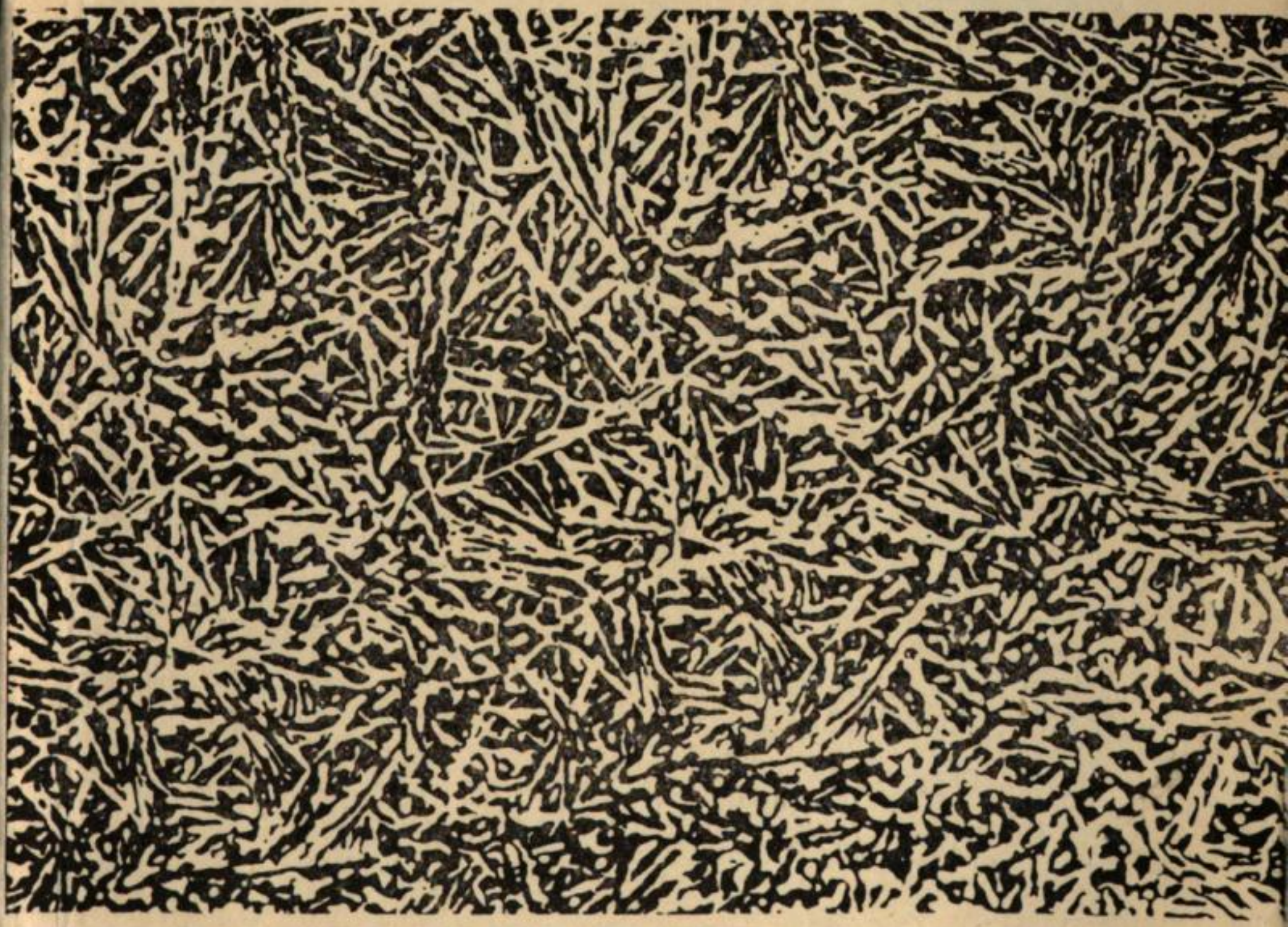
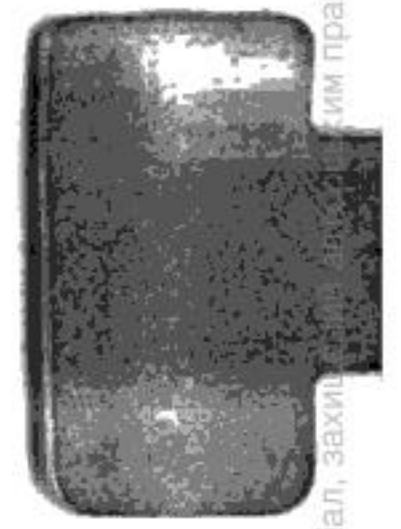
КРИОБИОЛОГИЯ И КРИОМЕДИЦИНА



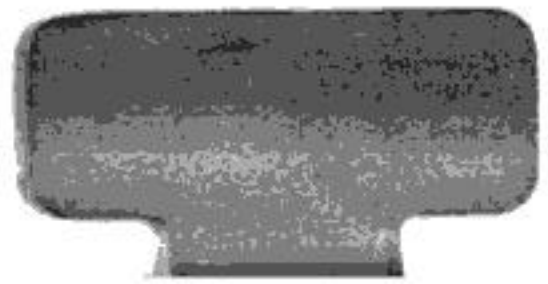
1

1 9 7 [illegible]

Матеріал, захищений автор[illegible]



Матеріал, захи[illegible]им правом



АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ И КРИОМЕДИЦИНЫ

КРИОБИОЛОГИЯ И КРИОМЕДИЦИНА

ВЫПУСК
1

РЕСПУБЛИКАНСКИЙ МЕЖВЕДОМСТВЕННЫЙ СБОРНИК

ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКОВА ДУМКА»
КИЕВ — 1975

Матеріал, захищений авторським правом

57.04+61
К82

В сборнике представлены результаты комплексного изучения теоретических и прикладных проблем современной криобиологии в Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР, а также в других учреждениях, разрабатывающих методы низкотемпературного консервирования биологических объектов. Особое место занимают вопросы механизмов криоповреждения биологических структур на разных уровнях организации после низкотемпературного воздействия, вопросы химии криопротекторов и криопротекции макромолекул и клеток, а также некоторые аспекты криоиммунологии. Описаны методы низкотемпературного консервирования биологических объектов и перспективы развития этой проблемы в связи с использованием новой криогенной аппаратуры и приборов.

Представляет интерес для криобиологов, биофизиков, физиологов, хирургов и других специалистов, работающих в области анабиоза и низкотемпературного консервирования биологических объектов.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Н. С. Пушкарь (*отв. редактор*), А. М. Белоус (*зам. отв. редактора*), Ф. И. Осташко (*зам. отв. редактора*), Г. С. Лобынцева (*отв. секретарь*), М. И. Шраго, В. И. Луговой, В. А. Моисеев, М. Г. Шенберг, В. И. Митасов

Редакция физиологии, биохимии и медицины

КРИОБИОЛОГИЯ И КРИОМЕДИЦИНА, 1

Печатается по постановлению ученого совета Института проблем криобиологии и криомедицины АН УССР

Редактор *В. И. Середа.* Художественный редактор *Р. И. Кальян.* Оформление художника *Р. Ф. Липатова.* Технический редактор *И. А. Ратнер.* Корректоры *З. П. Школьник, Л. М. Тищенко*

Сдано в набор 18. XI 1974 г. Подписано к печати 14. IV 1975 г. БФ 02568. Зак. 3052. Изд. № 103. Тираж 1200. Бумага № 1, 70×108¹/₁₆. Усл. печ. листов 14,7. Учетно-изд. листов 15.27. Цена 1 руб. 53 коп.

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

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

К $\frac{50500-218}{M221(04)-75}$ 319—75

© Издательство «Наукова думка», 1975 г.

Матеріал, захищений авторським правом

О НЕКОТОРЫХ ДОСТИЖЕНИЯХ И ПРОБЛЕМАХ КРИОБИОЛОГИИ И КРИОМЕДИЦИНЫ

Н. С. Пушкарь

В последние годы достигнуты значительные успехи в изучении физики низких температур, положившие начало широкому применению криогеники в сельском хозяйстве, пищевой промышленности и ряде других областей.

Использование низких температур в биологии и медицине привело к возникновению нового научного направления — криобиологии. Это направление в настоящее время привлекает все большее внимание биологов, медиков, физиков, биофизиков, химиков и других специалистов.

Современная криобиология призвана решать такие важные проблемы, как раскрытие механизмов холодового анабиоза и холодоустойчивости животных и растений, генетические и иммунногенетические эффекты низких температур, повреждение и защита клеток от холода, разработка и внедрение в практику высокоэффективных методов глубокого охлаждения и долгосрочного хранения тканей и органов.

Максимальное сохранение функциональной способности тканей и органов при низкотемпературной консервации в настоящее время является первостепенной задачей. Эти вопросы могут быть решены лишь на основе всестороннего исследования действия низких температур на клетку, новых методических подходов, что позволит ближе подойти к пониманию основных процессов, протекающих в живых биологических объектах в условиях глубокого холода.

В настоящее время принято считать, что возникающие при замораживании биологических систем фазовые превращения и концентрационные градиенты приводят к появлению следующих процессов:

1) разрушению биологических мембран при температурах от 0 до —11° С* — «температурный шок»;

2) кристаллизации внутри- и внеклеточной воды при фазовом переходе, вызывающей механические разрушения клеток;

3) росту кристаллов льда и повышению концентрации электролитов в оставшейся жидкой фазе, что приводит к денатурации белков;

4) потере «структурированной» воды биомакромолекулами и необратимым изменениям биоструктур (дегидратация);

5) рекристаллизации, приводящей к механическим разрушениям клеток, при хранении биологических объектов в условиях температур выше 140° К;

6) изменению морфо-функциональной структуры клеток вследствие обменных процессов, идущих при длительном хранении биологических объектов даже в зоне низких температур.

В связи с тем, что в современной криобиологии остается много нерешенных вопросов, связанных с действием на клетку вышеуказанных

---

* Дальше по всему сборнику температура приведена в градусах Цельсия, кроме специально указанных случаев.

Матеріал, захищений авторським правом

криоповреждающих факторов, следует особое внимание уделить изучению физико-химических процессов, происходящих в биологических средах, клетках и тканях при глубоком охлаждении и отогреве, что позволит научно обосновать методы низкотемпературной консервации биологических объектов.

Проведение биофизических исследований предполагает: а) экспериментальное установление эффективных физических констант: теплопроводности, электропроводности, теплоемкости, температуропроводности, диэлектрической постоянной и т. п.; б) экспериментальное изучение кинетических характеристик процессов кристаллизации, рекристаллизации, плавления, процессов диффузии, вязкости, проницаемости мембран и связи ее с биоэлектрическими потенциалами и поверхностными зарядами клеток; в) исследование структуры внутриклеточных компонентов методами оптической и электронной микроскопии, методами рентгено-, электронографии и методом дифракции медленных нейтронов; г) спектроскопические исследования биологических объектов методами оптической спектроскопии в ультрафиолетовой и инфракрасной областях спектра и методами электронного парамагнитного и ядерного резонанса; д) исследование влияния ультразвуковых и других видов энергии различной частоты и интенсивности на жизнеспособность клеток, тканей и органов.

Такой всесторонний подход к проблеме позволит на основе изучения физических и биологических свойств биоструктур после замораживания-оттаивания понять основные механизмы, лежащие в основе повреждений, вызванных действием низких температур.

Выяснение механизмов холодового гипо- и анабиоза, низкотемпературных адаптаций имеет первостепенное значение для понимания основ жизнедеятельности организмов и организации их взаимоотношений с окружающей средой. Познание биологических закономерностей существования организмов в условиях низких температур позволит направленно воздействовать на биологические объекты с целью повышения их холодоустойчивости.

За рубежом, особенно в США, Японии, Франции, Канаде решению этих вопросов придается большое значение. Созданы институты, отделы по изучению низкотемпературных адаптаций, холодового анабиоза. Организуются постоянно действующие станции и экспедиции. Уже более 15 лет в Париже функционирует Центр гибернотерапии, в котором под руководством профессора Лабори разрабатываются экспериментальные модели гипотермии и гибернотерапии. По прогнозам ряда зарубежных организаций, к 80—90-му году предвидится создание автоматизированных систем управляемого гипобиоза для использования этого состояния в медицине и космических целях. Конечной задачей в этом направлении является создание экспериментальной модели анабиотического состояния у высших животных.

Значительное место в решении ряда фундаментальных вопросов криобиологии занимают биохимические исследования. Первостепенное значение имеет изучение функционального и структурного состояния биологических мембран и белоксинтезирующей системы клеток тканей, подвергнутых действию низких температур, поскольку интенсивность и обратимость этих повреждений играют существенную роль в жизнеспособности тканей после их реконсервации. Вместе с тем, степень криочувствительности компонентов ядра клеток до настоящего времени во многом остается неясной. Не меньший интерес представляют криобиологические исследования системы трансляции белкового синтеза. Не ясно, остаются полисомы и их субъединицы в неизменном виде в клетке или они подвергаются необратимой криоденатурации. В связи с криобиохимическими исследованиями ядерных цитоплазматических структур несомненный интерес представляют проблемы, связанные

Матеріал, захищений авторським правом

с выяснением молекулярного и клеточного взаимодействия разного рода криопротекторов с ДНК и полисомами.

В настоящее время установлено, что при замораживании повреждается дыхательная цепь и угнетается фосфорилирующая активность митохондрий, однако остается много нерешенных вопросов, касающихся повреждений энергетических систем этих органелл. Не исследовано также, какой из факторов замораживания является наиболее повреждающим. Поэтому следует признать весьма актуальным исследование структуры и функции различных биомембран, на которых локализованы разнообразные полиферментные комплексы. Исследование ферментных процессов в условиях действия низких температур имеет большое теоретическое и прикладное значение в связи с широким развитием в последнее время вопросов низкотемпературной консервации клеток, тканей и органов в целях последующей их трансплантации.

В связи с этим представляется весьма своевременным предпринять углубленные и всесторонние энзимологические исследования различных биологических объектов клеток крови, отдельных органов и тканей, простейших бактерий и т. п. с целью выяснения первичных механизмов криолитической дегидратации и разработки оптимальных методов криозащиты и сохранности структур при низких температурах. Поиск эффективных криофилактиков, разработка методов низкотемпературного консервирования органов и тканей позволит создать банк тканей и органов долгосрочного хранения биологических объектов, необходимых для клинической трансплантации.

Решение проблемы трансплантации даст возможность продлить период активной профессиональной деятельности современного человека, что будет иметь важный экономический эффект (затраты на образование, профессиональное мастерство, накопление опыта начинают «окупаться» после 40—45-летнего возраста работающего).

Долгосрочного хранения биологических объектов можно достичь погружением их в состояние анабиоза, при котором обменные процессы в тканях резко подавлены, а энергетические затраты практически сведены к нулю. Долгосрочное хранение органов и тканей с созданием запасов их для нужд реконструктивной хирургии мирного и военного времени может быть обеспечено при глубоком замораживании до —196° и —269°.

Остаются невыясненными особенности приживления и функция трансплантата, консервированного замораживанием, в различные сроки после пересадки его в организм реципиента. Генетические, иммунологические и патофизиологические аспекты этой проблемы изучены в недостаточной степени и требуют своего решения.

Материалы отечественной и зарубежной литературы показывают, что в настоящее время предпринимаются попытки использования низких температур в лечебных целях для разъединения и деструкции тканей в хирургии и в качестве местного терапевтического фактора.

В гинекологии криотерапевтические методы применяются для борьбы с маточными кровотечениями, для лечения эрозий и новообразований; в урологии низкие температуры используются для криодеструкции аденом предстательной железы; в стоматологии криопрепараты применяются для лечения пульпитов. Весьма перспективно лечение холодом лейкоплакий и доброкачественных опухолей. Широкое применение находят криотерапевтические методы в офтальмологии (лечение язвенных и герпетических кератитов, глаукомы, отслойки сетчатки, криоэкстракция катаракты).

Заманчивой кажется перспектива использования низких температур как лечебного фактора при местном воздействии на патологический очаг. В комбинации с лекарственными веществами холод уже нашел применение (аэрозоли с анестетиками) в спортивной медицине.

Матеріал, захищений авторським правом

Успешное развитие трансплантологии, создание банков органов и тканей определяет необходимость проведения фундаментальных исследований механизмов трансплантационного иммунитета применительно к пересадкам реконсервированных объектов. Исследования, направленные на изучение клеточных, гуморальных и молекулярных факторов трансплантационного иммунитета в системе взаимодействия трансплантат-хозяин проводятся в США, Франции, Нидерландах, а в нашей стране — учеными Москвы, Ленинграда, Киева. Особое внимание уделяется совершенствованию и разработке новых методов тканевого типирования на основе внедрения микрометодов, а также использованию консервированных при низких температурах типовых лимфоцитов.

Учитывая, что успех трансплантации определяется антигенным спектром трансплантируемой ткани, проводятся работы по изучению характера изменений антигенных спектров консервируемых тканей, клеток, структурных элементов клетки и специфических белков (ферментов, иммунных глобулинов, альбуминов и др.). В некоторых работах отмечено антигенное упрощение реконсервированной ткани, хранившейся в течение длительного времени при низких температурах.

Исследуется также механизм воздействия различных физико-химических факторов на антигенный спектр трансплантата с целью снижения их антигенности. Поскольку до настоящего времени проблемы подбора совместимых тканей для их трансплантации окончательно не решены, продолжаются поиски и разрабатываются методы высокоэффективной и направленной иммунодепрессии. В последнее время, в связи с развитием криохирургии, наметилось новое направление в криоиммунологии — криоиммунотерапия, которая нашла широкое применение в онкологической практике при лечении злокачественных образований определенных локализаций.

Необходимо направить внимание специалистов на решение основных проблем криоиммунологии. От этого зависят более глубокое изучение процессов и явлений на уровне антигенных структур консервируемых объектов, исследование механизмов трансплантационного иммунитета применительно к трансплантации реконсервированной ткани, поиски методов преодоления тканевой несовместимости и повышение эффективности трансплантаций в клинике.

Низкотемпературная консервация биологических структур в настоящее время основана на использовании криопротектантов. Несмотря на ведущийся у нас в стране и за рубежом поиск физических средств защиты, дальнейшее развитие метода низкотемпературной консервации будет происходить, очевидно, на прежней основе, а использование физических методов криозащиты послужит дополнительным средством повышения эффективности применяемых криопротектантов. Все это позволит решить проблему холодового анабиоза для отдельных органов и, возможно, целых организмов.

Развитие метода низкотемпературной консервации биологических объектов неразрывно связано с совершенствованием криофилактиков. На смену глицерину, нашедшему широкое применение, но обладающему рядом недостатков: токсичностью, необходимостью удалять его из биологических структур после размораживания и т. п., были предложены новые криофилактики. Некоторые из них — ДМСО, ПВП применяются ограниченно, они не смогли заменить глицерин, ибо обладают определенными недостатками. Более 60 химических соединений апробированы в условиях биологического эксперимента, но не нашли практического применения. Тем не менее, изучение физико-химических свойств разнообразных веществ, обладающих криозащитным действием, обусловило переход от эмпирического подхода в выборе криофилактиков к целенаправленному синтезу новых ограждающих агентов.

Матеріал, захищений авторським правом

Как известно, вещества, обладающие криозащитным эффектом, принадлежат в основном к четырем основным классам химических соединений — соли, спирты, сахара, амино- и амидопроизводные. Причем большая часть их относится к многоатомным спиртам (сорбит, маннит и др.). В качестве криопротекторов хорошо зарекомендовали себя также производные окиси этилена.

За рубежом осуществлен синтез оксиэтилированных производных сорбитанмонопальмитата (твин-40), сорбитанмоноолеата (твин-80) и полиэтиленоксида. Попытка применить эти соединения в качестве криофилактика дала отрицательные результаты. Установлено, что указанные выше оксиэтилированные производные, относящиеся к поверхностноактивным веществам, могут применяться в небольших количествах только как добавки к основному криофилактику с целью снижения его токсического действия. При замораживании эритроцитов за рубежом используют оксиэтилированный крахмал, а в нашей стране продукты оксиэтилирования двухатомного спирта этиленгликоля — полиэтиленоксиды (ПЭО). Было установлено, что ПЭО различного молекулярного веса по-разному влияет на различные ткани. Под защитой этого криофилактика различной степени полимеризации успешно проведено низкотемпературное консервирование крови, костного мозга, роговицы, кожи и других биологических объектов. ПЭО с успехом заменил глицерин, поскольку указанный выше полимер не токсичен и отсутствует необходимость его удаления из размороженных биологических структур. Высокая криофилактическая эффективность ПЭО послужила основанием для синтеза новых производных многоатомных спиртов и производных окиси этилена.

Службы заготовки и консервации трупных органов и тканей в СССР получили юридические и нормативные основы с изданием приказа МЗ СССР от 6. V 1959 г. о создании этой службы на базе станций переливания крови и институтов ортопедического профиля. Первоочередной задачей ставилась разработка на научной основе способов длительного сохранения биологических объектов для обеспечения потребностей лечебных учреждений. Перспективной задачей определялось создание банков тканей и органов в крупных городах и республиках Советского Союза.

До настоящего времени остаются нерешенными многие вопросы, связанные с донорством, в частности медико-биологические, морально-этические, судебно-медицинские, юридические и другие аспекты. К этому тесно примыкает не менее сложная проблема — установление факта смерти, для решения которой необходимо привлечь специалистов разного профиля — патофизиологов, морфологов, судебномедицинских работников и др.

Исследования в этой области должны быть комплексными и проводиться с использованием новейшей аппаратуры, позволяющей регистрировать тонкие поствитальные процессы в организме человека. Сложной задачей является разработка анатомо-топографических особенностей техники взятия трупных органов и тканей.

Создание и усовершенствование новых методов долгосрочной консервации биологических объектов (кровь, костный мозг, сыворотки, кожа, роговица, бактерии, почки, эндокринные органы и т. п.) позволит улучшить результаты трансплантаций в лечебной практике.

Успешное проведение указанных выше исследований возможно лишь при наличии высокоразвитой современной материально-технической базы, позволяющей, наряду с использованием традиционных методов морфологии, биохимии и физиологии, применять такие современные физические методы, как ядерномагнитный и электронный парамагнитный резонанс, рентгеноструктурный анализ, кристаллографию, дифференциальную калориметрию, новейшую вычислительную технику.

Матеріал, захищений авторським правом

Из приведенных выше кратких данных видно, что криобиология, являющаяся сравнительно молодой отраслью науки, ставит перед собой важные проблемы, имеющие большое значение для практической медицины и биологии.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ СОВРЕМЕННОЙ КРИОБИОХИМИИ

А. М. Белоус, В. И. Луговой, А. К. Гулевский

Достижения современной криобиологии позволили в настоящее время подойти к решению проблемы низкотемпературного консервирования крови и ее компонентов, костного мозга, роговицы и других тканей. Для успешного решения этой задачи необходимы широкие экспериментально-теоретические исследования, направленные на раскрытие механизмов криоповреждений и криопротекции различных биологических объектов. Накопленные феноменологические знания в настоящее время являются уже недостаточными для решения ряда перспективных проблем биологии низких температур, в частности, для разработки экспериментальных подходов к вопросу низкотемпературного хранения в функционально полноценном состоянии ряда жизненно важных органов, которые могут быть использованы для трансплантации. В связи с этим в последние годы возрос интерес к экспериментальным исследованиям по изучению механизма изменений, которые возникают в органах и тканях на молекулярном, субклеточном и клеточном уровнях в условиях действия низких температур и применения различных криопротекторов. В настоящем обзоре сделана попытка осветить состояние криобиохимических исследований в области ферментологии, биохимии митохондрий и биохимии белоксинтезирующего аппарата клетки.

КРИОБИОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМ

В серии работ, вышедших из лаборатории Левитта [28, 29, 30], было показано, что устойчивость различных энзимов животного и растительного происхождения существенно зависит от содержания в белковой молекуле связей —S=S— и —SH—. Стабильность ферментных белков во многом определяется количеством внутримолекулярных дисульфидных связей, обеспечивающих довольно прочную макромолекулярную конформацию, мало изменяющуюся под влиянием замораживания. С другой стороны, ферменты, содержащие в своем составе SH-группы, более чувствительны к криолизу вследствие окисления сульфгидрильных групп. Это приводит к потере их каталитической активности и возникновению в определенных условиях дисульфидных внутримолекулярных и межмолекулярных сшивок. Необходимо отметить, что сульфгидрильная теория криоповреждений белков, разработанная Левиттом и сотр. [29, 30], получила достаточно убедительное подтверждение в опытах с модельной системой тиогеля, очищенных ферментов и т. п. [48].

Помимо различных модификационных изменений сульфгидрильных групп, в механизме криоповреждений различных каталитических белков важную роль играют и другие структурные изменения. В исследованиях Чилсона и соавт. [13] была показана возможность значительных внутримолекулярных перестроек при замораживании-оттаивании энзимов, имеющих субъединичную четвертичную структуру. На приме-

Матеріал, захищений авторським правом

ре очищенных изоэнзимов лактатдегидрогеназы авторы обнаружили диссоциацию нативной молекулы фермента на составляющие ее субъединицы с последующей рекомбинацией их и образованием гибридных молекул лактатдегидрогеназы. Факт гибридизации изоэнзимов лактатдегидрогеназы в условиях замораживания был установлен ранее Маркертом [34], хотя детальный механизм этого процесса не был исследован. Чилсон и сотрудники полагают, что явление низкотемпературной гибридизации молекулярных форм лактатдегидрогеназы обусловлено разрывом стабилизирующих внутримолекулярных водородных связей; разрыв сопровождается нарушением нативной конформации энзима. При исследовании конформационных изменений в процессе замораживания двух каталитических белков, имеющих различную исходную конформацию — каталазы и миозина мышц — было установлено, что каталаза, имеющая глобулярную структуру, более устойчива, чем фибриллярный миозин, к повреждающему действию замораживания. Потеря каталитической активности миозина обусловлена нарушением его регулярной спиральной конформации вследствие вымораживания сольватной воды, стабилизирующей вторичную структуру этого белка [18, 43].

Подтверждением важного значения конформационных изменений различных каталитических белков в процессе низкотемпературного воздействия являются также исследования кинетических характеристик ферментативных реакций в замороженных или переохлажденных системах. На примере реакций, катализируемых липазой, фосфатазой, пероксидазой, было показано, что кинетические параметры этих реакций при низких температурах отличаются от классических значений, полученных для обычных температур [33, 47, 50].

Следовательно, криоповреждения каталитических белков могут локализоваться на различном уровне организации весьма сложной ферментной молекулы. Вместе с тем остается неясным состояние активных и аллостерических центров ферментов, а также другие особенности модификационных изменений функциональных групп белка и способов их защиты от неблагоприятного влияния различных факторов низкотемпературного воздействия. В связи с этим представляется целесообразным дальнейшее более глубокое изучение структуры белков при низких температурах с использованием современных спектроскопических и аналитических методов исследования.

Данные о действии низких температур на ферменты, которые входят в состав различных биологических объектов, весьма противоречивы. Существует мнение, что такие энзимы менее чувствительны к повреждающему действию замораживания-оттаивания, чем чистые ферменты. Так, Хебер [19] после замораживания листьев пшеницы не обнаружил изменения активности каталазы, декарбоксилазы глутаминовой кислоты, дегидрогеназы молочной кислоты, глутаматщавелевоуксусной трансаминазы, фосфоглюкоизомеразы. Такое явление, по-видимому, следует объяснять наличием в клеточном содержимом ряда нейтральных веществ-метаболитов, коэнзимов, которые в какой-то мере предохраняют белковые молекулы от неблагоприятного влияния холода [20, 21, 22].

С другой стороны, имеются сведения о значительных изменениях активности ферментов в животных тканях под влиянием замораживания-оттаивания. В опытах Кана и соавт. [26] по замораживанию миофибрилл цыпленка было обнаружено выраженное падение АТФазной активности миозина, уменьшение количества SH-групп в белках мышц. Исследование стабильности многих ферментов в плазме крови при хранении ее при различных температурах, в том числе при —20°, выявило удовлетворительную сохраннюсть активности ацетилхолинэстеразы, псевдохолинэстеразы, трансаминаз, фосфатаз, тогда как лактатдегидро-

Матеріал, захищений авторським правом

геназа теряла активность [25]. Снижение активности лактатдегидрогеназы плазмы крови и в перфузатах почки, которые хранились при температуре —196°, происходило за счет инактивации 4-й и 5-й изоэнзимных фракций [12, 27]. После замораживания-оттаивания эритроцитов Старквизер и соавт. [49] обнаружили значительное снижение в клетках активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, глутатионредуктазы, 4-го изоэнзима лактатдегидрогеназы, нарушение аллостерического центра фосфофруктокиназы в отношении активирующего эффекта АТФ.

Таким образом, в составе различных тканей и биологических сред многие ферменты оказываются достаточно чувствительными к действию низких температур. В связи с этим представляется важным развитие подобного рода ферментологических исследований в прикладном аспекте для биохимического тестирования жизнеспособности различных клеток и тканей после низкотемпературной их консервации. Существенный интерес должны представлять прежде всего ферменты, которые выполняют функцию «ключевых» энзимов и одновременно, как правило, функцию аллостерических регуляторов отдельных участков метаболизма клетки. К указанным ферментам можно отнести гексокиназу, фосфорилазу, фосфофруктокиназу, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу, транскетолазу, изоцитратдегидрогеназу и др.

Представляется также весьма целесообразным изучение криочувствительности отдельных изоэнзимных форм ферментов, которые могут быть наиболее уязвимыми при замораживании-оттаивании клеток и тканей. Возможно, выключение из метаболических систем отдельных изоэнзимных форм фермента в результате криолитической их деградации существенным образом влияет на тонкую регулировку и адаптацию обменных циклов, что в условиях действия низких температур может иметь решающее значение для выживания клетки.

Существенный интерес представляют исследования, которые посвящены выяснению влияния низких температур на структурно-функциональное состояние ферментов, связанных с различными клеточными органеллами.

В криобиологической литературе наиболее полно освещен этот вопрос главным образом в отношении ферментов, ассоциированных с лизосомальными мембранами. Это объясняется тем, что нарушение лизосомных мембран является довольно ранней реакцией на различные повреждающие воздействия, в том числе и низких температур, в связи с чем уровень активности лизосомных ферментов — рибонуклеазы, дезоксирибонуклеазы, фосфатазы, катепсинов и др. — может быть достаточно объективным показателем характера и глубины возникающих повреждений. Латентность лизосомальных энзимов и их активация в результате замораживания и оттаивания впервые исследованы Де Дюв и сотр. [11, 14], а затем и в других лабораториях [50]. Бендалл и соавт. [11] установили, что в результате 5-кратного цикла замораживания-оттаивания смеси митохондрий и лизосом наблюдается почти полное освобождение из лизосом кислой фосфатазы, тогда как митохондриальные ферменты активируются незначительно. После 10-кратного цикла замораживания-оттаивания фракции лизосом β-глюкуронидаза и арилсульфатаза оказались солюбилизированными на 100%, рибонуклеаза — на 73%, кислая фосфатаза — на 55%. После солюбилизации лизосомные энзимы инициируют каталитические реакции гидролиза различных субстратов, в результате чего может довольно быстро возникать явление метаболической и структурной дезинтеграции клетки [50]. Под действием гидролаз происходит разобщение митохондриального окислительного фосфорилирования. Уже через 30 *мин* после контакта митохондрий с разрушенными лизосомами деструкция митохондриальных мембран достигает 20%, а через 3 *ч* — 40%. Подобному разру-

Матеріал, захищений авторським правом

лающему действию подвергаются также микросомальная и ядерная мембраны.

Таким образом, лабилизация лизосомальных гидролаз под действием низких температур вызывает значительные структурно-функциональные изменения в клетке, которые в некоторой степени могут быть предупреждены при использовании стабилизаторов и криопротекторов — глицерина, диметилсульфоксида, сахарозы.

Было показано, что применение глицерина, диметилсульфоксида в сочетании с такими веществами, как гидрокортизон, ацетилсалициловая кислота, хлороквин, трипан-блау, оказывает стабилизирующее влияние на лизосомы клеток костного мозга при их замораживании [36, 37, 38]. Однако до настоящего времени не имеется еще достаточно эффективного стабилизирующего агента, способного предупредить лабилизацию большинства лизосомальных гидролаз. Поэтому поиски оптимальных мер защиты лизосомальных мембран представляются в настоящее время одним из наиболее актуальных направлений в области энзимологии и биохимии низких температур.

СТРУКТУРНАЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ЦЕЛОСТНОСТЬ МЕМБРАННЫХ СТРУКТУР ПОСЛЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ

Согласно современным представлениям, митохондрии очень чувствительны к различного рода альтерирующим воздействиям [3], в частности, к замораживанию, которое может вызвать глубокие повреждения структурной и функциональной интеграции митохондрий.

Электронномикроскопические исследования замороженных клеток HeLa и клеток саркомы 37 до температуры —79° показали, что после такого воздействия обычно остается очень мало неповрежденных клеток даже в присутствии глицерина. Наблюдающиеся при этом набухание, разрывы митохондрий и эндоплазматического ретикулума, очевидно, не совместимы с выживанием [53].

При замораживании срезов печени также происходят разрывы мембран, нарушение внутренней структуры митохондрий. Однако глицерин и ДМСО в значительной степени предотвращают эти повреждения клеток в составе срезов тканей [51].

Наиболее разрушительным для митохондрий является замораживание и последующее хранение при температуре —15°, когда наблюдается быстрый выход митохондриальных ферментов. Лузена [32] считает, что эти повреждения в митохондриях являются следствием повышения концентрации солей и органических соединений в клетке из-за вымораживания из нее воды. Кроме того, сами по себе криофилактики также изменяют проницаемость внутренней мембраны митохондрий, вследствие чего они могут проникать во внутреннее пространство этих органелл.

По мнению Лузена [32], глицерин вызывает значительно большие повреждения структуры митохондрий, чем ДМСО. Согласно этим данным после обработки митохондрий ДМСО выход из них ферментов значительно меньше, чем после применения глицерина.

Вместе с тем в работах Шермана [44, 45, 46] также показано, что замораживание суспензии митохондрий при температуре —50° приводит к полному разобщению дыхания и окислительного фосфорилирования независимо от присутствия ДМСО. В то же время ДМСО хорошо предохраняет митохондрии печени крысы при замораживании до —25°. Однако автор отмечает, что уже в 10%-ной концентрации ДМСО токсичен. Добавление НАД, цитохрома С и АТФ к суспензии митохондрий после оттаивания вызывало в значительной степени восстановление их дыхательной активности. Применение глицерина и гликолей способствовало инактивации некоторых митохондриальных энзимов.

Матеріал, захищений авторським правом

Оказалось, что некоторое криозащитное действие на механизм окислительного фосфорилирования оказывали субстраты окисления, причем наиболее убедительно это было показано на митохондриях почки кролика [31, 39]. Например, добавление в суспензию замораживаемых митохондрий изоцитрата натрия практически сохраняет дыхательную активность этих органелл после оттаивания. ДМСО в 5%-ной концентрации также хорошо предохраняет сукцинат-цитохром-С-редуктазный комплекс от инактивации замораживанием [16].

Проводя ряд параллелей между криочувствительностью клеток и митохондрий, Грейф и соавт. [17] пришли к выводу, что глицерин и другие криопротекторы сохраняют жизнеспособность клеток только потому, что они предохраняют митохондрии от криолиза. Однако Уолтон и соавт. [52] отмечают, что глицерин защищает митохондрии печени крысы от повреждающего действия замораживания, однако он ингибирует их дыхательную активность. Торможение, очевидно, обусловлено присутствием ионов тяжелых металлов, которые содержатся в глицерине в виде примесей и способны образовывать комплексы. ДМСО также токсичен для митохондрий, однако обработка его на ионообменнике и включение в среду 1%-ного бычьего сывороточного альбумина (БСА) снижает эти свойства. Замораживание митохондрий, суспендированных в изотоническом растворе маннита и сахарозы, содержащем 10% ДМСО и 1% БСА, до температуры жидкого азота и последующее оттаивание позволяло сохранять высокий уровень их дыхательного контроля даже после двух месяцев хранения.

Повреждающее действие замораживания на механизмы аккумуляции энергии показано также на митохондриях и хлоропластах растений.

Замораживание хлоропластов и митохондрий [9] до —25° вызывает разобщение окислительного фосфорилирования и транспорта электронов. Предполагают, что сопрягающий фактор хлоропластов весьма лабилен и повреждается замораживанием, в результате чего происходит разобщение транспорта электронов и процесса фосфорилирования [21].

Таким образом, как видно из приведенных работ, механизм трансформации энергии в митохондриях и хлоропластах весьма чувствителен к замораживанию, причем повреждения митохондрий наблюдаются как при замораживании их в изолированном виде, так и при замораживании целых органов или срезов.

Детальное изучение механизмов этих процессов при низких температурах позволит более четко обосновать способ защиты этих структур клеток при их низкотемпературном хранении.

ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР НА СОСТОЯНИЕ БЕЛОКСИНТЕЗИРУЮЩЕГО АППАРАТА КЛЕТКИ

Изучение структурно-функционального состояния белоксинтезирующего аппарата клеток органов и тканей при низкотемпературной консервации является также одной из важнейших задач криобиохимии. Решение ее позволит, с одной стороны, оценить степень жизнеспособности консервируемых клеток и способность их к регенерации полученных повреждений, а с другой — получить информацию о полноценности синтезируемых нуклеиновых кислот и белков и возможных механизмах криоповреждений этих макромолекул. К настоящему времени особенности синтеза нуклеиновых кислот и белков, структурно-функциональное состояние отдельных звеньев белоксинтезирующего аппарата (ДНП, РНП, полирибосом и др.) изучены в недостаточной степени. По данным В. Н. Лысцова и соавт. [4, 5, 6], однократное замораживание-оттаивание ДНК не изменяет ее структурно-функциональных свойств, связанных с характеристической вязкостью, седиментационным анализом и биологической активностью. Однако при многократном замораживании-

Матеріал, захищений авторським правом

оттаивании препарата отмечалось увеличение полидисперсности ДНК, что объясняется в основном механическим крекингом участков ДНК, попадающих в область трещин льда. Электронно-микроскопические исследования подтвердили, что при этом происходят разрывы обеих цепей ДНК. Сходные результаты получены Эшвуд-Смит и соавт. [10], которые, использовав метод ультрацентрифугирования, показали, что ДНК при однократном замораживании-оттаивании сохраняется. Таким образом, изолированная ДНК при однократном замораживании-оттаивании практически полностью сохраняет свои структурно-функциональные свойства и биологическую активность. Однако это не снимает вопроса об изучении состояния ДНК в клетках, поскольку многими исследователями установлено, что после низкотемпературной консервации синтез ДНК существенно снижается. Так, например, Ферреби и соавт. [15] еще в 1957 г. выявили, что в клетках костного мозга, подвергшихся низкотемпературной консервации, включение C^{14}-тимидина в ДНК снижается почти в 90 раз. Применение в качестве криофилактика 15%-ного и 30%-ного глицерина несколько улучшало результат, однако не приводило к полному восстановлению синтеза ДНК.

Аналогичные результаты получены в последнее время Мозиманом и соавт. [35], которые показали, что применение глицерина при замораживании клеток печени нормализует синтез ДНК лишь наполовину по отношению к контролю. Применение других криофилактиков, в частности, ДМСО и, особенно, ПВП, оказалось менее эффективным. В работах Хандерсона [24] сообщается об угнетении включения C^{14}-тимидина в ДНК срезов селезенки и благоприятном влиянии на этот процесс 30%-ного ДМСО. К сожалению, все названные выше авторы, изучая синтез ДНК с помощью C^{14}-тимидина, не исследовали одновременно пула предшественника, и это, естественно, порождает некоторые сомнения в правильности интерпретации полученных данных. Особый интерес вызывают исследования структуры и функции ДНП-комплекса, ответственного, как известно, за качество и количество информации, поступающей из ядра в цитоплазму. Однако сведения о состоянии ДНП в составе изолированных тканей отсутствуют. В частности, по данным Хеноха и соавт. [8], после одночасового пребывания 0,062%-ного раствора ДНП в 0,8 М растворе хлористого натрия и замораживания до —10, —30, —50, —78, —196° с последующим отогреванием при комнатной температуре выпадал осадок ДНП с молекулярным весом, сниженным на 23—30%. Исходя из этого, авторы сделали вывод, что основной причиной падения молекулярного веса был переход ДНП из жидкой фазы в твердую.

Одновременно в результате криолиза повышалась характеристическая вязкость растворов ДНП, изменялась асимметрия молекул. Спектр поглощения ДНП при этом не изменялся и в растворе после замораживания-оттаивания свободная ДНК не обнаруживалась. Исследование функциональных свойств ДНП в составе изолированных ядер показало, что применение 30%-ного глицерина позволяет сохранять их матричную активность в течение 3 месяцев хранения при температуре —60° [1]. Сходные данные получены также К. Г. Газарян и соавт. [2].

По данным Вейсса и соавт. [53], при замораживании клеток до —79° в растворе Хэнкса наблюдается отслоение ядерной оболочки, хроматин ядра компактизируется в бесформенные комочки. После предварительной обработки глицерином эти явления в ядре не наступали. По-видимому, основным повреждающим моментом для изолированных ядер является разрыв ядерной оболочки. Показано, что после замораживания до —70° включение срезами селезенки C^{14}-аденина угнетается, а применение 30%-ного ДМСО не приводит к полной его нормализации. Кроме того, при замораживании тканей и клеточных структур происходит нарушение полимерности макромолекул. Хайяши и соавт.

Матеріал, захищений авторським правом

[23] выяснили, что при замораживании-оттаивании ядер печени наблюдается потеря полимерности молекул РНК, особенно фракций с коэффициентом седиментации 45 S и 35 S. Это связано, очевидно, с повышением активности РНКаз в ядрах клеток. В то же время замораживание-оттаивание изолированных тРНК, как и ДНК, не изменяет их структурно-функциональные свойства. По-видимому, весьма чувствительными к действию низких температур являются также РНП-частицы, клетки-информосомы, информоферы, рибосомы. Это следует из работы Кокварелли и соавт. [41], которые показали, что изометрический РНК-содержащий вирус желтой мозаики, представляющий РНП-частицу, разрушается, если инфицированные вирусом растительные ткани или очищенную суспензию вирусов заморозить и оттаять. Очищенные вирусные суспензии после хранения при температуре —25° также почти полностью распадаются на нуклеиновые кислоты и белковые оболочки. При температурах —78° и —196° этот распад идет медленнее. Степень этого процесса зависит также от химического состава среды, в которой суспендированы вирусы. Добавление ацетата натрия и NaCl защищает вирусы от разрушения при замораживании.

Повреждающее действие замораживания-оттаивания на РНП-частицы обнаружено и в опытах Л. Е. Стефановича и соавт. [7], которые исследовали действие низких температур на рибосомы. Авторы показали, что рибосомы, хранившиеся при —4° без глицерина, за 80 дней инактивировались на 80%, в то время как применение глицерина в концентрации 15 и 30% полностью сохраняло их функциональную активность.

Таким образом, можно отметить относительную устойчивость изолированных РНК и ДНК, в то время как комплексы их с белками чрезвычайно чувствительны к низким температурам. В основе такой повышенной чувствительности, вероятно, лежит денатурация белковых компонентов. Поэтому дальнейшие усилия должны быть направлены на изучение структурно-функционального состояния нуклеопротеидов, на расшифровку механизмов диссоциации комплекса ДНП и полисом, изучение денатурации белковых компонентов, а также возможных последствий этих нарушений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Адлер В. В., Поверенный А. М., Подгородниченко В. К., Шапот В. С. — Мол. биол., 1973, 7, 203.
2. Газарян К. Г., Ананьянц Т. Г., Федина А. Б., Андреева Н. Б. — Мол. биол., 1973, 7, 27.
3. Кондрашова М. Н. — В кн.: Свойства и функция макромолекул и макромолекулярных систем. М., «Наука», 1969, 135.
4. Лысцов В. Н., Копанкина Е. А., Малышева Л. Ф., Мошковский Ю. Ш. — Биофизика, 1966, 11, 726.
5. Лысцов В. Н., Франк-Каменецкий Д. А., Щедрина М. В. — Биофизика, 1965, 10, 105.
6. Лысцов В. Н., Мошковский Ю. Ш. — Биофизика, 1969, 14, 219.
7. Стефанович Л. Е., Севастьянов А. П., Костякина Т. В. — Изв. Сиб. отд. АН СССР, сер. биол., 1972, 10, 122.
8. Хенох М. А., Лапинская Е. М., Першина В. Н., Евдокимов В. Ф. — В кн.: Реакция клеток и их белковых компонентов на экстремальные воздействия. М.—Л., «Наука», 1966, 11.
9. Хебер У. — В кн.: Клетка и температура среды. М., «Наука», 1964, 23.
10. Ashwood-Smith M., Trevino J., Warby C. — Cryobiology, 1972, 9, 141.
11. Bendall D. S., de Duve C. — Biochem. J., 1960, 74, 444.
12. Carter J. E. et al. — Cryobiology, 1970, 7, 533.
13. Chilsson O. P., Costello L. A., Kaplan N. O. — Fed. Proc., 1965, 24, 55.
14. De Duve C. — In: Subcellular Particles. N. Y., Ronald Press, 1959, 128.
15. Ferrebee J. W. et al. — Blood, 1957, 12, 1096.
16. Fischbein W. N. — Cryobiology, 1971, 8, 293.
17. Greiff D., Myers M. — Nature, 1961, 190, 1202.
18. Hanafusa N. — In: Proc. Intern. Conf. Low Temp. Sci., Sapporo, 1967, 33.
19. Heber U. — Plant. Physiol., 1964, 39, 712.

Матеріал, захищений авторським правом

20. Heber U., Santarius K. — Plant Physiol., 1964, **39**, 712.
21. Heber U. — Cryobiology, 1968, **5**, 188.
22. Heber U. — Plant Physiol., 1967, **42**, 1343.
23. Hiyaschi F. — Biochim. Biophys. Acta, 1965, **103**, 335.
24. Henderson H., Langeloff L. — Cryobiology, 1969, **6**, 249.
25. Juul P. — Clin. Chem., 1967, **13**, 416.
26. Khan A. W., Davidkova E., Van den Berg L. — Cryobiology, 1968, **5**, 184
27. Kreutzer H. H., Fennis W. H. S. — Clin. Chim. Acta, 1964, **9**, 64.
28. Levitt I. — In: Protoplasmatologia. Wien, Springer-Verlag, 1958, 87.
29. Levitt I. — J. Theoret. Biol., 1962, **3**, 355.
30. Levitt I. — In: Cryobiology. Acad. Press, London — N. Y., 1966, 495.
31. Loomis W. F. — Arch. Biochem., 1950, **26**, 355.
32. Lusena E. V. — Canad. J. Biochem., 1965, **43**, 1787.
33. Maier V. P., Tappel A. L., Volman D. H. — J. Amer. Chem. Soc., 1955, **77**, 1278.
34. Markert C. L. — Science, 1963, **140**, 1329.
35. Mosimann W., Furman M., Beck E. A., Bucher U. — Schweiz. med. Wschr., 1972, 102, 1600.
36. Persidsky M. D., Ellett M. H. — Cryobiology, 1969, **6**, 280
37. Persidsky M. D. — Cryobiology, 1970, **7**, 582.
38. Persidsky M. D., Ellett M. H. — Cryobiology, 1971, **8**, 345.
39. Porter V. S., Denning N. P., Wright R. C., Scotts E. M. — J. Biol. Chem., 1953, **205**, 883.
40. Privitera C. A., Greiff D., Strengs D. R., Anglin M., Pinkerton H. — J. Biol. Chem., 1958, **233**, 524.
41. Qacquarelli A., Piazolla P., Vovlas C. — J. Hen. Virol., 1972, **17**, 147.
42. Santarius K. A., Heber U. — Planta, 1967, **73**, 109.
43. Shikama V., Yamazaki B. — Nature, 1963, **190**, 83.
44. Sherman J. K. — Cryobiology, 1967, **4**, 407.
45. Sherman J. K. — Cryobiology, 1967, **4**, 137.
46. Sherman J. K. — Cryobiology, 1968, **5**, 265.
47. Sizer I. W., Josephson E. S. — Food. Res., 1942, **7**, 201.
48. Soliman F. S., Van den Berg L. — Cryobiology, 1971, **8**, 73.
49. Starkweather W. H., Korpp L. F., Spencer H., Gikas P. — Cryobiology, 1968, **5**, 256.
50. Tappel A. L. — In: Cryobiology. London — N. Y., Acad. Press, 1966, 163.
51. Trump B. F., Young D. E., Arnols E. A., Stowell R. E. — Fed. Proc., 1965, **24**, 144.
52. Walton K. C., Kervina M., Fleischer S., Dow D. S. — J. Bioenerg., 1970, **1**, 3.
53. Weiss M. D., Armstrong M. B. — J. Biophys. Biochem. Cytol., 1960, **7**, 673.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

КОНСЕРВАЦИЯ СЕРДЦА В УСЛОВИЯХ ПЕРЕОХЛАЖДЕНИЯ И ЗАМОРАЖИВАНИЯ

Н. Г. Серебряков, В. С. Зыбин

Проблема консервации целых органов в настоящее время является одной из наиболее актуальных в связи с интенсивно развивающимся направлением в медицине — трансплантацией.

Не трудно представить, что многие сложные вопросы, связанные с пересадкой органов, в значительной степени могли бы быть решены при условии длительной сохранности органов без потери их жизнеспособности.

Существующие в настоящее время методы консервации целых органов можно условно разделить на две категории: 1) методы поддержания жизнеспособности органов в пределах положительных температур (от 37° до 1—2°) и 2) методы, направленные на сохранение органов в широком диапазоне отрицательных температур (от —1° до —270°). Первые эффективны при консервации в течение нескольких суток, а вторые — в течение нескольких минут. Тем не менее, перспективным направлением консервации целых органов является разработка и поиск

Матеріал, захищений авторським правом

различных методов сохранения органов при глубоком замораживании, что позволяет практически подойти к решению вопроса о создании банков органов и тканей.

В связи с этим в настоящем обзоре мы остановимся на рассмотрении различных методических приемов, используемых рядом исследователей с целью получить жизнеспособный орган (в частности сердце) при переохлаждении и замораживании.

Первой крупной работой, посвященной проблеме замораживания сердца, явилась монография Хюбеля [9], в которой автор обсуждает различные способы и условия замораживания сердца. В одном из разделов он представляет экспериментальные исследования по изучению жизнеспособности сердца при замораживании.

Камерон и Броунле [5] наблюдали возобновление сократительной деятельности сердца после двухчасового хранения при температуре —2,5 —3°.

В работе Британа [4] описан интересный эксперимент, в котором целую рыбу замораживали до —20°. После 16 *ч* хранения рыбы при указанной температуре осуществлялось отогревание. Несмотря на то, что жизнеспособность рыбы не возобновилась, зарегистрированы ритмичные сокращения сердца.

Вольф и Торгенес [28] сообщают об эксперименте на сердцах черепах, замороженных в жидком азоте до —120° и хранимых в течение 3, 5, 7 и 10 *мин*. После отогревания в растворе Рингера наблюдалось возобновление сократительной деятельности сердца. При этом отмечено, что сокращения сердец ухудшались и прекращались через 3 *ч*. Жизнедеятельность сердец, сохранявшихся при этой температуре (—192°) более чем 10 *мин*, не восстанавливалась.

Маршал и Адманд [18] опубликовали данные по замораживанию крысиных сердец при —10°; —12°; —17° и —20° со скоростью 1° в 1 *мин* без криофилактиков. Как только достигали заданной температуры охлаждения, сердца размораживали в течение 1 *мин*. Спонтанные сокращения наблюдали при замораживании до —10° и —12° и только в одном случае — при —17°. После замораживания до —10° и —12° авторы изучали ультраструктуру миокарда. При этом особых изменений не отметили.

Лует и Кене [16] замораживали 54 сердца хомяков до —1,5°; —2° и —3°. При замораживании до —1,5° в течение 6,25 *мин* сокращения сердца почти полностью восстановились. После замораживания до —3° в течение 11 *мин* возобновление сокращений сердца не наблюдалось.

Определенные успехи, связанные с восстановлением жизнеспособности клеток и органов после низкотемпературного воздействия, во многом связаны с открытием и применением криозащитных соединений [1, 22]. Из многочисленного количества криопротекторов при консервации сердца апробированы следующие соединения: глицерин, этиленгликоль, диметилсульфоксид, ацетамид, хлороформ, хлористый магний, сернокислый магний, метиловый спирт, метилмочевина, пропионамид, сахароза, мочевина и др.

Рассмотрим некоторые работы, посвященные использованию ряда криопротекторов с целью низкотемпературной консервации сердечной ткани и целого органа.

В обширном обзоре Робертсона и Якоба [25] показано, что жизнеспособность сердец млекопитающих при гипотермии ниже 0° сохраняется только при предотвращении замораживания и использовании для этой цели криопротекторов. Ганзалису и Люету [8] одним из первых удалось добиться положительного эффекта после замораживания ткани четырехкамерных эмбриональных сердец. Они брали сокращающиеся сердца куриных эмбрионов (от 36 до 48 *ч*), пропитывали их 30%-ным этиленгликолем и помещали в жидкий азот на срок от 1 *мин* до 1 *ч*.

Матеріал, захищений авторським правом

Оттаивание проводили в бане с раствором Тироде при температуре 40°. Предварительные результаты были отрицательные. Однако позже авторам удалось добиться восстановления жизнеспособности у 38 сердец из 65. В некоторых случаях сокращения продолжались от 30 *мин* до 1 *ч*, в большинстве случаев несколько часов и в одном — 20 *ч*.

Кампбел [6] сердца куриных эмбрионов пропитывал в течение 3 *мин* 30%-ным этиленгликолем, затем охлаждал их сухим льдом в течение 2—3 *мин*. В другой серии экспериментов сердца пропитывали чистым этиленгликолем в течение 1,5—2,0 *мин* и погружали в жидкий азот на 1 *мин*. После этого орган отогревали в растворе Тироде при температуре 40°. В 6 случаях через 2—11 *мин* после отогревания наблюдали ритмическое сокращение сердец в течение 30—80 *мин*.

Люет и Ганзелис [13] замораживали в жидком азоте кусочки сердца куриных эмбрионов (7—15-дневных) размером 0,3 *мм*, предварительно обработанных в этиленгликоле в течение 24 *ч*.

После оттаивания оценивали жизнеспособность клеток сердца, используя метод культуры тканей. Авторы отмечают значительное количество митозов. В случаях, когда кусочки сердца предварительно не обрабатывали криопротектором, митозы отсутствовали.

Люет и Гехенио [4] оценивали методом культуры тканей жизнеспособность сердец куриного эмбриона при разных скоростях отогревания. Замораживание сердец проводилось в жидком азоте после пропитывания в течение 1 *мин* раствором этиленгликоля в концентрации 1—8 М. На основании полученных данных авторы пришли к выводу, что при низкой концентрации этиленгликоля независимо от скорости отогрева сохранность ткани неудовлетворительная. При увеличении концентрации этиленгликоля до 6—8 М и скорости отогрева до 100° в 1 *сек* наблюдался рост 80—90% клеток. При концентрации этиленгликоля 7—8 М и скорости отогрева 10° в 1 *сек* наблюдали рост лишь 50% клеток. Авторы полагают, что медленное отогревание приводит к увеличению размеров кристаллов льда; эффект защиты этиленгликоля заключается в уменьшении количества воды, переходящей в кристаллическое состояние. Люет и Гехенио наблюдали хороший рост клеток культуры из кусочков сердец куриного эмбриона, пропитанных в течение 1 *мин* 30%-ным глицерином и замороженных до температуры —30°.

Рэй приводит результаты наблюдений на кусочках сердца куриного эмбриона, которые замораживались в разных условиях. Одна серия кусочков пропитывалась 30—60 *мин* раствором Эрла, другая — 5—40%-ным раствором глицерина. Далее проводилось замораживание кусочков следующими способами: 1) помещением на алюминиевые пластинки и погружением в жидкий пропан при температуре —150°; 2) охлаждением в жидком азоте; 3) охлаждением в стеклянных пробирках, опускаемых в сосуд с жидким азотом; 4) предварительным замораживанием в течение 30—60 *мин* при промежуточной температуре и погружением в жидкий азот. Отогревание осуществляли: 1) в физиологическом растворе; 2) на воздухе при комнатной температуре; 3) на воздухе при температуре 35—37°.

Проведенные эксперименты показали, что при пропитывании кусочков в растворе Эрла и последующем замораживании ткани разрушаются. Максимальную жизнеспособность сохраняли кусочки, предварительно пропитанные глицерином при концентрации 25—30%. Скорость отогрева не влияла на жизнеспособность сердечной ткани.

Смит [26] подробно описывает эксперименты по определению жизнеспособности сердец хомяков при различных режимах замораживания, отогрева и применения глицерина.

В случае замораживания сердец без глицерина до температуры —0,6; —1° и последующего отогревания, через 5—30 *мин* от начала

Матеріал, захищений авторським правом

перфузии сердца начинали сокращаться и работали несколько часов. Сердца, замороженные до температуры —1; —2°, также сокращались, однако период сокращений был короче. При замораживании до —3; —4; —5° возобновлялись сокращения лишь предсердий. Сердца, замороженные до —5°, не обнаруживали признаков активности. Сердца, пропитанные 15%-ным глицерином и охлажденные до —20° со скоростью 1° в 1 *мин*, отогревали в полиэтиленовых камерах горячей жидкостью. В ряде случаев в этих условиях автор наблюдал слабые сокращения сердец. При замораживании до температуры —79° с предварительным насыщением сердец 15%-ным глицерином и отогреванием в горячем растворе сердца не возобновляли активности. В случаях отогрева магнитным микроволновым генератором со скоростью 10° в 1 *мин* электрокардиографически обнаруживались потенциалы действия, однако механическая активность отсутствовала. Автор считает, что определенные участки миокарда сохраняют жизнеспособность при замораживании до —79°.

Рэй [24] сообщает о результатах замораживания сердец куриных эмбрионов с использованием в качестве криопротектора глицерина в концентрациях от 5 до 40% при разных условиях замораживания и дальнейшем культивировании тканей при температуре 37°.

Замораживание ткани, насыщенной глицерином в течение 30 *мин*, осуществляли следующими способами: 1) помещением сердец на алюминиевые подложки и погружением в пропан при температуре —196°; 2) опусканием в жидкий азот; 3) помещением ткани в стеклянных пробирках диаметром 11 *мм* в жидкий азот; 4) стеклянные пробирки с сердцами замораживали в течение 40 *сек* при температуре —30° и более 20 *сек* при температуре —196°. Время замораживания целого сердца составляло соответственно 0,5; 5; 65; 60 *сек*. Отогревание сердец осуществляли тремя способами: 1) погружением алюминиевых пластинок или стеклянных пробирок с тканью в физиологический раствор при 20°; 2) отогреванием материала в пробирках на воздухе при 20°. Время отогревания равно соответственно 0,5; 45 *сек* и 6 *мин*. В результате исследований автор пришел к заключению, что сердца, замороженные без глицерина, нежизнеспособны. Наилучшие результаты по восстановлению сердечной деятельности были получены, когда сердца насыщали 30%-ным раствором глицерина (во всех случаях). Замораживание со скоростью 0,5 *сек* при концентрации глицерина 20 или 30% обусловило хорошую сохранность сердец.

Конаугтон и Леуи [1] перфузировали кроличьи сердца оксигенированным раствором Локка, содержащего глицерин или хлороформ в различной концентрации. В серии экспериментов с использованием глицерина: 1) глицерин в концентрации 10% при температуре 37° не вызывал изменений в деятельности сердца; 2) сердца, перфузируемые 10%-ным раствором глицерина при 37° после дальнейшего замораживания до —21°, были жизнеспособны; 3) сердца, перфузируемые 20%-ным раствором глицерина и замороженные до —70°, хранили при этой температуре в течение 20 *ч*. После отогрева до 37° возобновления активности не обнаружено.

В серии экспериментов с применением хлороформа: 1) сердца, перфузируемые раствором Локка, насыщенным хлороформом при 10°, продолжали интенсивно сокращаться; сокращения продолжались и после удаления хлороформа и повышения температуры перфузата; 2) два сердца насыщали таким же способом хлороформом и замораживали до —20° в течение 30 *сек*; после отогревания до 37° возобновились сильные регулярные сокращения одного сердца, другое было неактивно; 3) два сердца, насыщенных хлороформом, заморозили до —20° и —70° и хранили при этой температуре в течение 20 *ч*; после отогревания восстановления жизнедеятельности не отмечено.

Матеріал, захищений авторським правом

В работе Карова и др. [11, 12] приводятся данные по изучению влияния различных криопротекторов и степени замораживания на жизнеспособность сердец крыс.

Перед замораживанием сердца перфузировали 2—3 *мин* при 37° раствором Рингера, содержащего 0,1 глюкозы, затем 5 *мин* этим же раствором с добавлением одного из следующих веществ — 15% глицерина, 15% ДМСО, 6% декстрана-70, 10% декстрана-40 или смеси 12,5% ДМСО и 15—30% декстрана. Глицерин добавляли только после охлаждения перфузата до 10°, так как, по мнению авторов, при более высоких температурах он токсичен для сердца. Затем сердца помещали в алюминиевый сосуд и погружали в охлажденный спирт при температуре —20°, —30° или —40°. Скорость охлаждения при этих условиях составляла 4—5° в 1 *мин*. Отогревание осуществляли погружением сосуда с сердцем в теплую воду и перфузией при 20—37°. Сердца считались выжившими, если регулярные сокращения желудочков и предсердий наблюдались в течение 5 *мин*.

Понижение температуры раствора Рингера обуславливало урежение сокращений сердца. Перфузия с 15%-ным ДМСО вызывала остановку сердечных сокращений. При перфузии с 10%-ным декстраном 5 сердец из 12 были жизнеспособны.

После перфузии с 6%-ным декстраном восстановилась деятельность 8 сердец из 9. Все 10 сердец с 12,5%-ным ДМСО и декстраном и 7 сердец с 15%-ным глицерином были неактивны. При замораживании до —30° или —40° ни одно сердце не было жизнеспособно. Авторы приходят к заключению, что ДМСО — более эффективный криопротектор, нежели глицерин.

Редо и др. [22] сообщают, что им не удалось получить возобновления деятельности сердец морских свинок после замораживания их в жидком азоте в течение 4—24 *ч* при использовании 15%-ного и 85%-ного ДМСО.

Следовательно, перфузия с ДМСО в концентрации более чем 25% при 15° снижает возобновление активности сердечной деятельности. При использовании 15%-ного ДМСО не наблюдается выраженных нарушений сердечной деятельности.

Барнер [3] сообщил о 220 исследованиях, проведенных на крысиных сердцах с использованием различных перфузионных растворов при различных условиях охлаждения и замораживания. Автор выделял сердечно-легочный препарат, перфузировал его (15%-ным, 20%-ным ДМСО или 0,5%-ным $MgSO_4$) в течение разного времени и замораживал до —80°. Отогрев проводили при 37°. При перфузии с 15%-ным ДМСО изменений функции сердца не наблюдали. Увеличение концентрации ДМСО до 20% нарушало сердечную деятельность. Замораживание до —15° в течение 70 *мин* при насыщении сердца 15—20%-ным ДМСО или 0,5%-ным $MgSO_4$ почти всегда заканчивалось возобновлением сокращений сердца. Замораживание при —15° более чем на 2 *ч* или при —80° на 10 *мин* привело к потере жизнеспособности.

А. В. Скибицкий [2] описал влияние глицерина на восстановление жизнеспособности сердца лягушки после его замораживания до температуры —20°. Автор перфузировал сердца лягушки 30%-ным раствором глицерина в растворе Рингера. После кратковременной перфузии, когда сердца останавливались, их охлаждали до —20° и выдерживали при этой температуре от 1 до 48 *ч*. После этого сердца отогревали и перфузировали раствором Рингера при комнатной температуре. Сердца, охлажденные в течение 1 *ч*, начинали функционировать в среднем через 17 *мин*, замороженные на 2—3 *ч* — через 20—30 *мин*. После замораживания на 6, 24 и 48 *ч* деятельность сердца восстанавливалась через 37—39 *мин*. После замораживания без предварительного насыще-

Матеріал, захищений авторським правом

ния сердца глицерином восстановление сокращений сердец не наблюдалось.

Оффериджи Крижден [19] изучали жизнеспособность сердец крыс разных возрастных групп при замораживании их с ДМСО. Крысиные сердца перфузировали сбалансированным и оксигенированным (95% O_2 и 5% CO_2) солевым раствором при давлении 70 *см* водн. ст. Регистрировали температуру сердца и ЭКГ. Проведены следующие эксперименты. 1. Перфузия сердца при 37° раствором, содержащим 10, 15, 25 или 30% ДМСО. Во всех случаях сократительная способность сердец снижалась. При концентрации ДМСО 30% сокращения прекращались совершенно и необратимо. 2. Сердца крыс весом 300—400 *г* охлаждали. Точка замораживания перфузата с 10% ДМСО —4,2°, а с 15% ДМСО — 6,7°. Работоспособность сердец, охлажденных на 1—2° выше точки замораживания раствора в течение 10—20 *мин*, всегда восстанавливалась после быстрого согревания при перфузии (37°). При тех же условиях, если сердца охлаждали на 1—3° ниже, восстановление сократительной способности сердца не наблюдалось. 3. Сердца крыс весом 121—318 *мг* (в возрасте 10—24 дня) перфузировали с 10% ДМСО. Затем их переносили в сосуд с перфузионным раствором и медленно замораживали до температуры —30°. После согревания до 37° наблюдали сокращения предсердий и возобновление электрической активности сердец. 4. Сравнивали жизнеспособность сердец молодых и старых животных при насыщении 10%-ным ДМСО и охлаждении до —30°. Оказалось, что только сердца молодых крыс сохраняют жизнеспособность.

Авторы пришли к выводу, что степень восстановления жизнеспособности сердец после замораживания зависит от возраста животных.

Хобз и др. [10] изучали жизнеспособность сердец крыс при замораживании с криопротектором и без него. Изолированные сердца крыс перфузировали сбалансированным электролитным раствором, снижая температуру его до —5°. После оттаивания при 37° функция сердец, охлажденных до —0,5°, была нормальной, тогда как сердца, охлажденные до —5°, были серьезно повреждены. В другой серии опытов перфузия осуществлялась 3 М этиленгликолем и сердца охлаждали до —7°. После сохранения при этой температуре в течение 1 *ч*, оттаивания и последующего удаления этиленгликоля ритмическая пульсация возобновлялась в 100% случаев. На основании полученных данных авторы приходят к выводу, что в условиях холода сердца крыс изменяются аналогично отдельным клеточным суспензиям, таким, как эритроциты. Охлаждение до точки кристаллизации не вызывает значительных повреждений органа, приводящих к утрате его жизнеспособности.

Люет и Рапатз [17] провели сравнение действия этиленгликоля глицерина и ДМСО на сократительный механизм сердца лягушки. Изучено действие криопротекторов в концентрации 2,5; 5 или 10 М в растворе Рингера на ткань в течение 1—2 или 5 *мин*. Результаты исследований показали, что ДМСО в сравнении с другими криопротекторами является наиболее «агрессивным», а этиленгликоль в наименьшей степени влияет на спонтанные сокращения и реактивность сердца при электрической стимуляции. Авторы приходят к выводу, что этиленгликоль менее, нежели ДМСО и глицерин, влияет на сердечную ткань лягушки.

Рапатз [21] сообщает, что перфузия сердец лягушек 10 М раствором метилового спирта позволяет получить восстановление спонтанных ритмических сокращений сердца при охлаждении до —30°. Автор предполагает, что при температуре не ниже указанной и концентрации до 10 М метиловый спирт по криофилактическим свойствам подобен этиленгликолю. Снижение его защитной способности при более низких темпера-

Матеріал, захищений авторським правом

турах может быть связано с появлением токсических концентраций вследствие кристаллизации воды.

