявляться при $\lambda < 5$ см.

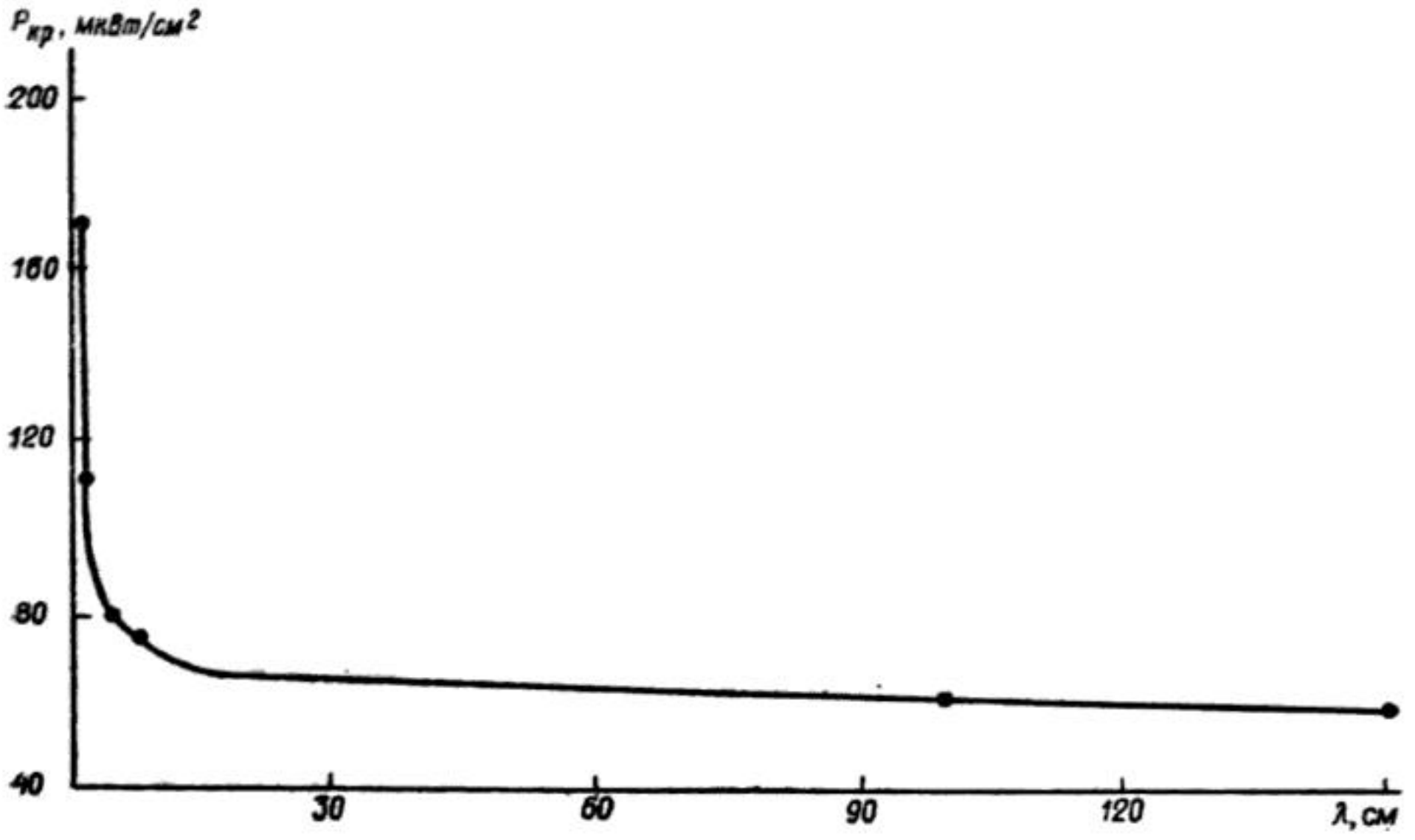


Рис. 4. Зависимость $P_{кр}=f(\lambda)$ для эритроцитов в чашке Петри.

На рис. 3 приведен график $P_{кр}=f(\lambda)$ для случая, когда вектор $\vec{E}$ перпендикулярен оси сосуда. Эффект слипания эритроцитов в этом случае проявляется при гораздо больших уровнях мощности падающей энергии. Это обусловлено тем, что векторы наведенных дипольных моментов располагаются в плоскости поперечного сечения кровеносного сосуда и практически не вызывают слипания эритроцитов.

На длине волны около 1,2 см наблюдается резкое уменьшение критической мощности облучения. Это позволяет автору утверждать, что высокочастотная энергия с $\lambda \approx 1{,}2$ см оказывает резонансное действие на эритроциты.

В обоих рассмотренных случаях взаимодействия эритроцитов с внешним высокочастотным полем на эффект слипания оказывает влияние мощность, частота и поляризация падающего поля.

Частным случаем рассматриваемой модели взаимодействия эритроцитов с полем является случай, когда облучаемая плазма крови находится в чашке Петри. Результаты расчетов для этого случая приведены на рис. 4, из которого следует, что уровни $P_{кр}$ существенно уменьшились, а эффект слипания эритроцитов не зависит от поляризации падающего поля.

Таким образом, из полученных на основе физико-математической модели данных видно, что под влиянием внешнего электромагнитного поля различной интенсивности изменяются поверхностные свойства мембран эритроцитов. Это, в частности, выражается в нарушении нормальных процессов их агглютинации.

1. *Биологические мембраны* / Под ред. Д. С. Парсона. — М.: Атомиздат, 1978. — 221 с.
2. *Гольдштейн Л. Д., Зернов Н. В.* Электромагнитные волны. — М.: Сов. радио, 1971. — 662 с.

Матеріал, захищений авторським правом

3. *Стреттон Д. А.* Теория электромагнетизма. — М.; Л.: ОГТЗ, 1948. — 540 с.
4. *Хижняк Н. А.* Применение интегральных уравнений электродинамики к решению дифракционных задач. — Тр. радиофиз. фак./Харьк. ун-т, 1957, 2, с. 13—22.
5. *Чижевский А. Л.* Электрические и магнитные свойства эритроцитов. — Киев: Наук. думка, 1973. — 92 с.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
03.03.80

УДК 57.043

С. Ю. Бидный, Ю. П. Тимошенко, Е. Ф. Иванова

ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ ГЛИЦЕРИНА

Для разработки методов низкотемпературного консервирования биологических объектов необходимо знать термодинамические свойства водных растворов криопротекторов и, в частности, особенности происходящих в них фазовых превращений. В связи с этим в данной статье изучена температурная зависимость теплоемкости[Ср(Т)] водных растворов глицерина в интервале температур —130—+50°С.

Измерения проводились на дифференциальном сканирующем микрокалориметре ДСМ-2М, разработанном в СКБ БП АН СССР. Особенностью метода дифференциальной сканирующей калориметрии является использование принципа «сбалансированного нуля», который заключается в том, что образцовая и эталонная ячейка снабжены индивидуальными нагревателями. В случае появления в образце эндо- или экзотермических процессов и при возникновении разницы в температуре образца и эталона, обеспечивается автоматическое регулирование силы нагревателя, компенсирующее разность температур между ячейками, а сигнал, пропорциональный разнице между теплом, передаваемым эталону и образцу dN/dt, регистрируется самописцем.

Одним из основных преимуществ динамических калориметров является их малая инерционность, позволяющая регистрировать тепловые эффекты быстропротекающих процессов, исследование динамики структурных превращений, кинетики различных процессов.

Для приготовления образца использовали дистиллированную воду с коэффициентом электропроводности $5{,}2\times10^{-3}$ mS и глицерин марки «чда», подвергнутый двойной вакуумной перегонке с последующим выдерживанием над осушителем — P_2O_5 в течение 20 ч. Содержание влаги проверяли рефрактометрически ($n_D^{20}=1{,}4730$, что соответствует содержанию влаги $\sim0{,}1\%$).

Образцы массой 20—40 мг помещали в алюминиевые кюветы, предназначенные для жидких проб, и герметизировали от окружающей среды на прессе. Такая упаковка образцов позволяет работать с созданием вакуума под колпаком калориметрического блока. Данные условия проведения эксперимента применяются для избежания конденсации атмосферной влаги на калориметрических ячейках при работе в области низких температур с использованием жидкого азота.

Для калибровки прибора при низких температурах использовали *н*-гексан ($T_{пл}=-95{,}3$°С); ртуть ($T_{пл}=-38{,}9$°С); дистиллированную воду ($T_{пл}=0{,}0$°С). Точность определения температур $\pm0{,}2$°С. Охлаждение всех образцов проводилось со скоростью 8°С/мин. В области температур —100°С при создании вакуума под колпаком калориметрического блока скорость охлаждения заметно уменьшалась.

Полученные зависимости теплоемкости от температуры для изученных смесей глицерин—вода приведены на рис. 1 и 2. Все термограммы снимались в режиме нагрева со скоростью 4°С/мин.

Матеріал, захищений авторським правом

На зависимости Ср(Т) (см. рис. 1, 2) в области температур —120—
—80°С наблюдаются переходы, происходящие без изменения энтальпии, но с резким изменением удельной теплоемкости, которые определяются переходом из стеклообразного состояния в жидкое. Согласно существующим в настоящее время представлениям процессы перехода из аморфного стеклообразного (метастабильного) состояния в жидкое

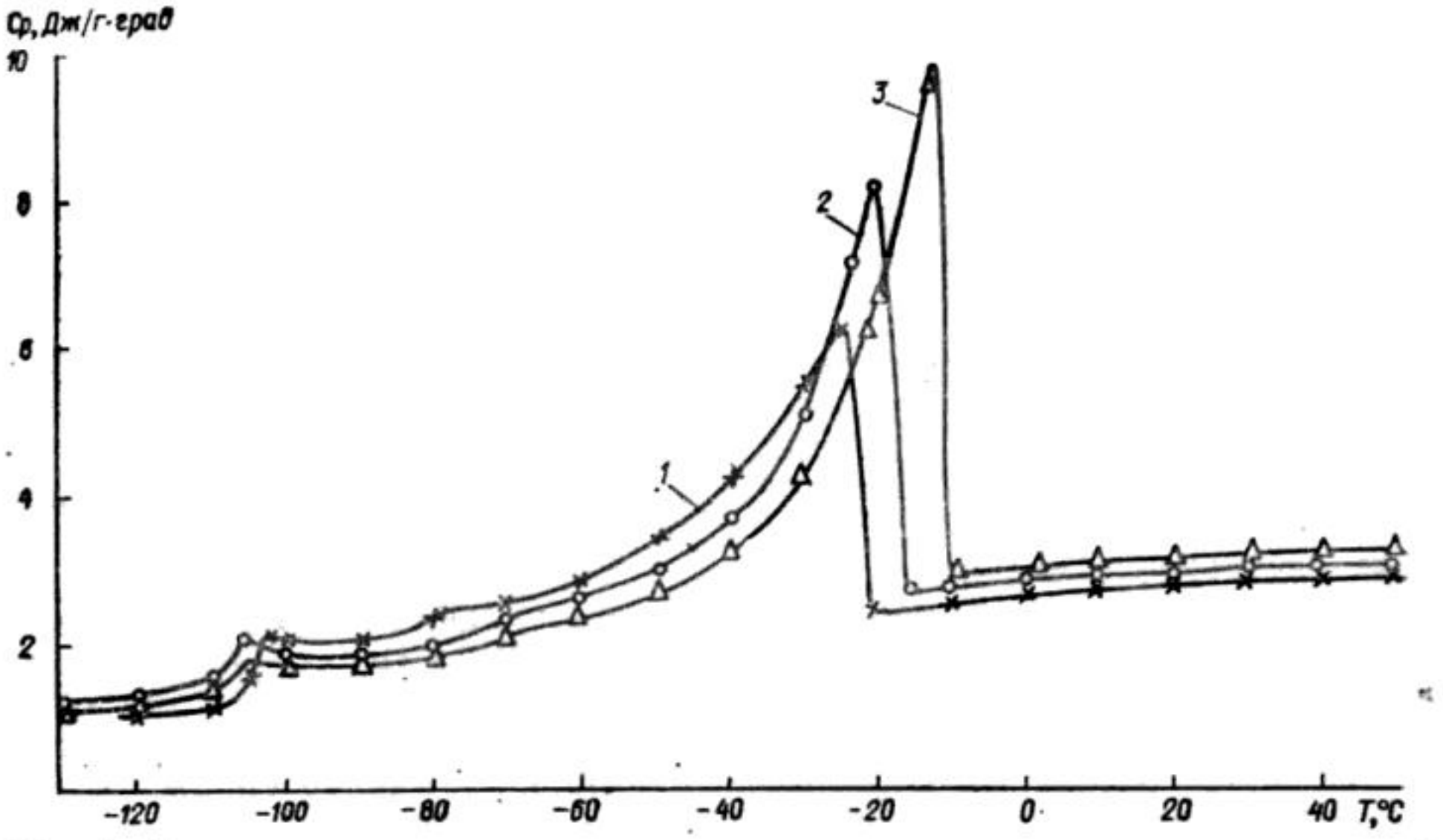


Рис. 1. Температурная зависимость теплоемкости водных растворов с концентрацией глицерина (массовое содержание, %):
1 — 51,6; *2* — 47,5; *3* — 36,5.

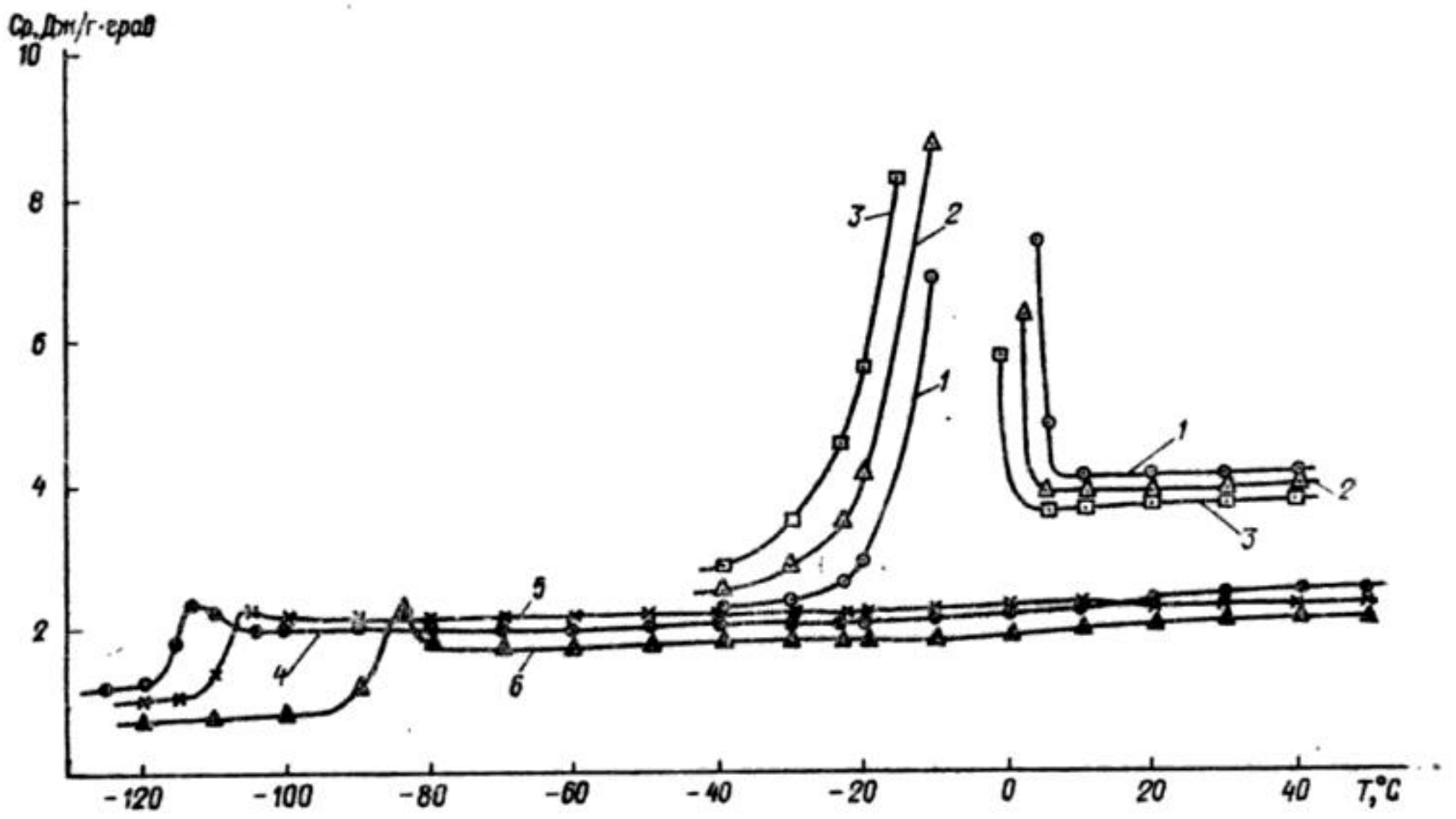


Рис. 2. Температурная зависимость теплоемкости водных растворов с концентрацией глицерина (массовое содержание, %):
1 — 5; *2* — 10; *3* — 20; *4* — 67; *5* — 83; *6* — 100.

аморфное (равновесное) при повышении температуры являются кинетическим превращением и происходят в результате уменьшения вязкости системы и увеличения трансляционной подвижности молекул.

Матеріал, захищений авторським правом

Как следует из рис. 1 и 2, величина изменения теплоемкости (ΔCp) при стеклопереходе зависит от концентрации компонентов в смеси: при малых концентрациях глицерина величина ΔCp составляет $\sim$0,5 Дж/г$\times$ $\times$град (для концентраций $<$40% массового содержания), увеличивается до $\sim$0,8 Дж/г·град для средних значений концентраций (50—70% массового содержания) и достигает 1 Дж/г·град для концентрированных растворов. Такое увеличение ΔCp при стеклопереходе связано, по-видимому, с относительным увеличением доли аморфных областей в системе. Наличие небольших эндопиков на зависимости $Cp(T)$ в области стеклования (см. рис. 1, 2), а также зависимость температуры стеклования (T_c) от скорости нагрева и охлаждения [3] служат подтверждением релаксационной природы этого превращения. Отсутствие рекристаллизационных процессов после расстеклования, наблюдаемых в работах [3, 5], зависит от условий кристаллизации, которые определяют распределение образующихся кристаллитов по размерам и степени совершенства.

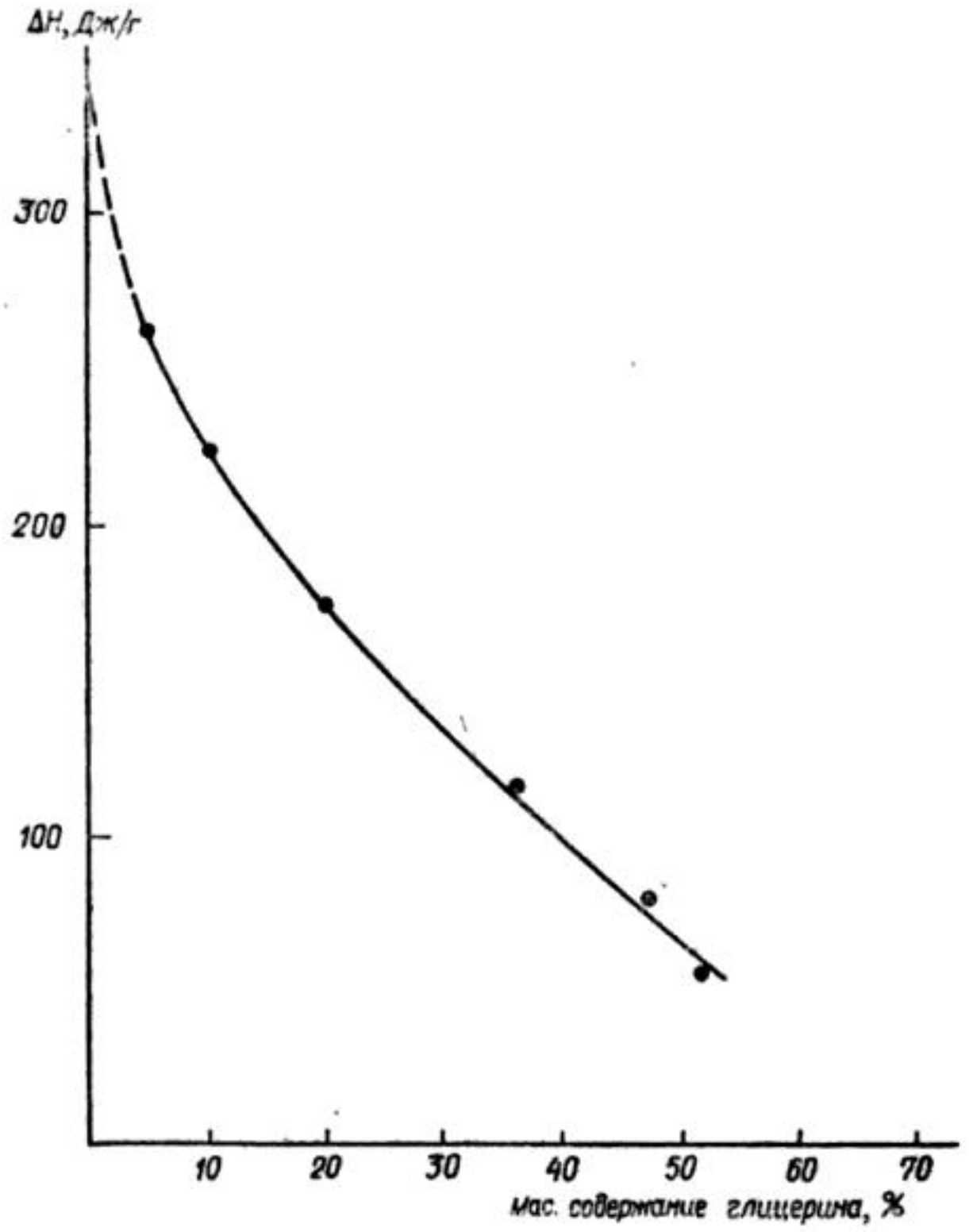


Рис. 3. Зависимость энтальпии плавления от содержания глицерина в смеси.

Когда соотношение скоростей кристаллизации и охлаждения таково, что при данной скорости охлаждения процесс кристаллизации смеси успевает произойти, то на термограммах плавления эффекты, связанные с процессами рекристаллизации, не наблюдаются. Например, не наблюдались они и в работе [3], когда охлаждение смесей производили со скоростью 10°С/мин.

При повышении температуры на термограммах плавления (см. рис. 1) (задолго до температуры плавления) наблюдается постепенное уменьшение степени кристалличности систем (частичное плавление). Таким образом, интервал плавления (ΔT) для водно-глицериновых смесей составляет несколько десятков градусов, а для концентраций $>$20% массового содержания глицерина достигает $\sim$80°С. Объяснением этому может служить неоднородное распределение кристаллитов по размерам, обусловленное кинетическими факторами. Меньшие по размерам кристаллиты начинают плавиться при более низких температурах, что и приводит к увеличению интервала плавления [1] кристаллитов.

Величины энтальпии плавления ($\Delta H_{пл}$) для исследованных водно-глицериновых смесей приводятся на рис. 3 и показывают монотонное уменьшение $\Delta H_{пл}$ с ростом концентрации глицерина в смеси.

Поскольку величина $\Delta H_{пл}$ пропорциональна массе кристаллической фазы, претерпевающей переход из твердого состояния в жидкое, то она

Матеріал, захищений авторським правом

может быть использована для определения степени кристалличности образующихся водно-глицериновых смесей по следующей формуле:

$$\varphi_H = \frac{\Delta H^*}{\Delta H},$$

где φ_H — степень кристалличности; ΔH^* — энтальпия плавления исходной смеси; ΔH — энтальпия плавления полностью кристаллического компонента — воды, равная 332 Дж/г.

Из значений, приведенных в таблице, хорошо видно, что с увеличением концентрации глицерина в смеси степень кристалличности системы уменьшается. Таким образом, отсутствие эффекта плавления на термограммах для образцов с концентрациями глицерина выше эвтектической (66,7% массового содержания [4]) (см. рис. 2) и связано, по-видимому, с резким увеличением вязкости систем [2], приводящим к уменьшению трансляционной подвижности кинетических единиц жидкости (гидратов глицерина), что в свою очередь затрудняет образование кристаллической структуры.

Значения энтальпии плавления, степени кристалличности и температур плавления водных растворов глицерина

Массовое содержание глицерина, %	ΔH, Дж/г	φ_H	$T_{пл}$
5	260,4	0,78	— 0,5
10	222,2	0,67	— 1,5
20	173,6	0,52	— 4,5
36,5	120,2	0,36	—12,0
47,5	80,7	0,24	—19,0
51,6	54,4	0,16	—24,0

1. *Годовский Ю. К.* Теплофизические методы исследования полимеров. — М.: Химия, 1976. — 215 с.
2. *Криопротекторы* / Н. С. Пушкарь, М. И. Шраго, А. М. Белоус, Ю. В. Калугин. — Киев : Наук. думка, 1978. — 204 с.
3. *Bohon R. L., Conway W. T.* DTA studies on the glycerol — water system. — Thermochim. acta, 1972, **4**, p. 321—341.
4. *Lane L. B.* Freezing points of glycerol and its aqueous solutions. — Ind. Eng. Chem., 1925, **17**. — 924 c.
5. *Shepard M. L., Goldston C. S., Cocks F. H.* The H_2O—NaCl — glycerol phase diagram and its application in cryobiology. — Cryobiology, 1976, **13**, p. 9—23.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
25.02.81

Матеріал, захищений авторським правом

II. КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

УДК 57.043

Л. П. Игнашева, Л. А. Данилова, А. Г. Федотенков

ВОЗДЕЙСТВИЕ ГЛИЦЕРИНА НА ИНАКТИВИРУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ ЛИМФОЦИТОВ ПРОТИВ НЕСИНГЕННЫХ КОЕ

В исследованиях, проведенных Л. А. Даниловой с соавт. [1], показано, что замораживание клеток селезенки, лимфоузлов и костного мозга с 15%-ным глицерином приводит к снижению иммунологической активности лимфоцитов. Однако авторы не дают ответ на вопрос: какой из факторов криоконсервирования (ограждающее вещество — 15%-ный глицерин или режим замораживания) влияет на активность иммунокомпетентных клеток.

В настоящей статье изучено влияние 15%-ного глицерина на иммунологические свойства лимфоцитов, содержащихся в селезенке, лимфоузлах и костном мозге.

Материал и методы. Материалом для исследований служили клетки селезенки, лимфоузлов и костного мозга мышей высоко инбредных линий. У мышей-доноров СВА удаляли лимфатические узлы, селезенки, бедренные и берцовые косточки. В опытах использовали консервирующий раствор ЦОЛИПК-3. На этом растворе готовили взвесь клеток лимфоузлов, селезенки и костного мозга. К полученным суспензиям клеток добавляли глицерин в 15%-ной концентрации и 10%-ную — аутологичную сыворотку. Взвесь клеток с глицерином выдерживали в холодильнике при температуре 5—9°С в течение 10—15 или 30—40 мин. После экспозиции клеток с 15%-ным глицерином отмывание от ограждающего вещества не производили.

В первой серии экспериментов интактные и обработанные 15%-ным глицерином клетки лимфоузлов мышей СВА в разной концентрации вводили мышам-реципиентам (СВА×С57Bl6) F_1. Во второй и третьей сериях опытов к разным концентрациям клеток селезенки или костного мозга мышей СВА, интактных или обработанных глицерином, добавляли интактные клетки костного мозга мышей С57Bl6 в концентрации $0{,}5\times10^6$. Смесь клеток вводили мышам-гибридам (СВА×С57Bl6) F_1.

Суспензию клеток вводили через 20—22 ч.

На 9-й день после трансплантации клеток у реципиентов извлекли селезенки, фиксировали их в растворе Буэна и 10%-ном растворе формалина. Визуально подсчитывали количество макроскопически видимых колоний в каждой селезенке. Вычисляли индекс инактивации [2].

Иммунологические свойства лимфоцитов определяли методами, отражающими взаимодействие стволовых клеток и лимфоцитов in vivo. 1. Методом учета инактивации несингенных стволовых клеток. 2. Методом учета отмены эндогенного колониеобразования [2].

Морфологическую сохранность клеток определяли с помощью суправительной окраски 1%-ным раствором эозина и подсчетом количества ядросодержащих клеток в камере Горяева.

Матеріал, захищений авторським правом

При трансплантации реципиентам клеточных суспензий производился пересчет на количество «живых» (морфологически сохранных) клеток.

Собственные исследования. В табл. 1 приведены суммарные данные по учету инактивации эндогенных колоний в селезенках мышей-гибридов (CBA×C57Bl6) F_1 при трансплантации им различных количеств интактных или обработанных глицерином клеток лимфатических узлов от мышей родительской линии CBA.

Таблица 1. **Изменение инактивации эндогенных КОЕ под влиянием 15%-ного глицерина при трансплантации интактных клеток лимфатических узлов мышей линии CBA**

Количество введенных клеток лимфоузлов мышей CBA	Трансплантация интактных клеток лимфоузлов		Трансплантация клеток лимфоузлов, обработанных глицерином			
			Экспозиция 15 мин		Экспозиция 30 мин	
	Количество колоний в селезенке (M±м)	Индекс инактивации КОЕ, %	Количество колоний в селезенке (M±м)	Индекс инактивации КОЕ, %	Количество колоний в селезенке (M±м)	Индекс инактивации КОЕ, %
$0{,}5\times10^6$	8,6±0,3	14,9	9,3±0,3	11,9	7,4±0,5	26,8
$1{,}0\times10^6$	4,7±0,5	53,5	10.4±0,2	6	12,7±0,3	0
$2{,}0\times10^6$	1,8±0,2	82,2	10,6±0,5	0	13,1±0,3	0
$4{,}0\times10^6$	0,7±0,07	93,1	8,9±0,4	11,8	13,5±0,3	0
$4{,}0\times10^6$	10,1±0,2	—	10,1±0,2	—	10,1±0,3	—

Трансплантация мышам-гибридам F_1 интактных лимфоцитов родительской линии фенотипа CBA в дозе $1{,}0\times10^6$ обеспечивает 53,5% инактивацию эндогенных КОЕ, а увеличение дозы лимфоцитов до $2{,}0\times10^6$ и $4{,}0\times10^6$ приводит соответственно к 82,2—93,1% инактивации.

Как показано в табл. 1, добавление к интактным клеткам глицерина в 15%-ной концентрации приводит практически к полному исчезновению эффекта инактивации несингенных КОЕ. Причем отмена эндогенного колониеобразования происходит в одинаковой степени при экспозиции клеток из лимфатических узлов в течение 15 и 30 мин.

Из полученных данных видно, что 15%-ный глицерин вызывает торможение гомотрансплантационной активности лимфоцитов против эндогенных КОЕ. На девятый день после введения животному-реципиенту интактных или обработанных глицерином аллогенных лимфоцитов производилось гистологическое исследование гемопоэтических колоний.

Показано, что угнетение колониеобразования наблюдается только под влиянием свежих клеток из лимфоузлов. После 15-минутной экспозиции и тем более после 30-минутной экспозиции клеток с глицерином угнетения колониеобразования не наступало. Напротив, количество микроскопически определяемых колоний даже нарастало при увеличении количества введенных лимфоцитов.

Изучено также влияние глицерина на последующую дифференцировку эндогенных колоний реципиента. Установлено, что 15-минутная экспозиция лимфоцитов с глицерином никак не сказывалась на дифференцировке колоний в организме реципиента (Э/М=2,4—3,0). После 30-минутной экспозиции Э/М отношение составляло 4,3—5,8, т. е. незначительно увеличивалось по сравнению с нормой. Лишь в опытах с введением свежих (без глицерина) лимфоцитов, когда имела место выраженная инактивация эндогенных колоний, полностью нарушалось эритроидно-миелоидное отношение. Все сохранившиеся колонии зрелого типа при этом были эритробластическими, а миелобластические — отсутствовали. Очевидно, при высоких степенях инактивации в первую

Матеріал, захищений авторським правом

очередь гибнут миелобластические колонии, которых в норме в два раза меньше, чем эритробластических.

Во второй и третьей сериях экспериментов изучалось влияние 15%-ного глицерина на иммунологическую активность лимфоцитов из селезенки и костного мозга.

Табл. 2 иллюстрирует инактивацию экзогенно-введенных стволовых клеток мышей генотипа C57Bl6 интактными (без глицерина) и с

Таблица 2. **Инактивация несингенных КОЕ при трансплантации смеси клеток интактного костного мозга мышей C57Bl6 с интактными (без глицерина) и 15%-ным глицерином клетками селезенки мышей СВА**

№ п/п	Доноры клеток и их количество		Введение клеточной смеси со свежими клетками селезенки мышей СВА					
			без глицерина		с 15%-ным глицерином (экспозиция—15 мин)		с 15%-ным глицерином (экспозиция—30 мин)	
	Клетки селезенки мышей СВА	Клетки костного мозга мышей C57Bl6	Среднее количество колоний в селезенке (M±м)	Индекс инактивации, %	Среднее количество колоний в селезенке (M±м)	Индекс инактивации, %	Среднее количество колоний в селезенке (M±м)	Индекс инактивации, %
1	$0{,}5\times10^6$	$0{,}5\times10^6$	8,6±0,5	0	7,0±0,5	14,6	11,3±1,0	0
2	$4{,}0\times10^6$	$0{,}5\times10^6$	7,6±0,3	51,3	7,7×0,2	35,8	10,8±0,8	0
3	$4{,}0\times10^6$	$0{,}5\times10^6$	4,5±0,4		6,4±0,4		6,5±0,6	
4	$0{,}5\times10^6$	—	3,2±0,08		1,4±0,04		0,9±0,02	
5	$4{,}0\times10^6$	—	10,9×0,9		5,2±0,2		2,6±0,1	
	Контроль		0,4±0,02					

глицерином клетками селезенки мышей СВА. Как видно из табл. 2, использование интактных (без глицерина) клеток селезенки в дозе $4{,}0\times10^6$ приводит к 51,3% инактивации несингенных клеток. При этой же дозе инактивирующая активность клеток селезенки мышей СВА, обработанных 15%-ным глицерином в течение 15 мин, снижена и составляет 35,8%. При экспозиции клеток с глицерином в течение 30 мин у клеток-киллеров мышей СВА инактивировать клетки-мишени C57Bl6 способность отсутствует.

Микроскопическое исследование гемопоэтических колоний с целью выявления влияния глицерина на пролиферативную активность и дифференцировку стволовых клеток показало, что при взаимодействии клеток костного мозга мышей C57Bl6 с максимальной дозой свежих клеток селезенки мышей СВА инактивация составляла 56%. После 15-минутной экспозиции селезеночных клеток с глицерином индекс инактивации для тех же дозировок клеток составлял 28,6%, а после 30-минутной экспозиции инактивация отсутствовала. Эритроидно-миелоидное отношение после экспозиции клеток селезенки с глицерином менялось незначительно (3,5—5,0) за счет увеличения эритробластических колоний.

Данные по изучению влияния 15%-ного глицерина на иммунологическую активность лимфоцитов костного мозга мышей СВА представлены в табл. 3. Показано, что при введении свежего костного мозга мышей C57Bl6 со свежими клетками костного мозга мышей СВА в дозе $0{,}5\times10^6$ и $4{,}0\times10^6$ получена инактивация стволовых клеток-мышей (C57Bl6) стволовыми клетками-киллерами (СВА) с показателями инактивации 25 и 57% (соответственно). Иная картина получена при введении реципиенту смеси клеток-киллеров (СВА), обработанных 15%-ным глицерином, со свежими клетками-мишенями (C57Bl6) При экспозиции костного мозга мышей СВА с 15%-ным глицерином в течение 15 мин

Матеріал, захищений авторським правом

доза клеток $0{,}5\times10^6$ вызывает 2,1% инактивацию, а $4{,}0\times10^6$ — 0 инактивацию клеток костного мозга мышей C57Bl6.

30-минутная экспозиция клеток костного мозга мышей СВА с глицерином приводит к еще большему снижению инактивирующего эффекта. При дозе клеток $0{,}5\times10^6$ инактивирующая способность клеток-киллеров снижается до 0, при дозе — $4{,}0\times10^6$ — равна 11,1%.

Таблица 3. **Инактивация несингенных КОЕ при трансплантации смеси клеток интактного костного мозга мышей C57Bl6 с интактными (без глицерина) и с 15%-ным глицерином клетками костного мозга мышей СВА**

№ п/п	Доноры клеток и их количество		Введение клеточной смеси со свежими клетками костного мозга мышей СВА					
	Клетки костного мозга мышей		без глицерина		с 15%ным глицерином			
					Экспозиция 15 мин		Экспозиция 30 мин	
	СВА	C57Bl6	Среднее число колоний в селезенке (M±м)	Индекс инактивации, %	Среднее число колоний в селезенке (M±м)	Индекс инактивации, %	Среднее число колоний в селезенке (M±м)	Индекс инактивации, %
1	$0{,}5\times10^6$	$0{,}5\times10^6$	25,3±1,6	25,0	23,9±1,7	2,1	22,4±0,5	0
2	$0{,}5\times10^6$	$0{,}5\times10^6$	16,9±0,6	57,0	34,1±0,8	0	34,7±0,6	11,1
3	$4{,}0\times10^6$	$0{,}5\times10^6$	5,5±0,1		7,3±0,1		5,6±0,5	
4	$0{,}5\times10^6$	—	27,8±1,0		16,7±1,0		11,6±0,7	
5	$4{,}0\times10^6$	—	33,4±1,0		24,8±1,0		33,0±0,9	
				0,4±0,08				

С помощью гистологического исследования колоний в селезенке смертельно облученного реципиента изучалось влияние на пролиферацию и дифференцировку стволовых гемопоэтических клеток взаимодействия клеток костного мозга мышей C57Bl6 с клетками костного мозга мышей СВА, подвергнутых воздействию глицерина. При взаимодействии интактных клеток костного мозга мышей СВА (без воздействия на них глицерина) с интактными клетками костного мозга мышей C57Bl6 инактивация экзогенных микроколоний была равна 31,3—39,5%. После экспозиции костного мозга мышей СВА с 15%-ным глицерином инактивация отсутствовала. Эритроидно-миелоидное отношение после взаимодействия клеток оставалось в пределах нормы. Лишь в двух группах опытов (со свежими клетками), где индекс инактивации достигал 31,3—39,5%, эритроидно-миелоидное отношение было немного выше нормы (4,8—5,9).

Таким образом, в результате проведенных экспериментов установлен факт снижения или отмены гомотрансплантационной активности лимфоцитов кроветворных тканей, обработанных 15%-ным глицерином, против эндогенных и экзогенных КОЕ. Если исходить из полученных нами фактов, то можно ожидать, что трансплантация свежезаготовленного аллогенного костного мозга, обработанного 15%-ным глицерином, окажется более эффективной в клинике, чем трансплантация свежего костного мозга без обработки глицерином.

Риск развития вторичной болезни при этом будет меньше, чем при переливании свежего костного мозга.

Использование метода снижения иммунологической активности лимфоцитов костного мозга открывает большие перспективы в комплексном лечении больных с депрессиями кроветворения и имунной патологией.

1. *Данилова Л. А., Федотенков А. Г., Петров Р. В. и др.* Влияние криоконсервирования на гомотрансплантационную активность лимфоцитов. — Пробл. гематологии и переливания крови, 1978, № 12, с. 21—25.

Матеріал, захищений авторським правом

2. *Петров Р. В., Сеславина Л. С.* Инактивация «стволовых» клеток при контакте генетически несовместных клеточных взвесей из лимфоидных тканей. — Докл. АН СССР, 1967, **176**, № 5, с. 1170—1173.

Центральный научно-исследовательский
институт гематологии и переливания крови
МЗ СССР

Поступила в редколлегию
23.10.80

УДК 57.043

Л. А. Данилова, Л. П. Игнашева, А. Г. Федотенков

ВЛИЯНИЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК СМЕШАННОГО ТРАНСПЛАНТАТА КОСТНОГО МОЗГА

Известно, что при переливании реципиенту костного мозга от нескольких генетически различающихся доноров терапевтическая эффективность смешанного трансплантата резко снижается из-за инактивации кроветворных стволовых клеток несингенными лимфоцитами [1, 2].

В настоящей статье изучалось влияние замораживания костного мозга, взятого от несингенных доноров, на инактивацию лимфоцитами стволовых клеток смешанного трансплантата.

Исследования проводились на смертельно облученных животных-реципиентах (гибридах первого поколения (CBA×C57Bl6)F_1), которым трансплантировался замороженный костный мозг мышей CBA («киллеры») в смеси с замороженным костным мозгом мышей C57Bl6 («мишени»). Способность пролиферации перелитых клеток костного мозга и инактивирующую активность лимфоцитов в смешанном трансплантате оценивали по величине экзогенного колониеобразования у облученных животных.

Материал и методы. Взвесь костномозговых клеток заготавливали из бедренных и берцовых костей мышей-доноров на растворе ЦОЛИПК-3. Суспензию клеток замораживали в алюминиевых контейнерах с 15%-ным глицерином и 10%-ной мышиной сывороткой со скоростью 1°С/мин от исходной температуры (+18, +20°С) до начала кристаллизации (—9, —10°С), затем 10°С/мин до —196°С. Объем замораживаемой взвеси —30 мл. После 2—4-недельного хранения в жидком азоте взвесь клеток костного мозга оттаивали в водяной бане (+39°С). Размороженные клетки отмывали от глицерина глюкозо-сахарозным раствором. С помощью суправитального окрашивания определялась морфологическая сохранность ядросодержащих клеток.

Размороженные клетки вводили мышам-гибридам (CBA×C57Bl6)F_1 через 22—23 ч после облучения в дозе 880 Р. (Облучение животных проводили на аппарате ЭГО-2 гамма-лучами Co^{60}, мощность дозы 102,5 Р/мин).

На девятый день после трансплантации клеток у реципиентов извлекали селезенки и фиксировали в растворе Буэна и 10%-ном растворе формалина. Подсчитывали число макроскопически видимых колоний в каждой селезенке. На замораживающем микротоме готовили серийные срезы из ткани селезенок и окрашивали их гемотоксилин-эозином. Под микроскопом определяли количество и морфологический состав колоний.

Полученные данные подвергали статистической обработке.

Результаты исследований. В таблице представлены результаты исследований экзогенного колониеобразования в организме смертельно облученных животных-реципиентов после введения им криоконсервированного костного мозга от генетически различающихся доноров. Как

Матеріал, захищений авторським правом

Изменение экзогенного колониеобразования (микроскопический учет) замороженного костного мозга от генетически

Условия эксперимента и наименование колоний	№ группы			
	1	2	3	4
Доза клеток СВА	$0{,}5\times10^6$	1×10^6	2×10^6	4×10^6
Доза клеток С57В16	$0{,}5\times10^6$	$0{,}5\times10^6$	$0{,}5\times10^6$	$0{,}5\times10^6$
Среднее число колоний	$12{,}2\pm0{,}3$	$14{,}4\pm0{,}9$	$20{,}3\pm1{,}6$	$33{,}1\pm1{,}6$
Эритробластические колонии	$8{,}9\pm0{,}05$	$10{,}5\pm0{,}8$	$12{,}1\pm1{,}6$	$24{,}4\pm3{,}4$
Миелобластические колонии	$0{,}9\pm0{,}02$	$0{,}8\pm0{,}08$	$1{,}9\pm0{,}9$	$2{,}4\pm0{,}2$
Э/М	9,8	13,1	6,3	10,1

видно из приведенной таблицы, замороженные клетки-киллеры СВА в дозе $0{,}5\times10^6$ не дают инактивирующего эффекта в отношении клеток-мишеней С57В16, взятых в той же дозе (12,2 колоний вместо ожидаемых 9,2). Из литературных данных и наших предыдущих работ [1, 2] известно, что клетки свежего костного мозга от двух генетически различающихся доноров дают с этими дозами клеток инактивацию, равную 40%. Поэтому в следующих сериях опытов доза замороженных клеток-киллеров СВА была нами увеличена до 1×10^6, 2×10^6, 4×10^6. Однако даже 2,4- и 8-кратное увеличение киллеров не дало инактивации клеток-мишеней. Напротив, количество колоний в организме смертельно облученных реципиентов неуклонно возрастало (14,4; 20,3; 33,1 вместо 8,1; 11,2; 16,8). Таким образом, вместо эффекта инактивации несингенных стволовых клеток получен эффект усиления экзогенного колониеобразования в организме облученного реципиента: количество колоний после введения замороженного костного мозга от двух генетически различающихся доноров превышало сумму колоний, полученных от введения клеток каждого из доноров.

При гистологическом анализе колоний, полученных от введения смешанного замороженного трансплантата костного мозга, было видно, что на девятые сутки у реципиентов в селезенке образуются колонии зрелого типа всех трех ростков кроветворения. Однако колонии эритроидного типа преобладали (эритроидно-миелоидное отношение увеличивалось по сравнению с нормой в три-четыре раза).

В заключение сделаем следующие выводы. При переливании замороженного мозга от двух генетически различающихся доноров отменяется эффект инактивации стволовых кроветворных клеток несингенными лимфоцитами, присутствующими в смешанном трансплантате.

Экзогенное колониеобразование в организме облученного реципиента усиливается.

Функция дифференцировки и вызревания стволовых клеток хорошо сохраняется при трансплантации реципиенту замороженного костного мозга от генетически различающихся доноров. При этом по сравнению с трансплантацией свежего костного мозга в селезенке смертельно облученных реципиентов в изученные сроки развиваются колонии преимущественно эритроидного ряда.

1. *Данилова Л. А., Федотенков А. Г., Петров Р. В. и др.* Влияние криоконсервирования на гомотрансплантационную активность лимфоцитов. — Пробл. гематологии и переливания крови, 1978, № 12, с. 21—25.
2. *Петров Р. В., Сеславина Л. С.* Инактивация «стволовых» клеток при контакте генетически несовместимых клеточных взвесей из лимфоидных тканей. — Докл. АН СССР, 1967, **176**, № 5, с. 1170—1173.

Центральный научно-исследовательский
институт гематологии и переливания крови
МЗ СССР

Поступила в редколлегию
23.10.80

Матеріал, захищений авторським правом

после введения смертельно облученному (880 Р) реципиенту различающихся доноров (М±м)

№ группы					
5	6	7	8	9	10
—	0,5×10⁶	1 ×10⁶	2×10⁶	4×10⁶	Контроль облучения
0,5×10⁶	—	—	—	—	—
1,2±0,4	8,0±1,8	7,0±2,3	10,0±1,4	15,6±1,8	0,9±0,2
	5,7±1,5	5,6±1,9	9,2±0,9	13,9±1,5	0,5±0,02
1,1±0,4					
0	0,6±0,1	1,0±0,3	0,8±0,3	1,3±0,3	0
Единичные эритробластические колонии	9,5	5,6	11,5	10,6	Единичные эритробластические колонии

УДК 57.043.611—018,46:615,014,4:536,48

Э. И. Обозная, Ю. А. Дмитренко

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ ЦИТОХРОМОКСИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ КАК ПОКАЗАТЕЛЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ПОСМЕРТНОГО КОСТНОГО МОЗГА, ЗАГОТОВЛЕННОГО ДЛЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ

Одним из этапов низкотемпературного консервирования клеток и тканей является подготовка их к процессу консервирования, которая включает способы получения материала, подбор консервирующих сред и т. д.

Ранее было ясно, что активность НАД-, НАДФ-диафораз, флавопротеиновых ферментов цикла Кребса, во всех клеточных категориях посмертного костного мозга по мере удлинения сроков до начала исследования достоверно снижается [5, 7]. В то же время из данных литературы известно, что активность цитохромоксидазы, конечного звена цитохромной цепи, является наиболее лабильной и уже через 2 ч теряет 20% первоначальной активности, а к 6 ч — 64% [1, 4].

Таким образом, изложенное свидетельствует об угасании ферментативных процессов в клетках костного мозга по мере удлинения сроков, прошедших с момента смерти [3]. При этом наибольшей лабильностью отличается цитохромоксидаза. Поэтому можно предположить, что использование цитохромоксидазной реакции как индикатора функциональной активности клеток костного мозга, заготовленных в различные сроки, прошедшие после наступления смерти, может повысить объективизацию полученных данных.

Цель настоящей статьи — изучение динамики цитохромоксидазной активности в клетках костного мозга в различные сроки посмертного периода.

Методика. Получение костномозговой взвеси осуществлялось аспирационным путем от трупов лиц обоего пола в возрасте от 16 до 62 лет, когда время смерти было точно установлено. Причиной смерти явились, в основном, различные виды травм. Исследован костный мозг 26 трупов.

В зависимости от срока, прошедшего с момента смерти, весь материал был распределен на пять групп: 1) 0—6 ч с момента смерти; 2) 6—12; 3) 12—18; 4) 18—24; 5) 24—36 ч.

Активность цитохромоксидазы (ЦХО) определялась по методу Берстона [2] с последующим подсчетом среднего гистохимического коэффициента (СГК) по методу Астальди и Верга [8].

Матеріал, захищений авторським правом

Прежде чем приступить к количественному учету продукта реакции (диформазан) в клетках посмертного костного мозга, был выявлен характерный для каждого вида клеток тип гранул и их расположение в цитоплазме (раздельно или в виде скоплений, равномерность и распределение).

Статистическая обработка данных осуществлялась по методу Фишера—Стьюдента. Различие между сравниваемыми группами считалось

Изменение активности ЦХО в клетках костного мозга в зависимости от времени наступления смерти

Время после смерти, ч	Статистические показатели					
	СГК	n	P_1	P_2	P_3	P_4
0— 6	2,26±0,45	7				
6—12	1,28±0,22	20	<0,001			
12—18	0,96±0,09	14		<0,05		
18—24	0,86±0,10	10			>0,05	
24—36	0,47±0,24	7				<0,05

Примечание. P_1 — рассчитана между показателями активности 0—12 и 0—6 ч, P_2 — 12—18 и 6—12 ч, P_3 — 18—24 и 12—18 ч, P_4 — 24—36 и 18—24 ч.

достоверным в том случае, когда $P<0,05$. Статистический анализ проведен на ЭВМ «Мир-2».

Результаты исследований. В посмертном костном мозге, взятом для исследования в интервале 0—6 ч с момента смерти, характер отложения диформазана в цитоплазме клеток совпадает с описанным в миелокариоцитах доноров [6]. Характерной особенностью реакции в данных условиях опыта является образование гранул диформазана средней величины, располагающихся равномерно в цитоплазме, главным образом перинуклеарно и в области цитоплазматической мембраны (СГК — 2,26±0,45).

Через 6—12 ч после наступления смерти характер отложения диформазана в клетках костного мозга существенно не изменился. Вместе с тем следует обратить внимание на диффузную окраску цитоплазмы и менее интенсивную окраску гранул. Количество продукта реакции по сравнению с предыдущим сроком достоверно снизилось (1,23±0,22; $P<0,001$).

Через 12—18 ч после смерти наблюдалось диффузное отложение продукта реакции и чаще встречались клетки, содержащие одиночные гранулы; в некоторых клетках они отсутствовали. СГК в данных условиях опыта составлял 0,96±0,09, что значимо отличало его от интервала времени 0—6 ч ($P<0,001$) и 6—12 ($P<0,05$).

Такая же направленность обменных процессов наиболее четко прослеживается в более поздние сроки: 18—24 и 24—36 ч. Отложение продукта реакции характеризуется в основном одиночными гранулами и их перераспределением в цитоплазме (скопление в виде глыбок). СГК резко снизился и составил в среднем соответственно 0,86±0,1 и 0,47±±0,24. При этом установлены достоверные различия между всеми исследуемыми интервалами времени, прошедшими после наступления смерти, за исключением сроков 12—18 и 18—24 ч с момента смерти (см. таблицу).

Обсуждение результатов. Изложенное свидетельствует о том, что в посмертном костном мозге, взятом для исследования в интервале 0—6 ч с момента смерти, реакция на ЦХО протекает аналогично донорскому костному мозгу [6]. Это дает основание полагать, что посмертный костный мозг, полученный в первые 0—6 ч после смерти, является функционально активным и может быть использован для дальнейшего замораживания с целью трансплантации.

Матеріал, захищений авторським правом

С увеличением времени, прошедшего после наступления смерти, установлена различная реакция цитохромоксидазной активности. Изменился не только характер, но и ее количественное выражение. Начиная с 6—12 ч, изменения ферментативной реакции протекают в основном однотипно и в зависимости от времени наступления смерти имеют характерную цитохимическую картину, т. е. уменьшение гранул дифор-мазана, их перераспределение в цитоплазме, наиболее четко выражено в интервале от 24 до 36 ч.

Таким образом, изучение динамики дыхательной функции посмертного костного мозга по цитохромоксидазной реакции является весьма перспективным как для криобиологической практики — возможность прогнозирования пригодности миелоидных клеток для дальнейшего криоконсервирования, так и судебно-медицинской — по динамике изменения активности ЦХО можно судить о времени наступления смерти.

1. *Арчаков А. И., Канаева И. П., Князева Г. А., Кузнецова Г. П.* Пути потребления кислорода в клетках печени. — В кн.: Митохондрии. М.: Наука, 1973, с. 132—138.
2. *Берстон М.* Гистохимия ферментов. — М.: Мир, 1965. — 349 с.
3. *Кидралиев С. К.* Динамика гистохимических изменений некоторых карбоксилаз в ранах различной давности. — Судеб.-мед. экспертиза, 1980, № 2, с. 12—14.
4. *Лушников Е.. Ф., Шапиро Н. А.* Изменение клеток при аутолизе. — В кн.: Аутолиз. М.: Медицина, 1974, с. 33—122.
5. *Обозная Э. И.* Изучение ряда окислительно-восстановительных ферментов и дыхания ядросодержащих клеток костного мозга и крови до и после различных сроков низкотемпературной консервации (—196°): Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Харьков, 1973. — 19 с.
6. *Обозная Э. И., Маркова О. П.* Исследование конечного звена цитохромной цепи цитохромоксидазы в клетках костного мозга после глубокого охлаждения. — Криобиология и криомедицина, 1975, вып. 1, с. 60—61.
7. *Шенберг М. Г., Обозная Э. И.* Влияние деконсервированного костного мозга на восстановительные процессы при острой лучевой болезни в эксперименте. — В кн.: Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины. Киев: Наук. думка, 1974, с. 131—133.
8. *Astaldi G., Verga L.* The glycogen content of the cells of lymphatic leucemia. — Acta haematol., 1957, 17, N 3, p. 129—136.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
24.10.80

УДК 57.043:611.441.361.041:537.533.35

Т. П. Говоруха, Б. А. Скорняков

УЛЬТРАСТРУКТУРА ФОЛЛИКУЛЯРНЫХ ТИРЕОЦИТОВ НА ЭТАПАХ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

В клинической практике все более широко используется консервированная ткань щитовидной железы. Однако хранение трансплантата при положительных температурах (2—4°С) обеспечивает сохранность его жизнеспособности только в течение 3—9 дней [4, 5, 10], что не всегда удовлетворяет запросы клиники. В связи с этим для длительного хранения щитовидной железы предложены методы низкотемпературного консервирования [3, 12]. Было установлено, что щитовидная железа человека сравнительно устойчива к низким температурам и ее можно хранить при —25°С в течение четырех недель [6]. Вместе с тем замораживание кусочков щитовидной железы до —196°С показало, что в трансплантатах развиваются выраженные дистрофические процессы [14]. В последнее время для предохранения ткани щитовидной железы от криодеструкции широко используются такие криопротекторы, как глицерин, ДМСО, ПЭО [2, 9, 11]. Но характер действия этих соединений на ультраструктуру клеток щитовидной железы исследован в недостаточной степени.

Матеріал, захищений авторським правом

Цель настоящей статьи — изучение ультраструктуры клеток щитовидной железы человека при низкотемпературном консервировании (—196°С) под защитой ДМСО.

Методика исследования. Исследовали щитовидные железы человека, удаленные по поводу узловатых и диффузных форм зоба.