Проанализировав представленные выше данные, можно сделать следующее заключение. Замораживание сердец холоднокровных животных без криопротекторов позволяет сохранять жизнеспособность органа в течение не более 2 *ч*. При замораживании сердец млекопитающих на продолжительный срок наблюдается образование кристаллов льда, концентрирование электролитов и других внутриклеточных веществ, пагубно влияющих на жизнеспособность клеток и органов, что приводит к необратимым повреждениям. Использование криопротекторов увеличивает период сохранения органов. Эффективность замораживания зависит от концентрации криопротектора и степени охлаждения органа. Чем выше концентрация криопротектора и чем значительнее охлаждение органа, тем меньше вероятности, что жизнедеятельность органа восстановится.

ЛИТЕРАТУРА

1. Максимов Н. А. — Известия лесного института, 1913, вып. 25, 135.
2. Скибицкий А. В. — В сб.: Вопросы гипотермии и местного действия холода на мозг и сердце. Краснодар, 1968, 259—301.
3. Barner H. R. — In: Organ Perfusion and Preservation. N. Y., 1968, 717.
4. Britton S. T. — Amer. J. Physiol., **67**, 411.
5. Cameron A. T., Brownler T. S. — Proc. Roy. Soc. Can., 1913, **7**, 107.
6. Campbell J. D. — Biodynamica, 1950, **7**, 107.
7. Connaughton P. S., Levis F. S. — Surg. Forum, 1961, **12**, 177.
8. Gonzales F., Luyet B. — Biodynamica, 1950, **7**, 1.
9. Heubell E., Hlugers S. — Arch. Surg., 1883, **45**, 461.
10. Hobbs K. E., Huggins C. E. — Cryobiology, 1970, **6**, 589.
11. Karow A. M., Webb W. R., Stapp S. B. — Arch. Surg. Chicago, 1965, **91**, 572.
12. Karow A. M., Carrior O., Holland W. C. — Cryobiology, 1967, **3**, 464.
13. Luyet B., Gonzales F. — Biodynamica, 1951, **7**, 61.
14. Luyet B., Gehenio P. M. — Biodynamica, 1952, **7**, 107.
15. Luyet B., Gehenio P. H. — Biodynamica, 1954, **7**, 213.
16. Luyet B., Keener R. — Cryobiology, 1971, **8**, 2, 216.
17. Luyet B., Rapatz G. L. — Cryobiology, 1971, **8**, 2, 366.
18. Marschal S., Armand K. — Cryobiology, 1971, **8**, 2, 216.
19. Offerijns F. G., Keynen H. W. — Cryobiology, 1972, **9**, 4, 289.
20. Polge C., Smith A. U., Parkes A. S. — Nature, 1949, **164**, 666.
21. Rapatz G. L. — Cryobiology, 1971, **8**, 4, 398.
22. Redo S. F., Dine S. — Arch. Surg. Chicago, 1966, **92**, 269.
23. Rey L. R. — Proc. Soc. Surg., 1957, **147**, 460.
24. Rey L. R. — J. Embryol. Exp. Morphol., 1958, **6**, 171.
25. Robertson S., Jacob I. — Cryobiology, 1968, **5**, 2, 188.
26. Smith A. U. — Proc. Roy. Soc. Surg., 1957, **147**, 533.
27. Smith A. U. Biological effects of freezing and supercooling. London, 1961.
28. Wolf E. A., Torgesen R. A. — Anat. Res., 1933, **2**, 57.

Институт трансплантации
органов и тканей АМН СССР

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКОЙ ТКАНИ

М. Г. Шенберг

К числу важнейших проблем современной трансплантологии относится определение жизнеспособности ткани и ее судьбы после пересадки в организм реципиента. Эта проблема имеет многолетнюю давность: при удалении омертвевших тканей хирурги должны были определять границу между мертвым и живым. Однако только в связи с развитием переливания крови, приготовлением живых вакцин и трансплантацией тканей и органов проблема определения жизнеспособности клеток, тканей и органов стала очень актуальной.

Матеріал, захищений авторським правом

В настоящее время определение жизнеспособности должно решаться с позиций системного подхода, а это требует прежде всего определения целей, для которых создается каждая система.

При переливании крови целью является стимулирующий эффект и замещающая функция элементов крови. Стимулирующий эффект оказывают и поврежденные клетки, обломки их и отдельные белковые молекулы. Замещающий эффект может быть получен только при целых клетках, которые способны выполнять свойственные им функции: эритроциты — осуществлять транспорт кислорода и углекислого газа, лейкоциты — фагоцитоз микробов, лимфоциты — участвовать в выработке антител и реакциях клеточного иммунитета, кровяные пластинки — вырабатывать фермент, необходимый для свертывания крови.

Отсюда должны вытекать и соответствующие методы определения жизнеспособности клеток: для эритроцитов — выявление способности связывать кислород и отдавать его тканям, для зрелых гранулоцитов — определение фагоцитарной активности, для лимфоцитов — способности к бласттрансформации и т. д.

При трансплантации костного мозга основной целью является создание очагов размножения клеток кроветворной ткани, способных производить достаточное количество форменных элементов крови в организме реципиента. Следовательно, трансплантируемая гемопоэтическая ткань должна содержать колониеобразующие клетки. Отсюда возник соответствующий метод определения жизнеспособности гемопоэтической ткани — исследование способности к образованию колоний.

Наряду с методами прямого определения состояния клеточных функций в трансплантологии широко используются косвенные тесты, являющиеся более доступными и достаточно информативными. Так, для определения сохранности транспортной функции эритроцитов пользуются определением органических фосфатов: 2,3-дифосфоглицерофосфата (2,3-ДФГ) и АТФ (2,3-ДФГ нужен для определения нормального выделения кислорода из эритроцитов, по уровню АТФ судят о выживании эритроцитов после переливания).

Для успешного приживления пересаженной ткани в организме реципиента большое значение имеют иммунологические факторы. При системном подходе к определению жизнеспособности клеток и тканей необходимо учитывать, что небольшая степень повреждения клеток, снижающая их антигенные свойства (прежде всего индивидуальных антигенов, как наименее устойчивых) может быть полезной для успешного преодоления биологической несовместимости после трансплантации. Поэтому чрезвычайно важным явилось бы умение определять такую степень повреждения клеток.

В процессе изменения или прекращения нормальной жизнедеятельности клеток часто выявляются изменения их структуры. Процесс умирания клеток может наступить не сразу, тогда в нем выделяют несколько периодов [8]:

1) период обратимых повреждений, совместных с жизнью клетки;

2) период необратимых повреждений, наблюдаемый при медленном затухании жизни, когда некоторые функции клетки сохраняются;

3) смерть клетки, наступление которой определить очень трудно (за исключением мгновенной смерти);

4) некроз — устанавливается равновесие между клеткой и окружающей ее средой, разрушаются клеточные мембраны и в результате деятельности освобожденных ферментов происходит аутолиз клетки.

Ясно, что такое выделение периодов в процессе гибели клетки носит условный характер; особенно необходима детализация изменений в первом периоде.

При замораживании все перечисленные процессы могут происходить одновременно. Продолжительность периодов может быть различ-

Матеріал, захищений авторським правом

ной: быстро развившемуся некрозу иногда предшествует длительный 2-й период — агония.

Малинин и Перри [21] указывают, что для криобиолога точное определение необратимого клеточного разрушения является наиболее важным: он пытается либо избежать его при исследовании клеток, тканей и органов при низких температурах, либо воспроизвести его по желанию в ограниченной области.

Моментом смерти клетки можно считать тот момент, когда она утрачивает способность поддерживать постоянство состава внутриклеточной среды — витальные красители (нейтральный красный, трипановый синий, нигрозин и др.) начинают беспрепятственно проникать внутрь клетки и диффузно откладываться в ней. Однако клеточный метаболизм при умирании клеток прекращается не сразу, в течение некоторого времени он протекает фрагментарно и некоординированно — так, нарушается обмен белков и жиров при сохранении гликолиза [8].

Повреждение, в зависимости от вызвавшей его причины, находит выражение в специфическом нарушении структуры и функции клетки. Для механического повреждения специфическим является нарушение целости структуры тканей, клеток, субклеточных и межклеточных элементов, для термического — коагуляция и денатурация белково-липидных структур клетки. При радиационной травме специфическим нарушением является образование свободных радикалов в поврежденных клетках с последующим нарушением в них окислительных и других процессов.

Специфическим проявлениям повреждения клетки обычно сопутствуют и общие неспецифические признаки повреждения: денатурация белков, ряд нарушений обмена веществ на клеточном уровне, внутриклеточный ацидоз, отек, освобождение из клеток ионов калия и другие изменения.

При денатурации белков изменяются их растворимость, размеры молекул, оптическая активность; выявляются отдельные скрытые в нативном белке функциональные группы (SH-группы цистеина, имидазольные группы, OH-группы тирозина и др.). Указанные изменения возникают под влиянием высоких температур (45—50°), резких сдвигов pH (ниже 4 или выше 10), действия солей тяжелых металлов, при обезвоживании, под влиянием детергентов и других повреждающих факторов. Поэтому явление денатурации белков клеток следует считать неспецифическим выражением их повреждения на молекулярном уровне.

Поступление в клетку воды, электролитов и питательных веществ не является процессом простой диффузии, оно осуществляется с помощью клеточного насоса.

Повреждение водных и электролитных насосов приводит к нарушению обмена воды между клеткой и средой и между субклеточными структурами и протоплазмой клетки, что в свою очередь вызывает появление мутного набухания, вакуольного перерождения, зернистого перерождения и других морфологических признаков клеточных дистрофий.

Начальные стадии альтерации клеток, изученные Трампом и соавт. [27], морфологически выражаются во фрагментации клеточной мембраны, изменениях в митохондриях и эндоплазматической сети. На аналогичные изменения ультраструктуры митохондрий и эндоплазматического ретикулума при криоповреждениях указывают Шерман [24], Шерман и Ким [25] и др.

Изменения клеточного ядра свидетельствуют, как правило, о более глубоких повреждениях клеток. Морфологически они выражаются в вакуолизации ядер и появлении гиперхромного вещества вблизи ядерной

Матеріал, захищений авторським правом

мембраны, затем ядро теряет свою обычную структуру, сморщивается и становится резко базофильным. Появление пикноза, по мнению ряда авторов, свидетельствует о смерти клетки. В других случаях наблюдается кариорексис, либо ядро теряет способность окрашиваться основными красителями и по цвету может не отличаться от цитоплазмы.

К известным словам Клода Бернара: «Клетки живут вместе, но умирают в одиночку» можно добавить: «Органоиды клетки живут вместе, но умирают в одиночку» [8]. По-видимому, смерть органоида можно представить себе как смерть некоторых макромолекул.

Смерть, а затем некроз могут охватить одну часть клетки, другие ее части еще могут пребывать в хорошем состоянии либо в состоянии агонии. Так, несколько митохондрий могут погибнуть в результате повреждения, однако некроз можно наблюдать только в одной части клетки.

Некоторые из подобных локальных изменений обычной клеточной структуры встречаются не только в условиях действия экстремальных факторов, но и в процессе нормальной жизнедеятельности клетки и укладываются в рамки представлений о физиологических колебаниях ее функций (например, такого осмолабильного органоида, как митохондрии, либо при повышении проницаемости лизосомальных мембран, когда проникающие в цитоплазму ферменты вызывают очаговый лизис).

Приведенные данные, полученные на клеточном и субклеточном уровнях, дают некоторое представление о далеко не простых методах изучения структуры клеток, которыми в настоящее время не ограничиваются при определении их жизнеспособности.

Широкое распространение получили методы прижизненного окрашивания клеток и тканей. Они используются для выявления изменений, происходящих в клетках при различных повреждающих воздействиях. Изучению изменений, объединяемых понятием «паранекроз», посвящен большой цикл работ Д. Н. Насонова и В. Я. Александрова [4], которые показали, что в основе реакции клетки на внешние воздействия лежат структурные перестройки белковых молекул, которые приводят к неспецифическим изменениям дисперсности, вязкости, pH и способности клетки связывать витальные красители. Образование гранул при этом свидетельствует о способности клетки к коацервации и носит защитный характер.

Методы суправитальной окраски особенно широко применяются при определении жизнеспособности в клеточных суспензиях. Они основаны на том, что неповрежденная клеточная мембрана не пропускает красители, из которых наиболее часто пользуются трипановой синью и эозином, а также акридином оранжевым при люминесцентной микроскопии [7, 9, 11, 18, 21 и др.].

Несмотря на широкое распространение методов суправитальной окраски, особенно для определения процента «живых» ядросодержащих клеток крови и гемопоэтической ткани, ряд авторов указывает на весьма относительное значение этого теста, ссылаясь на данные о несовпадении результатов, полученных с помощью суправитальной окраски и других критериев жизнеспособности [5, 6, 13, 14, 18, 20, 22].

Подвижность клеток и их способность к фагоцитозу используются некоторыми исследователями [2, 23] как критерий жизнеспособности клеток костного мозга, однако они свидетельствуют скорее о функциональной активности зрелых лейкоцитов.

В ряде случаев применяется также культивирование гемопоэтической ткани, позволяющее изучить в динамике ряд ее свойств.

Проводятся исследования клеточного дыхания, а также ряда окислительно-восстановительных ферментов как биохимическими, так и цитохимическими методами.

Матеріал, захищений авторським правом

С целью изучения пролиферативной способности клеток гемопоэтической ткани применяют авторадиографию с H^3-тимидином; реже изучают синтез ДНК с использованием C^{14}-формиата, C^{14}-глицина либо H^3-тимидина.

Вышеперечисленные методы определения жизнеспособности гемопоэтической ткани проводятся in vitro. Однако определить приживление трансплантата в организме реципиента можно лишь в условиях in vivo.

Для этого пользуются методом Тилла и Мак Каллоха [26], позволяющим на смертельно облученных линейных мышах определить колониеобразующую способность клеток костного мозга. Однако перенос полученных данных на колониеобразующие свойства костного мозга человека требуют осторожности, хотя бы при их количественной оценке.

Метод меченых атомов (Fe^{59} и Cr^{57}) применяется у человека для оценки приживляемости эритроцитов донора в кровеносном русле реципиента.

Наиболее полноценную информацию о приживлении может дать цитогенетическое исследование костного мозга, взятого у реципиента, при условии разнополого подбора пар донор-реципиент. Наличие секс-хромосомы противоположного пола у реципиента достоверно свидетельствует о реколонизации пересаженного костного мозга.

Возникает вопрос, всегда ли необходим столь широкий набор методов определения жизнеспособности костного мозга. При выборе тех или иных методов определения жизнеспособности системный подход диктует необходимость учета и возможных механизмов повреждающего действия исследуемых факторов. Так, если повреждающий фактор нарушает, например, целость наружных клеточных мембран, то для ориентировочного выявления его действия достаточно цитологических методов исследования. При повреждении внутриклеточных молекул, приводящем к нарушению ферментативных процессов, более показательными являются методы цитохимии [12, 16].

Следует также учитывать и характер исследуемой ткани, и время, прошедшее с момента извлечения ее из организма.

Поскольку длительное сохранение клеток возможно лишь в условиях глубокого холода, главной проблемой является определение жизнеспособности тканей, консервируемых при низких температурах. Для адекватного выбора методов оценки необходимо знание механизмов повреждающего действия самого замораживания-оттаивания без применения криофилактиков и на фоне их применения.

В настоящее время нет единой теории повреждающего действия указанных факторов. Рассмотрим некоторые основные гипотезы.

Так, все криобиологи признают, что лед, образующийся при замораживании тканей, повреждает клетки. Образование кристаллов льда механически повреждает клеточные мембраны и внутриклеточные структуры, а также вызывает физико-химические и химические повреждения, связанные с резким повышением концентрации солей в жидкой фазе. Криопротекторы, применяемые при консервации биологических объектов, связывают внутри- и внеклеточную воду путем образования водородных связей, что приводит к изменению структуры льда — формированию мелких кристаллов, понижению точки эвтектики, уменьшению повреждающего действия растворов солей в процессе замораживания [3, 15, 17, 19 и др.].

При оттаивании клеток происходит рекристаллизация льда, которая может вызвать дополнительное повреждение клеточных структур. Глубина этих повреждений зависит от скорости отогрева клеток.

Таким образом, в зависимости от условий консервации (режимов замораживания-оттаивания и применяемых криопротекторов) можно выбирать более или менее адекватные косвенные методы определения жизнеспособности клеток костного мозга.

Матеріал, захищений авторським правом

Например, при двухэтапном режиме замораживания, применяемом для консервации ядросодержащих клеток гемопоэтической ткани, исследованиями Р. Ф. Булатовой и соавт. [1], Н. С. Пушкаря и соавт. [10] показано, что повреждающее действие может оказать и вне- и внутриклеточный лед, а также и высокие концентрации солей. Поэтому в качестве косвенных методов определения жизнеспособности клеток, с нашей точки зрения, желательно применять:

— для выявления грубых повреждений — морфологическое исследование;

— для выявления повреждений клеточных органоидов — методы цитохимии, электронной микроскопии и электронной цитохимии;

— для выявления нарушения функции клеток по поддержанию постоянства внутренней среды — различные методы суправитального окрашивания, определять осмотическую резистентность клеток, импеданс;

— для выявления изменений дыхательной функции клеток, тканей — методы цитохимического, манометрического или полярографического исследования;

— для выявления нарушений функции белков в результате повреждения сульфгидрильных групп, которое по данным ряда авторов возникает при образовании льда, — цитохимическое исследование SH-групп;

— для выявления нарушений синтеза ДНК в связи с повреждением определенных ферментов — ауторадиографическое исследование способности к синтезу ДНК по включению меченого тимидина; и т. д.

Комплекс перечисленных методов дает возможность дифференцировать грубые повреждения клеток от менее выраженных повреждений, которые для одних клеток не имеют решающего значения (клетки могут частично сохранить функции, важные для трансплантата); в других клетках они указывают на потерю нужных функциональных свойств (например, в стволовых клетках — способности синтезировать ДНК и размножаться в организме реципиента) при сохранении их структурной, в том числе и ультраструктурной целостности.

Поэтому при разработке новых методов консервации органов, тканей и клеток и изучении действия новых криопротекторов необходимо использовать весь набор возможных методов определения жизнеспособности.

При планировании нового исследования с целью экономии времени и средств следует каждый раз решать вопрос об оптимальном комплексе параллельно применяемых методов определения жизнеспособности трансплантата. Задача выбора оптимального комплекса осложняется следующим: для сильно повреждающих воздействий достаточно только методов морфологического контроля с применением общих окрасок; использование в этих случаях всего набора методов определения жизнеспособности излишне. Если окажется, что применяемые воздействия не дают грубых повреждений, придется применить методы, выявляющие более тонкие нарушения. Поэтому при системном подходе к определению жизнеспособности клеток и тканей выбор оптимального комплекса методов в соответствии с конкретно поставленной задачей требует не только логического подхода, но, по-видимому, и определенного математического расчета.

ЛИТЕРАТУРА

1. Булатова Р. Ф., Коган В. С., Иткин Ю. А., Пушкарь Н. С., Даценко Б. М. — Ортопед., травматол., 1968, 8, 27.
2. Глухенькая Г. Т. Консервирование трупного костного мозга глубоким замораживанием. Автореф. канд. дис. Киев, 1971.
3. Медведев П. М., Фисанович Т. И. — Цитология, 1973, 2, 129.

Матеріал, захищений авторським правом

4. Насонов Д. Н., Александров В. Я. Реакция живого вещества на внешние воздействия. Денатурационная теория повреждения. М.—Л., Изд-во АН СССР, 1940.
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° С). Автореф. канд. дис. Харьков, 1973.
6. Останкова Л. В. Оценка жизнеспособности костного мозга при консервации (—196° С) под защитой полиэтиленоксида. Автореф. канд. дис. Харьков, 1972.
7. Петкевич Н. В., Зайцева К. К. — Пробл. гематол., 1965, 8, 37.
8. Поликар А., Бесси М. Элементы патологии клетки. М., «Мир», 1970.
9. Пушкарь Н. С. Консервирование глубоким охлаждением (—196° С) костного мозга и его использование в клинических целях. Автореф. докт. дис. Харьков, 1968.
10. Пушкарь Н. С., Иткин Ю. А., Розанов Л. Ф. — В сб.: Материалы Всесоюз. симпозиума по вопросам консервирования, культивирования и типирования костного мозга. М., 1971, 21.
11. Спижарская Л. М. — Пробл. гематол., 1965, 2, 48.
12. Шенберг М. Г., Обозная Э. И., Останкова Л. В. — В сб.: Трансплантация органов и тканей. Материалы V Всесоюз. науч. конф. по пересадке органов и тканей. Горький, 1970, 484.
13. Cavins J. A., Djerassi J., Roy A. J., Klein E. — Cryobiology, 1965, **2**, 129.
14. Cavins J. A., Djerassi J., Aghai E., Roy A. J. — Cryobiology, 1968, **5**, 88.
15. Diller K. R., Cravalho E. G., Huggins Ch. E. — Cryobiology, 1972, **9**, 429.
16. Fishbein W. N., Stowell R. E. — Cryobiology, 1969, **6**, 227.
17. Karow A. M. — J. Pharm. Pharmacol., 1969, **21**, 209.
18. Lewis J. P., Passovay M., Conti S. A., McFate P. A., Trobaugt F. E., Jr. — Transfusion, 1967, **7**, 17.
19. Lovelock G. E. — Nature, 1954, **173**, 659.
20. Luyet B., Menz L. — Biodynamica, 1969, **10**, 241.
21. Malinin T. I., Perry V. P. — Cryobiology, 1967, **4**, 104.
22. Pegg D. E. — Cryobiology, 1964, **1**, 64.
23. Perry V. P. — Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol., 1963, **22**, 102.
24. Sherman J. K. — Cryobiology, 1967, **4**, 37.
25. Sherman J. K., Kim K. S. — Cryobiology, 1967, **4**, 61.
26. Till J. E., McCulloch E. A. — Radiat. Res., 1961, **14**, 213.
27. Trump B. F., Young D. E., Arnold E. A., Stowell R. E. — Fed. Proc. Amer. Soc. Biol., Suppl., 1965, **24**, 144.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

КРИТЕРИИ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ (О ФУНКЦИОНАЛЬНОМ НАПРАВЛЕНИИ В КРИОБИОЛОГИИ)

М. И. Шраго, Л. П. Бредихина

Эффекты действия различных внешних факторов на биологические объекты могут отличаться как по характеру, так и по глубине развившихся изменений. Учет последних, как правило, представляет значительные трудности в связи с отсутствием интегральных показателей, объективно отражающих сдвиги, наступающие в каждом отдельном случае.

В литературе часто пользуются общим понятием «жизнеспособность» (viability), которое включает морфологические и функциональные показатели, более или менее характерные для изучаемого объекта.

В каждом конкретном исследовании выбор изучаемых тестов определяется: 1) свойствами объекта; 2) степенью его изученности; 3) уровнем квалификации исследователя; 4) техническим обеспечением работы.

Все перечисленные моменты весьма изменчивы, поэтому выбор критериев при постановке исследования и анализ данных о жизнеспособности объекта, полученных разными исполнителями, представляет значительные трудности. Эти вопросы приобретают особое значение на современном этапе, когда выражена тенденция к познанию интимнейших механизмов явлений на молекулярном уровне.

Матеріал, захищений авторським правом

Аналитический подход при изучении различных проблем биологии дал возможность накопить обширную и чрезвычайно важную информацию о химическом составе и структуре живых объектов. Ценность полученных сведений несомненна. Применение химии, физики и математики для анализа биологических явлений и использование новейшей аппаратуры открывает большие возможности для решения самых сложных проблем. Однако указанные пути познания биологических закономерностей могут увести от изучения свойств целостного объекта, его функциональной специфичности, определяющей в конечном итоге его жизнеспособность.

Рассмотрим некоторые показатели функциональной целостности эритроцитов в современной криобиологии.

Криобиология возникла на стыке наук — биологии, физики, химии и др., основные исследовательские проблемы с самого начала решались при участии специалистов различного профиля и выполнялись современными методами. И все же в ряде случаев при оценке жизнеспособности изучаемого объекта не было уделено должного внимания состоянию физиологических функций.

Как известно, в криобиологии, наряду с изучением анабиоза в природе, наступающего после воздействия холода, исследуется состояние анабиоза, возникающее в искусственно созданных условиях низких температур. При глубоком охлаждении стало возможным длительно сохранять в жизнеспособном состоянии клетки и ткани гомойотермных животных. Такими объектами оказались клетки и ткани млекопитающих, в том числе сперма, кожа, роговица, клетки миелоидной ткани и крови человека. Исследования по низкотемпературному консервированию клеток гемопоэтической ткани, особенно эритроцитов, получили практическое применение в трансфузиологии и завершились созданием банков, в которых в замороженном состоянии хранятся значительные запасы клеток.

Другие ткани и органы оказались менее резистентными к воздействию холода. Таким образом, различия в переносимости низких температур выявлены не только у разных видов живых существ и особей внутри вида, но и у клеток и тканей одного и того же индивидуума.

Как уже отмечалось, чрезвычайно удобным и доступным объектом криобиологических исследований оказались эритроциты человека. В растворах специальных веществ, получивших общее название криопротекторов, при низкотемпературном консервировании удавалось сохранить без гемолиза около 90% клеток.

Хранение крови в замороженном состоянии очень скоро стало одним из методов консервирования в практике. В качестве критериев жизнеспособности клеток после замораживания применялись в основном те же тесты, что и для оценки эритроцитов, консервированных при температурах выше 0°.

О состоянии клеток, хранившихся вне организма, судили на основании морфологических тестов, степени гемолиза, осмотической и механической резистентности, метода кислотных эритрограмм, эритроцитометрических и тинкториальных показателей, продолжительности жизни в кровяном русле реципиента после переливания и др.

Большое число опубликованных исследований посвящено изучению различных звеньев клеточного метаболизма: гликолиза, транспорта ионов и др. В последние годы активно изучалась структура клеточных мембран и процессы, связанные с переносом электрических зарядов на них. При этом состояние основной физиологической функции эритроцитов, хранившихся вне организма при температурах выше 0°, а затем ниже 0°, — способности транспортировать кислород, фактически оказалось вне поля зрения исследователей.

Матеріал, захищений авторським правом

Эффективность переливания консервированной крови, как показала клиническая практика, в значительной степени зависит от сроков хранения крови при температурах выше 0°, при длительном хранении качество крови снижается [1].

Сущность этого явления можно объяснить при помощи новых сведений о механизме обмена в эритроцитах. Изучение сложного физиологического процесса гликолиза в эритроцитах прояснило причину явления, описанного Г. В. Дервизом, Н. Б. Черняк, С. А. Лазаревским [6] — прогрессивного повышения сродства гемоглобина к кислороду при длительных сроках хранения консервированной крови.

При изучении энзимологического спектра анаэробного гликолиза в эритроцитах были выявлены ферменты, непосредственно участвующие в осуществлении функции транспорта кислорода кровью. Как известно, эритроциты характеризуются интенсивным углеводно-фосфорным обменом, который в значительной степени определяет их жизнеспособность. В процессах обмена участвует ряд соединений, таких, как 2,3-дифосфоглицериновая кислота, аденозинтрифосфорная кислота (АТФ), аденозиндифосфорная кислота, обеспечивающие важнейшие функции эритроцитов. Так, например, АТФ способствует сохранению дискоидной формы эритроцитов, обеспечивает энергетические затраты, влияет на сохранение физиологических концентраций калия и натрия в эритроцитах и плазме. В литературе имеются указания на прямую зависимость жизнеспособности, приживаемости, продолжительности циркуляции эритроцитов в кровяном русле от количества АТФ, которое оказывается довольно высоким и составляет 1 *мкмоль* на 1 *мл* красных кровяных телец [2].

Долгое время непонятным оставался факт высокого содержания 2,3-дифосфоглицериновой кислоты (ДФГ) в эритроцитах (4,5 *мкмоль* на 1 *мл* клеток), тем более, что в других клетках организма обнаруживаются лишь следы этого соединения.

Миллер и соавт. [11] указывали, что уровень ДФГ в организме может резко изменяться или восстанавливаться в эритроцитах в течение очень короткого времени — от нескольких часов до 1—2 суток.

Поведение ДФГ в консервированной крови исследовали Ф. Р. Виноград-Финкель с соавт. [1], показавшие, что количество ДФГ в крови при хранении постепенно уменьшается.

Известно, что на 1 *моль* гемоглобина в эритроцитах приходится почти 1 *моль* (0,9 *моля*) ДФГ. Другие исследователи показали [9, 10], что сродство гемоглобина к кислороду снижается при его взаимодействии с органическими фосфатами. Добавление этих веществ в очищенные растворы гемоглобина приводит к образованию комплекса «гемоглобин — органический фосфат» и резкому снижению сродства гемоглобина к кислороду.

В настоящее время в значительной степени выяснен механизм действия ДФГ на молекулярном уровне, определена связь между действием ДФГ и свойствами гемоглобина.

Согласно гипотезе Перутца [цит. по 2] присоединение ДФГ и в меньшей степени АТФ происходит в центральную полость между α- и β-полипептидными цепями гемоглобина в его дезоксигенированной форме. Удерживание молекулы органического фосфата в молекуле гемоглобина происходит вследствие электростатического взаимодействия между отрицательно заряженными фосфорными эфирами и положительно заряженными аминокислотными остатками дезоксигемоглобина.

При оксигенации молекула гемоглобина конформируется, объем центральной полости уменьшается и молекула ДФГ отщепляется. В связи с повышением парциального давления кислород получает преиму-

Матеріал, захищений авторським правом

щество перед органическим фосфатом в присоединении к молекуле гемоглобина.

Сконструированные Перутцем [13] атомарная модель гемоглобина и модель молекулы ДФГ, а также проведенные эксперименты полностью подтвердили эти теоретические предположения.

Кислород и ДФГ присоединяются к гемоглобину в разных участках молекулы. Работами многих авторов показано, что потеря одной из четырех молекул кислорода полностью оксигенированного гемоглобина приводит к такой же способности связывать ДФГ, как и потеря всех молекул кислорода. Поэтому даже относительно небольшие физиологические колебания насыщения крови кислородом вызывают значительные изменения количества ДФГ, связанной с гемоглобином.

In vivo в оксигенированных эритроцитах ДФГ находится главным образом в свободном состоянии, тогда как в дезоксигенированных эритроцитах это вещество связано с гемоглобином.

Константа связывания гемоглобина с АТФ приблизительно в 20 раз меньше константы связывания с ДФГ. Количество ДФГ в эритроцитах в физиологическом и патологическом состояниях более вариабельно по сравнению с АТФ, что может свидетельствовать о большом значении ее в регулировании сродства гемоглобина к кислороду.

Связывание ДФГ с гемоглобином в свою очередь зависит от pH крови, ионной силы и температуры. Уменьшение pH приводит к увеличению связывания ДФГ с гемоглобином. При высоких значениях ионной силы степень связывания уменьшается. Процесс связывания ДФГ с гемоглобином экзотермический, он протекает лучше при низких температурах [7].

Указанный механизм взаимодействия кислорода с экстракорпускулярным гемоглобином сохраняется в эритроцитах и проявляется при хранении консервированной крови.

По данным ряда авторов [1, 3, 12], количество ДФГ в консервированной крови при хранении быстро уменьшается. После трех дней хранения крови уровень ДФГ снижается наполовину, через шесть дней остается 25% и спустя 10 дней — 5% ДФГ. При таком малом содержании ДФГ кривая диссоциации оксигемоглобина резко сдвинута влево. При переливании крови in vivo содержание ДФГ начинает повышаться, но нормальный уровень достигается только через несколько дней.

Таким образом, несоответствие повышения сродства гемоглобина к кислороду и одновременного снижения pH при хранении консервированной крови объясняется сдвигом кривой диссоциации оксигемоглобина в связи с уменьшением в такой крови ДФГ [1].

При помощи новых данных удалось объяснить многие феномены, наблюдавшиеся в клетках, хранившихся вне организма, и при некоторых гематологических заболеваниях. Вместе с тем появилась возможность дать новую, более исчерпывающую трактовку функциональным особенностям целостной клетки, в случае эритроцитов — состоянию их важнейшей функции — транспорта кислорода.

Рассмотрим некоторые практические стороны проблемы.

В последние годы расширились научные исследования по удлинению сроков хранения крови в физиологически полноценном состоянии. В основу этих исследований легли новые данные по изучению обмена веществ в эритроцитах, их физико-химической структуры и механизма гемолиза.

На скорость наступления изменений в консервированной крови при хранении оказывают влияние: 1) состав консервирующей среды; 2) условия, при которых хранится кровь; 3) индивидуальные свойства крови донора. Изменения, происходящие в эритроцитах, в значительной степени зависят от нарушения эластичности и проницаемости их обо-

Матеріал, захищений авторським правом

лочки, изменения их электропроводности, нарушения изотонии и изоионии в плазме консервированной крови [8]. В связи с этими изменениями снижается и способность связывать кислород, которая, как известно, довольно устойчива.

Известно, что количество гемоглобина в течение всего времени хранения консервированной крови не изменяется значительно. Резистентность гемоглобина по отношению к воздействию щелочей в процессе консервации повышается. Изменения стойкости эритроцитов не столь значительны, чтобы можно было предполагать глубокие изменения гемоглобина во время консервации, понижающие терапевтическую ценность консервированной крови.

Как уже отмечалось, содержание органических фосфатов в эритроцитах также изменяется при хранении консервированной крови. Быстрая деградация уровня ДФГ в консервированной крови и сравнительно медленное восстановление ее уровня свидетельствуют о том, что только перелитая свежая кровь обеспечивает условия для снижения сродства гемоглобина к кислороду.

Кроме того, выяснено и большое влияние pH крови на уровень ДФГ. При снижении pH уменьшается концентрация ДФГ в крови in vitro и in vivo. Поэтому при длительном хранении крови с более высоким pH сохраняется и более высокий уровень ДФГ, что благотворно сказывается на функции транспорта кислорода. Это еще раз подчеркивает ведущее значение среди всех факторов, влияющих на сохранность крови в физиологически полноценном состоянии, состава консервирующей среды.

Учитывая изложенное о функциональной сохранности эритроцитов, в настоящее время представляется целесообразным пересмотреть свойства консервирующих растворов, применяющихся для их хранения. Общепринятым консервирующим раствором для крови, внесенным в основные Фармакопеи различных стран, является глюкозо-цитратная среда (pH 4,5). С самых ранних сроков хранения крови вне организма создаются условия для ацидотических сдвигов, в результате усугубляются накопления кислых продуктов клеточного метаболизма, что способствует снижению основной функции эритроцитов — транспорта кислорода. Применение в качестве консервирующих сред для крови буферных растворов, поддерживающих pH клеточных взвесей в пределах 7,0—7,2, препятствующих развитию ацидотических сдвигов, и некоторых добавок вполне оправдано [1, 4].

Новым направлением в трансфузиологии является низкотемпературное консервирование крови, которому посвящена обширная литература. В качестве криозащитных веществ используют как эндо-, так и экзоцеллюлярные криопротекторы.

Особого внимания заслуживает изучение состояния кислородно-транспортной функции эритроцитов, хранившихся в замороженном состоянии, влияния на этот показатель различных криопротекторов, режимов замораживания, условий хранения и способа отогрева. В качестве критериев жизнеспособности эритроцитов, восстановленных из замороженного состояния, применялись те же показатели, что и при оценке клеток, пребывавших при температуре комнатного холодильника. Оказалось, что ни степень гемолиза, ни эритроцитометрические показатели и даже приживаемость в кровеносном русле реципиента не отражают состояния основной функции клетки — способности транспортировать кислород. Освещению этих вопросов в литературе уделялось мало внимания, они стали предметом изучения фактически лишь в последние 3—4 года.

Имеются отдельные сообщения о сохранении свойств гемоглобина и концентраций ДФГ и АТФ при быстром замораживании эритроцитов [2, 4]. В работах Ф. Р. Виноград-Финкель и др. [2] говорится о консер-

Матеріал, захищений авторським правом

вировании эритроцитов замораживанием как об одном из способов длительного поддержания концентрации ДФГ на высоком уровне.

Валери и Лерулис [15] изучали эритроциты, сохранявшиеся в кислом глюкозо-цитратном растворе около 23 дней. Обнаружено, что эти эритроциты при инкубировании с пируватом, инозином, глюкозой в течение 60 *мин*, при температуре 37°, последующем замораживании при добавлении 40% глицерина и хранении при —80° в течение 12 месяцев, оттаивании и отмывании сохраняли нормальную способность к транспорту кислорода и выживаемость 75% клеток после переливания через 24 *ч*.

Сохранение уровня ДФГ в эритроцитах при замораживании консервированной крови до температуры —85° было показано также Миллер и соавт. [11].

Однако опубликованные немногочисленные сообщения посвящены описанию действия единственного криопротектора — глицерина на функциональную сохранность эритроцитов. Влияние других криопротекторов на указанный показатель не изучено.

Следовательно, в области изучения кислородно-транспортной функции консервированной крови и влияния на нее различных температурных режимов сделаны лишь первые шаги. Еще недостаточно изучены эффекты действия низких температур на эритроциты, на обменные процессы в них. Морфологическая сохранность клеток после воздействия низких температур и последующего оттаивания еще не является доказательством функциональной полноценности клеток и состояния кислородно-транспортной функции. Кислородная емкость консервированной крови, к определению которой прибегают некоторые исследователи, не является информативным показателем способности транспортировать кислород и не определяет скорости реакции оксигенации-дезоксигенации, от которой в значительной степени зависит снабжение тканей кислородом.

Анабиоз при низкотемпературном хранении замороженной крови представляется оптимальным для целей консервации. Поэтому изучение состояния жизненно важной кислородно-транспортной функции замороженной консервированной крови является актуальной проблемой, требующей безотлагательного и пристального изучения.

В заключение следует подчеркнуть, что в настоящее время оценка состояния биологического объекта может быть произведена лишь при сочетанном исследовании структуры и функции субклеточных структур и компонентов с изучением состояния всего объекта, его морфологических и функциональных параметров.

Целесообразность таких подходов наглядно показана на примере консервированных эритроцитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Виноград-Финкель Ф. Р., Дервиз Г. В., Андреева А. Г., Дмитриева М. Г., Гинзбург М. Г., Кудряшова С. Н. — Пробл. гематол., 1974, 7, 3.
2. Виноград-Финкель Ф. Р., Дервиз Г. В., Гинзбург Ф. Г., Сухова А. Г. — Пробл. гематол., 1972, 12, 17.
3. Гинзбург Ф. Г., Сухова А. Г., Данцер Н. А. — Пробл. гематол., 1967, 4, 3.
4. Голубева В. Л., Сухова А. Г., Олдурова С. В., Суворова Н. А. — Пробл. гематол., 1973, 9, 34.
5. Дервиз Г. В., Руэда К. В. — Тез. докл. XII Междунар. конгр. по переливанию крови. М., 1969, 48.
6. Дервиз Г. В., Черняк Н. Б., Лазаревский С. А. — Соврем. пробл. гематол. и перелив. крови. М., Медгиз, 1956, 32, 115.
7. Рубина Х. М. — Пробл. гематол., 1973, 8, 35.
8. Руководство по применению крови и кровезаменителей. Под ред. А. Н. Филатова. Л., «Медицина», 1973.

Матеріал, захищений авторським правом

9. Benesch R., Benesch R. E. — Science, 1968, **160**, 3823, 83.
10. Chanutin A., Curnish R. — Arch. Biochem., 1967, **121**, 96.
11. Miller L. D., Oski F. A., Diaco J. F. — Surgery, 1970, **68**, 187.
12. Oski F. A., Sugerman H. J., Miller L. D. — Blood, 1972, **39**, 4, 522.
13. Perutz M. F. — Nature, 1970, **228**, 726.
14. Valeri C. R., Collins F. B. — J. Appl. Physiol., 1971, **31**, 6, 823.
15. Valeri C. R., Laroulis C. J. — New Engl. J. Med., 1972, **287**, 26, 1307.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

АППАРАТУРА ДЛЯ ЗАМОРАЖИВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

П. М. Медведев, Г. Т. Недельский, Т. И. Фисанович

Методы низкотемпературной консервации биологических объектов в научных и лечебных целях нашли широкое применение лишь в последнее десятилетие. В связи с этим в нашей стране и за рубежом созданы и разрабатываются различные типы замораживающей аппаратуры.

Обобщение и сопоставление конструктивных особенностей аппаратов, применяемых для замораживания крови и костного мозга, является целью настоящей работы. При составлении обзора мы отказались от изложения материала в хронологической последовательности, поставив на первое место наиболее важные и перспективные, с нашей точки зрения, аппараты.

Московский завод кислородного машиностроения серийно выпускает единственный в нашей стране аппарат с пневматическим управлением для программного замораживания биологических объектов [4]. В ячейках камеры аппарата устанавливают контейнеры с биологическим объектом. Циркуляция паров азота в камере осуществляется при помощи вентилятора. Для равномерного распределения азота при входе в камеру установлен диффузор. Система автоматического регулирования температуры в камере, регулируя подачу паров азота, обеспечивает заданный режим замораживания.

В аппарате можно консервировать одновременно до 7 *л* биопрепарата в алюминиевых контейнерах емкостью 150 *см*^{3} при расходе жидкого азота 50 *кг* на цикл. К недостаткам следует отнести сложность наладки автоматики аппарата при изменении программы замораживания. Основным недостатком аппарата является неравномерность замораживания биологических объектов, зависящая от расположения контейнеров [13].

В США создана установка BF, в которой регулируется скорость снижения температуры. Заданная скорость охлаждения достаточно точно поддерживается при потреблении небольшого количества азота. Но изменение скорости охлаждения требует вмешательства оператора, так как аппарат имеет полуавтоматическое управление. Хотя установка BF широко используется за границей, сведения о ней в литературе крайне скудны, ибо она относится к разряду стратегических [12].

В Физико-техническом институте низких температур АН УССР разработана криогенная установка, обеспечивающая получение различных режимов замораживания и хранения биологических объектов на протяжении длительного времени. Установка состоит из блока замораживания и хранения, блока оттаивания и пульта управления. Простая конструкция и широкий диапазон скоростей замораживания являются достоинством этой установки [18].

Матеріал, захищений авторським правом

В Ленинградском НИИ гематологии и переливания крови совместно с Ленинградским научно-исследовательским институтом химического машиностроения разработан аппарат для замораживания костного мозга [1]. Аппарат предназначен как для научных исследований, так и для выполнения работ по низкотемпературной консервации костного мозга для клинических целей. Он состоит из следующих основных элементов: сосуда жидкого азота, морозильной камеры на 8 ячеек, испарителя, нагревателя, потенциометра ЭПП-09, а также средств управления и контроля, смонтированных на общей раме. Расход жидкого азота при замораживании 8 контейнеров с костным мозгом, емкостью 150 $см^3$ каждый, составляет 15 *л*. При замораживании меньшего количества костного мозга расход жидкого азота соответственно уменьшается. Аппарат позволяет просто и надежно осуществлять плавное и достаточно точное размораживание и управление процессом замораживания костного мозга в широком диапазоне температур по программе, что удобно при проведении экспериментально-исследовательских работ.

Картер с соавторами [22] описывают аппарат для замораживания биологических объектов, позволяющий варьировать скорость охлаждения, замораживания и оттаивания. Аппарат снабжен системой программирования процесса замораживания. Программа записывается на пластмассовую карту в виде требуемой температурной кривой, и контрольное устройство, следуя этой кривой, регулирует поток охлаждающего агента (жидкого азота). Простота и удобство программирования, экономичность в работе и возможность использовать различные биологические объекты являются достоинствами аппарата.

В Куйбышевском авиационном институте разработана азотно-холодильная камера АХК-4 для охлаждения и замораживания биологических веществ [14]. Камера имеет цилиндрическую рабочую емкость с теплоизоляцией из пенопласта. Сверху камера закрывается теплоизолированной крышкой, внутри ее помещен цилиндрический экран с поддоном для канистры с ампулами. Экран повышает эффективность циркуляции паров азота, создаваемую вентилятором. Жидкий азот подается из сосуда Дьюара емкостью 15 *л* в вентиль, откуда он по трубопроводу стекает на лопасти вентилятора и распыляется. Повышение давления в сосуде Дьюара осуществляется с помощью электронагревательного элемента, установленного на трубке внутри сосуда. Редукционным клапаном в сосуде поддерживается постоянное давление. Вентиль управляется реверсивным электродвигателем по командам, поступающим от программного регулятора.

Программное устройство состоит из регулируемого реле времени, работающего по 3-диапазонной программе, соленоидного механизма импульсивного поворота и задающего потенциометра. Последний снабжен шкалой с ручкой для установки границ диапазонов регулирования процесса охлаждения. Диапазоны и скорости охлаждения следующие: I — от 0 до —20°, скорость охлаждения от 0,1 до 1° в 1 *мин*; II — от —10 до —60°, скорость охлаждения от 1 до 3° в 1 *мин*; III — от —40 до —80°, скорость охлаждения от 4 до 10° в 1 *мин*. После окончания цикла замораживания система автоматического регулирования поддерживает температуру в камере —80°.

К недостаткам аппарата следует отнести переключение диапазонов замораживания вручную и недостаточно низкую конечную температуру замораживания.

Коллективом авторов [11] Института кибернетики АН Грузинской ССР и Тбилисской станции переливания крови создан «электронный замораживатель ядросодержащих клеток крови и костного мозга», состоящий из нескольких морозильных камер и представляющий собой насадку на стандартный сосуд Дьюара АСД-50 емкостью 50 *л*. Скорость поступления паров азота, а следовательно, и скорость охлаждения за-

Матеріал, захищений авторським правом

висит от интенсивности нагревания электрического элемента, погруженного в жидкий азот. Замораживатель снабжен электронным устройством для поддержания заданного температурного режима в биологическом объекте. Расход азота на цикл замораживания составлял 12—15 *л*. За один цикл можно заморозить 0,5 *л* биопрепарата.

Существенным преимуществом этого замораживателя является возможность регулирования процесса охлаждения, осуществляемого по температуре биологического объекта. Однако устройство аппарата в виде ряда морозильных камер может неудовлетворительно отразиться на равномерности температурного поля и, следовательно, равномерности замораживания биопрепарата в контейнерах, установленных в различных камерах.

В НИИ хирургической аппаратуры и инструментов МЗ СССР (Москва) разработан аппарат для глубокого охлаждения биологических объектов с программным управлением КЗ-8 [7]. Аппарат имеет рабочую камеру, в которой уложены змеевики из медных труб. Пространство между змеевиками заполняется петролейным эфиром, имеющим низкую температуру замерзания. Жидкий азот из сосуда Дьюара просасывается центробежным насосом через змеевики. При кипении жидкого азота происходит охлаждение петролейного эфира и погруженных в него контейнеров с биопрепаратами. Температура рабочей жидкости измеряется электронным потенциометром с медь-константановой термопарой. Режим замораживания регулируется вручную или автоматически с помощью позиционного регулятора электронного потенциометра, посредством изменения количества азота, подающегося в змеевики, и одновременным регулированием нагрева электрического элемента, установленного в рабочей камере. Скорость замораживания варьирует в пределах от 0 до 30° в 1 *мин*.

К недостаткам прибора следует отнести применение летучего и токсичного петролейного эфира, проникающего в контейнер с биопрепаратом даже при самой тщательной герметизации. Замена петролейного эфира спиртом ректификатом позволяет избежать проникновения его в биопрепарат, но ограничивает глубину охлаждения материалов до —80°, что недостаточно, ввиду процессов релаксации в биологическом объекте при температурах до —80°.

Ангелоф и Хендерсон [20] описывают аппарат для программированного замораживания биологических объектов, который работает в диапазоне температур от +50° до —269°. Возможность создания разных скоростей замораживания и автоматическое регулирование заданного режима в этом аппарате вызывают интерес к нему специалистов.

В. Г. Михайлов и Ф. А. Казанцев [16] получили удовлетворительные результаты, замораживая костный мозг до —40° с помощью аппарата для сушки плазмы французской фирмы «Юзифруа».

В. Г. Михайлов [15] получал удовлетворительные данные при замораживании костного мозга для клинических целей, используя электрохолодильники ТКС-150 и холодильные прилавки системы «Фригера» ЧССР.

Ведущиеся во всем мире работы по изысканию криопротекторов и поиск оптимальных режимов замораживания привели к созданию специальной аппаратуры для замораживания небольших объемов крови и костного мозга в экспериментальных целях.

Руппельт и соавт. [30] создали аппарат с регулируемой скоростью замораживания и оттаивания клеток крови. Аппарат состоит из цилиндрического тонкостенного контейнера, окруженного снаружи экраном. На его поверхности имеется спиральный электрический подогреватель. Вся конструкция погружается в жидкий азот, а скорость охлаждения регулируется степенью нагрева элемента. Аппарат предназначен для замораживания образцов малого объема (до 0,33 $см^3$) со скоростью

Матеріал, захищений авторським правом

от 0,2° в 1 *мин* до 60° в 1 *сек*. Скорость оттаивания составляет от 0,2° в 1 *мин* до 500° в 1 *сек*.

Аппарат обладает широким диапазоном скоростей замораживания и оттаивания и снабжен системой автоматического регулирования. К недостаткам следует отнести крайне малый объем замораживаемого образца.

Пегг [27] описывает аппарат, в котором в качестве охлаждающего вещества применен этанол, который перемешивается сильной струей воздуха. Аппарат имеет две секции. В одной происходит охлаждение этанола до —70°, —80° посредством перемешивания его вокруг емкости с твердой углекислотой. В другой секции происходит замораживание запаянных в ампулы образцов. Управление осуществляется прибором, следящим за скоростью охлаждения. При этом удается получить скорости охлаждения от 0,2° до 15° в 1 *мин* в температурном интервале от +50° до —15°.

Т. К. Мамышева [10] приводит описание аппарата, позволяющего осуществлять регулируемое замораживание костного мозга до температуры —70°. Аппарат выполнен в виде медного двойного сосуда, погруженного в твердую углекислоту и снабженного электронагревательным элементом. Требуемая скорость охлаждения создается регулированием степени нагревания элемента. Отсутствие автоматического регулирования температур и относительно высокая конечная температура замораживания — недостатки данного аппарата.

Полдж и Лавлок [29] применили аппарат, состоящий из пластмассового мешка емкостью 1000 *см*^{3}, в который помещается алюминиевый сосуд — замораживающая камера. Пространство между ними заполнено 20%-ным раствором глицерина. Вся эта конструкция погружается в ванну с сухим льдом. Скорость охлаждения образца 1° в 1 *мин* от 0° до —15° и 10° в 1 *мин* до —78°.

Барнес и Лаутит [21] в своих исследованиях применили аппарат, работающий по следующему принципу. В сосуд Дьюара, содержащий смесь сухого льда и метилового спирта, они помещали полиэтиленовый сосуд емкостью 300 *см*^{3}, в котором содержался 40%-ный водный раствор глицерина с точкой эвтектики —15°. В глицерин погружали медный сосуд, содержащий исследуемый образец. При погружении всей конструкции в смесь сухого льда со спиртом температура в медном сосуде падала медленно до —15°. При этой температуре раствор глицерина застывает и температура образца быстро понижается до —70°.

Нагингтон и Гривз [26] описали установку, которая изготовлена из трех кругов полистирона диаметром 81 *мм*, склеенных вместе, в виде пробки с шестью продольными вертикальными пазами для выхода паров азота. В центре пробки имеется отверстие диаметром 37,5 *мм*, облицованное картоном, не доходящее до дна на 50 *мм*, в которое устанавливаются ампулы с биопрепаратом. Всего загружается 8 ампул. Пробка вдвигается в горловину сосуда Дьюара с жидким азотом. От глубины вдвигания пробки в горловину зависит режим замораживания. Недостатком этой конструкции является необходимость постоянного наблюдения за скоростью замораживания, а также значительная неточность и невоспроизводимость процесса охлаждения.

Дайвес и соавт. [23] описывают установку, идентичную приведенной выше, со значительными изменениями в размерах.

Илбери и соавт. [25] применили аппарат, состоящий из изолированного медного цилиндрического сосуда, в котором подвешиваются ампулы из стекла «Пирекс» с биологическим объектом. Сосуд погружается в жидкий воздух. При соответствующем подборе изоляции, диаметра сосуда и ампул достигают скорости охлаждения 1° в 1 *мин*. Температура измеряется потенциометром с медь-константановой термопарой.

Матеріал, захищений авторським правом

Замораживание длится 48 *мин*, затем ампулы с биопрепаратом хранятся в жидком азоте.

Для сверхбыстрого замораживания крови А. Е. Киселев и соавт. [6] применили установку, в которой кровь замораживается в виде гранул. Для этого кровь распыляется из шприца с помощью электромагнитного распылителя. Последний состоит из соленоида, по которому пропускают переменный ток частотой 50 *гц*, пружины и иглы. При вибрации распылителя кровь дробится на капли диаметром 0,4—0,7 *мм* в зависимости от амплитуды колебаний пружины. Капли падают во вращающийся сосуд на воронкообразную поверхность жидкого азота, за 2—3 *сек* замерзают и тонут, попадая в стаканчик из фторопласта. Сосуду с жидким азотом придается вращение вокруг вертикальной оси, чтобы исключить попадание капель крови на стенки, не покрытые азотом.

Необходимость визуального анализа повреждения клеток крови и костного мозга в процессе замораживания-оттаивания привела к созданию аппаратуры для криомикроскопии.

Диллер и Кавальо [24] создали криомикроскоп с управлением процесса замораживания и оттаивания суспензий биологических клеток в диапазоне температур от +37° до —196°. Микроскоп снабжен камерой из нержавеющей стали с двумя окнами. В окна с помощью эпоксидной смолы вклеены кварцевые стекла толщиной 0,2 *мм*. Поток хладоагента направляется на внутреннюю поверхность верхнего окна. Регулирование скоростей замораживания-оттаивания в пределах от нуля до нескольких десятков градусов в 1 *сек* осуществляется благодаря постоянному протеканию хладоагента через устройство и подаче электроэнергии в нагревательный элемент, погруженный в поток хладоагента; оно осуществляется аналоговой системой управления, которая поддерживает заданную скорость охлаждения с высокой точностью.

Микроскоп снабжен длиннофокусным конденсором (7 *мм*). Объект наблюдения можно положить на верхнее окно камеры и накрыть покровным стеклом или зажать между двумя покровными стеклами и положить на верхнее окно камеры. Толщина образца 10—50 *мк*. Карманчик для образца с покровными стеклами заполнен фтористой кислотой, к верхнему покровному стеклу присоединена медь-константановая термопара с диаметром проволоки 0,02 *мм*. Микроскоп укомплектован кинокамерой с большой скоростью съемки.

Обладающий широким диапазоном регулирования скоростей замораживания и оттаивания, этот криомикроскоп, несомненно, представляет большой интерес для исследователей.

В Физико-техническом институте АН УССР разработан аппарат для микроскопического исследования замороженных препаратов [5, 17]. Аппарат состоит из окруженного экраном сосуда, в который поступает жидкий азот. Камера для замораживания с зеркальной отполированной поверхностью, на которой помещается исследуемый объект, нижней частью погружена в сосуд с жидким азотом. Сверху она закрывается стеклом с уплотнительной прокладкой и крышкой. Требуемую в камере температуру, а следовательно, и в исследуемом объекте, поддерживают при помощи нагревательного элемента. Наблюдение ведется через смотровое стекло. Температуру измеряют электронным потенциометром ЭПП-09 с медь-константановыми термопарами.

Аппарат хорошо зарекомендовал себя и широко применяется для исследований. Достоинство его состоит в возможности осуществления микроскопического наблюдения при замораживании биологических объектов с различными скоростями и в широком диапазоне температур.

Л. К. Лозина-Лозинский и П. Э. Мороз [9] разработали камеру для замораживания объектов при микроскопировании. Она имеет форму цилиндра диаметром 125 *мм* и высотой 50 *мм* и состоит из трех сосудов, вставленных один в другой. Наружный сосуд является теплоизоляцией,

Матеріал, захищений авторським правом

средний предназначен для хладоагента (сжиженный газ) и внутренний — для хладоносителя (спирт). В верхней части последнего сосуда вставлена втулка, к ней приклеена тонкая бронзовая пластинка с отверстием в центре. Снизу к пластине приклеено предметное стекло размером 24×24 *мм*. Сверху на втулку укладывается латунное кольцо с полированной поверхностью, соприкасающейся со втулкой. Через отверстие кольца вводится объектив микроскопа. Камера помещается на столик микроскопа и зажимается в препаратоводителе. Пространство, замкнутое между объективом микроскопа, стенками втулки и предметным стеклом, столь мало, что запотевание оптики при конденсации водяных паров практически не наблюдается. Таким образом можно избежать применения влагопотребителей.

Г. А. Козловым [8] сконструирована камера для микроскопирования биологических объектов при температурах от +100° до —50°. В конструкции использована установка, собранная на основе ультратермостата типа И-8. В качестве хладоносителя использован этиловый спирт, а в качестве теплоносителя — вода. Этиловый спирт охлаждается твердой углекислотой до —50°. Расход сухого льда составляет 2,4 *кг/ч*, максимальная скорость охлаждения биологического объекта 8° в 1 *мин*. Для связи между блоками установки использованы трубки из сополимера этилена с пропиленом среднего давления, изолированные стекловатой. Против запотевания применяется обдувание стекол подогретым воздухом. Расстояние между стеклами при обдуве составляет 6,7 *мм*. Температура измеряется при помощи низкоомного потенциометра ПМС-48 с медь-константановой термопарой.

Недостатком данной камеры является охлаждение образца только до —50°, что недостаточно для проведения большинства современных исследований. Кроме того, скорость замораживания образца невысокая.

Устройство Смита и соавт. [31] для наблюдения под микроскопом клеток крови при замораживании состоит из медной пластины, концы которой погружены в жидкий азот, находящийся в сосуде Дьюара. На медную пластину укладывают предметное стекло, на котором находится объект исследования. Вся система изолирована пробковой изоляцией. Для предотвращения запотевания и образования инея на покровном стекле его смачивают тонким слоем глицерина или пропиленгликоля. Температуру измеряют потенциометром с медь-константановой термопарой.

Для исследования процессов кристаллообразования методом рентгеноструктурного анализа Ф. Р. Виноград-Финкель и соавт. [2] применяли специальное приспособление для замораживания крови в рентгеновской камере. Приспособление состоит из сосуда Дьюара, в котором находится жидкий азот, с электронагревательным элементом. С камерой для замораживания крови сосуд Дьюара соединен трубкой, по которой подаются пары, образующиеся при кипении жидкого азота. Камера для замораживания представляет собой трубку из органического стекла, через которую продуваются пары азота. В верхней части этой трубки имеется специальное отверстие, куда вставляется карманчик с кровью. Толщина слоя крови равна 0,8 *мм* в направлении прохождения рентгеновских лучей. Температура паров азота в трубке и температура в процессе замораживания регистрировалась медь-константановыми термопарами гальванометрическим методом.

В Физико-техническом институте низких температур АН УССР для рентгеноструктурных исследований применяют низкотемпературное устройство, состоящее из медного стержня, погруженного в жидкий азот (на выступающем конце которого располагают образец крови или костного мозга), и колпака из пенопласта, благодаря которому обдувание образца испаряющимся сухим азотом происходит без оседания инея.

Матеріал, захищений авторським правом

Ленинградский завод рентгеноаппаратуры «Буревестник» серийно выпускает низкотемпературные приставки КРН-190 и УРНТ-180 к аппаратам для рентгенструктурного анализа. Хладоагентом в них является жидкий азот. К недостаткам этих камер следует отнести отсутствие программного замораживания. Кроме того, оснастка камер не позволяет исследовать жидкие образцы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беляков А. Д., Логинов Н. Н., Бабенко Н. И., Медведев П. М. — В кн.: Краткие тез. докл. науч. сессии по вопросам трансфузиологии Ленинградского НИИ гематол. и переливания крови, 22—23 мая. Л., 1973, 78.
2. Виноград-Финкель Ф. Р., Разумова Л. Л., Кудряшова С. Н. — Биофизика, 1960, 2, 229.
3. Игнашева Л. П. Влияние замораживания и оттаивания на сохранность родоначальных клеток костного мозга. Автореф. канд. дис. М., 1971.
4. Инструкция по обслуживанию биокомплекса. Московский завод кислородного машиностроения. М., 1964.
5. Иткин Ю. А., Пушкарь Н. С., Козьмин Ю. В., Даценко Б. М. — Пробл. гематол., 1968, 12, 53.
6. Киселев А. Е., Подольский М. В., Смирнова Л. И., Скурьят Э. Н., Ичаловская Т. А., Пискунова Т. М. — Пробл. гематол., 1971, 8, 52.
7. Комаров Б. А., Горбовицкий Е. Б., Белова И. А., Злотников В. П. — Медицинская техника, 1971, 1, 51.
8. Козлов Г. А. — Цитология, 1969, 5, 6, 700.
9. Лозина-Лозинский Л. К., Мороз П. Э. — Цитология, 1964, 6, 774.
10. Мамышева Т. К. — В кн.: Актуальные вопросы гематологии и переливания крови. Сб. тр. ЛИПК, 1963, вып. 14, 491.
11. Мгебришвили Н. Н., Махатадзе И. К., Кахиани Ш. В., Роква М. М., Бадалов П. М., Бакурадзе Г. В., Оганов С. И. — В кн.: Материалы XXIII науч. сессии, посвящ. 50-летию Сов. Грузии и созданию Коммунистической партии Грузии. НИИ гематол. и переливания крови им. Г. М. Мухатадзе, 1971, 21—24 сент. Тбилиси, 113.
12. Мгебришвили Н. Н., Махатадзе И. К., Кахиани Ш. В., Роква М. М., Бадалов П. М., Бакурадзе Г. В., Оганов С. И. — В кн.: Материалы Всесоюзного симпозиума по вопросам консервирования, культивирования и типирования костного мозга. М., 1971, 57.
13. Медведев П. М., Бабенко Н. И., Недельский Г. Т. — Холодильная техника, 1972, 9, 30.
14. Меркулов А. П. — Холодильная техника, 1965, 2, 43.
15. Михайлов В. Г. Консервирование костного мозга (при положительных и низких температурах) и применение его в клинике. Автореф. докт. дис. Ташкент, 1969.
16. Михайлов В. Г., Казанцев Ф. А. — Проблемы гематол. и переливания крови, 1966, 7, 56.
17. Подольский М. В., Иткин Ю. А. — Холодильная техника, 1970, 3, 38.
18. Пушкарь Н. С. Консервирование глубоким охлаждением (—196° С) костного мозга и его применение в клинических целях. Автореф. докт. дис. Харьков, 1968.
19. Шраго М. И., Булатова Р. Ф. — Биофизика, 1967, 1, 163.
20. Angeloff L. G., Henderson W. — Cryobiology, 1970, **6**, 4, 368.
21. Barnes D. W. H., Loutit J. F. — J. Nat. Cancer Inst., 1955, **15**, 4, 901.
22. Carter J. E., Beisang A. A., Ahlgren F. F., Dorman F. D., Graham E. F. — Cryobiology, 1969, **5**, 5, 343.
23. Davies J. D., Coulson A. S., Smith A. F. — Cryobiology, 1966, **2**, 5, 263.
24. Diller K. R., Gravalho E. G. — Cryobiology, **7**, 4, 191.
25. Ilbery P. L. T., Meszaros S., Winn S. M. — J. Appl. Physiol., **16**, 4, 767.
26. Nagington J., Greaves R. I. N. — Nature, 1962, **194**, 4832, 993.
27. Pegg D. E. — J. Appl. Physiol., 1964, **19**, 2, 301.
28. Pegg D. E. Lloyd-Luke LTD. London, 1966.
29. Polge C., Lovelock J. — Vet. Res., **64**, 3, 369.
30. Ruppelt W., Pfisterer H., Lani K., Stick W. — Cryobiology, 1970, **7**, 1, 47.
31. Smith A. U., Polge C., Smiles J. — J. Roy. Microscop. Soc., ser. 3, 1951, **71**, 2, 186.

Ленинградский НИИ гематологии
и переливания крови

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

Матеріал, захищений авторським правом

АНАЛИЗ ПРОЦЕССОВ КРИСТАЛЛИЗАЦИИ И ОБЕЗВОЖИВАНИЯ КЛЕТОЧНЫХ СУСПЕНЗИЙ*

Ю. А. Иткин, В. Л. Бронштейн, Е. А. Гордиенко

Первой попыткой применения физико-математических методов для изучения процессов, сопровождающих замораживание биологических объектов, явилась работа Мазура [1]. Она сыграла важную роль в понимании явлений, вызывающих повреждение клеток в период замораживания; взгляды, высказанные в этой работе, легли в основу двухфакторной гипотезы [2].

Однако, основываясь на работе [1] и приведенном в ней уравнении, трудно сделать вывод об условиях кристаллообразования в клетке и судить об изменениях концентрации растворенных в ней веществ. Между тем, эти вопросы являются первостепенными для практики в криобиологии. В настоящей работе получено уравнение (11), позволившее дать ответ на поставленные вопросы.

Рассматриваемая система состоит из клетки и ее непосредственного окружения. В клетке отсутствуют вещества, предохраняющие ее от повреждения при замораживании. Предполагается, что во время охлаждения: 1) свойства цитоплазматической мембраны не изменяются; 2) мембрана проницаема только для молекул воды; 3) отсутствуют пространственные температурные градиенты; 4) кинетические процессы во вне- и внутриклеточном растворах отсутствуют, то есть происходит только изменение содержания воды в клетке в силу отсутствия равновесия между вне- и внутриклеточным раствором.

При достаточно медленном охлаждении, когда успевает установиться термодинамическое равновесие между вне- и внутриклеточным раствором, некоторое количество воды будет покидать клетку и протоплазма не будет переохлаждаться. При этих условиях содержимое клетки не замерзает.

Количество воды в клетке и степень ее переохлаждения будут зависеть от скорости замораживания и проницаемости клеточной мембраны. Если вода в клетке будет сильно переохлаждаться, то произойдет внутриклеточная кристаллизация. При малых переохлаждениях она не возникает, по-видимому из-за того, что в живых клетках отсутствуют центры, инициирующие образование зародышей кристаллов.

Из предположения 2 следует, что химический потенциал воды в клетке является функцией только одной переменной величины — количества молекул воды в клетке. Однако в качестве независимой переменной удобно рассматривать не величину N, а суммарную концентрацию растворенных в клетке веществ

$$c = \frac{n_0}{N + n_0}. \tag{1}$$

В качестве независимых переменных выбираем температуру, давление и концентрацию. Предполагая линейную зависимость между потоком воды из клетки и силой, его вызывающей, имеем

$$\frac{dN}{dt} = KS(\mu' - \mu). \tag{2}$$

---

* В работе приняты обозначения: t — время; T — температура; P' — давление вне клетки; $\varkappa$ — постоянная Больцмана; r — радиус клетки; μ, μ' — химические потенциалы воды в клетке и вне клетки; n_0 — количество молекул растворенных в клетке веществ; N — количество молекул воды в клетке; c — суммарная концентрация раствора в клетке; $\mu_л$ — химический потенциал льда; q — теплота кристаллизации чистой воды; K — константа, характеризующая проницаемость клетки для молекул воды; $v_л$, v_0 — объем льда и воды, приходящейся на одну молекулу; ΔT — величина переохлаждения протоплазмы; τ — скорость замораживания; S — площадь поверхности клетки; P — давление в клетке.