Кусочки щитовидной железы 5×8 мм инкубировали в среде Хенкса с раствором ДМСО в 15%-ной конечной концентрации в течение

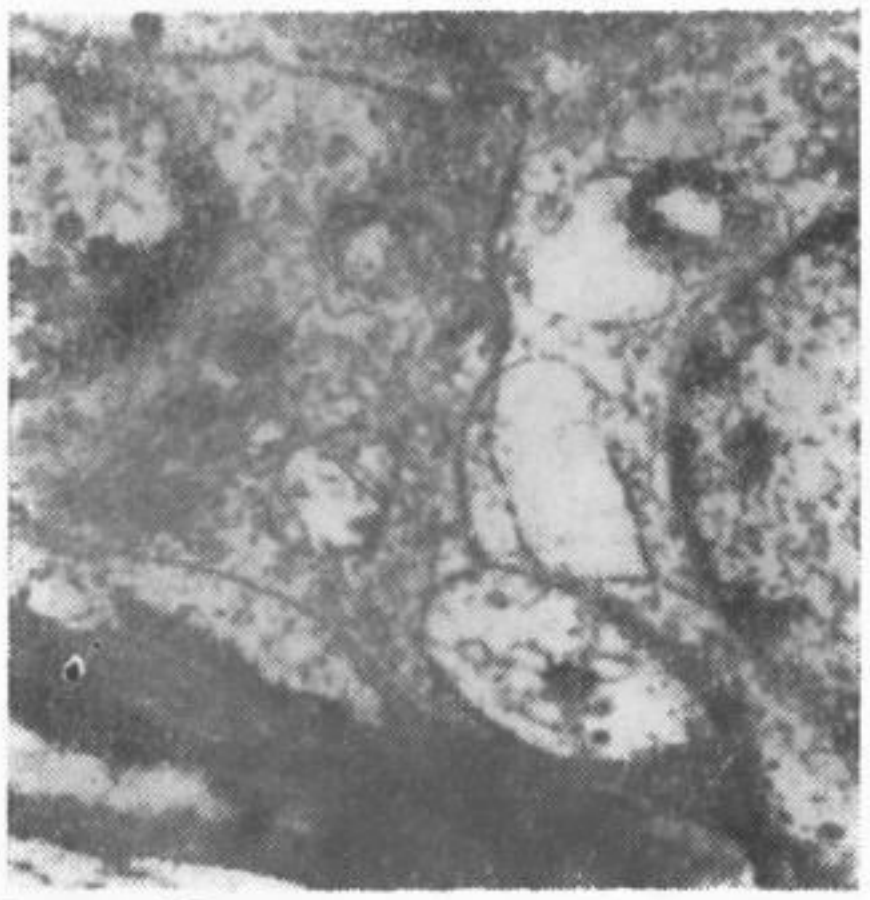


Рис. 1. Исходное состояние щитовидной железы. ×1200.

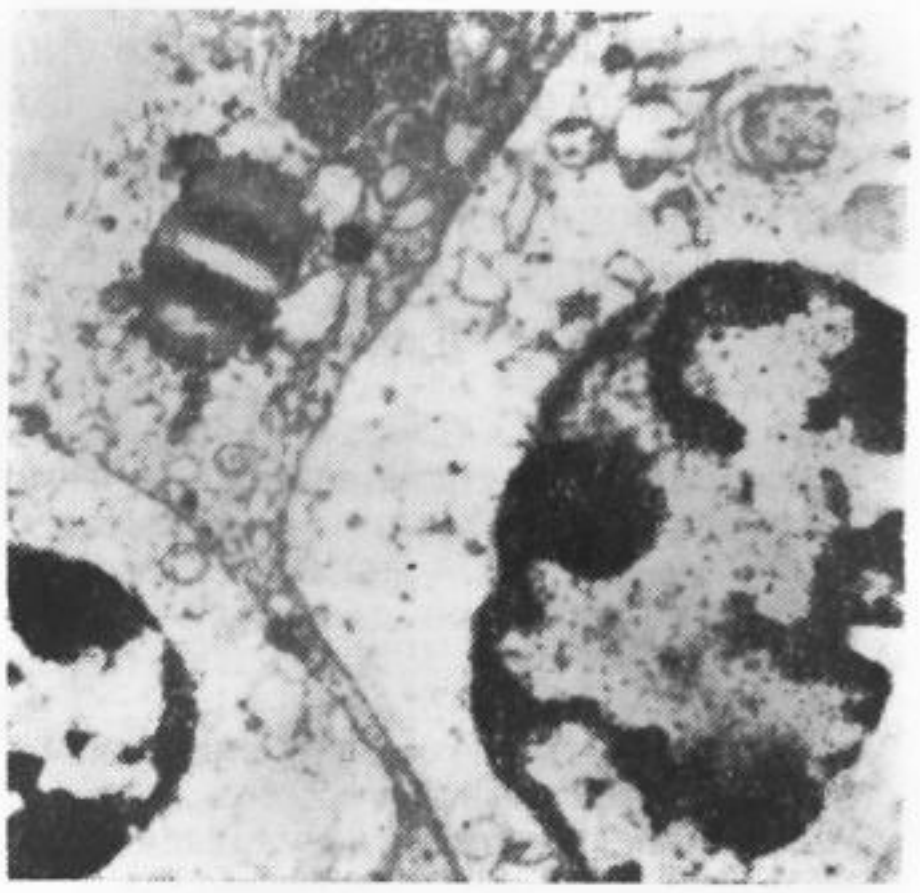


Рис. 2. Инкубация с 15%-ным раствором ДМСО. Увеличение количества гетерохроматина в ядре, частичная деградация органоидов в цитоплазме. ×12000.

30 мин при температуре тающего льда. Затем пробы замораживали по двухэтапной программе: на первом этапе — медленно со скоростью 1°С/мин, на втором — быстро со скоростью 300—400°С/мин до завершения кристаллизации. Пробы отогревали на водяной бане при 40°С.

Для электронно-микроскопических исследований ткань щитовидной железы фиксировали в 5%-ном глутаровом альдегиде, постфиксировали в 2%-ном OSO_4, обезвоживали в растворах ацетона восходящей концентрации и заключали в смесь эпон-аралдит. Полимеризацию проводили при 60°С. Срезы, изготовленные на ультрамикротоме УМТП-2, исследовали в микроскопе ЭМВ-100А при ускоряющем напряжении 75 кВ.

Для характеристики ультраструктуры тиреоцитов определяли объем основных частей клеток и внутриклеточных органоидов в процентах с помощью сетки, имеющей 600 точек по фотографиям, используя модифицированный метод Вайбеля [1].

Результаты и их обсуждение. Ткань щитовидной железы в исходном состоянии имеет своеобразное строение, которое характеризуется наличием «светлых» и «темных» тиреоцитов, образующих пласт фолликулярного эпителия (рис. 1). Ядра тиреоцитов овальной и округлой формы с небольшими глыбчатыми скоплениями гетерохроматина на внутренней поверхности ядерной мембраны окружены узким и относительно равномерным перинуклеарным пространством. Цитоплазма «светлых» клеток характеризуется неравномерно разреженной мелкодисперсной глобулярно-фибриллярной гиалоплазмой и неравномерно распределенными органоидами: участками расширенных цистерн и узких каналов эндоплазматической сети, округлых и овальных митохондрий и единичных мелких секреторных пузырьков. На апикальной поверхности клеток, обращенной к коллоиду, определяются короткие, редко расположенные микроворсинки. «Темные» клетки характеризуются более плотной структурой гиалоплазмы и большим количеством

Матеріал, захищений авторським правом

органоидов, среди которых преобладают неравномерно расширенные каналы эндоплазматической сети и митохондрии. Базальная поверхность тиреоцитов за счет различной величины складок тесно контактирует с базальной мембраной фолликула.

Инкубация кусочков щитовидной железы с 15%-ным раствором ДМСО вызывает изменения различной степени выраженности во всех компонентах ультраструктуры тиреоцитов (рис. 2). Так, одновременно с уменьшением объема ядра происходит увеличение количества компактного хроматина, уменьшается общий объем митохондрий, среди которых увеличивается количество митохондрий с разрушенными в различной степени кристами. Наряду с изменениями количества органоидов (в основном в сторону уменьшения) происходят изменения формы органоидов и ядра. Ядерная мембрана имеет многочисленные выпячивания и неравномерные расширения перинуклеарного пространства, местами обнаруживаются ее разрывы.

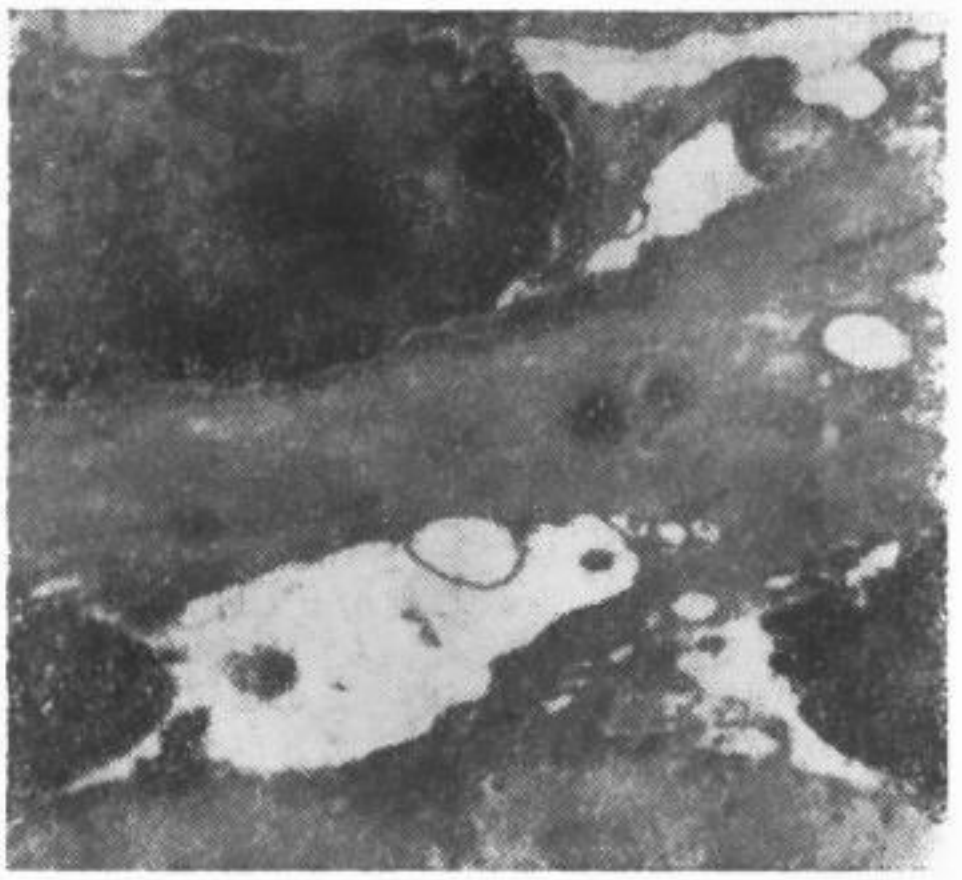


Рис. 3. Замораживание—отогрев под защитой 15%-ного раствора ДМСО. Выраженное увеличение количества гетерохроматина, неравномерное расширение перинуклеарного пространства. ×1200.

Эндоплазматическая сеть содержит резко суженные канальцы в виде трубочек, а также расширенные неправильной формы цистерны и вакуоли. Встречаются отдельные клетки с повреждениями цитоплазматической мембраны и выходом фрагментов цитоплазмы в коллоид фолликулов.

После замораживания — отогрева образцов под защитой ДМСО изменения ультраструктуры тиреоцитов были подобны описанным выше, но в более выраженной форме (рис. 3). Уменьшается абсолютный объем клеток (преимущественно за счет объема цитоплазмы), изменяется структура органоидов и ядра. В ядре в 3—4 раза увеличилось количество плотного хроматина, который в виде неправильной формы тяжей и скоплений обнаруживается по всему ядру. Ядерная оболочка имеет многочисленные поверхностные и глубокие впячивания. Перинуклеарное пространство неравномерно расширено, причем в отдельных клетках наблюдается образование вакуолеобразных полостей. Цитоплазма с мелкодисперсной глобулярно-фибриллярной структурой гиалоплазмы, в которой определяются единичные органоиды, преимущественно в виде пузырьковидных образований. Межклеточные контакты сохранены с формированием сложноизвилистой границы между клетками. На апикальной поверхности клеток редко расположены короткие микроворсинки. Граница апикальной поверхности тиреоцитов с коллоидом тесная.

Объемные отношения основных частей и органоидов тиреоцитов на этапах низкотемпературного консервирования описаны в таблице. Из данных таблицы видно, что после экспериментальных воздействий на ткань геометрические параметры клеток и их органоидов изменяются — инкубация с 15%-ным ДМСО приводит к набуханию цитоплазмы за счет увеличения гиалоплазмы, при этом относительный объем митохондрий и ЭПС уменьшается, объем компактного хроматина в ядре увеличивается; после замораживания — оттаивания еще больше увеличивается относительный объем ядра при дальнейшей конденсации хроматина.

Матеріал, захищений авторським правом

Таким образом, результаты исследования показывают, что изменения ультраструктуры тиреоцитов при инкубации с 15%-ным раствором ДМСО соответствуют изменениям структуры, описанным в литературе по отношению к клеткам других тканей и органов [8, 13, 15]. В данных работах наблюдаемое уменьшение объема ядра и органоидов связывают не только с дегидратирующим действием криопротектора, но и с изменением содержания электролитов в ядре и цитоплазме. Это, оче-

Объемные отношения основных частей и органоидов тиреоцитов на этапах низкотемпературного консервирования, % ($n=5$)

Этапы низкотемпературного консервирования	Части клетки и органоиды					
	$V_ц^*/V_к$	$V_я/V_к$	$V_я/V_ц$	$V_м/V_ц$	$V_э/V_ц$	$V_{пх}/V_я$
I. Исходное состояние						
«темные» тиреоциты	74,2±6,4	25,9±3,2	0,35±0,03	12,2±1,1	14,2±5,6	10,9±3,6
«светлые» тиреоциты	61,3±5,3	38,4±2,8	0,62±0,04	6,0±0,58	24,0±1,2	8,6±2,3
II. Инкубация с 15% ДМСО						
«темные» тиреоциты	78,6±7,2	21,3±3,6	0,27±0,7	3,2±0,37	8,3±2,6	38,4±6,7
«светлые» тиреоциты						
III. Замораживание — отогрев по программе **	68,7±5,3	31,3±4,6	0,45±0,3	2,2±0,54	9,1±2,1	35,2±5,6
	34,2±6,3	66,3±4,2	1,94±0,31	0	0	43,4±4,6

* Здесь ц — объем цитоплазмы, к — объем клетки, я — объем ядра, м — объем митохондрий, э — объем эндоплазматической сети, пх — объем плотного хроматина.
** Здесь выделение «темных» и «светлых» тиреоцитов невозможно.

видно, приводит к компактизации ядерного материала и увеличению количества конденсированного хроматина в ядре клетки. Учитывая, что при замораживании на биоструктуры воздействуют такие факторы, как «эффекты растворов» и кристаллизации жидкой фазы [7], следует ожидать более выраженных изменений структуры внутриклеточных органелл и ядра. Действительно, видно, что после замораживания количество конденсированного хроматина возрастает в 3—4 раза, а в органоидах обнаруживаются более грубые структурные нарушения. Вместе с тем следует отметить, что на всех этапах низкотемпературного консервирования межклеточные отношения в пласте фолликулярного эпителия и тесный контакт коллоида с апикальной поверхностью тиреоцитов в определенной степени сохраняются. Это указывает, что коллоид фолликулов, очевидно, играет существенную роль в криоустойчивости тиреоцитов.

В заключение сделаем некоторые выводы.

В процессе низкотемпературного консервирования щитовидной железы под защитой 15%-ного ДМСО изменения ультраструктуры тиреоцитов имеют однонаправленный характер и выражаются в основном в увеличении объема гетерохроматина в ядре и уменьшении объема органоидов в цитоплазме.

На фоне выявленных структурных изменений межклеточные взаимодействия и контакт тиреоцитов с коллоидом сохраняются на всех этапах низкотемпературного консервирования, что указывает на его важную роль в криоустойчивости клеток щитовидной железы.

1. *Автандилов Г. Г.* Морфометрия в патологии. — М.: Медицина, 1973. — 245 с.
2. *Беличенко Л. И., Яролова П. В.* О жизнеспособности свободных гомотрансплантатов щитовидной железы, консервированной глубоким замораживанием. — Ортопедия, 1969, № 5, с. 195—196.

Матеріал, захищений авторським правом

3. *Брук Г. З.* Низкотемпературное консервирование и трансплантация щитовидной железы в эксперименте.: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Харьков, 1975. — 22 с.
4. *Бурейко Л. В., Артюшкевич В. С.* Изучение морфологической структуры щитовидной и паращитовидной желез при различных методах консервирования. — В кн.: Трансплантация органов и тканей: Материалы II респ. конф. Минск, 1974, с. 276—278.
5. *Гнилорыбов Т. Е.* Результаты гомотрансплантации желез внутренней секреции за 30 лет. — В кн.: Трансплантация органов и тканей. Горький, 1970, с. 168—169.
6. *Головин В. Г., Романова А. М.* Современное состояние проблемы пересадок желез внутренней секреции. — Вест. хирургии им. Грекова, 1962, № 12, с. 71—79.
7. *Пушкарь Н. С., Белоус А. М.* Введение в криобиологию. — Киев: Наук. думка, 1975. — 340 с.
8. *Пушкарь Н С., Капрельянц А. С., Панков Е. Я.* Ультраструктура клетки при низких температурах. — Киев; Наук. думка, 1978. — 139 с.
9. *Сенников Б. А.* Консервирование и трансплантация щитовидной и паращитовидной желез в эксперименте. — В кн.: XXII науч. сессия, посвящ. 50-летию Великой Октябр. соц. революции. Оренбург, 1967, с. 203—204.
10. *Сяпич П. И.* Отдаленные результаты гомопересадки щитовидных и околощитовидных желез в клинике. — В кн.: Трансплантация органов и тканей. Горький, 1970, с. 180—182.
11. *Шенберг М. Г.* Морфологические исследования криоконсервированных трансплантатов щитовидной железы. — Криобиология и криомедицина, 1976, вып. 2, с. 75—77.
12. *Шоргулян П. М., Хашиев Н. А.* Сравнительная оценка проточного и непроточного методов консервирования щитовидной железы. — Эксперим. хирургия и анестезиология, 1976, № 4, с. 50—52.
13. *Эренпрейс Я. Г., Зирне Р. А.* Влияние глубокого замораживания и оттаивания клеток асцитной гепатомы Зайделя крыс на ультраструктуру ядер. — Криобиология и криомедицина, 1978, вып. 4, с. 31—35.
14. *Blumenthal H. T., Walsh L. B.* Survival of guinea-pig thyroid and parathyroid autotransplants previously subjected to extremely low temperatures. — Proc. Soc. Exp. Biol., 1950, **73**, N 4, p. 62—67.
15. *Mazur P.* Cryobiology: the freezing of biological systems. — Science, 1970, **168**, N 3934, p. 939—948.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
02.07.80

УДК 57.043.581.19:631.53+633.11

И. Г. Строна, М. И. Шраго, С. Н. Сорокин

ТОКСИЧНОСТЬ НЕКОТОРЫХ КРИОПРОТЕКТОРОВ ДЛЯ СЕМЯН И РАСТЕНИЙ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ

Озимая пшеница — одна из ведущих зерновых культур нашей страны, определяющая в значительной степени ее продовольственный баланс [1, 2].

В СССР под озимой пшеницей занято около 20 млн. га, в том числе на Украине — около 9 млн. га. Урожайность пшеницы во многом зависит от условий перезимовки. Так, в годы, неблагоприятные для перезимовки озимых культур, урожай озимой пшеницы снижается с 20 ц (в среднем по стране) до 8—10 ц/га, а в отдельных местах наблюдается полная гибель посевов [4].

Таким образом, повышение зимостойкости озимой пшеницы является реальным резервом увеличения валового сбора зерна и потому относится к важнейшим народнохозяйственным задачам. Решения указанной задачи можно достигнуть в основном созданием зимостойких сортов (селекция), разработкой и применением специальных агротехнических приемов, обеспечивающих улучшение условий перезимовки. Каждое из приведенных направлений имеет определенные недостатки и до сих пор не дает желаемых результатов.

К недостаткам первого пути следует отнести длительность процесса селекции сорта с заданными свойствами, кроме того, некоторым препятствием при достижении цели оказывается отрицательная корреляция, отмечаемая между продуктивностью и зимостойкостью [4].

Матеріал, захищений авторським правом

Второй путь также не гарантирует должного повышения зимостойкости, особенно в годы с неблагоприятными погодными условиями для перезимовки растений.

В связи с этим необходим дальнейший поиск подходов, направленных на повышение зимостойкости озимой пшеницы. Конкретная задача сводится к понижению критической температуры для озимой пшеницы на глубине залегания узла кущения на 2—3°С.

Разрабатываются приемы направленного изменения метаболизма

Всхожесть семян озимой пшеницы после обработки

Криопротектор	Концентрация									
	Намачивание									
	К-1	К-2	0,25	1	5	10	20	50	80	100
Глицерин	96	94	98	96	96	80	78	54	—	—
Этиленгликоль ДМОО	96	94	96	96	80	58	24	0	0	0
ПЭО-200	96	94	95	94	92	86	80	26	0	0
ПЭО-400	96	94	95	94	92	88	88	70	60	60
ПЭО-1500	96	94	95	97	96	94	94	95	—	—
$НСР_{0,95}$—1,2%	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Условные обозначения контролей: К-1 — семена без обработки; К-2 — семена, обработанные ботанные дистиллированной водой и вакуумом.

озимого растения с учетом фаз его физиологического развития, представляющие возможность повысить резистентность клеток и тканей к понижению температуры [5, 7, 8, 11]. Возникло новое научное направление, получившее название криофитофизиология [6].

В этом плане особый интерес представляет испытание криопротекторов, защитное действие которых на животные ткани при низких температурах установлено.

В литературе имеются лишь разрозненные данные о действии на ткани различных сельскохозяйственных растений активного криопротектора для животных клеток — глицерина [7, 9]. Отмечено положительное влияние на зимостойкость пшеницы криопротектора диметилсульфоксида (ДМСО) [5] и некоторых физиологически активных веществ, например гидразида малеиновой кислоты [8, 11], экзогенных аминокислот (глютаминовая, аспарагиновая, пролин и их смесь) [3] и др. Представляет интерес испытание влияния на растения других криопротекторов.

Например, полиэтиленоксиды (ПЭО) различной молекулярной массы, обладающие высоким криозащитным действием в отношении клеток костного мозга, крови и других биологических объектов, на растениях не применялись и их действие не изучено.

Настоящая статья — первый этап изучения ряда криопротекторов по их действию на зимостойкость растений и посвящена исследованию общих показателей токсичности, необходимых для определения дозы вещества, допустимого для обработки семян и растений.

Методика работы. Объектом исследований служили семена и растения озимой пшеницы. Семена обрабатывали растворами криопротекторов методом вакууминфильтрации и путем намачивания их в таких же растворах.

При каждом способе обработки семян и растений озимой пшеницы растворами криопротекторов устанавливали их дозы, летальные для организма (ЛД) — концентрацию и экспозицию с тем, чтобы выработать оптимальные режимы (варианты) обработки на уровнях ниже ЛД.

Матеріал, захищений авторським правом

В опытах изучали такие криопротекторы: глицерин, этиленгликоль, ДМСО, ПЭО-400 (полиэтиленоксид молекулярной массы 400), ПЭО-1500 (полиэтиленоксид молекулярной массы 1500).

Обработка семян проводилась в течение 10, 60, 360 мин путем полного погружения их в растворы следующих концентраций: 0,25; 5; 10; 20; 50; 80; 100%. Контролем служили семена, замоченные в дистиллированной воде при соответствующей экспозиции, и семена без обработки.

возрастающими дозами криопротекторов

раствора, %

Вакууминфильтрация											
К-1	К-4	К-3	0,25	1	5	10	20	50	80	100
96	93	95	96	96	95	80	70	52	—	—
96	93	95	96	04	40	20	8	0	0	0
96	93	95	95	94	86	82	76	3	0	0
96	93	95	95	96	90	87	82	68	64	45
96	93	95	96	95	90	82	82	66	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

дистиллированной водой; К-3 — семена, обработанные вакуумом (сухие); К-4 — семена, обра-

Семена озимой пшеницы сорта Мироновская 808, репродукции питомника размножения второго года, перед обработкой растворами предварительно отсортировывались на лабораторных решетках. Для опыта брали семена, сошедшие с решет с размером ячеек 2,5×20 мм. Всхожесть семян определялась по ГОСТу 12038-66 [10].

Согласно требованиям ГОСТа 10467-63 семена озимой пшеницы должны иметь такую всхожесть: I класс — 95%, II — 92%, III — 90%.

По 100 штук семян каждого варианта обработки высевали в чашку Петри с песком под маркер (в две чашки по 50 штук семян в каждую). Повторность опыта четырехкратная. Проращивание проводили при температуре 20°С. На третий день определяли энергию прорастания семян, на пятый — всхожесть. Результаты исследований приведены в таблице.

При установлении токсичности криопротекторов для растений изучались действия растворов следующих концентраций: 0,001; 0,01; 0,1; 0,5; 1; 5; 10%. На участках площадью 1 м² растения обрабатывали растворами из пульверизатора в дозе 50 мл/м² (500 л/га).

Результаты и их обсуждение. В результате проведенных многочисленных опытов оказалось, что наиболее приемлемой экспозицией является 60 мин, поэтому в таблице приведены данные, полученные только при этой экспозиции.

При анализе данных было видно, что обработка семян растворами этиленгликоля вызывает значительную гибель семян при небольшом увеличении концентрации раствора. Например, всхожесть семян при обработке растворами с концентрацией несколько более 10% снижается на 50% ($ЛД_{50}$). Кроме того, при обработке семян растворами этиленгликоля с концентрацией более 10% нарушается высыхаемость, семена слипаются и теряют сыпучесть. При обработке семян растворами этиленгликоля с концентрацией 5% и более семена становятся некондиционными во всхожести и не отвечают требованиям III класса посевного стандарта, утвержденного ГОСТом 10467-63. Поэтому обработку семян озимой пшеницы растворами этиленгликоля для дальнейшего изучения необходимо проводить с концентрациями менее 5%.

Матеріал, захищений авторським правом

Диметилсульфоксид по полученным нами данным также является химическим агентом, жестко действующим на семена озимой пшеницы. Он также обладает токсичностью, вызывая значительную гибель семян при небольших концентрациях рабочих растворов, что влияет на показатель их лабораторной всхожести.

Из полученных данных следует, что полная гибель семян наблюдается при обработке раствором 50%-ной концентрации, а обработка семян раствором с концентрацией 5% и более снижает всхожесть семян до неприемлемого уровня. Кроме того, при этом также наблюдается плохая высыхаемость семян, что делает их непригодными для сеялочного посева.

ПЭО-400 по полученным данным является мягкодействующим слаботоксичным агентом. Потеря всхожести семян на 50% и более наблюдается лишь в вариантах с экспозицией 6 ч при 50%-ной концентрации раствора, и даже при обработке 100%-ным ПЭО-400 всхожесть семян составляет 40%. Оптимальные концентрации растворов ПЭО-400 находятся в интервале до 5%.

Глицерин оказывает на семена также слабое токсическое воздействие. В опыте изучались растворы с концентрацией до 50% (включительно). Это связано с тем, что в более концентрированных растворах глицерина семена очень трудно смочить из-за большого поверхностного натяжения раствора, а впоследствии освободиться от глицерина из-за плохой его испаряемости. И хотя при обработке семян 5%-ным раствором глицерина их всхожесть отвечает требованиям стандарта, поиск оптимальных концентраций необходимо вести среди растворов с концентрацией ниже 5%, так как при таком варианте обработки семена значительно увлажнены, становятся мягкими и непригодными для механического высева.