Матеріал, захищений авторським правом

Но в силу предположения 4 химический потенциал воды вне клетки

$$\mu' = \mu_л(P', T), \tag{3}$$

откуда

$$\frac{dN}{dt} = KS[\mu_л(P', T) - \mu(P, T, c)] =$$

$$= KS\{\mu_л(P, T) - \mu(P, T, c) + [\mu_л(P', T) - \mu_л(P, T)\}. \tag{4}$$

В уравнении (4) величиной

$$\mu_л(P', T) - \mu_л(P, T) = v_л \Delta P, \tag{5}$$

где $\Delta P = P' - P$, очевидно, можно пренебречь. В результате получим уравнение

$$\frac{dN}{dt} = KS\{\mu_л(P, T) - \mu(P, T, c)\} = -KS\frac{\partial\mu}{\partial c}(P, T, \bar{c})\, c_1, \tag{6}$$

где $\bar{c}(P, T)$ — функция, задающая зависимость температуры замерзания протоплазмы от концентрации растворенных веществ, она определяется из уравнения

$$\mu_л(P, T) = \mu[P, T, \bar{c}(P, T)], \tag{7}$$

а $c_1 = c - \bar{c}$.

При выводе уравнения (6) величина c_1 считалась малой, что соответствует малым переохлаждениям. Из уравнения (6) легко получаются уравнения для N и c_1. Для этого воспользуемся равенством

$$1 - \frac{N}{N + n_0} - \bar{c} - c_1 = 0, \tag{8}$$

получим

$$\frac{dN}{dt} \cdot \tau = -KS\frac{\partial\mu}{\partial c}\left[1 - \frac{N}{N + n_0} - \bar{c}\right], \tag{9}$$

$$\frac{n_0\tau\dfrac{d}{dT}(c_1 + \bar{c})}{(\bar{c} + \bar{c}_1)^2} = -KS\frac{\partial\mu}{\partial c}c_1. \tag{10}$$

Учитывая малость c_1, перепишем уравнение (10) с точностью до членов порядка c_1:

$$\frac{dc_1}{dT} = -\frac{d\bar{c}}{dT}\tau + KS\frac{\partial\mu}{\partial c}\frac{\bar{c}^2 c_1}{n_0}. \tag{11}$$

Уравнение (11) является линейным и легко решается, поэтому оно наиболее удобно для практических расчетов.

В пределе малой концентрации из уравнения (10) легко получается уравнение Мазура [1]. Для этого продифференцируем обе части уравнения по температуре и, заметив, что в пределе малой концентрации

$$\frac{\partial\mu}{\partial c} = -\varkappa T \text{ и } \frac{d\bar{c}}{dT} = \frac{q}{\varkappa T^2},$$

получим

$$\frac{d}{dT}\left[\frac{dN}{dT}\frac{\tau}{KS\,\partial\mu/\partial c}\right] + \frac{q}{\varkappa T^2} + \left\{\frac{dN}{dT}\frac{n_0}{(N + n_0)^2}\right\} = 0. \tag{12}$$

Уравнение (12) отличается от полученного в работе [1] лишь знаменателем в фигурных скобках, который в уравнении Мазура равен не

Матеріал, захищений авторським правом

$(N+n_0)^2$, а $N(N+n_0)$. Заметим, что это отличие несущественно в случае малых концентраций.

На практике важно знать оценку для скоростей охлаждения, при которых переохлаждение протоплазмы ΔT незначительное, т. е. клетки не замерзают. Такая оценка получается, если уравнение (11) переписать с учетом, что $\frac{dc_1}{dT}=0$. Получим

$$\tau \frac{d\bar{c}}{dT} \sim KS \frac{\partial \mu}{\partial c} \bar{c}^2 \frac{c_1}{n_0}, \tag{13}$$

или

$$\Delta T \sim c_1 \left(\frac{dc}{dT}\right)^{-1} \sim \frac{\tau n_0}{\bar{c}^2 KS \partial \mu / \partial c}. \tag{14}$$

Для оценки можно считать, что $\frac{\partial \mu}{\partial c} \sim -\varkappa T$; $\frac{n_0}{\bar{c}} \sim N$; $N \sim \frac{Sr}{3v_0}$, предполагая клетку сферической. Откуда

$$\Delta T \sim \frac{\tau r}{3v_0 K \varkappa T \bar{c}}. \tag{15}$$

Проведенное теоретическое рассмотрение процесса обезвоживания позволяет не только описать изменение объема клеток и концентрации внутриклеточного раствора при замораживании, но и судить о переохлаждении протоплазмы как функции скорости охлаждения и клеточных параметров.

Авторы благодарят старшего научного сотрудника Физико-технического института низких температур канд. физ.-мат. наук Д. Г. Долгополова за полезные замечания и интерес, проявленный к их работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mazur P. — J. Gen. Physiol., 1963, **47**, 347.
2. Mazur P. The Frozen Cell. London, 1970, 69.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

ВЛИЯНИЕ КРИОПРОТЕКТОРОВ НА БЕЛКОВУЮ ФЛУОРЕСЦЕНЦИЮ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

А. М. Грек, В. И. Луговой, Т. П. Бондаренко

По мнению ряда авторов [8—12], 60% белков клетки, часть из которых связана с липидами, чувствительны к замораживанию. Исходя из этого, можно заключить, что повреждением липопротеидов различных клеточных структур объясняется гибель клетки при действии низких температур [13].

Криопротекторы, связывая свободную воду, замедляют кристаллообразование, а также снижают высокие концентрации метаболитов, тем самым предупреждается повреждение белковых и липопротеидных молекул при замораживании [14—16]. Возможно также, что криозащитные агенты способны вызывать изменения конформации макромолекул с образованием структур более устойчивых к действию низких температур.

Матеріал, захищений авторським правом

Изучение спектров белковой флуоресценции может быть одним из адекватных методов выяснения состояния хромофорных групп белка и возможных изменений его конформации под влиянием различных воздействий [1—7].

В настоящей работе поставлена задача изучить влияние криопротекторов на спектры флуоресценции мембран эритроцитов. Мембраны эритроцитов выделяли по методу Доджа и соавт. [10] и суспендировали в растворе Тироде. Спектры флуоресценции мембран эритроцитов регистрировали на спектрофлуориметре MPF-2A фирмы «Хитачи» при $\lambda_{возб}$ равной 280 и 296 *нм* в присутствии криопротекторов: полиэтиленоксида с молекулярным весом 400 и 4000 (ПЭО-400 и ПЭО-4000), глицерина в 15%-ной концентрации и поливинилпирролидона (ПВП) с молекулярным весом 19 900 в 8%-ной концентрации.

Установлено, что максимумы флуоресценции мембран эритроцитов находятся в области 330 *нм* при $\lambda_{возб}=280$ и $\lambda_{возб}=296$ *нм*. В присутствии ПЭО-400 и ПЭО-4000 при $\lambda_{возб}=280$ *нм* положение максимума спектра флуоресценции не изменялось, для глицерина и ПВП отмечалось смещение максимумов соответственно в коротковолновую и длинноволновую области. При $\lambda_{возб}=296$ *нм* отмечался длинноволновой сдвиг максимума спектра флуоресценции для всех криопротекторов, за исключением глицерина, в присутствии последнего положение максимума спектра не изменялось (таблица).

Влияние криопротекторов на спектры флуоресценции мембран эритроцитов человека, λ_{max}

Условия опыта	$\lambda_{возб}$ = 280 *нм*	$\lambda_{возб}$ = 296 *нм*
Без добавления криопротекторов	331,0±0,27 $n=5$	330,9±0,19 $n=5$
Добавление 15%-ного глицерина	330,2±0,12 $n=5$ $P<0,02$	330,6±0,17 $n=5$ $P=0,2$
„ 15%-ного ПЭО-400	331,9±0,33 $n=5$ $P<0,1$	334,0 $n=5$ $P<0,001$
„ 15%-ного ПЭО-4000	331,4±0,46 $n=5$ $P<0,4$	337,7±0,46 $n=5$ $P<0,001$
„ 8%-ного ПВП	375,4±0,24 $n=5$ $P<0,001$	383,6±0,4 $n=5$ $P<0,001$

Известно, что флуоресценция белков в основном обусловлена ароматическими аминокислотами — триптофаном и тирозином. При $\lambda_{возб}=280$ и $\lambda_{возб}=296$ *нм* для белков, содержащих триптофан и тирозин, положение максимума спектра флуоресценции не зависит от длины волны возбуждения, т. е. спектр флуоресценции определяется только триптофановыми остатками [1—7]. Считается, что тирозин в этой группе белков находится в нефлуоресцирующем состоянии вследствие образования водородной связи между гидроксилом тирозина и карбоксильными группами соседних пептидных цепей [2]. Аналогичная независимость положения максимума спектра флуоресценции отмечается и для нативных мембран эритроцитов: флуоресценция мембран также определяется триптофановыми остатками мембранных белков, тирозин находится в нефлуоресцирующем состоянии [6]. Следует отметить, что триптофановые остатки в мембранных белках характеризуются крайне гидрофобным состоянием и максимумом флуоресценции равным 330—331 *нм*.

Матеріал, захищений авторським правом

Положение максимума флуоресценции остатков триптофана в коротковолновой части спектра может объясняться гидрофобным взаимодействием липидно-белкового комплекса, которое, вероятно, и определяет физико-химические свойства микроокружения хромофорных групп мембранных белков. Физико-химические свойства микроокружения могут изменяться не только вследствие гидрофобного взаимодействия липидно-белкового комплекса [3], но и в результате изменения полярных свойств растворителя [4].

Ранее нами [5] было показано изменение диэлектрической проницаемости растворителя от содержания криопротекторов (ПЭО, глицерина, ПВП) в водном растворе и зависимость положения максимума спектра флуоресценции хромофорных групп бычьего сывороточного альбумина от диэлектрических свойств растворителя. Однако отмеченный неодинаковый сдвиг максимума спектра флуоресценции для мембран в присутствии ПЭО-400, ПЭО-4000 и ПВП при $\lambda_{возб}=296$ *нм* и при $\lambda_{возб}=280$ *нм*, вероятно, нельзя объяснить только изменением диэлектрических свойств растворителя.

Спектр флуоресценции мембран эритроцитов при $\lambda_{возб}=280$ *нм* представляет собой суммарный спектр свечения тирозиновых и триптофановых остатков, но в гидрофобных областях макромолекулы белка из-за наличия тирозил-карбоксилатной водородной связи остаток тирозина находится в нефлуоресцирующем состоянии. Разрыв этих связей приводит к изменению спектральных характеристик, в частности, к сдвигу максимума спектров флуоресценции в сторону длинноволновой части спектра [2, 9]. Если бы свечение при $\lambda_{возб}=280$ *нм* и $\lambda_{возб}=296$ *нм* в присутствии указанных криопротекторов определялось только триптофановыми остатками, сдвиг был бы примерно одинаковый, так как положение максимума спектра флуоресценции для тирозиновых остатков мало зависит от диэлектрических свойств растворителя [17].

Исходя из этого, можно заключить, что криопротекторы ПЭО-400, ПЭО-4000 и ПВП могут, вероятно, влиять определенным образом на систему водородных связей, тем самым увеличивая вклад тирозиновых остатков в свечении мембранных белков.

Сдвиг максимума спектра флуоресценции мембран в присутствии глицерина в сторону коротковолновой части спектра можно объяснить его слабополярными свойствами. Глицерин может проникать в толщу глобулы белка [11] и тем самым увеличивать гидрофобность микроокружения вокруг хромофорных групп.

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров Ю. А. Фотохимия и люминесценция белков. М., «Наука», 1965.
2. Владимиров Ю. А. — ДАН СССР, 1960, **136**, 960.
3. Владимиров Ю. А., Поглазов А. Ф. — В кн.: Биологические мембраны. М., «Медицина», 1974, 20.
4. Гладченко Л. Ф., Пикулик Л. Г. — Журнал прикладной спектроскопии, 1967, **66**, 49.
5. Грек А. М., Луговой В. И., Белоус А. М. — Укр. біохім. журнал, 1974, **46**, 62.
6. Клебанов Г. И., Сороковой В. И., Владимиров Ю. А. — Мол. биол., 1972, **6**, 189.
7. Конев С. В. Электронно-возбужденные состояния биополимеров. Минск, «Наука и техника», 1965.
8. Хебер У. — В кн.: Клетка и температура среды. М.—Л., «Наука и техника», 1964, 23.
9. Cowgill R. — Arch. Biochem. Biophys., 1964, **104**, 84.
10. Dodge J., Mitchell C., Hanahan D. — Arch. Biochem. Biophys., 1963, **100**, 119.
11. Herskovits T., Sorensen M. — Biochemistry, 1268, **7**, 2533.
12. Lovelock J. — Proc. Roy. Soc., ser. Biol., 1957, **147**, 427.
13. Lovelock J. — Biochem. Biophys. Acta, 1953, **10**, 414.
14. Lovelock J., Bishop M. — Nature, 1959, **183**, 1394.

Матеріал, захищений авторським правом

15. Mazur P. — Science, 1970, 168, 939.
16. Meryman H. Cryobiology. London — N. Y., Acad. Press, 1966, 25.
17. Weber Y., Young L. — J. Biol. Chem., 1964, 239, 1424.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

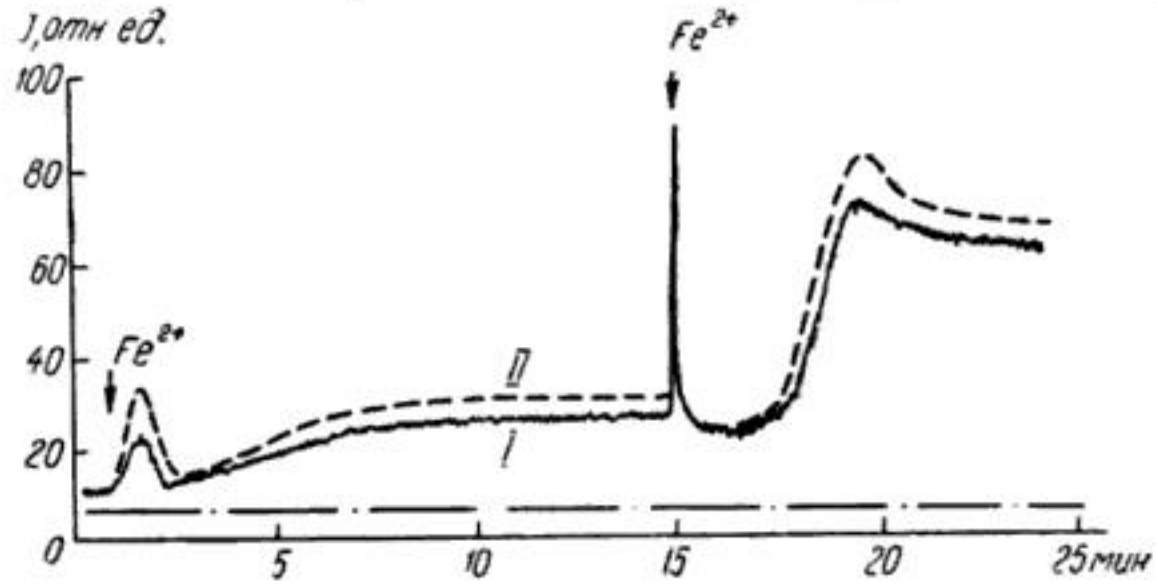
Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

ВЛИЯНИЕ БЫСТРОГО ЗАМОРАЖИВАНИЯ-ОТТАИВАНИЯ НА СТИМУЛИРУЕМУЮ Fe^{2+} ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ МИТОХОНДРИЙ

В. А. Бондаренко

Как известно, сверхслабое свечение митохондрий непосредственно связано с перекисным окислением липидов [2].

Характерной особенностью реакций переокисления липидов является их цепной, свободнорадикальный характер, что в определенных



Динамика хемилюминесценции митохондрий:
I — нормальных, *II* — подвергнутых быстрому замораживанию-оттаиванию: горизонтальная линия — фон; стрелками показано добавление $FeSO_4$.

условиях обуславливает высокую скорость окисления субстрата. В митохондриях при этом наблюдаются набухание и лизис, повреждение ферментных систем [3].

Согласно теории А. А. Берлина, химические превращения, вызванные замораживанием биологических препаратов, приводят к развитию свободнорадикальных процессов, следствием чего может быть переокисление липидов [1]. В то же время количество связанных липидов, являющихся субстратом переокисления, в тканях после замораживания уменьшается [4].

В настоящей работе исследовалось влияние быстрого замораживания-оттаивания на свечение митохондрий в присутствии ионов Fe^{2+}. После центрифугирования осадок митохондрий суспендировали в 0,25 М сахарозе. Суспензию делили на две части, одна исследовалась как контрольная, другая подвергалась замораживанию-оттаиванию. Замораживали по 1 *мл* суспензии в стеклянных контейнерах, погружая их в жидкий азот. Оттаивали на водяной бане при температуре 37°, после чего, введя в систему ионы Fe^{2+} в качестве активатора, производили регистрацию хемилюминесценции.

Замораживание-оттаивание приводит к заметному изменению картины свечения, о чем свидетельствуют кривые люминесценции (рисунок). При этом отмечается: 1) увеличение интенсивности хемилюминесценции митохондрий, подвергнутых замораживанию-оттаиванию, по сравнению с контролем; 2) усиление свечения митохондрий, подвергнутых замораживанию-оттаиванию, в фазе медленной вспышки

Матеріал, захищений авторським правом

(1—4 *мин* регистрации); 3) повышение активирующего действия ионов Fe^{2+} после повторного добавления к суспензии митохондрий, подвергнутых замораживанию-оттаиванию.

Изменение картины свечения объясняется повреждающим действием замораживания-оттаивания. Под влиянием этих факторов происходят разрывы в липопротеидных комплексах мембран, количество свободных липидов при этом увеличивается [5]. Вследствие этого количество субстрата, способного окисляться, увеличивается, что приводит к усилению интенсивности хемилюминесценции митохондрий, подвергнутых замораживанию-оттаиванию. Помимо этого, изменение картины свечения в фазе медленной вспышки свидетельствует о повышении скорости накопления гидроперекисей в митохондриях, подвергнутых замораживанию-оттаиванию. Последнее, вследствие токсичности перекисей, имеет существенное значение для функционального состояния митохондрий.

Таким образом, быстрое замораживание-оттаивание приводит к повреждению мембран митохондрий, что отражается на изменении динамики хемилюминесценции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Берлин А. А. — Биофизика, 1963, 8, 28.
2. Владимиров Ю. А., Львова О. Ф. — Биофизика, 1964, 9, 506.
3. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., «Наука», 1972.
4. Джафаров А. И. — Физико-химические свойства замороженных и консервированных тканей. Автореф. канд. дис. М., 1965.
5. Lovelock J. E. — Proc. Roy. Soc., 1957, B147, 427.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛЯРОГРАФИЧЕСКОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ НАПРЯЖЕНИЯ КИСЛОРОДА В СЕМЕННИКАХ КРЫС ПРИ ОЦЕНКЕ ИХ БИОЛОГИЧЕСКОЙ СОХРАННОСТИ

В. М. Сахнович

При консервации органов и тканей большое значение имеет своевременная оценка их биологической сохранности. Она позволяет определить функциональную активность тканей на этапах изъятия, консервации и трансплантации.

Целью настоящего исследования явилось изучение возможности использования полярографического метода для оценки биологической сохранности семенника на различных этапах консервации.

Исследования проводились на 65 половозрелых крысах весом 120—140 *г*, наркотизированных тиопенталом натрия (0,2 *мг/г* веса животного). Производилась регионарная перфузия семенников. Электрод вводили в наружно-верхний квадрант семенника на глубину 5 *мм*.

Полученные данные показывают, что напряжение кислорода (pO_2) в тестикулярной ткани с нормальным кровообращением составляет 26,37±4,33 *мм* рт. ст., что приближается к значениям таких активно функционирующих тканей, как сердце [5], печень [4], головной мозг [3].

После остановки сердца животного pO_2 в тканях семенника снижается до 3,67±0,78 *мм* рт. ст., 15—20-минутная ишемия, вызванная пережатием сосудов, питающих семенник, приводит к снижению pO_2 с 26,37±4,33 до 13,08±1,34 *мм* рт. ст. Снятие зажима с сосудов сопро-

Матеріал, захищений авторським правом

вождается дальнейшим снижением pO_2 до 11,65±1,37 *мм* рт. ст., что, возможно, обусловлено усиленным потреблением кислорода ишемизированной тканью. После возобновления кровообращения pO_2 восстанавливается до исходной величины уже через 15—20 *мин*.

В процессе работы исследовалась зависимость pO_2 в семенниках от режима перфузии и состава перфузата. При перфузии семенников с производительностью насоса 3 *мл/мин* pO_2 равно 6,00±1,81 *мм* рт. ст., а при 6 *мл/мин* — 12,81±2,74 *мм* рт. ст.

Ответная реакция тканей на действие катехоламинов является одним из функциональных тестов, характеризующих состояние окислительно-восстановительных процессов. Введение 0,1%-ного адреналина (0,03 *мл/г* веса) в перфузионную систему вызывает двухфазные изменения pO_2: в течение 10 *сек* pO_2 увеличивается с 12,84±2,74 до 52,40±1,74 *мм* рт. ст., затем на 10-й секунде снижается до исходного уровня; через 30 *сек* происходит повторный подъем pO_2 до 42,90±±0,75 *мм* рт. ст., с последующим резким снижением до исходных величин.

Изучалось также действие криопротектора на тестикулярную ткань; pO_2 измеряли в семенниках перфузированных оксигенированным 5%-ным раствором полиэтиленоксида с молекулярным весом 400 (ПЭО-400) на среде Хэнкса, с производительностью насоса 6 *мл/мин*. Оно оказалось равным 9,67±1,69 *мм* рт. ст.

Введение адреналина, как и в случае перфузии средой Хенкса, вызывает двухфазные изменения pO_2: сначала отмечается увеличение до 18,25±1,23 *мм* рт. ст., с последующим резким снижением до 12,81±±2,74 *мм* рт. ст.; через 20 *сек* наблюдается повторное увеличение pO_2 до 18,25±1,23 *мм* рт. ст., через 20—30 *сек* оно снижается до исходной величины.

Можно предположить, что перфузия семенников средой Хэнкса не оказывает компенсирующего действия, вероятно, потому, что указанный раствор состоит преимущественно из электролитов и к переносу кислорода способен в незначительной мере. Раствор криопротектора по тем же причинам не может оказать компенсирующего действия.

Введение адреналина как при перфузии средой Хэнкса, так и 5%-ным раствором ПЭО-400 вызывает изменения pO_2.

Сравнительно меньший ответ на адреналин тестикулярной ткани, перфузированной раствором ПЭО-400, по-видимому, обусловлен проявлением псевдотоксического эффекта криопротектора.

Полученные результаты подтверждают данные [1, 2, 5], что уровень pO_2 является одним из показателей функционального состояния ткани и может быть использован для оценки жизнеспособности семенника на этапах заготовки, консервации и перед трансплантацией.

ЛИТЕРАТУРА

1. Березовский В. А. — В кн.: Полярографическое определение кислорода в биологических объектах. Тез. докл. II Всесоюз. симпозиума. Киев, «Наукова думка», 1972, 18.
2. Зоров Д. Б., Мохова Е. Н. — Биологические науки, 7, 1973, 45.
3. Коваленко Е. А., Панков В. Л., Черняков И. Н. — Бюл. эксперим. биол. и мед., 1963, 1, 43.
4. Мансурова И. Д., Игаджик Ф. С. — В кн.: Актуальные вопросы патологии печени, 3. Горький, «Наука», 1965, 147.
5. Расторгуев Б. П., Шаргородский Б. М. — Патол. физиология и эксперим. терапия, 9, 6, 1965, 82.
6. Kirk E., Hohig C. — Am. J. Physiol., 1964, 267, 2.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

Матеріал, захищений авторським правом

ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАЗВУКОВЫХ КОЛЕБАНИЙ НА КРИСТАЛЛИЗАЦИЮ СПЕРМЫ БЫКОВ

В. И. Вишневский, А. В. Марющенко

Выживаемость клеток при замораживании тесным образом связана с условиями возникновения кристаллов льда вне и внутри этих клеток. Успех замораживания многие авторы связывают со скоростью льдообразования, величиной и формой кристаллов и их взаимодействием с живыми клетками [2, 6].

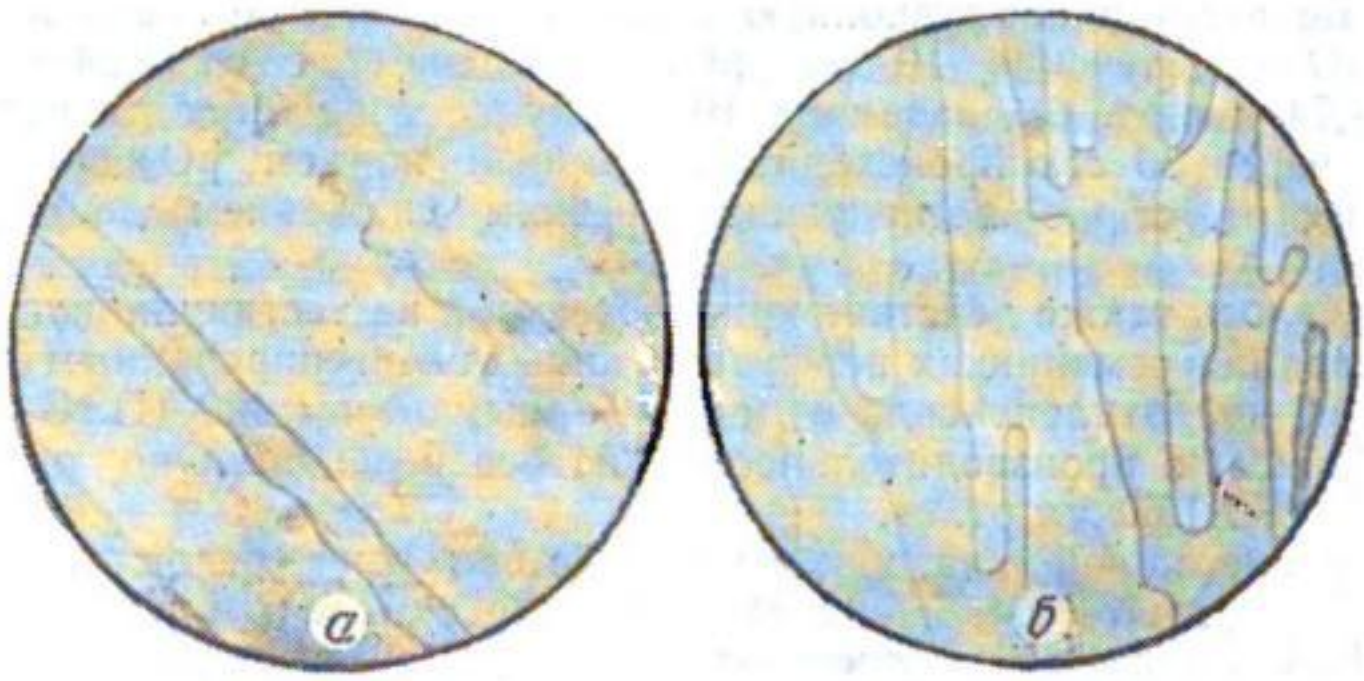


Рис. 1. Кристаллы льда в сперме без глицерина и воздействия ультразвуком (*а*) и при действии ультразвука (*б*).

Изучая действие ультразвуковых колебаний на сперму сельскохозяйственных животных, нам необходимо было выяснить влияние ультразвука на характер кристаллообразования льда в сперме при замораживании.

В. И. Данилов [4] показал, что ультразвуковые колебания существенно влияют на протекание кристаллизации в переохлажденных жидкостях и могут вызывать заметное измельчение зерна первичной кристаллизации. Диспергирующее действие ультразвука проявляется в увеличении скорости появления твердой фазы.

Л. О. Мелешко [5] при действии ультразвука наблюдал массовое образование новых центров кристаллизации на ранее гладкой границе кристалл—расплав. Новые центры соединялись с растущими кристаллами, обуславливая быстрое передвижение фронта кристаллизации. Если без ультразвукового поля кристаллизация определенной доли маточного раствора длилась 22 *мин*, то в ультразвуковом поле срок ее сокращался до 5, 6 *мин*. Действие ультразвука не ограничивалось превращением части растущих кристаллов в новые центры, но оказывало влияние и на процесс возникновения в расплаве зародышей новой фазы.

Ф. К. Горский [3] объясняет природу мелкокристаллической структуры при кристаллизации в ультразвуковом поле тем, что при действии ультразвука от поверхности растущего кристалла механически отрываются осколки, выбрасываемые по направлению роста кристаллов. Эти осколки становятся новыми зародышами кристаллов.

Сперму быков-производителей разбавляли первой средой: глюкозо-цитратно-желточной (воды дистиллированной 100 *мл*, глюкозы 3 *г*, цитрата натрия 1,4 *г*, желтка 20 *мл*). Вторая среда с глицерином имела следующий состав: воды дистиллированной 100 *мл*, глюкозы 5 *г*, цитрата натрия 2,4 *г*, желтка 20 *мл*, глицерина 15 *мл*. Конечную среду получали смешиванием первой и второй сред в соотношении 1 : 1, в результате чего конечная концентрация глицерина была равной 7,5%.

Матеріал, захищений авторським правом

Рис. 2. Кристаллизация спермы с 7,5% глицерина без воздействия ультразвука при скорости охлаждения 1° (*а*), 2° (*б*), 6° (*в*) и 12° в 1 *мин* (*г*).

Рис. 3. Кристаллизация спермы с 7,5% глицерина при действии ультразвуковых колебаний при скорости охлаждения 1° (*а*), 2° (*б*), 6° (*в*) и 12° в 1 *мин* (*г*).

Матеріал, захищений авторським правом

Исследовали кристаллизацию спермы, разбавленной первой средой без глицерина, конечной средой с 7,5% глицерина и второй средой с 15% глицерина. Наблюдение и фотографирование кристаллизации производили на специальной установке для криомикроскопии, позволяющей исследовать процессы кристаллизации при регулированной скорости охлаждения [1].

Для того чтобы определить влияние ультразвука на рост кристаллов льда, головку излучателя ультразвуковых колебаний подводили снизу к предметному охлаждаемому стеклу рядом с наблюдаемым

Рис. 4. Кристаллизация спермы с глицерином (15%) без действия ультразвука.

Рис. 5. Кристаллизация спермы с глицерином (15%) при действии ультразвука.

объектом. В качестве источника ультразвука использовали прибор УТП-1, работающий на частоте 880 *кгц*. Максимальная интенсивность ультразвукового излучения в непрерывном режиме 2 *вт/см*^{2}. Точка приложения ультразвуковых колебаний находилась не прямо под озвучиваемым препаратом, поэтому действительная интенсивность была меньше. Процессы кристаллизации изучали при скоростях охлаждения 1°, 2°, 6°, 12° в 1 *мин*.

Исследование кристаллообразования льда в сперме, разбавленной глюкозо-цитратно-желточной средой без глицерина, показало, что при замораживании в ультразвуковом поле кристаллы льда растут с бóльшими разветвлениями, чем без ультразвука. При скорости охлаждения 1° в 1 *мин* без ультразвука кристаллы льда имеют вид прямых стволов достаточно больших размеров (рис. 1, *а*). При действии ультразвука у кристаллов льда появляются достаточно крупные боковые отростки (рис. 1, *б*). В сперме с 7,5% глицерина кристаллы при этой же скорости охлаждения несколько меньше, а разветвленность их большая (рис. 2, *а*). Во время замораживания с ультразвуком количество отростков увеличивается, форма их несколько искривляется, а осевая направленность нарушается (рис. 3, *а*). При более высоких скоростях охлаждения эти явления сохраняются при общем уменьшении величины кристаллов льда с увеличением скорости охлаждения (см. рис. 2, *б*; 3, *б*). И хотя при больших скоростях замораживания (6—12° в 1 *мин*) разница в размерах кристаллов почти незаметна, тем не менее, в расположении их отмечена большая беспорядочность, обусловленная возникновением под влиянием ультразвуковых колебаний дополнительных центров кристаллизации льда (см. рис. 2, *в*; 3, *в*; 2, *г*; 3, *г*).

При увеличении количества глицерина до 15% кристаллы образуются еще более мелкие и округлые. Даже при скорости 2° в 1 *мин* величина их достаточно мала по сравнению с образцами спермы без глицерина (рис. 4, 5). Влияние ультразвука проявляется в разветвлении и нарушении линейности роста кристаллов.

Матеріал, захищений авторським правом

Таким образом, ультразвуковые колебания, не повреждая спермы (по данным активности и переживаемости), влияют на кристаллизацию спермы во время замораживания, изменяют ее характер и форму. Это обстоятельство следует учитывать при применении ультразвука для низкотемпературной консервации спермы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вишневский В. И. — Вестник с.-х. науки, 1969, 6, 109.
2. Воротилин А. М., Манжелий В. Г., Данилина В. В. — Клин. хирургия, 1967, 4, 52.
3. Горский Ф. К. — Изв. АН БССР, 1950, 6, 117.
4. Данилов В. И. — В кн.: Строение и кристаллизация жидкости. Киев, «Наукова думка», 1956.
5. Мелешко Л. О. — Инж.-физ. журнал, 1961, **14**, 123.
6. Пушкарь Н. С., Иткин Ю. А., Даценко Б. М., Козьмин Ю. В. — В кн.: Сб. науч. трудов Харьковского мед. института, 69. 1967, 62.

Научно-исследовательский
институт животноводства
Лесостепи и Полесья УССР

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

КРИОСКОПИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СПЕРМЫ БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ

Ф. И. Осташко, Я. П. Раковский,
М. П. Павленко, Б. А. Скорняков

Одним из условий эффективной низкотемпературной консервации клеток является устранение действия осмотических явлений. Это обуславливает актуальность изучения осмотических свойств клеточных суспензий, искусственных сред для них, а также динамики изменения этих свойств при охлаждении.

Последние работы, посвященные этому вопросу [2, 5, 8], не раскрывают в полной мере связь осмотических параметров с физиологической полноценностью спермиев. Одной из основных причин этого является отсутствие приемлемых, достаточно простых методов и аппаратуры для определения этих параметров в биологических жидкостях. Применяющиеся в настоящее время способы измерения осмотического давления [6, 7, 9] удовлетворяют требованиям, предъявляемым к лабораторным опытам, но непригодны для научных комплексных исследований по консервации и хранению спермы.

В связи с отмеченным нами были разработаны и изготовлены два типа осмометра и проведено изучение концентрации осмотически активных веществ в сперме быков-производителей, подвергаемой низкотемпературной консервации.

Принцип действия разработанных приборов основан на точном измерении депрессии температуры замерзания биологических жидкостей. Приборы выполнены в виде двух блоков — малогабаритного блока термометра и охлаждающего устройства, созданного на основе термоэлектрического охлаждающего столика ТОС-1.

С помощью разработанных приборов проведено измерение концентрации осмотически активных веществ в трех последовательных эякулятах 137 клинически здоровых быков-производителей разных пород. Кроме концентрации осмотически активных веществ, в каждом эякуляте определяли активность (часть прямолинейно подвижных спермиев, оцененная по десятибалльной шкале), а также концентрацию и объем спермы.

Матеріал, захищений авторським правом

Результаты измерений, просчитанные на ЭВМ, показывают, что осмотическая концентрация в сперме быков симментальской породы была в первых эякулятах 313±1,5 *мосм/л*, во вторых — 317±1,7 и в третьих — 313±2,4 *мосм/л*. Для быков айрширской породы соответственно в первых эякулятах 313,5±2,7 *мосм/л*, во вторых — 315±3,5 и в третьих — 312,5±4,2 *мосм/л*. Концентрация осмотически активных веществ в среднем по всем взятым эякулятам для быков чернопестрой породы составила 312,4±2,8 *мосм/л*, для лебединской — 315±3,8 и для красной степной — 316±3,5 *мосм/л*.

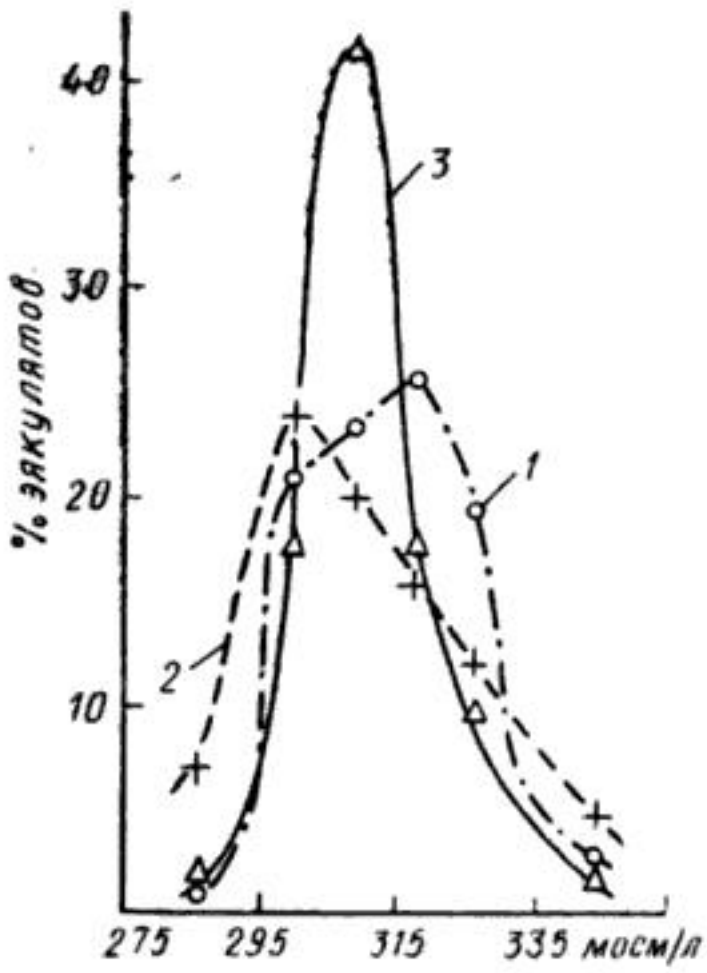


Рис. 1. Распределение спермы быков разных пород по осмотическим концентрациям:

1 — симментальская порода; *2* — чернопестрая; *3* — красная степная. Здесь и далее по оси абсцисс — концентрация осмотически активных веществ.

Пределы колебаний концентрации осмотически активных веществ для спермы быков всех изученных пород составляли 284—366 *мосм/л*. Причем осмотическая концентрация, близкая к средней (304—321 *мосм/л*), была у 49% эякулятов быков симментальской породы, у 59,6% айрширской, у 36% чернопестрой и у 68% красной степной (рис. 1).

Как следует из приведенного графика, распределения эякулятов по концентрациям осмотически активных веществ для разных пород быков различны. Так, у быков чернопестрой породы максимальное количество эякулятов лежит в интервале концентраций 295—304 *мосм/л*, для красной степной породы максимум приходится на 304—312 *мосм/л*, для симментальской породы — 312—321 *мосм/л*.

В связи с отмеченным можно предположить, что использование стандартного разбавителя для различных по осмотическим концентрациям эякулятов спермы, по-видимому, и обуславливает некоторое различие последних в способности переносить замораживание.

Результаты математической обработки показали, что 59,6% вторых эякулятов имеют концентрацию осмотически активных веществ бóльшую, а 57,1% третьих эякулятов — меньшую, чем первые эякуляты. Это подтверждают и графики распределения эякулятов по шкале осмотических концентраций (рис. 2).

Анализ приведенных кривых свидетельствует о том, что первые эякуляты имеют более широкую область осмотических концентраций. Максимум распределения для первых эякулятов приходится на концентрацию 308 *мосм/л*, для вторых — на 312 и для третьих — 304 *мосм/л*.

Нами был проведен анализ степени взаимосвязи концентрации осмотически активных веществ в сперме с другими качественными показателями. Корреляционный анализ выявил, что для связи между осмотической концентрацией и активностью спермы коэффициент корреляции $r=0{,}037\pm0{,}053$; $P>0{,}5$, для связи между осмотической концентрацией и объемом эякулята $r=0{,}028\pm0{,}055$; $P>0{,}5$.

Средняя концентрация осмотически активных веществ в сперме с оценкой 8,0 балла равна 315±1,2 *мосм/л* и мало отличается от соответствующей величины осмотической концентрации для выбракованной по активности и концентрации спермы (313±1,3 *мосм/л*), а также для спермы, выдержавшей замораживание (314±1,1 *мосм/л*).

На рис. 3 приведены кривые распределения эякулятов по шкале концентраций осмотически активных веществ. Как следует из графиков

Матеріал, захищений авторським правом

распределений, в выбракованной перед замораживанием сперме большинство эякулятов имеет осмотическую концентрацию 299 *мосм/л*, в сперме высокого качества 75,6% эякулятов имеют осмотическую концентрацию выше 304 *мосм/л*, а в сперме, которую замораживали, 80% эякулятов имеют осмотическую концентрацию выше 304 *мосм/л*.

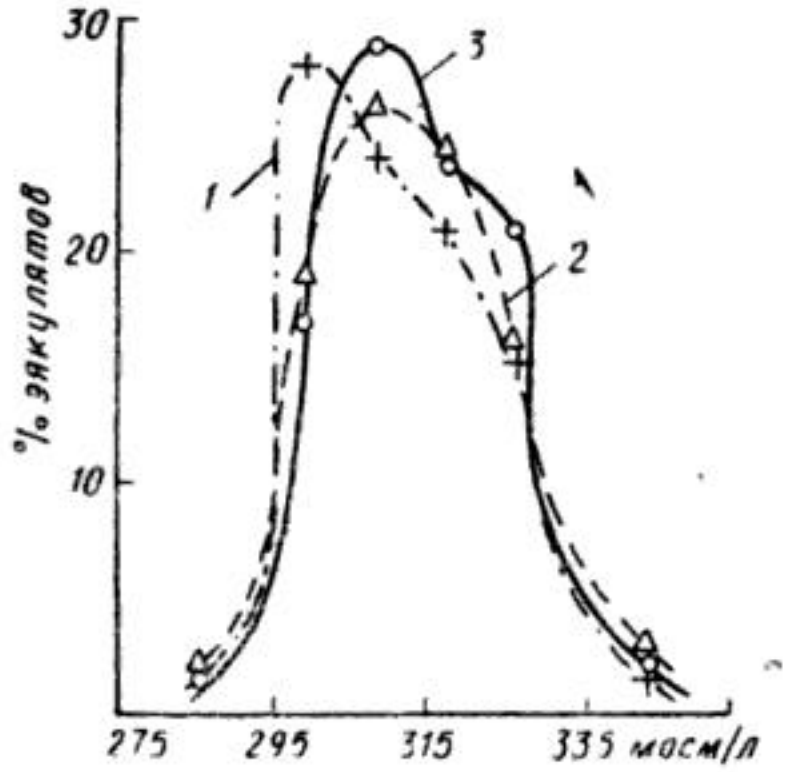


Рис. 2. Распределение трех последовательных эякулятов по концентрациям осмотически активных веществ:

1 — первые эякуляты; *2* — вторые эякуляты; *3* — третьи эякуляты.

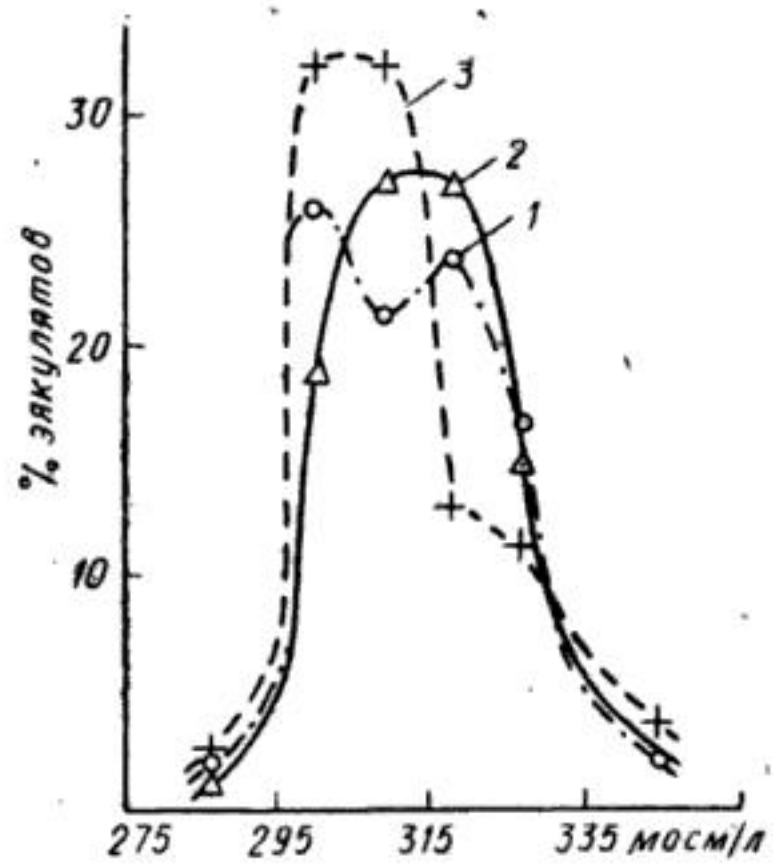


Рис. 3. Распределение выбракованных, принятых к консервации и прошедших замораживание эякулятов по концентрациям осмотически активных веществ:

1 — выбракованные эякуляты; *2* — эякуляты, принятые к консервации; *3* — эякуляты после замораживания с активностью не ниже 4 баллов.

Полученные нами результаты хорошо согласуются с данными М. Г. Ковалева [3] и Г. Г. Козлова [4, 5], которые проводили исследования принципиально отличным от нашего методом — методом Хила [6]. В работе А. З. Емца [1] использован криоскопический метод, но результаты измерений выше, чем в наших исследованиях, на 15,5 *мосм/л*. А. З. Емец отмечает наличие высокой корреляции осмотического давления спермы с активностью и концентрацией спермиев в ней, чего в нашей работе не отмечено.

ЛИТЕРАТУРА

1. Емец А. З. — В кн.: Наукові праці Української с.-г. академії, 41. 1971, 25.
2. Ковальов М. Г. Розведення і утримання сільськогосподарських тварин. Київ, «Урожай», 1965, 5, 31.
3. Ковалев М. Г. Изучение некоторых вопросов биологии и усовершенствование методов хранения спермы производителей. Автореф. канд. дис. Витебск, 1966.
4. Козлов Г. Г. — В кн.: Материалы науч. конф. по вопросам ветеринарии. М., «Колос», 1971, 1, 203.
5. Козлов Г. Г. — В кн.: Науч. труды Московской ветеринарной академии, 62. 1972, 109.
6. Осташко Ф. И., Магда В. И. — Лабор. дело, 1964, 12, 521.
7. Пак С. Г., Титов В. В., Кульчихин В. В. — Лабор. дело, 1972, 6, 331.
8. Смирнов И. В., Емец А. З. — Животноводство, 1971, 5, 80.
9. Соколова М. М. — Лабор. дело, 1967, 10, 589.

Научно-исследовательский
институт животноводства
Лесостепи и Полесья УССР

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

Матеріал, захищений авторським правом

КАЛОРИМЕТРИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ НЕКОТОРЫХ КРИОФИЛАКТИКОВ

Ю. П. Тимошенко

Калориметрия — наиболее распространенный метод экспериментального определения эффектов, связанных с изменением температуры или фазовыми превращениями вещества. Прецизионные измерения проводят методом абсолютной калориметрии [1], измерения тепловых эффектов, сопровождающих динамику нагрева или охлаждения, — методом дифференциальной калориметрии [2].

Исследования проводились на абсолютном калориметре с адиабатной оболочкой и на дифференциально-сканирующем микрокалориметре (ДСМ-2).

Измерена теплоемкость глицерина в диапазоне температур от +20° до —120°, удельная зависимость которой представлена на рис. 1, *а*. В большом интервале температур теплоемкость жидкого глицерина приблизительно линейна и описывается зависимостью $C_p = K_1 T$, где $K_1 = 0{,}4$ *дж/моль·град*. При переходе в стеклообразное состояние в области температур —78°÷—85° теплоемкость глицерина резко снижается.

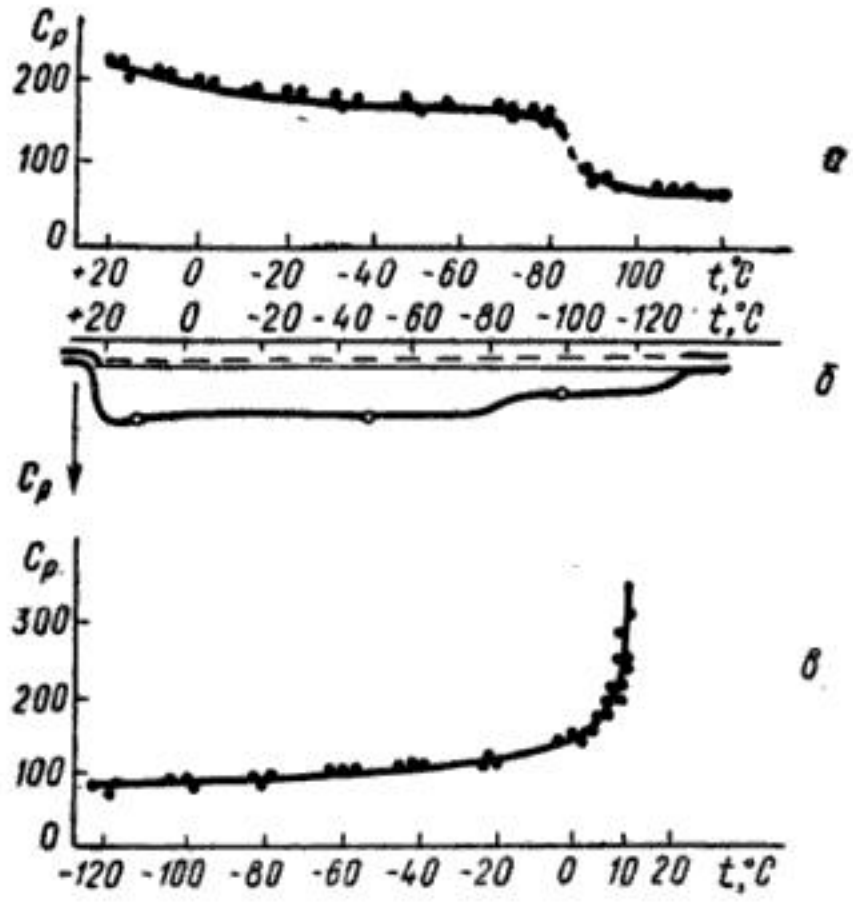


Рис. 1. Зависимость удельной теплоемкости глицерина от температуры: при медленном охлаждении (*а*), при охлаждении со скоростью 1° в 1 *мин* (*б*), при медленном нагревании (*в*).

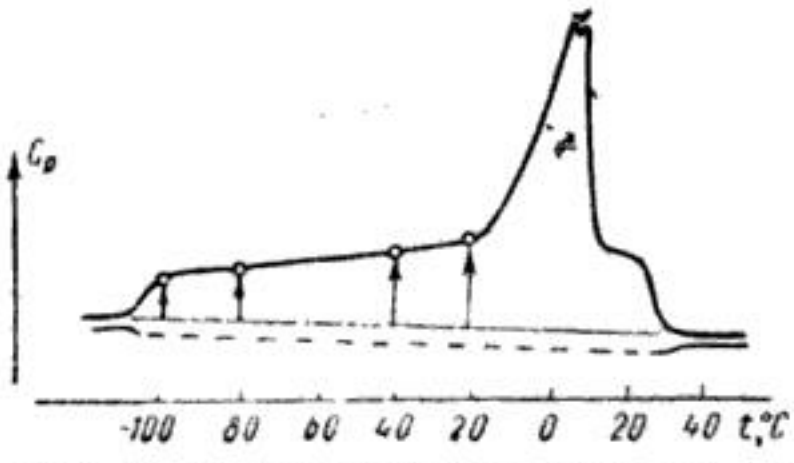


Рис. 2. Ход зависимости удельной теплоемкости ПЭО-400 при нагревании со скоростью 1° в 1 *мин*.

Кривая на рис. 1, *б* снята на ДСМ-2 для глицерина при скорости охлаждения 1° в 1 *мин* и отражает ход зависимости изменения удельной теплоемкости от температуры при определенной скорости сканирования. Величины теплоемкости глицерина C_p рассчитаны для трех точек при температурах +10°, —50°, —100° и соответственно равны: 0,52, 0,48, 0,22 (*кал/г·град*). В области температур —75°÷—80°, соответствующей температуре стеклования глицерина, наблюдается резкое изменение удельной теплоемкости, которое можно разделить на вклады, обусловленные конфигурационными эффектами и эффектами, связанными с тепловыми колебаниями. При переходе в стеклообразное состояние конфигурационный эффект отсутствует, поэтому теплоемкость стеклообразного глицерина примерно равна теплоемкости глицерина кристаллического.

На рис. 1, *в* приведена зависимость теплоемкости от температуры при ее повышении для кристаллообразного глицерина. Кристаллообразное состояние в данном случае вызывалось внесением кристаллической затравки при охлаждении образца. Теплоемкость кристалличе-

Матеріал, захищений авторським правом

ского глицерина можно описать зависимостью $C_p = K_2T$, где $K_2 = 0{,}3$ *дж/моль·град*. При приближении к точке плавления, начиная с температуры —35°, сказывается «эффект предплавления», что приводит к отклонению теплоемкости от вышеуказанной зависимости. Появление избыточной молярной теплоемкости может быть вызвано также возрастанием дефектов структуры в кристалле при переходе к плавлению.

Сравнительные исследования, проведенные двумя калориметрическими методами, показали, что методом дифференциально-сканирующей микрокалориметрии можно проводить измерения теплоемкости в области отрицательных температур с погрешностью 5÷7%. С помощью этого метода просто, быстро и на относительно малых образцах можно получить сведения о термодинамических параметрах образца. Хорошая стабильность базовой линии прибора ДСМ-2 и высокая чувствительность (10^{-5} *вт*) позволяют регистрировать любой переход, сопровождающийся изменением теплоемкости в исследуемом веществе. Так, область стеклования для оксиэтилированных глицеринов лежит в пределах —70°÷—75°.

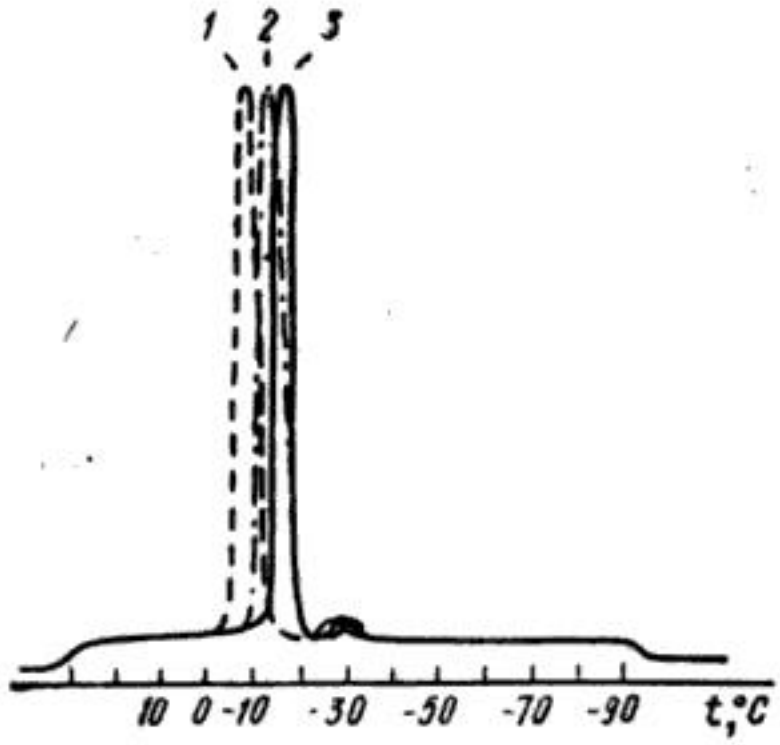


Рис. 3. Термограммы охлаждения со скоростью 1° в 1 *мин* лейкомассы с криофилактиком ПЭО-400 5%-ной (*1*), 10%-ной (*2*) и 15%-ной (*3*) концентраций.

На рис. 2 приведена кривая, отражающая ход удельной теплоемкости ПЭО-400 при нагревании его со скоростью 1° в 1 *мин*. Рассчитанная теплоемкость C_p в точках —100°, —80°, —40°, —20° соответственно равна: 0,22, 0,26, 0,36, 0,5 (*кал/г·град*). На всех кривых, характеризующих нагревание ПЭО-400, нами обнаружен двойной эндотермический пик в области температур +4°÷+5°. Появление этого дуплета может быть объяснено тем, что изучаемый криофилактик не является мономером и содержит целый ряд гомологов. Установлено также наличие температурного интервала плавления, который составляет приблизительно 10°. Известно, что присутствие ПЭО-400 способствует переохлаждению растворов. Нами отмечено влияние скорости охлаждения на переохлаждение растворов и процесс плавления. Кривые охлаждения и плавления растворов ПЭО-400 образуют петлю гистерезиса.

Эксперименты по изучению процесса плавления и выяснению его природы требуют очень медленного отогревания, что хорошо выполняется в адиабатических калориметрах. Однако если нагревание на сканирующем калориметре проводить медленно (0,5°÷1° в 1 *мин*), то удается приблизиться к условиям, когда в каждый момент времени сосуществующие фазы находятся в равновесии.

Тот факт, что от степени кристалличности образца зависит плавление ПЭО-400, еще не доказывает отсутствия равновесной температуры плавления. В случае кристаллизации в неравновесных условиях однозначное определение свойств кристаллической фазы невозможно, так как структура этой фазы зависит от всего процесса кристаллизации. Достижение высоких степеней кристалличности представляет трудную задачу, для ее решения необходимо согласовать условия опыта с возможным механизмом кристаллизации.

Методом дифференциально-сканирующей калориметрии проведено исследование фазовых переходов при охлаждении лейкомассы под защитой ПЭО-400 в концентрации 5, 10 и 15%. Из рис. 3 видно, что степень переохлаждения растворов определяется концентрацией криофи-

Матеріал, захищений авторським правом

лактика в образце. Эндотермический пик в области температуры —30° связан с кристаллизацией эвтектической смеси. Следует отметить, что с повышением концентрации криофилактика величина пика уменьшается, а эвтектическая область расширяется.

Полученные результаты позволяют прийти к выводу, что метод дифференциально-сканирующей микрокалориметрии найдет широкое применение в практике криобиологии. Его можно применять для получения информации о взаимодействии воды с криофилактиком, изучения физико-химических процессов, сопровождающих нагревание или охлаждение биологических объектов при разных скоростях сканирования, а также для определения их термодинамических параметров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Попов М. М. Термометрия и калориметрия. Изд-во МГУ, 1954.
2. Wunderlich B. J. — J. Phys. Chem., 1965, **69**, 1078.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ КРИСТАЛЛИЗАЦИИ В ТКАНИ РОГОВОЙ ОБОЛОЧКИ ПРИ ЗАМОРАЖИВАНИИ

В. А. Моисеев, Л. Г. Кулешова, Ю. П. Тимошенко, В. В. Волина

Долгосрочное консервирование роговой оболочки с помощью низких температур (—196°) относится к числу актуальных проблем современной биологии и медицины. Для успешного решения вопроса обеспечения морфологической сохранности и биологической полноценности клеток роговичной ткани в процессе замораживания-оттаивания необходимо изучить характер и механизмы повреждения клеточных структур глубоким холодом, а также защитное действие различных криопротекторов. Криофилактические агенты существенно влияют на характер кристаллизации воды, находящейся внутри и вне клеток: снижается процент вымерзающей воды, находящейся в свободном состоянии, и уменьшается размер образующихся кристаллов. Соответственно уменьшается дегидратация клеток, предупреждается механическое повреждение их растущими кристаллами [2, 5—7]. Таким образом, размер кристаллов, образующихся в охлажденной биологической системе, является одним из факторов, определяющих сохранность клеток при замораживании.

В настоящей работе представлены результаты исследования кристаллизации воды в ткани роговой оболочки под защитой полиэтиленоксида с молекулярным весом 400 (ПЭО-400) и глицерина методами низкотемпературной рентгенографии и термографии.

Исследовались нативные, инкубированные в течение 15 *мин* в 10%-ном растворе ПЭО-400 и 10%-ном растворе глицерина и отмытые от этих криофилактиков в течение 15 *мин* в физиологическом растворе роговицы свежеэнуклеированных глаз человека. Растворы криофилактиков готовили на физиологическом растворе. Всего исследовано 24 образца.

Рентгенографический анализ проводился на острофокусной установке УРС-0,02 в K_α излучении меди. Рентгенограммы регистрировались на плоскую пленку при температуре —70°, напряжении анода 30 *кв* и токе накала 400 *мка*. Время экспозиции — 40 *мин*. Охлаждали образцы в камере обдуванием их парами жидкого азота по двум программам: 1) двухэтапной — замораживание со скоростью 1° в 1 *мин* до точки кристаллизации и затем охлаждение со скоростью 60° в 1 *мин*;

Матеріал, захищений авторським правом

2) замораживание с постоянной скоростью 60° в 1 *мин*, начиная от комнатной температуры до —70°.

Температура образца контролировалась дифференциальной медь-константановой термопарой, «теплый» спай которой находился при 0°. Точки фазовых переходов определялись по выделению скрытой теплоты кристаллизации. Оценка линейных размеров кристаллов льда проведена по формуле [1]

$$l = \sqrt[3]{\frac{Q \cdot a\cos\Theta}{2 n_{hkl} L}},$$

где l — линейные размеры кристаллов льда; n_{hkl} — число рефлексов на кольце hkl; Q — объем образца, участвующий в рассеянии рентгеновских лучей; L — расстояние от щели коллиматора до образца; a — диаметр отверстия коллиматора; Θ — угол рассеяния рентгеновских лучей.

Для определения точек фазового перехода применили метод дифференциально-сканирующей калориметрии. Термограммы замораживания-оттаивания роговицы получены на сканирующем калориметре фирмы «Перкин—Элмер» модели DSC—1B. Исследуемые образцы роговицы одинакового веса поочередно помещали в ампулу измерительной ячейки прибора и подвергали регулируемому воздействию температуры. Теплообмен образца с охлаждаемой жидким азотом стенкой калориметра осуществлялся с помощью газообразного гелия. В точке фазового перехода тепло подводилось к образцу или отводилось от него с помощью автоматической системы, причем образец выдерживали при температуре эталона, в качестве которого использовался сапфир. Автоматическая компенсация энергии, сопряженной с фазовым переходом, позволяла регистрировать выделенную энергию графически.

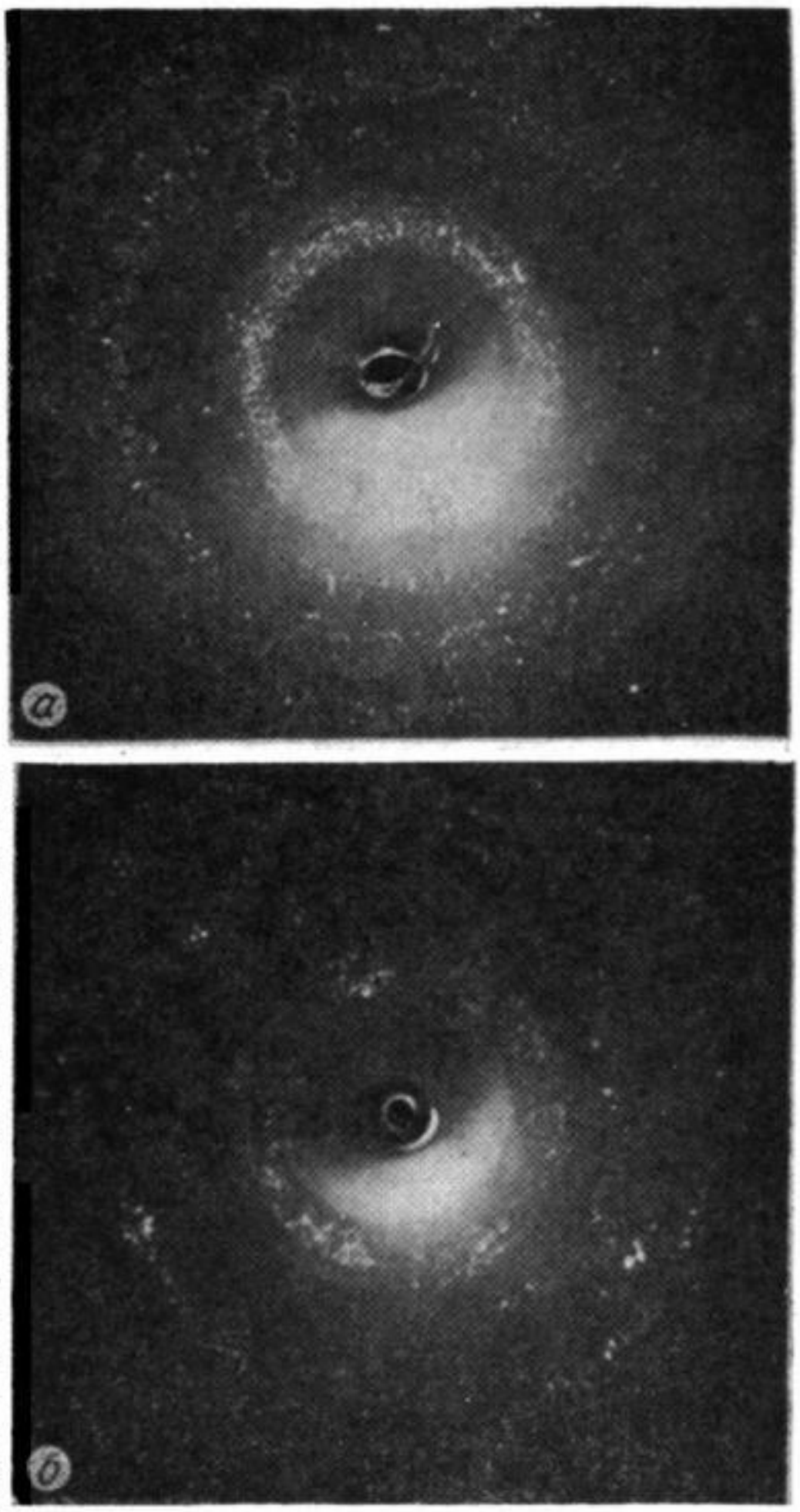


Рис. 1. Рентгенограммы нативных роговых оболочек:

а — замораживание по двухэтапной программе; *б* — замораживание со скоростью 60° в 1 *мин*.

В процессе исследования влияния различных скоростей охлаждения на характер кристаллизации воды в ткани роговой оболочки обнаружено следующее. При замораживании по двухэтапной программе образуется мелкодисперсная структура. При замораживании со скоростью 60° в 1 *мин* размер образующихся кристаллов больше. Как известно, процесс кристаллизации характеризуется числом центров кристал-

Матеріал, захищений авторським правом

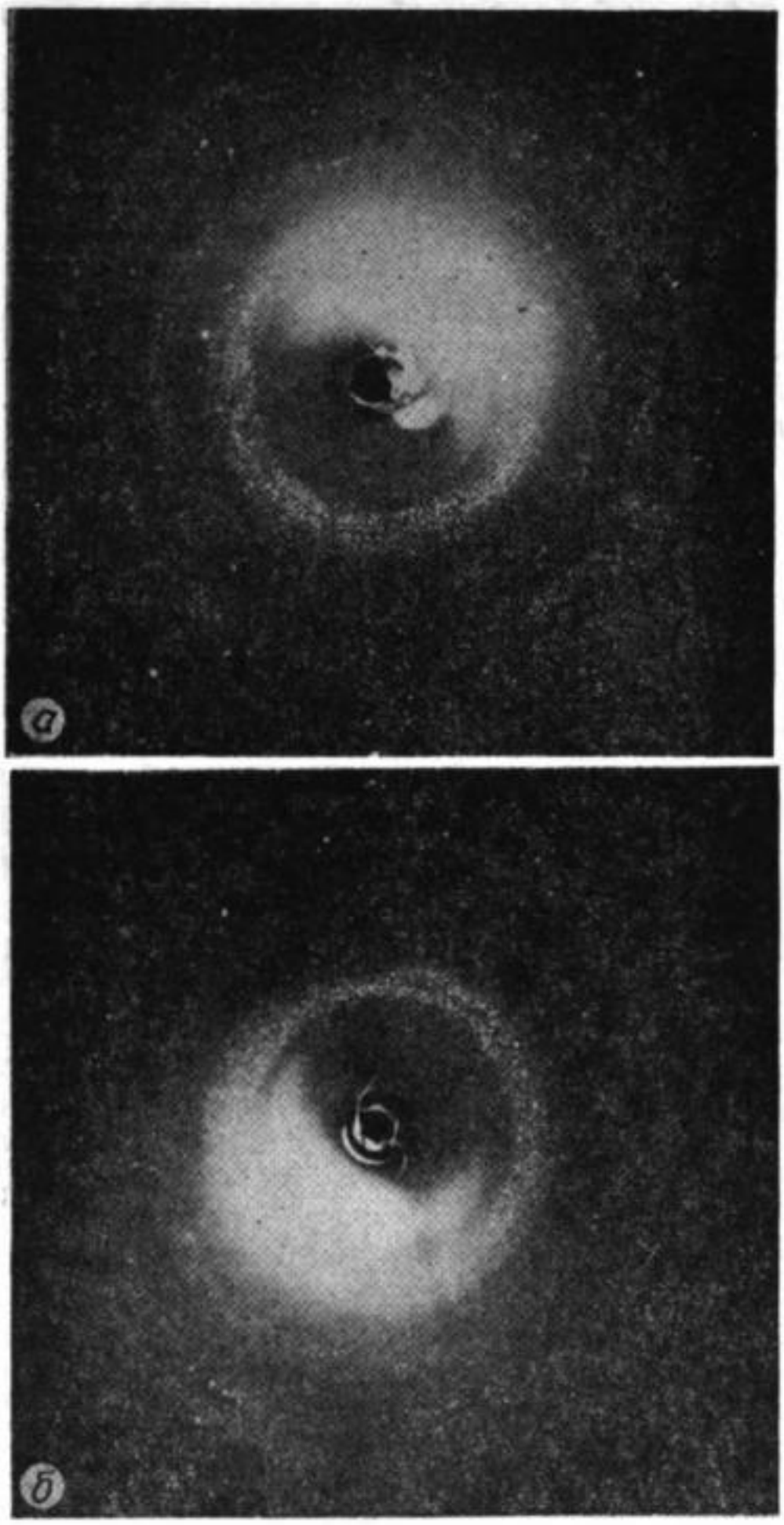


Рис. 2. Рентгенограммы роговых оболочек (замораживание по двухэтапной программе) при инкубации в течение 15 *мин* в 10%-ном растворе ПЭО-400 (*а*) и 10%-ном растворе глицерина (*б*).

лизации, возникающих в единицу времен в единице объема, или частотой нуклеации и линейной скоростью роста центров. При понижении температуры от точки плавления скорость образования зародышей сначала остается практически равной нулю. При дальнейшем охлаждении скорость зародышеобразования возрастает и, достигнув при некоторой температуре максимума, затем падает до нуля. В зависимости от температуры и свойств среды процесс кристаллизации описывается выражением [4]

$$J(T) = c \cdot e^{-\left(\frac{A_{кр}}{kT} + \frac{U}{kT}\right)},$$

где $J(T)$ — скорость зародышеобразования; $A_{кр}$ — работа образования зародыша критического размера; k — константа Больцмана; $e^{-\frac{U}{kT}} \sim 1/\eta$; η — вязкость раствора; c — константа.

Появление максимума частоты нуклеации связано с тем, что с понижением температуры, с одной стороны, уменьшается работа образования зародышей критического размера, а следовательно, увеличивается вероятность зарождения центров новой фазы. По Фольмеру [3],

$$A_{кр} = \frac{a}{(T_{пл} - T)^2}; \quad a = \frac{4b}{3k}\left(\frac{M}{\rho}\right)^2 \frac{\sigma T_{пл}}{H_{пл}^2},$$

где b — геометрический фактор; ρ — плотность кристалла; M — молекулярная масса; σ — средняя свободная энергия границы раздела кристалл—жидкость; $T_{пл}$ — температура плавления; $H_{пл}$ — энтальпия плавления.

С другой стороны, при больших переохлаждениях снижается подвижность молекул, а также скорость их обмена между зародышем и жидкостью, что приводит к уменьшению скорости зародышеобразования. Кроме того, кривая зависимости линейной скорости роста кристаллов от температуры имеет максимум. В зависимости от взаимного расположения максимума частоты нуклеации и максимума линейной скорости роста, а также режимов охлаждения можно получить различную

Матеріал, захищений авторським правом

дисперсность структуры. При медленном охлаждении (1° в 1 *мин*), вероятно, сначала проходится температура, соответствующая максимуму частоты нуклеации, линейная же скорость роста относительно невелика, ибо образовавшиеся многочисленные центры кристаллизации мешают росту друг друга (рис. 1). При замораживании со скоростью 60° в 1 *мин* (относительно быстрое замораживание) температура, при которой образуется максимальное число центров кристаллизации, проходится быстро. Появляются немногочисленные центры, которые растут с максимальной скоростью.

Инкубирование роговицы в 10%-ном растворе ПЭО-400 и 10%-ном растворе глицерина, как и следовало ожидать, приводило к снижению точки кристаллизации (точка кристаллизации нативной роговицы —4,5°; роговицы, инкубированной в 10%-ном растворе ПЭО-400 и 10%-ном растворе глицерина —7°; роговицы, отмытой от этих криофилактиков в физиологическом растворе, —4,7°) и уменьшению размеров кристаллов льда (рис. 2).

Результаты анализа термограмм сводятся к следующему. Количество теплоты, необходимое для фазовых превращений роговой оболочки, инкубированной в растворе глицерина, меньше, чем количество теплоты в случае инкубирования в растворе ПЭО-400. Инкубирование в растворе ПЭО-400 приводит к уменьшению этой теплоты по сравнению с нативной роговицей и роговицей, отмытой в физиологическом растворе после инкубирования в криофилактиках. Количество теплоты, необходимое для фазовых превращений в нативной и отмытой роговой оболочке, почти одинаковое. Поскольку и глицерин, и ПЭО-400 хорошо растворяются в воде, естественно предположить, что их растворы будут легко пропитывать ткань. Из сравнения теплот кристаллизации и размеров кристаллов льда (таблица) в случае инкубации в растворе глицерина и растворе ПЭО-400 можно сделать предварительный вывод, что глицерин с большей скоростью проникает в ткань роговой оболочки. Сравнение размеров кристаллов льда отмытой роговой оболочки и нативной свидетельствует о том, что не весь глицерин был удален из ткани.

Изменение линейных размеров кристаллов льда в ткани роговицы (*l*, *мк*)

Замораживание со скоростью 60° в 1 *мин*	Замораживание по двухэтапной программе				
Нативная роговица	Нативная роговица	Инкубированная в 10%-ном растворе ПЭО-400	Отмытая от ПЭО-400 в физиологическом растворе	Инкубированная в 10%-ном растворе глицерина	Отмытая от глицерина в физиологическом растворе
9	6,6	5,8	6,3	5,5	5,9

Таким образом, рентгенографические и термографические исследования показали, что 10%-ные растворы глицерина и ПЭО-400 легко проникают в ткань роговой оболочки. Глицерин полностью не выводится из ткани, что, по-видимому, связано с частичным проникновением его внутрь клеток.

В заключение авторы выражают благодарность старшему инженеру Б. Н. Леонову за изготовление низкотемпературной приставки к острофокусной установке УРС-0,02.

ЛИТЕРАТУРА

1. Жданов Г. С., Иверонова В. И. — Заводская лаборатория, 1935, 4, 10, 12.
2. Клен Р. Заготовка и консервирование тканей. Прага, Государственное издательство медицинской литературы, 1962.
3. Мейер К. Физико-химическая кристаллография. М., «Металлургия», 1972.

Матеріал, захищений авторським правом

4. Френкель Я. И. Собр. избр. трудов, 3. Кинетическая теория жидкости. М., Изд-во АН СССР, 1959.
5. Persidsky M., Richard V. — Nature, 1962, **196**, 585.
6. Pyle H. M., Boyer H. F. — Amer. J. Acad. Sci., 1964, **114**, 686.
7. Huggins Ch. E. — Fed. Proc., 1965, **24**, 190.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

ИССЛЕДОВАНИЕ КОНЕЧНОГО ЗВЕНА ЦИТОХРОМНОЙ ЦЕПИ ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ В КЛЕТКАХ КОСТНОГО МОЗГА ПОСЛЕ ГЛУБОКОГО ОХЛАЖДЕНИЯ

Э. И. Обозная, О. П. Маркова

Известно, что основной функцией цитохромоксидазы (ЦХО) является восстановление кислорода в реакциях окисления, которые сопровождаются выделением энергии. Поэтому представляло несомненный интерес исследование цитохромоксидазной активности в клетках костного мозга после их глубокого охлаждения.

ЦХО выявляли по Роскину [4] в различных группах клеток костного мозга, взятого от 17 доноров и 40 людей, скоропостижно скончавшихся от несчастных случаев. Активность энзима определялась в пробах нативного костного мозга, взятого на консервирующем растворе ЦОЛИПК-3, а также после замораживания-оттаивания. В качестве защитной среды был применен полиэтиленоксид молекулярного веса 400 в 15%-ной конечной концентрации. Замораживание производилось при температуре жидкого азота по двухэтапной программе, размораживание — в водяной бане (+42°) в течение 40 *сек.*

Оценка результатов реакции производилась в каждой группе клеток (бластные, миелоциты, зрелые гранулоциты и нормобласты) по подсчету гранул диформазана, маркирующих ферментативную активность. Затем выводили средний гистохимический коэффициент (СГК) по Астальди и Верга.

Контроль изучаемого материала осуществляли при цитологическом исследовании костного мозга в мазках, окрашенных по Паппенгейму, подсчитывали также количество миелокариоцитов в 1 *мм*^{3} и процент жизнеспособных клеток по эозиновой пробе.

Исследования показали, что до замораживания-оттаивания по мере созревания клеток костного мозга активность ЦХО проявляла тенденцию к увеличению. После замораживания-оттаивания донорского и посмертного костного мозга отмечено значительное снижение активности энзима во всех изученных группах клеток. Так как активность ЦХО отражает интегральный процесс переноса электронов, угнетение реакции можно, по-видимому, объяснить ингибированием фермента и предшествующих ЦХО звеньев электронно-транспортной цепи, а также повреждением клеточных структур.

Для выявления и уточнения возможных повреждений была произведена количественная и качественная оценка клеток костного мозга, а также проведен анализ предшествующих ЦХО звеньев дыхания. Оказалось, что число ядерных элементов в пробах посмертного костного мозга составляет в среднем 16000±1166 в 1 *мм*^{3} костномозговой взвеси; в костном мозге доноров 12000±1600 в 1 *мм*^{3}, при этом, по данным эозиновой пробы, в посмертном костном мозге 96±0,64% миелокариоцитов были жизнеспособными (в донорском — 100%). После замораживания-оттаивания общее число посмертных миелокариоцитов по сравнению с исходным уменьшилось на 37,5%, что соответствовало

Матеріал, захищений авторським правом

10000±1596 в 1 *мм*³. В костном мозге доноров насчитывалось 5700± ± 1100 миелокариоцитов в 1 *мм*³, из них 91±0,5% сохранились в жизнеспособном состоянии.

При цитологическом исследовании миелокариоцитов грубых изменений структуры, связанных с разрушением клетки, не выявлено. Таким образом, значительное снижение активности ЦХО в размороженных миелоидных клетках нельзя объяснить повреждением клеточных структур.

Анализ активности НАД-, НАДФ-диафораз, сукцинатдегидрогеназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы показал незначительное снижение активности диафораз и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в различных группах миелокариоцитов. Активность сукцинатдегидрогеназы значительно снижается только в зрелых гранулоцитах [2, 3 и др.]. Следовательно, угнетение цитохромоксидазной реакции не связано с падением активности изученных энзимов.

С целью дальнейшего уточнения и анализа состояния конечного звена цитохромной цепи в среду инкубации добавляли экзогенный цитохром С. Проведенные исследования выявили полное восстановление активности ЦХО, что свидетельствует о чувствительности цитохромоксидазы к действию глубокого холода. На стимулирующий эффект цитохрома С в ядрах и ядерных оболочках печени крысы после воздействия глубокого холода указывают также И. Б. Збарский с соавт. [1]. Поэтому представляется возможным использовать «цитохромный эффект» для повышения жизнеспособности размороженных клеток. С этой целью было проведено две серии опытов. В первой серии размороженные гемопоэтические клетки хранились при температуре +4° без добавления цитохрома С; во второй — к аналогичным пробам миелокариоцитов добавляли экзогенный цитохром С. Оценка полученных результатов — подсчет количества клеток в 1 *мм*³ и данных эозиновой пробы — производилась в динамике, в течение 1, 2, 3, 4 и 5 суток хранения.

Исследование сохранности оттаянного костного мозга показало, что хранение клеток в суспензии полиэтиленоксида без добавления цитохрома С приводит к быстрой гибели миелокариоцитов. Через 5 суток в указанном растворе оставалось лишь 34% миелоидных клеток.

Включение в консервирующий раствор цитохрома С способствовало лучшей морфологической сохранности гемопоэтических клеток — на 5-е сутки хранения найдено 64% жизнеспособных клеток. Защитный эффект цитохрома С после воздействия низких температур связан, по-видимому, с его прямым воздействием на клеточные структуры миелокариоцитов и нормализацией биоэнергетики последних.

ЛИТЕРАТУРА

1. Збарский И. Б., Кузьменко С. Н., Бульдеева Т. В., Троицкая Л. П.— В сб.: Современные проблемы биохимии дыхания и клиника, 1. Иваново, 1972, 4.
2. Обозная Э. И. — В сб.: Материалы Всесоюзного симпозиума по вопросам консервирования, культивирования и типирования костного мозга. М., 1971, 78.
3. Обозная Э. И. — В сб.: Соврем. пробл. биохимии дыхания и клиника. Иваново, 1972, 329.
4. Роскин Г. И. — ДАН СССР, 1974, 58, 8, 1773.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

Матеріал, захищений авторським правом

ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ МЕМБРАН МИТОХОНДРИЙ ПРИ ИНКУБАЦИИ СРЕЗОВ КОРЫ ПОЧКИ КРЫС В РАСТВОРАХ КРИОПРОТЕКТОРОВ

Н. П. Суббота

Результаты применения низкотемпературного метода консервации в значительной степени зависят от эффективности криозащитного агента, степени воздействия его на клетки и внутриклеточные процессы, способа и условий насыщения им ткани или органа [3, 5, 9, 10].

В представленной работе изучено действие криопротекторов — глицерина, диметилсульфоксида (ДМСО) и полиэтиленоксидов (ПЭО) с молекулярным весом 100, 300 и 400 — на дыхательную активность и состояние внутренней мембраны митохондрий срезов коры почки крыс (в гомогенате). Известно, что мембрана митохондрий наиболее чувствительна к разного рода повреждающим воздействиям [4, 6, 7, 11].

Срезы коры почки крыс толщиной 0,5—0,7 *мм* и весом 150÷160 *мг* инкубировали в 10%-ных растворах криопротекторов, приготовленных на фосфатном растворе Кребса—Рингера, pH 7,4, в течение 30, 90 и 150 *мин* на холоду при +2°÷+4°. Отмывание проводили также на холоду в 0,25 М сахарозе, после чего срезы гомогенизировали в 1 *мл* среды выделения следующего состава: 0,3 М сахароза, 1 *мМ* трилон Б, 10 *мМ* трис-HCl, pH 7,4. Для каждой серии опытов ставился свой контроль.

Функциональную активность митохондрий в гомогенате определяли полярографическим методом при температуре +26° в реакционной среде (РС) — 0,25 М сахароза, 10 *мМ* KH_2PO_4, 20 *мМ* KCl, 20 *мМ* трис-HCl, pH 7,4, — прибавляя к 1 *мл* РС 0,1 *мл* гомогената. В качестве субстрата окисления использовали 8 *мМ* сукцинат.

Показатели функционального состояния митохондрий при инкубации срезов коры криопротекторов ($n=5$)

Вариант	Время инкубации, *мин*					
	30			90		
	V_2	V_3	ДК	V_2	V_3	ДК
Контроль	4,6±0,1	9,0±0,5	2,0±0,2	5,0±0,4	9,1±0,5	1,8±0,1
ДМСО	4,1±0,1	8,4±0,8	2,0±0,1	5,0±0,4	8,1±0,8	1,6±0,1
Контроль	5,3±0,2	9,0±0,5	1,7±0,3	4,6±0,5	8,2±0,6	1,8±0,3
Глицерин	5,1±0,3	9,2±0,7	1,8±0,4	5,5±1,1	7,5±0,6	1,4±0,5
Контроль	4,2±0,5	8,1±1,2	2,0±0,1	4,6±0,5	8,5±0,7	1,9±0,2
ПЭО-100	4,2±0,4	7,3±0,8	1,8±0,2	5,0±0,5	8,0±0,2	1,7±0,1
Контроль	5,5±0,5	9,6±0,7	1,8±0,1	5,0±0,4	7,5±0,3	1,7±0,2
ПЭО-300	4,9±0,4	9,7±0,5	2,0±0,1	4,8±0,3	7,5±0,4	1,6±0,2
Контроль	5,1±0,2	9,3±0,3	2,0±0,1	4,5±0,3	8,2±0,2	1,9±0,1
ПЭО-400	3,8±0,1	8,6±0,4	2,1±0,1	4,8±0,5	7,9±0,6	1,7±0,1

Примечание. V_2 — состояние 2 (дыхание с субстратом окисления); V_3 — состояние ДК — дыхательный контроль (отношение V_3 к V_2, по Ларди и Вэлману). Дыхательная активность — 1 *мг* ткани за 1 *мин*.

О состоянии внутренней мембраны митохондрий судили по проницаемости восстановленного НАД-Н, о скорости проникновения НАД-Н — по НАД-Н оксидазной активности гомогената срезов коры почки в присутствии разобщителя, 150 *мкМ* динитрофенола (ДНФ). Концентрация НАД-Н — 2 *мМ*.

Матеріал, захищений авторським правом

Как видно из табл. 1, время инкубации срезов в 10%-ных растворах криопротекторов существенно не влияет на дыхательную активность гомогенатов. Тенденция к увеличению дыхательной активности в состоянии 2 (в контроле и опыте) обусловлена, по-видимому, увеличением протонной проводимости мембран, связанной со старением митохондрий [2]. Дыхание митохондрий в метаболическом состоянии 3 также существенно не отличается в контроле и опыте и не изменяется во времени.

Не было выявлено достоверных различий и в величине дыхательного контроля митохондрий контрольных и опытных серий. Достоверное снижение этого показателя наблюдалось лишь спустя 150 *мин* после инкубации (в контроле и опыте).

Исследование влияния инкубации срезов в растворах криопротекторов на состояние внутренней мембраны митохондрий приведено в табл. 2. Достоверных различий между контрольной и опытными сериями исследований по величине НАД-Н оксидазной активности не установлено. Некоторая тенденция к увеличению НАД-Н оксидазной активности к концу инкубации (150 *мин*) связана, по-видимому, также со старением митохондрий [1].

В последнее время в литературе появляются сообщения о токсическом влиянии ДМСО на некоторые внутриклеточные механизмы и мембранные органеллы клетки [8]. Глубина повреждений обычно зависит от способа насыщения ткани криопротектором и температуры, при которой происходило насыщение криопротектором.

В наших экспериментах существенных отличий в действии ДМСО на функциональное состояние митохондрий и состояние внутренней мембраны митохондрий по сравнению с контрольными образцами и действием других испытанных нами криопротекторов не обнаружено.

Таким образом, инкубирование срезов коры почки крыс в 10%-ных растворах ДМСО, глицерина, ПЭО с молекулярным весом 100, 300, 400 при температуре $+2° \div +4°$ в течение 2,5 *ч* существенно не влияет на структурно-функциональное состояние митохондрий.

Таблица 1

почки крыс в 10%-ных растворах

	150		
	V_3	V_2	ДК
	6,4±0,1	8,7±0,6	1,7±0,1
	6,2±1,0	7,4±0,3	1,5±0,3
	5,0±0,8	8,1±0,9	1,9±0,5
	6,1±0,4	9,1±0,4	1,8±0,3
	7,1±0,3	10,2±0,5	1,5±0,1
	6,3±0,3	7,4±0,4	1,3±0,1
	6,3±0,4	10,2±0,3	1,4±0,2
	7,3±0,2	9,7±0,8	1,4±0,1
	5,6±0,6	9,4±1,7	1,7±0,2
	6,1±0,1	8,9±0,3	1,5±0,1

3 (дыхание с субстратом и АДФ); ность выражена в наноатомах O_2 на

Таблица 2

Скорость окисления (в наноатомах O_2 на 1 *мг* ткани за 1 *мин*) экзогенного НАД-Н гомогенатами срезов коры почки крыс при разном времени инкубации в растворах криопротекторов ($n=5$)

Вариант	Время инкубации, *мин*		
	30	90	150
Контроль	3,4±0,6	3,4±0,6	4,1±0,5
ДМСО	3,4±0,2	3,8±0,7	4,2±0,1
Контроль	3,8±0,1	3,6±0,4	4,2±1,3
Глицерин	4,2±0,2	4,3±0,2	4,1±0,6
Контроль	3,5±0,3	3,6±0,4	3,8±0,5
ПЭО-100	3,0±0,1	4,2±0,5	4,4±0,4
Контроль	3,7±0,4	3,2±0,2	3,7±0,5
ПЭО-300	3,6±0,4	3,9±0,1	5,0±0,6
Контроль	4,1±0,2	3,5±0,6	4,2±0,3
ПЭО-400	3,3±0,2	3,6±0,3	4,9±0,2

ЛИТЕРАТУРА

1. Ленинджер А. Митохондрия. М., «Мир», 1966.
2. Ляхович В. В., Долгов А. В. — В кн.: Биофизика мембран. Материалы конференции в Паланге. 1973, 34.

Матеріал, захищений авторським правом

3. Петровский Б. В. — Клиническая медицина, 1970, 8, 13.
4. Balcavage W. Z., Beck J. C., Beck D. P., Greenawalt J. W., Parker J. H., Mattoon J. R. — Cryobiology, 1970, 6, 385.
5. Dickinson D. B., Misch M. J., Drury R. E. — Science, 1967, 3788, 1738.
6. Lovelock J. E., Bischop N. W. H. — Nature, 1959, 183, 4672, 66.
7. Lyons J. M. — Cryobiology, 1972, 9, 5, 341.
8. Malinin G. I. — Cryobiology, 1973, 10, 22.
9. Mazur P. — Science, 1970, 168, 939.
10. Meryman H. T. — Cryobiology, 1971, 8, 2, 173.
11. Scherman J. K. — Cryobiology, 1972, 9, 2, 112.

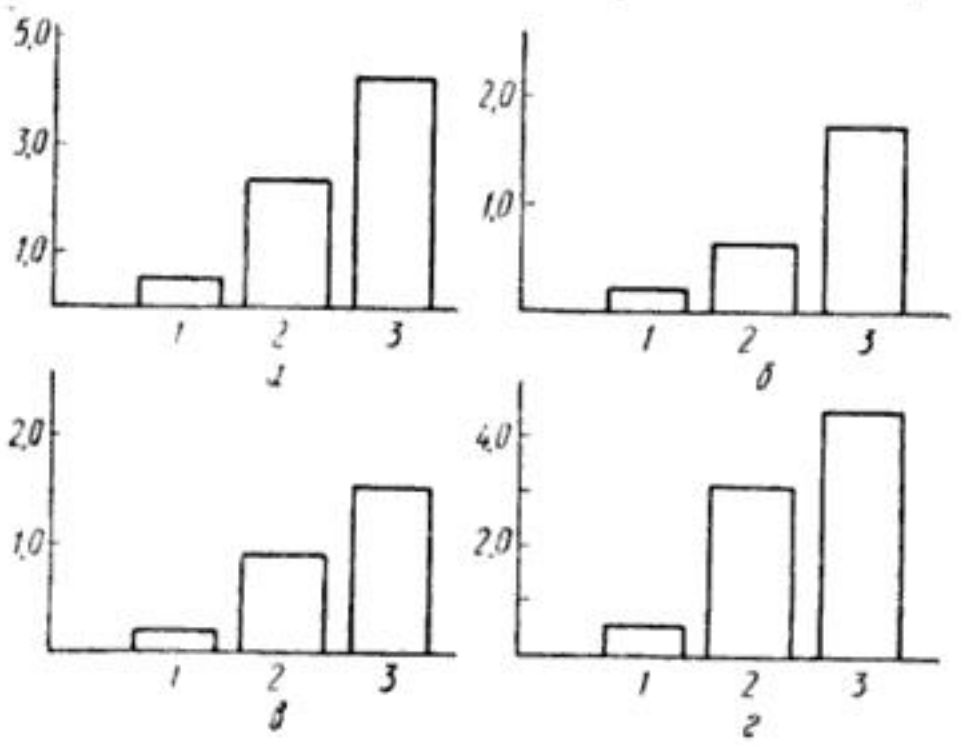
Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

ВЛИЯНИЕ СКОРОСТИ ОТТАИВАНИЯ ИЗОЛИРОВАННЫХ ЛИЗОСОМ ПЕЧЕНИ НА АКТИВНОСТЬ ГИДРОЛАЗ

Л. П. Кравченко, В. И. Луговой, Е. В. Белоусова

Известно, что лизосомы содержат богатый комплекс гидролитических ферментов, которые в случае нарушения проницаемости их мембран могут разрушить практически любой из известных биополимеров [4, 12, 13]. В последнее время этим субклеточным структурам стали отводить важную роль в процессе повреждения биологических объектов при замораживании [5, 7, 9, 10].



Уровень неседиментируемой активности гидролаз при различных скоростях оттаивания лизосом: *а* — рибонуклеаза, активность выражена в микромолях АМФ в 1 *мин* на 1 *мг* белка; *б* — дезоксирибонуклеаза, активность выражена в микромолях АМФ в 1 *мин* на 1 *мг* белка; *в* — кислая фосфатаза, активность выражена в микромолях $Ф_н$ в 1 *мин* на 1 *мг* белка; *г* — катепсины, активность выражена в ΔE_{280} в 1 *мин* на 1 *мг* белка (×1000). *1* — контроль (экспозиция 30 *мин* при 4° в 0,15 М NaCl); *2* — замораживание до —196° и оттаивание со скоростью 70—80° в 1 *мин*; *3* — замораживание до —196° и оттаивание со скоростью 1,5—2,0° в 1 *мин*.

В настоящей работе поставлена задача изучить влияние режимов замораживания-оттаивания на уровень неседиментируемой активности лизосомальных гидролаз, характеризующих структурно-функциональную целостность этих органелл.

Исследования проведены на выделенной и очищенной методом дифференциального центрифугирования фракции лизосом печени крыс [4]. Лизосомы ресуспендировали в физиологическом растворе и замораживали погружением в жидкий азот со скоростью охлаждения 300—400° в 1 *мин*. Оттаивание проб проводили двумя способами: в водяной бане при температуре 37° со скоростью оттаивания 80—70° в 1 *мин* и при комнатной температуре со скоростью оттаивания 1,5—2,0° в 1 *мин*. Скорость замораживания-оттаивания контролировалась медь-константановой термопарой и регистрировалась самописцем.

Неседиментируемую активность гидролаз (кислая фосфотаза, кислые РНКаза и ДНКаза, катепсины) исследовали в супернатанте, полученном после осаждения центрифугированием при 15 000 *об/мин* в течение 30 *мин* размороженной фракции лизосом. Активность кислой фосфатазы определяли по Боданскому [3], кислой ДНКазы и РНКазы — по В. С. Шапоту [2], катепсины — по А. А. Покровскому [1].

Матеріал, захищений авторським правом

Активность ферментов выражали в микромолях соответствующих субстратов, расщепленных за 30 *мин* инкубации при 37° на 1 *мг* белка. Белок определяли по методу Лоури и др. [8].

На рисунке представлены результаты исследований уровня неседиментируемой активности гидролитических ферментов при двух изученных режимах замораживания-оттаивания лизосомальных фракций.

Анализируя представленный материал, можно отметить, что оба режима замораживания-оттаивания приводят к резкому увеличению неседиментируемой активности гидролаз лизосом в супернатанте. Наиболее значительный выход ферментов из лизосом отмечался при использовании медленного способа оттаивания.

Очевидно, увеличение уровня гидролаз в надосадке объясняется нарушением лизосомальной мембраны, с которой эти ферменты в разной степени связаны ионными, электростатическими и, возможно, ковалентными взаимодействиями [6, 11].

Повреждающее влияние низких температур на структуру лизосом может реализоваться через несколько факторов, среди которых наиболее важны кристаллообразование, повышение концентраций электролитов и метаболитов в процессе вымораживания воды, эвтектическая кристаллизация солей.

В условиях нашего эксперимента разная чувствительность лизосом к повреждающему действию двух режимов замораживания-оттаивания, очевидно, не связана с особенностями кристаллообразования в среде замораживания, поскольку скорость охлаждения в обоих случаях была одинаковой. В данном случае указанное различие обусловлено, вероятно, концентрационным эффектом хлористого натрия при оттаивании среды замораживания с разной скоростью.

При медленном оттаивании период контакта концентрированного раствора электролита с мембранами лизосом увеличивается, что приводит к более существенным структурным повреждениям и, как следствие, к более значительному освобождению гидролитических ферментов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Покровский А. А., Арчаков А. М. — В кн.: Современные методы в биохимии. М., «Медицина», 1968, 5.
2. Шапот В. С., Чудинова И. А., Кречетов Г. Д. — В кн.: Современные методы в биохимии. М., «Медицина», 1964, 267.
3. Bodansky O. — J. Biol. Chem., 1933, **101**, 93.
4. De Duve C. — In: Subcellular particles. N. Y., Ronald Press C., 1959, 128.
5. Dajan G., Rowe A. — Cryobiology, 1970, **6**, 579.
6. Koening H., Jibril A. — Biochim. Biophys. Acta, 1962, **65**, 543.
7. Lotke P., Schwarts S. — Surgery, 1970, **67**, 3, 488.
8. Lowry O., Rosebrouph N., Farr A., Randall R. — J. Biol. Chem., 1951, **193**, 265.
9. Persidsky M. — Cryobiology, 1969, **6**, 4, 280.
10. Persidsky M. — Cryobiology, 1971, 8, 345.
11. Sawant P., Desai D., Tappel A. — Arch. Biochem. Biophys., 1964, **105**, 247.
12. Tappel A. — In: Cryobiology. Ed. H. T. Meryman. L. — N. Y., Acad. Press, 1966. 163.
13. Weissman E. — New Engl. J. Med., 1965, **273**, 1084.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

Матеріал, захищений авторським правом

АКТИВАЦИЯ ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТАЗЫ ПЕЧЕНИ КРЫС ЗАМОРАЖИВАНИЕМ

В. В. Лемешко, Е. В. Чаплай

Исследование характера и механизмов криоповреждений клеток и тканей на уровне внутриклеточных органелл, в особенности структурно-функционального состояния их мембран, является важным этапом в изучении причин гибели биологических объектов при замораживании-оттаивании. В литературе встречается мало работ по изучению влияния замораживания на функциональное состояние ферментов эндоплазматического ретикулума, хотя ультраструктурные аспекты криоповреждения и криозащиты мембран эндоплазматического ретикулума изучены в большей степени [6, 5].

В настоящей работе исследовано состояние фермента, прочно связанного с мембранами эндоплазматического ретикулума, — глюкозо-6-фосфатазы, в зависимости от скорости и кратности замораживания срезов печени крыс.

В опытах использовали беспородных крыс весом 160—200 *г*. Срезы большой доли печени толщиной 0,9—1,2 *мм* и весом 100 *мг*, помещали в стеклянную ампулу, содержащую 1 *мл* холодного К-цитратного буфера. Замораживание осуществляли быстро (400—500° в 1 *мин*) — непосредственным погружением ампулы в азот, до температуры —196° и медленно (8—12° в 1 *мин*) — помещением ампул в пенопластовый стакан, соприкасающийся с жидким азотом. Отогревание образцов производили быстро со скоростью около 400° в 1 *мин* в воде с температурой +37°. После оттаивания срезы гомогенизировали и гомогенат использовали для определения глюкозо-6-фосфатазной активности по методу, описанному В. С. Асатиани [1]. Активность выражали в микромолях неорганического фосфата ($Ф_н$) на 1 *г* печени в 1 *мин*. Статистическую обработку результатов производили методом парных сравнений.

Таблица 1

Влияние режимов замораживания срезов печени крыс на активность глюкозо-6-фосфатазы ($n=11$)

Вариант	Активность фермента, *мкМ* $Ф_н$ на 1 *г* печени в 1 *мин*	Активность, % к контролю
Контроль	10,42±1,02	100
Быстрое замораживание, быстрое оттаивание	12,55±1,05 $P<0,001$	121
Медленное замораживание, быстрое оттаивание	13,02±1,94 $P<0,01$	125

Таблица 2

Влияние двукратных режимов замораживания срезов печени крыс на активность глюкозо-6-фосфатазы ($n=5$)

Вариант	Активность фермента, *мкМ* $Ф_н$ на 1 *г* печени в 1 *мин*	Активность, % к контролю
Контроль	11,53±0,96	100
I вариант	17,95±2,20 $P<0,02$	157
II вариант	15,42±1,62 $P<0,01$	136

Активность глюкозо-6-фосфатазы печени крыс при двух режимах однократного замораживания и быстрого оттаивания срезов указанного органа приведена в табл. 1. Данные таблицы свидетельствуют о том, что после замораживания-оттаивания активность глюкозо-6-фосфатазы мембраны эндоплазматического ретикулума клеток печени существенно повышается (на 21÷25%), причем степень активации почти не зависит от скорости замораживания срезов.

В следующей серии опытов было изучено влияние повторного замораживания на активность глюкозо-6-фосфатазы. При этом быстро

Матеріал, захищений авторським правом

замороженные и быстро оттаянные срезы печени подвергались медленному замораживанию и быстрому оттаиванию (вариант I), а медленно замороженные и быстро оттаянные — быстрому замораживанию и быстрому оттаиванию (вариант II). Результаты этих опытов, приведенные в табл. 2, свидетельствуют о том, что активность глюкозо-6-фосфатазы после повторного замораживания продолжает существенно возрастать.

Как отмечают Эйнстер и др. [4], активность ферментов, связанных с мембранами, в частности с эндоплазматическим ретикулумом, изменяется соответственно структурным изменениям мембраны. Глюкозо-6-фосфатаза (липопротеид) относится к ферментам, прочно связанным с мембранами микросом. Активацию этого фермента можно вызвать воздействием на мембрану микросом дезоксихолата в малой концентрации, трипсина и хемотрипсина [3], не вызывая при этом его солюбилизации [2]. При обработке мембран лецитиназой [3] и большими концентрациями дезоксихолата наблюдается угнетение активности глюкозо-6-фосфатазы. Очевидно, при замораживании могут проявляться два эффекта, противоположно влияющих на активность мембранносвязанного фермента: с одной стороны, непосредственная инактивация, с другой — активация фермента в связи с повреждением мембраны. Однако результаты наших опытов свидетельствуют о том, что замораживание срезов печени крыс вызывает увеличение их глюкозо-6-фосфатазной активности. Эффект почти не зависит от скорости замораживания (400°÷500° и 8°÷12° в 1 *мин*) и увеличивается при двукратном замораживании. Активация глюкозо-6-фосфатазы связана, очевидно, со структурными нарушениями в мембранах эндоплазматического ретикулума.

ЛИТЕРАТУРА

1. Асатиани В. С. Ферментные методы анализа. М., «Медицина», 1969.
2. Beaufay H., de Duve C. — Bull. Soc. Chim. Biol., 1954, **36**, 1551.
3. Görlich M., Heise E. — Z. Naturforschung, 1962, **17b**, 465.
4. Ernster L., Jones L. C. — J. Cell. Biol., 1962, **15**, 541.
5. Trump B. F., Young D. E., Arnols E. A., Stowell R. E. — Fed. Proc., 1965, **24**, 144.
6. Weiss L., Armstrong J. A. — Biophys. Biochem. Cytol., 1960, 6, 673.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

ВЛИЯНИЕ КРИОПРОТЕКТОРОВ (ГЛИЦЕРИНА И ПЭО-400) НА ДЫХАТЕЛЬНУЮ ЦЕПЬ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС

В. В. Лемешко, А. М. Белоус, Л. Г. Мишнева

Предохранение биологических структур от повреждающего действия замораживания наиболее эффективно в случае применения криопротекторов. В последнее время для решения многих практических задач криобиологии и медицины, например низкотемпературной консервации органов и тканей, использование криопротекторов с низкой токсичностью приобретает первостепенное значение. В настоящей работе изучено влияние полиэтиленоксида с молекулярным весом 400 (ПЭО-400) и глицерина на функционирование дыхательной цепи и окислительное фосфорилирование митохондрий.

Опыты проводили на митохондриях печени крыс. Митохондрии получали, как описано у В. П. Скулачева [2]. Дыхание, окислительное фосфорилирование митохондрий, а также кинетику окислительно-восстановительных превращений их никотинамидадениндинуклеотидов

Матеріал, захищений авторським правом

(НАД) регистрировали на сконструированной нами установке. Белок определяли биуретовым методом.

В работе приняты следующие обозначения: состояние 2 — дыхание митохондрий с субстратом; состояние 3 — дыхание с субстратом и АДФ; ДК (дыхательный контроль по Ларди и Вэлману) — отношение дыхательной активности в состоянии 3 к активности в состоянии 2.

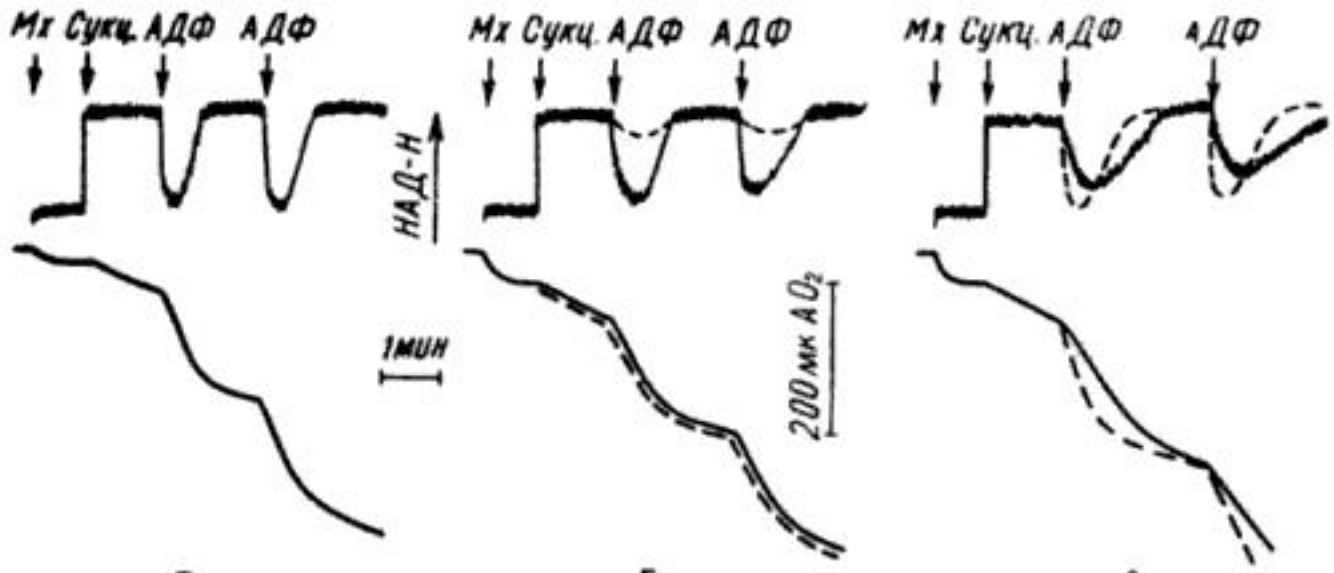


Рис. 1. Влияние криопротекторов на окислительно-восстановительные превращения НАД и дыхание митохондрий с субстратом сукцинатом: *а* — контроль; *б* — опыты с ПЭО-400; *в* — опыты с глицерином. Для *б* и *в* пунктиром обозначены опыты, когда исходная суспензия митохондрий и реакционная среда (РС) содержат 10% криопротектора; сплошная линия — когда РС не содержит криопротекторов. Состав РС: 0,25 М сахароза, 10 *мМ* KH_2PO_4, 20 *мМ* KCl, 20 *мМ* трис-HCl, pH 7,4.

Первую серию опытов проводили таким образом, что после суспендирования митохондрий в сахарозной среде выделения (СВ) в суспензию добавляли ПЭО-400 или глицерин до конечной концентрации 10%. Функциональное состояние митохондрий определяли в реакционной среде (РС), не содержащей криопротекторов, добавляя 0,1 *мл* суспензии к 1 *мл* РС. В результате было установлено, что при такой схеме

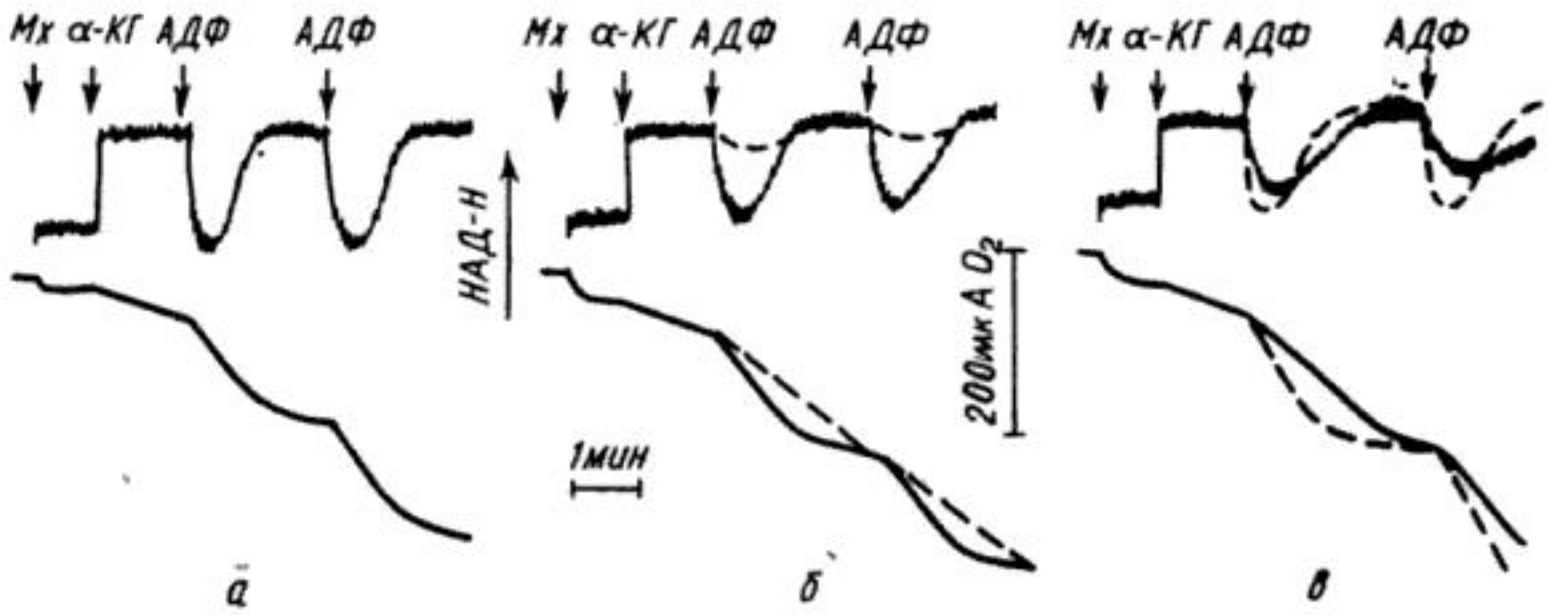


Рис. 2. Влияние криопротекторов на окислительно-восстановительные превращения НАД и дыхание митохондрий с субстратом α-кетоглютаратом. Обозначения как на рис. 1.

опыта глицерин угнетал дыхание митохондрий с субстратом сукцинатом в состоянии 3 на 33% ($P<0,01$), в то время как ПЭО-400 — лишь на 17% ($P<0,02$). Во втором метаболическом состоянии глицерин стимулировал дыхание митохондрий на 21% ($P<0,01$), а ПЭО-400 не оказывал влияния. Наиболее значительно под влиянием глицерина уменьшался ДК: на 42% ($P<0,01$) с субстратом сукцинатом и на 37% ($P<0,01$) с субстратом α-кетоглютаратом. Кинетика окислительно-восстановительных превращений НАД митохондрий под влиянием криопротекторов в значительной степени сохраняла свой характер, хотя скорость окисления НАД-Н в ответ на добавку АДФ и восстановление НАД после фосфорилирования АДФ заметно замедлялись (рис. 1, 2).

Матеріал, захищений авторським правом

Можно было полагать, что причиной столь значительного влияния глицерина на функциональное состояние митохондрий печени крыс является резкий перепад осмотических давлений исходной суспензии с глицерином и реакционной среды без глицерина. В случае применения ПЭО-400 перепад осмотических давлений существенно меньше, поскольку молекулярный вес глицерина почти в 4 раза меньше, чем у ПЭО-400, а объемные концентрации этих соединений одинаковы.

В следующей серии опытов РС содержала криопротекторы в той же концентрации, что и суспензия митохондрий. Кинетика окислительно-восстановительных переходов НАД и дыхания митохондрий в РС с криопротекторами показаны на рис. 1 и 2. В табл. 1 приведены данные, характеризующие функциональное состояние «глицеринизированных» митохондрий в РС без глицерина и с 10%-ным его содержанием.

Таблица 1

Влияние содержания глицерина в реакционной среде на функциональное состояние «глицеринизированных» митохондрий

Субстрат	Измеряемый параметр	РС+10% глицерина	РС без глицерина	*P*
Сукцинат	ΔO_2 в сост. 2	22,6 ±0,7	22,6 ±1,6	>0,05
	ΔO_2 в сост. 3	77,5 ±4,0 (12)	46,9 ±3,7	<0,001
	Д К	3,82±0,27	2,12±0,14	<0,001
α-Кетоглютарат	ΔO_2 в сост. 2	14,2 ±1,2	11,8 ±2,1	>0,1
	ΔO_2 в сост. 3	42,3 ±2,6 (7)	22,2 ±2,7	<0,001
	Д К	3,10±0,34	2,05±0,26	<0,001

Примечание. Здесь и в табл. 2 ΔO_2 выражено в наноатомах кислорода на 1 *мг* белка в 1 *мин*; в скобках — количество опытов.

Как следует из табл. 1, активность дыхательной цепи в состоянии 3 и дыхательный контроль «глицеринизированных» митохондрий в реакционной среде с глицерином значительно выше, нежели в среде без него. Очевидно, перепад осмотических давлений РС без глицерина и исходной суспензии митохондрий с глицерином, проникающим, как известно, в их матрикс, является основным фактором, влияющим на функциональное состояние «глицеринизированных» митохондрий в РС без глицерина.

Функциональное состояние митохондрий, суспендированных с 10%-ным ПЭО-400, с субстратом α-кетоглютаратом существенно отличалось от состояния митохондрий в РС без ПЭО-400 (табл. 2). Отличие заключается в том, что в РС с 10%-ным содержанием ПЭО-400 дыхательная активность митохондрий в состоянии 3 и дыхательный контроль значительно меньше, чем в РС без ПЭО-400 (см. рис. 2). С дру-

Таблица 2

Влияние содержания ПЭО-400 в среде инкубации на функциональное состояние митохондрий, предварительно суспендированных в 10%-ном растворе ПЭО-400

Субстрат	Измеряемый параметр	РС+10% глицерина		РС без глицерина		*P*
Сукцинат	ΔO_2 в сост. 2	19,2 ±2,4	(12)	17,9 ±1,8	(11)	>0,1
	ΔO_2 в сост. 3	59,6 ±3,7		61,3 ±2,7		>0,1
	Д К	3,45±0,24		3,20±0,13		>0,1
α-Кетоглютарат	ΔO_2 в сост. 2	12,2 ±1,2	(6)	12,4 ±2,7	(6)	>0,1
	ΔO_2 в сост. 3	20,6 ±1,7		34,8 ±4,1		<0,01
	Д К	1,79±0,2		3,14±0,4		<0,02

Матеріал, захищений авторським правом

гим субстратом — сукцинатом, функциональное состояние митохондрий почти не зависело от наличия или отсутствия ПЭО-400 в РС. В то же время, как видно из рис. 1 и 2, окисление НАД-Н в ответ на добавление АДФ в РС с ПЭО-400 существенно угнетается.

Угнетение α-кетоглютаратоксидазной активности митохондрий в присутствии 10%-ного ПЭО-400 и слабое влияние последнего на сукцинатоксидазную активность могут указывать на блокирование как α-кетоглютаратдегидрогеназы, так и НАД-Н-дегидрогеназного комплекса дыхательной цепи. Однако сравнительно медленное окисление эндогенного НАД-Н митохондрий в ответ на добавление АДФ свидетельствует об угнетении ПЭО-400 НАД-Н-дегидрогеназного комплекса.

Таким образом, ПЭО-400 в концентрации 10% существенно угнетает активность НАД-Н-дегидрогеназного комплекса дыхательной цепи, однако предварительное суспендирование митохондрий в среде с 10%-ным ПЭО-400 и последующее 10-кратное разведение суспензии в среде без ПЭО-400 не оказывают значительного влияния на функционирование дыхательной цепи. Глицерин в тех же концентрациях при определенных условиях вызывает у митохондрий осмотический шок.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ленинджер А. Митохондрия. М., «Мир», 1966.
2. Скулачев В. П. Аккумуляция энергии в клетке. М., «Наука», 1969.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ НАТИВНОЙ И ДЕКОНСЕРВИРОВАННОЙ АНТИМАКРОФАГАЛЬНОЙ И АНТИЛИМФОЦИТАРНОЙ СЫВОРОТОК

А. А. Цуцаева, Н. П. Лобасенко, В. М. Маркова

Широкое применение сывороток предполагает разработку методов их длительного хранения с полной сохранностью специфической активности.

Ряд авторов отмечает, что сыворотка теряет специфическую активность не только при хранении в холодильнике при температуре +4°, но и при —20° [2, 3]. Однако о характере воздействия низкотемпературной консервации на активность сывороток почти ничего не известно. Гривз [1] отметил, что активность комплемента сыворотки морской свинки, хранившейся при —196°, не изменяется неопределенно долго. Можно предположить, что ультранизкие температуры будут влиять на иммунные сыворотки аналогичным образом.

Целью настоящей работы явилось сравнительное изучение специфической активности антимакрофагальной и антилимфоцитарной сывороток — нативных, деконсервированных и хранившихся в холодильнике при температуре +4°.

Гетерологичные (АМС и АЛС) сыворотки получали при иммунизации кроликов породы шиншилла. Животных в течение 4-х недель иммунизировали внутривенно. Каждый цикл состоял из трех инъекций макрофагальных клеток ($5 \cdot 10^6$), полученных из перитонеального экссудата мышей линии СВА (для АМС) и взвеси лимфоидных клеток в том же количестве, полученных из подмышечных и паховых лимфатических узлов (для АЛС).

Матеріал, захищений авторським правом

Таблица 1

Содержание антител в АМС, хранившейся при разных условиях

Материал	Серологическая реакция	Тестируемые клетки	Разведение сыворотки 1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	Рабочий титр
Нативная сыворотка	Реакция агглютинации	Макрофаги	++++	++++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+–	1:512
	Цитотоксическая проба		22	38	40	42	50	61	65	67	73	79	1:512
	РСК		++	++	++	++	++	++	++	++	+–	–	1:256
	Реакция агглютинации	Лимфоциты	++	++	++	++	+	+	+	+	+–	–	1:256
	Цитотоксическая проба		40	44	58	60	69	73	75	79	82	86	1:128
	РСК		+++	++++	++++	++++	++++	++	++	–	–	–	1:128
Деконсервированная сыворотка	Реакция агглютинации	Макрофаги	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+	+	+–	–	1:256
	Цитотоксическая проба		38	40	43	43	45	46	50	65	77	87	1:256
	РСК		++++	++++	++++	+++	++++	++++	+++	+++	+–	–	1:256
	Реакция агглютинации	Лимфоциты	++	++	++	++	+	+	+	+–	–	–	1:128
	Цитотоксическая проба		50	55	60	65	70	74	79	81	84	86	1:64
	РСК		+++	+++	++++	++++	+++	++	++	+–	–	–	1:128
Сыворотка, хранившаяся в холодильнике	Реакция агглютинации	Макрофаги	++	++	++	+	+–	+–	–	+–	–	–	1:16
	Цитотоксическая проба		50	55	56	60	68	75	78	80	82	85	1:64
	РСК		++++	+++	++++	+++	++	++	++	+–	+–	–	1:128
	Реакция агглютинации	Лимфоциты	++	++	+	+	+–	+–	+–	–	–	–	1:16
	Цитотоксическая проба		53	55	60	63	72	79	81	84	86	86	1:32
	РСК		++++	++++	+++	++	++	++	+–	+–	–	–	1:64

Примечание. Здесь и в табл. 2 (++++) — резко положительная реакция, (+++) и (++) — положительная, (+) — слабо положительная, (+–) — сомнительная, (–) — отрицательная. Цитотоксическая проба в %.

Material, захищений авторським правом

Таблица 2

Содержание антител в АЛС, хранившейся при разных условиях

Материал	Серологическая реакция	Тестируемые клетки	Разведение сыворотки										Рабочий титр
			1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	2:128	1:256	1:512	1:1024	
Нативная сыворотка	Реакция агглютинации	Лимфоциты	+++	+++	++	++	+++	++	++	++	+	—	1:512
	Цитотоксическая проба		30	32	40	53	60	69	71	73	83	85	1:256
	РСК		++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	—	—	1:256
	Реакция агглютинации	Макрофаги	++	++	++	++	++	+	+	+—	——	——	1:128
	Цитотоксическая проба		42	52	52	60	62	65	68	78	79	86	1:128
	РСК		++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	—	—	—	1:128
Деконсервированная сыворотка	Реакция агглютинации	Лимфоциты	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+	+—	—	1:256
	Цитотоксическая проба		40	45	55	59	65	70	74	80	82	85	1:128
	РСК		++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	—	—	1:256
	Реакция агглютинации	Макрофаги	++	++	++	++	++	+	+—	+—	—	—	1:64
	Цитотоксическая проба		40	42	46	52	58	69	78	79	83	85	1:64
	РСК		++++	++++	++++	++++	+++	++	++	+—	—	—	1:128
Сыворотка после хранения в холодильнике	Реакция агглютинации	Лимфоциты	+++	++	++	+	+	+—	+—	—	—	—	1:32
	Цитотоксическая проба		40	42	48	52	62	75	79	80	82	86	1:64
	РСК		++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	+—	+—	—	1:128
	Реакция агглютинации	Макрофаги	++	++	+	+—	+—	—	—	—	—	—	1:8
	Цитотоксическая проба		68	70	70	72	80	81	85	86	86	87	1:16
	РСК		++	++	+	+	+—	+—	+—	—	—	—	1:16

Матеріал, захищений авторським правом

Кровь для получения сыворотки брали на 8—9-й день после последней инъекции. Сыворотки инактивировали при температуре 56° в течение 30 *мин* и адсорбировали мышиными эритроцитами, для удаления гемагглютининов. Определяли титры цитотоксинов, агглютининов и комплементсвязывающих антител. В качестве тест-клеток использовали макрофаги перитонеального экссудата и клетки лимфатических узлов.

Титры АМС и АЛС в цитотоксической пробе определяли по последнему разведению сыворотки, под влиянием которого количество жизнеспособных клеток снижалось по сравнению с контролем не менее чем на 20—25%.

Замораживание сывороток проводилось в полиэтиленовых ампулах (объем 1,5 *мл*) в парах жидкого азота. Скорость охлаждения регистрировалась с помощью медь-константановой термопары, сопряженной с предварительно отградуированным потенциометром 09М-ЭПП. Оттаивание производили в водяной бане при температуре +41°.

Замораживание проводили по двухэтапной программе. Скорость охлаждения на первом этапе составляла 20° в 1 *мин* в интервале температур от +20° до —2° и на втором — около 400° в 1 *мин* в интервале температур от —2° до —196°.

Для титрации использовали сыворотки нативные, деконсервированные, хранившиеся три месяца в жидком азоте при температуре —196° и сыворотки, в течение 1 месяца хранившиеся в холодильнике.

В полученных сериях АМС и АЛС обнаружились перекрестно реагировавшие антитела как против макрофагов, так и против лимфоцитов, но в более низком титре, чем специфические (табл. 1, 2).

Агглютинины и цитотоксины в АМС обнаруживались в титре 1 : 512, комплементсвязывающие антитела — в титре 1 : 256. В сыворотках, хранившихся при температуре —196°, несколько снизилось содержание агглютининов и цитотоксинов (1 : 256), титр комплементсвязывающих антител не изменился.

Титры антител в сыворотках, хранившихся при +4°, снижались интенсивнее: титр цитотоксинов равнялся 1 : 64, агглютининов 1 : 16. Содержание комплементсвязывающих антител также уменьшалось (1 : 128) (см. табл. 1).

Аналогичные результаты получены и при изучении активности АЛС нативной и хранившейся при температуре —196° (см. табл. 2). Титры цитотоксинов и агглютининов снижались после хранения при —196°, а содержание специфических комплементсвязывающих антител не изменялось (1 : 256). В процессе хранения сывороток при +4° в холодильнике резко снижалось содержание агглютининов, цитотоксинов и комплементсвязывающих антител.

Титры перекрестнореагирующих антител были значительно ниже, чем в случае специфических антител, они более заметно снижались как под влиянием низкотемпературной консервации, так и особенно при хранении в холодильнике при температуре +4°.

Таким образом, АМС и АЛС содержат наряду со специфическими и перекрестнореагирующие антитела, титр которых значительно ниже специфических. Специфичность сывороток можно повысить истощением перекрестнореагирующих антител.

Сыворотки могут сохраняться как при +4°, так и при —196°. Титры антител снижаются в обоих случаях, однако при хранении в условиях температуры —196° титры антител изменяются незначительно, а содержание отдельных видов их остается неизменным. Наиболее резко снижаются титры антител при хранении в холодильнике. Количество перекрестнореагирующих антител в обоих случаях уменьшается.

Консервация сывороток при температуре —196° позволяет сохранять препараты с высоким содержанием иммунных антител.

Матеріал, захищений авторським правом

ЛИТЕРАТУРА

1. Greaves R. J. N. — Cryobiology, 1965, **24**, 3, 253.
2. Gudd K. P., Trentin I. I. — Transplantation, 1971, **12**, 83.
3. Shanfield Y., Wren S. F. G., Maclean L. D. — Transplantation, 1971, **12**, 1, 80.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КОЖНЫХ ТРАНСПЛАНТАТОВ

Л. В. Останкова, К. К. Калмыков, Г. Г. Медведева, А. И. Вороновская

Известно, что одним из наиболее эффективных способов закрытия кожных дефектов является кожная гомопластика [3, 4]. В связи с этим потребность в создании больших запасов кожи в жизнеспособном состоянии возрастает. Добиться этого можно лишь при использовании низкотемпературной консервации с применением криопротекторов [1, 6]. При этом важное значение имеет изучение действия низких температур и криопротекторов на иммунобиологические свойства кожных трансплантатов [2, 5, 7].

Целью нашей работы было изучение свойств кожных трансплантатов, подвергнутых воздействию низких температур и криофилактика ПЭО-400, не требующего отмывания. О жизнеспособности кожных лоскутов судили по характеру приживления их в сингенной системе.

Исследования проводили на мышах линии $C_{57}Bl/6$ весом 18—20 *г*. Все животные были разбиты на три группы. Первой группе животных пересаживали интактную кожу; второй группе — деконсервированную кожу, хранившуюся 2 дня в жидком азоте; третьей группе — деконсервированную кожу со сроком хранения 8 дней. Полнослойные кожные лоскуты брали у доноров под гексеналовым наркозом.

Перед замораживанием лоскуты выдерживали в контейнерах с 10%-ным раствором ПЭО-400 в среде 199 на льду в течение 40 *мин*. Консервировали кожные лоскуты быстрым замораживанием до температуры —196° под защитой криопротектора. Ткань хранили в течение 2 и 8 дней в жидком азоте. Деконсервацию кожных лоскутов осуществляли быстрым погружением контейнеров в водяную баню при температуре +41°.

Деконсервированные (не отмытые от протектора) и интактные лоскуты кожи площадью 0,9—1,2 $см^2$ пересаживали на спину реципиентов. Ежедневно осуществляли визуальный счет состояния трансплантатов.

Гистологическое исследование кожных лоскутов проводили на образцах до консервации и пересадки реципиенту, после деконсервации, а также на 6-й день после трансплантации кожи интактной и консервированной в течение 2 и 8 дней. Срезы окрашивали гематоксилин-эозином по методу Ван Гизон. Коллагеновые волокна окрашивали по Маллори. Микроскспирование препаратов осуществляли в световом микроскопе.

С первого по третий день после пересадки кожные трансплантаты, интактные и деконсервированные, выглядели несколько отечными, бледными, теплыми и мягкими на ощупь. К 5-му дню отечность исчезла, цвет трансплантатов интактных не отличался от нормальной кожи, а трансплантаты деконсервированной кожи были более бледными.

Матеріал, захищений авторським правом

У животных трех групп края трансплантатов были тесно спаяны с окружающей тканью.

При исследовании трансплантатов нативной кожи на 6-й день после пересадки обнаружено сращение глубоких слоев дермы с грануляционной тканью, представленной в основном фибробластами. Эпидермис трансплантата гиперплазирован вследствие усиленного развития клеточных элементов мальпигиевого слоя. Коллагеновые волокна несколько набухшие, отчетливо контурируются. Эластические волокна сохраняли нормальную структуру. Воспалительная лейкоцитарная инфильтрация выражена слабо. Лейкоцитарный вал образовывался только в средней части трансплантата. Глубокие слои дермы плотно связаны с грануляционной тканью, из которой прорастают сосуды и тяжи клеток.

Консервированная при температуре —196° в течение 2 и 8 дней кожа сохраняла микроскопическую структуру: эпидермис многослойный, клеточные элементы всех слоев хорошо дифференцируются. Незначительные цитологические изменения выражались в пикнозе ядер и вакуолизации отдельных клеток мальпигиевого слоя эпидермиса. Эпителий волосяных фолликулов, сальных и потовых желез несколько отечен; коллагеновые волокна набухшие, эластические — не изменены. Наблюдалось уменьшение количества пигмента в пигментном слое кожи и корнях волос. Во всех случаях между лоскутами интактных и деконсервированных трансплантатов и тканями реципиента был виден грануляционный слой, представленный фибробластами и незначительно инфильтрированный лимфоцитами и лейкоцитами.

При исследовании гистологического строения деконсервированных трансплантатов кожи после 2 дней хранения в жидком азоте и на 6-й день после трансплантации в эпидермисе обнаружена четкая дифференциация клеточных элементов всех слоев; в отдельных клетках наблюдались пикноз ядер, кариорексис, а также вакуолизация цитоплазмы.

Поверхностный слой дермы слегка отечен из-за набухания коллагеновых волокон. Эластическая сеть, окружающая корни волос и проходящая под эпидермисом, более грубая, чем в интактной коже.

Глубокие слои дермы довольно хорошо сохранялись, в них отчетливо контурировались коллагеновые волокна, почти без клеток. На фоне коллагеновых пучков встречались волосяные фолликулы и свободно лежащие глыбки пигмента.

В консервированном более длительное время (8 дней) кожном трансплантате на 6-й день после пересадки выявлена такая же гистологическая картина. Однако коллагеновые волокна выглядели более отечными во всех слоях дермы, эластичная сеть поверхностного слоя дермы не только огрубевала, но и приобретала извитую, гофрированную форму.

Сравнивая процесс приживления интактной и деконсервированной кожи, мы не отметили существенных различий в характере реакций.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что под влиянием низкотемпературной консервации биологические свойства кожных лоскутов сохраняются, в результате чего приживление этих трансплантатов в сингенных системах не отличалось от такового при имплантации интактных лоскутов.

Для суждения об эффективности низкотемпературной консервации кожных лоскутов необходимо изучать характер их приживления в сингенных системах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арцимович Н. Г. — В кн.: Современные проблемы оперативной хирургии. М., «Медицина», 1968, 2, 38.
2 Арцимович Н. Г. — Иммунобиологические свойства свежих и консервированных тканей при ауто- и гомопластике. Автореф. докт. дис. М., 1971.

Матеріал, захищений авторським правом

3. Барский А. В., Климин В. С. — Хирургия, 1971, 6, 20.
4. Бурмистров В. М. — Вестник хирургии им. И. И. Грекова, 1970, 105, 7, 66.
5. Медведев П. М. — В кн.: Вопросы изосерологии и иммунологии. Л., 1970, 6.
6. Моин М. Л. — В кн.: Трансплантация органов и тканей. Горький, 1970, 480.
7. Сабурова И. В., Балаба Т. Я. — Ортопедия, травматология и протезирование, 1969, 2, 50.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕМЕНТА СЫВОРОТКИ МОРСКИХ СВИНОК В УСЛОВИЯХ ДЕЙСТВИЯ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР И КРИОФИЛАКТИКА

В. М. Маркова, Г. Г. Медведева

Комплемент сыворотки крови — высоколабильная система, легко теряющая активность при действии различных физических факторов, в частности встряхивания, ультрафиолетовых лучей, высокой температуры. Активность комплемента при хранении в холодильнике в течение 3—4 дней снижается на 90% [1, 3], в течение 6 месяцев хранения при —10°, —20° — на 50% [2, 4].

Лишь в единичных работах изучалось влияние ультранизких температур на специфическую активность комплемента [4]. Результаты исследований свидетельствуют о сохранении активности его в течение длительного времени.

В этой связи представляло интерес сравнительное изучение активности комплемента сыворотки, хранившейся при температурах ±4° и —196°.

В работе использовали сыворотку крови морских свинок. Кровь брали из сердца. Для каждого опыта смешивали кровь от 5 животных. Полученную из крови сыворотку разливали по 1,5 *мл* в полиэтиленовые ампулы. Предварительно к одной части сыворотки добавляли криофилактик ПЭО-400 в количестве 5%.

Замораживание проводили в парах жидкого азота в специальном сосуде Дьюара. Скорость охлаждения регистрировалась с помощью медь-константановой термопары, сопряженной с предварительно отградуированным потенциометром ЭПП-09М. Оттаивание проводили при температуре +41°.

Аналогичные образцы сыворотки хранились в холодильнике при температуре +4° в полиэтиленовых ампулах с 5% ПЭО-400 и без него.

Замораживание проводили по следующим программам. Сыворотку без ПЭО-400 замораживали по двухэтапной программе. Скорость охлаждения на первом этапе — 20° в 1 *мин* в интервале температур от +20° до —2° и на втором этапе около 400° в 1 *мин* в интервале температур от —2° до —196°. Сыворотку с 5% ПЭО-400 также замораживали по двухэтапной программе, на первом этапе со скоростью охлаждения 20° в 1 *мин* в интервале температур от +20° до —5°, на втором этапе — со скоростью около 400° в 1 *мин* до —196°.