ПЭО-1500 использовался так же, как и глицерин, в виде раствора с концентрацией до 50% (включительно). Это вещество, по нашим данным, является самым низкотоксичным из всех изучаемых в опыте. Ни для одного из вариантов $ЛД_{50}$ не установлена. При экспозиции 60 мин обработка растворами ПЭО-1500 изучаемых в опыте семян озимой пшеницы незначительно повлияла на их всхожесть.

При установлении показателей токсичности используемых криопротекторов для растений озимой пшеницы в интервале изучаемых концентраций растворов гибели не обнаружено. Испытания криозащитной активности криопротекторов в отношении озимой пшеницы будут проведены с учетом установленных показателей токсичности, и их результаты явятся предметом следующих сообщений. При инфильтрации в связи с более глубоким проникновением раствора токсичность препаратов повышается, поэтому при таком способе обработки следует пользоваться более низкими концентрациями.

Самым токсичным препаратом среди испытанных оказался этиленгликоль, который в 10%-ной концентрации при намачиваниях снижает всхожесть до 58%, а при применении вакууминфильтрации — до 40%. Плохая высыхаемость семян отмечена также после обработки глицерином, ДМСО. Дальнейшую работу по установлению оптимальных концентраций для достижения криозащитного эффекта следует проводить как методом замачивания, так и методом вакууминфильтрации, при котором требуются более низкие концентрации препаратов. Допустимые концентрации для всех испытанных криопротекторов находятся ниже 5%, приемлемая продолжительность замачивания 60 мин.

Таким образом, испытанные криопротекторы (глицерин, этиленгликоль, ДМСО, ПЭО-400, ПЭО-1500) по действию на семена озимой пшеницы и целые растения следует отнести к классу веществ, обладающих низкой токсичностью. Однако в характере действия изученных криопротекторов отмечены определенные различия.

Матеріал, захищений авторським правом

Минимальная токсичность для семян озимой пшеницы отмечена у ПЭО-1500 и ПЭО-400.

При испытании криопротекторов в качестве возможного средства, повышающего зимостойкость пшеницы, следует учесть установленные показатели их общей токсичности.

1. *Материалы* XXVI съезда КПСС. — Правда, 1981, 2 марта.
2. *Материалы* июльского (1978 г.) Пленума ЦК КПСС. — Парт. жизнь, 1978, № 4, с. 3—37.
3. *Бабенко В. И., Махновская М. Л.* Повышение морозоустойчивости озимой пшеницы под действием экзогенных аминокислот. — Докл. ВАСХНИЛ, 1977, № 9, с. 13—14.
4. *Гуляев Г. В., Гужов Ю. Л.* Селекция и семеноводство полевых культур. — М.: Колос, 1972. — 455 с.
5. *А. с. 571231 (СССР).* Способ защиты растений от заморозков / О. И. Калоша, Н. С. Пушкарь, А. М. Белоус, В. А. Рябокляч, В. Е. Семенюк, М. И. Шраго. — Опубл. в Б. И., 1977, № 33, с. 9.
6. *Калоша О. И.* Физиологические основы зимостойкости озимых зерновых культур. — В кн.: Методы и приемы повышения зимостойкости озимых зерновых культур: Тез. докл. на Всесоюз. науч.-метод. совещ. Харьков, 20—22 июня 1973 г. М., 1973, с. 23—25.
7. *Максимов Н. А.* Избранные работы по засухоустойчивости и зимостойкости растений: В 2-х т. М.: Изд-во АН СССР, 1952. — Т. 2. 294 с.
8. *Молчанова З. Я., Кадыров Ч. Ш.* Влияние гидразида малеиновой кислоты и бензимидазола на зимостойкость виноградного растения. — Тр. НИИ садоводства, виноградарства и виноделия им. акад. Р. Р. Шредера, 1977, № 38, с. 107—112.
9. *Самыгин Г. А.* Причины вымерзания растений. — М.: Наука, 1974. — 192 с.
10. *Семена* и посадочный материал сельскохозяйственных культур: М.: «Стандарты», 1969. — 395 с.
11. *Ханина Н. П.* Использование гидразида малеиновой кислоты с целью повышения зимостойкости яблони. — Бюл. науч. информ. Центр. генет. лаб. им. И. В. Мичурина, 1977, вып. 26, с. 47—50.

Укр.НИИ растениеводства, селекции
и генетики им. В. Я. Юрьева
ЮО ВАСХНИЛ

Поступила в редколлегию
10.02.80

Матеріал, захищений авторським правом

III. КРИОМЕДИЦИНА

УДК 57.043.612.43.45.014.41.089.843

Н. С. Пушкарь, А. М. Утевский,
В. А. Чуйко, Н. Г. Цариковская

КОНСЕРВИРОВАНИЕ И ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА

Интерес к пересадкам желез внутренней секреции как методу лечения эндокринной недостаточности, возникшему в конце XIX ст. — начале XX ст., не потерял своего значения и сейчас [15, 35, 41].

Основным его преимуществом по сравнению с широко применяемой гормональной терапией является возможность физиологически полноценного восстановления эндокринной недостаточности и гормонального гомеостаза, адекватной нейро-эндокринной регуляции вегетативных функций организма. При гормональной терапии ограничивается спектр биологических эффектов и лишь частично компенсируется эндокринная недостаточность, возникают рефрактерность и побочные реакции.

Особенностью пересадки эндокринных структур является возможность их трансплантации в виде целого органа, его доли или фрагмента, гомогенатов и даже отдельных клеток [17, 19, 24, 26, 28, 33, 37, 38], что обусловлено характером эмбрио- и филогенетического развития эндокринной ткани, ее метаболической обеспеченностью и связанной с ней устойчивостью к ишемии и другим неблагоприятным факторам окружающей среды [14]. Это открывает широкие возможности для легкодоступной в хирургическом отношении свободной пересадки эндокринных тканей и клеток.

Важным разделом в проблеме трансплантации эндокринных органов и тканей является их консервирование. Этой проблеме посвящено значительное количество исследований и достигнуты определенные успехи.

Эндокринные органы были одними из первых высокоспециализированных тканевых структур, для консервации которых были использованы низкие (—79°С) и сверхнизкие (—196°, —296°С) температуры. Сохранение их жизнедеятельности и функциональной активности при пересадке позволило оптимистически рассматривать использование глубокого охлаждения для консервации [18—22, 28, 30, 32, 38, 43].

В данной статье приводятся имеющиеся в литературе и собственные данные о консервировании и трансплантации щитовидной железы — эндокринного органа, наиболее изученного с данной точки зрения, пересадка которой представляет существенный интерес для клинической эндокринологии.

Существующие в настоящее время методы консервирования щитовидной железы можно разделить на две группы: сохранение при пониженных положительных или околонулевых температурах, не сопровождающихся образованием кристаллов льда в тиреоидной паренхиме и выдерживание в замороженном состоянии при отрицательных — низких и сверхнизких температурах.

Среди методов, основанных на гипотермии, в свою очередь, следует выделить методы, в основе которых лежит насыщение тиреоидной па-

Матеріал, захищений авторським правом

ренхимы стабилизирующими веществами, метаболическими субстратами или ингибиторами путем погружения ее в специальные среды и те, в которых соответствующие соединения поступают с помощью перфузии органа через систему кровеносных сосудов.

Основой для консервирующих сред, используемых при гипотермических методах хранения, служат солевые растворы разнообразного состава, раствор Рингер — Локка с добавлением антибиотиков [25, 26], стандартный стабилизатор крови — ЦОЛИПК-7б [24], глюкозо-цитратный раствор с антибиотиками [3, 4], одногрупповая кровь с антибиотиками и гепарином [3].

Т. Е. Гнилорыбов [6, 7] приводит данные о консервировании щитовидных желез погибших от травм людей погружением в солевой раствор. Железу брали через шесть—десять часов после смерти донора и хранили при температуре 2—4°С. При этом обеспечивалось сохранение функциональной полноценности ткани в течение трех—девяти дней. После пересадки консервированных желез больным с кретинизмом отмечали восстановление их физиологической и умственной активности, нормализацию биохимических показателей в крови (сахар, хлориды), увеличение накопления J^{131} щитовидной железой и обмена веществ. Использование в качестве среды одногрупповой крови не приводит к удлинению сроков хранения [3]. Удовлетворительный эффект от пересадки кадаверных щитовидных желез, изъятых у взрослых и новорожденных, был получен при лечении гипопаратиреоза [24]. В этих случаях использовали железы, хранившиеся в растворе ЦОЛИПК-7б в течение трех—семи суток при температуре 2—4°С. В. И. Точилин с соавторами [25] использовал для консервации щитовидно-околощитовидного комплекса, взятого у погибших от асфиксии плодов, комбинацию физиологического раствора и жидкости Рингер — Локка с добавлением антибиотиков. После хранения в течение 10—12 дней при температуре 4—6°С консервированные железы использовали для трансплантации больным гипотиреозом и микседемой. В результате проведенного лечения исчезали клинические симптомы тиреоидной недостаточности, нормализовался основной обмен, температура тела, артериальное давление, на протяжении года сохранялась удовлетворительная йодаккумулирующая способность трансплантата.

Л. В. Бурейко [3, 4] исследовал сохранность щитовидной и паращитовидной желез при их консервировании погружением в жидкую изотоническую среду, содержащую глюкозу, цитрат и антибиотики, а также путем перфузии указанной жидкости через сосудистую сеть. На основании исследований тканевого дыхания, гистоструктуры, а также биохимического изучения состава перфузата (pH среды, концентрации сахара, общего азота) автор считал, что перфузионный метод консервирования обеспечивает лучшие условия для сохранения жизнеспособности тиреоидной паренхимы и увеличивает сроки переживания консервированного аллотрансплантата в организме реципиента.

Преимущество метода перфузионного насыщения подтверждается и другими исследователями [29], которые основой среды для консервирования избрали сбалансированный раствор Рингер — Локка с добавлением глюкозы, АТФ, цитрата натрия, димедрола, гидрокортизона, гепарина и пенициллина. При дозированной подаче данной среды и одновременном удалении продуктов метаболизма из железы обеспечивается сохранение постоянного уровня гликолитической активности, тканевого дыхания и способности к гормоногенезу на протяжении 50 сут. Отмечается также сохранение фолликулярного строения тиреоидной паренхимы. При этом обнаруживаются некоторые деструктивные изменения. Очаговое слущивание фолликулярного эпителия в виде пластов и отдельными клетками характерно для обоих способов консервирования в ранние сроки наблюдения, однако в дальнейшем эти

Матеріал, захищений авторським правом

изменения нарастают при непроточном методе консервирования, что приводит к полному исчезновению фолликул к 25 сут хранения, в то время как при использовании перфузии происходит регенерация и восстановление структуры тиреоидной паренхимы, которые прослеживаются на протяжении 50 сут. Отмечается зависимость между сроками консервирования и длительностью переживания в организме реципиента. Чем меньше сроки консервирования желез, чем менее выражены в них деструктивные изменения, тем длительнее их функционирование в организме после пересадки. При исследовании иммунологического ответа организма на аллотрансплантацию консервированных щитовидных желез обнаруживаются менее выраженные реакции, чем при трансплантации нативных желез.

Представленные данные позволяют заключить, что методы консервирования щитовидной железы при положительных околонулевых температурах обеспечивают сохранение функциональной активности на протяжении трех—восьми суток. При более длительных сроках хранения отмечается развитие выраженных деструктивных изменений, снижение или исчезновение признаков функциональной активности железы. Необходимо, однако, отметить, что приведенные результаты получены преимущественно при консервировании целого органа. Из экспериментальных работ известно, что фрагментирование органа на дольки или срезы создает лучшие условия для процессов диффузии и осмоса, обеспечивающих транспорт кислорода и соответствующих субстратов, что должно сопровождаться удлинением сроков переживания с сохранением способности к гормоногенезу.

Методы, основанные на гипотермической перфузии щитовидной железы, через сосудистую ножку позволяют вдвое или втрое увеличить срок хранения. К недостаткам перфузионного метода следует отнести его сложность: непрерывная перфузия в течение трех суток требует на протяжении всего срока консервирования специальной аппаратуры, квалифицированного персонала, обеспечивающего не только поддержание всех параметров перфузии, но и осуществление постоянного биологического контроля.

Более перспективными оказались методы замораживания щитовидной железы: их использование существенно удлинило сроки хранения органа. Охлаждение до —25°С предпочтительнее, чем выдерживание при —4 — +6°С: при таком способе железа сохраняет биологическую активность в течение трех недель [8]. Б. А. Сенников [22] исследовал состояние щитовидной железы после ее замораживания до —78°С и хранения в течение 55 дней при температуре —8—10°С. Такое воздействие приводит к повреждению структуры щитовидной железы, что выражается в набухании стромы и ее гомогенизации, десквамации эндотелия сосудов, пикнозе и фрагментации ядер.

Первые попытки использовать глубокое охлаждение для консервирования щитовидной железы были далеко не совершенны и проводились без применения криопротектора. Щитовидные железы морских свинок погружали в жидкий азот на 10 мин и на 24 час в твердую углекислоту [36]. При гистологическом исследовании желез, замороженных в углекислоте, через 13 сут после аутоимплантации отмечали нормальное строение ткани щитовидных желез, сохранение фолликулярного строения тиреоидной паренхимы. В единичных клетках наблюдался митоз, наряду с которым обнаруживались участки некроза, которые, однако, встречались и в нативных трансплантатах. Среди криоконсервированных трансплантатов наиболее хорошо сохранялись извлеченные на третий день после операции; на пятые сутки в центральной части трансплантатов обнаруживался некроз, но периферические фолликулы находились в хорошем состоянии. Трансплантат, изъятый на 11-й день, полностью замещался соединительной тканью. Было высказано пред-

Матеріал, захищений авторським правом

положение, что быстрое охлаждение до —196°С, во время которого происходит витрификация внутри- и внеклеточной воды, вызывает меньшие повреждения щитовидной железы, чем медленное замораживание до —79°С. Проводились гистологические исследования четырех желез, которые после замораживания в течение 10 мин в жидком азоте и последующего хранения в течение 24 часов при температуре —79°С подвергались аутотрансплантации. Изъятые на 11-й день после операции железы характеризовались фолликулярным строением, фолликулы были выстланы кубическим и цилиндрическим эпителием, некоторые клетки находились на стадии митоза.

Глицерин был первым криопротектором, используемым для низкотемпературного консервирования щитовидной железы [42]. При замораживании щитовидной железы крыс до —79°С наилучший криозащитный эффект обеспечивался применением 15 и 20%-ной концентраций глицерина. Уменьшение концентрации глицерина и увеличение продолжительности хранения до 1 мес снижало функциональную активность трансплантатов, которые исследовались спустя 28 сут после имплантации. Эффективность глицерина в качестве криопротектора при консервировании щитовидной железы крыс была продемонстрирована и другими авторами [37, 42]. Крысы, которым имплантировали щитовидную железу, замороженную при температуре —79°С без криопротектора, заметно отставали в росте и трансплантат характеризовался низким уровнем поглощения радиоактивного йода. В отличие от этой группы животные, которым пересаживалась железа, консервируемая с 15%-ным глицерином, нормально развивались и транплантаты характеризовались высоким уровнем поглощения йода.

Вопросам устойчивости щитовидной железы к замораживанию посвящена работа М. С. Мицкевича [16], в которой наряду с изучением структуры трансплантата исследовалась способность к поглощению радиоактивного йода. Отмечалось, что после консервирования при —196°С количество прижившихся транплантатов составляет 70%. В группе крыс с прижившимися трансплантатами отмечалось заметное отставание в росте. Изменения в структуре трансплантатов наблюдались при пересадке нативных и консервированных желез. В ранние сроки наблюдения отмечались дегенеративные изменения (исчезновение фолликул в центре и на периферии, отсутствие коллоида, появление лейкоцитов и пикнотических ядер) и слабовыраженный, диффузный характер радиоавтографов. По мере увеличения сроков прослеживаются репаративные процессы, появляется значительное количество сформированных фолликулов, выполненных коллоидом. Встречаются эпителиальные клетки, в которых имеются митозы. В капсуле вокруг трансплантата появляются кровеносные сосуды. Указанный характер изменений, однако, характерен лишь для наружного участка железы; в ее центральной части выражена зона некроза, отдельные участки железистой ткани замещены соединительной тканью. Радиоавтографы трансплантатов отчетливо положительны. Указанная динамика изменений характерна для нативных и консервированных трансплантатов. Однако репаративные процессы в криоконсервированнных трансплантатах существенно запаздывают.

К двум месяцам нативный трансплантат по структурным и функциональным характеристикам практически не отличается от нормальной щитовидной железы. В трансплантате, подвергнутом консервированию, вплоть до трех месяцев отмечается резкое увеличение числа фолликулов и нефолликулярных эпителиальных клеток, хотя значительная площадь трансплантата все еще занята фиброзной тканью. Радиоавтографы характеризуются определенной плотностью.

В опытах со щитовидными железами кролика и собаки исследовалась криозащитная эффективность низкомолекулярного (12600) по-

Матеріал, захищений авторським правом

ливинилпирролидона (ПВП) и глицерина [1—2]. Наряду с ними в состав ограждающих растворов входили вещества, обладающие интра- и экстрацеллюлярным действием (глюкоза, гомологичная сыворотка, среда 199, гидролизат лактальбумина). Было проведено три серии опытов. В первой серии замораживание проводилось при температуре —79°С, во второй — при —196°С, в третьей — при —196°С, но при поэтапном снижении температуры. Насыщение желез проводилось путем погружения их в соответствующий раствор на 30 мин. Эффективность консервирования щитовидных желез оценивали как in vitro, так и после свободной ауто- и гомотрансплантации.

Наблюдения за трансплантатами осуществлялись с первого дня после операции на протяжении 64 сут. Было установлено, что замораживание щитовидных желез кроликов и собак до —79 и —196°С без применения криопротектора не обеспечивает сохранность железы, что противоречит наблюдениям других авторов на щитовидных железах крыс. Возможно, при замораживании более крупных органов в условиях использованного режима охлаждения высокие скорости не могли быть обеспечены, что и послужило причиной разрушения структуры щитовидных желез.

При сравнительной оценке криозащитной эффективности глицерина и ПВП было установлено, что глицерин в концентрации 12 и 20% обеспечивает удовлетворительную сохранность функции щитовидных желез при замораживании до —79 и —196°С, однако предпочтительнее ПВП, который в 8,5%-ной концентрации обеспечивает сохранение не только гистологической структуры, но и способности к поглощению J^{131} и росту тиреоцитов в культуре ткани. На 12—21 сут в нативных аутотрансплантатах наблюдалось интенсивное замещение погибших клеток фолликулярного эпителия соединительной тканью. В консервированных аутотрансплантатах эти процессы формировались в более поздние сроки и сохранялись длительнее. Отдельные новообразованные фолликулы между волокнами соединительной ткани прослеживались на периферии: на 30—35 сут в свежих и на 42-й день в консервированных образцах. При сравнении сроков переживания ауто- и аллогенных трансплантатов не выявлено значительных различий между группами.

В работе Б. М. Даценко и соавторов [11—13] исследовалось влияние на щитовидную железу криопротектора полиэтиленоксида молекулярной массы 400 (ПЭО-400) [5]. Насыщение щитовидной железы крыс ПЭО-400 производилось путем ретроградной перфузии верхней половины тела животного. В перфузат добавляли гепарин, спазмолитики и антигистаминные препараты. Температуру раствора за период перфузии (6 мин) постепенно снижали с +30°С до +5°С. Влияние различных режимов перфузии на щитовидную железу исследовалось с помощью рентгеноструктурных методов, ЯМР, изучалось также тканевое дыхание и поглощение J^{131}. При анализе рентгенограммы замороженных образцов железы можно заключить, что увеличение содержания ПЭО-400 в перфузате сопровождается уменьшением размеров зерен с 50—60 мкм (нативная железа) до 10—15 мкм (железа после перфузии 30—40% ПЭО-400), что предполагает снижение повреждающего эффекта замораживания.

Методом ЯМР изучалось состояние воды в тканях тиреоидного эксплантата под влиянием криопротектора. Эти исследования показали, что для консервации щитовидной железы целесообразно использовать 30%-ный раствор ПЭО, поскольку именно такая концентрация обеспечивает максимальную стабилизацию воды. При исследовании тканевого дыхания экспериментом было установлено, что повышение ПЭО-400 в перфузате сопровождается снижением способности к поглощению кислорода: незначительным при 10 и 20%-ной и существенным при 40 и 50%-ной концентрации ПЭО-400. Удаление криопротектора

Матеріал, захищений авторським правом

из тиреоидной паренхимы сопровождается восстановлением уровня тканевого дыхания. Аналогичным образом ПЭО-400 влияет на способность к поглощению радиоактивного йода: при использовании 30%-ной концентрации она угнетается вдвое, 50%-ной — почти в четыре раза. Наблюдаемая депрессия йодакумулирующей функции, как и тканевого дыхания, обратима — она восстанавливается при удалении ПЭО-400 из перфузата. После аллопересадки криоконсервированной (1°С/мин) с 30%-ной концентрацией ПЭО-400 щитовидной железы были получены результаты, свидетельствующие о ее приживлении и функционировании. На это указывало восстановление уровня тиреоидных гормонов в плазме крови тиреоидэктомированных крыс на 20-е сутки после трансплантации. Если пересаживалась железа, замороженная без криопротектора, уровень тиреоидных гормонов в крови не отличался от их содержания у тиреоидэктомированных крыс. Криоконсервированный с ПЭО-400 трансплантат сохранял способность продуцировать йодаминокислоты на протяжении всего срока наблюдения — 30 сут, однако их уровень в крови был снижен по сравнению с нативным и криоконсервированным трансплантатом, изъятым на 20-е сут после операции. При исследовании микроструктуры в контрольной группе (нативные трансплантаты) признаки функциональной активности отмечались на 10-е сут, отсутствовали на 20-е, вновь появлялись на 30-е сут и полностью отсутствовали на 60-е сут. В группе криоконсервированных трансплантатов через 20 и 30 сут после пересадки обнаруживалось исчезновение фолликулов, появление мононуклеарных клеток. Неожиданными, однако, были результаты гистологических исследований на 60-е сут после пересадки. Из четырех исследованных трансплантатов в трех из них на периферии наблюдались сравнительно крупные фолликулы, стенка которых состояла из высоких тиреоцитов с куполообразным выпячиванием на апикальном конце. Интерфолликулярный коллоид вакуолизирован, в центре его — ядра тиреоцитов. Мелкие фолликулы содержали густой коллоид. Несоответствие в сроках изменений, характеризующих структурные и биохимические показатели, можно объяснить неодинаковой степенью выраженности иммунологических процессов [34], так как опыты проводились на различных группах животных.

При сравнительном исследовании влияния трансплантации щитовидной железы на функцию коры надпочечников было установлено, что пересадка нативной и консервированной желез тиреоидэктомированным крысам сопровождается более быстрым восстановлением (6—12 сут вместо 18—30 сут) уровня 11-ОКС в крови, сниженного в результате тиреоидэктомии [31]. Отличительной чертой реакции коры надпочечников на трансплантацию криоконсервированной щитовидной железы является более замедленный, но более значительный характер увеличения уровня 11-ОКС в крови. Учитывая существование функциональной взаимосвязи между системами: гипофиз-щитовидная железа и гипофиз-кора надпочечников, изменения в реакции коры надпочечников, обнаруженные при трансплантации криоконсервированной железы, указывают на ее полноценную гормонопродуцирующую и функциональную активность в организме реципиента и проявление ею регуляторных свойств — способности к нормализации межэндокринного гормонального гомеостаза, нарушенного в результате тиреоидэктомии.

При замораживании щитовидной железы человека до —80°С использовали 15%-ный глицерин [39]. После 30 мин замораживания срезы железы погружали для последующего хранения в сосуд с жидким азотом и хранили от 1 до 8 недель. Размораживание образцов производили при +37°С, после чего осуществляли замену среды с глицерином на физиологический раствор и срезы инкубировали в среде, содержащей 95% O_2 и 5% CO_2. Было установлено, что под влиянием тиреотропного гормона (ТТГ) в консервированной железе существенно (на

Матеріал, захищений авторським правом

152% по отношению к нестимулированному образцу) увеличивается уровень цАМФ. Вместе с тем отмечена неодинаковая реактивность к тиреоидным стимуляторам, что, по мнению автора, является результатом функциональной неоднородности различных участков тиреоидной паренхимы и неодинаковой функциональной активностью самих щитовидных желез [39]. Не исключено, однако, что вариабильность полученных данных является результатом отсутствия строго контролируемой скорости замораживания, адекватности использования глицерина в качестве криопротектора и т. д. В работе не были представлены данные о пересадке консервированной железы.

Нами [21] исследовалось влияние факторов криоконсервирования на щитовидную железу. Показано, что криопротекторы оказывают неодинаковое влияние на J^{131}-аккумуляцию. При этом в действии на щитовидные железы быка и человека были отмечены различия в эффекте одного и того же вещества. ПЭО-400 в опытах на срезах щитовидных желез человека не изменял уровень аккумуляции, в то время как в щитовидных железах быка он существенно увеличивал ее. Указанные различия, очевидно, объяснимы видовыми особенностями (уровень внутритиреоидного метаболизма, степень и характер васкуляризации, иннервации) исследуемых желез.

Глицерин оказывал умеренно ингибирующее действие на поглощение йода щитовидными железами человека и быка. Это его действие проявляется при использовании 15%-ного раствора. Дальнейшее увеличение концентрации не приводит к дополнительному угнетению йодаккумуляции. При насыщении щитовидных желез человека и быка димексидом отмечается угнетение J^{125} — аккумуляции, однако в образцах щитовидной железы человека этот эффект более выражен. Существенное ингибирование поглощения йода тиреоидной паренхимой обнаруживается при инкубации железы в растворах этиленгликоля. Как и в опытах с димексидом, указанный эффект более выражен в срезах щитовидной железы человека, что свидетельствует о большей ее чувствительности к действию криопротекторов. Различия в действии криопротекторов, очевидно, объясняются неодинаковой проникающей способностью их в клетки.

При исследовании влияния криопротекторов на биосинтез белков в срезах тиреотоксической измененной щитовидной железы человека установлена высокая толерантность указанного процесса к действию всех исследуемых соединений. При изучении действия глубокого замораживания на функциональные процессы в щитовидной железе исследовалось состояние йодаккумулирующей способности, биосинтеза белка, связывание трийодтиронина — J^{125} и L-норадреналина [H^3], отражающее различные стороны тиреоидного метаболизма и процессов его регуляции. Отмечена устойчивость процесса йодаккумуляции к замораживанию. В опытах без применения криопротектора при замораживании железы со скоростью 300—400°С/мин сохранялось 40% способности железы к поглощению йода-131. Эти данные согласуются с работами других авторов [16, 36] и, очевидно, могут быть объяснены особенностями метаболизма данного органа. При замораживании щитовидной железы с полиэтиленоксидом молекулярной массы 400 отмечается значительное угнетение уровня йодаккумуляции. Результаты позволяют предположить, что ПЭО-400 обладает сравнительно малой способностью проникать внутрь клетки при насыщении ткани путем ее погружения в растворы с ПЭО-400. При инкубировании срезов щитовидной железы человека с глицерином, димексидом и этиленгликолем, обладающими более высокой проникающей способностью, криозащитный эффект проявляется сохранением 70—80% йодаккумулирующей активности.

Учитывая, что более 60% всех белков щитовидной железы приходится на долю тиреоглобулина, представляло интерес выяснить, в

Матеріал, захищений авторським правом

какой мере замораживание отражается на имеющем первостепенное значение для тиреоидного гормоногенеза процесс биосинтеза белка. Было установлено, что охлаждение срезов щитовидной железы до температуры —196°С без применения криопротекторов существенно угнетает этот процесс: в щитовидной железе человека — в десять раз, быка — в шесть раз [9], что свидетельствует о его высокой криолабильности, сравнимой, однако, с другими органами [10]. Предварительное погружение срезов железы в растворы ПЭО-400 не обеспечивает сохранения этого процесса. В то же время вещества, обладающие способностью проникать в клетки — глицерин, димексид и этиленгликоль, обеспечивают высокий уровень криозащиты процесса биосинтеза белка.

Важное значение в регуляции и ауторегуляции эндокринных функций принадлежит ингибированию собственным гормоном по типу короткой обратной связи гормоногенеза в периферических железах внутренней секреции. Первичным процессом этого механизма является связывание циркулирующего гормона в железе специфическими акцепторами. Показано, что замораживание (10°С/мин) угнетает процесс связывания L-трийодтиронина в щитовидной железе человека на 60%. Использование димексида способствовало увеличению (на 25%) активности исследуемого процесса. Следствием криогенного воздействия на щитовидную железу, однако, является не только уменьшение способности к связыванию гормона, но и предотвращение стимулирующего эффекта на этот процесс норадреналина, что, возможно, является результатом уменьшения количества акцепторов трийодтиронина в железе или их активности. В регуляции тиреоидного метаболизма, кровообращения и гормоногенеза существенное значение принадлежит адренергическим механизмам [40]. Одним из звеньев этого механизма, ответственным за неэнзиматический компонент инактивации медиатора, является захват и обратный захват норадреналина нервными окончаниями, обеспечивающий тонкую физиологическую регуляцию на уровне пресинаптического звена адренергической передачи. Увеличение активности захвата приводит к избыточному накоплению норадреналина и сопровождается изменением направленности и интенсивности процесса медиации. Показано, что низкотемпературное консервирование щитовидной железы человека (1°С/мин до —196°С в присутствии 15% ДМСО) сопровождается угнетением нейронального захвата L-норадреналина (H^3) на 30% [32]. При сопоставлении этих данных с характером захвата медиатора предсердием, где процент ингибирования составлял 50—60% [27], отмечалась большая криоустойчивость процесса в щитовидной железе.

Таким образом, один и тот же процесс в различных тканях и органах может по-разному реагировать на действие низких температур. Ранее была отмечена устойчивость к замораживанию таких функциональных процессов в щитовидной железе, как йодаккумуляция, связывание J^{125} — трийодтиронина, что свидетельствует о криостабильности целого ряда метаболических и регуляторных процессов в щитовидной железе. Эти представления согласуются с данными Лабори [14] о высокой устойчивости эндокринных органов к разного рода неблагоприятным воздействиям (ишемии, аноксии и т. д.), которая определяется особенностями метаболизма и его регуляцией.

Наиболее объективным критерием оценки функции криоконсервированного трансплантата является его приживление и восстановление функциональной активности в организме реципиента. Нами была изучена способность криоконсервированного аутоимплантата к накоплению йода. Аутоимплантация больным производилась спустя четыре—шесть месяцев после хирургического лечения тиреотоксикоза при появлении клинических и гормональных признаков гипотиреоза. Железы, изъятые при операции, замораживались (1°С/мин) до температуры —70°С с

Матеріал, захищений авторським правом

последующим опусканием в жидкий азот в присутствии 15%-ного димексида и хранились в течение четырех—шести месяцев. Аутоимплантация срезов железы (масса 4—6 г) производилась в подкожный карман передней складки живота.

Полученные результаты свидетельствуют о существовании определенной фазности в характере йодаккумуляции. В ранние сроки — через 7—10 сут и 2—4 мес после аутоимплантации во всех трех группах обнаруживается гипотиреоидный характер исследуемой функции. Спустя 6 мес йодаккумулирующая активность всех групп аутоимплантатов увеличивается и составляет 8—12%, при норме 15%. Через один-два года после имплантации отмечено восстановление до уровня контрольных показателей йодаккумулирующей активности криоконсервированного аутоимплантата.

Таким образом, при аутоимплантации криоконсервированной щитовидной железы больным, произведенной спустя 6—8 мес после низкотемпературного хранения при —196°С, отмечается сохранение и восстановление важнейшей в функциональном отношении функции — аккумуляции йода, отражающей начальную неорганическую фазу интратиреоидального метаболизма.

При сопоставлении активности исследуемого процесса в аутоимплантатах различных групп можно выявить различия в развитии и интенсивности восстановительного периода. Наиболее быстро (к 6 мес) и значительно восстанавливается йодаккумулирующая активность в криоконсервированных аутоимплантатах, хранившихся при температуре жидкого азота 4—6 мес. Промежуточное положение занимает уровень йодаккумуляции в криоконсервированных аутоимплантатах, пересаживаемых субоперационно. Для нативного аутоимплантата характерно сохранение гипотиреоидного уровня йодаккумуляции на протяжении длительного срока наблюдения — двух лет.

При клиническом обследовании больных, которым производилась аутоимплантация криоконсервированной щитовидной железы, ни в одном случае не наблюдалось развития гипотиреоза и возникновения побочных реакций.

Анализируя приведенные в данной статье материалы, следует заметить, что вопросы консервирования щитовидной железы получили достаточное развитие и оформились в определенные методы. Предложенные методы консервации позволяют сохранять щитовидную железу при гипотермических режимах и в условиях глубокого замораживания.

Консервирование при низких температурах щитовидной железы характеризуется высоким уровнем показателей функциональной, метаболической и регуляторной активности, о чем свидетельствуют экспериментальные наблюдения, а также изучение клинической эффективности пересадки криоконсервированной щитовидной железы человека.

1. *Беличенко Л. И.* Ауто- и гомопластика как критерий эффективности консервирования щитовидной железы замораживанием. — В кн.: Гематология и переливание крови. Киев : Здоров'я, 1973, с. 97—102.
2. *Беличенко Л. И., Яралова П. В.* О жизнеспособности свободных гомотрансплантатов щитовидной железы, консервированной глубоким замораживанием. — В кн.: Ортопедия. Киев : Здоров'я, 1969, с. 195—198.
3. *Бурейко Л. В.* Оценка консервирования щитовидной и паращитовидной желез в жидкой среде и перфузионным методом по данным биохимических исследований. — В кн.: Трансплантация органов и тканей. Рига, 1972, с. 477—478.
4. *Бурейко Л. В., Гнилорыбов Т. Е., Данилов Н. П., Рябов К. П.* К вопросу консервирования щитовидной и паращитовидной желез. — В кн.: Трансплантация органов и тканей. Рига, 1970, с. 458—459.
5. *Воротилін О. М., Шраго М. І.* Про захисну дію полімерів окису етилену на еритроцити людини при заморожуванні. — Доп. АН УРСР, 1966, № 5, с. 638—643.
6. *Гнилорыбов Т. Е.* Консервация и методы гомотрансплантации эндокринных желез. — В кн.: Трансплантация органов и тканей. Минск, 1969, с. 39—41.

Матеріал, захищений авторським правом

7. *Гнилорыбов Т. Е.* Гомопластическая трансплантация желез внутренней секреции на сосудистые ножки. — Вест. АМН СССР, 1956, № 2, с. 35—45.
8. *Головина В. Г., Романов А. М.* Современное состояние пересадок желез внутренней секреции. — Вестн. хирургии им. Грекова, 1962, № 12, с. 71—79.
9. *Гулевский А. К., Чуйко В. А., Калько А. И.* Биосинтез суммарных белков в срезах щитовидной железы при замораживании (—196°С) и оттаивании (+37°С). — В кн.: Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины. Киев : Наук. думка, 1974, с. 45—47.
10. *Гулевский А. К., Переверзев Н. П., Белоус А. М.* Влияние ультранизких температур (—196°С) на биосинтез суммарных белков в срезах внутренних органов в эксперименте. — В кн.: Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины. Киев : Наук. думка, 1974, с. 47—49.
11. *Даценко Б. М., Алюшина А. А., Брук Г. З., Пышкина Т. А.* Низкотемпературное консервирование щитовидной железы в эксперименте. I: Выбор оптимальной концентрации криопротектора. — Криобиология и криомедицина, 1975, вып. 1, с. 98—103.
12. *Даценко Б. М., Чуйко В. А., Алюшина А. А.* Функция щитовидной железы, подвергнутой глубокому охлаждению (—196°С). — Пробл. эндокринологии, 1975, **21**, № 2, с. 86—90.
13. *Даценко Б. М., Чуйко В. А., Пышкина Т. А., Алюшина А. А.* Трансплантация щитовидной железы, консервированной замораживанием (—196°С). — В кн.: Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины. Киев : Наук. думка, 1974, с. 49—52.
14. *Лабори А.* Регуляция обменных процессов. — М.: Медицина, 1970. — 384 с.
15. *Лисовская С. Н.* К учению о пересадке щитовидной железы. — СПб., 1911. — 120 с.
16. *Мицкевич М. С.* Восстановление функциональной активности щитовидной железы после глубокого охлаждения (—196°С). — Изв. АН СССР. Сер. биол., 1958, № 2, с. 149—160.
17. *Немилов А. А.* Свободная пересадка органов и тканей. — Л.: Гос. ин-т усовершенствования врачей. — М., 1927. — 83 с.
18. *Ошерова О. А., Панков Е. Я., Дедух Н. В.* Изучение морфологической сохранности овариальной ткани на этапах низкотемпературного консервирования. — Криобиология и криомедицина, 1975, вып. 1, с. 107—110.
19. *Пушкарь Н. С., Утевский А. М., Чуйко В. А., Цариковская Н. Г., Петренко А. Ю.* А. с. (СССР). Способ низкотемпературного консервирования щитовидной железы человека. — Опубл. в Б. И., 1980, № 5.
20. *Пушкарь Н. С., Цариковская Н. Г., Чуйко В. А.* Аутотрансплантация криоконсервированной щитовидной железы с целью профилактики и лечения послеоперационного гипотиреоза у больных тиреотоксикозом. — В кн.: Трансплантация органов и тканей. Баку, 1970, с. 26—27.
21. *Пушкарь Н. С., Чуйко В. А., Цариковская Н. Г.* Низкотемпературное консервирование и аутотрансплантация щитовидной железы человека. — В кн.: Актуальные вопросы криобиологии, Киев ; Наук. думка, 1981, с. 390—415.
22. *Сенников В. А.* Консервирование и трансплантация щитовидной и паращитовидной желез в эксперименте. — В кн.: XXII науч. сессия, посвящ. 50-летию Великой Окт. соц. революции. Оренбург: Мед. ин-т, 1967, с. 203—204.
23. *Смит О.* Биологическое действие замораживания и переохлаждения. — М.: Изд-во иностр. лит., 1963. — 343 с.
24. *Сяпич П. И.* Пересадка щитовидной железы с околощитовидными железами при гипопаратиреозе: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Витебск, 1968. — 21 с.
25. *Точилин В. И., Чебанюк Г. М.* К проблеме консервирования и гомотрансплантации щитовидной и паращитовидных желез. — В кн.: Трансплантация органов и тканей. М. : Медицина, 1966, с. 536—537.
26. *Точилин В. И.* Гомотрансплантация щитовидно-околощитовидного комплекса в эксперименте на собаках и щенках. — Пробл. эндокринологии, 1973, **19**, № 3, с. 100—104.
27. *Утевский А. М., Чуйко В. А., Губина Н. Ф.* Влияние охлаждения на способность тканей к захвату катехоламинов. — Укр. биохим. журн., 1980, № 1, с. 16—19.
28. *Филатов А. Н., Депп М. Е., Романова А. М.* Гомопересадка околощитовидных желез при лечении больных гипопаратиреозом. — В кн.: Актуальные вопросы пересадки органов и тканей. / Под ред. Ю. М. Лопухина. М., 1978, с. 26—30. (Тр. II МОЛГМИ; Т. 113. Вып. 23).
29. *Хашиев М. Л.* К вопросу о консервировании и аллотрансплантации щитовидных желез: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Ростов н/Д, 1977. — 23 с.
30. *Цариковская Н. Г., Чуйко В. А.* Низкотемпературное консервирование щитовидной железы человека: Пути сохранения функции. — В кн.: Механизм действия гормонов. Ташкент, 1966, с. 7—9.
31. *Чуйко В. А., Онуфриева Г. А., Митасов В. И.* Реакция коры надпочечников на гомотрансплантацию щитовидной железы — свежей и криоконсервированной (—196°С). — Криобиология и криомедицина, 1976, вып. 2, с. 77—79.
32. *Чуйко В. А., Утевский А. М., Губина Н. Ф.* Захват L-норадреналина [H^3] щитовидной железой человека. — В кн.: II Всесоюз. съезд эндокринологов. Л., 1981.

Матеріал, захищений авторським правом

33. *Шевердин Ю. П., Цариковская Н. Г., Ткач Ф. С. и др.* Аутотрансплантация ткани щитовидной железы с целью профилактики послеоперационного гипотиреоза. — Вест. хирургии им. Грекова, 1977, № 5, с. 8—12.
34. *Шенберг М. Г.* Морфологические исследования криоконсервированных трансплантатов щитовидной железы. — Криобиология и криомедицина, 1976, вып. 2, с. 75—77.
35. *Шумкова-Трубина К. В.* К вопросу о пересадке щитовидной и паращитовидной желез в различные органы и ткани. — Казань, 1913.
36. *Blumenthal H. T., Walsh L. S.* Survival of guinea-pig thyroid and parathyroid transplantants previously subjected to extremely low temperatures. — Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1952, 73, p. 62—67.
37. *Brooks S. R.* Endocrine tissue transplantation. — Springfield, 1962, 3. — 165 p.
38. *Ferguson J., Allsopp B. H., Taylor R.* Isolation and long term preservation of pancreatic islets from mouse, rat and guinea pig. — Diabetologia, 1976, N 12, p. 115—121.
39. *Knox A. S. S., Von Westapp C., Row A. W., Volpe R.* The use of cryopreserved human thyroid tissue of the in vitro assay of thyroid stimulators. — Cryobiology, 1977, 14, N 5, p. 543—548.
40. *Melander A., Westgren U., Ericson L. E., Sundler F.* Influence of the sympathetic nervous system on the secretion and metabolism of thyroid hormone. — Endocrinology, 1977, 101, p. 1228—1237.
41. *Schiff M.* — Med. Suisse Rom., 1884, 4, p. 425—432. Приводится по: Точилин В. И. Гомотрансплантация щитовидно-околощитовидного комплекса в эксперименте на собаках и щенках. — Пробл. эндокринологии, 1973, 19, № 3, с. 100—104.
42. *Stewart J. H., Stewart R. D. H., Woodruff M. L. A.* The storage of rat thyroid tissue at subzero temperature. — Proc. Soc. Univ. Utago Med. School., 1955, 33, p. 26—27.
43. *Wells S. A., Gunnells J., Gutman R. A. et al.* The successful transplantation of frozen parathyroid tissue in man. — Surgery, 1977, 81, p. 86—90.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
24.12.80

УДК 57.043.616.127—005.8+616—089.583.29

Л. Т. Малая, Н. С. Пушкарь, А. Ф. Яковцова,
И. Ф. Паскевич, В. И. Пахомов, Е. В. Адольф,
Г. А. Бабийчук, В. Г. Калиманов, В. Н. Офицеров,
Н. Н. Питенько, В. С. Журавлев

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МИОКАРДА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИНФАРКТЕ И КРАНИОЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ГИПОТЕРМИИ

Все более широкое распространение ишемической болезни и инфаркта миокарда, тяжесть течения процесса и высокая летальность делают актуальными попытки изыскания новых направлений патогенеза данного заболевания, путей его профилактики и терапии [3, 4, 7, 13, 15].

Патогенез инфаркта миокарда и его последствий является сложным. Для целостного его понимания необходим многоуровневый подход. Только интегральный подход к разработке патогенеза инфаркта миокарда может принести существенные результаты и открыть новые горизонты познания для его профилактики и лечения.

В последние годы для защиты ишемического миокарда используется краниоцеребральная гипотермия [2, 5], но еще недостаточно изучено ее действие на метаболизм и структуру миокарда.

Для решения этих задач целесообразно сопоставить в динамике результаты научных исследований на модели экспериментального инфаркта миокарда у собак с применением кранио-церебральной гипотермии, проведенных на органном, тканевом, клеточном и субклеточном уровнях.

Материал и методы исследования. Изучено 20 сердец собак с экспериментальным инфарктом миокарда и четыре контрольных. В 19 наблюдениях была первая стадия инфаркта (донекротическая), в од-

Матеріал, захищений авторським правом

ном — третья (организации). В последнем случае у собаки была успешно проведена краниоцеребральная гипотермия (животное забито под наркозом уколом иглы в дно IV желудочка мозга через два месяца после операции). Острую коронарную недостаточность вызывали перевязкой передней межжелудочковой ветви левой венечной артерии. Через 10—15 мин после операции проводилась кранио-церебральная гипотермия с помощью аппарата «Флюидокраниотерм» и установки для программированного охлаждения, разработанной в конструкторском бюро Института проблем криобиологии и криомедицины АН УССР. Температуру тела животных понижали в течение 40—60 мин до 30—28°С. Краниоцеребральная гипотермия проводилась в среднем режиме (температура 30—28°С) в течение 3—5 ч. Собаки забивались под наркозом уколом иглы в дно IV желудочка мозга. Сразу же после констатации смерти (по ЭКГ-данным) производился забор материала не только из предполагаемой зоны инфаркта, но и всех отделов сердца для гистологического, авторадиографического и электронно-микроскопического исследований.

Из кусочков, взятых для гистологического исследования, получали срезы толщиной 5 мк, которые окрашивали гематоксилином-эозином, по методу ван Гизона и Ли с соавторами [16].

Для авторадиографического исследования кусочки миокарда немедленно погружали в физиологический раствор, охлажденный до 0°С. Затем каждый образец помещали в колбу со средой Хенкса и соответствующим меченым предшественником в концентрации 20—25 мкК/мл. В качестве специфического предшественника синтеза ДНК использовался тимидин-5 (метил —$^3H_1$), РНК — оротовая кислота-5—^3H. Для изучения синтеза белка применялись следующие аминокислоты: *D, L*-метионин—2^3H, *D, L*-лейцин—2^3H, глицин—2—$^3H_2$. Колбы с образцами помещали в аппарат Варбурга на 2,5—3 ч, после чего кусочки переносили в формалин и заливали парафином. Серийные гистологические срезы толщиной 5 мк покрывали фотоэмульсией типа М (ГосНИИХимфотопроект) с экспозицией три недели. Препараты проявляли обычным способом, окрашивали метиленовым синим Лефлера и гематоксилином-эозином. Изучение авторадиограмм проводилось под микроскопом путем визуального наблюдения и анализа микрофотографий.

Показателем синтеза белка и РНК было количество зерен серебра в клетке, показателем синтеза ДНК — индекс меченых ядер. Расчеты производились по 2000 клеток в каждой зоне. Статистическую обработку материала проводили по методу Фишера—Стьюдента. Материал для электронной микроскопии приготавливали по стандартным методикам. Применялся микроскоп — УМВ 100 К, ультратом — УМТП-2.

Результаты исследования и их обсуждение. Так как большинство собак (19) погибли или были забиты в течение первых часов после операции, то макроскопических изменений в миокарде у них не выявлено, не отмечено у этих животных и микроскопических изменений в миокарде при обычных гистологических методах окраски. В наблюдении с успешной краниоцеребральной гипотермией макроскопически обнаружен в толще передней стенки левого желудочка сердца с переходом на межжелудочковую перегородку сероватый неправильной формы участок размерами 0,9×0,8×0,15 см.

Для диагностики ишемической стадии инфаркта миокарда в световом микроскопе мы использовали и фуксинорragический метод Ли с соавторами [16]. При этой окраске ишемизированный миокард терял структуру и окрашивался основным фуксином в темно-красный цвет в отличие от нормальной мышцы желто-коричневого цвета (рис. 1). Саркоплазма пораженных миоцитов была гомогенной и окрашивалась фуксином в разные оттенки красного цвета. Такие же результаты по-

Матеріал, захищений авторським правом

лучили и другие авторы, применявшие этот метод для выявления ранних ишемических повреждений миокарда [10, 11]. Мелкие участки фуксинофилии выявлены и в периинфарктной зоне, так как при ишемическом повреждении миокарда структурным изменениям подвергаются не только прилежащие, но и отдаленные зоны сердечной мышцы, функциональная нагрузка которых значительно возрастает. Описанные изменения мы выявляли в миокарде спустя 30 мин после перевязки

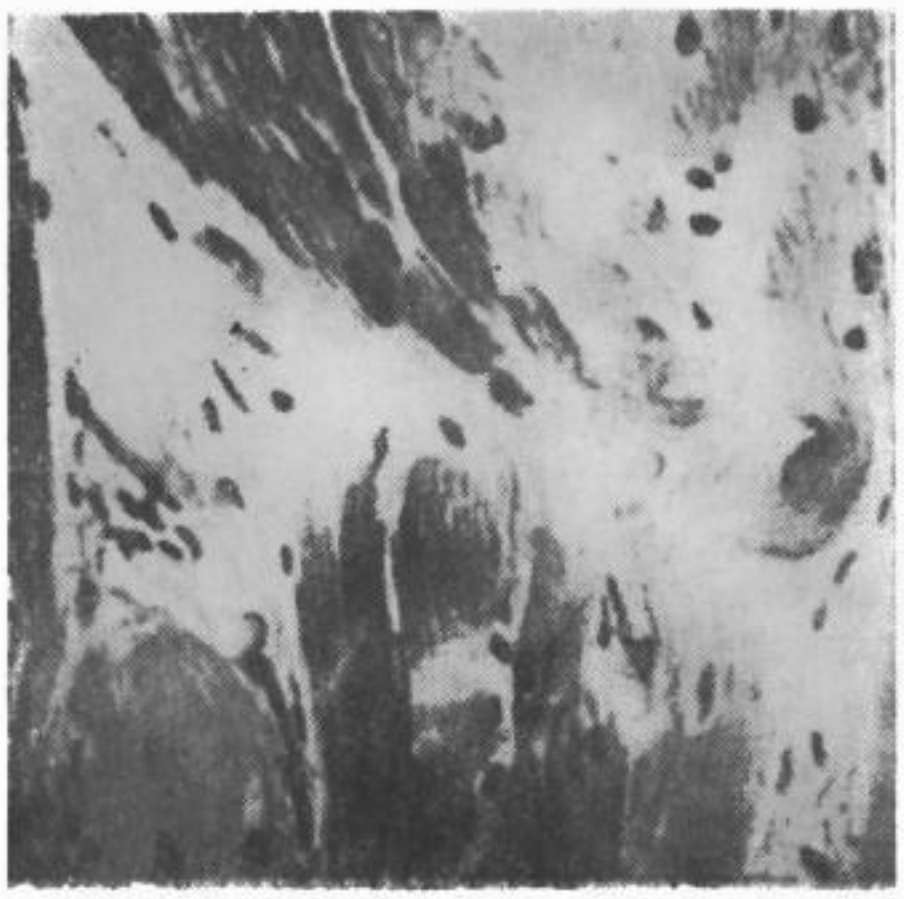


Рис. 1. Ишемия миокарда в течение 30 мин. Очаги фуксинофилин миокарда (черного цвета). Окраска по Ли. ×120.

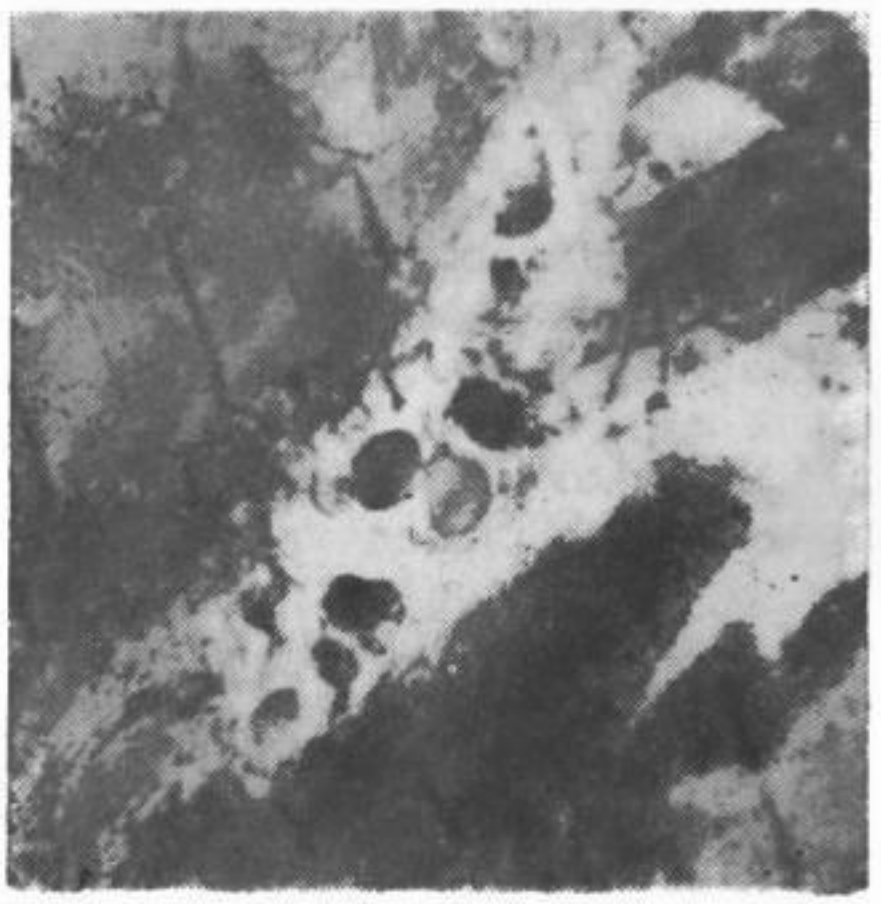


Рис. 2. Очаговый миоцитолиз с наличием фрагментов миофилламентов и измененных митохондрий. В сохранившихся отделах кардиомиоцита — гетерогенность митохондрий и большое количество гликогена. ×12 000.

передней межжелудочковой ветви левой венечной артерии. Они нарастали к концу первых суток и уже через 8 ч после операции обнаруживались в препаратах, окрашенных гематоксилин-эозином, а еще отчетливей — при окраске по методу ван Гизона.

Электронно-микроскопически в зоне ишемии уже через 5—30 мин после перевязки коронарной артерии определялся отек перикапиллярных пространств и умеренная гидратация мышечной ткани. Отмечалась выраженная гетерогенность митохондрий. Так, в подсарколемной и околоядерной зонах они были набухшие, с нечетко контурированными и частично разрушенными кристами. Эти изменения обнаруживались спустя 15 мин после перевязки венечной артерии и были обратимы, что совпадает с некоторыми данными [8]. В дальнейшем степень повреждений миокарда нарастала с увеличением срока ишемии. Но если она длилась более часа, то эти изменения прогрессировали и приобретали необратимый характер: исчезали кристы, просветлялся матрикс, отмечалась потеря наружной оболочки митохондрий; наблюдалось просветление нуклеоплазмы с изменением формы ядра, выявлялась релаксация миофибрилл, очаговый миоцитолиз и выраженный отек вокруг спавшихся кровеносных сосудов (рис. 2).

В периинфарктной зоне через 1,5—2 ч после перевязки венечной артерии обнаружено расширение капилляров, умеренный периваскулярный и внутриклеточный отек, гетерогенность митохондрий с разрушением крист и очаговым просветлением матрикса, расширение цистерн эргастоплазматической сети, изменение формы ядра с просветлением кариоплазмы, очаговый лизис миофилламентов.

В этот период в интактной зоне миокарда отмечалось следующее: расширение кровеносных сосудов с отеком периваскулярных пространств, гетерогенность митохондрий, изменение формы ядра, пересокращение миофибрилл, очаговый лизис миофилламентов и скопление

Матеріал, захищений авторським правом

аутофагосом. Выявленные гистологические и электронно-микроскопические изменения в сердечной мышце при экспериментальном инфаркте мы подтвердили авторадиографическим исследованием.

Авторадиографически общее количество меченых клеток в мышце сердца контрольной группы животных было сравнительно небольшим, что в известной мере отражало крайне незначительно выраженную пролиферативную его способность [9].

Приводим результаты авторадиографического изучения синтеза ДНК в миокарде контрольных животных (зоны названы в топографическом соответствии с зонами подопытных животных, количество животных во всех случаях — 4). Индекс меченых ядер в инфарктной зоне составлял 1,7±0,2%; в периинфарктной зоне — 1,7±0,2; в заинфарктной зоне — 1,6±0,2%.

В зоне инфаркта отмечалось увеличение синтеза РНК (табл. 1) и белка (табл. 2) (эти процессы непосредственно связаны между собой). В пери- и заинфарктной зонах синтез РНК и белков увеличен незначительно по сравнению с контролем, что свидетельствует о неодинаковых компенсаторно-восстановительных реакциях миокарда в зависимости от его функционального состояния.