Активность комплемента в сыворотке определяли методом титрации по схеме реакции Вассермана. Для приготовления гемолитической системы использовали бараньи эритроциты, хранившиеся при +4° в растворе Альсевера в течение трех дней, и гемолитическую сыворотку производства Харьковского завода бактериальных препаратов с титром 1 : 1200. Общий объем ингредиентов реакции составлял 2,5 *мл* (каждый ингредиент вносили в объеме 0,5 *мл*).

Матеріал, захищений авторським правом

Результаты исследований представлены в таблице.

Как видно из представленных данных, титр свежеприготовленного комплемента был 2%. Титр комплемента — минимальное количество сыворотки морской свинки, которое вызывает 100%-ный гемолиз эритроцитов барана в гемолитической системе, состоящей из 3%-ной взвеси эритроцитов и гемолизина в тройном титре. Следовательно, чем меньше этот показатель, тем выше активность комплемента и наоборот.

Активность комплемента сыворотки морских свинок в процессе хранения в разных условиях

Условия хранения	Исходный титр, %	Титр комплемента (%) через	
		7 дней	30 дней
При температуре +4° без ПЭО-400	2	7	18,8
При температуре +4° с 5% ПЭО-400	2	10	19,3
При температуре −196° без ПЭО-400	2	2	2
При температуре −196° с 5% ПЭО-400	2	2	2

Специфическая активность сыворотки, хранившейся в течение месяца при температуре жидкого азота (—196°) без ПЭО-400 и под защитой ПЭО-400, не изменялась, в то время как активность сыворотки, хранившейся в холодильнике без криофилактика, снизилась уже через неделю в 3,5 раза, а с 5% ПЭО-400 — в 5 раз. Через месяц снижение активности комплемента сыворотки по сравнению с исходной активностью было очень существенным — соответственно в 9,4 и 9,7 раза.

Таким образом, активность комплемента резко падает по мере увеличения сроков хранения при температуре +4°. Криофилактик ПЭО-400 при этих температурах отрицательно влияет на свойства комплемента. Активность комплемента не изменяется, если образцы охлаждаются до температуры —196°. В этих условиях ПЭО-400 не оказывает отрицательного влияния на специфические свойства комплемента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бойд У. Основы иммунологии. М., «Мир», 1969, 346.
2. Кэбот Е., Мейер М. Экспериментальная иммунохимия. М., «Медицина», 1968, 158.
3. Сухова Н. О. — В кн.: Труды Томского НИИВС, 11. Томск, 1960, 166.
4. Greaves R. J. N. — Cryobiology, 1965, **24**, 3, 253.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОЙ РНК НА СИНТЕЗ БЕЛКА И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В КЛЕТКАХ КОСТНОГО МОЗГА ПОСЛЕ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЙ КОНСЕРВАЦИИ

Ю. Е. Микулинский, В. В. Андрусенко

Целью настоящей работы было сравнительное изучение интенсивности метаболических процессов в деконсервированных миелокариоцитах под влиянием экзогенных рибонуклеиновых кислот.

Эксперименты по определению скорости синтеза белка и нуклеиновых кислот в клетках нативной и деконсервированной миелоидной ткани со стимуляторами и без них проводили в суспензионной культуре костного мозга по методу Шехтера [5].

Матеріал, захищений авторським правом

Костный мозг консервировали при —196° С с применением 15%-ного полиэтиленоксида с молекулярным весом 400 по двухэтапной программе [4]. Препараты РНК вносили в инкубационную среду из расчета 150 *мкг* на $0{,}5 \cdot 10^8$ клеток костного мозга. РНК выделяли из печени эмбриона человека температурно-фенольным методом [1]. В качестве стимуляторов использовали тотальную клеточную РНК, а также фракцию РНК, полученную при фракционировании хромосомно-ядрышковой РНК на метилированном альбумине [3]. В опытах применяли фракцию РНК, элюируемую с колонки температурно-солевым градиентом, которую А. В. Лихтенштейн [3] обозначает тРНК. В экспериментах использовались как РНК, так и ее ферментативный гидролизат. В качестве гетерологичной РНК применяли препарат коммерческой дрожжевой РНК.

Интенсивность включения метки в белки и нуклеиновые кислоты миелоидной ткани определяли, используя в качестве меченых предшественников C^{14}-гидролизат белков хлореллы, H^3-тимидин и H^3-уридин. Пробы инкубировали в течение 3, 6, 12, 24 *ч*. Разделение РНК, ДНК и белка проводили на нитроцеллюлозных фильтрах по методу Д. Кен-

Относительная удельная активность ДНК, РНК и белка в клетках консервированного костного мозга под влиянием экзогенных РНК, $M \pm m$

Показатель	Вариант системы	Время инкубации			
		3 ч	6 ч	12 ч	24 ч
ДНК	Нативный костный мозг	30,4±2,8	35,8±3,2	38,6±4,0	34,7±2,5
	З.к.м.	17,2±2,2	18,4±1,6	22,7±2,1	20,2±2,7
	З.к.м.+гидролизат РНК	18,2±1,8	17,6±1,4	19,2±2,2	20,8±2,8
	З.к.м.+РНК дрожжевая	16,3±1,6	18,2±2,2	20,6±2,4	21,6±2,3
	З.к.м.+$РНК_1$	19,4±2,1	19,9±2,1	26,2±2,4	24,3±1,7
	З.к.м.+$РНК_2$	19,2±2,0	20,6±1,7	29,4±2,2	28,8±2,3
РНК	Нативный костный мозг	23,2±1,6	27,4±2,6	28,2±3,1	26,4±1,9
	З.к.м.	11,7±1,8	13,5±1,4	15,6±1,9	14,2±1,7
	З.к.м.+гидролизат РНК	13,4±1,8	14,2±1,8	13,6±1,6	12,5±1,3
	З.к.м.+РНК дрожжевая	12,9±1,6	14,7±2,3	16,9±2,3	15,8±2,2
	З.к.м.+$РНК_1$	17,2±1,4	18,4±1,8	18,6±3,1	17,4±2,0
	З.к.м.+$РНК_2$	19,1±2,0	19,7±2,0	21,9±1,8	18,2±2,3
Белок	Нативный костный мозг	20,3±2,4	18,6±1,7	17,6±2,2	15,8±2,1
	З.к.м.	10,4±1,2	12,4±1,6	11,2±1,2	12,3±1,5
	З.к.м.+гидролизат РНК	11,2±1,6	12,5±2,0	13,4±1,7	11,2±0,4
	З.к.м.+РНК дрожжевая	9,6±1,5	11,2±1,2	14,3±1,9	13,4±1,4
	З.к.м.+$РНК_1$	14,5±1,4	14,6±1,2	13,6±1,4	11,7±1,1
	З.к.м.+$РНК_2$	18,0±1,7	17,4±1,5	16,5±1,5	14,2±1,6

Примечание. $РНК_1$ — тотальная клеточная РНК; $РНК_2$ — фракция ядерной РНК (тРНК); З.к.м. — замороженный костный мозг.

нела [2]. Количество белка в пробах определяли по методу О. Лоури [8], РНК — по реакции с орцином [6], ДНК — с дифениламиновым реактивом [7]. Радиоактивность проб измеряли на счетчике фирмы «Интертехник» марки СЛ-40. Степень включения метки в белки и нуклеиновые кислоты выражали в процентах относительной удельной активности (УА), получаемой делением УА соответствующих макромолекул (*имп·мин/мг*) на УА кислоторастворимого фонда.

В результате изучения интенсивности метаболических процессов в суспензионной культуре нативного и деконсервированного костного мозга показано, что под влиянием низкотемпературной консервации в клетках костного мозга наблюдается снижение уровня синтеза белка, ДНК и РНК (таблица).

Матеріал, захищений авторським правом

Применение в качестве стимуляторов препаратов тотальной гомологичной РНК, а также ее фракции, обогащенной мРНК, позволяет увеличить скорость синтеза белка и нуклеиновых кислот в клетках деконсервированной миелоидной ткани. Препараты гетерологичной дрожжевой РНК, а также ферментативный гидролизат гомологичной РНК такого влияния не оказывают.

Использование гомологичной РНК, особенно ее фракции, обогащенной мРНК, в качестве стимуляторов, по-видимому, ускоряло восстановительные процессы в клетках костного мозга после низкотемпературной консервации, что проявлялось в увеличении скорости синтеза белка и нуклеиновых кислот.

ЛИТЕРАТУРА

1. Георгиев Г. П., Мантьева В. Л. — Биохимия, 1962, 23, 949.
2. Кеннел Д. — В кн.: Методы исследования нуклеиновых кислот. М., «Мир», 1970, 138.
3. Лихтенштейн А. В. — ДАН СССР, 1970, **193**, 4, 936.
4. Пушкарь Н. С., Шенберг М. Г., Наконечный А. А., Симонова Л. И., Обозная Э. И., Дроздова О. А., Останкова Л. В., Бодня В. М., Карева Л. В., Михайличенко З. П., Гайсенюк Л. А. — Пробл. гематол., 1971, 8, 21.
5. Шехтер С. Ю. — Пат. физиол. и экспер. терапия, 1965, 9, 81.
6. Albaum H. Y., Umbreit W. W. — J. Biol. Chem., 1947, **167**, 369.
7. Dische Z. — In: The nucleic acid. N. Y., Acad. Press, 1955, 258.
8. Lowry O. H., Rosebraugh N. Y., Farr A. C., Randall B. I. — J. Biol. Chem., 1951, **193**, 265.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

КОНСЕРВИРОВАНИЕ РАЗМОРОЖЕННОГО КОСТНОГО МОЗГА ПРИ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ

А. Г. Федотенков, Г. А. Курбанова,
В. М. Королев, Н. А. Федоров

Литературные данные свидетельствуют о том, что срок хранения размороженного костного мозга при положительных температурах в настоящее время исчисляется несколькими часами [3—5]. Максимально эти сроки могут быть доведены до 24 *ч* [1, 2, 6].

Целью данного исследования являлось изучение сохранности клеток размороженного костного мозга человека (по определению биосинтеза ДНК с применением H^3-тимидина) и удлинение сроков сохранения размороженного костного мозга при положительных температурах (4°÷5°).

Определение интенсивности синтеза ДНК в клетках замороженного костного мозга исследовали методом радиометрии (удельная активность H^3-тимидина — 23 *мккюри/мкМ*, концентрация H^3-тимидина — 2,5 *мккюри* на $2 \cdot 10^6$ клеток). На первом этапе исследований было изучено влияние глюкозо-сахарозных растворов среды 199 на синтез ДНК клетками костного мозга. В дальнейшем в работе с замороженным костным мозгом полученные данные сравнивались с показателями синтеза ДНК в свежезаготовленном костном мозге.

Для исследования использовали свежий костный мозг человека (доноров), который заготавливали на консервирующем растворе ЦОЛИПК-3 или среде 199 в соотношении костного мозга и раствора 1 : 1 и костный мозг, замороженный с 15%-ным глицерином и подготовленный к трансплантации по методике ЦОЛИПК.

Матеріал, захищений авторським правом

При заготовке костного мозга на среде 199 в качестве стабилизатора использовали гепарин 1500 МЕ и ЭДТА Na_2 — 0,1 *г* на 100 *мл* среды. Для осаждения эритроцитов к среде 199 добавляли желатину в том соотношении, что и в растворе ЦОЛИПК-3. Эритроциты осаждали дважды. Затем взвесь костного мозга центрифугировали, супернатант отделяли от клеток костного мозга и переводили в среду для инкубации (среда Игла — 45%, гидролизат лактатальбумина — 45%, сыворотка группы АВ — 10%, ЭДТА Na_2 — 0,05%).

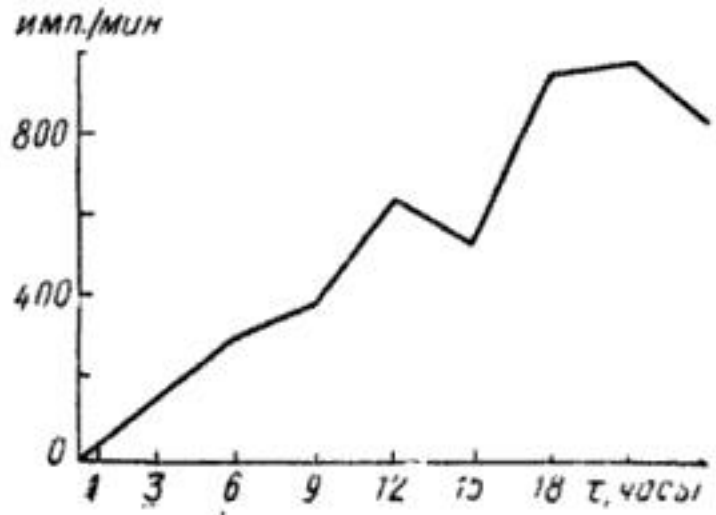


Рис. 1. Кинетика включения H^3-тимидина в ДНК клеток размороженного костного мозга в зависимости от времени инкубации.

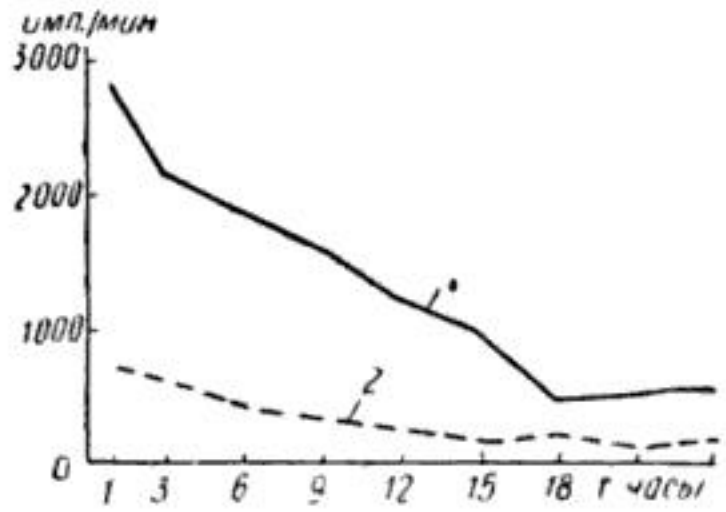


Рис. 2. Кинетика включения H^3-тимидина в ДНК клеток свежезаготовленного костного мозга (*1*) и размороженного (*2*), хранившегося при 4°÷5° в течение 1—24 *ч*.

Подсчет количества ядросодержащих клеток производили в камере Горяева. Концентрацию клеток доводили до $2 \cdot 10^6$ в 1 *мл*. Результаты исследований вычисляли как среднее из 5—6 параллельных опытов.

Инкубацию костномозговой взвеси проводили в термостате при температуре 37° от 1 до 24 *ч*. После прекращения инкубации клетки отделяли от инкубационной среды центрифугированием и спектрофотометрически определяли концентрацию ДНК по Цаневу—Маркову в модификации А. С. Спирина. В аликвотах раствора ДНК измеряли радиоактивность в диаксановом сцинтилляторе на счетчике Nuclear Chicago Mark I. Результаты выражали в импульсах в 1 *мин* на 1 *мкг* ДНК.

Включение H^3-тимидина в ДНК клеток костного мозга, $M \pm m$

Продолжительность инкубации, *ч*	Число импульсов в 1 *мин* на 1 *мкг* ДНК	
	Раствор ЦОЛИПК-3	Среда 199
1	136,6±0,6	145,7±13,8
3	380,3±10,4	443,2±18,7
6	436,7±18,6	647,0±54,0
12	744,4±73,4	969,7±99,9
15	1483,6±275,8	1717,8±521,4
18	1257,8±154,8	1159,1±50,7

При одночасовой инкубации костномозговой взвеси с меченым предшественником клетки костного мозга, заготовленные на среде 199, включают H^3-тимидин в 2 раза интенсивнее, чем костномозговые клетки, заготовленные на растворе ЦОЛИПК-3. Однако при 18-часовой инкубации эта закономерность не отмечается.

Для изучения синтеза ДНК в зависимости от времени инкубации с меченым предшественником была изучена динамика включения H^3-тимидина в ДНК клеток костного мозга, заготовленного на изучаемых растворах. Данные экспериментов представлены в таблице. В интервале от 1 до 15 *ч* включение H^3-тимидина в ДНК довольно сильно повышается при использовании как ЦОЛИПК-3, так и среды 199. Это свидетельствует о том, что эти среды влияют на биосинтез ДНК в одинаковой степени, поэтому в дальнейшей работе опыты проводили с раствором ЦОЛИПК-3.

Была исследована оптимальная активность H^3-тимидина, которая необходима для определения уровня биосинтеза клетками костного

Матеріал, захищений авторським правом

мозга. С увеличением активности H^3-тимидина в среде инкубации возрастает и интенсивность включения меченого предшественника в клетки костного мозга. Так, при увеличении активности препарата от 0,5 до 2,5 *мккюри* на $2 \cdot 10^6$ интенсивность включения возрастает в $2^1/_2$ раза, а при дальнейшем увеличении активности меченого предшественника от 2 до 8 *мккюри* — только в 2 раза ($P<0{,}05$). Это позволяет считать наиболее удобной рабочей активностью 1,5—2,5 *мккюри* на $2 \cdot 10^6$ клеток (в 1 *мл* среды).

Оказалось, что биосинтез ДНК в клетках размороженного костного мозга снижен по сравнению с контрольными образцами нативного костного мозга в 3—4 раза (инкубация 1 *ч* при температуре 37°). Однако после 18-часовой инкубации в размороженном костном мозге происходило увеличение включения метки в 10 раз, как и в опытах с нативным костным мозгом (рис. 1).

Опыты по изучению синтеза ДНК в клетках размороженного костного мозга (инкубация 1 *ч* при 37°) при хранении его в условиях при положительных температурах (4°÷5°) в течение 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 48 *ч*, показали, что в размороженном костном мозге синтез ДНК остается на стабильном уровне до 3 *ч* хранения при продолжительной температуре, к 6 *ч* он снижается в 2 раза, к 24 *ч* — в 5 раз, к 48 *ч* — еще более резко (рис. 2).

Для удлинения сроков хранения размороженного костного мозга использовали ингибиторы (дезоксиаденозин) и стимуляторы (оротовая кислота) синтеза ДНК.

Установлено, что экзогенный дезоксиаденозин обладает сильным ингибирующим эффектом на включение C^{14}-оротовой кислоты и C^{14}-уридина и H^3-тимидина в ДНК. Экзогенный аденозин ингибировал включение оротовой кислоты в ДНК и РНК, но значительно стимулировал включение меченого уридина в РНК и включение меченого уридина и меченого тимидина в ДНК в дозе 1 *мкМ*. Оротовая кислота обладала ингибирующим эффектом. В этих же исследованиях подтверждено, что в клетках нативного костного мозга дополнительный путь биосинтеза пиримидиновых предшественников ДНК функционирует эффективнее, чем путь de novo.

Добавление дезоксиаденозина в клетки размороженного костного мозга в дозах 1, 5, 15 *мкМ* вызывает увеличение ингибирующего эффекта на включение 2-C^{14}-оротовой кислоты в зависимости от увеличения дозы вводимого препарата соответственно в 3, 4 и 10 раз.

Оротовая кислота оказывала также ингибирующее действие на включение в ДНК 2-5-H^3-тимидина и C^{14}-уридина, причем введение оротовой кислоты (доза 5 *мкМ*) в клетки размороженного костного мозга сопровождалось более сильным ингибирующим эффектом, чем введение ее до замораживания.

Подобная картина наблюдается и при использовании дезоксиаденозина. Экзогенный уридин стимулирует включение 2-5-H^3-тимидина и C^{14}-оротовой кислоты в ДНК. Если уридин в дозе 5 *мкМ* вводили перед замораживанием клеток костного мозга, то эффекта не наблюдали.

Таким образом, в клетках свежезаготовленного костного мозга при 18-часовой инкубации биосинтез ДНК увеличивается в 10 раз по сравнению с одночасовой инкубацией. В клетках размороженного костного мозга этот процесс снижен в 3—4 раза по сравнению с образцами нативного костного мозга. Однако при 18-часовой инкубации размороженного костного мозга с H^3-тимидином происходит 10-кратное возрастание включения метки по сравнению с одночасовой инкубацией, т. е. наблюдается регенерация, подобная восстановительным процессам в клетках нативного костного мозга.

При хранении костного мозга при положительной температуре

Матеріал, захищений авторським правом

(4°÷5°) синтез ДНК остается стабильным, т. е. в 3—4 раза ниже, чем в свежем костном мозге, в течение 3 *ч* после размораживания, а затем снижается в 2 раза через 6 *ч* хранения; в 5 раз — к 24 *ч* и почти полностью прекращается через 48 *ч* хранения. Экзогенные дезоксиаденозин и оротовая кислота оказывают ингибирующее действие на биосинтез ДНК. Стимулирующее влияние на биосинтез получено при воздействии на размороженный костный мозг уридина. Добавление к размороженному костному мозгу дезоксиаденозина, оротовой кислоты, уридина не удлиняет срока сохранения миелокариоцитов при температуре 4°÷5°.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лаврик С. С. Консервирование костного мозга глубоким замораживанием. Докт. дис. Киев, 1966.
2. Пегг Д. Е. — Пробл. гематол., 1966, 10, 26.
3. Федотенков А. Г. — Пробл. гематол., 1961, 2, 46.
4. Fiala J. — Physiol. Bohemoslovaca, 1970, **19**, 441.
5. Ferrebee F. W. — Blood, 1957, **12**, 12, 1096.
6. Pyle H. M. — Bibl. Haematol., 1965, **23**, 652.

Центральный ордена Ленина
институт переливания крови

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

ТЕРМИНОЛОГИЯ КРИОБИОЛОГИЧЕСКИХ ЯВЛЕНИЙ*

С. Н. Мацко

Криобиологическая терминология не отличается точностью: для обозначения одного и того же явления используют разные термины, в одно и то же понятие иногда вкладывают разное содержание, некоторые физические термины используют неправильно в отношении биологических объектов.

Остановимся вначале на понятии «криобиология», предложенном Парксом [29] в качестве названия нового журнала (Cryobiology). Термин «криобиология» расшифровывается как наука о жизни в условиях холода (kryos — холод), поэтому ограничивать его какими-либо температурными рамками представляется нецелесообразным.

Рассмотрим термины, которые имеют прямое отношение к криобиологии.

Мезабиоз — термин, обозначающий промежуточное состояние между «анабиозом» и «жизнедеятельностью». Характерным для мезабиоза считается наличие только процессов диссимиляции [9]. Выделение этого понятия из гипобиоза можно признать полностью узаконенным, если будет доказано существование подобного состояния.

Зимняя спячка. Четкую формулировку этого термина дал Расмуссен [32]: сезонное явление у животных с постоянной температурой тела. Однако «зимней спячкой» стали обозначать оцепенение у животных с переменной температурой тела, а именно — у насекомых [3, 12, 20 и др.], состояние черепах в зимнее время [23] и у животных с переменной температурой тела вообще [13].

Против подобного расширения этого термина справедливо восставал П. Ю. Шмидт. Полагаем, что за термином «зимняя спячка» следует сохранить значение состояния пониженной жизнедеятельности в зимнее время только у животных с постоянной температурой тела.

---

* Доклад на заседании Московского общества испытателей природы (январь 1972 г.).

Матеріал, захищений авторським правом

Критерии жизни. Этот термин не требовал бы пояснений, если бы не получил широкое распространение другой, применяемый вместо «критериев жизни», а именно — «показатели жизнеспособности» [2, 15].

Критерии жизни — это признаки, по которым можно отличить живой организм от мертвого. Термин «жизнеспособность» можно применять, только когда биологический объект находится в состоянии анабиоза (см. ниже); его нельзя назвать живым, но он жизнеспособный, поскольку при изменении внешних условий он может стать живым.

Температурные зоны. Полагаем, что в криобиологии правомочно выделение по крайней мере двух температурных зон: 1) вообще отрицательные температуры, при которых вода в биологических объектах, замерзая, может переходить в качественно иное состояние; 2) температуры порядка —150° и более низкие, при которых наблюдаются особые виды анабиоза.

Холодостойкость (холодоустойчивость). Под этим понимают способность переносить: 1) замерзание [27]; 2) вообще низкие температуры [30]; 3) низкую температуру при отсутствии льдообразования в теле [10].

Далее, под «холодостойкостью» стали понимать количество градусов (ниже 0°), на которое может снижаться температура тела при переохлаждении. В этом смысле начали применять термины «холодостойкость» у насекомых [4, 14], «морозостойкость» у насекомых [8] и «устойчивость к низким температурам» у клещей [6].

Полагаем, что под «холодостойкостью» следует понимать способность организмов переносить вообще холод, с обязательным указанием, определялись переносимые низкие температуры при переохлаждении или при замерзании организмов.

Переохлаждение. Термин «переохлаждение» [3, 5 и др.] и «глубокое переохлаждение» [1] применяют для состояния, при котором температура тела остается положительной. Под переохлаждением следует понимать снижение температуры данного объекта ниже начальной температуры его замерзания, но при отсутствии замерзания.

Анабиоз. Под «анабиозом» следует понимать обратимое полное прекращение жизненных процессов [21, 35] либо значительное угнетение их [7, 10, 17, 18, 19, 23, 28 и др.]. Полагаем, что анабиоз следует считать особым состоянием, отличающимся от необратимой смерти или, как еще называли, «абсолютной смерти» [26], или «истинной смерти» [11, 23], сохранением структуры. Его нельзя отнести и к состояниям жизни, поскольку жизнь — процесс, связанный не только со структурой, но и с функцией биологического объекта.

Возможность применения термина «химический анабиоз» в отношении тканей, хранимых в слабых растворах формалина, требует дополнительных доказательств, так как в этих условиях наблюдался рост костной ткани [19].

В заключение следует подчеркнуть необходимость введения единообразия в формулировку криобиологических терминов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Атабегова Н. Г. — В кн.: Теоретические проблемы действия низких температур на организм. Материалы II Всесоюз. конф. Л., 1969, 3.
2. Баллюзек Ф. В., Костин Э. Д., Малахов С. Ф., Рябоконь Р. В. — В кн.: Оценка жизнеспособности организмов и тканей. Материалы конф. М., «Медицина», 1970, 9.
3. Варман И. Г., Кузнецова З. П. VII Всесоюз. съезд физиологов, биохимиков, фармакологов. Докл. М., Медгиз, 1947, 633.
4. Веймер С. А. — В кн.: Холодостойкость насекомых и клещей. Материалы симпоз. Тарту, 1971, 11.
5. Векслер Я. И., Атабегова Н. Г. — В кн.: Теоретические проблемы действия низких температур на организм. Материалы II Всесоюз. конф. Л., 1969, 7.
6. Гейспиц К. Ф., Орловская Э. Э. — В кн.: Холодостойкость насекомых и клещей. Материалы симпоз. Тарту, 1971, 16.

Матеріал, захищений авторським правом

7. Генкель П. А., Пронина Н. Д. — Физиол. раст., 1969, **16**, 896.
8. Глиняная Е. И. — В кн.: Холодостойкость насекомых и клещей. Материалы симпоз. Тарту, 1971, 21.
9. Голдовский А. М. — Журн. общей биол., 1963, **24**, 81; 1970, 31, 316.
10. Граевский Э. Я. — Зоологич. журн., 1948, **27**, 1, 17.
11. Иванов И. П., Иванова Т. И. — Бюл. эксп. биол. и мед., 1948, **6**, 443.
12. Иванчик Е. П. — В кн.: Холодостойкость насекомых и клещей. Материалы симпоз. Тарту, 1971, 27.
13. Калабухов Н. И. Спячка животных. Изд-во ХГУ, Харьков, 1956.
14. Кипятков В. Е. — В кн.: Холодостойкость насекомых и клещей. Материалы симпоз. Тарту, 1971, 35.
15. Кузнецов В. Н. — В кн.: Оценка жизнеспособности органов и тканей. Материалы конф. М., «Медицина», 1970, 29.
16. Лапчинский А. Г. — Трансплантация органов и тканей. Горький, 1970, 475.
17. Лозина-Лозинский Л. К. Очерки по криобиологии. Л., «Наука», 1972.
18. Мартехов П. Ф. — Тр. Новосибирского зоосада, **1**, 1937, 51.
19. Мелконян Г. А. — Усп. соврем. биол., 1950, **30**, 309.
20. Меривэ Э. Э. — В кн.: Холодостойкость насекомых и клещей. Материалы симпоз. Тарту, 1971, 72.
21. Мурский Л. И. — В кн.: Физиология гипотермии. Уч. зап. Ярославского пед. института, 44. Ярославль, 1958, 187.
22. Неговский В. А. — В кн.: Актуальные вопросы реаниматологии и гипотермии. Материалы симпоз. М., «Медицина», 1964, 5.
23. Попугаева А. Г. — Бюл. эксп. биол. и мед., 1944, **18** (3), 50.
24. Шмидт П. Ю. Анабиоз. М.—Л., Изд-во АН СССР, 1948.
25. Bachmetjew P. — Biol. Zbl., 1901, **21**, 672.
26. de Halluin, 1895. — Cit.: Malinin T. I., Perry V. — Cryobiology, 1967, **4**, 103.
27. Harvey R. B. — J. Agric. Res., 1918, **15**, 2, 83.
28. Keilin D. — Proc. Roy. Soc., 1959, **15**, 2, 83.
29. Parkes A. S. — Cryobiology, 1964, **1**, 3.
30. Payne N. M. — J. Morphol. Physiol., 1927, **43**, 521.
31. Preyer W. — Elemente der allgemeiner Physiologie. Leipzig, 1883, 83.
32. Rasmussen A. T. — Amer. Naturalist, 1916, **50**, 604.

Лаборатория экспериментальной физиологии
по оживлению организмов АМН СССР

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

ТОКСИКО-ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ОКСИЭТИЛИРОВАННОГО ПЕНТАЭРИТРИТА

Э. С. Гусарова, Д. А. Ткаченко, З. П. Михайличенко

Нами было проведено изучение токсико-фармакологических свойств синтезированного в Институте проблем криогенной биологии и медицины АН УССР оксиэтилированного пентаэритрита (ОЭПЭ) молекулярного веса 450—500.

На основании данных литературы [3, 4, 5, 6, 7] и собственных наблюдений следовало ожидать, что полученный препарат окажется

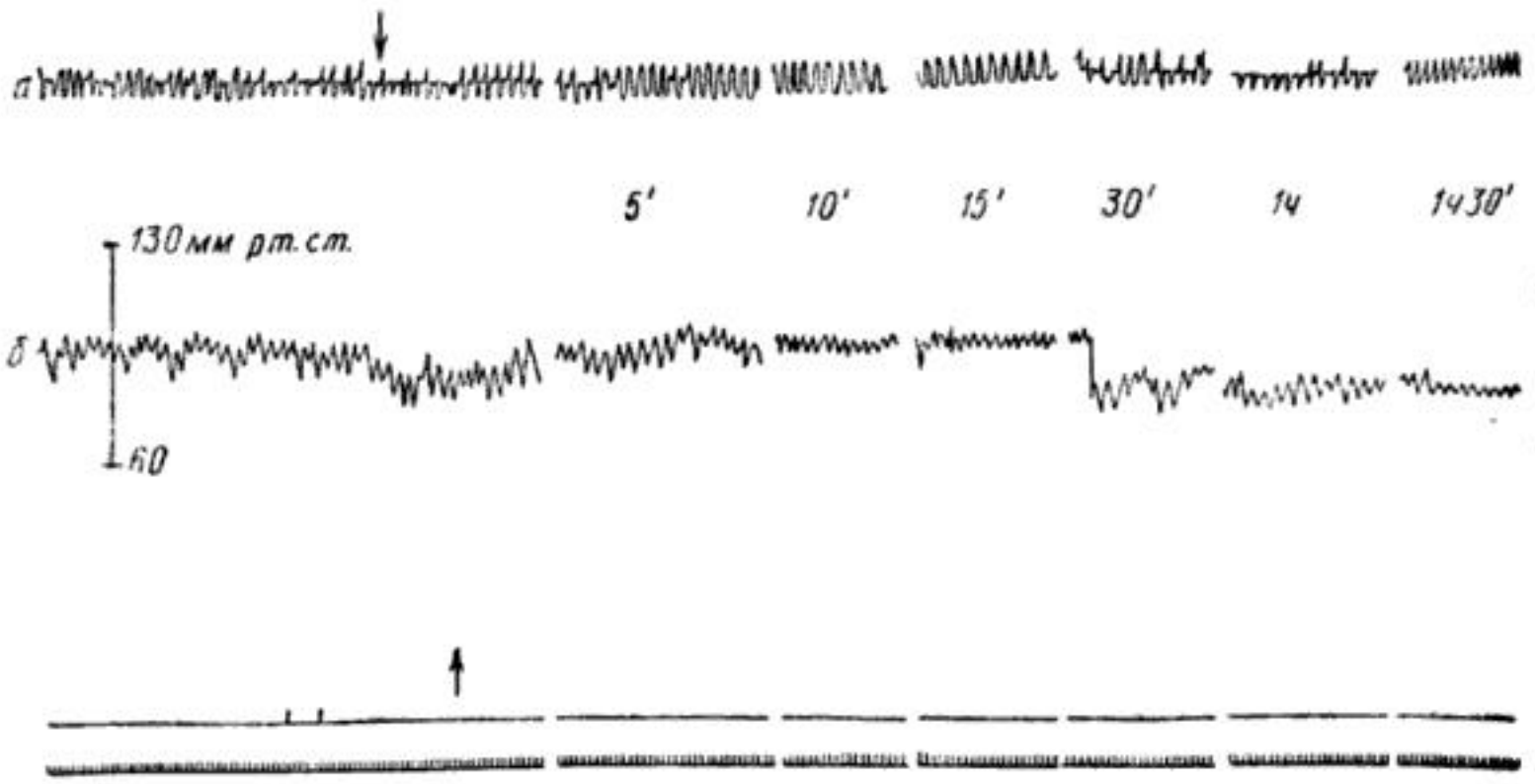
Сравнительная характеристика

Серия опыта	Нв, мг%	Лейкоциты	Эритроциты	Лейкоформула: Нейтрофилы: палочкоядерные
I	12,4±0,3	10010±2452	4426000±260900	0,5±0,12
III	12,0±0,28	9597±446	4188000±159500	0,8±0,11
P	0,05	0,05	0,05	0,05
II	12,5	9252±241	4429866±138200	0,8±0,11
III	12,0±0,28	9597±446	4188000±159500	0,8±0,11
P	0,05	0,05	0,05	0,05

Матеріал, захищений авторським правом

физиологически индифферентным. Определялась токсичность ОЭПЭ в острых и субхронических опытах, его влияние на сердечно-сосудистую систему, состав периферической крови и состояние свертывающей системы крови.

При изучении токсичности в острых опытах определяли верхние ее параметры: абсолютно смертельную, среднесмертельную и максимально переносимую дозы. При этом учитывалось также общее состояние животных, их поведение, отношение к пище и др. За животными наблюдали в течение 21 дня.



Влияние ОЭПЭ в дозе 3,9 *г/кг* на дыхание (*а*) и кровяное давление (*б*) через 5 *мин*; 10 *мин*; 15 *мин*; 30 *мин*; 1 *ч*; 1 *ч* 30 *мин*. Отметка времени — 5 *сек*.

Опыты были поставлены на 100 крысах весом 150—180 *г*. Препарат вводили внутрибрюшинно в 10%-ной концентрации на изотоническом растворе NaCl. Экспериментальные данные обработаны графическим методом Литчфилда и Уилкоксона [1] в модификации Рота. Установлено, что $ЛД_{50}$ для белых крыс составляет 19,5 (17,5—21,6) *г/кг*; $ЛД_{100}$ — 28,7 *г/кг*; максимально переносимой оказалась доза 11,5 *г/кг*. Выжившие животные внешне ничем не отличались от интактных.

Подострая токсичность ОЭПЭ изучалась на кроликах обоего пола породы шиншилла весом 3,5—4,05 *кг*. Изучали действие ОЭПЭ в дозах в 3—5 раз превышающих предполагаемую терапевтическую. Поставлено три серии опытов: в I препарат вводили в дозе 1,95 *г/кг*; во II — 0,97 *г/кг*; III серия служила контролем. ОЭПЭ в 10%-ной концентрации на изотоническом растворе хлорида натрия вводили внутривенно ежедневно в течение месяца. Общее состояние животных в контрольной серии: поведение, общий вид, отношение к пище, активность животных

картины периферической крови

грамма, %				
трофилы				
сегменто-ядерные	Лимфоциты	Моноциты	Эозинофилы	Базофилы
33±3,44 47,5±3,3 0,05	58±4,06 42,8±3,9 0,05	4±0,5 5±0,71 0,05	2,5±0,57 0,8±0,1 0,05	2±0,68 3±0,57 0,05
35±4,7 49,5±3,8 0,05	54,5±5,0 42,8±3,9 0,05	4,6±0,39 5±0,71 0,05	1,6±0,7 0,8±0,1 0,05	3±0,6 3±0,57 0,05

Матеріал, захищений авторським правом

не изменялись. Вес отдельных органов (легкие, печень, почки, селезенка, надпочечники) в опытных сериях не отличался от таковых в контрольной серии. В состоянии свертывающей системы крови каких-либо отклонений от исходного фона не отмечено.

При изучении гемограммы в серии опытов, где животным вводили ОЭПЭ в дозе 0,97 *г/кг*, наблюдалось достоверное увеличение числа лимфоцитов, сегментоядерных клеток и эозинофилов (таблица).

В острых опытах на кошках при внутривенном введении ОЭПЭ в дозе 3,9 *г/кг* наблюдалось достоверное понижение как систолического, так и диастолического давления, начиная с 30-й *мин* действия препарата. Эти явления отмечались в течение 30 *мин*, а начиная с 1,5 *ч* действия препарата показатели диастолического давления возвращались к исходным цифрам. ОЭПЭ в дозе 1,95 *г/кг* вызывал лишь кратковременное понижение систологического давления на 45-й минуте действия, к 60-й минуте последнее возвращалось к исходному уровню (рисунок).

Изменения основных показателей ЭКГ оказались статистически недостоверными.

Доза 3,9 *г/кг* веса вызывала достоверное увеличение амплитуды и частоты дыхательных движений в течение 10 *мин*. Частота дыхательных движений возвращалась к исходной к 30-й минуте наблюдения, увеличение амплитуды длилось до 1,5 *ч*.

Таким образом, можно сделать предварительное заключение, что ОЭПЭ, изучаемый в указанных дозах, согласно классификации С. Д. Заугольникова и др. [2], относится к малотоксичным веществам. Он вызывает кратковременное снижение артериального давления, изменение дыхания (увеличение амплитуды и частоты), ведет к увеличению числа лимфоцитов, сегментоядерных клеток и эозинофилов. С увеличением дозы действие препарата усиливается.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кудрин А. Н., Пономарева Г. Т. Применение математики в экспериментальной и клинической медицине. М., «Медицина», 1967.
2. Заугольников С. Д., Лойт А. О., Иваницкий А. А. Общие вопросы промышленной токсикологии. М., МЗ СССР, 1967, 46.
3. Carr C. J., Beck F. F., Krantz J. C. — J. Amer. Chem. Soc., 1936, **58**, 1934.
4. Davies D. S., Hinchel Wood C. N. — Franç. Faraday Soc., 1947, **43**, 257.
5. Ferry J. D., Schulman S. J. — J. Amer. Chem. Soc., 1949, **71**, 3198.
6. Kunkel A. M., Carr C. J., Krantz J. C. — Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1939, **42**, 438.
7. Kutsaher W. Z. — Physiol. Chem., 1948, **283**, 268.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ВЕСОВОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ОКСИЭТИЛИРОВАННОГО ПЕНТАЭРИТРИТА С ПОМОЩЬЮ ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

В. С. Кривич, Г. Г. Кочуровская, Н. М. Матвиец

Механизм действия криофилактика существенно зависит от его состава, в частности для полимеров — от соотношения низко- и высокомолекулярных фракций. Методы тонкослойной и адсорбционной хроматографии, разделения центрифугированием, криоскопия не могут дать ответа на вопрос о количественном соотношении полимергомологов [1, 2, 3].

Матеріал, захищений авторським правом

Нами разработан метод определения молекулярно-весового распределения оксиэтилированного пентаэритрита молекулярного веса 450 на основе газохроматографических данных.

С целью снижения температуры кипения оксиэтилированного пентаэритрита использован прием, заключающийся в блокировании конечных гидроксильных групп, что обеспечивает получение производных с более низкой электроотрицательностью кислорода в ОН-группах. Это уменьшает водородное взаимодействие между сорбитом и жидкой фазой, ведущее к уменьшению объемов удерживания.

Блокирование конечных ОН-групп можно проводить несколькими способами. Обычно, используют реакции метилирования диметилсульфатом в щелочной среде, хлорирования тионилом хлористым. В первом случае образуется полный простой метиловый эфир оксиэтилированного пентаэритрита, во втором — его хлорпроизводное с более низкой точкой кипения. Оба эти метода громоздки, требуют удаления из реакционной среды основного продукта и его дополнительной очистки.

Газохроматографическому определению подвергали триметилсилановые производные оксиэтилированного пентаэритрита, получаемые действием триметилхлорсилана в пиридине в присутствии гексаметилдисилазана. При этом происходит количественное триметилсилирование всех свободных гидроксильных групп молекул оксиэтилированного пентаэритрита.

Реакция протекает по следующей схеме:

$$-\overset{|}{\underset{|}{C}}-CH_2(OCH_2CH_2)_nOH + (CH_3)_3SiCl \rightarrow$$

$$\rightarrow -\overset{|}{\underset{|}{C}}-CH_2(OCH_2CH_2)_nOSi(CH_3)_3 + HCl,$$

$$(CH_3)_3SiNHSi(CH_3)_3 + 3(PyHCl) \rightarrow 2(CH_3)_3SiCl + NH_4Cl + Py.$$

Образующиеся в результате реакции триметилсилановые производные можно прямо без выделения вводить в испаритель хроматографа. Образующийся в процессе силирования небольшой осадок хлористого аммония не мешает проведению анализа. Пиридин удаляют в роторном испарителе при температуре 40°. Остаток после упаривания промывают четыреххлористым углеродом и нормальным гексачом.

Анализ проводили на хроматографе «Цвет-4», колонка 100×0,3 *см*, твердый носитель — Целит (100—120 меш.), промытый кислотой, жидкая фаза OV-17 (20%), температура колонки 270°, температура испарителя 400°, скорость прохождения газа-носителя (He) — 50 *мл/мин*, детектор ДИП-2.

Для интерпретации пиков, полученных при газохроматографическом разделении эфиров пентаэритрита, определялись объемы удерживания индивидуальных оксиэтилированных продуктов, полученных с помощью адсорбционной колоночной хроматографии.

Зная логарифм приведенных объемов удерживания по правилу Джеймса и Мартина можно, используя зависимость логарифма объемов удерживания от длины оксиэтиленовой цепи, определить объемы удерживания любого гомолога исследуемого ряда.

Количественно хроматограммы обсчитывались по площади пиков. Процентное содержание отдельных полимергомологов в октиэтилированном пентаэритрите (А) рассчитывали по следующей формуле:

$$A = \frac{Si \cdot 100}{\Sigma Si},$$

где Si — площадь пика индивидуального полимера, ΣSi — сумма

Матеріал, захищений авторським правом

площадей всех пиков, полученных в результате хроматографического разделения.

Молекулярно-весовое распределение оксиэтилированного пентаэритрита со степенью замещения равной 7 звеньям окиси этилена подчиняется Гауссовскому распределению. Степень разброса оксиэтильных групп равна от 1 до 13. Максимум кривой соответствует содержанию около 50% полимера.

Таким образом, разработан газохроматографический метод анализа, позволяющий определять состав синтезированных октиэтильных производных пентаэритрита.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dorhguist — J. Acta Chem. Scand., 1966, **20**, 572.
2. Huebner V. R. — Anal. Chem., 1962, **84**, 488.
3. Weimer D. R., Copper D. E. — J. Amer. Oil Chem. Soc., 1966, **43**, 7.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

О МЕТОДАХ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛИЭТИЛЕНОКСИДА В БИОЛОГИЧЕСКИХ СУБСТРАТАХ

Л. В. Карева

Биотрансформация криопротектора полиэтиленоксида с молекулярным весом 400 (ПЭО-400) в организме и особенности его взаимодействия с различными клеточными и неклеточными структурами изучены недостаточно. Для решения этих вопросов необходимы методы количественного определения ПЭО в биологических субстратах. Анализ литературы показал, что для количественного определения этих соединений применялись различные методы.

Хроматографические методы открыли большие возможности разделения и тонкого анализа различных многокомпонентных систем [9]. Однако в условиях физиологического эксперимента, когда возникает необходимость определения вещества из биологического субстрата повторно, эти методы оказываются непригодными. Разновидностью этих методов является тонкослойная хроматография, примененная Брейбергом [10] для выявления ПЭО на различных сорбентах. Вахтина и соавт. (цит. по [6]) с помощью этого метода разделили смеси, содержащие моно-, ди-, триэтиленгликоль и ПЭО с молекулярными весами 200, 300, 600, 1000, 2000. Куме и соавт. [13] при помощи бумажной хроматографии определяли ПЭО с различными молекулярными весами. Подобраны наиболее пригодные растворители для хроматографии этой группы полимеров и получено четкое разделение ПЭО на силикагеле [3, 4].

Метод тонкослойной хроматографии для определения ПЭО в водных растворах, разработанный в Харьковском научно-исследовательском химико-фармацевтическом институте [6], был применен для определения ПЭО-400 в моче [8]. Однако этим методом не удается точно определить содержание ПЭО ни в водных, ни в биологических средах, ибо он является полуколичественным.

Наиболее доступными в биологических экспериментах остаются химические методы определения ПЭО [12, 13, 16]. Все они основаны на способности ПЭО к комплексообразованию с различными соединениями в кислой среде. Это свойство меняется в зависимости от молекулярного веса. Так, турбидиметрическим методом [12] ПЭО определяется по образованию устойчивой мути в результате взаимодействия с солями

Матеріал, захищений авторським правом

бария. Этот метод испытан нами для определения ряда ПЭО с различными молекулярными весами (от 4000 до 300). Оказалось, что этот метод пригоден для определения ПЭО с молекулярным весом от 3000 до 600. Для низкомолекулярных ПЭО этот метод не пригоден.

Метод определения маннита в биологических объектах [1] также был применен нами для идентификации ПЭО, но использовать его для определения полимеров окиси этилена не удалось.

Количественное определение полиэтиленгликолей по количеству образовавшегося формальдегида описали Коркоран и Пейдж [11]. Принцип метода состоит в том, что маннитол окисляется периодатной кислотой до формиатной кислоты и формальдегида. Периодат восстанавливается до иодида $SnCl_2$ и образовавшийся формальдегид определяется по Мак-Фадьену [16]. Этот метод также не удалось использовать для определения ПЭО-400, ибо на последнем этапе после кипячения с хромотроповой кислотой образуется белая муть, препятствующая колориметрированию.

Ю. Н. Гладчикова и Н. И. Шумарина [2] для определения формальдегида предложили использовать более точный метод, основанный на реакции между хромотроповой кислотой и формальдегидом в сернокислой среде с образованием соединения, окрашенного в фиолетовый цвет. Примененный нами для определения ПЭО-400 этот метод не дал положительных результатов (хотя этиленгликоль и пентаэритрит дают эту реакцию).

Е. А. Перегуд и Е. В. Гернет [7] для определения этиленгликоля применили метод, предложенный Гронсберг [5]. Принцип метода — окисление этиленгликоля иодной кислотой до формальдегида. Формальдегид определяется колориметрически по реакции с хромотроповой кислотой. Этот метод был использован нами для определения ПЭО-400 в водных растворах и биологических средах. Была построена калибровочная кривая, указывающая на пропорциональную концентрационную зависимость. Ход работы заключается в следующем: к 2 *мл* исследуемой жидкости добавляли 0,5 *мл* серной кислоты и 0,3 *мл* раствора периодата калия. Смесь перемешивали и давали постоять 30 *мин*. Затем для восстановления избытка KIO_4 добавляли по каплям сульфит натрия до исчезновения окраски выделившегося иода. После прибавления 2,5 *мл* хромотроповой кислоты пробы ставили на кипящую водяную баню. К охлажденным растворам добавляли 2 *мл* воды, осторожно перемешивали и через 5 *мин* измеряли оптическую плотность растворов на ФЭК с желтым светофильтром.

Предлагаемый метод доступен, пригоден для серийных определений и позволяет производить исследование количества ПЭО-400 в водных растворах. В настоящее время мы изучаем возможность использования метода для количественного определения ПЭО в биологических средах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гайдина Г. А. — Патологическая физиология и экспериментальная терапия, 1960, 4, 85.
2. Гладчикова Ю. Н., Шумарина Н. И. — Гигиена и санитария, 1968, 4, 83.
3. Глузман М. Х., Дашевская Б. И., Бодня В. М. — Высокомолекулярные соединения, 1960, **11**, 12, 1832.
4. Глузман М. Х., Дашевская Б. И., Фридман Г. М. — Журн. прикладной химии, 1965, **38**, 2319.
5. Гронсберг Е. Ш. — Химическая промышленность, 1960, 2, 162.
6. Дашевська Б. І., Литвиненко А. Л. — Фармацевтичний журнал, 1969, 5, 40.
7. Перегуд Е. А., Гернет Е. В. Химический анализ воздуха промышленных предприятий. М., «Медицина», 1970.
8. Пушкарь Н. С., Шенберг М. Г., Наконечный А. А., Симонова Л. И., Обозная Э. И., Михайличенко З. П., Гайсенюк Л. А., Бодня В. М. — Пробл. гематол., 1972, 3, 30.

Матеріал, захищений авторським правом

9. Цвет М. С. Хроматографический адсорбционный анализ. М., Изд-во АН СССР, 1946.
10. Breitburd P., Puisieux F., Lehir A. — Ann. Pharm. Franç., 1966, **24**, 3, 191.
11. Corcoran A. C., Page I. H. — J. Biol. Chem., 1947, **170**, 1, 165.
12. Hyden S. — Kgl. Lantbruk's-Hogskol Ann., 1956, 22, 139.
13. Kume S. et al. — Chim. Zbl., 1954, 10, 8412.
14. MacFadyen D. A — J. Biol. Chem., 1940, **135**, 231.
15. Shaffer C. B., Critchfield F. H., Nair J. H. — J. Amer. Pharm. Ass., 1950, **39**, 6, 340.
16. Smyth H. F., Jr., Carpenter Ch. P., Weil C. S. — J. Amer. Pharm. Ass., 1950, **39**, 6, 349.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЕ ПОСЛЕ ЕЕ КРИОДЕСТРУКЦИИ

А. С. Бреславский, Б. А. Вартапетов, А. И. Гладкова, В. Ф. Криворотько, С. Ю. Масловский

Успехи криобиологии, достигнутые за последнее время, привели к развитию криохирургии. Широкому внедрению криодеструкции предстательной железы в клинических условиях препятствует отсутствие всестороннего исследования последствий этой операции, в частности характера морфологических изменений в предстательной железе и парауретральных тканях.

Перед нами стояла задача выяснить в экспериментальных условиях картину морфологических изменений предстательной железы в разные сроки после замораживания.

Криодеструкция предстательной железы осуществлялась жидким азотом, поступающим из стандартного 15-литрового сосуда Дьюара под соответствующим давлением (не менее 0,5 *атм*) через систему соединительных трубок в криокатетер, усовершенствованный нами (В. Ф. Криворотько). Необходимым условием является герметичность системы.

Ввиду особенностей анатомического строения уретры собаки ввести жесткий катетер через уретру до простаты не представляется возможным. В связи с этим замораживание предстательной железы у собак является полостной операцией. Доступ к предстательной железе осуществлялся с помощью нижней срединной лапаратомии. Ретроградно со стороны полости мочевого пузыря в простатический отдел уретры вводили криокатетер. Прилежащие ткани предохранялись от замораживания криопротекторами (неокомпенсаном, гемодезом). Предстательная железа гидратировалась физиологическим раствором. Для определения оптимальных условий криодеструкции испытывали разную холодовую экспозицию — от 2 до 34 *мин*. Наилучшие результаты достигались при замораживании в течение 5—15 *мин*.

Замораживание предстательной железы производилось у 25 половозрелых собак, 14 из них были умерщвлены в разные сроки после операции для проведения морфологических исследований. Макро- и микроскопическими методами исследования изучали внеорганные нервы и сосуды, включая тонкую препаровку нервов и инъекцию сосудов. Для гистологического изучения материал фиксировали в 10%-ном формалине и заливали в целлоидин. Срезы предстательной железы толщиной не более 5—6 *мк* окрашивали гематоксилином с эозином, в отдельных случаях окраска срезов производилась по методу Ван Гизон. Полученные гистологические препараты изучали и фотографировали.

Матеріал, захищений авторським правом

При микроскопическом изучении гистологических срезов предстательных желез собак, подвергавшихся охлаждению жидким азотом, на 2—6-й день после криодеструкции наблюдались явления острого альтеративного воспаления. При этом в одних случаях в препаратах сохранялись концевые отделы трубчато-альвеолярных железок обычных размеров, стенки которых образовывали складки, а их полости содержали остатки оксифильного секрета; у других собак концевые отделы трубчато-альвеолярных железок представлялись мелкими, овальной формы, с сохранением альвеолярных полостей. В первом случае эпителиальные железистые клетки сохраняли высокопризматическую или кубическую форму, во втором — низкопризматическую. Кроме того, обращает на себя внимание, что указанные клетки претерпевали глубокие дистрофические нарушения, подвергаясь кариопикнотическим и даже кариолитическим изменениям. Если ядра железистых клеток сохранялись, они располагались непосредственно у базальной мембраны. В цитоплазме этих клеток интрацеллюлярные гранулы секрета отсутствовали, и она казалась однородной крупногранулярной структурой.

Миоэпителиальные элементы предстательной железы в случаях, когда обнаруживались концевые отделы с сохранением ацинарных полостей, подвергались значительным дистрофическим и атрофическим изменениям. При скоплении сравнительно мелких ацинарных образований структура миоэпителиальных элементов в основном сохранялась. Соединительнотканная строма почти во всех случаях оказалась умеренно развитой. Вокруг железистых элементов предстательной железы наблюдались значительных размеров диффузные воспалительные инфильтраты. К 6-му дню после криодеструкции воспалительные инфильтраты обнаруживались реже и носили очаговый характер.

Обращает на себя внимание выраженная гиперемия кровеносных сосудов, а также огромные диффузные кровоизлияния, которые располагались как между оставшимися концевыми отделами железистой паренхимы предстательной железы, включая ацинарные полости, так и в прослойках миоэпителиальных элементов и соединительной ткани.

Ткань замороженной предстательной железы подвергалась секвестрации. При этом в отдаленные после операции сроки (после 3 месяцев) наблюдалось значительное уменьшение размеров и веса предстательной железы. У собак, забитых через 5—6 месяцев после операции, при патологоанатомическом обследовании в области предстательной железы, подвергнутой криодеструкции, имеется избыточно разросшаяся грубоволокнистая соединительная ткань, в которой к остаткам органа подходят внеорганные нервы и сосуды.

При гистологическом исследовании срезов предстательной железы в отдаленные после операции сроки (5—6 месяцев) выявлены изменения, противоположные наблюдаемым в первые дни после операции. Паренхима этих желез представлена мелкими единичными скоплениями железистых эпителиальных клеток, полностью утративших ацинарное строение и подвергшихся резким дистрофическим, а также атрофическим изменениям. Границы клеток не определялись, ядер их почти не было, а те, что сохранились, претерпели выраженные пикнотические изменения. Цитоплазма этих клеток была резко базофильна и представляла собой гомогенную однородную структуру.

В указанные сроки после операции миоэпителиальные элементы предстательной железы почти полностью замещались плотной фиброзной грубоволокнистой соединительной тканью. Кроме отмеченных выше мелких единичных эпителиальных скоплений, вся предстательная железа представляла собой плотную зрелую соединительнотканную строму, что следует рассматривать как исход хронического пролиферативного воспалительного процесса, который обычно трактуется как склероз

Матеріал, захищений авторським правом

или цирроз органа. Местами обнаруживались кровеносные сосуды с явно утолщенными атеросклеротическими стенками.

Таким образом, результаты проведенного патоморфологического исследования предстательной железы собак, подвергавшейся криовоздействию жидким азотом, позволяют сделать заключение, что в ранние сроки после криодеструкции (до 6 дней) наблюдаются в разной степени выраженные явления острого альтеративного воспаления. В отдаленные сроки (5—6 месяцев) в предстательной железе развивается хронический (пролиферативный) воспалительный процесс с исходом в фиброз и склероз с полной потерей функционирующих железистых паренхиматозных элементов. Согласно предварительным данным, полученным на этих же собаках, в отдаленные после операции сроки не выявляются изменения в тканях и органах, прилежащих к предстательной железе. Последнее имеет большое значение, так как свидетельствует о безопасности проведения криодеструкции предстательной железы для близлежащих органов.

Полученные факты заслуживают внимания клиницистов, которым приходится решать вопрос о выборе характера операционного вмешательства при аденоме и новообразованиях предстательной железы.

НИИ эндокринологии и химии гормонов,
Украинский институт
усовершенствования врачей,
Харьковский медицинский институт

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

ГОРМОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ ЗАМОРАЖИВАНИИ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Б. А. Вартапетов, А. И. Гладкова,
Л. А. Бондаренко, В. Ф. Криворотько

Накопленный в настоящее время экспериментальный и клинический материал позволяет предполагать развитие своеобразного порочного круга — с первичной недостаточностью гонад, сопровождающейся изменением соотношения андрогенов и эстрогенов и последующим вовлечением в патологию предстательной железы, что в свою очередь усугубляет гипофункцию семенников.

Задачей настоящего исследования являлось установление функциональной зависимости между предстательной и половыми железами, а также характера экскреции половых стероидов после замораживания предстательной железы.

Работа выполнена на 25 собаках, у которых до операции, а также в разные сроки после криодеструкции предстательной железы производилось определение мочевых метаболитов андрогенов.

Изучение индивидуальных 17-КС проводилось по модифицированному нами методу М. А. Креховой, который дает возможность определить дегидроэпиандростерон (ДГЭА), андростерон (А), этиохоланолон и группу 11-окси-17-КС. Андростерон и этиохоланолон являются в основном метаболитами тестостерона (и частично ДГЭА) и позволяют судить о функциональной способности семенников, тогда как ДГЭА в большей мере является показателем андрогенной продукции надпочечников. Для оценки функционального состояния гонад важно не только абсолютное содержание мочевых метаболитов андрогенов, но и их соотношение, в частности между активным андростероном и не обладающим андрогенной активностью этиохоланолоном.

Матеріал, захищений авторським правом

У здоровых собак определялось следующее содержание андрогенов (в *мг* за 24 *ч*): дегидроэпиандростерона — 0,330±0,036, андростерона — 0,201±0,035, этиохоланолона — 0,200±0,031, 11-окси-17-КС — 0,307±0,040.

Замораживание предстательной железы у собак является полостной операцией (ввиду особенностей анатомического строения уретры). Доступ к предстательной железе осуществлялся с помощью нижней срединной лапаратомии. Криокатетер, по которому поступает жидкий азот, вводили ретроградно со стороны мочевого пузыря. Прилежащие к предстательной железе ткани предохранялись от замораживания криопротекторами. Длительность холодовой экспозиции обычно составляла 5—15 *мин*.

Поскольку само оперативное вмешательство приводит к изменению экскреции андрогенов, ранние послеоперационные сроки для оценки функционального состояния гонад нами не учитывались. Гистологические исследования, выполненные в первые 2 недели после криодеструкции предстательной железы, свидетельствовали о наличии в разной мере выраженных воспалительных явлений в предстательной железе. К 3-й неделе после операции начиналось отторжение некротических масс. В отдаленные после операции сроки отмечалось резкое уменьшение размеров железы. При гистологическом исследовании предстательной железы, подвергнутой замораживанию, в отдаленные после операции сроки обнаруживалось, что, помимо мелких очаговых единичных скоплений железистых клеток, имеющих атрофические, дистрофические и кариопикнотические изменения, вся предстательная железа представляла собой плотную соединительную строму, что следует рассматривать как исход хронического воспалительного процесса.

Таким образом, в результате замораживания предстательной железы было достигнуто подавление ее функциональной активности. В этой связи представляло значительный интерес выяснить, как отразится криодеструкция простаты на функциональной активности гонад. При гистологическом изучении строения гонад были обнаружены изменения как сперматогенного эпителия, так и интерстициальных клеток. Клетки Лейдига подвергались настолько выраженной редукции, что почти не обнаруживалось у базальной мембраны извитого семенного канальца. Атрофия клеток Лейдига сопровождалась уменьшением продукции тестостерона, о чем свидетельствовали изменения в экскреции его метаболитов.

У собак, подвергнутых криодеструкции простаты, наблюдается значительное уменьшение экскреции индивидуальных 17-КС и прежде всего андростерона. Так, уже через месяц после замораживания предстательной железы экскреция андростерона понизилась до 0,104±±0,024 *мг* за 24 *ч* ($P<0,02$), в дальнейшем она оставалась низкой: через 2 месяца после операции — 0,093±0,074, через 3 месяца — 0,141±±0,120. Уменьшение экскреции андростерона, этого наиболее активного андрогенного мочевого метаболита, оставалось достоверным на протяжении 2 месяцев после операции; по истечении этого срока изменения были уже недостоверными ($P<0,8$). Очень выраженное падение наблюдалось также в экскреции ДГЭА. Через 1, 2 и 3 месяца после операции она составляла соответственно 0,176±0,032; 0,168±0,009 и 0,187±±0,100 *мг* за 24 *ч*. Во все указанные сроки уменьшение выделения ДГЭА было значимым ($P<0,001$; 0,001; 0,01).

Экскреция этиохоланолона у оперированных животных также уменьшалась — в течение месяца до 0,122±0,020 *мг* за 24 *ч*, через 2 месяца после операции — до 0,164±0,058 и 3 месяца спустя — 0,195±0,170. Однако в отличие от ДГЭА и андростерона понижение экскреции этиохоланолона было недостоверным (во все указанные сроки $P>0,05$).

Матеріал, захищений авторським правом

Таким образом, у животных, подвергнутых замораживанию предстательной железы, выделение наиболее активных фракций (ДГЭА, А) уменьшается. Соответственно изменяется и соотношение между андростероном и этиохоланолоном, последний начинает преобладать.

Экскреция 11-окси-17-КС достоверно не изменялась, составляя в исследуемые сроки (через 1, 2 и 3 месяца соответственно) 0,216±0,045, 0,480±0,086 и 0,370±0,080 *мг* за 24 *ч* ($P<0,05$).

Отсутствие изменений в экскреции надпочечниковых фракций (11-окси-17-КС) при понижении выделения андрогенов семенникового происхождения (андростерон и частично ДГЭА) свидетельствует об угнетении функции семенников при существенно не измененной функции надпочечников у животных, подвергнутых замораживанию предстательной железы.

Полученные нами данные подтверждают роль предстательной железы как основного звена в обмене тестостерона, превращающегося в ней в наиболее активную форму — дигидротестостерон. Хотя восстановление тестостерона в дигидротестостерон может происходить и в других тканях (коже, подчелюстной железе, фолликулах волос и др.), предстательная железа, захватывающая около 70% продуцируемого тестостерона и превращающая его в дигидротестостерон, остается главным звеном метаболизма андрогенов. Следовательно, нормальное функционирование предстательной железы является одним из условий для осуществления не только экскреторной, но и инкреторной функции семенников. Поскольку андрогены оказывают специфическое и весьма существенное неспецифическое действие в организме, регулируя, в частности, обменные процессы, представляется необходимым в случае проведения операций, связанных с удалением либо разрушением предстательной железы, назначать корригирующую андрогенную терапию.

Таким образом, проведенное нами экспериментальное исследование свидетельствует о важном значении предстательной железы для обмена андрогенов и стимуляции сперматогенеза.

НИИ эндокринологии
и химии гормонов

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

К ИЗУЧЕНИЮ ДЕЙСТВИЯ КРИОПРОТЕКТОРА ПОЛИЭТИЛЕНОКСИДА С МОЛЕКУЛЯРНЫМ ВЕСОМ 400 НА МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ СОХРАННОСТЬ СЕМЕННИКА

Л. П. Волимерец, Т. А. Пышкина, В. Ф. Козлова

В настоящее время в эндокринологической клинике разработаны определенные показания к трансплантации семенников: посткастрационный синдром, врожденная и препубертатная формы гипогонадизма [3].

Пересадка семенников в клинике требует постоянного наличия трансплантатов, что возможно лишь при условии их консервирования. Известные способы консервации обеспечивают морфо-функциональную сохранность семенника при температуре от 2° до 20° в течение 3—9 суток [1, 2, 3, 4].

Долгосрочное консервирование семенников и создание запасов этого материала возможно на основе метода глубокого замораживания до —196° С.

Целью настоящей работы явилось исследование морфо-функциональной сохранности семенников после перфузии их растворами криопротектора полиэтиленоксида с молекулярным весом 400 (ПЭО-400)

Матеріал, захищений авторським правом

в различной концентрации для последующей низкотемпературной консервации.

Эксперименты поставлены на 66 белых беспородных крысах, весом 120—140 *г*, содержащихся в обычных условиях вивария.

Изучалось действие возрастающих концентраций ПЭО-400 (5, 10, 20, 30, 40%) на структуру и функцию семенников половозрелых крыс при их гипотермической (+4°) перфузии in situ. Перфузия семенников проводилась по следующей методике: под эфирно-барбитуратовым наркозом производилась срединная лапаротомия, обнажалась брюшная аорта, которая лигировалась под диафрагмой. Катетер проводился до устья почечных сосудов. Перфузия осуществлялась с помощью микроперфузионного насоса со скоростью 2—3 *мл/мин*. Для гистологического исследования семенники окрашивали гематоксилин-эозином и по Ван Гизон.

Для определения гормональной функции семенников исследовали содержание тестостерона в крови, оттекающей от желез. Проводили экстракцию и очистку тестостерона, затем — количественное определение в крови контрольных и экспериментальных животных [5, 6].

С целью определения оптимальной концентрации криопротектора методом ядерно-магнитного резонанса (совместно с Ю. В. Калугиным) был изучен характер стабилизации воды в семеннике после его перфузии in situ криозащитной смесью, содержащей ПЭО-400 в концентрации от 10 до 40%, а также проведена контрольная группа экспериментов с перфузией растворами глицерина (10, 20, 30, 40%) и ДМСО (5, 10, 20%).

Установлено, что оптимальная степень гидратации в тканях наблюдается при перфузии семенника 20—25%-ными растворами этого криопротектора. Дальнейшее повышение содержания ПЭО-400 в перфузате ведет к снижению гидратации вследствие взаимодействия макромолекул ПЭО-400 между собой.

При гистологическом изучении контрольных семенников, перфузированных раствором Хэнкса, обнаруживаются сосуды, свободные от крови, со стенкой обычного строения. В мелких сосудах, расположенных з центре, встречаются небольшие скопления форменных элементов. Сперматогенный эпителий извитых семяобразующих канальцев, а также интерстициальная ткань без изменений.

В семенниках, перфузированных раствором Хэнкса, содержащим ПЭО-400 в различной концентрации (10, 20 и 40%), кровеносные сосуды, свободные от крови, имеют широкий просвет и растянутые истонченные стенки (после перфузии 40%-ным раствором ПЭО-400 стенки истончены сильнее). Внутренняя эластическая мембрана крупных сосудов, расположенных на периферии, уплощена. Центрально расположенные сосуды семенников, перфузированных растворами криопротектора, содержат форменные элементы крови.

По-видимому, насыщение ткани семенника криопротектором в значительной степени определяется скоростью перфузии органа.

В извитых канальцах семенников, перфузированных растворами ПЭО-400, наблюдаются, как обычно, различные стадии сперматогенеза, в некоторых из них видны фигуры митоза. Интерстициальная ткань также без особых изменений, местами в ней, главным образом на периферии семенника, обнаруживается слегка вакуолизированное жидкое содержимое.