Уже через 1 ч после перевязки венечной артерии в инфарктной зоне миокарда опытных животных наблюдалось существенное снижение индекса меченых ядер, которое прогрессировало во времени и через 2—72 ч уменьшалось в четыре раза по сравнению с нормой (табл. 3). Полученные данные свидетельствуют о том, что синтез ДНК в зоне инфаркта миокарда резко нарушен. Через 2 мес после успешной кранио-церебральной гипотермии происходила нормализация синтеза ДНК и индекс меченых ядер был на 50% больше по сравнению с контролем. Увеличение синтеза ДНК может быть связано с общим усилением метаболических процессов, как это имеет место при гипертрофии миокарда [6].

При анализе полученных авторадиографических данных видно существенное нарушение синтеза ДНК, РНК и белков в инфракрасной, пери- и заинфарктной зонах миокарда при экспериментальном его некрозе.

Однако, если синтез ДНК резко угнетался во всех исследованных зонах, то синтез РНК и белков увеличивался. Подобное увеличение, очевидно, связано с усилением компенсаторно-восстановительных процессов в участках повреждения миокарда, направленных на их репарацию.

Следовательно, при остром инфаркте миокарда изменения происходят не только в очаге ишемии, а и далеко за ее пределами, что необходимо учитывать в клинике, так как они понижают сократительную способность миокарда и могут привести к остановке сердечной деятельности.

Выявленные нами изменения в зоне ишемии миокарда, в прилежащих отделах ее и на значительном расстоянии от нее, на органном, клеточном и субклеточном уровнях не противоречат данным, полученным в работах [1, 8, 10, 12, 14].

В сердце собаки спустя 2 мес после успешного лечения острого инфаркта миокарда кранио-церебральной гипотермией на месте бывшего инфаркта в световом микроскопе обнаружен склероз, а вокруг него — гипертрофия мышечных волокон.

Электронно-микроскопически в зоне бывшего инфаркта кроме склероза выявлены следующие изменения: периваскулярный отек, пальцевидные выросты эндотелия, четкое строение саркомеров, гипертрофия ядер с изменением их формы (рис. 3).

В периинфарктной зоне обнаружены периваскулярный и внутриклеточный отеки, нормализация мышечных клеток, нарушение строения

Матеріал, захищений авторським правом

Таблица 1. **Интенсивность синтеза РНК в миокарде**

Группа животных	Номер собаки	Время после инфаркта, ч	Количество зерен серебра в клетке					
			Инфарктная зона		Перинфарктная зона		Заинфарктная зона	
			Ядро	Протоплазма	Ядро	Протоплазма	Ядро	Протоплазма
I Интактные животные	15		0,86±0,08	322±27,1	0,46±0,09	315±19,8	0,39±0,04	910±18,9
	16		0,84±0,06	106±13,4	1,6 ±0,10	594±31,1	0,45±0,06	480±23,9
	20		0,39±0,04	370±19,3	1,2 ±0,08	610±27,1	0,8 ±0,03	520±19,4
II Экспериментальный инфаркт	2	2	2,50±0,12	930±41,1	2,00±0,14	155±16,3	0,8 ±0,10	450±21,2
	7	72	2,5 ±0,17	910±31,3	3 ±0,15	800±24,1	1,06±0,11	128±11,9
	8	1	1 ±0,10	460±21,3	0,76±0,03	161±11,9	1 ±0,10	320±18,7
	9	3	3 ±0,16	912±31,9	0,2 ±0,04	620±21,9	1 ±0,13	1000±51,4
	10	0,5	2,5 ±0,12	1136±29,4	0,93±0,08	423±13,4	0,9 ±0,11	666±31,1
	12	4	1,73±0,12	810±19,9	1,26±0,16	743±41,2	0,8 ±0,15	850±29,4
	13	1	3,5 ±0,18	512±27,5	1,4 ±0,19	287±21,9	3,5 ±0,18	704±21,9

Примечание. Здесь и в табл. 3, 4 величина абсолютной погрешности вычислена для $p \geqslant 0{,}90$.

Таблица 2. **Интенсивность синтеза белка в миокарде**

Группа животных	Номер собаки	H^3-аминокислоты	Время после инфаркта, ч	Количество зерен серебра в клетке					
				Инфарктная зона		Перинфарктная зона		Заинфарктная зона	
				Ядро	Цитоплазма	Ядро	Цитоплазма	Ядро	Цитоплазма
I Интактные животные	1	Лейцин		3,5 ±0,21	380±17,5	2,5±0,11	540±10,9	1,6 ±0,17	430±21,0
	15	Глицин		1,8 ±0,13	436±19,1	6,5±0,14	670±19,1	1 ±0,15	627±23,1
	16	Лейцин	—	1 ±0,19	960±31,3	2 ±0,16	660±20,27	3 ±0,18	740±30,3
	20	Лейцин		1,72±0,10	317±17,4	1,5±0,13	92,85±10,8	2,6 ±0,13	611±21,4
II Экспериментальный инфаркт	3	Лейцин	1,5	2,5 ±0,14	540±23,3	5,5±0,19	900±41,1	2 ±0,11	170±14,8
	6	Лейцин	24	0,5 ±0,13	160±11,8	1 ±0,14	210±19,1	3 ±0,08	575±27,3
	9	Лейцин	3	2,75±0,18	150±17,4	8,6±0,21	373±24,7	0,26±0,1	165±10,9
	10	Глицин	0,5			4,85±0,19	1211±29,3	4 ±0,18	480±17,5
	11	Глицин	1,5			2 ±0,31	320±10,14	5 ±0,21	1760±29,8
	12	Глицин	4	2,5 ±0,15	640±17,3	2 ±0,29	290±13,7	2,5 ±0,19	800±31,2
	13	Глицин	1	1 ±0,17	720±19,1	3,5±0,19	720±19,1	1,5 ±0,21	320±19,4
III Гипотермия	4	Метионин		1 ±0,14	350±11,7	1,5±0,17	610±13,9	3,5 ±0,31	460±14,5

Матеріал, захищений авторським правом

Таблица 3. **Интенсивность синтеза ДНК в миокарде в норме и при экспериментальном инфаркте**

Группа животных	Номер собаки	Время после инфаркта, ч	Индекс меченных ядер, %		
			Инфарктная зона	Периинфарктная зона	Заинфарктная зона
I Интактные	15	—	2 ±0,10	2±0,09	1,5±0,08
II Экспериментальный инфаркт	7	72	0,6±0,07	3±0,11	1,5±0,09
	12	4	0,5±0,09	2±0,10	1,5±0,07
	13	1	1,0±0,06	1±0,06	1,0±0,10
	18	2	0,5±0,07		0,8±0,09

Z-линии, расширение каналов саркоплазматического ретикулума и десмосом, наличие крупных аутофагосом.

В миокарде правого желудочка наряду с обычными мышечными клетками (рис. 4) обнаруживались гипертрофированные (рис. 5). В ле-

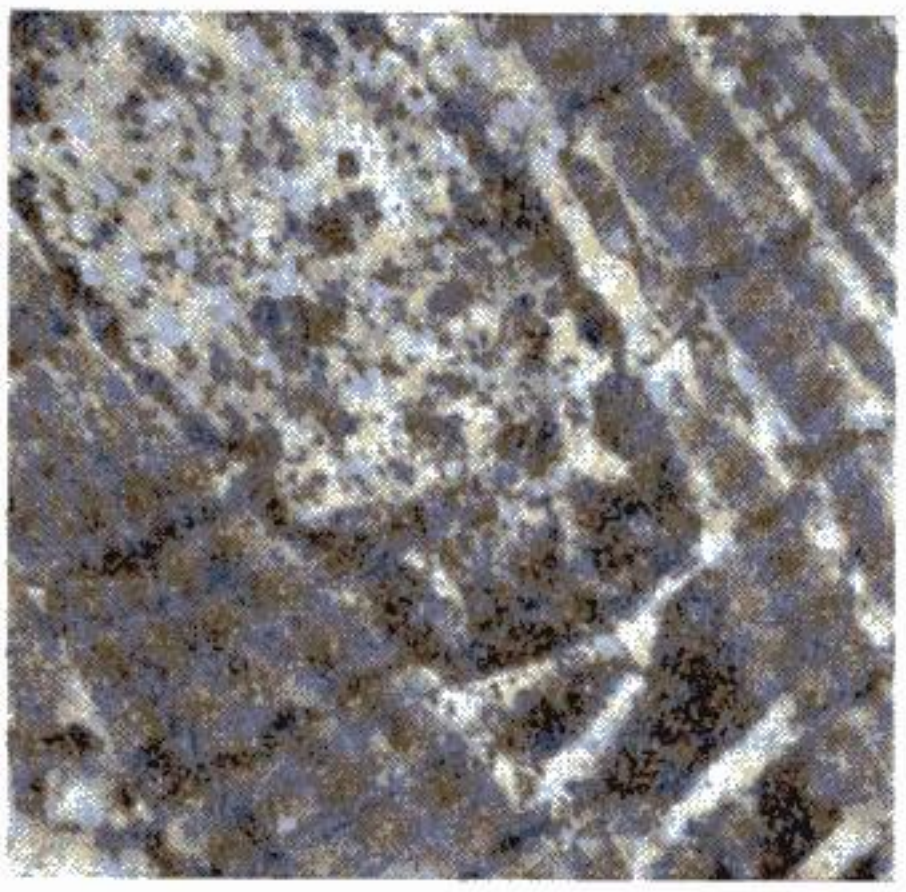


Рис. 3. Фрагмент мышечной клетки. Четкое строение саркомеров. Причудливая форма гипертрофированного ядра. ×10 000.

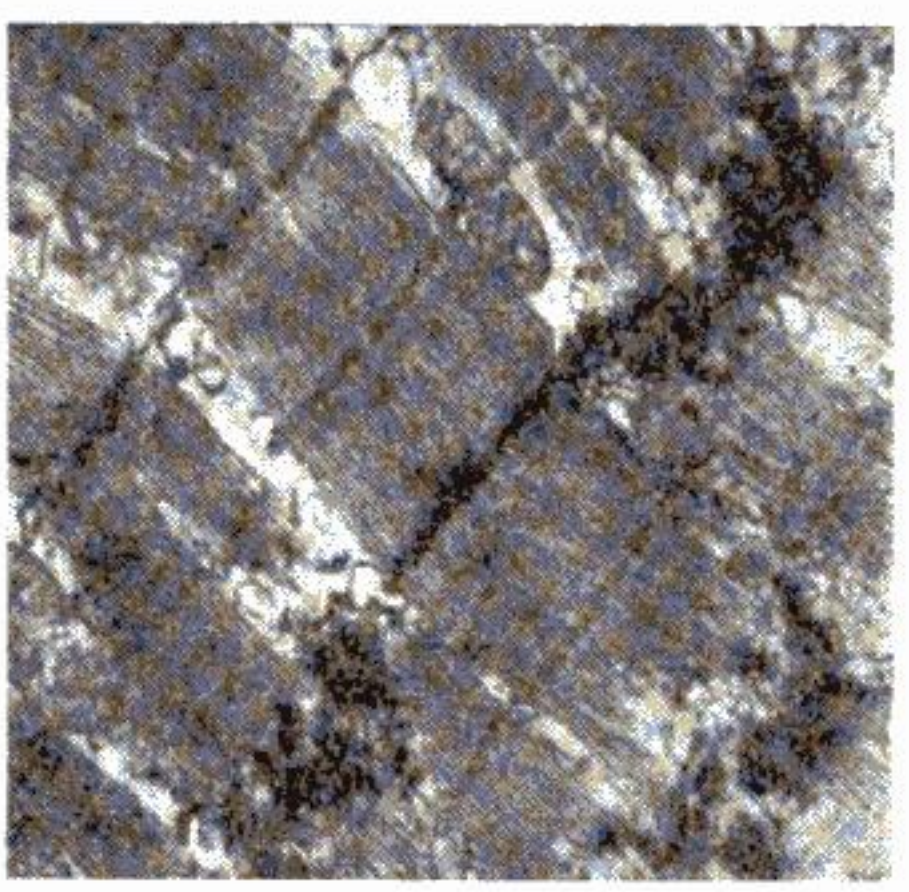


Рис. 4. Фрагмент кардиомиоцита правого желудочка. Четкое строение миофибрилл и митохондрий. ×12 000.

вом предсердии отмечалась полная сохранность ультраструктурной организации.

В правом предсердии наряду с нормализацией ультраструктур кардиомиоцитов встречались аутофагосомы и отек межклеточных пространств.

Таким образом, в миокарде после перевязки передней межжелудочковой ветви левой коронарной артерии с успешной кранио-церебральной гипотермией наряду с нормализацией ультраструктур кардиомиоцитов обнаружен очаг постинфарктного кардиосклероза, гипертрофия мышечных клеток, очаговое разрушение митохондрий и миолизис отдельных из них, скопления аутофагосом, внутри- и межклеточный, а также периваскулярный отек.

Механизм развития этих повреждений можно объяснить как дистрофию от перегрузки в связи с тем, что сохранившиеся мышечные клетки в условиях постинфарктного кардиосклероза выполняют большую нагрузку. Чтобы морфологически подтвердить клинические данные, свидетельствующие об ограничении зоны инфаркта под влиянием краниоцеребральной гипотермии, необходимо дальнейшее экспериментальное исследование.

Матеріал, захищений авторським правом

В заключение сделаем некоторые выводы.

1. Окраска основным фуксином, по мнению Ли, является общедоступным методом в повседневной прозекторской практике для выявления инфаркта миокарда в донекротической стадии.

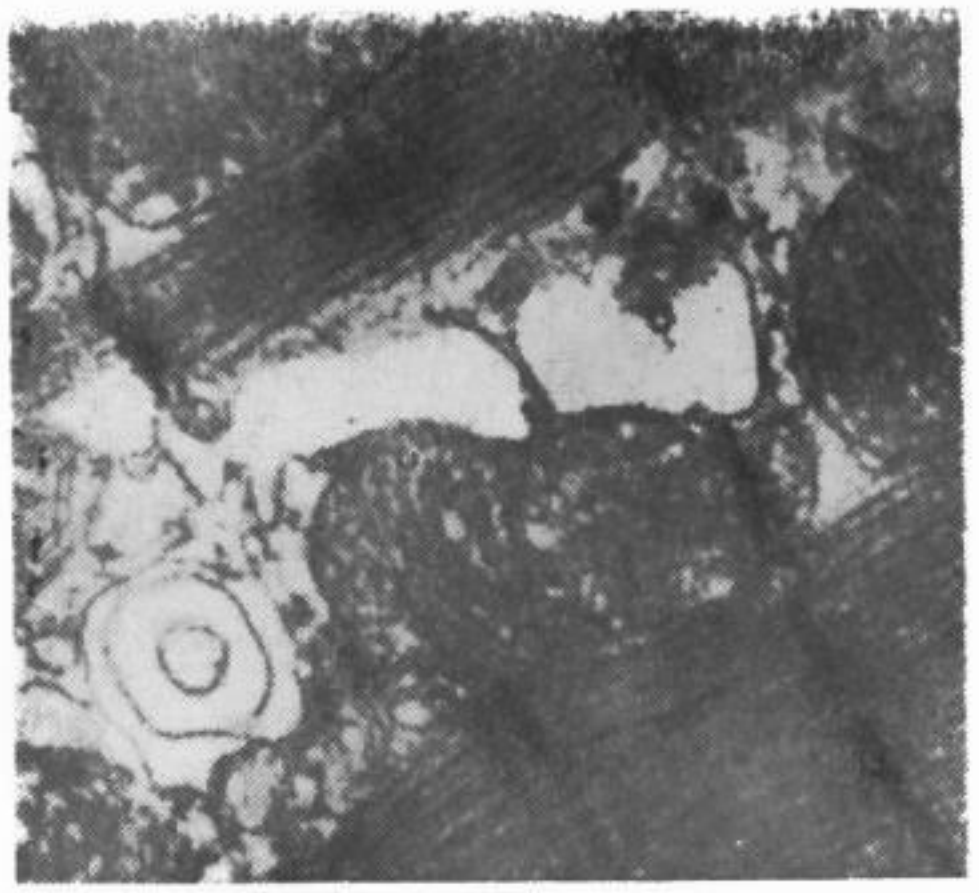


Рис. 5. Фрагмент кардиомиоцита: гипертрофированные митохондрии с четко выраженной ультраструктурой. ×18 000.

2. Электронно-микроскопически можно обнаружить первую (обратимую) фазу раннего периода ишемической стадии инфаркта миокарда.

3. При инфаркте миокарда происходят изменения не только в зоне некроза, но в периинфарктной и более отдаленных от некроза зонах, что необходимо учитывать в клинике.

4. Краниоцеребральная гипотермия при экспериментальном инфаркте миокарда, по-видимому, замедляет процессы гибели и дистрофии, чем, очевидно, создает лучшие условия для внутриклеточной компенсации и регенерации кардиомиоцитов.

1. *Галанкина И. Е., Ершова Н. В.* Патоморфологические изменения миокарда вне зоны инфаркта в постреанимационном периоде. — Арх. патологии, 1980, **42**, № 8, с. 23—29.
2. *Гватуа Н. А., Кондратович М. А., Кравцов В. Л. и др.* Применение гипотермии в лечении осложненного инфаркта миокарда. — В кн.: Материалы конф. о-ва кардиологов ЛитССР. Каунас, 1972, с. 108—109.
3. *Ильинский Б. В.* Профилактика, ранняя диагностика и лечение атеросклероза. — М. : Медицина, 1977. — 167 с.
4. *Лукомский П. Е.* Патогенез инфаркта миокарда. — Кардиология, 1974, **14**, № 1, с. 5—13.
5. *Малая Л. Т., Пушкарь Н. С., Яковцева А. Ф. и др.* Роль некоторых факторов нейрогуморальной регуляции в развитии морфологических изменений при инфаркте миокарда и кранио-церебральной гипотермии. — В кн.: Актуальные вопросы клинической морфологии. Харьков, 1979, с. 51—53.
6. *Метаболизм* миокарда / Под ред. Е. Чазова, Ю. Браунвальда. — М. : Медицина, 1975. — 432 с.
7. Метаболизм миокарда / Под ред. Е. Чазова, Ю. Браунвальда. — М. : Медицина, 1979. — 407 с.
8. *Митин К. С.* Электронно-микроскопический анализ изменений сердца при инфаркте. — М. : Медицина, 1974. — 202 с.
9. *Мэзия Ф.* Физиология клеточного деления. — М. : Мир, 1966. — 863 с.
10. *Семенова Л. А., Целлариус Ю. Г.* Ультраструктура мышечных клеток сердца при очаговых метаболических повреждениях. — Новосибирск : Наука, 1978. — 142 с.
11. *Серов Р. А., Чекарева Г. А., Рагузин К. К., Шмырева Т. А.* Применение окраски гематоксилином — основным фуксином—пикриновой кислотой (ГОФП) для выявления повреждений миокарда различного генезиса. — Арх. патологии, 1977, **39**, № 5. с. 70—72.
12. *Струков А. И., Лушников Е. Ф., Горнак К. А.* Гистохимия инфаркта миокарда. — М. : Медицина, 1967. — 301 с.
13. *Чазов Е. И.* Спорные вопросы патогенеза и классификации ишемической болезни сердца. — Арх. патологии, 1978, **40**, № 6, с. 3—11.
14. *Черпаченко Н. М., Жданов В. С., Шаров В. Г.* Морфологические изменения миокарда вне зоны экспериментального инфаркта. — Арх. патологии, 1977, **39**, № 2, с. 45—51.
15. *Шхвацабая И. К.* Ишемическая болезнь сердца. — М. : Медицина, 1975. — 400 с.
16. *Lie I. T., Holley R. E., Kamps W. R., Fitus I. L.* New histochemical method for morphologie diagnosis of early stage of myocardial ischemia. — Mayo Chin. Proc., 1971, **46**, N 5, p. 319—327.

Харьковский медицинский институт,
Институт проблем криологии и
криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
20.11.80

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043.616.127—005.8:616.8329

И. И. Соснова, В. В. Королев, А. И. Скребцов

СОСТОЯНИЕ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ ПО ДАННЫМ ЭЛЕКТРОКАРДИОГРАФИИ У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ В УСЛОВИЯХ ГИПОТЕРМИИ И ИНФАРКТА МИОКАРДА

Многочисленные литературные данные свидетельствуют о том, что при умеренном снижении температуры тела животных происходит ослабление окислительных процессов, угнетение обмена веществ, замедление кровообращения [1, 3, 4], в результате чего создаются условия для большей устойчивости к кислородному голоданию и различным неблагоприятным раздражителям [2, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14].

Эти обстоятельства послужили основанием для экспериментального обоснования использования гипотермии как лечебного фактора. Так, щадящие условия, создаваемые кранио-церебральной гипотермией при экспериментальном инфаркте миокарда, способствуют угнетанию метаболических процессов в ишемизированных и интактных областях миокарда, погружению клеток в состояние парабиоза, повышению порога переносимости гипоксии [6, 9, 12, 15], что в свою очередь может ограничить распространение некроза миокарда.

В Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР в течение ряда лет проводится работа по изучению влияния гипотермии на организм животных в норме и при экспериментальном инфаркте миокарда.

В настоящей статье приведены данные по изучению особенностей состояния сердечно-сосудистой системы у кроликов в условиях воздействия кранио-церебральной гипотермии и при инфаркте миокарда без гипотермии.

Методика исследования. Эксперименты проведены на 28 кроликах породы шиншилла массой 1,5—2,5 кг, из них гипотермия проведена у 16 животных и инфаркт миокарда вызван у 12 кроликов.

Кранио-церебральная гипотермия проводилась с помощью аппарата для программного охлаждения (отогрева) головного мозга и других участков тела животного и человека. Охлаждение производилось со скоростью 1—2°С/мин, которая обеспечивала умеренную гипотермию (31—30°С) в течение 2—3 часов.

Перед проведением кранио-церебральной гипотермии кролику внутривенно вводили тиопентал натрия в дозе 50 мг/кг массы и оксибутират натрия из расчета 300 мг/кг массы. Ректальная температура контролировалась электротермометром.

Электрокардиограмма регистрировалась на аппаратах кардиополиграф НФ-925 и «Биос» до проведения кранио-церебральной гипотермии, в период охлаждения, при понижении температуры тела на каждый градус и после окончания сеанса гипотермии.

Инфаркт миокарда моделировали с помощью перевязки нисходящей ветви левой коронарной артерии. Перед операцией животным вводили тиопентал натрия (50 мг/кг массы), фентанил (0,5 мл) и дроперидол (0,5 мл). Местно применялась инфильтрационная анестезия мягких тканей и области сердца 0,5%-ным раствором новокаина. В эксперименте с инфарктом миокарда электрокардиограмма снималась до перевязки левой коронарной артерии, после перевязки и в динамике: через 10 мин, 1 ч, 1 день, на 3, 10—14 и 21 сут.

Результаты и их обсуждение. Исходное состояние сердечно-сосудистой системы по данным электрокардиографии у 28 кроликов характеризовалось следующими данными: частота пульса колебалась в преде-

Матеріал, захищений авторським правом

лах 250—350 уд/мин, у одного кролика она составляла 150 уд/мин, интервал *P—Q* длился 0,06—0,08 с, *Q—S* — 0,03—0,05 с, *Q—T* — 0,14—0,16 с. Зубец *P* был лучше выражен в II и III отведениях, в I отведении он часто был низким и даже сглаженным. Зубец *Q* был выражен в трех стандартных отведениях, лучше в II и III. Интервал *S—T* обычно располагался на изолинии в виде прямой или слегка наклонной линии, иногда он был слегка выпуклым кверху в I отведении. В грудных отведениях часто отмечался косо опущенный интервал *S—T*, переходивший в положительный зубец *T*. В I грудном отведении часто встречался выпуклый кверху интервал *S—T*.

Под влиянием сеанса умеренной гипотермии на ЭКГ определялось снижение частоты сердечных сокращений на 100—200 уд/мин, постепенное увеличение времени проведения возбуждения по предсердиям и желудочкам, проявляемое в изменении интервалов *PQ, QS, QT*. Амплитуда ЭКГ снижалась во всех отведениях.

У кроликов с инфарктом миокарда наличие ишемии подтверждено динамическим электрокардиографическим исследованием в указанные выше сроки. Установлено, что основное изменение у всех кроликов заключалось в подъеме сегмента *S—T* уже в первые минуты после перевязки, в 20% случаев произошло его слияние с зубцом *T*, образование зубца *Q*. В 10% случаев имело место нарушение ритма сердечной деятельности, выразившееся появлением желудочковых экстрасистол. Экстрасистолы исчезали через 10—24 ч после операции. В динамике на 10—14 сут после перевязки, как правило, все изменения ЭКГ нормализовались.

Таким образом, можно сделать следующие выводы.

Умеренная кранио-церебральная гипотермия приводит к электрокардиографическим изменениям, свидетельствующим о снижении обменных процессов в миокарде, что проявлялось в урежении сердечной деятельности, удлинении времени проведения возбуждения по предсердиям и желудочкам, снижении амплитуды зубцов *P* и *T*.

Перевязка левой коронарной артерии вызывает на электрокардиограмме изменения сегмента *S—T*, свидетельствующие об ишемии миокарда с быстрой нормализацией ЭКГ данных на 10—14 сут без какого-либо лечебного воздействия.

1. *Бобров Н. И., Ломов О. П., Тихомиров В. П.* Физиолого-гигиенические аспекты акклиматизации человека на севере. — М., 1979. — 182 с.
2. *Богданова В. А.* Изменение концентрации калия и натрия в крови при экспериментальном инфаркте миокарда в условиях кранио-церебральной гипотермии. — В кн.: Материалы межвуз. науч. конф. физиологов и морфологов пед. ин-тов. Ярославль, 1970, с. 23—24.
3. *Верболович В. П.* Особенности энергетического метаболизма миокарда в условиях искусственной гипотермии. — Кардиология, 1976, **16**, № 6, с. 84—88.
4. *Гаевская М. С., Молдаванова Л. Л., Белицкая Р. А. и др.* К вопросу о причинах гибели кроликов в состоянии искусственного гипобиоза. — Патол. физиология и эксперим. терапия, 1976, № 6, с. 43—48.
5. *Глубокая* кранио-церебральная гипотермия. — Владимир, 1978. — 111 с. — (Сб. тр. Владимир. пед. ин-та).
6. *Логинов С. И.* Сокращение и расслабление миокарда левого желудочка анестезированных собак при пролонгированной кранио-церебральной гипотермии. — В кн.: Состояние и регуляция вегетативных функций в здоровом организме человека и животных. Владимир, 1975, ч. 2, с. 108—110.
7. *Майстрах Е. В.* Неспецифические сенсорные и эндокринные механизмы терморегуляции при остром охлаждении организма. — Физиол. журн. СССР им. И. М. Сеченова, 1979, **65**, № 11, с. 1582—1589.
8. *Мурский Л. И., Русских А. П.* Фазовая структура сердечного цикла при ишемии миокарда в условиях кранио-церебральной гипотермии. — Биол. науки, 1973, № 1, с. 29—33.
9. *Осипова Г. В.* Зависимость изменений сердечно-сосудистой системы от степени глубины гипотермии. — В кн.: Экспериментальная и возрастная кардиология. Владимир, 1971, ч. 2, с. 103—105.
10. *Шепелев Л. П.* Зависимость состава и фазовых переходов липидов митохондрий

Матеріал, захищений авторським правом

миокарда белых крыс и собак от глубины острой гипотермии. — Биофизика, 1977, 22, № 3, с. 465—467.
11. *Abelin L., Cherney D. D., Didio L. I.* Miocardium of hypothermic rats with and without administration of dextran: Electrocardiographis and electron microscopic. — Lab. Invest., 1975, 33, N 3, p. 324—329.
12. *Boyer W. H.* Hypothermia in acute myocardial infarction defendent. — Arch. Pathol. Lab. Med., 1976, 100, N 8, p. 450.
13. *Lehr D., Irenc S., Bown A.* A method for the production of infarctioid myocardial injury BY a cryosurgical probe. — New-York: Med. College, Vachalla, 1979, p. 451.
14. *Kobert I., Staab.* Vincent de Paul, LVNCH, Cesak Can-Cam and Michall Barletta. — J. Pharm. Sci., 1977, 66, N 10, p. 1483—1485.
15. *Sands M. P., Sato S. A., Mohry et al.* Electroradiographic changes during surface in dused deep hypothermia. — Amer. Thorac. Surg., 1975, 19, N 4, p. 386—396.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
04.12.80

УДК 57.043

А. И. Гладкова, В. Ф. Криворотько

ОСОБЕННОСТИ КАРДИОВАСКУЛЯРНОЙ РЕАКЦИИ ПРИ ЗАМОРАЖИВАНИИ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

В настоящее время криохирургия находит все более широкое применение. Однако использованию криодеструкции органов и тканей нередко препятствует отсутствие сведений о последствиях указанной операции для других систем организма, в частности сердечно-сосудистой. Согласно единичным наблюдениям [5], криохирургическое вмешательство (на небных миндалинах) не вызывает изменений в артериальном давлении при незначительном урежении пульса. Аналогичные данные в отношении криохирургии простаты отсутствуют, хотя и имеются основания полагать, что оперативное вмешательство на предстательной железе приведет к функциональным расстройствам сердечно-сосудистой системы [4, 7].