При исследовании гормональной функции семенников на основании 23 определений выявлено, что у интактных крыс в крови, оттекающей от семенника, содержится 28 *мкг*% тестостерона на 100 *мл* крови.

Для изучения действия криопротекторов на семенники половозрелых крыс после их перфузии растворами ПЭО-400 различной концентрации исследовали содержание гормона при экстракорпоральном под-

Матеріал, захищений авторським правом

ключении желез к бедренным сосудам кастрированного промежуточного хозяина (кролика). Предварительные результаты этих опытов показывают, что возрастающее содержание криопротектора в перфузате оказывает ингибирующее действие на тестостеронпродуцирующую функцию семенников.

Таким образом, разработана модель гипотермической регионарной перфузии семенников. Методом ядерно-магнитного резонанса изучен характер стабилизации воды после перфузии семенников in situ растворами ПЭО-400 различной концентрации (10—40%). Оптимальная степень гидратации в ткани наблюдалась при 25%-ной концентрации ПЭО-400 в перфузате. Гистологическое исследование выявило сохранность сперматогенного эпителия извитых канальцев, а также интерстициальной ткани семенников; выработка тестостерона, по-видимому, меняется в зависимости от концентрации ПЭО-400 в перфузате.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вовк А. А. — В сб.: Науч. тр. Днепропетровского мед. института, 1961, 48.
2. Гнилорыбов Т. Е. — Урология и нефрология, 1965, 2, 50.
3. Кирпатовский И. Д., Горбатюк Д. Л. — Вестник хирургии, 1971, 5, 136.
4. Нехвядович В. З. — В кн.: Трансплантация органов и тканей. Тез. докл. I республ. конф. Минск, 1969, 98.
5. Halb W., Scholberg K. — Acta endocr., 1968, 58, 353.
6. Suzuki G., Eto T. — Endocr. Jap., 1962, 9, 277.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

СОДЕРЖАНИЕ ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ В КРОВИ ТИРЕОИДЭКТОМИРОВАННЫХ КРЫС ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, КОНСЕРВИРОВАННОЙ ЗАМОРАЖИВАНИЕМ

Б. М. Даценко, В. А. Чуйко, А. А. Алюшина

Принципиальная возможность функционирования эндокринных органов, консервированных при низких и ультранизких температурах, продемонстрирована в работах ряда авторов [1—4]. Однако недостаточно изученным остается вопрос о действии замораживания-оттаивания на процессы синтеза и продукции гормонов.

Целью настоящей работы является изучение функции щитовидной железы, подвергнутой низкотемпературной консервации (—196°) в присутствии полиэтиленоксида с молекулярным весом 400 (ПЭО-400).

Опыты проводились на беспородных белых крысах-самцах весом 125—160 *г*. Иссеченные щитовидные железы после перфузионного насыщения их 30%-ным раствором ПЭО-400 замораживали в пластмассовых ампулах до —196° по программе (1° в 1 *мин* до —15°, далее 300° в 1 *мин*). Отогревание производилось при температуре +37°. Деконсервированные железы трансплантировали тиреоидэктомированным животным на 20-й день после операции, целиком, под кожу передней брюшной стенки. Контролем служили тиреоидэктомированные животные с трансплантатом щитовидной железы, замороженной со скоростью 300° в 1 *мин* без применения криопротектора.

Установлено, что удаление щитовидной железы у крыс сопровождается снижением всех исследуемых иодаминокислот (таблица). В результате тиреоидэктомии в организме реципиента были созданы условия гормонального дефицита, необходимые для успешного приживления трансплантата.

Матеріал, захищений авторським правом

Содержание иодаминокислот * в крови тиреоидэктомированных крыс после трансплантации щитовидной железы

Вид операции	Содержание иодаминокислот в крови (*мкг/мл*)							
	МИТ		ДИТ		T_3		T_4	
	$\bar{x}$	P	$\bar{X}$	P	$\bar{X}$	P	X	P
Интактные животные	1,79	—	2,42	—	1,97	—	2,89	—
Тиреоидэктомия	0,70	—	1,12	—	0,72	—	0,67	—
Трансплантация свежезаготовленной железы (20-е сут.)	1,52	0,05	2,92	0,05	1,92	0,05	2,78	$\leqslant$0,010
Трансплантация свежезаготовленной железы (30-е сут.)	0,50	$>$0,05	0,70	$\leqslant$0,05	1,62	$<$0,05	0,86	$>$0,05
Трансплантация железы, замороженной без защиты (20-е сут.)	0,81	$>$0,05	0,70	$\leqslant$0,05	0,30	0,05	0,84	$>$0,05
Трансплантация железы, замороженной с ПЭО-400 (20-е сут.)	1,65	0,025	2,71	$<$0,010	0,69	$>$0,05	2,24	0,025 —0,011
Трансплантация железы, замороженной с ПЭО-400 (30-е сут.)	0,46	$>$0,05	1,29	$>$0,05	0,95	$>$0,05	1,75	$<$0,05

* МИТ — монойодтирозин; ДИТ — дийодтирозин; T_3 — трийодтиронин; T_4 — тироксин. Расчет содержания иодаминокислот при различных вариантах трансплантации производился по отношению их к значению при тиреоидэктомии по методу Стьюдента—Фишера.

Указанием на функциональную полноценность трансплантата щитовидной железы могло бы служить восстановление уровня тиреоидных гормонов до исходных величин. Однако в условиях трансплантации щитовидной железы, замороженной без применения криопротектора, нормализация содержания гормонального баланса не наблюдалась: содержание иодаминокислот в этом случае не отличалось от такового у тиреоидэктомированных животных (см. таблицу). Следовательно, процесс замораживания щитовидной железы до температуры —196° без применения криопротектора приводит к необратимому угнетению ее функциональной активности.

При пересадке щитовидной железы, консервированной в присутствии криопротектора ПЭО-400, отмечалось восстановление содержания тиреоидных гормонов в крови до величин, близких к показателям контрольной группы — крыс с пересаженной свежезаготовленной щитовидной железой. Не в полном объеме, однако, восстанавливался уровень трийодтиронина (см. таблицу).

Тот факт, что содержание йодтирозинов, являющихся предшественниками тиронинов, не отличалось от контрольных величин, а также восстановление достаточно высокого уровня тироксина в крови экспериментальных животных, свидетельствует, что низкотемпературная консервация щитовидной железы в присутствии криопротектора ПЭО-400 не отражается на процессе образования ее основного гормона — тироксина. В то же время подавление фракции трийодтиронина дает основание для предположения о криоуязвимости соответствующего этапа гормонопоэза в щитовидной железе.

Возможным участком криоповреждений в этом случае может быть молекула тиреоглобулина, специфического белка, определяющего биосинтетические процессы в щитовидной железе. Показано, что даже небольшое охлаждение тиреоглобулина приводит к изменению ряда свойств этого белка [6].

Наибольшая функциональная активность криоконсервированного трансплантата обнаруживается на 20-е сутки после пересадки; на 30-е

Матеріал, захищений авторським правом

сутки величины тиреоидных гормонов несколько снижены. Однако в этом случае, по-видимому, целесообразно думать об определенной закономерности, связанной с иммунологическими процессами, а не с действием низких температур, поскольку уровень тиреоидных гормонов в контрольной группе также закономерно снижался от 20-го к 30-му дню после пересадки. Это согласуется с данными литературы. Так, Л. М. Беличенко [1] указывает, что средние сроки функционирования тиреоидного трансплантата у крыс, как ауто-, так и гомологичного, составляют 30 суток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беличенко Л. В. — В кн.: Гематология и переливание крови. Киев, «Здоров'я», 1973, 97.
2. Лозина-Лозинский Л. К. — В кн.: Очерки по криобиологии. Л., «Наука», 1972, 165.
3. Мицкевич М. С. — Изв. АН СССР, сер. биол., 1958, 2, 149.
4. Blumenthal H. T., Walsh B. R. — Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1950, 73.
5. Kobauashi J., Greer M. A. — Endocrionol., 1971, 89, 79.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЕ КОНСЕРВИРОВАНИЕ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ.

I. ВЫБОР ОПТИМАЛЬНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ КРИОПРОТЕКТОРА

Б. М. Даценко, А. А. Алюшина, Г. З. Брук, Т. А. Пышкина

Для уверенного суждения о выживании клеток нормальной ткани млекопитающих после глубокого охлаждения необходим выбор объекта, который позволил бы проследить за сохранностью не только гистоструктурных его единиц при охлаждении, но и специфической функции этого органа. Этим требованиям, пожалуй, в наибольшей степени отвечает ткань щитовидной железы [3, 7], которая, отличаясь ясно выраженным строением, характеризуется отчетливой гормональной активностью, легко контролируемой с помощью известных методов.

Известно, что сохранность органа при замораживании повышается в значительной степени после предварительного насыщения специальным криозащитным веществом. Небольшое число работ [1—4, 6—10] посвящено замораживанию щитовидной железы, в том числе и под защитой глицерина. Авторы, как правило, рассекали железу на отдельные фрагменты, которые погружали в раствор криопротектора в целях насыщения и затем замораживали до —79° или —196°. К недостаткам метода относится невозможность последующей трансплантации щитовидной железы как целостного органа с включением его в кровоток через восстановление прямых сосудистых связей.

Для равномерного насыщения щитовидной железы ограждающим коктейлем в условиях сохранения целостности этого органа мы применили методику регионарной перфузии его раствором, содержащим криопротектор полиэтиленоксид с молекулярным весом 400 (ПЭО-400).

В качестве модельных животных были использованы белые нелинейные крысы весом 140—150 *г*. Под наркозом (0,2 *мл* 2%-ного раствора гексенала внутрибрюшинно) производили левостороннюю торакотомию. Восходящую аорту канюлировали в дистальном направлении тефлоновой трубкой соответствующего диаметра; нисходящий отдел

Матеріал, захищений авторським правом

аорты перевязывали. С помощью роликового или клавишного микронасоса осуществляли перфузию верхней половины тела животного со скоростью 1,8—2 *мл/мин* (рис. 1).

В качестве перфузата использовался раствор Хэнкса с добавлением к нему ПЭО-400 в том или ином соотношении (10, 20, 30, 40 и 50%-ное содержание криопротектора в перфузате). Во всех случаях перфузат содержал гепарин (20 *мг* на 100 *мл* раствора), спазмолитики (папаверин, платифилин) и антигистаминные препараты (димедрол, пипольфен). Температуру раствора за период перфузии (6 *мин*) постепенно снижали с 30° до 5°. По мере насыщения щитовидной железы криозащитной смесью окраска ее постепенно менялась с розовой на желтую. Через 1—2 *мин* от начала перфузии надсекали правое ушко сердца для нормализации оттока. При введении в перфузат 0,4%-ного раствора индигокармина железа равномерно окрашивалась в синий цвет.

Таблица 1

Параметры ЯМР (спин-эхо) в тканях

Концентрация ПЭО, %	Д·10⁵, *см²/сек*	$T_1 \cdot 10^3$, *сек*	$T_1 \cdot 10^3$, *сек*	$T_1 : T_2$
0	0,89	709	95	7,46
5	0,85	611	87	7,02
10	0,75	438	77	5,69
20	0,67	340	65	5,23
30	0,59	310	62	5,00
40	0,53	306	59	5,18

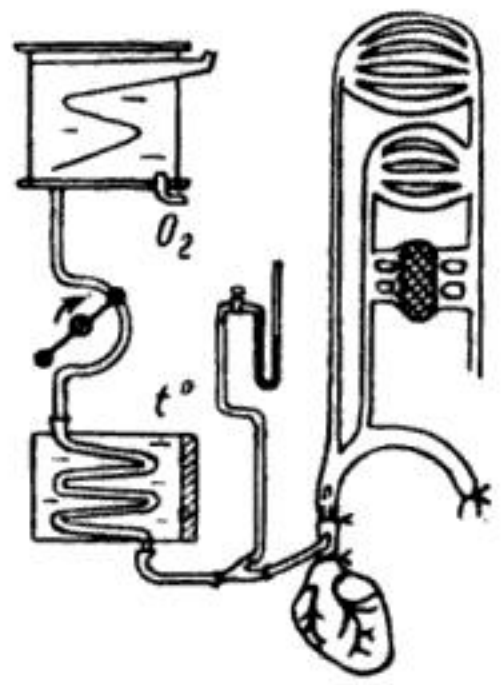


Рис. 1. Схема гипотермической региональной перфузии щитовидной железы (объяснение в тексте).

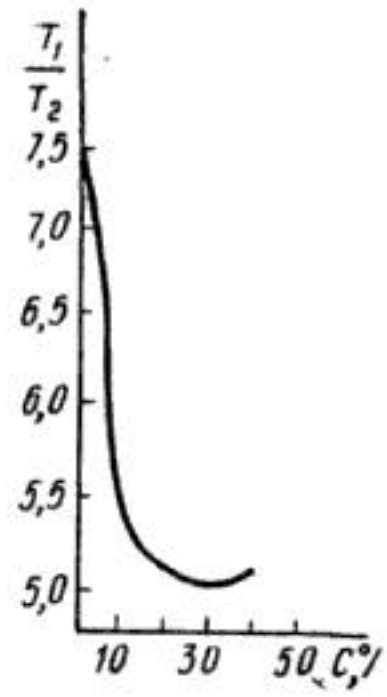


Рис. 2. Зависимость соотношения T_1/T_2 от концентрации ПЭО в перфузированных тканях:

соотношение стремится к постоянной величине при содержании ПЭО-400 в перфузате 30% и выше.

Разработанная нами методика отличалась от описанных в литературе. Во-первых, перфузия органа осуществляется in situ. Манипуляции по канюлированию приводящего сосуда производятся вне области перфузируемого органа. Механическая травма, связанная с иссечением железы, исключается, чем предупреждаются ответные патологические реакции, обуславливающие вазоконстрикцию и нарушение обменных процессов в органе.

Во-вторых, в случае спазма внутриорганных сосудов в ответ на гипотермическую перфузию (холодовый фактор, колебания объемного кровотока вследствие нарушений режима перфузии) определенная емкость артериального русла тканей, окружающих орган, играет роль шунтирующей системы, обеспечивая более адекватную микроциркуляцию в тканях щитовидной железы (демпфирующий эффект).

Разработанная модель регионарной гипотермической перфузии щитовидной железы отличается простотой и обеспечивает равномерное насыщение органа криозащитной смесью.

С помощью разработанной модели проведены исследования, целью которых явилось изучение действия ПЭО-400 на морфологическую сохранность щитовидной железы и способность ее противостоять криовоздействию (—196°) в зависимости от степени насыщения криопротектором. Тем самым была определена оптимальная концентрация ПЭО-400 в перфузате, насыщение которым щитовидной железы через питающий сосуд обеспечивает ее максимальную сохранность при последующем замораживании.

Матеріал, захищений авторським правом

Для определения оптимальной концентрации криофилактика проведено изучение перфузированных щитовидных желез методами ядерно-магнитного резонанса и рентгенографии; одновременно исследовали влияние возрастающих концентраций криопротектора на функциональную сохранность органа с помощью неспецифических (тканевое дыхание) и специфических (способность к поглощению радиоактивного иода) методов контроля.

После перфузии растворами криопротектора щитовидные железы иссекали и подвергали исследованию с помощью указанных методов.

Методом рентгенографии (совместно с Б. Н. Леоновым) было изучено влияние процентного содержания ПЭО-400 в перфузате на характер кристаллизации в щитовидной железе крысы.

Тиреоидный эксплантат помещали в полиэтиленовую трубку диаметром 1,5 *мм;* на остальном протяжении трубка заполнялась перфузатом. Образец помещали в рентгеновскую камеру РКУ-114 со специальной приставкой. Замораживание образца осуществлялось обдуванием его парами азота: до —15° охлаждение велось со скоростью 0,8—1,1° в 1 *мин*, далее со скоростью 14—18° в 1 *мин.*

Анализ полученных рентгенограмм (24 образца) и подсчет параметров решетки с оценкой линейных размеров кристаллов льда показали, что увеличение концентрации ПЭО-400 в перфузате сопровождается появлением более мелкой структуры льда замороженных образцов тиреоидного эксплантата: размеры зерен уменьшаются от 50—60 *мкм* (нативная железа) до 10—15 *мкм* (железа после перфузии 50%-ным раствором ПЭО-400). Мелкокристаллическая структура льда отмечается в образцах щитовидной железы, перфузия которых проводилась раствором ПЭО-400 30%-ным и выше.

Методом ядерно-магнитного резонанса (совместно с Ю. В. Калугиным) изучено состояние воды в тканях тиреоидного эксплантата под влиянием криопротектора, так как известна симбатная зависимость между его гидратационными и криозащитными свойствами.

На 22 образцах определены коэффициенты самодиффузии Д и время спин-решеточной и спин-спиновой релаксации T_1 и T_2 в щитовидной железе крыс, подвергнутых в остром эксперименте регионарной перфузии раствором Хэнкса при различной концентрации в нем ПЭО-400. Изучены также водные растворы ПЭО-400 и растворы Хэнкса с различным содержанием (до 40%) ПЭО-400. Измерение Д, T_1 и T_2 проводилось по методу Хана (ЯМР — спин-эхо).

Присутствие ПЭО в воде и перфузате приводит к уменьшению коэффициента диффузии Д и времени T_1 и T_2, что обусловлено микробарьерными и гидратационными действиями молекул ПЭО.

Наличие ПЭО в перфузате значительно отражается на величинах Д, T_1 и T_2 для щитовидных желез (табл. 1). Однако уменьшение этих параметров с ростом концентрации ПЭО замедляется. При достижении концентрации около 30% отношение T_1/T_2 стремится к постоянной величине (рис. 2).

Из табл. 1 видно, что увеличение концентрации ПЭО в перфузате выше 30%, по-видимому, нецелесообразно, поскольку число гидратации при пересчете на одну молекулу ПЭО уменьшается в связи с растущим взаимодействием между макромолекулами. Таким образом, оптимальной является 30%-ная концентрация ПЭО-400 в перфузате.

Кислородпоглотительная способность тиреоидного эксплантата изучена на микрореспирометре [5], где использован манометрический метод определения газообмена.

После отработки методики были проведены исследования по определению интенсивности потребления кислорода нативным эксплантатом (контроль). Средние показатели дыхания 15 исследованных образцов составили 435,1 *мкл/ч* (рис. 3).

Матеріал, захищений авторським правом

Далее было изучено влияние раствора Хэнкса, вводимого путем перфузии в щитовидную железу, а также 10, 20, 30, 40, 50%-ных растворов ПЭО на его основе на интенсивность потребления кислорода органом.

Результаты исследования, представленные на рис. 3, показывают, что повышение концентрации ПЭО-400 в перфузате сопровождается снижением кислородпоглотительной способности перфузированных тиреоидных эксплантатов. При сравнении интенсивности поглощения кислорода тиреоидными эксплантатами после перфузии раствором Хэнкса

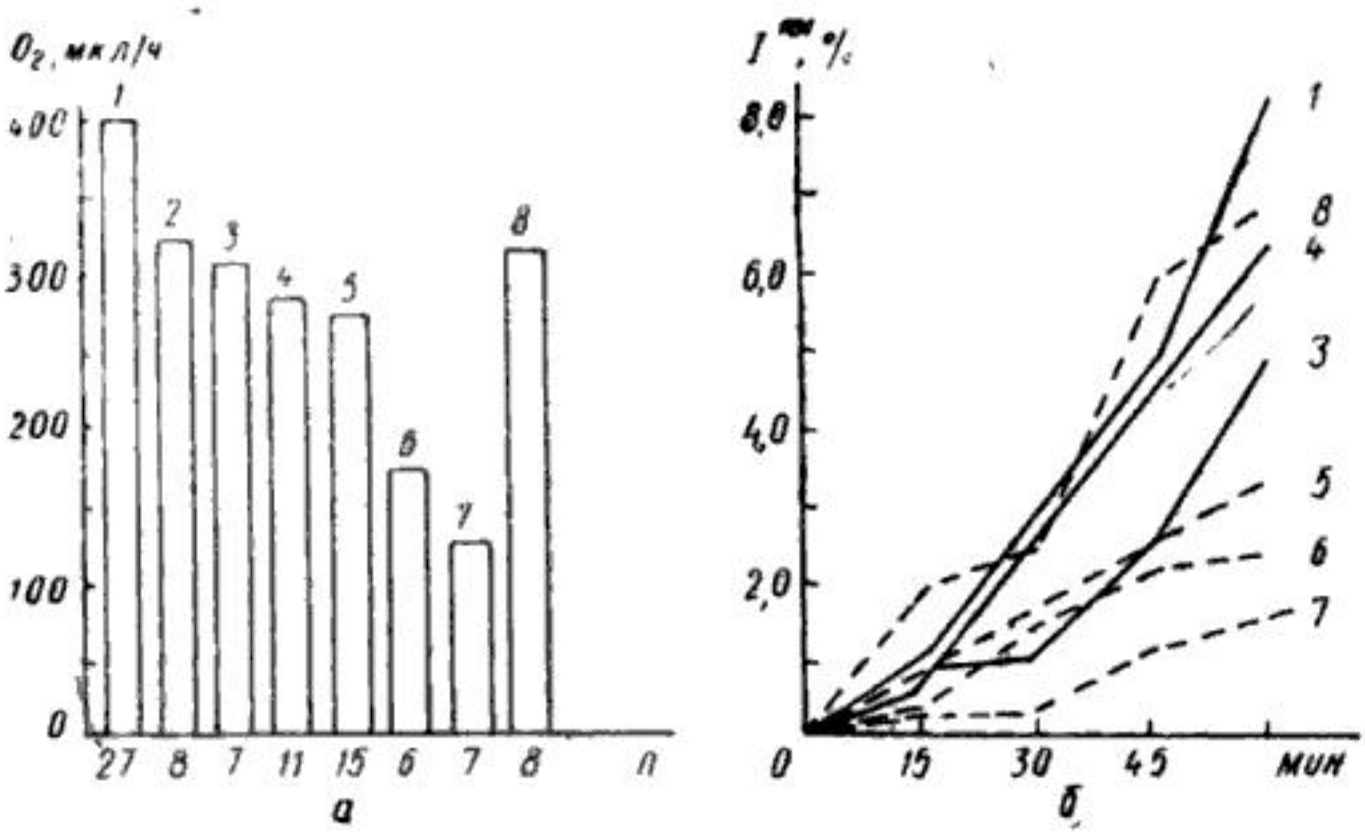


Рис. 3. Влияние концентрации ПЭО-400 в перфузате на кислородпоглотительную (*а*) и иодпоглотительную (*б*) способность щитовидной железы нативной (*1*), после перфузии раствором Хэнкса (*2*), после перфузии 10%-ным (*3*), 20%-ным (*4*), 30%-ным (*5*), 40%-ным (*6*) и 50%-ным (*7*) раствором ПЭО-400, после отмывания ПЭО-400 раствором Хэнкса (*8*); *n* — число исследований.

с показателями дыхания эксплантатов, перфузированных 10 и 20%-ным раствором ПЭО-400, в последнем случае выявлено незначительное снижение, тогда как перфузия 40 и 50%-ной концентрацией ПЭО-400 приводит к значительной депрессии кислородпоглотительной способности.

Отмывание насыщенных 50%-ным раствором ПЭО тиреоидных эксплантатов раствором Хэнкса с помощью артериальной перфузии приводит к значительному усилению кислородпоглотительной способности исследуемых образцов. Так, если перфузированные 50%-ным ПЭО эксплантаты поглощали кислорода в среднем 100,4 *мкл/ч*, то после артериальной отмывки — 310,8 *мкл/ч*, т. е. утилизация кислорода приближалась к уровню тканевого дыхания образцов, перфузированных только раствором Хэнкса.

Иодпоглотительная способность тиреоидных эксплантатов изучалась после инкубирования их в растворе NaI^{131} с активностью 1 *мккюри* в течение 15, 30, 45 и 60 *мин*. После отмывания железу гомогенизировали; уровень активности поглощенного иода определяли на радиометре ДП-100. Процент накопления I^{131} образцами высчитывали при сопоставлении радиоактивности щитовидной железы и стандарта.

Проведено изучение иодпоглотительной способности нативных тиреоидных эксплантатов и влияния на этот показатель перфузии железы раствором Хэнкса и ПЭО-400 в концентрации от 10 до 50% (6 серий экспериментов). В каждой серии (см. рис. 3) использовали 20 животных (40 образцов), причем в зависимости от времени инкубирования в каждой серии были 4 однозначные группы по 5 животных (10 образцов).

Матеріал, захищений авторським правом

Анализ полученных данных показывает, что увеличение концентрации ПЭО-400 в перфузате оказывает ингибирующее действие на иодпоглотительную способность перфузированных тиреоидных эксплантатов. Сопоставление показателей этой способности по группам показало, что при 30%-ной концентрации ПЭО в перфузате иодпоглотительная способность уменьшается вдвое, при 50%-ной — почти в 4 раза. Однако во всех сериях опытов увеличение срока инкубирования приводило к нарастанию иодпоглотительной способности образцов. Важно отметить, что после отмывания от криофилактика иодпоглотительная способность щитовидной железы увеличивалась, приближаясь к контролю.

Для правильного суждения о влиянии ПЭО-400 на тиреоидный трансплантат было проведено изучение его функциональной активности в сравнении с контролем. В качестве контроля изучена функция 20-дневного нативного тиреоидного трансплантата в организме предварительно тиреоидэктомированного реципиента. О функции трансплантата судили по специфической его активности, т. е. способности к иодпоглощению и гормонообразованию (уровню фракций тиреоидных гормонов в крови реципиента).

Таблица 2

Влияние трансплантации щитовидной железы на содержание тиреоидных гормонов в крови крыс

Вариант	Содержание тиреоидных гормонов, *к/мл* ($n=5$)							
	Трииодтиронин		Тироксин		Дииодтирозин		Монойодтирозин	
	X	*P*	*X*	*P*	*X*	*P*	*X*	*P*
Здоровые крысы	1,97	0,05	2,89	⩽0,01	2,42	⩽0,01	1,79	⩽0,01
Крысы после тиреоидэктомии	0,72		0,67		1,12		0,70	
Крысы после тиреоидэктомии и трансплантации свежезаготовленной щитовидной железы	1,92	0,05	2,78	⩽0,01	2,92	0,05	1,52	0,05
Крысы после тиреоидэктомии и трансплантации щитовидной железы, замороженной под защитой 30%-ного ПЭО-400	1,03	0,05	2,42	⩽0,01	2,47	<0,05	1,77	⩽0,01

Представленные в табл. 2 данные свидетельствуют, что в крови здоровых крыс тиреоидные гормоны содержатся в определенных количественных соотношениях; через 20 дней после тиреоидэктомии уровень их резко падает, однако после аллотрансплантации свежей щитовидной железы (через 20 дней) в значительной степени нормализуется.

Получив эти данные, представилось возможным оценить функциональную активность тиреоидного трансплантата после перфузии его растворами ПЭО-400. Для этого перфузированные по принятой методике щитовидные железы иссекали и трансплантировали подкожно тиреоидэктомированным крысам (срок после тиреоидэктомии — 20 дней).

Животных забивали через 20—22 дня после трансплантации; кровь их исследовали на содержание тиреоидных гормонов, а сами трансплантаты — на иодпоглотительную способность. Результаты этих исследований, представленные в табл. 2, показывают, что предварительная перфузия щитовидной железы 30%-ным раствором ПЭО-400 не оказывает существенного влияния на его приживляемость и специфическую гормонообразующую функцию. Подтверждением этого служат

Матеріал, захищений авторським правом

также сравнительно высокие цифры иодпоглотительной способности тиреоидного трансплантата, предварительно обработанного 30%-ным раствором ПЭО-400 (табл. 3).

Представленные данные показывают, что в эксперименте разработана модель регионарной гипотермической перфузии щитовидной железы, которая обеспечивает равномерное насыщение органа криозащитной смесью.

Таблица 3

Иодпоглотительная способность 20-дневного тиреоидного трансплантата

Вариант	Накопление I^{131} ($\bar{x}$ при $n=5$) при инкубировании	
	15 *мин*	30 *мин*
Нативный трансплантат	0,83 (0,54—0,99) *	1,45 (1,35—1,62)
Трансплантат после обработки 30%-ным ПЭО-400	0,75 (0,22—1,03)	1,05 (0,63—2,29)

* Границы колебаний.

Перфузия 30%-ным ПЭО-400 щитовидной железы обуславливает максимальную стабилизацию воды в ее тканях (данные ЯМР) и мелкокристаллическую структуру замороженных образцов (данные рентгенографии). Насыщение щитовидной железы криопротектором сопровождается временным торможением ее функциональной активности, что находит объяснение в характере физико-химического взаимодействия криопротектора и биологического субстрата. Удаление криопротектора из ткани щитовидной железы сопровождается почти полным восстановлением функциональных показателей органа (кислородпоглотительной и иоднакопительной способности).

Полученные результаты свидетельствуют, что перфузия щитовидной железы 30%-ным раствором ПЭО-400 не оказывает существенного влияния на ее приживаемость и специфическую функцию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беличенко Л. И. — В кн.: Трансплантация органов и тканей. Минск, 1969, 43.
2. Беличенко Л. И. — В кн.: Гематология и переливание крови. Киев, «Здоров'я», 1973, 97.
3. Мицкевич М. С. — Изв. АН СССР, сер. биол., 1958, 2, 149.
4. Сенников Б. А. — В кн.: XXII науч. сессия, посвящен. 50-летию Великой Октябрьской социалистической революции. Оренбург, 1967, 203.
5. Шахбазов В. Г., Шестопалова Н. Г., Котенко Л. В. — В сб.: Тр. биол. фак-та ХГУ по генетике и зоологии, 36. 1963, 34.
6. Blumenthal H. T. — Proc. Soc. Exp. Biol., 1950, **73**, 4, 62.
7. Brooks Y. R. Endocrine tissue transplantation. Baltimore, 1963.
8. Parkes A. S. — Endocrinol., 1959, **18**, 35.
9. Steward G. H., Steward R. O. H., Woodruff M. F. A. — Proc. Univ. Otago Med. Sci., 1955, **33**, 26.
10. Swarm R. G., Scholten W. E., Sanders R. G., Bergenstal D. M. — Lab. Invest., 1959, **8**, 149.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

Матеріал, захищений авторським правом

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ КОНСЕРВИРОВАНИЯ ТКАНЕВЫХ ТРАНСПЛАНТАТОВ ХОЛОДОМ И ПРИ КОМНАТНОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ В ГАЗООБРАЗНЫХ СРЕДАХ

Т. Е. Козлова-Лавриненко, А. Я. Холодный, С. С. Ткаченко, К. М. Крылов, Н. Б. Соколова, М. В. Киселева

Применение низких и ультранизких температур — важный этап в развитии проблемы консервирования различных биологических объектов. В этих условиях трансплантаты дольше всего сохраняют жизнеспособность. Однако консервирование холодом не всегда осуществимо, необходимы определенные технические условия. Снабжение периферийных лечебных учреждений замороженными трансплантатами из функционирующих банков тканей связано с рядом трудностей (необходимость специальных низкотемпературных контейнеров, хладоагентов для заполнения термосов и др.).

Кроме того, многочисленными исследованиями доказано, что замораживание при любых низкотемпературных режимах приводит к некоторому снижению биологической активности тканей. В связи с этим не прекращаются поиски способов консервирования гомотрансплантатов при комнатной температуре. Широкое распространение получило хранение тканей в жидких средах различного состава, высушивание их, а также заключение в твердые среды — парафин, полиэфирные смолы, полимеры и другие вещества. Каждый из указанных способов консервирования имеет свои достоинства и недостатки. Использовали для консервирования костной ткани также газообразный гелий. Этот способ, как и заключение в твердые среды, основан на изоляции консервируемой ткани от внешней среды. Положительные результаты экспериментального изучения его послужили основанием для проверки возможности консервирования в газообразном гелии костных и кожных трансплантатов, предназначаемых для клинических целей.

Консервирование проводилось при комнатной температуре в пакетах из полимерной пленки, наполненных газообразным гелием. Для приготовления пакетов использовали прозрачные пленки, выдерживающие стерилизацию кипячением или автоклавированием и обладающие низкой влаго- и газопроницаемостью (полиэтилен, саран, лавсан). В пакетах гелий сохраняется не менее 3 месяцев, однако некоторое количество его переходит в атмосферу, о чем свидетельствовало уменьшение объема пакетов на 10—15%.

Для изучения эффективности метода, консервированию были подвергнуты кожно-жировые лоскуты, длинные трубчатые кости и ребра. Наблюдение за состоянием трансплантатов продолжалось до 3 месяцев. По окончании опыта выборочно провели бактериологическое исследование кусочков консервированной кожи и кости (по 16 образцов); ни в одном случае микробы не высеяны.

Предназначаемые для пластики трансплантаты помещали в пакеты размерами 30×60 *см*, а подлежащие лабораторным исследованиям делили на части, каждую из которых консервировали в отдельном пакете размером 10×20 *см*. Гистологические, гистохимические, люминесцентные и биохимические исследования для изучения изменений, происходящих в процессе консервирования, проводили систематически. Полученные данные сопоставляли с результатами консервирования при различных низкотемпературных режимах. Эффективность консервирования прослежена на 74 образцах кожи (46 кроличьей и 28 — взятой посмертно от человека) и 38 образцах костной ткани (соответственно 21 и 17).

Матеріал, захищений авторським правом

Внешний вид костных трансплантатов, консервированных в газообразном гелии, не менялся в течение 20—22 дней, костных — 45—60. Гистологически выявляемые морфологические изменения в кожных трансплантатах обнаруживались на 18—20-е сутки и выражались в более бледной окраске ядер, мутном набухании волокон дермы, появлении отдельных вакуолей в протоплазме. При люминесцентном исследовании изменения в ткани определялись на 15—18-е сутки: почти все элементы и структуры начинали светиться одинаковым желто-оранжевым светом, в последующие дни это явление становилось более выраженным. К этому же времени происходило снижение активности сукцинатдегидрогеназы — зерна формазана меняли интенсивно синюю окраску на бледно-синюю, количество их уменьшалось. Изменения такого же характера в кожных лоскутах, консервированных замораживанием при температуре —10°, —12°, появлялись через 1,5—2 месяца, при —27°, —30° — через 4 месяца, при — 68°,—70° — через 6 месяцев.

Морфологические изменения костной ткани в течение первых трех недель хранения в газообразном гелии не обнаруживались, строение всех элементов было хорошо выражено. Перекладины костной ткани окрашивались интенсивно, ядра остеоцитов четко контурировались, структура их была правильной. На четвертой неделе окраска в отдельных участках препаратов становилась более бледной, структура костной ткани менее четкой, вследствие диффузного прокрашивания клеток; в некоторых из них выявлялись вакуоли и пикнотичные ядра. К концу пятой недели эти изменения встречались чаще и были выражены интенсивнее. После 6 недель они обнаруживались в большинстве препаратов. При люминесцентном исследовании в первые дни хранения ни в одном из образцов кости патологических изменений не выявлено. Костная ткань выглядела нормально, она хорошо воспринимала флуорохромы. Костные балочки и остеоциты давали зеленоватое свечение, а костно-мозговые элементы — ярко-зеленое. Начальные изменения флуоресценции в 1/3 образцов обнаруживались к концу 3-й недели хранения. Они выражались в появлении темных глыбок и тяжей на фоне свечения части остеоцитов. К концу 4—5-й недели эти изменения были закономерными. К 1,5 месяцам хранения менялся и общий характер люминесценции — костные балки давали зеленовато-желтое свечение, а костно-мозговые элементы — оранжевое или красноватое.

Снижение биологической активности костной ткани происходило параллельно с изменениями ее структуры и тинкториальных свойств, о чем свидетельствовало изменение активности аспартатаминоферазы. В свежих костях она была в пределах 13,5—17 *ед.* В течение первых 2 недель хранения незначительное снижение активности (на 1,5÷2 *ед.*) отмечено всего в двух образцах. К концу 3-й недели уже в 1/3 образцов уровень ее снизился на 10 *ед.*, а к исходу 4-й недели активность фермента не превышала 3 *ед.* После 6 недель хранения содержание аспартатаминоферазы оказалось незначительным.

Морфологические и гистохимические изменения той же степени выраженности в костных трансплантатах, консервированных замораживанием при —10°, —12°, наблюдались через 2—2,5 месяца хранения; при —27°, —30° — через 4 месяца; при —68°, —70° — через 6 месяцев. Определение жизнеспособности тканей, консервированных в газообразном гелии при комнатной температуре, производилось методом трансплантации в эксперименте на животных и в клинике. Кожные лоскуты, хранившиеся в гелии 14—16 суток, пересадили 36 обожженным животным (10 ауто- и 26 гомотрансплантаций) и 17 больным с ожогами, на раны после некрэктомии. Площадь глубоких ожогов как в клинике, так и в эксперименте составляла в каждом наблюдении 10—15% поверхности тела. Лоскуты перед пластикой расщеплялись до 0,3 *мм*. Во всех видах трансплантации контролем служили пересадки кожи, консерви-

Матеріал, захищений авторським правом

рованной замораживанием при —27° и хранившейся в течение 2,5—3 месяцев.

За состоянием больных и животных проводилось систематическое наблюдение. Трансплантаты, консервированные в газообразном гелии, приживались без видимых признаков токсического воспаления. Аутотрансплантаты оставались теплыми, мягкими, они быстро покрывались шерстью; при гистологическом исследовании обнаруживалось хорошее прорастание в них сосудов материнского ложа. Гомотрансплантаты дали картину временного приживления в 78% случаях и сохранялись на раневом ложе от 11 до 23 суток. При использовании замороженных лоскутов результаты пластики были худшие: временное приживление гомотрансплантатов наблюдалось лишь в 59% случаев.

Для определения жизнеспособности костной ткани было проведено 2 серии опытов на 25 кроликах. Искусственно созданные дефекты лучевой кости возмещались одинаковыми по величине трансплантатами — в I серии (15 опытов), консервированными в газообразном гелии от 28 до 40 суток, во II серии (10 опытов) — консервированными при температуре —27° и хранившимися в течение 2—3 месяцев. Оперированные животные содержались в одинаковых условиях и находились под систематическим наблюдением. Клинически послеоперационный период и заживление ран у всех животных протекали одинаково. Раны зажили первичным натяжением. К 14—17-му дню наблюдения на месте операции имелся хорошо сформированный рубец, к концу 3-й недели животные свободно пользовались оперированной конечностью.

Рентгенологические исследования производились на 15, 20, 30 и 60-й дни опыта. Начальные признаки регенерации костной ткани при исследовании на 15-е сутки после операции выявлены только в 2 случаях (животные I серии). На 20-й день регенерация со стороны опилов лучевой кости обнаруживалась у всех животных II серии и 7 животных I серии. При исследовании на 30-е сутки она определялась у всех животных со стороны эндоста и периоста. К 60-му дню были хорошо выражены признаки замещения трансплантатов новообразованной костью. Через 3 месяца после операции 3 животным каждой серии (выборочно) рассекали мягкие ткани в области произведенной пластики. Во всех случаях наблюдалось прочное сращение трансплантатов с материнским ложем. В ходе исследования не удалось выявить каких-либо существенных различий в гомотрансплантатах, консервированных в среде газообразного гелия и замораживанием при —27°.

Костные трансплантаты, консервированные в среде газообразного гелия, применялись при оперативных вмешательствах у больных с ложными суставами, несросшимися переломами, застарелыми вывихами и другими повреждениями костей нижних конечностей. Больных наблюдали до 1 года. Контролем служили пересадки костной ткани, консервированной при —27°. Послеоперационный период у всех больных протекал гладко. Консолидация наступала своевременно. Раны заживали первичным натяжением. Костные трансплантаты вызывали обычную для этого вида операций остеогенетическую реакцию костного ложа.

Таким образом, кожные трансплантаты, консервированные в среде газообразного гелия при комнатной температуре, сохраняют жизнеспособность в течение 16—18 суток, костные — 28—40 суток. Предлагаемый способ хранения эффективен и может быть рекомендован при возможно частом пополнении запасов гомотрансплантатов.

Всесоюзная медицинская
академия им. С. М. Кирова

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

Матеріал, захищений авторським правом

ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ СОХРАННОСТИ ОВАРИАЛЬНОЙ ТКАНИ НА ЭТАПАХ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЙ КОНСЕРВАЦИИ

О. А. Ошерова, Е. Я. Панков, Н. В. Дедух

Пересадка яичников неразрывно связана с необходимостью предварительного консервирования их, так как клинические потребности в материале для трансплантации, как правило, не совпадают во времени с возможностью заготовки его от донора (трупа).

Целью наших исследований явилось изучение действия низких температур на ткань яичника и отработка методов его защиты при замораживании с помощью криопротекторов и щадящего режима охлаждения.

Исследования проведены на 150 белых беспородных крысах весом 120—130 *г*; выполнено две серии экспериментов. В первой серии этих опытов (использовано 50 крыс) изучено влияние возрастающих концентраций полиэтиленоксида с молекулярным весом 400 (ПЭО-400) на овариальную ткань экспериментальных животных; во второй (100 крыс) — влияние различных скоростей охлаждения на сохранность ткани яичника, нативного и под защитой ПЭО-400 в оптимальной концентрации.

Для насыщения яичников раствором криопротектора использован метод регионарной холодовой перфузии их в организме животного. Под гексеналовым наркозом обнажали брюшную аорту и перевязывали ее под самой диафрагмой. В проксимальном от лигатуры направлении в аорту вводили канюлю; перфузия осуществлялась роликовым или клавишным микронасосом со скоростью 1,6—2,0 *мл/мин*. В качестве перфузата использовался раствор Хэнкса и различные концентрации растворов ПЭО-400 (от 10 до 50%) на его основе.

Температура перфузата постепенно в течение 10 *мин* (период перфузии) снижалась с 20° до 4°. Для нормализации оттока через 1—2 *мин* от начала перфузии вскрывалось ушко правого предсердия. Насыщение органа контролировалось визуально по изменению его окраски с розовой на желтую. Далее яичники иссекали для морфологических исследований. Препараты окрашивали гематоксилин-эозином; ферментативная активность отпечатков яичников определялась по методике А. Берстон.

По данным световой микроскопии микропрепаратов яичника, перфузия раствором Хэнкса не влияет отрицательно на овариальную ткань: гистологическая структура органа остается без выраженных изменений. При микроскопическом изучении яичника после перфузии его 10—20%-ным ПЭО-400 обнаруживаются явления дегидратации овариальной ткани: уменьшение объема клеток, некоторое разобщение их вследствие образования щелей и микрощелей. В ряде случаев отмечается отсутствие фолликулярного эпителия вокруг граафовых пузырьков. Строма является наиболее устойчивой к действию криопротектора.

По мере повышения концентрации криопротектора в перфузате изменения в яичнике, обусловленные явлением дегидратации ткани, становятся более выраженными: уменьшается объем цитоплазмы, во многих клетках ядра расположены асимметрично. Отмечается уплотнение стромы, отслоение наружной оболочки фолликула, появление большого количества щелей и микрощелей (рис. 1).

Результаты изучения активности некоторых ферментов (щелочная, кислая фосфатазы, сукцинатдегидрогеназа, НАД- и НАДФ-диафораз) позволяют считать, что ферментативная активность находится в прямой зависимости от процентного содержания криофилактика в перфузате.

Матеріал, захищений авторським правом

Важно отметить, что снижение активности изученных ферментов проявляется после перфузии органа раствором ПЭО-400 в 10—20%-ной концентрации, причем явное снижение получено после перфузии ПЭО-400 в концентрации 30% и выше.

Таким образом, на основании данных, полученных при микроскопическом исследовании, изучении ферментативной активности в препаратах яичника после перфузии его возрастающими концентрациями ПЭО-400, можно сделать вывод, что деструктивные изменения в овариальной ткани находятся в прямой зависимости от количества

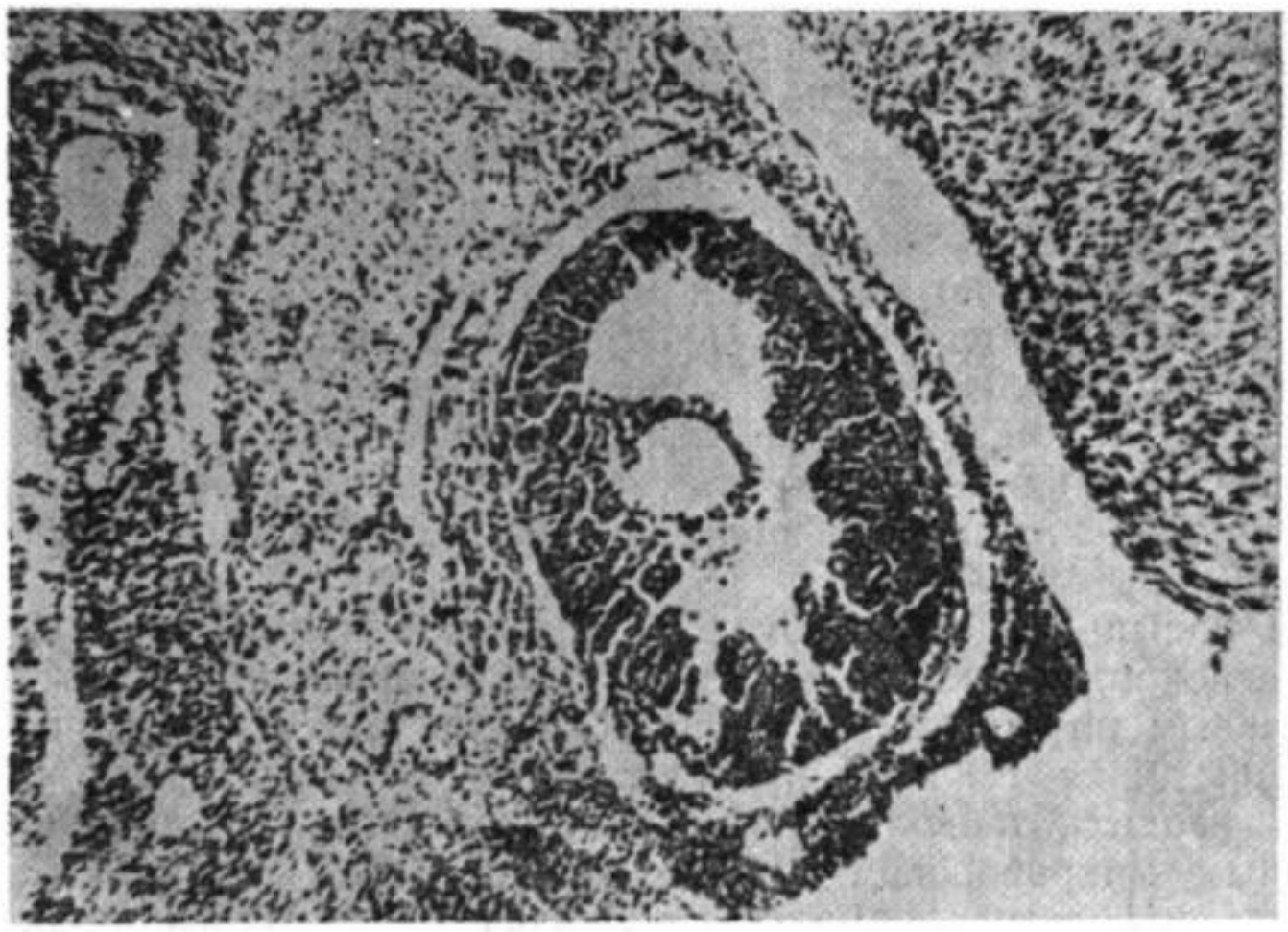


Рис. 1. Ткань яичника после перфузии 30%-ным раствором ПЭО-400.

ПЭО-400 в перфузате: после перфузии 10—20%-ным раствором криопротектора они выражены нерезко; перфузия яичника криопротектором в концентрации 30% и выше сопровождается грубым повреждением ткани.

Проведено изучение биологической сохранности овариальной ткани после воздействия на нее возрастающих концентраций ПЭО-400 (10, 20, 30, 40, 50%). Перфузированные по указанной выше методике яичники трансплантировали подкожно кастрированным крысам и в течение месяца после пересадки изучали методом анализа влагалищных мазков (феномен корнификации клеток).

Анализ 120 изученных препаратов показал, что в 70% случаев отмечается приживление трансплантата: циклические изменения возобновились на 10-е сутки после пересадки яичников, перфузированных 10—20%-ным раствором ПЭО-400, что свидетельствует о продукции эстрогенов. Приживляемости яичников после перфузии раствором в концентрации 30% и выше не отмечалось.

Во второй серии экспериментов было изучено действие различных скоростей охлаждения на сохранность яичника после перфузии его раствором Хэнкса и растворами ПЭО-400 на его основе в концентрации 10, 20, 30, 40%.

Перфузированные по указанной выше методике яичники иссекали и замораживали в пластмассовых ампулах по различным программам одноэтапно и двухэтапно.

Режим одноэтапного замораживания: 1° в 1 *мин* до —196°; 10° в 1 *мин* до —196°; 300° в 1 *мин* до —196°.

Матеріал, захищений авторським правом

Режим двухэтапного замораживания: 1° в 1 *мин* до —15°, далее 10° в 1 *мин* до —196°; 10° в 1 *мин* до —15°, далее 300° в 1 *мин* до —196°; 1° в 1 *мин* до —15°, далее 300° в 1 *мин* до —196°.

После размораживания в водяной бане (+42°) яичники подвергались микроскопическому исследованию.

Анализ 242 образцов методом световой микроскопии позволяет сделать следующие обобщения. Быстрое замораживание (300—400° в 1 *мин*) яичников после перфузии их раствором Хэнкса вызывает грубые нарушения гистоструктурных взаимоотношений в образцах и вы-

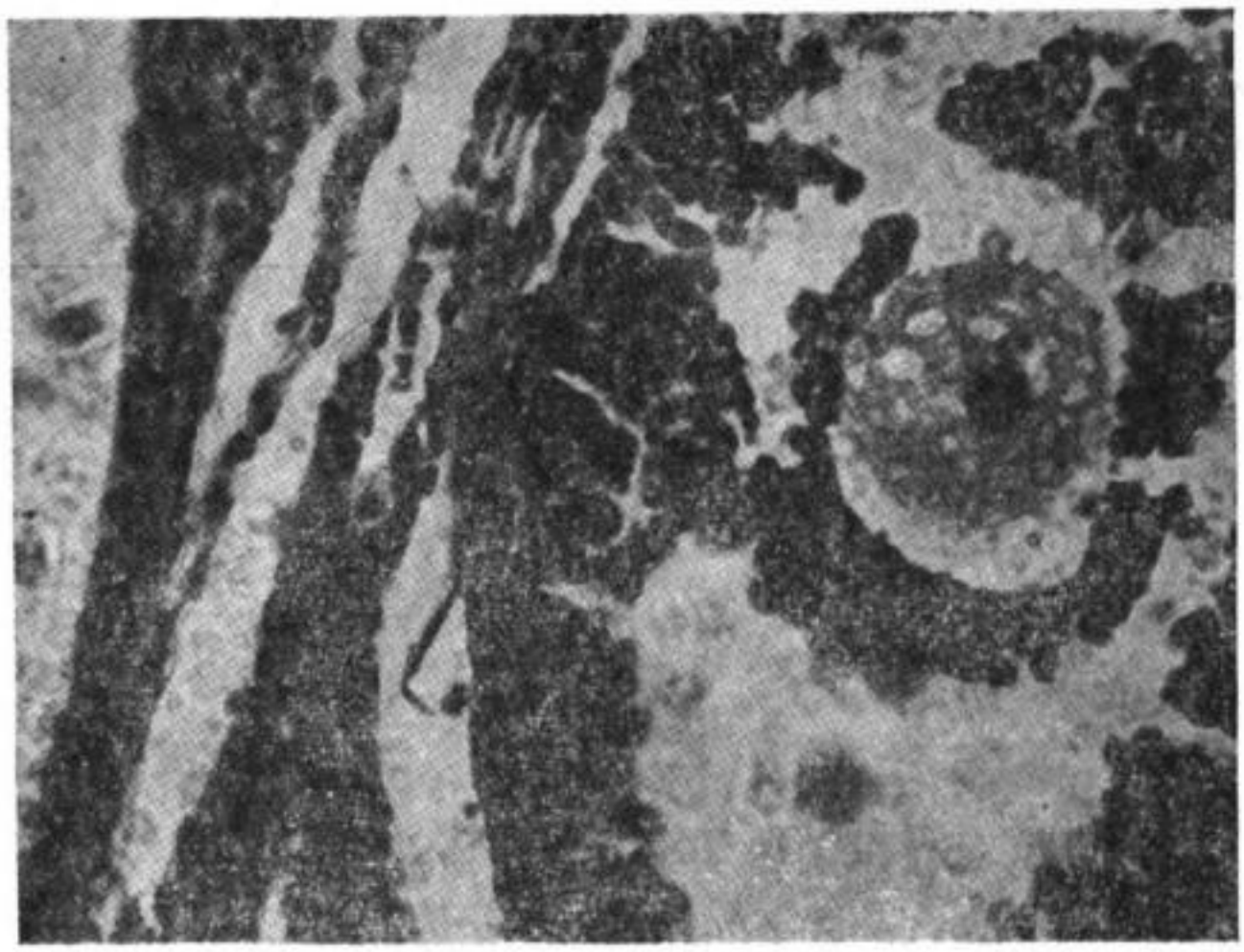


Рис. 2. Ткань яичника после охлаждения со скоростью 1° в 1 *мин* до —15° и далее со скоростью 300° в 1 *мин* до —196°. Окраска гематоксилин-эозином. ×280.

раженные клеточные повреждения овариальной ткани. Практически неизмененная после перфузии морфология яичника претерпевает деструкцию в результате быстрого охлаждения: лютеиновые клетки резко уменьшены в объеме вследствие уменьшения цитоплазмы, в некоторых случаях цитоплазма сильно вакуолизирована. В отдельных клетках наблюдается лизис цитоплазмы, фолликулы овальной формы, отслоены от окружающей ткани, яйцеклетка отслоена от зернистого слоя. Клетки фолликулярного эпителия меньшего объема: цитоплазма одних лизирована, в других отсутствует полностью. Ядра расположены эксцентрично.

В случаях, когда замораживание проводилось после насыщения криозащитной смесью, повреждения овариальной ткани были выражены в несколько меньшей степени, однако в сравнении с контролем (нативные яичники) признаки деструкции гистоструктуры были столь значительны, что вызывали сомнение в возможной репарации ткани яичника и его достаточной функции после пересадки.

Охлаждение со скоростью 1° в 1 *мин* до —196° существенно не влияет на сохранность овариальной ткани. Яичники, перфузированные раствором Хэнкса, и особенно 10—20%-ным раствором ПЭО-400, после замораживания по указанным программам незначительно отличаются от нативных: лютеиновые клетки желтого тела неправильной формы, округлое ядро находится в центре клетки, отдельные ядра с рыхлым хроматином, четко видны ядрышки, между группами клеток определяются единичные микрощели. Чувствительными к замораживанию по указанным программам оказались яйцеклетки и ооциты 1-го порядка, которые приобретали подковообразную форму и сморщивались.

Матеріал, захищений авторським правом

При анализе препаратов яичника, охлажденных по двухэтапной программе, после перфузии раствором ПЭО-400 в 10, 20, 30 и 40%-ной концентрациях, выявлено, что деструктивные изменения выражены в большей степени, чем при медленном одноэтапном охлаждении. Как и при быстром охлаждении, в препаратах отмечается резкое уменьшение объема клеток желтого тела, появление между ними большого количества микрощелей. В соединительнотканной строме яичника находится большое количество щелей; отдельные клетки не имеют цитоплазмы (см. рис. 2).

На основании данных морфологических исследований яичника крысы можно считать, что наибольшая сохранность отмечается при медленном охлаждении (1° в 1 *мин*) биологического объекта после предварительной перфузии его 20%-ным раствором ПЭО-400. Степень повреждения яичника, перфузированного ПЭО-400 концентрации 30% и выше, дает основание считать, что репарация органа в дальнейшем сомнительна. Данные морфологических исследований согласуются с изменением ферментативной активности.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР,
Институт протезирования,
ортопедии и травматологии
им. М. И. Ситенко

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

НАРУШЕНИЯ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ СПЕРМИЕВ ПРИ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЙ КОНСЕРВАЦИИ

Ф. И. Осташко, Б. А. Скорняков

Низкотемпературная консервация спермы осуществляется в два этапа — подготовка к охлаждению и глубокое замораживание. На каждом из них спермии подвергаются отрицательному действию различных физико-химических явлений. В результате нарушается целостность части клеток, что показано рядом авторов [1—4, 6].

Некоторые стороны механизма повреждения спермиев при консервации в определенной степени выяснены. Одним из вопросов, требующих ближайшего решения, является определение зависимости количества поврежденных клеток и глубины нарушения их ультраструктуры от условий подготовки и глубокого замораживания.

Целью нашей работы было дальнейшее развитие метода оценки повреждений спермиев в суспензиях и изучение некоторых сторон механизма патологических изменений ультраструктуры половых клеток при низкотемпературной консервации.

Эксперименты проводили на разделенных эякулятах спермы быков-производителей (начальная активность спермы не ниже 8 баллов, т. е. в образце было не менее 80% активных прямолинейно движущихся спермиев). Подготовка спермы к замораживанию состояла в разбавлении ее глюкозо-цитратно-желточной (ГЦЖ) средой, адаптации к холоду при температуре близкой к 0° С, разбавлении ГЦЖ средой с глицерином и эквилибрации. Отмеченные этапы подготовки спермы к замораживанию осуществляли по известным методам [5]. По окончании эквилибрации сперму замораживали с соблюдением следующего режима: охлаждали от 0° до —15° со скоростью 5° в 1 *мин*, а от —15° до —70° со скоростью 13,5° в 1 *мин*.

Нарушения ультраструктуры спермиев изучали с помощью электронного микроскопа УЭМВ-100К. Препарирование спермы состояло

Матеріал, захищений авторським правом

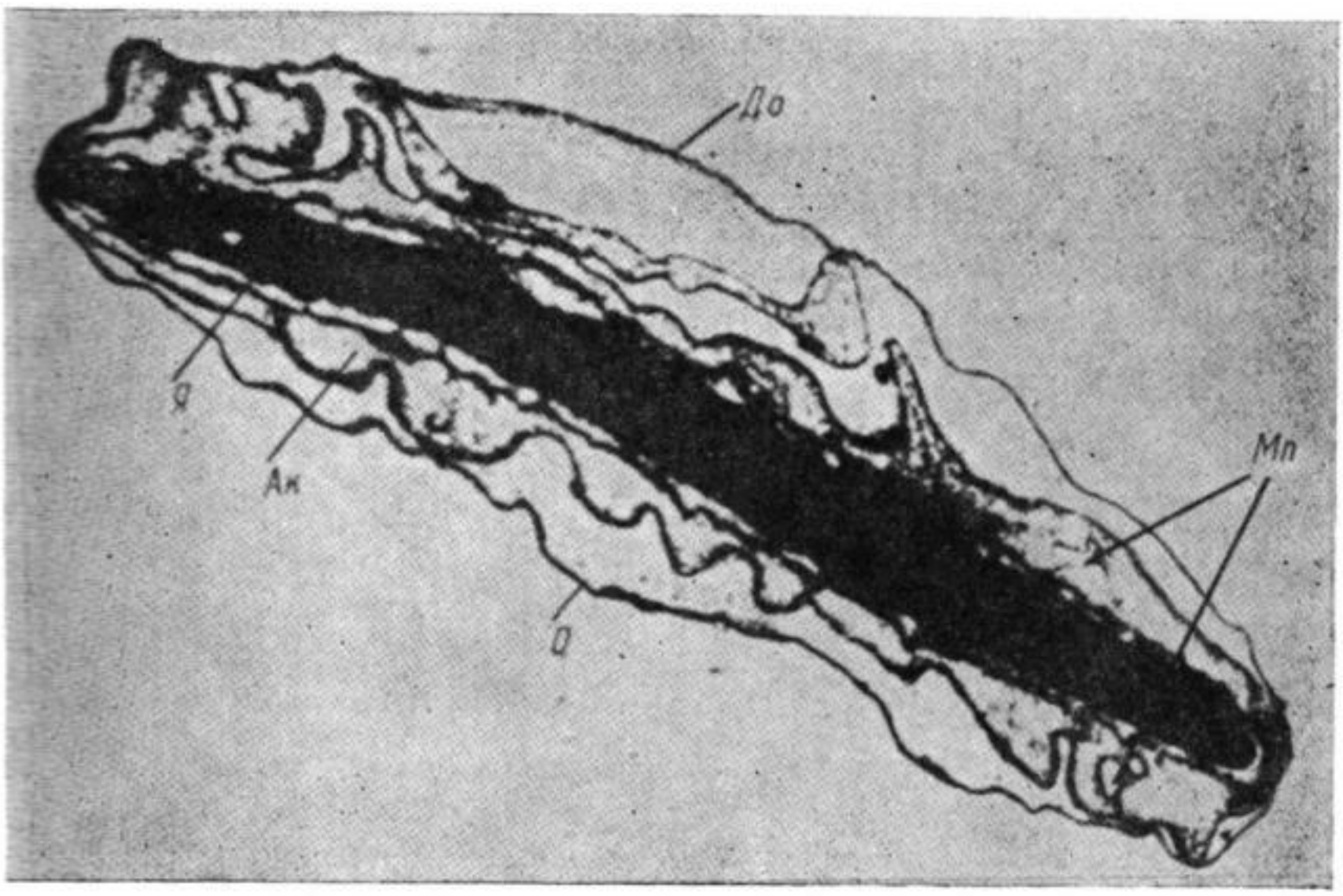


Рис. 1. Поперечный срез головки спермия со слабыми нарушениями цитоплазматической мембраны и акросомы:

Я — ядро, Ак — акросома, О — цитоплазматическая мембрана, До — деструктивный участок мембраны, Мп — микропузырьки в теле акросомы. ×20 000.

в отмывании клеток изотоническим раствором глюкозы, фиксации в забуференном солевом растворе четырехокиси осмия, обезвоживании в ряду водных растворов этанола восходящей концентрации и в заливке в смесь метакрилатов. Ультратонкие срезы готовили на ультрамикротоме УМТ-2 и дополнительно контрастировали в растворах уранилацетата и гидроокиси свинца.

Для исследований сперму отбирали после основных этапов консервации: перед первым разбавлением ГЦЖ средой, после адаптации, перед замораживанием и после оттаивания.

Предварительное изучение электронограмм выявило большое разнообразие нарушений ультраструктуры спермиев. При анализе этих нарушений мы сочли целесообразным для документирования результатов исследований подсчитывать клетки с нарушениями оболочки головки, а также с нарушениями морфологии акросомы, шейки, тела и хвоста. При подсчете раздельно фиксировали клетки с сильными и слабыми повреждениями.

Выбранная система отражает следующую градацию нарушений элементов спермия:

1. Оболочка головки — цитоплазматическая мембрана. К слабым нарушениям относили отслаивания, выпячивания, набухания или деструктивные изменения. Под последним понимается состояние оболочки, когда на срезе она просматривается как набухшая, утратившая монолинейность очертаний структура. При этом электронная плотность ее снижена. Разрывы и глубокий распад оболочки квалифицировали как сильные нарушения.

2. Акросома. К слабым повреждениям относили соответствующие нарушения мембран, образование в теле пузырьков и частичное просветление содержимого. Сильными считали изменения, когда мембраны разрушались и содержимое акросомы выходило наружу.

3. Шейка — участок сочленения тела и головки спермия. Набухание оболочки и просветление структурных элементов расценивали как

Матеріал, захищений авторським правом

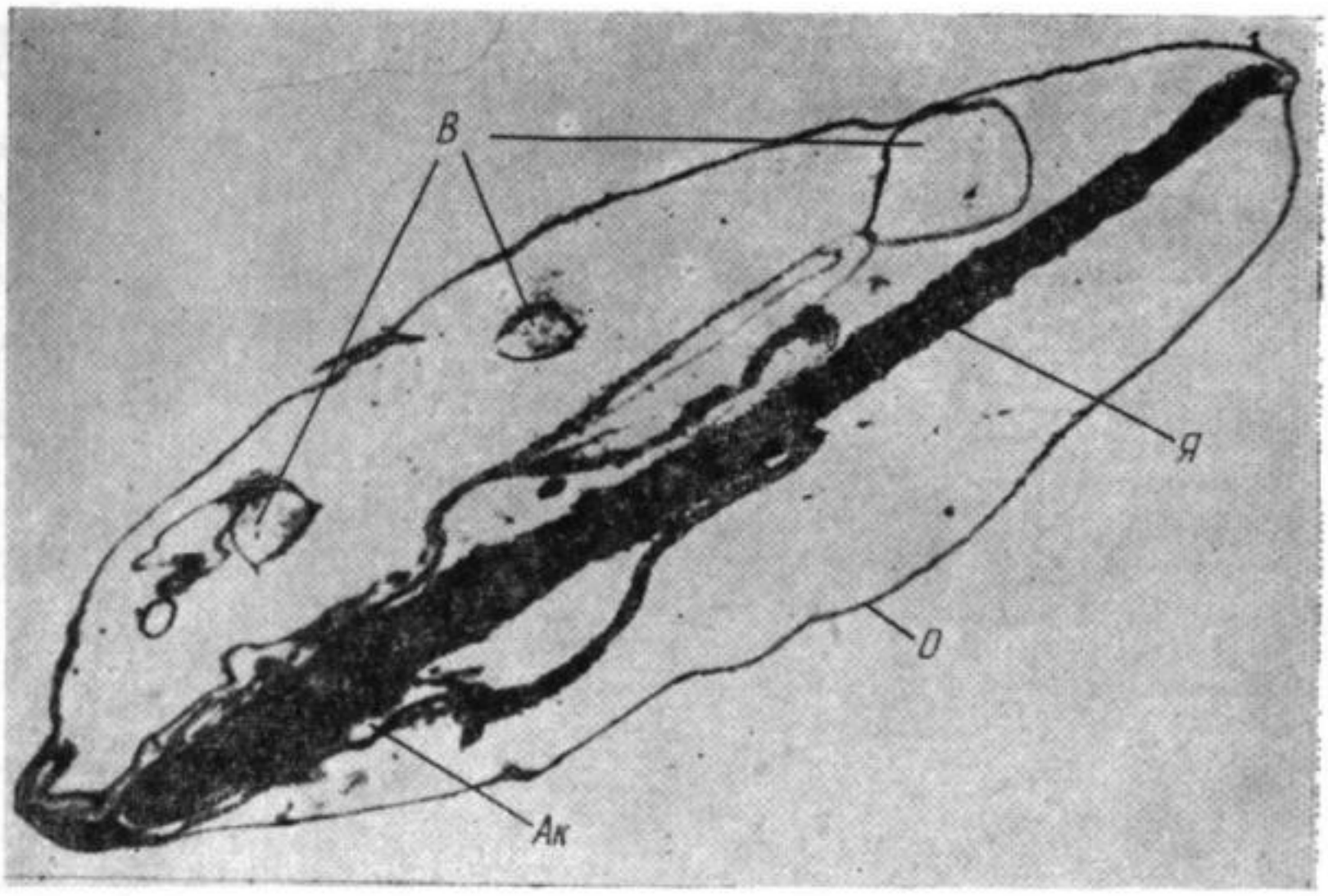


Рис. 2. Срез, близкий к поперечному, набухшей головки спермия:
Я — ядро, Ак — акросома, О — цитоплазматическая мембрана, В — вакуоли. ×25 000.

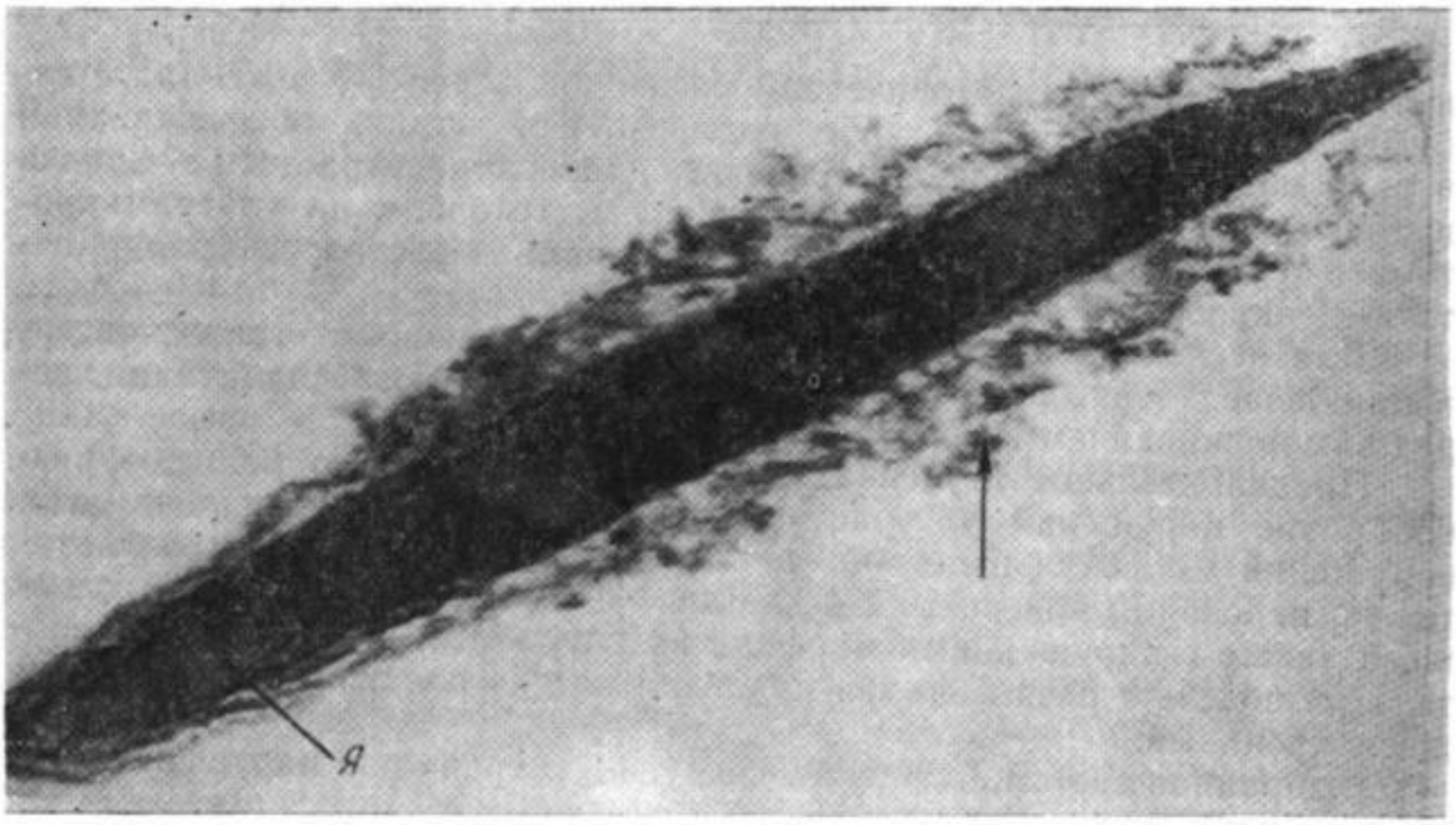


Рис. 3. Поперечный срез головки спермия с разрушенными цитоплазматической мембраной и акросомой:
Я — ядро, стрелкой отмечен кружевообразный венец — результат зернистого распада цитоплазматической мембраны и акросомы. ×20 000.

слабые нарушения, а разрывы оболочки и дезинтеграцию структурных элементов — как сильные.

4. Тело и хвост. Отслоения, выпячивания или набухания оболочки считали слабыми нарушениями, а разрывы оболочки, нарушения целостности митохондрий или фибрилл — сильными нарушениями.

Для иллюстрации отмеченных выше типов повреждений структурных элементов приводим три микрофотографии типичных нарушений оболочки и акросомы.

Матеріал, захищений авторським правом

На рис. 1 представлен срез, близкий к поперечному, через верхнюю четверть головки спермия. Цитоплазматическая мембрана претерпела слабые деструктивные изменения — местами утрачена мононейность структуры, электронная плотность снижена. В акросоме видны микропузырьки, не описанные для структуры интактного спермия, они могут быть расценены как слабые нарушения.

Нарушения ультраструктуры спермиев в процессе низкотемпературной консервации

Состояние морфологических элементов спермиев	Образец спермы			
	перед разбавлением	после адаптации	перед замораживанием	после оттаивания
	Активность спермы перед фиксацией, баллы			
	7,5	7,0	6,0	4,0
Оболочка головки, число срезов, шт.	330	400	500	300
а) нормальных, %	75±2,4	70±2,3	60±2,2	37±2,8
б) с нарушениями слабыми, %	21±2,3	22±2,1	25±1,8	39±2,8
сильными, %	4±1,0	8±1,3	15±1,6	34±2,7
Акросома, число срезов, шт.	170	250	200	180
а) нормальных, %	55±3,8	53±3,2	40±3,5	28±3,3
б) с нарушениями слабыми, %	17±2,9	15±2,3	18±2,7	20±3,0
сильными, %	28±3,4	32±3,0	42±3,5	52±3,7
Шейка, число срезов, шт.	95	110	120	90
а) нормальных, %	87±3,5	83±3,6	80±3,6	70±4,8
б) с нарушениями слабыми, %	10±3,1	13±3,2	15±3,2	21±4,3
сильными, %	3±1,7	4±1,9	5±1,9	9±3,0
Тело, число срезов, шт.	150	140	250	130
а) нормальных, %	90±2,5	90±2,5	89±2,6	80±3,5
б) с нарушениями слабыми, %	9±2,3	7±2,1	8±1,7	12±2,9
сильными, %	1±0,08	3±1,4	3±1,0	8±2,4
Хвост, число срезов, шт.	110	85	80	100
а) нормальных, %	92±2,6	89±3,4	87±3,8	79±4,0
б) с нарушениями слабыми, %	7±2,4	9±3,1	10±3,5	12±3,2
сильными, %	1±0,08	2±1,5	3±1,3	9±2,9

При срезе набухшей головки, близком к поперечному (рис. 2), оболочка сильно растянута, в цитоплазме видны новообразования в виде вакуолей. Акросома утратила четкость очертаний мембраны и ее содержимое просветлилось. В целом подобные изменения расцениваются нами как слабые повреждения.

На поперечном срезе головки с сильными нарушениями оболочки и акросомы (рис. 3) видно, что большая часть оболочки претерпела зернистый распад. Аналогично нарушена акросома. Остатки этих структур образовали кружевообразное окружение ядра.

Отмеченное выше позволяет считать примененный метод дифференциальной оценки повреждений клеток достаточно информативным и вполне отражающим степень повреждения основных структурных элементов спермиев.

Матеріал, захищений авторським правом

Результаты исследований эффекта низкотемпературной консервации на ультраструктуру спермиев (таблица) показывают, что в процессе выполнения этапов консервации происходит гибель части клеток — активность спермы уменьшается и количество клеток с нарушениями ультраструктуры увеличивается. На всех этапах наиболее повреждаемыми элементами являются цитоплазматическая мембрана и акросома спермиев. Шейка повреждается у заметно меньшего числа клеток, тело и хвост еще менее чувствительны.

После замораживания заметно увеличивается число клеток с сильными нарушениями структур. Следует отметить, что после замораживания типичные изменения спермиев практически мало отличаются от таковых, обнаруженных в сперме после подготовительных этапов замораживания.

Из представленных данных следует, что снижение активности спермы на этапах консервации происходит примерно по тому же закону, что и уменьшение числа клеток с неповрежденной оболочкой — цитоплазматической мембраной. В то же время состояние структуры двигательного аппарата гораздо в меньшей мере отражает изменение активности. Отмеченное может быть объяснено тем, что работоспособность моторного органа спермия определяется не только целостностью структуры, но и физиологическим его состоянием, которое зависит от течения биохимических процессов. Последнее позволяет предположить, что спермии теряют способность к движению в результате биохимических и ультраструктурных нарушений моторного органа.

Таким образом, при низкотемпературной консервации в значительной части половых клеток происходят существенные нарушения процессов жизнедеятельности и ультраструктуры. Эти нарушения возникают и на подготовительном этапе, и после замораживания-оттаивания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Варнавский А. Н., Турбин В. Ф., Осадчук В. С. — В кн.: Технология искусственного осеменения и биологии воспроизведения сельскохозяйственных животных. М., «Колос», 1972, 169.
2. Зверева Г. В. — В кн.: Докл. советских ученых на V Междунар. конгр. по биологии воспроизведения и искусствен. осеменения животных. М., «Колос», 1964, 20.
3. Зверева Г. В., Черномаз Л. А. — В кн.: Новое в племенном деле и искусственном осеменении сельскохозяйственных животных. М., Сельхозиздат, 1963, 41.
4. Милованов В. К., Варнавский А. Н., Наук В. А. — В кн.: Технология воспроизведения сельскохозяйственных животных. М., «Колос», 1972, 157.
5. Осташко Ф. И. Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей. Киев, «Урожай», 1968.
6. Песковатский А. П. — В кн.: Бюл. науч. работ ВНИИ животноводства, 27. М., «Колос», 1972, 71.

НИИ животноводства Лесостепи
и Полесья УССР

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

СОДЕРЖАНИЕ СЕРОТОНИНА В ТРАНСПЛАНТАТЕ ЯИЧНИКА

В. А. Чуйко, И. А. Медведева, О. А. Ошерова

При восстановлении функции трансплантированного органа в условиях нарушения его нервно-трофических связей важная роль принадлежит медиаторам, переносимым к тканям гуморальным путем [7, 2, 3, 6].

В настоящей работе в пересаженном яичнике исследовали характер изменения содержания серотонина — медиатора, оказывающего выраженное стимулирующее действие на процессы энергетического обме-

Матеріал, захищений авторським правом

на, транспорта ионов [5]. Для трансплантации были использованы яичники, полученные непосредственно после изъятия, а также замороженные (1° в 1 *мин*) до температуры —196° без применения криозащитных веществ. Опыты проводились на беспородных крысах весом 150—180 *г*. Яичники пересаживались на 20-й день после кастрации, целиком под кожу, в переднюю стенку живота. Исследование содержания серотонина [4] производилось на 3, 6, 14 и 30-е сутки после трансплантации. В эти же сроки, а также на 30-е и 60-е сутки определяли вес трансплантатов.

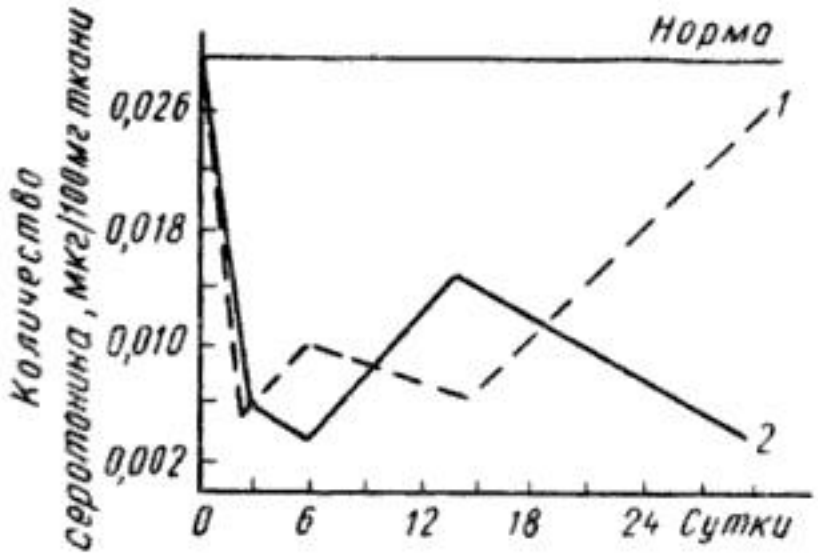


Рис. 1. Содержание серотонина в трансплантате яичника свежезаготовленного (*1*) и подвергнутого замораживанию (*2*) со скоростью 1° в 1 *мин* до температуры —196°.

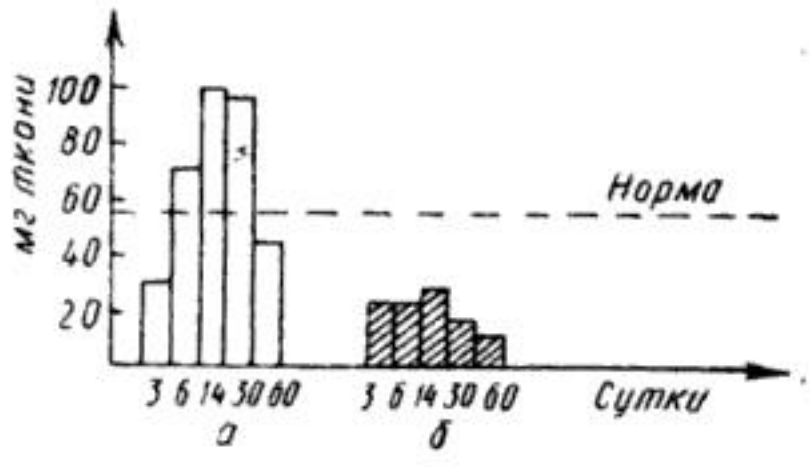


Рис. 2. Вес трансплантатов яичника — свежезаготовленного (*а*) и подвергнутого замораживанию (*б*) со скоростью 1° в 1 *мин* до температуры —196°.

Полученные результаты свидетельствуют о выраженных изменениях в исследуемых показателях: снижении содержания серотонина в пересаженном яичнике и веса трансплантата по сравнению с весом нативного органа.

Сниженный уровень серотонина характерен и для трансплантата в более поздние сроки наблюдения — 6-е и 14-е сутки (рис. 1). К этому времени, однако, вес трансплантата был увеличен, к 14-м суткам он превышал вес нативного яичника (рис. 2). На 30-е сутки содержание серотонина в трансплантате восстанавливалось до исходных величин.

Вероятной причиной снижения содержания серотонина является денервация и травма, неизбежно возникающие при изъятии и последующей трансплантации органа [2, 6]. Характер морфо-функциональных изменений пересаженного органа позволяет выделить стадии первичной дегенерации, восстановления функции и приживления.

Изменения содержания серотонина в свежезаготовленном трансплантате яичника соответствуют названным стадиям функционирования. Это совпадение не случайно. В процессе приживления и восстановления своей функции орган, лишенный нервных и циркуляторных связей, особенно нуждается в регуляторном и трофическом влиянии. Серотонин, обладающий выраженными стимулирующими эффектами в отношении окислительно-восстановительных процессов, транспорта ионов [5], несомненно, должен принимать участие в восстановлении функции трансплантата.

В отличие от свежезаготовленного яичника в трансплантате замороженного органа содержание серотонина резко уменьшается в ранние сроки после пересадки и не восстанавливается через месяц. Отмечено, что трансплантаты яичников, подвергнутых предварительному замораживанию, не увеличивались на 6, 14 и 30-е сутки, тогда как вес свежезаготовленных яичников не только возвращался к исходному, но и в 2—3 раза превосходил его (см. рис. 1).

Эти данные, таким образом, свидетельствуют о крайне неблагоприятном действии замораживания на исследуемые показатели функ-

Матеріал, захищений авторським правом

циональной активности яичника. Замораживание в целях консервации яичника, очевидно, целесообразно сочетать с криозащитными веществами, используемыми для консервации таких эндокринных органов, как щитовидчая железа [7, 8].

ЛИТЕРАТУРА

1. Беличенко Л. В. — В кн.: Гематология и переливание крови. Киев, «Здоров'я», 1973, 97.
2. Волкова О. В. — В кн.: Структура и регуляция функции яичников. М., «Медицина», 1970, 139.
3. Дідоренко М. Д., Коган Э. И. — Укр. біохім. журн., 1971, **3**, 368.
4. Кулинский В. И., Костюковская Л. С. — Лабор. дело, 1967, **7**, 390.
5. Курский М. Д., Федоров А. И. — Усп. соврем. биол., 1969, **67**, 190.
6. Уколова М. А. — В кн.: Роль нейро-эндокринных нарушений в патогенезе опухолей яичников. М., «Медицина», 1972, 141.
7. Фролов Е. П., Серебряков Н. Г., Васина И. Г., Шатилова Н. В. — В кн.: Иммунодепрессия при трансплантации органов. М., Изд. Института трансплантации АМН СССР, 1973, 45.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР (—196°) НА ДЫХАТЕЛЬНУЮ ФУНКЦИЮ РОГОВОЙ ОБОЛОЧКИ ЧЕЛОВЕКА

Т. Н. Юрченко, Т. М. Шарлай

Среди долгосрочных методов хранения роговой оболочки наиболее перспективным является метод низкотемпературной консервации при —196°. Выявление характера изменений, развивающихся в клетках роговой оболочки при воздействии низких температур, может помочь в целенаправленной защите их от криоповреждений.

Литературные данные по исследованию дыхания роговицы немногочисленны и разноречивы [3]. Во всех случаях авторы применяли этот тест для оценки функциональной полноценности ткани роговицы [1, 2, 4, 5, 6].

Одной из самых чувствительных функций клеток к повреждению замораживанием является дыхание и окислительное фосфорилирование. В связи с этим целью настоящей работы явилось изучение влияния замораживания и оттаивания на дыхательную функцию роговой оболочки человека. Кроме того, в клетках различных слоев роговицы при тех же условиях опыта гистоэнзимологически определялось содержание одного из окислительно-восстановительных ферментов — сукцинатдегидрогеназы (СДГ).

Необходимость гистоэнзимологического изучения фермента СДГ вызвана тем, что он является важнейшим ферментом цикла Кребса, локализованным в митохондриях.

Объектом исследования служила роговица человека, взятая через 12—24 *ч* после наступления смерти. Непосредственно перед исследованием роговая оболочка отсекалась у лимба, помещалась в контейнер цилиндрической формы (без криопротектора) и подвергалась замораживанию до —196°. Отогревание производилось на водяной бане при температуре 42° в течение 1 *мин*. В качестве контроля использовали нативную роговицу.

Интенсивность потребления кислорода измерялась манометрическим методом с помощью микрореспирометра. Трепаном диаметром 4 *мм*

Матеріал, захищений авторським правом

иссекали кусочки роговицы, взвешивали их на торзионных весах, после чего помещали в манометрические сосуды, где ткань инкубировали в течение 15 *мин* при 37°. Интенсивность потребления кислорода измеряли в микролитрах за 1 *ч* на 100 *мг* сырого веса ткани.

Для исследования активности СДГ готовили криостатные срезы (температура камеры —20°) роговицы толщиной 12 *мк*. Окраска на СДГ производилась по методу Э. Пирса. Предварительно проведенные исследования позволили обнаружить, что оптимальное время инкубации среза с субстратом — 30 *мин* при температуре 37° и pH раствора 7,4. Учет реакции проводили по визуальному полуколичественному методу с отдельным учетом содержания зерен формазана в эпителии, строме и эндотелии. Всего исследовано 40 роговиц.

В первой серии опытов изучали потребление кислорода, а также распределение СДГ в нативной роговице человека. Результаты опытов показали, что нативная роговица человека потребляет 72,5±5,7 *мкл* кислорода за 1 *ч* на 100 *мг* сырого веса ткани. При изучении постоянных препаратов нативной роговицы выявлен стандартный характер отложения формазана в клетках. В эпителии, строме и эндотелии отмечено отложение мелких зерен формазана правильной формы. В клетках эндотелия два вида зерен — мелкие и более крупные, также правильной формы.

Во второй серии опытов определяли потребление кислорода и локализацию фермента в клетках роговой оболочки, замороженной при —196° без криофилактика. Интенсивность дыхания размороженных образцов значительно снизилась по сравнению с нативной роговицей и составила 33,6±1,7 *мкл* за 1 *ч* на 100 *мг* сырого веса ткани.

Замораживание-оттаивание приводит к существенному повреждению внутриклеточных структур, о чем свидетельствует нарушение внутриклеточного распределения зерен формазана, образование конгломератов неправильной угловатой формы. Наибольшие изменения удалось выявить в эпителии и эндотелии, наименьшие — в строме.

Можно думать, что низкие температуры вызывают повреждения митохондрий, приводящие к подавлению ферментативной активности СДГ. Естественно предположить, что подавление ферментативной активности происходит и на других звеньях дыхательной цепи. Изучение этих изменений явится предметом наших дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Перелыгин Н. И. — В кн.: Проблемы гомопластики и аллопластики. Киев, «Здоров'я», 1967.
2. Чернова А. А. — Вопросы мед. химии, 1964, 10, 4.
3. Шестерикова Т. П., Розенфельд Е. Л. — Укр. біохім. журн., 1964, **18**, 2.
4. Шульгина Н. С., Никулина Н. Б. — В кн.: Проблемы пересадки роговой оболочки. Киев, «Здоров'я», 1966.
5. Эпштейн М. М. — Укр. біохім. журн., 1968, **20**, 2.
6. Polack F. M., Kudo T., Takahashi Y. H. — Arch. Ophtalm., 1968, **79**, 205.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

ИЗУЧЕНИЕ ДЗЕТА-ПОТЕНЦИАЛА КЛЕТОК В СВЯЗИ С МЕХАНИЗМОМ КРИОЗАЩИТЫ

А. М. Воротилин, Л. Г. Бурмака

Изучение механизмов криопротекции клеток необходимо для успешного решения проблемы длительного хранения биологического материала в условиях низких температур.

Матеріал, захищений авторським правом

Гемолиз эритроцитов после замораживания

Концентрация	Диметилформамид		Диэтиленгликоль	
	Гемолиз, *мг%*	ξ-потенциал, *мв*	Гемолиз, *мг%*	ξ-потенциал, *мв*
5%	Интенсивный	17,630±0,084	7680±260	31,478±0,403
10%	«	18,151±0,100	3400±90	52,904±0,709
15%	3000±120	18,756±0,107	1840±50	82,373±0,508
20%	2100±40	24,572±0,154	520±20	91,246±0,873
30%	2000±40	30,626±0,171	470±20	83,700±0,915

Исходя из различных предположений о механизме криозащиты, авторы существующих теорий [5, 7, 10, 12] рассматривают этот вопрос вне связи с электрическими параметрами клеток. Однако известно, что клетки являются носителями электрического заряда. С другой стороны, молекулы веществ, обладающих криозащитным действием, имеют полярные группы (OH, NH_2, NO и др.) или диссоциируют в водном растворе на ионы. Следовательно, при внесении в криозащитную среду заряженная поверхность клетки вступает в электрическое взаимодействие с полярными группами или ионами молекул криофилактика.

В данной работе исследовали связь между величиной дзета-потенциала (ξ-потенциала) клеток в защитной среде и степенью защиты клеток этой средой при замораживании.

Кровь донора, хранившуюся в течение 2—7 дней, центрифугировали. Плазму удаляли и к оставшейся эритромассе добавляли в соотношении 1 : 1 5—30%-ные растворы диметилформамида (CH_7ON), диэтиленгликоля ($HO—CH_2—CH_2—O—CH_2—CH_2—OH$), мальтозы ($C_{12}H_{22}O_{11}$), ацетамида ($CH_3CONH_2$) и мочевины ($CH_4ON_2$). Растворы этих веществ готовили на физиологическом растворе. Полученные образцы объемом 1—2 *мл* замораживали погружением в жидкий азот. Отогревание после замораживания производили на водяной бане при 42°. Степень гемолиза определяли фотокалориметрически.

Для изучения концентрационной зависимости ξ-потенциала клеток в указанном растворе эритроциты трижды отмывали в соответствующей электрофоретической среде. Электрофоретическую подвижность (U_0) клеток, вязкость среды (η) и диэлектрическую постоянную (ε) среды определяли методами, описаньными в прежних работах [2, 3]. На основе полученных данных находили значения ξ-потенциала клеток по формуле

$$\xi = \frac{4\pi\eta}{\varepsilon} \cdot U_0.$$

Первоначально исследовали защитное действие указанных растворов на эритроциты при замораживании. В имеющейся литературе [8, 11] такие данные отсутствуют. Результаты исследований представлены в таблице, из которой видно, что при использовании в качестве защитного вещества диметилформамида и диэтиленгликоля гемолиз клеток после замораживания с ростом концентрации раствора убывает. Наоборот, небольшое повышение гемолиза наблюдается при замораживании в присутствии концентрированных растворов мальтозы. Повышение концентрации ацетамида вызывает большее усиление гемолиза клеток после замораживания. Увеличение концентрации мочевины приводит к резкому повышению гемолиза. В таблице представлена зависимость ξ-потенциала эритроцитов от концентрации защитного раствора. При понижении ξ-потенциала клеток с изменением концентрации раствора

Матеріал, захищений авторським правом

и ξ-потенциал их в растворах криофилактика

Мальтоза		Ацетамид		Мочевина	
Гемолиз, *мг%*	ξ-потенциал, *мв*	Гемолиз, *мг%*	ξ-потенциал, *мв*	Гемолиз, *мг%*	ξ-потенциал, *мв*
—	7,928±0,307	—	16,893±0,430	Интенсивный	29,478±0,432
1923±28	5,603±0,283	990±25	12,395±0,357	«	26,872±0,639
1997±25	4,472±0,214	906,8±25	9,543±0,207	Полный	10,222±0,283
2061±30	4,562±0,103	783±28	7,279±0,383	«	9,345±0,377
2131±37	3,918±0,100	1751±35	6,262±0,254	«	7,305±0,237

понижаются и его защитные свойства. Так, при повышении концентрации диметилформамида и диэтиленгликоля с увеличением ξ-потенциала клеток уменьшается их гемолиз при замораживании. Небольшие изменения в гемолизе с ростом концентрации мальтозы сопровождаются незначительными изменениями ξ-потенциала клеток. При замораживании клеток с мочевиной быстрому росту гемолиза клеток с повышением концентрации раствора соответствует быстрое снижение их ξ-потенциала. Надежность отличия результатов при изменении концентрации составляла не менее 95% ($P \leqslant 0{,}05$).

Попытки детально объяснить наблюдаемую закономерность встретили затруднения. Известно, что молекулы исследуемых криофилактиков (как и большинства других) нейтральны и не диссоциируют в растворе. Электрическое взаимодействие их с дискретно заряженной клеточной поверхностью [1] обусловлено наличием у них полярных групп. Степень дискретности поверхностного заряда зависит от состава окружающей среды, поэтому распределение потенциала в окружающей среде будет иметь рельефный характер. Поверхностные заряды клетки, которая находится в физиологическом растворе, экранированы ионами Na^+ и Cl^- [1]. Добавление криофилактика снижает концентрацию ионов. Его полярные молекулы адсорбируются на полярных группах клеточной поверхности и входят в состав диффузного слоя противоионов дискретных поверхностных зарядов. Это приводит к изменению ξ-потенциала клетки. Следует считать, что на величину ξ-потенциала клетки влияет и изменение ее проницаемости. Так, в растворах диметилформамида и диэтиленгликоля наблюдается выход ионов K^+ из клеток [10].

Мочевина наряду с защитным действием при замораживании оказывает на клетки и разрушающее действие [6]. Таким образом, полученные данные позволяют высказать предположение, что приготовленная на физиологическом растворе криофилактическая среда, содержащая молекулы нейтрального криофилактика, увеличивает защитный эффект при повышении в ней ξ-потенциала клеток. Полученные ранее данные [3] свидетельствуют, что в водных растворах полиэтиленоксидов криозащитный эффект увеличивается при снижении ξ-потенциала эритроцитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аристархов В. М., Пирузян Л. А., Цыбышев В. П. — Известия АН СССР, сер. биол., 1973, 1, 52.
2. Воротилин А. М. Применение полиэтиленоксида для замораживания эритроцитов человека, механизмы их повреждения и физиологическое состояние после действия низких температур. Автореф. канд. дис. Харьков, 1970.
3. Воротилин А. М., Шахбазов В. Г. — В кн.: Актуальные вопросы консервации и трансплантации костного мозга и крови. Харьков, 1972, 63.
4. Ильин Б. В. Природа адсорбционных сил. М., Изд-во АН СССР, 1952.
5. Медведев П. М., Фисанович Т. И. — Успехи соврем. биол., 1973, **75**, 1, 46.

Матеріал, захищений авторським правом

6. Полянский Ю. Н. — Биофизика, 1966, **11**, 1, 75.
7. Lovelock Y. E. — Biochim. Biophys. Acta, 1953, **10**, 414.
8. Lovelock Y. E. — Biochim. J., 1954, **56**, 265.
9. Lovelock Y. E. — Nature, 1954, **173**, 659.
10. Meryman H. T. — Cryobiology, 1971, **8**, 2, 173.
11. Nach T. — J. Gen. Physiol., 1962, **46**, 167.
12. Nach T. — In: Cryobiology (ed. by Meryman H. T.). London—N. Y., Acad. Press, 1966, 179.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЛИЭТИЛЕНОКСИДА С МОЛЕКУЛЯРНЫМ ВЕСОМ 400 (ПЭО-400)

А. А. Наконечный, З. П. Михайличенко

В последнее время в качестве защитной среды при консервировании клеток костного мозга охлаждением (—196°) успешно используют растворы ПЭО-400 [3].

Основные физико-химические свойства этого соединения представлены в табл. 1.

Таблица 1

Физико-химические константы ПЭО

Эмпирическая формула	Степень полимеризации	Растворимость	Температура затвердевания, °С	Температура дегидратации, °С	Вязкость при 20°	Удельный вес
$HO(CH_2—CH_2O)_nH$	10	Хорошо растворим в воде и органических растворителях	от —4 до +6	79—81	80—115 сантипауз	1,125

Токсикологическая оценка ПЭО проведена на 250 белых крысах обоего пола в условиях однократного острого и повторного подострого воздействия. Препарат вводили внутрижелудочно и внутрибрюшинно ежедневно в течение 15 суток. Среднесмертельные дозы рассчитаны по методу Беренса и Шлоссер [4]. При повторном воздействии вещество вводили внутрибрюшинно в дозе $1/5ЛД_{50}$. В контрольных опытах крысам вводили изотонический раствор хлористого натрия. Морфологические исследования проводили по общепринятой методике с окраской гистологических срезов по Ван Гизон и гематоксилин-эозином. Весь цифровой материал обработан статистически по методу Фишера и Стьюдента [1].

Таблица 2

Верхние параметры токсического действия ПЭО при внутрибрюшинном введении

Группа белых крыс	Дозы, *г/кг* веса		Доверительные границы при $P=0,05$
	$ЛД_{100}$	$ЛД_{50}$	
Самцы	10,0	8,5	7,7÷ 9,2
Самки	16,7	12,3	11,6÷13,0

В острых опытах при пероральном введении ПЭО в дозах до 22,4 *г/кг* веса животные не погибали. Верхние параметры токсического действия ПЭО при внутрибрюшинном введении представлены в табл. 2.

Сравнение $ЛД_{50}$ для самцов и самок показало, что различие статистически незначимо. Клиническая картина острого отравления характеризуется адинамией, ослаблением или полным отсутствием ответов

Матеріал, захищений авторським правом

на внешние раздражители. Животные постепенно принимают боковое положение. Гибель наступает в течение 1—48 *ч*.

При повторном ежедневном введении ПЭО в указанных выше дозах в течение 15 суток все животные выжили до конца эксперимента.

Исследования показали, что никаких видимых отклонений в общем состоянии и весе крыс по сравнению с контрольными животными не было. Морфологические изменения в органах забитых животных при микроскопическом исследовании обнаружить не удалось.

В связи с перспективой широкого применения ПЭО в качестве нового криофилактического агента значительный интерес представляла токсическая оценка этого соединения. В результате проведенных экспериментов установлено, что при пероральном введении смертность не может быть достигнута.

При внутрибрюшинном введении ЛД для белых крыс, самцов и самок, составляет соответственно 8,5 и 12,3 *г/кг* веса. Таким образом, по такому важному интегральному показателю токсичности, как смертность при остром отравлении, ПЭО, по классификации С. Д. Заугольникова и др. [2], относится к практически нетоксичным соединениям.

В подострых опытах при ежедневном внутрибрюшинном введении ПЭО в течение 15 суток в дозах 1/5 $ЛД_{50}$ каких-либо морфологических изменений внутренних органов у подопытных животных не выявлено.

Итак, ПЭО-400 является практически нетоксичным соединением, что позволяет рекомендовать его для применения в качестве защитной среды для консервации биологических объектов глубоким охлаждением.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беленький М. Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Государственное изд. мед. литературы. Л., 1963.
2. Заугольников С. Д., Лойт А. О., Иваницкий А. А. — В сб.: Общие вопросы промышленной токсикологии. М., Изд. ин-та гигиены труда и профзаболеваний АМН СССР. 1967, 46.
3. Пушкарь Н. С., Веркин Б. И., Даценко Б. М., Иткин Ю. А., Козырев В. Ф. — Тез. докл. XII Междунар. конгр. по переливанию крови. М., 1969, 52.
4. Behrens B., Schlosser L. — Arch. Exp. Path. Pharmak., 1957, 230, 59.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ РАЗМОРОЖЕННЫХ ЭРИТРОЦИТОВ

Н. Г. Карташевский, Е. П. Михнович, Л. С. Шулутко, Т. М. Ханина, В. А. Кузьмин

В Ленинградском научно-исследовательском институте гематологии и переливания крови в течение ряда лет проводятся исследования по изучению влияния различных режимов замораживания и оттаивания на функциональные свойства эритроцитов, а также применению их в клинике. В 1972 г. был подготовлен запас замороженных эритроцитов, что позволило приступить к их клиническому применению.

На первом этапе работы замораживание эритроцитов производилось при температуре —196° с использованием криозащитного раствора 11_4. Подготовка размороженных эритроцитов к переливанию производилась путем троекратного отмывания растворами сахарозы в концентрациях от гиперосмолярных до изоосмолярных с последующим помещением их в раствор ЦОЛИПК $8^б$.

Матеріал, захищений авторським правом

Показанием к применению трансфузий размороженных эритроцитов явились анемии различного происхождения. Больных, получавших взвеси эритроцитов, условно можно разделить на три группы.

В первую группу (11 чел.) вошли больные хроническим лимфолейкозом, хроническим лимфоретикулезом, эссенциальной полицитемией, гипопластической анемией, болезнью Маркиафава—Микели, врожденной гемолитической анемией. Вторую группу (10 чел.) составили больные с различными проявлениями гемофилии, третью (9 чел.) — больные с хирургическими заболеваниями (тромбоэмболические заболевания нижних конечностей, посттромбофлебитические заболевания, агастральная астения, острая посттрансфузионная почечная недостаточность, хронический сепсис).

У большинства больных первых двух групп при переливании донорской крови часто возникали посттрансфузионные реакции вследствие наличия у них различных антител. Группе больных гемофилией трансфузии размороженных эритроцитов производились после полной остановки кровотечения.

Оценка состояния переливаемых эритроцитов производилась на основании изучения морфологических изменений эритроцитов и поведения их в нативной капле. Исследования переливаемых размороженных эритроцитов показали, что основная их масса (90—95%) имеет дисковидную форму, 5—10% — тутовую. При помещении эритроцитов в одногруппную каплю сыворотки последние приобретали способность складываться в монетные столбики, что характерно для неизмененных эритроцитов.

Содержание свободного гемоглобина в надосадочной жидкости размороженных и отмытых эритроцитов, взвешенных в растворе ЦОЛИПК 8[6], составляло 60—70 *мг*%, и только в единичных случаях оно доходило до 170 *мг*%. Гематокритный объем взвеси эритроцитов колебался от 20 до 53%.

Эритроциты в замороженном состоянии сохранялись от нескольких месяцев до 1,5 лет. Было перелито 50 доз размороженных эритроцитов 20 больным. Доза переливаемой взвеси размороженных эритроцитов колебалась от 120 до 200 *мл* при кратности трансфузий от 1 до 7. В отдельных случаях доза переливаемых эритроцитов увеличивалась до 300—400 *мл*.

Трансфузии размороженных эритроцитов все больные переносили хорошо. После переливания у больных наблюдалось повышение содержания гемоглобина на 2—6 *ед*. Наряду с этим улучшались показатели гемодинамики: артериальное давление повышалось на 5—10 *мм* рт. ст., отмечалась тенденция к нормализации частоты пульса. Содержание билирубина в крови, уробилина и желчных пигментов в моче у больных, которым производили трансфузии размороженных эритроцитов, не повышалось, не отмечалось каких-либо признаков гемолиза. Наряду с улучшением перечисленных выше показателей отмечалось улучшение общего самочувствия больных: прекращение головокружений и сердцебиений.

Таким образом, на основании клинических наблюдений можно сделать заключение, что замороженные эритроциты являются полноценной трансфузионной средой.

На основании своих наблюдений, а также анализа литературного материала мы могли определить достоинства и недостатки методов замораживания и отмывания крови и преимущества и недостатки размороженных эритроцитов как трансфузионной среды.

К достоинствам метода хранения эритроцитов в замороженном состоянии относится: 1) возможность длительного хранения крови (до 10 лет); 2) создание запасов крови редких групп, а также аутокрови; 3) использование в неограниченном количестве эритромассы, остающей-

Матеріал, захищений авторським правом

ся после слива плазмы. Недостатком метода является: 1) трудоемкость отмывания эритроцитов от криозащитных растворов; 2) необходимость использования дорогостоящей аппаратуры.

Существующий в настоящее время метод деглицеринизации чрезвычайно трудоемкий и занимает много времени. Мы попытались его несколько упростить, сократив количество отмываний.

Таблица 1

Продолжительность различных методов деглицеринизации с учетом объемов растворов *

Метод деглицеринизации	Время, затрачиваемое на отмывание, *мин*	Объем отмывающего раствора, расходуемого на 500 *мл* размороженных эритроцитов, *мл*
Метод троекратного центрифугирования	90—120	2100
Метод цитоаггломерации	30	4050—6000
Метод непрерывного фракционирования	30	2700
Метод двукратного центрифугирования	60—80	1300

* Данные методов троекратного центрифугирования и непрерывного фракционирования взяты из диссертации Н. В. Семеновой.

Суть метода состоит в следующем. Размороженные эритроциты в количестве 250 *мл* переводятся из контейнера во флакон емкостью 500 *мл*, куда вносят 30%-ный раствор сахарозы на физиологическом растворе в состоянии 1 : 1 (250 *мл*). Полученную взвесь эритроцитов центрифугируют. После центрифугирования надосадочную жидкость удаляют и к оставшимся эритроцитам добавляют 1,5 объема (по отношению к оставшимся клеткам) 10%-ного раствора сахарозы. После тщательного перемешивания в течение 5—6 *мин* в тот же флакон добавляют двукратный объем физиологического раствора и взвесь снова перемешивают и центрифугируют. После удаления супернатанта в оставшиеся эритроциты вводят раствор ЦОЛИПК 8[6] в соотношении 1 : 1. В обоих случаях центрифугировачие производят при скорости 1500 *об/мин* в течение 20 *мин*. Всю процедуру отмывания проводят в одном и том же флаконе емкостью 500 *мл*.

Таблица 2

Сравнительная оценка методов три- и двукратного отмывания размороженных эритроцитов (средние данные)

После размораживания			После отмывания					
			Троекратное отмывание			Двукратное отмывание		
Гематокрит, %	Свободный гемоглобин, *мг* %	Количество разрушенных эритроцитов, %	Гематокрит, %	Свободный гемоглобин, *мг* %	Количество разрушенных эритроцитов, %	Гематокрит, %	Свободный гемоглобин, *мг* %	Количество разрушенных эритроцитов, %*
27	840	5,6	29	93	0,78	30	93	0,61

* Определение количества разрушенных эритроцитов производилось в растворе ЦОЛИПК 8б

В табл. 1 представлены данные о затрате времени и расходе растворов, используемых при разных методах отмывания. При двукратном отмывании время, затрачиваемое на отмывание, а также количество требуемого для отмывания раствора уменьшаются. Оценка эффектив-

Матеріал, захищений авторським правом

ности проводимых отмываний проводилась по количеству свободного гемоглобина во взвеси размороженных отмытых эритроцитов в растворе ЦОЛИПК 8[6]. Как следует из табл. 2, различий в этих показателях при дву-трикратном отмывании не выявлено.

Было перелито 32 дозы размороженных эритроцитов отмытых двукратным методом центрифугирования 10 больным. Все больные перенесли трансфузии хорошо, посттрансфузионных реакций не наблюдалось. Отмечены изменения показателей красной крови и гемодинамики, как и при переливании размороженных эритроцитов, отмытых троекратным центрифугированием.

Существенным недостатком при переливании размороженных эритроцитов явилось наличие в них сгустков, которые закрывают поры фильтра. Гистологические исследования сгустков показали, что они состоят из густой сети нитей фибрина, включающих большие скопления эритроцитов. Лейкоциты содержатся в небольшом количестве и располагаются между нитями фибрина. Размороженные эритроциты сохраняют лечебную эффективность: трансфузионная среда является ареактогенной. Примененный нами двукратный метод отмывания эритроцитов позволил сократить время, затрачиваемое на отмывание их, и количество расходуемого отмывающего раствора, при сохранении биологической полноценности замороженных эритроцитов.

Ленинградский НИИ гематологии
и переливания крови

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

ВЫБОР ОПТИМАЛЬНОГО РЕЖИМА ОТТАИВАНИЯ ДЛЯ ЯДРОСОДЕРЖАЩИХ КЛЕТОК КРОВИ, КОНСЕРВИРОВАННЫХ ГЛУБОКИМ ОХЛАЖДЕНИЕМ

А. И. Полякова, Е. А. Гордиенко

Процесс оттаивания имеет немаловажное значение для получения в неповрежденном состоянии клеток, хранившихся при низких температурах. По данным литературы, наиболее оправданным является применение быстрого оттаивания ядерных клеток [1—4, 6, 7]. При быстром отогревании время пребывания объекта в опасной с точки зрения повреждения рекристаллизацией температурной зоне (примерно от —120° до —40°) сокращается, а следовательно, возможность рекристаллизации, а вместе с ней и степень повреждения объекта, уменьшается. Сокращение времени пребывания клеток в этой зоне достигается также тем, что при непрерывном нагревании область температур, наиболее благоприятная для рекристаллизации, с увеличением скорости нагревания смещается в сторону температуры плавления. Следует иметь в виду, что оптимальный режим оттаивания зависит от многих факторов, поэтому, как и при подборе режима охлаждения, для разных видов клеток требуется экспериментальный подбор условий оттаивания.

Объектом исследования служили лейкоциты периферической крови человека. Лейкоцитарную массу готовили из донорской крови по методу, разработанному Н. Н. Чернышевой и А. А. Фром [5]. В качестве защитного вещества при низкотемпературной консервации суспензии лейкоцитов мы использовали полиэтиленоксид молекулярного веса 400 (ПЭО-400) в 10%-, 15%- и 20%-ной концентрациях. Замораживание производили по двухэтапной программе: скорость охлаждения на первом этапе (от +20° до —15°) равнялась 1° в 1 *мин*, а на втором (до —196°) — 300—400° в 1 *мин*. Замораживание производили в полиэтиленовых ампулах, объем суспензии — 1—2 *мл*. Скорость охлаждения

Матеріал, захищений авторським правом

и отогревания регистрировали термопарой, соединенной с потенциометром ЭПП-09М.

Для изучения влияния различных режимов оттаивания на жизнеспособность клеток лейкоконцентрата мы провели ряд экспериментов. Было изучено влияние быстрого оттаивания (в водяной бане при температурах +50°, +40°, +30°), медленного оттаивания в воде при температурах +15° и 0°, а также очень медленного оттаивания на воздухе при комнатной температуре (+18°).

При погружении в водяную баню температура препарата вплоть до —35°,—30° (первый этап) изменялась с постоянной скоростью. Отклонения от заданной скорости не превышали ±0,3° в 1 *сек*. Средние значения скоростей отогревания в водяной бане при соответствующих температурах приведены в таблице. Из таблицы видно, что скорость отогревания на первом этапе (от —196° до —35°, —30°) при использованных значениях температуры водяной бани отличается незначительно. Можно показать, что разность между максимальной скоростью $\dot{T}_{max}$ на первом этапе, соответствующей наибольшей из использованных температур водяной бани $T_{max}=50°$, и минимальной скоростью, соответствующей наименьшей из температур бани $T_{min}=0°$, при отогревании препарата после пребывания при температуре консервации T_0 составляет примерно $\frac{T_{max}-T_{min}}{T_{min}-T_0}$ часть от $\dot{T}_{max}$. В нашем случае она составляет 2,4° в 1 *сек*. На воздухе (+18°) скорость отогревания до —30° составляла всего 1,15° в 1 *сек*, что обусловлено тем, что теплопроводность воздуха меньше, чем воды.

Жизнеспособность клеток лейкоконцентрата, консервированных под защитой ПЭО-400, в зависимости от режима отогревания, $\bar{x}\pm S\bar{x}$

Температура воды, воздуха	Скорость отогревания, °С в 1 *сек*		Продолжительность плавления, *сек*	Лейкоконцентрат + 10%-ный ПЭО-400	Лейкоконцентрат + 15%-ный ПЭО-400	Лейкоконцентрат + 20%-ный ПЭО-400
	Первый этап до — 30°	Второй этап до 0°				
+50°	9,4	1,39	40	90,9±3,61	91,9±2,23	90,4±3,13
				P>0,1	P=0,1	P>0,1
+40°	9	1,20	50	97,0±0,71	96,6±0,35	94,7±1,20
+30°	8,3	0,94	70	95,8±0,96	96,2±0,35	P>0,5
				P>0,2	P>0,2	95,1±0,47
+15°	7,8	0,45	180	91,0±1,78	88,4±2,67	92,5±1,04
				P<0,05	P<0,05	P=0,1
0°	7		1200	90,3±2,67	90,9±2,48	88,9±3,69
				P<0,05	P=0,05	P>0,1
+18° на воздухе	1,15	0,20	600	82,5±6,60	77,6±6,70	73,0±6,68
				P=0,05	P=0,05	P=0,05

На втором этапе отогревания (примерно от —30° до 0°) в связи с плавлением, сопровождающимся поглощением тепла, отогревание приостанавливалось. Этот этап отогревания (таяние) удобно характеризовать временным интервалом от начала плавления до полного его завершения. Момент начала плавления определяли по замедлению отогревания, т. е. отклонению временной зависимости температуры от прямолинейной (точка *а* на рис. 1), отражающей постоянство скорости отогревания на первом этапе. Конец плавления определяли по характерному излому на кривой «температура отогреваемого образца — время» (точка *б* на рис. 1).

Продолжительность плавления $t_б-t_а$, соответствующая разным условиям отогревания, указана в таблице. Для наглядности приведены

Матеріал, захищений авторським правом

также средние скорости отогревания на участках плавления, определяемые как $\frac{T_б - T_а}{t_б - t_а}$.

Оценка жизнеспособности клеток после оттаивания проводилась с помощью экспресс-метода — эозиновой пробы. Полученные данные приведены в таблице и на рис. 2. Наиболее высокие показатели жизнеспособности лейкоцитов, консервированных под защитой ПЭО-400 в 10%-ной концентрации были получены при скорости отогревания 9° в 1 *сек* (первый этап). Клетки, консервированные в присутствии ПЭО-400 15%-ной концентрации, давали наиболее высокие цифры показателей жизнеспособности при такой же скорости отогревания. При использовании ПЭО-400 20%-ной концентрации лучшие показатели жизнеспособности выявлены при скорости отогревания 8,3° в 1 *сек*.

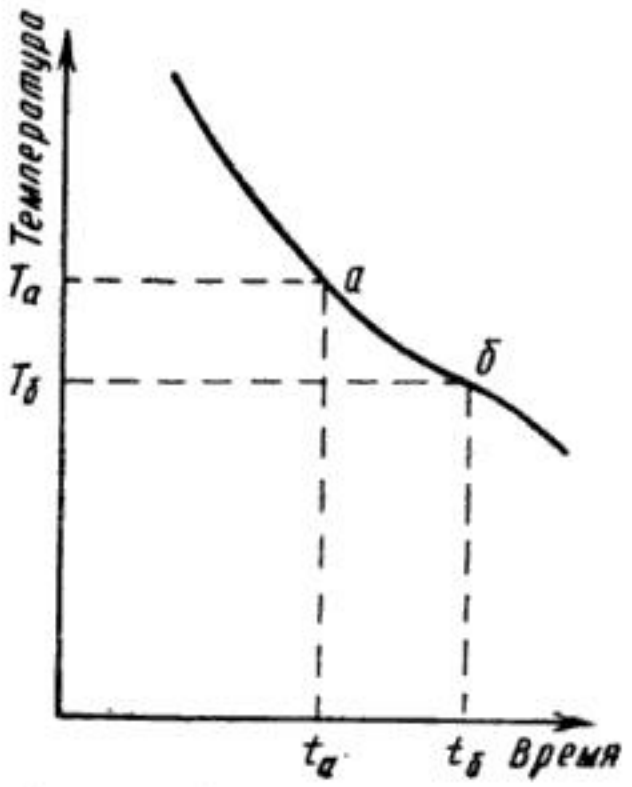


Рис. 1. Термограмма отогревания лейкоконцентрата крови.

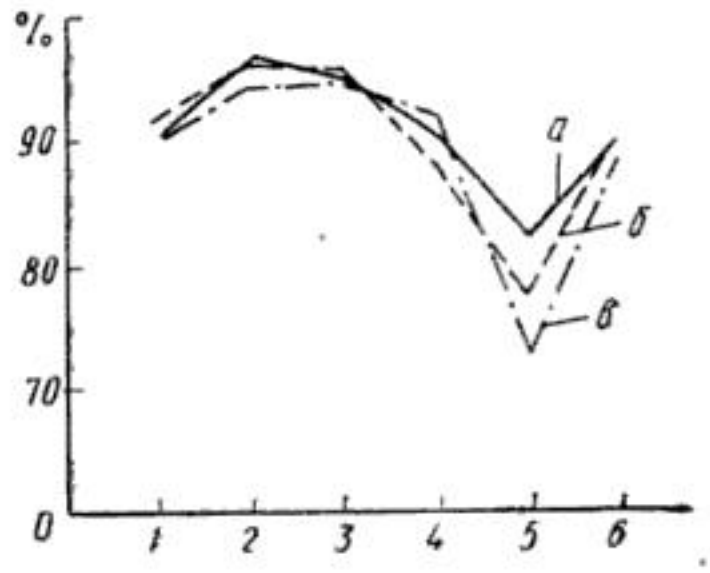


Рис. 2. Влияние режима отогревания на жизнеспособность клеток лейкоконцентрата, консервированных под защитой ПЭО-400 10%-ной (*а*), 15%-ной (*б*) и 20%-ной (*в*) концентрации. По оси ординат — жизнеспособность, по оси абсцисс — режимы отогревания, скорость на первом этапе (°С в 1 *сек*):

1 — 9,4; *2* — 9,0; *3* — 8,3; *4* — 7,8; *5* — 7,0; *6* — 1,15.

Полученные результаты свидетельствуют о лучшей сохранности клеток при быстром оттаивании. Лучшие результаты по всем тестам получены при применении режима быстрого оттаивания. При подсчете лейкограмм выявлено сохранение всех клеточных форм, получены недостоверные различия показателей фагоцитарной активности лейкоцитов до консервации и после быстрого оттаивания, хорошие результаты получены и в реакции бласттрансформации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лаврик С. С. — Консервирование костного мозга глубоким замораживанием. Автореф. докт. дис. Киев, 1967.
2. Пушкарь Н. С., Иткин Ю. А., Розанов Л. Ф. — В кн.: Материалы Всесоюз. симпоз. по вопросам консервирования, культивирования и типирования костного мозга. М., «Медицина», 1971, 21.
3. Федотенков А. Г., Нефедова Н. А., Дискант И. Н. — Пробл. гематол., 1961, 2, 46.
4. Федотенков А. Г., Шишкина И. Д., Игнашева Л. П., Курбанова Г. Н. — Пробл. гематол., 1969, 3, 48.
5. Чернышева Н. Н., Фром А. А. — Пробл. гематол., 1969, 1, 55.
6. Rey L. — World Refregerat., 1964, **15**, 21.
7. Stowell R. E., Younge D. E., Arnold E. A., Trump B. T. — Fed. Proc., 1966, **24**, 115.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

Матеріал, захищений авторським правом

ВЛИЯНИЕ СКОРОСТИ ЗАМОРАЖИВАНИЯ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ЛЕЙКОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

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

Для максимальной выживаемости клеток в процессе низкотемпературной консервации первостепенное значение имеет правильно подобранная программа замораживания [1].

Одной из работ, которая резко расширяет понимание сути процессов, происходящих при замораживании биологических суспензий, является работа Мазура [3]. Из нее логически вытекает двухфакторная гипотеза [4], суть которой заключается в следующем. Интенсивность повреждения клеток тем или иным фактором при замораживании сильно изменяется с изменением скорости замораживания. При одних скоростях охлаждения большую роль играет один повреждающий фактор, при других скоростях — другой. Поэтому для одного и того же консервируемого объекта при разных режимах охлаждения могут понадобиться совершенно различные способы защиты (проникающие или непроникающие защитные добавки и т. д.). Согласно рассматриваемой гипотезе, оптимальными являются скорости замораживания, при которых действие совокупности повреждающих факторов оказывается минимальным. Оптимальные скорости изменяются в зависимости от рода применяемого криофилактика для одного и того же вида клеток и тем более для разных типов клеток.

Двухфакторная гипотеза явилась для нас основой для подхода к выбору оптимальных условий консервации лейкоконцентрата и трактовки полученных результатов.

С целью выбора оптимальной программы замораживания мы исследовали зависимость сохранности лейкоцитов от скорости замораживания и последующего отогревания в водяной бане при +41° под защитой полиэтиленоксида молекулярного веса 400 (ПЭО-400).

Лейкомассу получали из донорской крови методом фракционирования по Н. Н. Чернышевой, А. А. Фром [2] в нашей модификации. Охлаждение суспензии лейкоцитов при скоростях от 0,2° до 400° в 1 *мин* производилось в парах жидкого азота или непосредственным погружением в азот в конических полиэтиленовых ампулах емкостью 2 *мл*, фиксируемых вершиной книзу. Температуру регистрировали в процессе охлаждения с помощью предварительно отградуированного потенциометра ЭПП-09М и медь-константановой термопары, спай которой помещали в центре ампулы.

Для определения выживаемости лейкоцитов в процессе консервации определяли количество ядросодержащих клеток в одном микролитре суспензии, а также жизнеспособность лейкоцитов методом суправитального окрашивания 1%-ным раствором эозина по Шрэку.

Уменьшение концентрации лейкоцитов по сравнению с начальной после цикла консервации связано с полным разрушением части консервируемых клеток. Определение жизнеспособности суправительным окрашиванием показало, что и среди неразрушенных полностью клеток имеется часть клеток, утративших способность препятствовать диффузному проникновению красителя внутрь клетки, т. е. биологически неполноценных. Комбинирование указанных методов дает возможность использовать следующую формулу для определения жизнеспособности клеток после консервации в процентах от начальной жизнеспособности:

$$\frac{n_f \cdot g_f}{n_0 \cdot g_0} \cdot 100,$$

Матеріал, захищений авторським правом

где n_0, g_0 и n_f, g_f — количество ядросодержащих клеток в 1 микролитре суспензии и их жизнеспособность по Шрэку соответственно до и после консервации.

Полученные таким образом, а также усредненные данные о жизнеспособности лейкоцитов после консервации при десяти режимах замораживания и трех концентрациях защитной добавки показаны на рис. 1, из которого видно, что жизнеспособность лейкоцитов после консервации как функция средней скорости охлаждения имеет два ярко выраженных максимума, больший из которых соответствует скорости

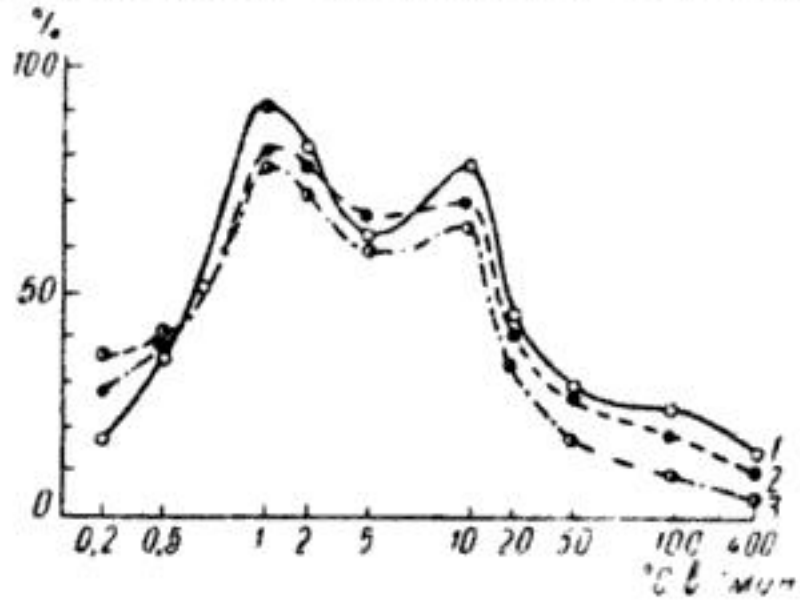


Рис. 1. Влияние скорости охлаждения на жизнеспособность лейкоцитов (% от контроля) при добавлении ПЭО-400 10%-ной (*1*), 15%-ной (*2*) и 20%-ной (*3*) концентрации.

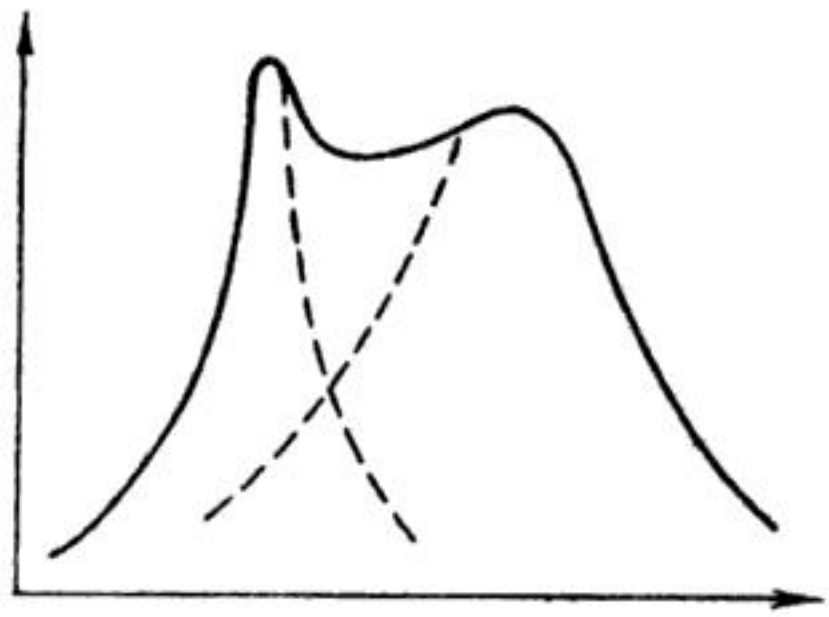


Рис. 2. Кривая зависимости жизнеспособности клеток от скорости охлаждения, образованная наложением максимумов выживаемости двух фракций лейкоконцентрата.

охлаждения 1° в 1 *мин*, а меньший — 10° в 1 *мин*. Мы предположили, что двухвершинная форма кривой может быть обусловлена наложением двух (почти симметричных относительно соответствующих им максимумов скоростей) зависимостей, как показано на рис. 2. Первый максимум более высокий, но менее широкий (на рис. 1 это завуалировано тем, что значения скоростей охлаждения по оси абсцисс отложены в логарифмическом масштабе).

Наличие двух подобных зависимостей побудило нас прийти к заключению о неоднородной устойчивости лейкомассы по отношению к условиям консервации. Поскольку резко очерченными совокупностями в лейкомассе являются полинуклеары и мононуклеары, мы предположили, что различное воздействие на эти две фракции приводит к появлению двух перекрывающихся максимумов. Для проверки этой гипотезы был произведен дифференциальный подсчет количества полинуклеаров и мононуклеаров в деконсервированном материале в случаях, когда предшествующее замораживание соответствовало первому или второму оптимумам. При скорости охлаждения 1° в 1 *мин* отношение количества полинуклеаров к количеству мононуклеаров после консервации оказалось близким к 1,5, тогда как при условиях консервации, соответствующих второму максимуму, отношение количества полинуклеаров к мононуклеарам оказалось незначительным (0,7).

Таким образом, наше предположение о наличии разных оптимальных условий для консервации двух указанных фракций в лейкомассе подтвердилось. Оптимум замораживания для мононуклеаров по сравнению с полинуклеарами перемещается в сторону бóльших скоростей, соответствующих менее длительной экспозиции в гипертонической, и, в частности, в солевой среде, хотя вероятность внутриклеточной кристаллизации при более высоких скоростях, согласно двухфакторной гипотезе, возрастает.

Проведенные исследования показывают, что наиболее эффективная защита обеих фракций при использованных режимах охлаждения на-

Матеріал, захищений авторським правом

блюдается при 10%-ной концентрации полиэтилена. Для максимальной выживаемости обеих рассмотренных фракций необходимо замораживать лейкомассу со скоростью 1° в 1 *мин*. Охлаждение со скоростью 10° в 1 *мин* обеспечивает выживаемость лишь моноядерных клеток, которые в лейкоконцентрате представлены в основном лимфоцитами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Леонтович В. А., Абезгауз Н. Н., Перфильев В. Я., Мгебришвили Н. Н., Трошина В. М. — Пробл. гематол., 1973, 9, 44.
2. Чернышева Н. Н., Фром А. А. — Пробл. гематсл., 1969, 1, 55.
3. Mazur P. — J. Gen. Physiol., 1963, **47**, 345.
4. Mazur P., Leibo S., Chu E. — Exp. Cell Res., 1972, **71**, 345.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТРАНСПЛАНТАЦИЙ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ АЛЛОГЕННОЙ МИЕЛОИДНОЙ ТКАНИ ОНКОЛОГИЧЕСКИМ БОЛЬНЫМ ПРИ ХИМИО- И ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ

Г. А. Бабийчук, О. П. Маркова, В. И. Луговой, Э. И. Обозная, Е. Л. Воловельская, Ю. П. Шевердин, Л. А. Вартанова

В настоящее время накоплен ряд фактов, свидетельствующих о важной роли трансплантаций гемопоэтической ткани больным с развившейся гипоплазией кроветворения разного происхождения. Депрессии кроветворения, возникшие в результате применения цитостатических препаратов, как правило, не могут быть компенсированы гемотрансфузиями, гормональными препаратами и другими методами лечения. Наиболее действенным методом профилактики этих осложнений является трансплантация костного мозга [1—9].

В настоящей работе представлены материалы наблюдения над 17 больными раком молочной железы 3—4-й стадии заболевания, которым в процессе лечения трансфузировали консервированный глубоким охлаждением посмертный костный мозг. Показанием к трансплантации костного мозга служила развившаяся гипоплазия кроветворения в результате применения химио- и лучевого лечения.

Посмертный костный мозг после прибавления криопротектора ПЭО-400 замораживался до —196° по двухэтапной программе и хранился в полиэтиленовых контейнерах в жидком азоте.

Как показали проведенные исследования, в деконсервированном посмертном костном мозге в среднем содержалось 7000±1,030 миелокариоцитов в 1 *мм*^{3}, жизнеспособность которых по Шреку составляла 81±3,4%. При изучении миелограмм отмечено, что клеточный состав был представлен элементами миело- и эритропоэза и в процентном отношении приближался к нативному костному мозгу. Однако часть мононуклеаров претерпевала структурные изменения, выражающиеся в основном в пикнозе ядра и сморщивании всей клетки, что приводило к нарушению тинкториальных свойств и подчас затрудняло их идентификацию.

Матеріал, захищений авторським правом

Цитохимические исследования окислительно-восстановительных ферментов показали снижение активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) в зрелых гранулоцитах на 41% и в нормобластах на 30% по сравнению с исходной, в меньшей степени снизилась активность НАД-диафоразы в бластных клетках, миелоцитах и нормобластах, соответственно на 25, 28 и 17%. Вместе с тем следует отметить, что в деконсервированных миелокариоцитах активность указанных ферментов была достаточно высокой.

В пунктате костного мозга, взятого перед миелотрансплантацией, содержание клеточных элементов в среднем составляло 54000 в 1 *мм*^{3}. Миелограммы характеризовались торможением процессов созревания гранулоцитов на уровне миелоцитов (индекс созревания приближался к 1,0). У части больных наблюдали угнетение эритропоэза и ретикулярно-плазмоцитарную реакцию.

Об эффективности трансплантации посмертного костного мозга судили на основании изменения общего состояния больных, периферической крови, миелограмм, изоферментного спектра лактатдегидрогеназы крови.

В миелограммах на 21-е сутки отмечалась нормализация созревания клеток гранулоцитарного ряда (индекс созревания нейтрофилов равнялся 0,7), а также некоторое увеличение эритропоэза. Однако к этому сроку исследования еще сохранялась ретикулярно-плазмоцитарная реакция.

На 7—14-й день после трансфузии гемопоэтической ткани наблюдалась нормализация уровня лактатдегидрогеназы ($ЛДГ_5$) и некоторое снижение уровня $ЛДГ_4$. Через три недели после трансплантации костного мозга $ЛДГ_5$ была в пределах нормы, тогда как активность $ЛДГ_4$ оставалась повышенной. Подобная динамика отмечалась и для общей лактатдегидрогеназы: если до начала лечения общая активность фермента составляла 0,89 *мкмоль/мин·мл*, то на 7-е сутки после трансплантации 0,76, а на 21-е сутки 0,67 *мкмоль/мин·мл*.

Изменения изоферментного спектра лактатдегидрогеназы в процессе комплексного лечения онкологических больных

Группа обследованных	Относительная активность (в % к общей активности фермента)				
	$ЛДГ_1$	$ЛДГ_2$	$ЛДГ_3$	$ЛДГ_4$	$ЛДГ_5$
Здоровые (доноры)	27,0	45,5	23,0	3,0	1,5
Онкологические больные до начала лечения	26,3	40,0	23,2	7,6	2,3
Онкологические больные на 7—14-е сутки после трансплантации	28,0	44,0	19,0	5,6	1,6
Онкологические больные на 21-й день после миелотрансфузии	28,0	40,0	26,7	4,2	1,1

Таким образом, результаты исследования показывают, что миелотрансплантации посмертного костного мозга, консервированного при низких температурах, способствуют некоторой нормализации цитологических и биохимических показателей у онкологических больных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Боголявленская М. П. — Радиология, 1966, 1, 15.
2. Баженова П. П. — Вопросы онкологии, 1969, 15, 1, 85.
3. Бутомо Н. В. — Военно-мед. журнал, 1969, 12, 23.
4. Даценко Б. М. Регионарная химиотерапия злокачественных опухолей в сочетании с аутотрансплантацией костного мозга, консервированного программным замораживанием при —196°. Автореф. докт. дис. Харьков, 1971.

Матеріал, захищений авторським правом

5. Даценко Б. М. — В кн.: Актуальные вопросы консервирования и трансплантации костного мозга и крови. Харьков, 1972, 3.
6. Киселев Е. А. — Материалы Всесоюз. симпоз. по вопросам консервации, культивирования и типирования костного мозга. Харьков, 1971, 3.
7. Морозов И. А. — Пробл. гематол., 1973, 2, 60.
8. Пушкарь Н. С. — Клиническая хирургия, 1971, 5, 55.
9. Пушкарь Н. С. — Пробл. гематол., 1971, **16**, 4, 52.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ КРИОФИЛАКТИКОВ ПРИ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЙ КОНСЕРВАЦИИ ЯДЕРНЫХ КЛЕТОК КРОВИ

Г. С. Лобынцева, Г. М. Щербак

Целью данной работы было изучить криофилактические свойства оксиэтилированных пэнтаэритритов (ОЭПЭ) разного молекулярного веса и установить их оптимальную концентрацию, при которой после замораживания-оттаивания сохраняется наибольшее количество жизнеспособных клеток.