Характер гемодинамических сдвигов при полостных криохирургических вмешательствах не изучен. В частности, несмотря на то, что в последние годы криодеструкция простаты получила распространение во многих странах мира, возможные сопутствующие осложнения в функциональном состоянии сердечно-сосудистой системы не изучены. Необходимость проведения подобных исследований возрастает также в связи с тем, что криовоздействие обычно производится при опухолях предстательной железы, поражающих лиц пожилого возраста с выраженной кардиоваскулярной симптоматикой.

В связи с указанным широкому внедрению криодеструкции предстательной железы в практику лечебных учреждений должна предшествовать экспериментальная проверка состояния гемодинамики при различных холодовых режимах. Основываясь на этом, мы поставили перед собой задачу в экспериментальном исследовании выяснить характер изменений в функциональном состоянии сердечно-сосудистой системы при операции криовоздействия и тем самым содействовать решению вопроса о безопасности криохирургического вмешательства.

Методика исследований. Работа выполнена на 25 собаках разного возраста, что отвечало поставленной задаче. У старых собак (12), возраст которых составлял не менее 12 лет, имели место спонтанное повышение артериального давления, признаки коронаросклероза. У части этих животных, подвергнутых кастрации и операции по воспроизведению инфаркта миокарда, отмечались явления сердечной недостаточности, рубцовые изменения миокарда. ЭКГ этих собак характеризовалась снижением вольтажа, смещением электрической оси сердца влево, глубокими зубцами О, отклонением в конечной части желудоч-

Матеріал, захищений авторським правом

кового комплекса. Другая группа животных — 13 молодых половозрелых собак — была здоровой, их ЭКГ соответствовала физиологической норме данного вида.

Таким образом, при подборе экспериментальных животных можно осуществить сравнительный анализ и изучить реакцию скомпрометированного различными патологическими ситуациями сердца на замораживание простаты.

Замораживание предстательной железы у собак (в отличие от человека) является полостной операцией и осуществляется под общим наркозом. Доступ к предстательной железе ретроградный, со стороны мочевого пузыря. В качестве криоагента используется жидкий азот, поступающий в теплообменную камеру криокатетера, установленного в простатическом отделе уретры. Длительность замораживания в различных опытах варьировала от 2 до 30 мин, что давало возможность выяснить характер изучаемых показателей в динамике и разработать оптимальный режим замораживания. В течение всей операции у животных регистрировались ЭКГ (в стандартных и усиленных от конечностей отведениях), а также артериальное давление (на предварительно выведенной в кожный лоскут сонной артерии).

При статистической обработке цифрового материала производилось сравнение данных, полученных в разные сроки замораживания, с исходным состоянием, за которое принимались показатели, непосредственно предшествующие криовоздействию (после введения морфина и тиопентала, вскрытия брюшной полости и мочевого пузыря).

Результаты обсуждений. Как видно из анализа выполненных исследований, у большинства собак (18) в период замораживания предстательной железы артериальное давление понижалось. Гипотензивная реакция отмечалась независимо от возраста животных, однако степень ее определялась исходным уровнем артериального давления и функциональным состоянием миокарда. Старые собаки реагировали большим понижением кровяного давления не только на наркоз, но и на замораживание: средняя величина артериального давления у них за весь период замораживания простаты составила 112,2±4,6 мм рт. ст., тогда как в исходном состоянии она равнялась 140,0±6,2 мм рт. ст. (падение на 20%). У молодых собак эти величины соответствовали 118,5±4,8 мм рт. ст. и 109,9±2,1 мм рт. ст. (падение на 8%).

Тенденция к падению кровяного давления отмечалась уже с первых минут замораживания, хотя у некоторых животных (рис. 1) первоначально выявлялась гипертензивная реакция.

По средним данным в целом для всей группы животных максимум снижения артериального давления наступал на десятой минуте холодовой экспозиции, в этот период давление было самым низким ($p < 0{,}001$), после чего при условии продолжающегося замораживания поддерживался тот же уровень.

Как следует из приведенных данных, несмотря на то что в процентном отношении понижение артериального давления у собак старшей возрастной группы было более выраженным, абсолютные уровни его в период замораживания простаты значимо не различались ($p > 0{,}05$) по сравнению с молодыми собаками. Следует указать, что даже при очень длительной холодовой экспозиции (30 мин) мы не наблюдали развития шока. Во всех случаях нижний уровень систолического артериального давления превышал 75 мм рт. ст. (рис. 1). После прекращения замораживания давление быстро возвращалось к исходному уровню.

У части собак (трех из двадцати одной) во время операции не наблюдалось изменений артериального давления.

Как видно из результатов наших исследований, достаточно полное промораживание простаты наступает при 2—5-минутном замораживa-

Матеріал, захищений авторським правом

нии, т. е. в сроки, при которых отмечается лишь тенденция ($p<0,1$) к снижению артериального давления. Поэтому необходимость контроля артериального давления возникает лишь при длительном криовоздействии, которое практически редко используется.

В наших исследованиях наряду с артериальным давлением в период замораживания предстательной железы осуществлялась реги-

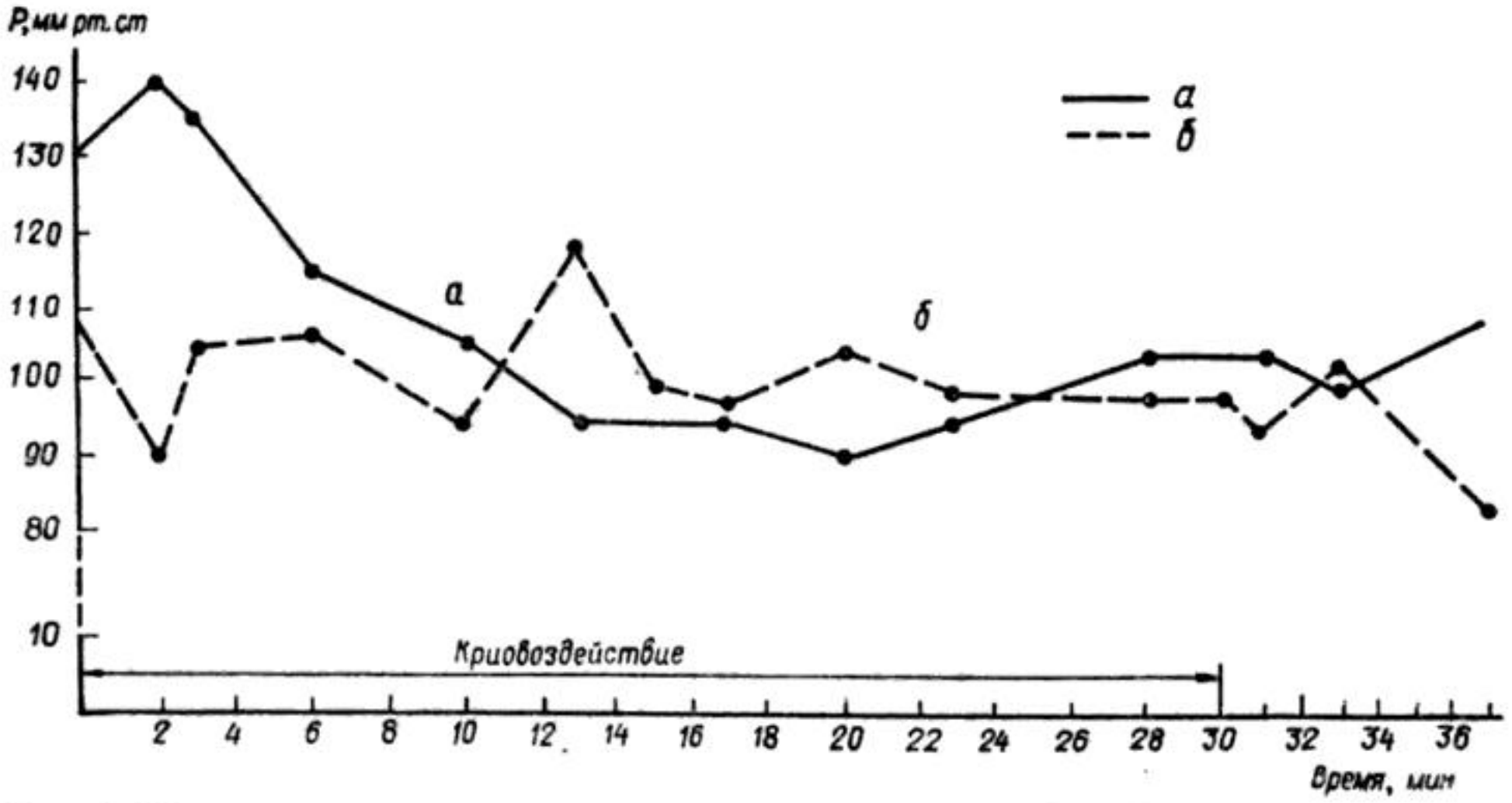


Рис. 1. Уровень кровяного давления и частоты пульса у собаки Кинг в период криовоздействия на предстательной железе:
а — кровяное давление; *б* — пульс.

страция ЭКГ, что давало возможность косвенно судить о состоянии коронарного кровообращения в этот период. Следует отметить, что введение тиопентала само по себе у всех собак вызывало изменения в частоте сердечного ритма, а у некоторых животных — и в конечной части желудочкового комплекса ЭКГ. В отдельных случаях выявлялось также нарушение проводимости. Последнее чаще имело место у старых собак, как это видно из ЭКГ, иллюстрирующей появление одиночных желудочковых экстрасистол (рис. 2).

Характер электрокардиографических изменений, сопровождающих фазу криовоздействия на простате, был различным у отдельных животных. Каких-либо закономерностей выявлено не было. В одних случаях отмечалось исчезновение экстрасистол, имевших место до начала криовоздействия и вновь появлявшихся после его отмены (см. рис. 2). У других собак, напротив, замораживание сопровождалось нарушением проводимости (рис. 3) или появлением признаков диффузной ишемии миокарда, устранившихся непосредственно после прекращения поступления жидкого азота.

Следует указать, что у большинства животных (шести старых и десяти молодых) качественные изменения на ЭКГ в период замораживания простаты отсутствовали. В частности, у подопытных животных на протяжении всего периода криовоздействия на простате не отмечалось достоверных изменений (при расчете хи-квадрата) в конечной части желудочкового комплекса — в форме и направленности зубца Т, а также положения Т. Это свидетельствовало об отсутствии выраженных изменений метаболизма миокарда и коронарного кровотока в период замораживания предстательной железы.

У большинства оперированных животных имели место лишь количественные изменения временных показателей — PQ, QT, P—R, степень которых зависела от длительности холодовой экспозиции. Так,

Матеріал, захищений авторським правом

в первые пять минут криовоздействия отклонения в длительности атриовентрикулярной проводимости в целом для всей группы оперированных собак не были значимыми (удлинение с 0,091±0,0020 с до 0,092±0,0030 с). По мере продолжавшегося замораживания наблюдалось увеличение длительности PQ, которое на 11—15 мин замораживания имело достоверный характер (0,096±0,0025 с, $p<0,05$).

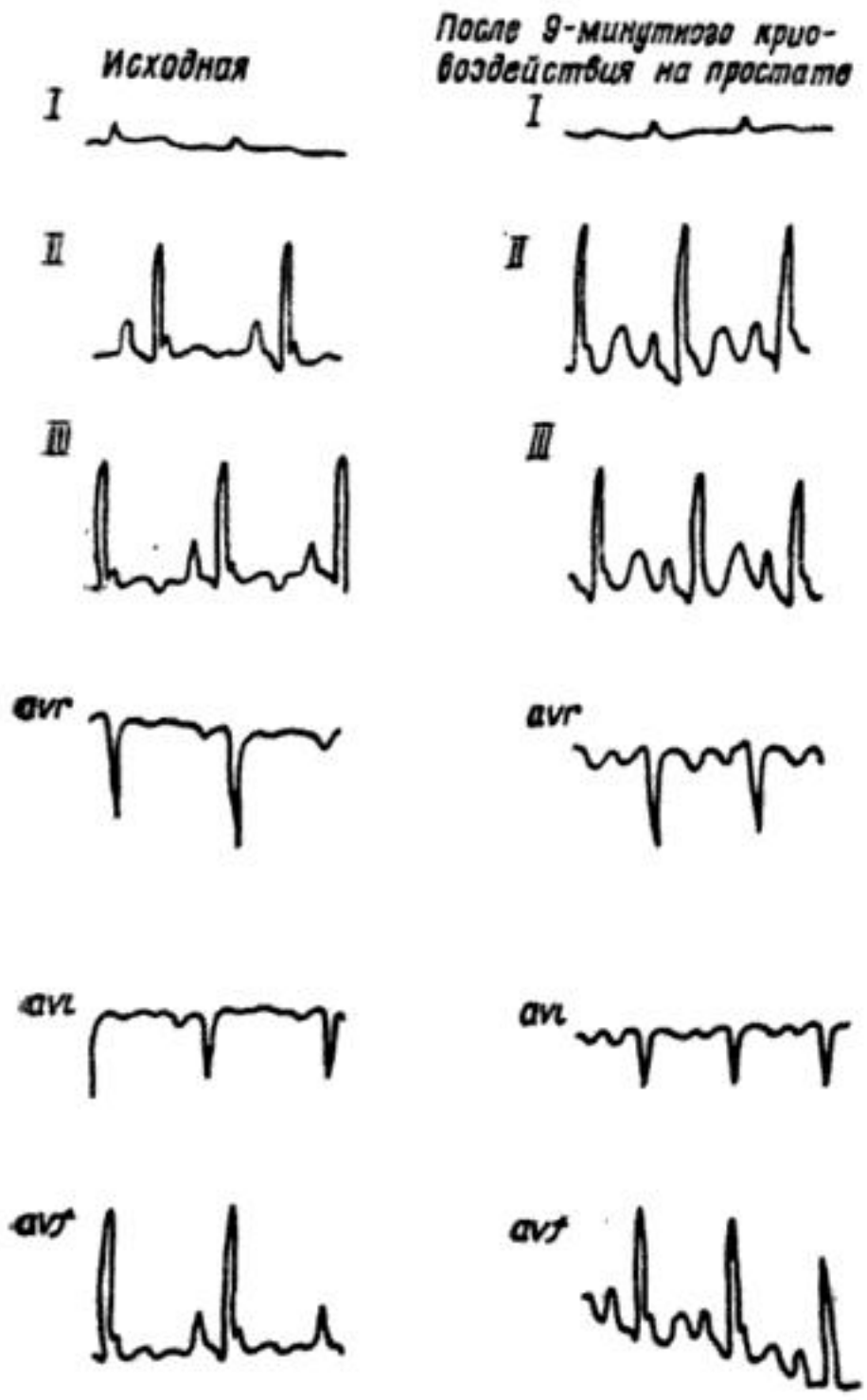


Рис. 2. ЭКГ собаки Старик (во время операции).

Электрическая систола желудочков (QT) удлинялась на 3—5-й минуте криовоздействия с 0,1810±±0,0040 с до 0,199±0,0037 с, $p<0,05$. В остальное время (криовоздействие свыше 15 мин) изменения не были достоверными, хотя по абсолютному значению продолжительность QT в течение всего периода замораживания превышала таковую в исходном состоянии.

Длительность R—R (и обратно зависимая от нее частота пульса) увеличивалась в период замораживания у половины животных. При этом не было установлено зависимости между возрастом животных и хронотропными изменениями — урежение ритма отмечалось в обеих возрастных группах, однако в них же имелись животные, которые реагировали учащением пульса либо не обнаруживали никаких изменений. Ввиду указанных различий в индивидуальной чувствительности частоты сердечного ритма на криовоздействие в целом для всей группы собак изменения длительности *R—R* не были достоверными (0,0479±0,0275 с против 0,421±±0,0031 с в исходном состоянии; $p>0,05$). Частота пульса уменьшалась соответственно до 125 ударов в минуту (по сравнению со 142 в исходном состоянии), что, однако, также не было достоверным.

Появление у части животных изменений в артериальном давлении, пульсе и ЭКГ в период замораживания предстательной железы объясняется, по-видимому, наличием рефлекторных связей в системе гонады — сердце. Прямых доказательств существования рефлексов в системе предстательная железа — сердце не получено. Однако известно, что простата имеет функциональные и морфологические тесные связи с яичком, что дает основание считать ее органом-мишенью для мужской половой железы. Наличие рефлексов с яичка на коронарное кровообращение установлено [1, 3]. По-разному предстательная железа через посредство яичка (а возможно и самостоятельно) оказывает влияние на сосудодвигательные центры.

Полученные нами данные свидетельствуют, что замораживание предстательной железы не сопровождается выраженными нарушениями гемодинамики. Имеющиеся незначительные сдвиги в артериальном давлении и ЭКГ имели проходящий характер и выявлялись не у всех животных. При этом старые собаки и, в частности, перенесшие инфаркт миокарда являются группой повышенного риска, однако и у них операция не была противопоказанной. Результаты наших исследова-

Матеріал, захищений авторським правом

ний согласуются с клиническими наблюдениями [2, 6] о возрастании числа осложнений в период проведения аденомэктомии у лиц пожилого возраста.

На основании полученных экспериментальных данных представляется возможным рекомендовать криодеструкцию простаты для использования ее по показаниям без опасности вызвать острые нарушения кровообращения.

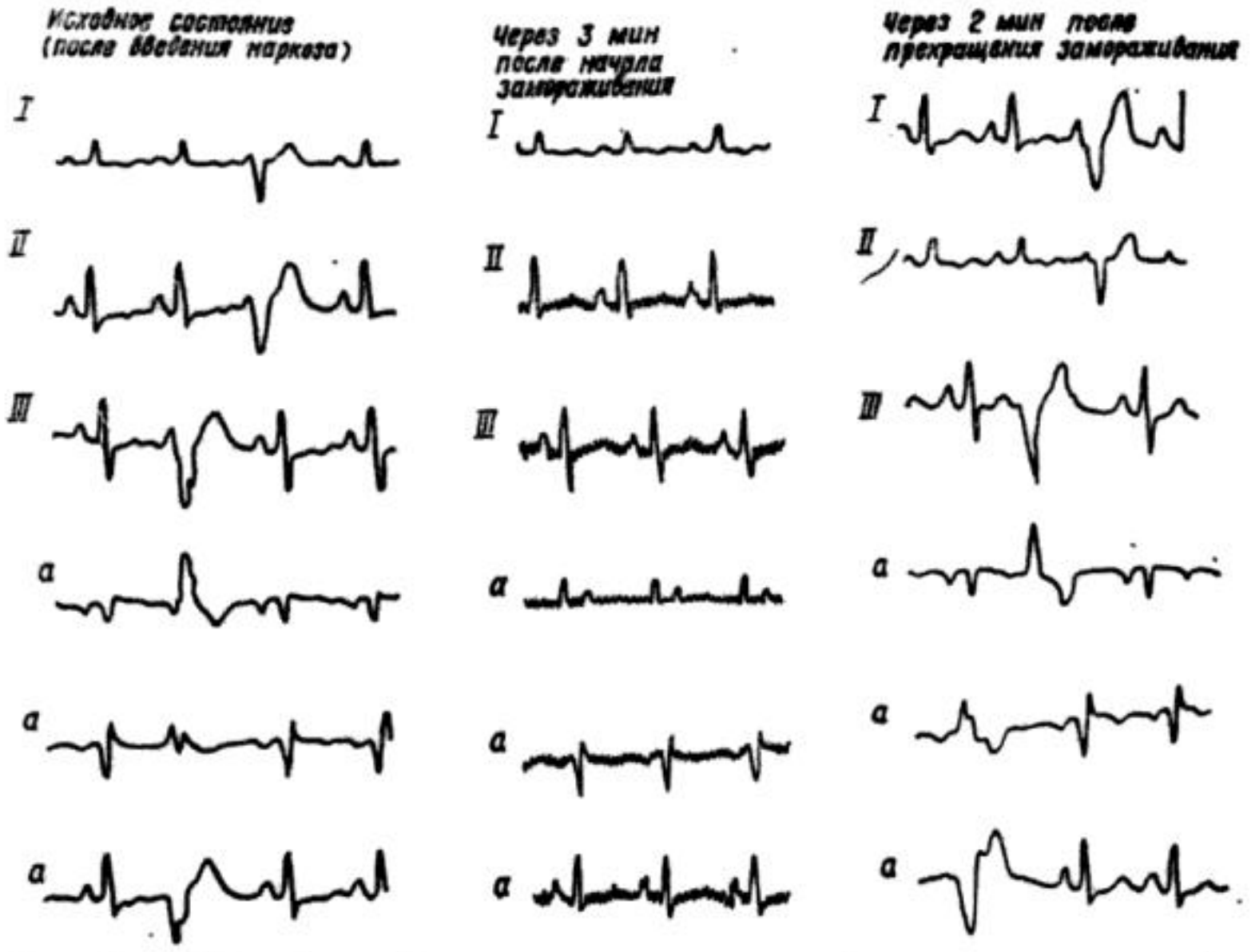


Рис. 3. ЭКГ собаки Луч во время операции (криопростатэктомия).

Таким образом, сделаем некоторые выводы.

1. В период замораживания предстательной железы у некоторых собак выявляются изменения в артериальном давлении (гипотония), пульсе (брадикардия) и ЭКГ.

2. Характер вызываемых нарушений зависит от исходного состояния сердечно-сосудистой системы и длительности замораживания, однако во всех случаях эти нарушения не являются противопоказанием для осуществления операции.

1. *Гусейнов С. Ю., Атакишиев А. Р., Карапетова Е. С.* Гистохимические изменения содержания нуклеиновых кислот в структурных компонентах семенников и яичника при экспериментальном инфаркте миокарда. — Тр. АзНИИ гематологии и переливания крови, 1969, **9**, с. 121—131.
2. *Джавад-заде М. Д., Садыков Г. А., Кнабенгоф В. В.* Радиотелеметрическое исследование сердечной деятельности у больных аденомой простаты. — Урология и нефрология, 1967, № 5, с. 71—74.
3. *Кульжанов З. К.* Рефлексы с мужской половой железы на коронарное кровообращение. — В кн.: Физиология коронарного кровообращения и сердца. Алма-Ата, 1966, с. 66—70 (Тр. Ин-та физиологии АН КазССР; Т. 9).
4. *Петрова З. А.* О сердечно-сосудистых и легочных осложнениях при аденоме простаты. — В кн.: Вопросы морфологии и экспериментальной хирургии сердца и сосудов. Орджоникидзе, 1969, с. 329—332.
5. *Садыхов Г. А.* Состояние сердечно-сосудистой системы у больных аденомой предстательной железы. — Учен. зап. Аз. ин-та усовершенствования врачей, 1967, 8, № 2, с. 129—133.
6. *Тарлычева Л. С.* О криовоздействии на небные миндалины у больных хроническим тонзиллитом : Автореф. дис. ... канд. мед. наук, М. : 1972. — 23 с.
7. *Muzierowicz A., Widzgowski H.* Ryzyko operacyjnego leczenia gruczolaka sterca u choruch z przewlekla niewydoloscia krazenia. — Polszi Tyg., 1969, **24**, N 46, p. 1775—1776.

Украинский институт усовершенствования врачей МЗ СССР

Поступила в редколлегию 27.03.80

Матеріал, захищений авторським правом

СОДЕРЖАНИЕ

I. Теоретическая и экспериментальная криобиология

Луговой В. И., Кравченко Л. П. Механизмы лабилизации лизосом при замораживании—оттаивании 3

Бражников А. М., Иткин Ю. А. Научные основы технологии криоконсервирования клеточных суспензий 17

Гучок В. М., Козлова В. Ф. О кумулятивных свойствах 1,2-пропандиола, глицерина и оксиэтилированного глицерина молекулярной массы 1412 и выносливости к ним крыс 24

Капрельянц А. С. Электронно-цитохимическое исследование АТФ-азной активности клеток печени при охлаждении 27

Черепнев А. С., Пиротти Е. Л., Ушаков В. М. Рассеяние электромагнитных волн на эллипсоидальной неоднородности в цилиндрическом волноводе . . . 31

Черепнев А. С. Математическое моделирование взаимодействия эритроцитов с внешним электромагнитным полем 35

Бидный С. Ю., Тимошенко Ю. П., Иванова Е. Ф. Исследование термодинамических свойств водных растворов глицерина 43

II. Криоконсервирование биологических объектов

Игнашева Л. П., Данилова Л. А., Федотенков А. Г. Воздействие глицерина на инактивирующую активность лимфоцитов против несингенных КОЕ . . 47

Данилова Л. А., Игнашева Л. П., Федотенков А. Г. Влияние замораживания на пролиферативную активность и дифференцировку стволовых клеток смешанного трансплантата костного мозга 51

Обозная Э. И., Дмитренко Ю. А. Динамика изменения цитохромоксидазной активности как показателя функционального состояния посмертного костного мозга, заготовленного для криоконсервирования 53

Говоруха Т. П., Скорняков Б. А. Ультраструктура фолликулярных тиреоцитов на этапах криоконсервирования щитовидной железы 55

Строна И. Г., Шраго М. И., Сорокин С. Н. Токсичность некоторых криопротекторов для семян и растений озимой пшеницы 59

III. Криомедицина

Пушкарь Н. С., Утевский А М., Чуйко В. А., Цариковская Н. Г. Консервирование и трансплантация щитовидной железы человека 64

Малая Л. Т., Пушкарь Н. С., Яковцова А. Ф., Паскевич И. Ф., Пахомов В. И., Адольф Е. В., Бабийчук Г. А., Калиманов В. Г., Офицеров В. Н., Питенько Н. Н., Журавлев В. С. Структурно-функциональные изменения миокарда при экспериментальном инфаркте и краниоцеребральной гипотермии . 74

Соснова И. И., Королев В. В., Скребцов А. И. Состояние сердечно-сосудистой системы по данным электрокардиографии у экспериментальных животных в условиях гипотермии и инфаркта миокарда 81

Гладкова А. И., Криворотько В. Ф. Особенности кардиоваскулярной реакции при замораживании предстательной железы 83

Матеріал, захищений авторським правом

CONTENTS

I. Theoretical and Experimental Cryobiology

Lugovoy V. I., Kravchenko L. P. Mechanism of Lisosome Labilization During Freezing and Thawing 3

Brazhnikov B. M., Itkin Yu. A. Fundamentals of the Cell Suspension Cryopreservation Engineering 17

Guchok V. M., Kozlova V. F. On Cumulative Properties of 1,2-Propanediol, Glycerol and Oxyethylated Glycerol M. W. 1412 and Their Tolerance by Ratz . 24

Kaprelyants A. S. Electron-Cytochemical Investigation of ATPase Activity in Frozen Liver Cells 27

Cherepnev A. S., Pirotti E. L., Ushakov V. M. On the Ellipsoidal Inhomogeneity Scattering of Electromagnetic Waves in a Cylindrical Waveguide . . . 31

Cherepnev A. S. Mathematical Modelling of Interaction Between Red Blood Cells and the External Electromagnetic Field 35

Bidny S. Yu., Timoshenko Yu. P., Ivanova E. F. A Study of Thermodynamic Properties of Aqueous Clycerol Solutions 43

II. Criopreservation of Biological Systems

Sukhanova L. I., Fedotenkov A. G., Danilova L. A. Preservation of Bone Marrow by Supercooling 47

Danilova L. A., Ignasheva L. P., Fedotenkov A. G. Effect of Freezing on Proliferative Activity and Differentiation of Stem Cells of a Mixed Bone Marrow Transplant 51

Oboznaya E. I., Dmitrenko Yu. A. Dynamics of Changes in Cytochrome Oxidase Activity as an Index of the Functional State of Postmortem Bone Marrow Prepared for Cryopreservation 53

Ignasheva L. P., Danilova L. A., Fedotenkov A. G. The Effect of Clycerol on Inactivating Action of Lympocytes Against Nonsyngenetic KOE . . . 47

Govorukha T. P., Skornyakov B. A. Follicular Thyreocyte Ultrastructure During Cryopreservation of Thyroid Gland 55

Strona I. G., Shrago M. I., Sorokin S. N. Toxicity of Some Cryoprotectants for Winter Wheat Seeds and Plants 59

III. Cryomedicine

Pushkar N. S., Utevsky A. M., Chuiko V. A., Trasikovskaya N. G. Preservation and Transplantation of Human Thyroid Gland 64

Malaya L. T., Pushkar N. S., Yakovtsova A. F., Paskevich I. F., Pakhomov V. I., Adolf E. V., Babiychuk G. A., Kalimanov V. G., Ofitserov V. N., Pitenko N.N., Zhuravlev V. S. Structural and Functional Changes in Myocardium Under Experimental Infarction and Craniocerebral Hypothermia 74

Sosnova I. I., Korolev V. V., Skrebtsov A. I. The State of the Cardiovascular System Estimated by Means of Electrocardiography in Experimental Animals Under Hypothermia and Myocardial Infarction 81

Gladkova A. I., Krivorotko V. F. Peculiarities of Cardiovascular Response to Prostate Freezing 83

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043.576.311.34.591.044.3

Механизмы лабилизации лизосом при замораживании—оттаивании / Луговой В. И., Кравченко Л. П. — Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 11, с. 3—16.

Проведен анализ литературных данных и результатов собственных исследований авторов по проблеме влияния замораживания—оттаивания на структурную целостность изолированных и находящихся в составе различных клеток и тканей лизосом. Кратко изложены современные представления о молекулярной организации лизосомальной мембраны и гидролитических ферментов лизосом. Подробно представлены экспериментальные данные о значении концентрационных эффектов в механизме криоповреждения лизосом и влияния на их стабильность различных криопротекторов и лизосомотропных веществ.

Ил. 6. Библиогр.: 82 назв.

УДК 57.043.615.361.014.41

Научные основы технологии криоконсервирования клеточных суспензий / Бражников А. М., Иткин Ю. А. — Криобиология и криомедицина, 1983, вып 11, с. 17—23.

На примере разработки научно обоснованной технологии низкотемпературного консервирования клеточных суспензий (эритроцитов, лейкоцитов, лимфоцитов, половых продуктов рыб, микроорганизмов и др.) показана возможность построения технологической линии, оснащенной необходимой специальной аппаратурой.

Библиогр.: 6 назв.

УДК 57.043.547.422.426.1:615.9

О кумулятивных свойствах 1,2-пропандиола, глицерина и оксиэтилированного глицерина молекулярной массы 1412 и выносливости к ним крыс / Гучок В. М., Козлова В. Ф. — Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 11, с. 24—28.

В субхронических опытах исследовались кумулятивные свойства 1,2-пропандиола, глицерина, ОЭГ-1412 и выносливость к ним крыс. Показано, что изученные криопротекторы, в зависимости от условий их применения, следует отнести к веществам с чрезвычайно слабой кумулятивной активностью или к вовсе некумулирующим химическим агентам. Кумулятивнее других оказался глицерин. Повторное многократное введение 1,2-пропандиола, ОЭГ-1412 и глицерина повышает выносливость к ним животных.

Ил. 3. Табл. 2. Библиогр.: 11 назв.

УДК 57.043:615

Элекронно-цитохимическое исследование АТФ-азной активности клеток печени при охлаждении / Капрельянц А. С. — Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 11, с. 28—31.

Электронно-цитохимическим методом изучена активность Mg — активируемой АТФ-азы в клетках печени при охлаждении (—196°С). Показано перераспределение локализации активности в различных компартментах клетки.

Ил. 5. Библиогр.: 8 назв.

УДК 57.043.621.372.852.6

Рассеяние электромагнитных волн на эллипсоидальной неоднородности в цилиндрическом волноводе / Черепнев А. С., Пиротти Е. Л., Ушаков В. М. — Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 11, с. 31—35.

Рассмотрена методика решения интегро-дифференциальных управлений, использующихся для нахождения полей, рассеянных на эллипсоидальных неоднородностях, в цилиндрической системе координат.

Получены аффинорные функции Грина для полей электрического и магнитного типов. На основе этих выражений исследованы два случая: основной H_{11}-волны и основной электрической E_{01}-волны. Получена зависимость коэффициента отражения для этих волн от положения хорошо проводящей сферы в поперечном сечении волновода. Проведено сравнение теоретических и экспериментальных результатов, давшее хорошее их совпадение.

Ил. 3. Библиогр.: 4 назв.

УДК 57.043.

Математическое моделирование взаимодействия эритроцитов с внешним электромагнитным полем / Черепнев А. С. — Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 11, с. 35—43.

Рассматривается электромагнитное поле внутри кровеносного сосуда, облучаемого высокочастотной энергией. Предлагается модель взаимодействия, позволяющая определить силы, действующие на эритроциты крови. Оценивается критическая мощность поля, при которой наблюдается слипание эритроцитов.

Ил. 4. Библиогр.: 5 назв.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043

Исследование термодинамических свойств водных растворов глицерина / Бидный С. Ю., Тимошенко Ю. П., Иванова Е. Ф. — Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 11, с. 43—46.

Проведены исследования температурной зависимости теплоемкости водных растворов глицерина в широком интервале температур (—130—+50°С) методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии.

Полученные зависимости Ср(Т) имеют сложный характер. В области температур —120°——80°С наблюдаются превращения, связанные с переходом из стеклообразного состояния в жидкое. Величина изменения теплоемкости (ΔСр) при стеклопереходе зависит от концентрации компонентов в смеси: с ростом концентрации глицерина величина ΔСр увеличивается и достигает ~1 Дж/г для концентрированных растворов.

Обнаружено монотонное уменьшение энтальпий плавления смесей с ростом концентрации глицерина. Это явление предложено использовать для анализа степени кристалличности изучаемых водно-глицериновых смесей.

Ил. 3. Табл. 1. Библиогр.: 5 назв.

УДК 57.043

Воздействие глицерина на инактивирующую активность лимфоцитов против несингенных КОЕ / Игнашева Л. П., Данилова Л. А., Федотенков А. Г. — Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 11, с. 47—51.

Изучено влияние 15%-ного глицерина на иммунологические свойства лимфоцитов, содержащихся в лимфоузлах, селезенке и костном мозге. Для определения иммунологической активности лимфоцитов использованы методы, отражающие взаимодействие стволовых клеток и лимфоцитов «in vivo». 1. Метод учета инактивации несингенных стволовых клеток. 2. Метод учета отмены эндогенного колониеобразования.

Установлен факт снижения или отмены гомотрансплантационной активности лимфоцитов кроветворных тканей, обработанных 15%-ным глицерином, против эндогенных и экзогенных КОЕ. Можно предположить, что трансплантация свежезаготовленного аллогенного костного мозга, обработанного 15%-ным глицерином, окажется более эффективной в клинике, чем трансплантация свежего костного мозга без обработки глицерином. Риск развития вторичной болезни при этом будет меньше, чем при переливании свежего костного мозга.

Табл. 3. Библиогр.: 2 назв.

УДК 57.043

Влияние замораживания на пролиферативную активность и дифференцировку стволовых клеток смешанного трансплантата костного мозга / Данилова Л. А., Игнашева Л. П., Федотенков А. Г. — Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 11, с. 51—52.

При переливании свежезаготовленного костного мозга от нескольких доноров эффективность его невелика из-за инактивации кроветворных стволов клеток несингенными лимфоцитами, присутствующими в смешанном трансплантате. При трансплантации замороженного костного мозга от двух или нескольких доменов эффект инактивации отменяется. Более того, экзогенное колониеобразование в организме животного-реципиента усиливается. Показано, что при переливании замороженного костного мозга хорошо сохраняется функция дифференцировки стволовых клеток по всем трем росткам кроветворения. Преимущественное развитие, однако, получают колонии эритробластического типа.

Табл. 1. Библиогр.: 2 назв.

УДК 57.043.611—018,46:615,014,4:536,48

Динамика изменения цитохромоксидазной активности как показателя функционального состояния посмертного костного мозга, заготовленного для криоконсервирования / Обозная Э. И., Дмитренко Ю. А. — Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 11, с. 53—55.

Исследована активность ЦХО в клетках посмертного костного мозга в различные сроки, прошедшие с момента смерти: 0—6; 6—12; 12—18; 18—24 и 24—36 ч.

В интервале 0—6 ч после наступления смерти гранулы продукта реакции равномерно и интенсивно заполняют цитоплазму клеток. Начиная с 6—12 ч изменения ферментативной реакции связаны в основном с уменьшением гранул диформазана, их перераспределением в цитоплазме, наиболее четко выраженном в интервале 24—36 ч. Высказано предположение, что по изменению активности ЦХО можно судить как о качестве миелоидных клеток, полученных для дальнейшего криоконсервирования, так и о сроках, прошедших после наступления смерти, для судебно-медицинской экспертизы.

Табл. 1. Библиогр.: 8 назв.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043:611.441.361.041.:537.533.35

Ультраструктура фолликулярных тиреоцитов на этапах криоконсервирования щитовидной железы / Говоруха Т. П., Скорняков Б. А. — Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 11, с. 55—59.

Проведено электронно-микроскопическое исследование тиреоцитов человека при низкотемпературном консервировании под защитой 15%-ного раствора ДМСО. Показано, что инкубация кусочков щитовидной железы с 15%-ным раствором ДМСО вызывает различной степени выраженности изменения во всех компонентах ультраструктуры тиреоцитов. Наблюдается уменьшение объема ядра и органоидов, разрушение митохондриальных крист, неравномерное расширение перинуклеарного пространства. После замораживания—оттаивания подобные изменения ультраструктуры тиреоцитов наблюдаются в более выраженной форме. Сделан вывод об однонаправленном характере изменений ультраструктуры тиреоцитов в процессе низкотемпературного консервирования.

Ил. 3. Табл. 1. Библиогр.: 15 назв.

УДК 57.043.6.581.19:631.53+633.11

Токсичность некоторых криопротекторов для семян и растений озимой пшеницы / Строна И. Г., Шраго М. И., Сорокин С. Н. — Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 11, с. 59—63.

С целью изучения возможности получения морозостойкой озимой пшеницы проведены опыты по определению токсичности для семян и растений озимой пшеницы некоторых химических веществ, являющихся криопротекторами: глицерина, этиленгликоля, диметилсульфоксида (ДМСО), полиэтиленоксидов различной молекулярной массы (ПЭО-400 и ПЭО-1500). Исследованы два способа обработки семян — намачивание и вакууминфильтрация и опрыскивание растений. Изучены три экспозиции и 15 концентраций растворов.

Сделан вывод, что недопустимое снижение всхожести семян происходит при обработке растворами с концентрацией пять и более процентов по всем изученным криопротекторам.

Табл. 1. Библиогр.: 11 назв.

УДК 57.043.612.43.45.014.41.089.843

Консервирование и трансплантация щитовидной железы человека / Пушкарь Н. С., Утевский А. М., Чуйко В. А., Цариковская Н. Г. — Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 11, с. 64—74.

Приводятся материалы исследований, посвященных консервированию и трансплантации щитовидной железы. Анализируется состояние структурно-функциональных, метаболических и регуляторных процессов в щитовидной железе, подвергнутой консервации — в условиях гипотермических режимов и глубокого замораживания. Дается характеристика функционального состояния криоконсервированного трансплантата и реакция некоторых нейро-гуморальных систем организма на пересадку криоконсервированной щитовидной железы. Анализируются клинические наблюдения аутоимплантации криоконсервированной щитовидной железы в целях профилактики и лечения послеоперационного гипотиреоза.

Библиогр.: 43 назв.

УДК 57.043.616.127—005.8+616—089.583.29

Структурно-функциональные изменения миокарда при экспериментальном инфаркте и краниоцеребральной гипотермии / Малая Л. Т., Пушкарь Н. С., Яковцева А. Ф., Паскевич И. Ф., Пахомов В. И., Адольф Е. В., Бабийчук Г. А., Калиманов В. Г., Офицеров В. Н., Питенько Н. Н. Журавлев В. С. — Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 11, с. 74—80.

Гистологически, электронно-микроскопически и авторадиографически изучены инфарктная, пери- и заинфарктная зоны миокарда 20 собак при экспериментальном инфаркте и кранио-церебральной гипотермии. В световом микроскопе ишемическая стадия инфаркта миокарда выявлялась окраской по Ли, в электронном — первая (обратимая) фаза раннего периода ишемической стадии инфаркта миокарда.

При инфаркте миокарда происходят изменения не только в зоне некроза, но и в периинфарктной и более отдаленных от некроза зонах, что необходимо учитывать в клинике.

Кранио-церебральная гипотермия при экспериментальном инфаркте миокарда, по-видимому, замедляет процессы гибели и дистрофии, чем, очевидно, создает лучшие условия для внутриклеточной компенсации и регенерации кардиомиоцитов.

Ил. 5. Табл. 4. Библиогр.: 16 назв.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043.616.127—005.8:616.8329

Состояние сердечно-сосудистой системы по данным электрокардиографии у экспериментальных животных в условиях гипотермии и инфаркта миокарда / Соснова И. И., Королев В. В., Скребцов А. И. — Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 11, с. 81—83.

Приведены данные изучения электрокардиографических показателей у кроликов в процессе кранио-церебральной гипотермии и при экспериментальном инфаркте миокарда.

Установлены изменения электрокардиограммы при гипотермии, свидетельствующие о снижении обменных процессов в миокарде, что выражалось в урежении сердечной деятельности, удлинении времени проведения возбуждения по предсердиям и и желудочкам, снижении амплитуды зубцов *P* и *T*.

При моделировании инфаркта миокарда электрокардиографически подтверждена ишемия миокарда и характерная для исхода инфаркта динамика.

Библиогр.: 15 назв.

УДК 57.043

Особенности кардиоваскулярной реакции при замораживании предстательной железы / Гладкова А. И., Криворотько В. Ф. — Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 11, с. 83—87.

Приводится анализ характера изменений артериального давления и ЭКГ собак, у которых в условиях общего обезболивания производилось замораживание предстательной железы. У большинства животных с первых минут криовоздействия наблюдалось понижение артериального давления, степень которого зависела от исходного уровня и длительности холодового воздействия. Указанные изменения сопровождались урежением частоты сердечного ритма и соответственным удлинением временных показателей ЭКГ, а также появлением в отдельных случаях признаков ишемии миокарда и нарушения проводимости. После прекращения замораживания наступала быстрая нормализация изучаемых показателей.

Ил. 4. Библиогр.: 7 назв.

UDC 57.043.576.311.34.591.044.3

Mechanisms of Lisosome Labilization During Freezing and Thawing / Lugovoy B. I., Kravchenko L. P. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1983, iss. 11, p. 3—16.

Literature data and results of the authors' own studies of the problem on the effect of freezing and thawing on the structural integrity of isolated lysosomes and those in cells and tissues are analyzed in the review. Present-day ideas of the molecular organization of lysosomal membranes and hydrolytic enzymes are discussed in brief. Experimental data on the significance of concentration effects in the mechanism of cryoinjury to lysosomes and on the effect of different cryoprotectants and lysosomotropic substances on their stability are analyzed in detail.
6 figs. Refs: 82 titles.

UDC 57.043.615.014.41

Fundamentals of the Cell Suspension Cryopreservation Engineering / Brazhnikov A. M., Itkin Yu. A. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1983, iss. 11, p. 17—23.

A possibility for constructing a technological line fitted with special equipment is exemplified by the development of a scientifically founded engineering for low-temperature preservation of cell suspensions (erythrocytes, leucocytes, lymphocytes, fish gametes, microorganisms, etc.).
1 table. Refs: 6 titles.

UDC 57.043.547.422.426.1:615.9

On Cumulative Properties of 1,2-Propanediol, Glycerol and Oxyethylated Glycerol M. W. 1412 and Their Tolerance by Rats. / Guchok V. M., Kozlova V. F. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1983, iss. 11, p. 24—28.

Cumulative properties of 1,2-propanediol, glycerol, OEG-1412 and their tolerance by rats were studied in subchronic experiments. It is demonstrated that the cryoprotectants studied have a very low cumulative activity or no cumulative activity, that depends on conditions of their application. Glycerol is the most cumulating agent. Repeated multiple administrations of 1,2-propanediol, OEG-1412, and glycerol increase their tolerance by animals.
3 figs. 2 tables. Refs: 11 titles.

UDC 57.043:615

Electron-Cytochemical Investigation of ATPase Activity in Frozen Liver Cells / Kaprelyants A. S. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1983, iss. 11, p. 28—31.

The activity of M-activated ATPase in hepatic cells cooled to —196°C has been studied by electron-cytochemical techniques. The redistribution of the activity localization in various cell compartments is shown.
5 figs. Refs: 8 titles.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 57.043.621.372-852.6

On the Ellipsoidal Inhomogeneity Scattering of Electromagnetic Waves in a Cylindrical Waveguide / Cherepnev A. S., Pirotti E. L., Ushakov V. M. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1983, iss. 11, p. 31—35.

A technique is discussed for solving integro-differential equations used for determining fields scattered by ellipsoidal inhomogeneities in a cylindrical coordinate system. Green's affinoric functions are obtained for electric and magnetic fields. These functions are used to describe the fundamental H_{11}-wave and fundamental electric E_{01}-wave. The reflection coefficient of these waves is found to depend on the position of the well-conducting sphere in the cross-section of the waveguide. Theoretical and experimental results are in good agreement.
3 figs. Refs: 4 titles.

UDC 57.043

Mathematical Modelling of Interaction Between Red Blood Cells and the External Electromagnetic Field / Cherepnev A. S. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1983, iss. 11, p. 35—43.

The electromagnetic field inside the blood vessel irradiated with high-frequency energy is studied. A model simulating the interaction is proposed for determination of forces affecting red blood cells. The critical power of the field resulting in erythrocyte adhesion is estimated.
4. figs. Refs: 10 titles.

UDC 57.043

A Study of Thermodynamic Properties of Aqueous Glycerol Solutions / Bidny S. Yu., Timoshenko Yu. P., Ivanova E. F. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1983, iss. 11, p. 43—46.

The temperature dependence for heat capacity of aqueous glycerol solutions has been studied in a wide temperature range (—130°÷50°T) by means of differential scanning microcalorimetry.

The obtained dependences Cp (T) are of complicated character. Transformations associated with the vitreous-liquid state transition are observed within a —120 - —80°C range of temperatures. A change in the heat capacity (ΔCp) at glass transition depends on the concentraion of components in the mixture: the value of ΔCp increases with an increase in glycerol concentration amounting to $\sim$1J/g for concentrated solutions.

There is a monotonic decrease in the enthalpy of fusion for mixtures with an increase in glycerol concentration. This phenomenon can be used for analyzing the degree of crystallization of water-glycerol mixtures studied.
3 figs. 1 table. Refs: 5 titles.

UDC 57.043

The Effect of Glycerol on Inactivating Action of Lymphocytes Against Nonsyngenetic KOE / Ignasheva L. P., Danilova L. A., Fedotenkov A. G. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1983, iss. 11, p. 47—51.

Immunological properties of lymphocytes in lymphonodes, spleen and bone marrow have been studied as affected by 15% glycerol. The immune lymphocyte activity was determined by methods reflecting the interaction of stem cells and lymphocytes "in vivo": method for taking account of nonsyngenetic stem cell inactivation (1) and method for taking account of endogenic colony-formation cancellation (2).

There is some evidence for a decrease or cancellation of homotransplantation activity of hematopoietic tissue lymphocytes treated with 15% glycerol against endogenic and exogenic KOE.

It is supposed that transplantation of fresh prepared allogenic bone marrow treated with 15% glycerol may be more effective in clinical practice than transplantation of fresh bone matrrow untreated with glycerol. It is safer to avoid the development of a secondary disease in this case than in case of medullotherapy.
3 tables. Refs: 2 titles.

UDC 57.043

Effect of Freezing on Proliferative Activity and Differentiation of Stem Cells of a Mixed Bone Marrow Transplant. / Danilova L. A., Ignasheva L. P., Fedotenkov A. G. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1983, iss. 11, p. 51—52.

The efficiency of transfusions of fresh bone marrow from several donors is not high due to inactivation of myeloid stem cells by nonsyngenic lymphocytes in the mixed transplant. When the frozen bone marrow from two or more donors is transplanted, the inactivation effect is eliminated. Moreover, the exogenic colony formation in the organism recipient animal is enhanced. It is demonstrated that the function of the stem cell differentiation of the frozen bone marrow is well preserved in all hemopoietic cells. However, colonies of erythroblast types proliferate preferentially.
1 table. Refs: 2 titles.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 57.043.47.043.611—018.46:615.014.4:536.48

Dynamics of Changes in Cytochrome Oxidase Activity as an Index of the Functional State of Postmortem Bone Marrow Prepared for Cryopreservation / Oboznaya E. I., Dmitrenko Yu. A. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1983, iss. 11, p. 53—55.

Cytochrome oxidase activity of postmortem bone marrow cells was studied at different time after death: 0-6, 6-12, 12-18, 18-24, and 24-36 hours.

Within 6 hours after death the reaction product granules uniformly and intensely fill the cell cytoplasm. Changes in the enzymic reaction beginning from 6-12 h are mostly associated with a reduction of diformazane granules, their redistribution in cytoplasm which is most clearly manifested within 24-36 h. It is suggested that the quality of myeloid cells obtained for further cryopreservation and the time after death for the forensic medical examination can be indicated by changes in the cytochrome oxidase activity.

1 table. Refs: 8 titles.

UDC 57.043:611.441.361.014.41:537.533.35

Follicular Thyreocyte Ultrastructure During Cryopreservation of Thyroid Gland / Govorukha T. P., Skornyakov B. A. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1983, iss. 11, p. 55—59.

Human thyreocytes cryopreserved with 15% DMSO were investigated by electron microscopy. It is demonstrated that incubation of the thyroid gland pieces with 15% DMSO results in various changes in all componens of the thyreocyte ultrastructure. There is a reduction in the volume of the nucleus and organoids, destruction of mitochondrial cristas, a nonuniform expansion of perinuclear space. These changes in thyreocytes are more manifested after freezing and thawing. It is concluded that the observed changes in the thyreocyte ultrastructure during low-temperature preservation are of unidirectional character.

3 figs, 1 table, Refs: 15 titles.

UDC 57.043:581.19:631.53.+633.11

Toxicity of Some Cryoprotectants for Winter Wheat Seeds and Plants / Strona I. G., Shrago M. I., Sorokin S. N. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1983, iss. 11, p. 59—63.

To study a possibility for obtaining hard winter wheat, experiments have been carried out with the view of determining the toxicity of some chemical substances (glycerol, ethylene glycol, dimethyl sulphoxide, polyethylene oxides of different molecular weights) for the seeds and plants of winter wheat. Two methods of processing the seeds are investigated: moistening and vacuum infiltration as well as sprinkling of plants. Three exposures and fifteen concentrations were studied.

It is concluded that an inadmissible reduction in the germination of seeds occurs after their exposure to cryoprotectants with concentrations more than 5%.

1 table. Refs: 8 titles.

UDC 57.043.612.43.45.014.41—089.843

Preservation and Transplantation of Human Thyroid Gland. / Pushkar N. S., Utevsky A. M., Chuiko V. A., Tsarikovskaya N. G. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1983, iss. 11, p. 64—74.

The results of preservation and transplantation of human thyroid gland are presented. The state of structural and functional, metabolic and regulatory processes in the thyroid gland preserved by hypothermia and deep freezing is discussed. The functional characteristics of cryopreserved transplants and the response of some neurohumoral systems of the organism to the transplantation of the cryopreserved thyroid gland are described. Clinical experience of autotransplantation of cryopreserved thyroid glands is analyzed with the aim of treatment and prophylaxis of postoperative hypothyrosis.

1 fig., 3 tables, 43 Refs: 43 titles.

UDC 57.043.616.127—005.8+616—089.583.29

Structural and Functional Changes in Myocardium Under Experimental Infarction and Craniocerebral Hypothermia. / Malaya L. T., Pushkar N. S., Yakovtsova A. F., Paskevich I. F., Pakhomov V. I., Adolf E. V., Babiychuk G. A., Kalimanov V. G., Ofitserov V. N., Pitenko N. N., Zhuravlev V. S. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1983, iss. 11, p. 74—80.

The infarction, periinfarction and subinfarction zones of the myocardium were studied in 20 dogs under craniocerebral hypothermia and experimental infarction by means of histological, electron microscopic and autoradiographic methods. The ischemic stage of myocardial infarction was determined in a light microscope by staining according to Lee, in an electron microscope the first (reversible) phase of the early ischemic stage of myocardial infarction was observed.

In myocardial infarction changes develop not only in the zone of necrosis. but also in the periinfarction and more distant zones, that should be taken into account in a clinical picture.

Матеріал, захищений авторським правом

Craniocerebral hypothermia retards processes of destruction and degeneration in the experimental infarction, thus providing better conditions for intracellular compensation and regeneration of cardiomyocytes.
5 figs, 4 tables. Refs: 15 titles.

UDC 57.043.616.127—005.8:616.8329

The State of the Cardiovascular System Estimated by Means of Electrocardiography in Experimental Animals Under Hypothermia and Myocardial Infarction / Sosnova I. I., Korolev V. V., Skrebtsov A. I. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1983, iss. 11, p. 81—83.

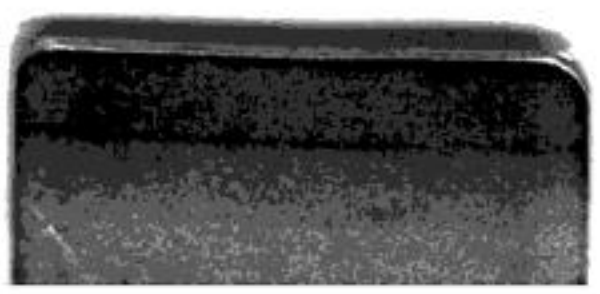
The paper deals with the results of electrocardiographic examination of rabbits during craniocerebral hypothermia and under experimental myocardial infarction. The observed changes in the electrocardiogram during hypothermia testify to a reduction in myocardium metabolic processes. These changes are manifested in cardiac slowing, an increase in the time of stimulation conduction in auricles and ventricles, a decrease in the amplitude of *P* and *T* peaks. In case of myocardial infarction modelling the electrocardiogram demonstrates myocardial ischemia and the dyhamics characteristic of the infarction outcome.
5 figs, Refs: 15 titles.

UDC 57.043

Peculiarities of Cardiovascular Response to Prostate Freezing / Gladkova A. I., Krivorotko V. F. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1983, iss. 11, p. 83—87.

The character of changes is analyzed in arterial tension and ECG in dogs with prostates frozen under general anesthesia. Since the very beginning of freezing in most animals there was a reduction in arterial tension dependent on the initial value of arterial tension and on the time of exposure to cold. The changes mentioned above were accompanied by changes in the rate of cardiac rhythm and a corresponding prolongation of time ECG indices, as well as by symptoms of myocardial ischemia and conduction disturbances in some cases. On ceasing freezing the indices studied rapidly recovered their normal levels.
4 figs. Refs: 7 titles.

Матеріал, захищений авторським правом



Матеріал, захищений авторським правом

1 руб. 20 коп.

НАУКОВА ДУМКА

Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 11, 1—96

Матеріал захищений авторським правом