Таблица 1

Влияние некоторых ОЭПЭ на сохранность ядерных клеток крови при низкотемпературном консервировании (—196°)

Степень полимеризации и молекулярный вес	5%-ный ОЭПЭ		15%-ный ОЭПЭ	
	Суправитальное окрашивание, %	Количество ядерных клеток, %	Суправитальное окрашивание, %	Количество ядерных клеток, %
11,4 636	98,15±0,34 81,55±1,24	100 88,05±0,79	97,85±0,28 66,35±0,79	100 62,85±0,82
9 532	98,20±0,32 75,68±0,84	100 83,05±1,03	98,35±0,21 65,05±1,03	100 62,85±1,02
5 386	98,2 ±0,05 76,0 ±0,38	100 80,65±0,89	97,85±0,24 63,65±0,79	100 62,35±0,89
17,2 892,8	97,1 ±0,34 80,95±0,78	100 75,25±0,93	75,25±0,93 71,20±0,67	100 65,15±1,50
3,3 281	97,90±0,25 79,20±1,08	100 92,15±0,24	98,05±0,24 67,15±0,65	100 66,35±0,70
7,5 466	98,55±0,26 83,65±1,05	100 82,35±0,44	97,80±0,31 65,80±0,52	100 65,10±0,52
22,5 1126	98,40±0,19 81,60±0,78	100 82,30±0,61	98,30±0,23 65,15±0,40	100 58,05±0,95

Примечание. В числителе — до замораживания, в знаменателе — после отогревания.

Материалом для исследований служила лейкомасса, полученная из периферической донорской крови [2]. Используемый в эксперименте криофилактик доводили раствором Рингера до 50%-ной концентрации. Постоянно взбалтывая суспензию клеток, добавляли его по каплям до получения 2, 5, 10 и 15%-ных конечных концентраций. Полученную

Матеріал, захищений авторським правом

суспензию с добавленным криофилактиком замораживали в полиэтиленовых ампулах объемом 2 *мл* по следующей программе: на первом этапе медленное охлаждение (1° в 1 *мин*) от +20° до точки кристаллизации, на втором — быстрое охлаждение (300° в 1 *мин*) до —196°, т. е. до температуры хранения. Отогревали в водяной бане при +42°. Для определения сохранности клеток в ходе эксперимента использовали следующие методы: подсчет количества ядросодержащих клеток крови в камере Горяева; определение жизнеспособности клеток по суправитальному окрашиванию эозином [3]; характеристика лейкограмм.

В работе, опубликованной ранее, изложены результаты сравнительного исследования криофилактических свойств полиэтиленоксида (ПЭО) разного молекулярного веса при консервации ядерных клеток крови. Установлено, что из исследованных ПЭО молекулярного веса 200, 300, 400 и 500 при замораживании по двухэтапной программе наиболее эффективным оказался ПЭО молекулярного веса 400 в 10%-ной концентрации [1].

В настоящем сообщении изложены результаты исследования ОЭПЭ разного молекулярного веса (636, 532, 386, 892,8, 281, 466, 1126) и степени полимеризации (n равно 11,4; 9; 5; 17,2; 3,3; 7,5; 22,5), которые могут использоваться в качестве криофилактиков при низкотемпературной консервации ядерных клеток крови.

Как видно из табл. 1, все исследуемые ОЭПЭ не вызывали резкого снижения жизнеспособности клеток. Однако при рассмотрении лейкограмм и при качественной оценке клеток отмечено, что с добавлением ОЭПЭ клетки уменьшаются в размерах, сморщиваются, в некоторых случаях нарушается целостность мембран. В сегментоядерных и палочкоядерных нейтрофилах иногда наблюдается деструкция ядра без разрушения мембраны клетки. Особенно резкие изменения были в суспензии клеток с 15%-ной концентрацией ОЭПЭ.

Таблица 2

Влияние ПЭО-400 и ОЭПЭ-466 (n=7,5) в 10%-ной концентрации на сохранность ядерных клеток крови при низкотемпературной консервации (—196°)

Криофилактик	Суправитальное окрашивание, %	Количество ядерных клеток, %
ПЭО-400	98,5±0,22 / 95,0±0,42	100 / 84,8±0,74
ОЭПЭ-466	98,6±0,16 / 96,6±0,33	100 / 85,6±1,57

Примечание. В числителе — до замораживания, в знаменателе — после отогревания.

При замораживании с 5%-ной концентрацией ОЭПЭ получена лучшая сохранность клеток (75—88%) с жизнеспособностью 75—92%. При 15%-ной концентрации сохранялось лишь 56—66% клеток с жизнеспособностью 63—71%. Это позволило сделать вывод, что 5%-ная концентрация ОЭПЭ во всех случаях обладает лучшим защитным эффектом. Из всех изученных ОЭПЭ можно выделить три (n и молекулярный вес соответственно 7,5, 466; 11,4, 636; 22,5, 1126), которые необходимо изучить подробнее.

Для исследованных нами концентраций не отмечено увеличения эффекта криозащиты с повышением степени полимеризации ОЭПЭ. В дальнейших экспериментах мы применяли ОЭПЭ с n=7,5, молекулярным весом 466 в 5%- и 10%-ной концентрации. По данным экспресс-методик и лейкограмм жизнеспособность клеток в случае консервации с 10%-ным ОЭПЭ была выше, чем при 5%-ной концентрации.

Таким образом, результаты проведенных экспериментов позволяют сделать вывод, что ОЭПЭ-466, сохраняющий 85% клеток в жизнеспособном состоянии, может использоваться наряду с ПЭО-400 (табл. 2) при консервации ядерных клеток крови по двухэтапной программе ($P<0,05$).

Матеріал, захищений авторським правом

ЛИТЕРАТУРА

1. Чернышова Н. Н., Фром А. А. — Проблемы гематол. и перелив. крови, 1969, 1, 55.
2. Лобынцева Г. С., Полякова А. И., Щербак Г. М. — В кн.: Криобиология и криомедицина. Киев, «Наукова думка», 1974.
3. Schrek L. — Amer. J. Cancer, 1936, 28, 389.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

ОПЫТ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ КОНСЕРВИРОВАННОГО КОСТНОГО МОЗГА ПРИ ТЕМПЕРАТУРЕ —196°

С. С. Лаврик, Г. Т. Глухенькая, Г. И. Когут, Л. Л. Карабанова, Е. Ю. Афанасьева, Т. А. Коротя

В Киевском научно-исследовательском институте гематологии и переливания крови разработан метод консервирования и длительного хранения костного мозга глубоким замораживанием при температуре —196° с помощью защитной среды, содержащей низкомолекулярный поливинилпирролидон (ПВП) [3]. Решение этой проблемы дало возможность создать в институте банк долгосрочного хранения гемопоэтической ткани, позволяющий систематически снабжать лечебные учреждения миелотрансплантатами. Исследования были направлены на изучение: 1) влияния ПВП на клетки костного мозга при плюсовой температуре; 2) защитных свойств ПВП при глубоком замораживании; 3) влияния различных режимов скорости замораживания на жизнеспособность клеток костного мозга, обработанного средой, содержащей ПВП; 4) возможности длительного хранения консервированного с помощью ПВП костного мозга при —78° и —196°.

Для суждения об эффективности избранного способа консервирования клеток костного мозга наряду с общепринятыми методами (эозиновая проба, люминесцентная микроскопия, подсчет количества миелокариоцитов и миелограмм, определение фагоцитарной активности) определяли гликоген, щелочную фосфатазу, сукцинатдегидрогеназу.

Жизнеспособность клеток деконсервированного костного мозга определяли также методами: инкубации с тимидином, определения окислительного фосфорирования, меченным искусственно радиоактивным тритием (H^3).

Для суждения о биологической полноценности клеток костного мозга кроме опытов in vitro проведено изучение влияния консервированного костного мозга на течение и исход острой лучевой болезни у летально облученных кроликов [1]. Проведенные нами исследования показали, что среда, содержащая ПВП, не оказывает повреждающего действия на клетки костного мозга, более того, она способствует сохранению клеток костного мозга при плюсовых температурах в течение 8—10 дней.

Анализ миелограмм консервированного костного мозга показал, что самыми стойкими являются молодые клетки гранулоцитарного ряда, клетки эритроидного ряда и лимфоциты. На 8-е сутки хранения консервированного костного мозга достоверно уменьшалось количество палочко- и сегментоядерных клеток. Это, вероятно, связано с тем, что клеточные формы, завершившие цикл своего развития и созревания, более подвержены воздействию повреждающих факторов, чем клетки на ранних этапах дифференцировки [10].

Матеріал, захищений авторським правом

Установив благоприятное влияние среды, содержащей ПВП, на клетки костного мозга при плюсовой температуре, мы перешли к изучению ее защитных свойств при замораживании костного мозга. При замораживании костного мозга были изучены защитные свойства 8,5%-ного водного раствора ПВП; ПВП в комбинации с гомологичной сывороткой; ПВП в комбинации с гомологичной сывороткой и солевым раствором Хэнкса; ПВП с глюкозой и гомосывороткой.

Наиболее высокий процент жизнеспособных клеток сохранялся при обработке костного мозга защитной средой следующего состава: ПВП (молекулярный вес 12 600) — 17 *г*, глюкоза — 10—12 *г*, сыворотка крови — 10 *мл*, левомицетин — 0,015, гепарин — 2500 МЕ, вода бидистиллированная — до 100 *мл*. При обработке костного мозга средой в соотношении 1 : 1 конечная концентрация ПВП во взвеси была 8,5%. Изучали также влияние на сохранение клеток костного мозга, обработанного ПВП, различных режимов замораживания: быстрого, сверхбыстрого, медленного, поэтапного.

Скорость процесса охлаждения регистрировали с помощью аппарата ЭПП-09 М-2 и дифференциальной термопары. Оказалось, что при быстром замораживании костного мозга в смеси твердой углекислоты и эфира скорость охлаждения от 0° до —20° составляла 3° в 1 *сек*, от —20° до —60° —1,2° в 1 *сек*. При таком режиме замораживания и последующем оттаивании сохраняется 33±3,8% жизнеспособных клеток. Скорость охлаждения при сверхбыстром замораживании до —196° клеток консервированного костного мозга составляла: от 0° до —20° — 12° в 1 *сек*, от —20° до —60° — 20° в 1 *сек*, от —60° до —196° — 2,4° в 1 *сек*. При этом отмечается 30±3,3% жизнеспособных клеток. При медленном замораживании до —79° скорость охлаждения от 0° до —20° составляла 2,4° в 1 *мин*, от —20° до —79° — 3,5° в 1 *мин*. При таком режиме замораживания и оттаивания обнаруживали 76±3,7% жизнеспособных клеток.

Наиболее высокий процент жизнеспособных клеток костного мозга, обработанного защитной средой, содержащей ПВП, сохранялся при поэтапном режиме замораживания: первый этап 1° в 1 *мин* до —20°, второй этап 10° в 1 *мин* от —20° до —60° и быстрое погружение или в жидкий азот (—196°), или в твердую углекислоту (—79°).

Анализ приведенных данных дает основание сделать заключение, что для сохранения жизнеспособности клеток костного мозга решающее значение имеет скорость охлаждения в первый и начальный период замораживания.

Для успеха консервирования костного мозга необходимо замедлить скорость охлаждения до —20° и ускорить ее на втором этапе замораживания [4]. Применение суправитальной окраски клеток костного мозга 1%-ным водным раствором зозина показало, что некоторое снижение жизнеспособности происходит в процессе замораживания костномозговой взвеси: если до замораживания неразрушенных клеток было 97±1,3%, то через сутки хранения при температуре —196° их насчитывали 92±3,2% (P=0,01). При дальнейшем исследовании образцов костного мозга, хранившихся в жидком азоте в течение 12 месяцев, их было 92±2,6% (P=0,01 по сравнению с данными до замораживания и P=0,05 по сравнению с первыми днями хранения). Кроме определения процента жизнеспособных клеток во взвеси консервированного костного мозга мы проводили подсчет количества ядерных клеток в единице объема до замораживания, через сутки и 12 месяцев хранения. Следует отметить, что в процессе замораживания происходит незначительное разрушение 10—15% клеток в единице объема через сутки хранения в жидком азоте. При хранении в жидком азоте общее количество миелокариоцитов существенно не снизилось. Подсчет клеточных элементов в мазках, окрашенных по модифицированной нами

Матеріал, захищений авторським правом

методике Романовского—Гимза показал, что процентное соотношение клеточных форм костного мозга до замораживания и в процессе хранения в жидком азоте существенно не изменяется. Сохраняются клеточные элементы от молодых до зрелых клеток всех рядов: миелоидного, эритроидного и лимфоцитов.

Люминесцентно-микроскопическое исследование показало, что большинство клеток консервированного костного мозга до замораживания и после оттаивания обладали яркой метахроматической флуоресценцией. При исследовании костномозговой взвеси, подвергавшейся замораживанию и оттаиванию, 50% фагоцитирующих до замораживания клеток сохранили фагоцитарную активность.

Гликоген в клетках консервированного костного мозга определяли по методу Мак-Мануса и Хочкиссу, щелочную фосфатазу — по Гомори, сукцинатдегидрогеназу — по модифицированной нами методике Нахласа. Положительная реакция на перечисленные выше ферменты была получена в клетках консервированного костного мозга до замораживания и после оттаивания. О жизнеспособности клеток костного мозга свидетельствуют также опыты, проведенные методом инкубации клеток с тимидином H^3. Установлено, что клетки консервированного костного мозга сохраняют способность синтезировать нуклеиновые кислоты.

Методы определения жизнеспособности клеток консервированного костного мозга в разной степени достоверны. В связи с тем, что ни один метод не может дать полного представления о физиологической полноценности клетки, оценка производилась на основании результатов комплексных исследований. Наиболее достоверны методы, устанавливающие пролиферативную активность клеток. Поэтому мы изучали биологическую полноценность клеток консервированного костного мозга также in vivo. С этой целью клетки консервированного костного мозга вводили кроликам, облученным летальной дозой. Выживаемость животных составляла 75%, а животные контрольной группы погибли в течение первых двух недель. При исследовании в динамике периферической крови пунктатов костного мозга можно отметить восстановление гемопоэза до исходного уровня к 45—60-м суткам [1].

Для оценки жизнеспособности клеток консервированного костного мозга в ткань селезенки облученного кролика вводили взвесь клеток костного мозга, подвергавшегося замораживанию. Обнаруженные в селезенке клетки гранулоцитарного и эритроидного рядов косвенно свидетельствовали о жизнеспособности клеток консервированного костного мозга, так как нежизнеспособные клетки костного мозга разрушаются и быстро уничтожаются.

В настоящее время, благодаря разработанному Тилл и Каллох [44] методу клонирования ткани в селезенке смертельно облученного животного, появилась возможность судить о количестве сохранившихся при консервировании стволовых клеток. В костномозговой взвеси, обработанной защитной средой, содержащей ПВП и подвергавшейся поэтапному замораживанию, сохраняется до 64% стволовых клеток [7].

С целью изучения иммунологических свойств консервированного костного мозга здоровым кроликам вводили консервированный костный мозг. Для изучения иммунологических сдвигов использовали методы «микропреципитации» Уанье и лейкоагглютинации по Доссе. Трансплантация консервированного костного мозга вызывала образование антител в организме реципиента, что свидетельствует о сохранении антигенной способности [5].

Таким образом, наши исследования показали, что содержащая ПВП защитная среда не оказывает разрушающего действия на клетки костного мозга. Эта среда сохраняет защитные свойства и в процессе замораживания и длительного хранения в жидком азоте. С целью выяснения возможности длительного хранения консервированного кост-

Матеріал, захищений авторським правом

ного мозга с помощью ПВП при разных температурных режимах (—79°, —196°) сопоставляли процент сохранности жизнеспособности клеток консервированного костного мозга при том и другом режиме. При хранении в твердой углекислоте на протяжении 18—21 месяца было 86±3,8% жизнеспособных клеток; при хранении на протяжении таких же сроков в жидком азоте получены более стабильные результаты сохранения жизнеспособных клеток (через 30 дней 90±2,7%, через 18—21 месяц 90±2,4%).

Комплексные исследования клеток костного мозга, консервированного с помощью ПВП глубоким замораживанием и хранившегося при температуре —196°, в динамике через 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8 лет показали, что в процессе длительного хранения жизнеспособность клеток существенно не снижается. При хранении клеток консервированного костного мозга в жидком азоте в течение 8 лет количество жизнеспособных клеток составляет 84% и существенно не отличается от количества неразрушенных клеток, хранившихся в течение 1 года при температуре —196° ($P>0,05$) [6, 8].

ЛИТЕРАТУРА

1. Карабанова Л. А. — В кн.: 43-й пленум уч. совета ЦОЛИПК, 11. М., 1967, 274.
2. Коваленко П. П., Рахматуллаев А. Р. — Вестник хирургии, 1971, **106**, 2, 114.
3. Лаврик С. С. Раствор для консервирования костного мозга. Авторское свидетельство 174768 от 7 IX, 1965 г. — Бюл. изобретений и товарных знаков Госкомитета по делам изобретений и открытий, 1965, 18.
4. Лаврик С. С., Афанасьева Е. Ю., Глухенькая Г. Т., Яценко В. П., Карабанова Л. Л. — В кн.: Трансплантация органов и тканей. М., 1966, 498.
5. Лаврик С. С., Муравьева Л. П. — В кн.: Трансплантация органов и тканей. М., 1966, 330.
6. Лаврик С. С. — В кн.: XII Междунар. конгр. по переливанию крови. М., 1969, 52.
7. Лаврик С. С., Братусь Г. Г. — В кн.: Материалы Всесоюз. симпоз. по вопросам консервирования, культивирования и типирования костного мозга. М., 1971, 48.
8. Lawrik S. S., Afanasyeva E. Y., Karabanova L. L., Glukhenkaya G., Bratus G. G. — Inter. Soc. Blood Transfusion XIII Inter. Congress. Washington, 1972, 38.
9. Ладуба Т. Л., Афанасьева Е. Ю., Карабанова Л. Л. — В кн.: Гематология и переливание крови. К., 1969, 151.

Киевский НИИ гематологии
и переливания крови МЗ УССР

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

ПЛАСТМАССОВЫЕ КОНТЕЙНЕРЫ ДЛЯ ЗАМОРАЖИВАНИЯ И ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ КОСТНОГО МОЗГА

Н. С. Пушкарь, Э. П. Обозный

Одним из основных требований к контейнерам для замораживания и долгосрочного хранения костного мозга является обеспечение стерильности в условиях, когда контейнер соприкасается с хладо- и теплоносящими средами и градиент температур достигает высоких величин. Материал для изготовления контейнеров одноразового пользования должен быть биологически инертным, коррозионно стойким, иметь большую теплопроводность, легко стерилизоваться, маркироваться и быть прозрачным.

Конструкция контейнера должна обеспечивать равномерное охлаждение всего объема биологического объекта, герметичность, удобство хранения (минимальная площадь).

Применяемые в настоящее время в СССР алюминиевые контейнеры с гофрированными стенками [1] не полностью отвечают указанным требованиям. Они многоразового пользования, материал, из кото-

Матеріал, захищений авторським правом

рого они сделаны, биологически инертен, но эти контейнеры мало экономичны и непрозрачны. Указанными недостатками не обладают контейнеры из полимерных материалов. Из выпускаемых нашей промышленностью полимеров только свойства полиэтилена и фторопластов близки к требуемым. Более перспективным из них для низкотемпературной консервации костного мозга и крови в настоящее время является полиэтилен, благодаря налаженному многотоннажному производству. Низкие тепло- и морозостойкость полиэтилена можно повысить радиационно-химической обработкой готового изделия.

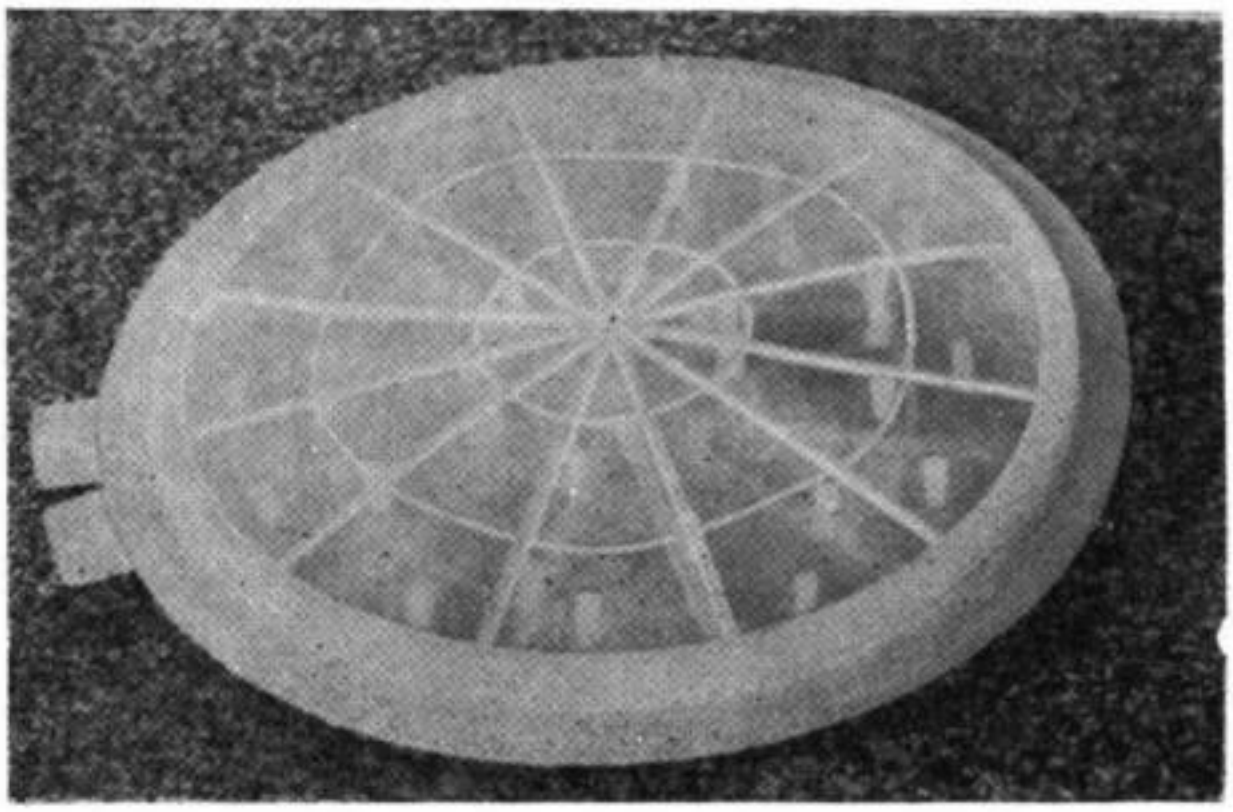


Рис. 1. Круглый полиэтиленовый контейнер для замораживания до —196° и длительного хранения костного мозга.

В качестве материала для изготовления тары был выбран нестабилизированный полиэтилен высокого давления марок П-202Т и П-2035П (МРТУ-05-889-65), допущенных приказом МЗ СССР № 761 от 24 декабря 1969 г. для применения в медицинской практике. Специально проведенные исследования показали, что для изготовления тары целесообразно применять полиэтилен высокого давления с показателем текучести расплава не более 3,0 за 10 *мин.*

Разработанный в институте совместно с СПКБ «Укрпластик» контейнер из полиэтилена высокого давления представляет собой тонкостенную емкость на 200 *мл* округлой формы с утолщением в виде борта и двумя резьбовыми штуцерами диаметром 10 *мм,* высотой 10 *мм,* толщиной стенки 0,4—0,6 *мм,* толщиной борта 6 *мм* (рис. 1).

Поскольку для консервации костного мозга сверхбыстрое замораживание не требуется, указанная толщина стенки позволяет добиться применения оптимальной программы замораживания.

Для обеспечения тщательной герметизации контейнеров проводилось испытание заглушек из разных материалов (полиэтилен, фторопласт, стекло и др.). Лучшие результаты получены при использовании стеклянных заглушек, их помещали в штуцеры и фиксировали полиэтиленовыми накидными гайками, навинчивая их на штуцеры до отказа.

Радиационно-химическое модифицирование контейнеров осуществляли с помощью гамма-лучей в среде инертного газа. Гашения образующихся свободных радикалов достигали термической обработкой, об эффективности которой судили по отсутствию окисления полимера, исходя из постоянства интенсивности полосы поглощения в инфракрасных спектрах, соответствующей карбонильным группам. Затем контейнеры помещали в мешки из полиэтиленовой пленки, герметично заваривали и в таком виде подвергали стерилизации с помощью гамма-лучей. Стерильность тары подтверждалась бактериологическим исследованием

Матеріал, захищений авторським правом

смывов. В указанной таре контейнеры могут храниться продолжительное время, не требуя дополнительной стерилизации перед употреблением. Специальными исследованиями показана биологическая инертность модифицированного материала [21].

Проведенные клинические испытания по замораживанию и длительному хранению миелоидной ткани при —196° (более 500 случаев) показали, что жизнеспособность клеток костного мозга при консервировании по двухэтапной программе в полиэтиленовых контейнерах составляет в среднем 80%. Размораживание костного мозга проводилось в водяной бане при температуре 42±1° в течение 4 *мин.*

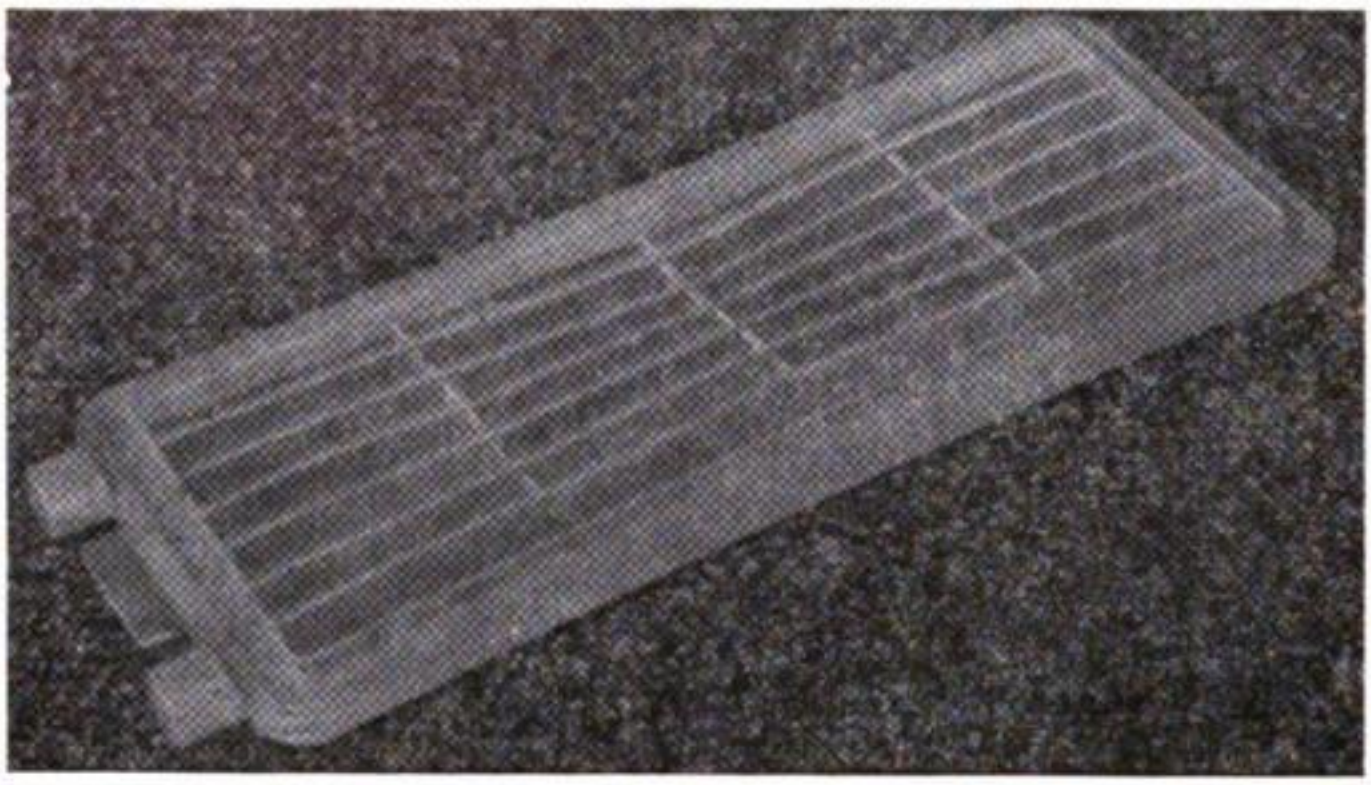


Рис. 2. Прямоугольный контейнер из полиэтилена высокого давления для замораживания и длительного хранения крови и костного мозга.

Накопленный опыт по трансплантации костного мозга, взятого из полиэтиленовых контейнеров, показал, что методика очень проста и вполне применима в любых условиях. Для миелотрансфузии достаточно, обработав колпачок одного из штуцеров спиртом, отсоединить его от штуцера и извлечь стеклянную заглушку, подсоединить в систему с капроновым фильтром. После этого проводят трансфузию.

С целью унификации тары и приспособления ее к выпущенному оборудованию для низкотемпературной консервации разработан полиэтиленовый контейнер прямоугольной формы (рис. 2).

С целью обеспечения равномерного охлаждения массы жидкости, находящейся в контейнере, принята прямоугольная форма размером 100×240 *мм* и максимальной толщиной 10 *мм*. Для уменьшения термического сопротивления стенок контейнера последние делаются минимальной (с точки зрения технологии изготовления) толщины — 0,4 *мм*.

Прямоугольный контейнер изготавливается из двух одинаковых полуформ, получаемых методом литья под давлением на литьевой машине ТП-125, с последующей сваркой и вторичной обливкой корпуса детали тем же материалом, что обеспечивает высокую прочность шва, надежность и быстроту сварки. Радиационно-химическое модифицирование и стерилизация осуществляются как и в случае изготовления круглых контейнеров.

Следует отметить, что разработка полиэтиленовых контейнеров для низкотемпературного замораживания и длительного хранения костного мозга выполнялась в соответствии с существующими медико-биологическими требованиями и полностью отвечает последним. Результаты экспериментальных и клинических испытаний позволяют рекомендовать полиэтиленовые контейнеры для широкого внедрения в медицинскую практику.

Матеріал, захищений авторським правом

ЛИТЕРАТУРА

1. Федотенков А. Г. — Гематология и переливание крови, 1969, 2, 3.
2. Цуцаева А. А. Вопросы консервации и трансплантации костного мозга и крови. Харьков, 1972, 199—201.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРЯМОУГОЛЬНОЙ ЖИДКОАЗОТНОЙ КАМЕРЫ ДЛЯ ХРАНЕНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ В ПАРАХ АЗОТА

А. Е. Киселев, Я. А. Рудаев, Л. И. Федорова, Л. П. Полякова, Г. И. Демкин

Наиболее распространенным и доступным в настоящее время криоагентом, позволяющим длительно, годами хранить биологические системы в условиях глубокого холода (—196°), является жидкий азот.

Однако в связи с дефицитностью этого криоагента возникла необходимость в применении для хранения биологических продуктов холода, нарабатываемого турбохолодильными машинами (ТХМ), питающимися обычно от электросети. Другой путь, ограничивающий потребность больших количеств жидкого азота, — хранение биологических систем (эритроцитов) в его парах. Если первый путь — применение ТХМ для создания холода в суховоздушной камере — за рубежом не получил развития, то применение паров жидкого азота для хранения эритроцитов изучается, но эти исследования еще не вышли из состояния эксперимента.

Учитывая перечисленные преимущества хранения эритроцитов как в условиях холодного воздуха, так и в парах жидкого азота, мы поставили задачу создать соответствующую холодильную установку. Проект разработан совместно с конструкторским бюро, создавшим турбохолодильную машину.

Установка состоит из четырех камер, в которые поступает холодный воздух, нарабатываемый ТХМ. В случае ремонта турбины камеры можно заполнять небольшим количеством жидкого азота для хранения эритроцитов в его парах. ТХМ может охладить в диапазоне температур от —155 до —175° 20 камер одновременно.

Выход машины на расчетный режим происходит через 25—30 *мин*. При достижении заданной температуры в камерах машина автоматически останавливается, по мере повышения температуры до контрольного уровня турбина вновь включается и в камеру поступает холодный воздух.

Исследования температурных режимов в камере показали, что кривая средней температуры находится на уровне —172°, колебания составляют ±°. Температурные поля с большим градиентом не возникают.

При отработке режимов работы установки ТХМ в качестве образца изготавливаемых камер использована прямоугольная камера $LR = 1000$. Ее заполняли контейнерами с кровью, которые устанавливали в два этажа над жидким азотом; толщина слоя жидкого азота составляла 15—20 *см*. Подливание жидкого азота в камеру осуществлялось автоматически с помощью электронного устройства. Специальное устройство позволяло присоединять камеры к ТХМ и эксплуатировать их без заполнения жидким азотом. Такая возможность камер работать

Матеріал, захищений авторським правом

с заполнением их охлажденным воздухом или частичным заполнением жидким азотом позволяет использовать их в зависимости от конкретных условий.

Для изучения температурного режима камеры при неполном заполнении ее жидким азотом (в парах азота) в ней были установлены специальные датчики — медь-константановые термопары отечественного производства. Регистрировали температуру с применением потенциометра ПСР-029, над уровнем жидкого азота, где помещались контейнеры с кровью, и в парах азота.

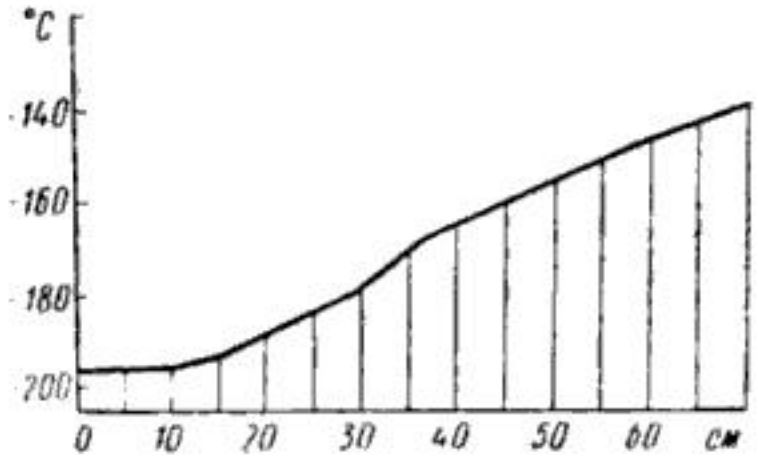


Рис. 1. Распределение температур в холодильной камере. По оси абсцисс — расстояние от днища.

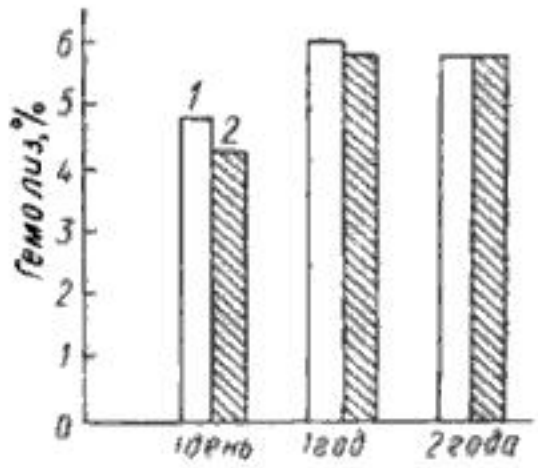


Рис. 2. Степень гемолиза эритроцитов, хранившихся в азоте (*1*) и его парах (*2*).

Распределение температурных полей камеры, заполненной парообразной фазой жидкого азота, показано в виде кривой, которая была получена после измерения температур в шести точках камеры — нижней, средней и верхней, соответственно уровням контейнеров, расположенных на нижнем и втором этажах (рис. 1).

Как следует из табл. 1, температуры, в которых находятся контейнеры с эритроцитами, соответствуют диапазону от —196° до —170° на нижнем этаже, непосредственно над уровнем жидкого азота, и в пределах от —138° до —165° — на верхнем этаже (только пары азота). Таким образом, парообразная фаза жидкого азота, заключенная в прямоугольном рефрижераторе, имеет диапазон температур от —196° до —138°. Изучение температурных режимов в камере при заполнении ее охлажденным ТХМ воздухом показало, что кривая средней температуры находится на уровне —172°±3°. При заполчении камеры частично жидким азотом и парами жидкого азота температурный режим колебался в пределах от —196° до —138°.

Таблица 1

Распределение температурных полей в камере с парообразным азотом

Уровень расположения контейнеров	Точки измерения температуры, °С		
	нижняя	средняя	верхняя
I этаж	—196	—180	—170
II этаж	—165	—155	—138

Таблица 2

Степень гемолиза оттаянных эритроцитов, хранившихся разный срок в парах азота и в жидком азоте

До замораживания, сразу после соединения с раствором	Фаза азота	Срок хранения в замороженном состоянии		
		1 день	1 год	2 года
0,5	Пары азота	4,7	4,5	4,9
0,5	Жидкий азот	4,5	4,9	4,9

Основная задача исследования состояла в изучении возможности хранения замороженных эритроцитов в парах азота при температурах выше —196° (получаемой в камерах ТХМ при нагнетании в них холодного водуха). Было заморожено 292 дозы донорской эритроцитной взвеси (раствор № 114) в количестве 250 *мл* в алюминиевых волнистых контейнерах по методу, описанному в методическом письме «Методы

Матеріал, захищений авторським правом

долгосрочного хранения в замороженном состоянии эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов, предназначенных для трансфузий» (ЦОЛИПК, МЗ СССР, 1969 г.). Часть проб хранили в жидком азоте, другую — в его парах. Изучали дозы крови, взятые от одного донора, пробы для исследования брали после хранения в течение 1 дня, 12 и 24 месяцев. Определяли степень гемолиза эритроцитов в процессе хранения, морфологическую сохранность.

Размораживание проб и отмывание эритроцитов от криофилактика осуществлялось по методу, изложенному в указанном выше методическом письме.

В табл. 2 представлены показатели степени гемолиза эритроцитов по срокам хранения при двух температурных режимах.

Как видно из таблицы, показатели гемолиза в оттаявшей и отмытой взвеси эритроцитов с течением времени почти не увеличиваются. Через 2 года степень гемолиза в образцах, сохраняемых в двух фазах азота, одинакова (рис. 2).

Изучение морфологической сохранности этих эритроцитов показало, что эритроциты остаются морфологически полноценными.

Полученные данные свидетельствуют о том, что длительное хранение замороженных эритроцитов в парах жидкого азота не оказывает повреждающего действия на клетки. Можно сделать вывод, что рекристаллизация замороженной в жидком азоте крови при помещении ее в пары азота не наступает.

Центральный ордена Ленина институт
гематологии и переливания крови

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

СТОМАТОЛОГИЧЕСКИЙ КРИОЗОНД

В. А. Никитин, Е. М. Медведев, Б. Н. Муринец-Маркевич, М. Е. Носов, К. В. Григорьева

Проблема лечения зубов с воспаленной пульпой остается все еще актуальной. Предложено большое количество разных методов и средств, эффективность которых недостаточно высока. В последние годы в связи с достижениями техники низких температур и внедрением в клиническую практику криогенной аппаратуры широко применяются бескровные и безболезненные методы удаления патологически измененных органов и тканей путем их криодеструкции.

Каких-либо сообщений о применении низких температур при лечении зубов с воспаленной пульпой в литературе мы не встретили. В 1971 г. мы впервые опубликовали результаты экспериментальных исследований по выяснению скорости и степени охлаждения различных тканей зубов, периодонта, надкостницы при криовоздействии на пульпу с помощью криозонда собственной конструкции.

Пользование криозондом обеспечивает мгновенную подачу и прекращение подачи парожидкостной струи хладоагента и свободный доступ к операционному полю (рис. 1). Манипуляции криозондом осуществляются одной рукой. Для получения капиллярной струи хладоагента применяются медицинские иглы типа «Рекорд». В зависимости от установленной иглы изменяется диаметр струи и расход хладоагента.

Предварительные экспериментальные исследования и клинические наблюдения позволили выработать методику криотерапии необратимых форм воспаления пульпы, которая заключается в следующем. После установления диагноза заболевания препарируется кариозная полость

Матеріал, захищений авторським правом

(удаляются нависающие края эмали, производится некротомия) и возможно шире вскрывается полость зуба. В зависимости от объема полости зуба применяются иглы с диаметром отверстия 0,2—0,3 *мм*. Затем конец иглы устанавливается на 1—2 *мм* от перфорационного отверстия и парожидкостная струя азота направляется непосредственно на вскрытую пульпу и на оставшуюся часть дна кариозной полости. Криовоздействие продолжается 3—6 *сек* в зависимости от объема полости зуба. За это время пульпа превращается в серовато-розовую стекловидную массу, покрытую снаружи слоем инея. С прекращением подачи хладоагента необходимо тотчас же раскрыть полость зуба и ампутировать коронковую пульпу (рис. 2).

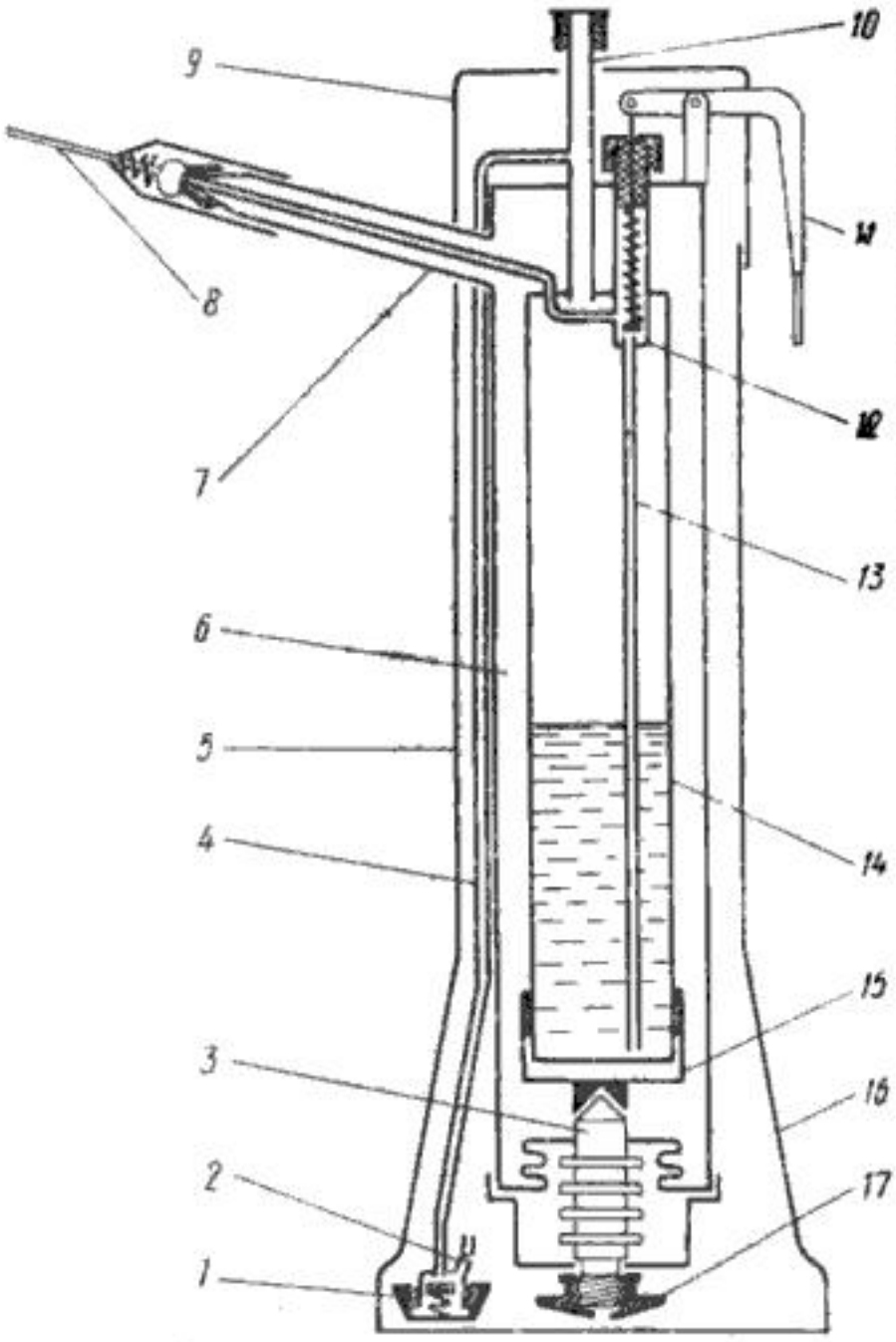


Рис. 1. Криозонд:

1 — регулировочный клапан, *2* — сигнализатор, *3* — тепловой ключ, *4* — капилляр, *5* — обечайки, *6* — вакуумная изоляция, *7* — наконечник, *8* — игла, *9* — крышка, *10* — горловина, *11* — рычаг, *12* — клапан подачи азота, *13* — трубка подачи азота, *14* — азотная емкость, *15* — стакан, *16* — основание, *17* — рукоятка.

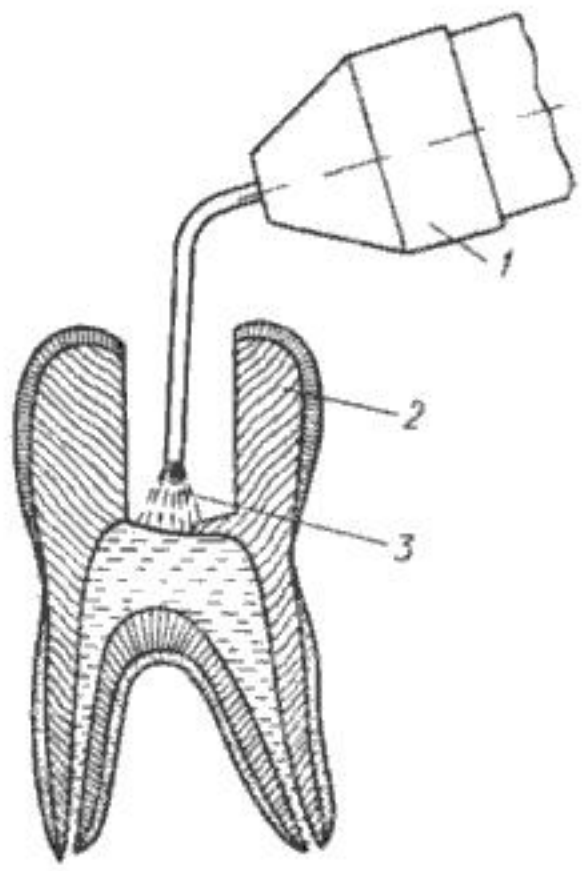


Рис. 2. Схема криовоздействия на пульпу зуба:

1 — криозонд, *2* — зуб, *3* — хладоагент.

Если лечение производится ампутационным методом, то после гемостаза на устье каналов наносится паста из антимикробных, противовоспалительных и стимулирующих веществ и зуб закрывается контрольной пломбой. Через 6—10 дней контрольную пломбу заменяют на постоянную.

При экстирпационном лечении после удаления коронковой пульпы производится повторное криовоздействие на устье корневых каналов в течение 2—3 *сек* и корневая пульпа удаляется пульпэкстрактором. В то же или следующее посещение больного после гемостаза и высушивания корневой канал пломбируется обычными материалами. Лечение пульпитов проводится обычно в одно-два посещения больного. Все вмешательства, связанные с ампутацией или экстирпацией, возможны лишь в период глубокого охлаждения пульпы, продолжающейся 1—1,5 *мин* после прекращения подачи хладоагента.

Учитывая, что разработанный метод лечения является принципиально новым, он должен применяться строго по показаниям и с соблюдением правил пользования низкими температурами.

По описанной методике проведено лечение 105 больных с необратимыми формами воспаления пульпы. Ближайшие и отдаленные резуль-

Матеріал, захищений авторським правом

таты лечения этих больных показали, что с помощью криозонда можно производить локальную криодеструкцию пульпы, не допуская отрицательного влияния низкой температуры на эмаль зуба и ткани периодонта.

Предлагаемый прибор и метод лечения могут в большинстве случаев заменить девитализацию и анестезию воспаленной пульпы.

Физико-технический институт низких температур АН УССР,
Украинский институт усовершенствования врачей МЗ СССР,
Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

ЛИОФИЛИЗАЦИОННАЯ ПРИСТАВКА К УНИВЕРСАЛЬНОМУ ВАКУУМНОМУ ПОСТУ ВУП-2К

Б. А. Скорняков

В практике препарирования биологических объектов для электронно-микроскопических исследований известное значение имеет метод лиофильной сушки. В ряде случаев он позволяет получать дополнительную информацию. На наш взгляд, метод лиофильной фиксации может быть достаточно перспективным и в криобиологических исследованиях.

Развитие этого метода в значительной мере тормозится отсутствием специальной аппаратуры. В связи с этим мы разработали лиофилизационную приставку к вакуумному универсальному посту, который имеется почти в каждой электронно-микроскопической лаборатории. Ниже приводим основные конструктивные характеристики приставки. Используя предложенный принцип, можно изготовить устройство с желаемыми рабочими характеристиками.

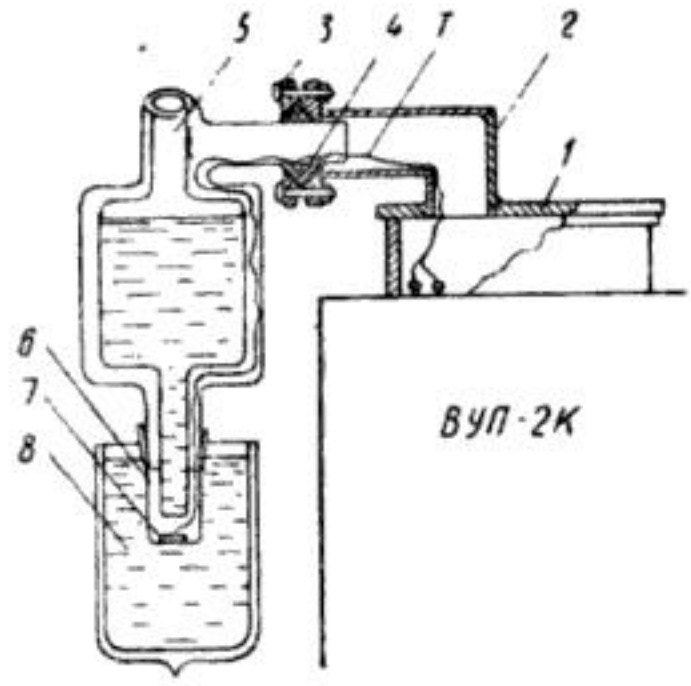


Рис. 1. Конструктивная схема лиофилизационной приставки.
Объяснения в тексте.

Конструктивная схема приставки изображена на рисунке.

Приставка включает следующие основные элементы: вакуумно-контактный фланец (*1*) с вакуумпроводом (*2*), переходной фланец (*3*), изготовленный из нержавеющей стали с использованием аргонно-дуговой сварки, и резиновым уплотнением (*4*); стеклянный сублиматор (*5*), соединенный с помощью шлица со сменным стаканчиком (*6*) для образцов (*7*), криостат (*8*). Переходной фланец с резиновым уплотнением позволяет подключать различные по конструкции сублиматоры, а также предварительные азотные ловушки. В рабочем объеме сублиматора давление порядка $5 \cdot 10^{-5}$ *мм* рт. ст., устройство приставки позволяет осуществлять контроль температуры образца или парогазовой смеси в сублиматоре с помощью термопары (*T*), подключенной к соответствующим клеммам вакуумного поста.

С помощью лиофилизационной приставки можно проводить предварительное замораживание объекта в вакууме или при определенной температуре, которая зависит от выбранного хладоагента криостата. Криостат поддерживает требуемую температуру объекта в процессе сушки.

Матеріал, захищений авторським правом

Описанная конструкция дает возможность без нарушения работоспособности поста сушить образцы объемом 5—7 *мл*. При высушивании больших объемов установку следует укомплектовать дополнительной ловушкой и форнасосом с газобалластным устройством.

Методика эксплуатации приставки следующая. Образец помещают в сменный стаканчик, который насаживают на сублиматор. Производится предварительная откачка (вакуумная коммутация обеспечивается устройством поста), затем, по достижении форвакуума, система переключается на высокий вакуум. Для сублимации необходима поверхность конденсации с температурой значительно меньшей, чем температура образца. Роль конденсатора выполняет поверхность внутренней емкости сублиматора. Температура конденсатора выбирается в соответствии с требованиями режима сушки. Во внешний объем сублиматора заливают спирт или иной хладоагент. В случае, когда режим сушки не имеет принципиального значения, в емкость сублиматора заливают жидкий азот, при этом температура конденсатора близка к 77° К. Степень высушенности образца контролируется по графику его температуры. Температура образца при необходимости может записываться на ленте самописца.

Приставка удовлетворяет высоким требованиям, предъявляемым к управлению и контролю сушки биологических объектов.

НИИ животноводства Лесостепи
и Полесья УССР

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ ЗАМОРАЖИВАНИЯ КОСТНОГО МОЗГА ТРУПОВ НА НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЙ УСТАНОВКЕ

П. М. Медведев, Т. И. Фисанович, Г. Т. Недельский

Определение эффективных условий криоконсервации костного мозга и ядросодержащих элементов крови невозможно без соответствующих аппаратов, обеспечивающих большой спектр скоростей охлаждения биообъектов на разных этапах цикла, высокую повторяемость режима охлаждения, равномерность замораживания всей массы биопродукта.

В соответствии с этим Всесоюзным научно-исследовательским институтом химического машиностроения и Ленинградским ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательским институтом гематологии и переливания крови разработана и изготовлена экспериментальная модель низкотемпературной установки (рис. 1). Установка имеет сосуд жидкого азота, морозильную камеру, испаритель, нагнетатель-пылесос типа «Вихрь», потенциометр ЭПП-09, средства управления и контроля и системы коммуникаций, трубо- и электропровода, смонтированные в общем корпусе.

Технико-эксплуатационные данные аппарата: ширина — 600 *мм*, длина — 1500 *мм*, высота — 1200 *мм*, вес — 160 *кг*, рабочий объем морозильной камеры — 8 ячеек размером 25×135×300 *мм* каждая, максимальный объем замораживаемого за один цикл биопродукта — 8 контейнеров по 200 $см^3$ каждый, всего 1,6 *л*. Максимальный объем расходуемого за один цикл жидкого азота составляет 15 *л*. Поверхность теплообмена испарителя — 0,34 $м^2$, емкость сосуда жидкого азота — 20 *л*. Регулирование темпа замораживания ручное, скорость замораживания можно изменять в диапазоне от 0,25 до 30° в 1 *мин*, предельная температура замораживания составляет 180°. Настоящая

Матеріал, захищений авторським правом

установка проста в конструктивном отношении, дешева в изготовлении и экономична в эксплуатации [1].

Для выяснения возможности применения установки в целях создания больших запасов костного мозга были проведены многочисленные замораживания разных объемов костномозговой суспензии в разнообразных средах. Параллельно проводились опыты по замораживанию

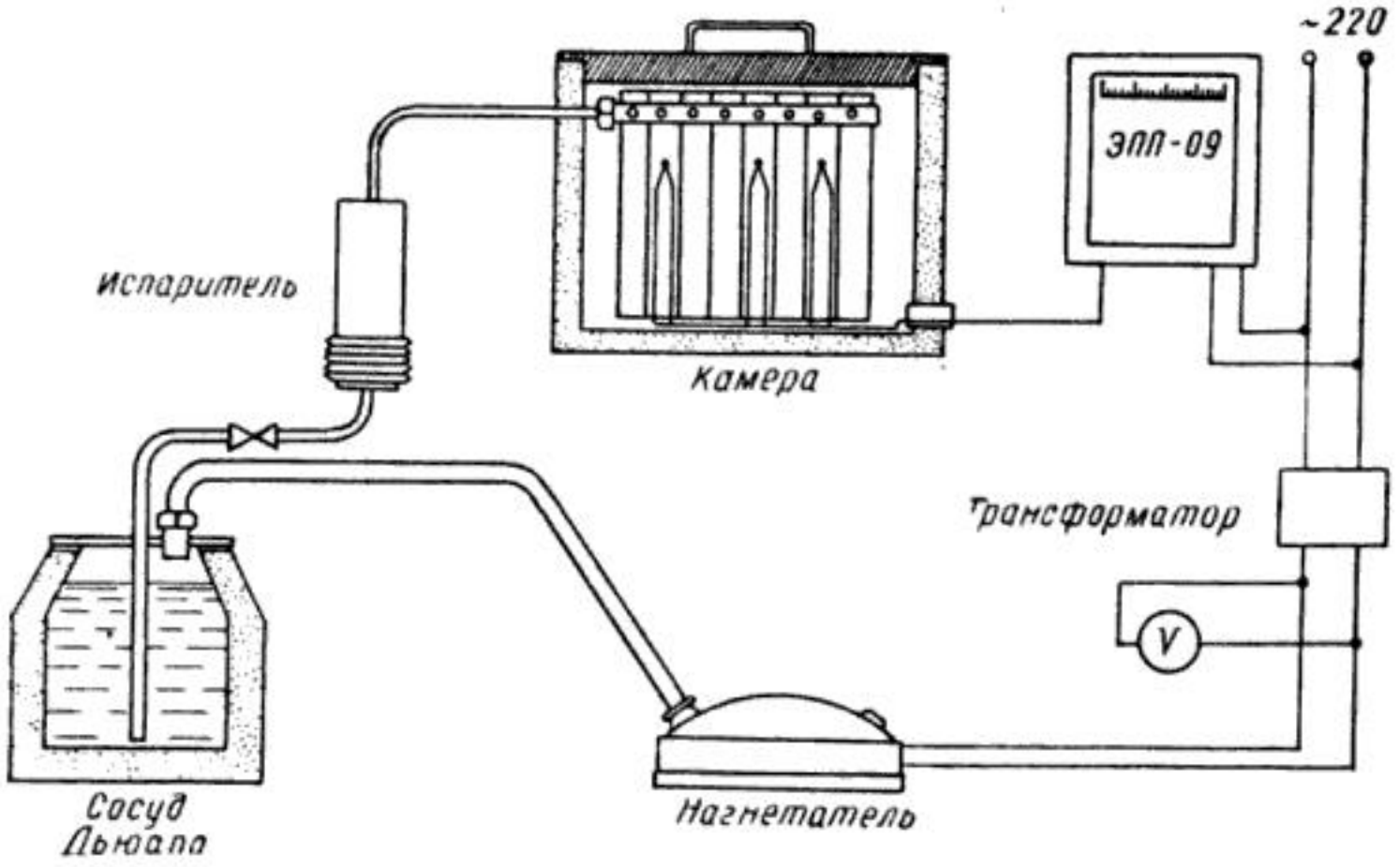


Рис. 1. Принципиальная схема замораживающей установки.

сред без костного мозга. При этом ставилось задачей определить по характеру термограмм, полученных с помощью медь-константановых термопар на ленте электронного потенциометра ЭПП-0,9, степень равномерности охлаждения всей массы биопродукта (рис. 2, *а*) и точность воспроизведения намеченной программы при повторении цикла (рис. 2, *б*).

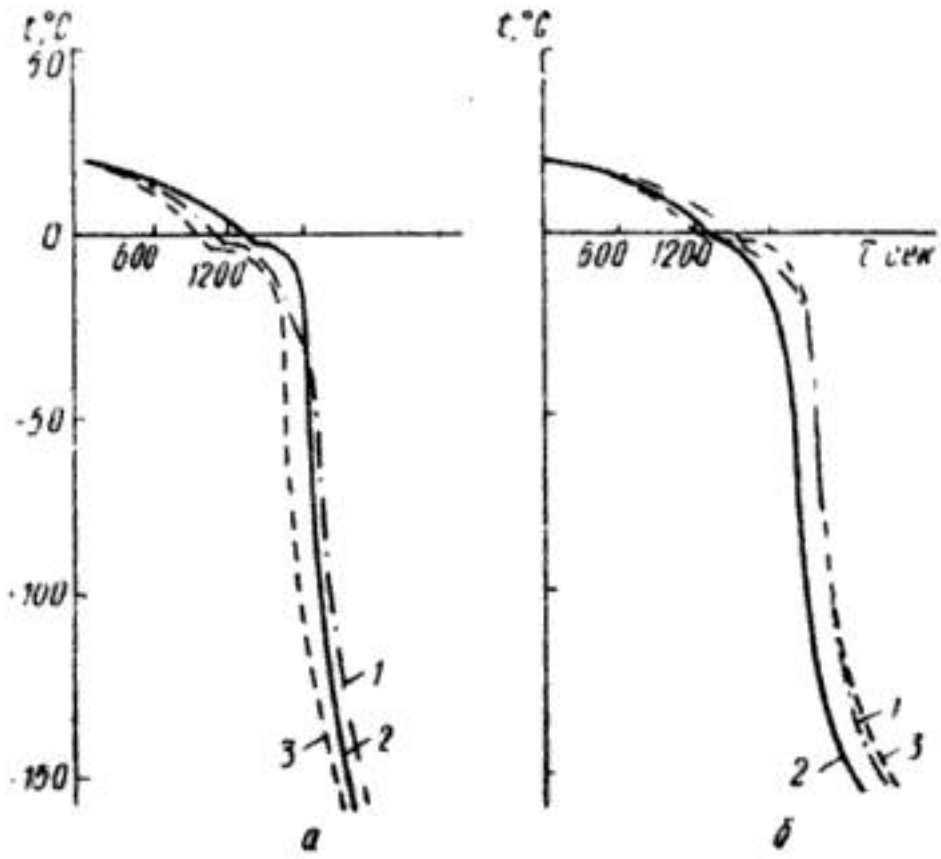


Рис. 2. Термограммы испытаний замораживающей установки. Исследование:

а — равномерность охлаждения массы биопродукта; *б* — воспроизводимость режима охлаждения; *1* — в верхней, *2* — средней, *3* — нижней части контейнера.

На рисунке 2, *а* представлены графики охлаждения в верхней, средней и нижней части плоского дюралюминиевого гофрированного контейнера емкостью 150 *мл* (толщина слоя биопродукта 1 *см*³). Однородность кривых охлаждения свидетельствует о высокой равномерности замораживания всей массы биопродукта. Графики рис. 2, *б* получены при повторных охлаждении и оттаивании одних и тех же контейнеров с постоянным содержимым. Пунктиром отмечен первый цикл, прямой линией обозначен повторный цикл, начатый сразу же после оттаивания биопродукта, использованного в первом цикле, т. е. когда морозильная камера еще не отогрелась в достаточной мере, и прямой с черными точками показан третий цикл, причем отогревание камеры производилось достаточно долго. Сравнение графиков показы-

Матеріал, захищений авторським правом

вает, что повторное охлаждение в недостаточно отогретой морозильной камере, как бы «аккумулирующей» холод, приводит к ускорению процесса замораживания биопродукта и может изменить программу нежелательным образом. Следовательно, для ускорения подготовки к повторному охлаждению нужно снабдить морозильную камеру электроподогревателем.

Учитывая эксплуатационные особенности замораживающей установки, мы провели с ее помощью замораживание ряда высокоэффективных и малоэффективных криоконсервантов, а также суспензий костного мозга в этих же растворах. Режим охлаждения был одинаков: до —13°

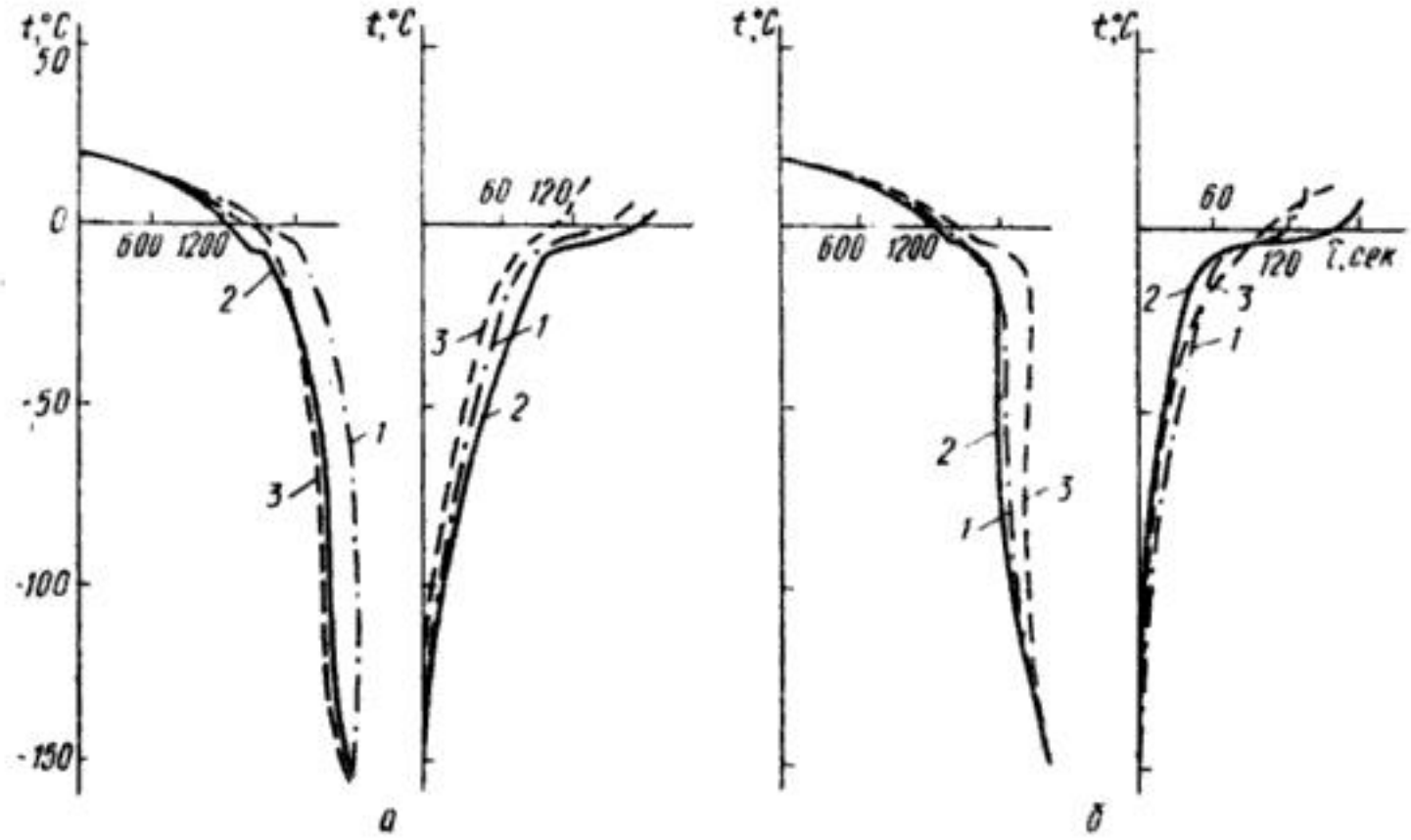


Рис. 3. Термограммы суспензий костного мозга (*а*) и хладозащитных сред (*б*) растворов сополимера ВП-КК:
1 — КК 7,3 *вес.%*, *2* — КК 14,4 *вес.%*, *3* — КК 21,7 *вес.%*.

со скоростью 1° в *мин* и далее до —180° со скоростью 10° в *мин*. Оттаивание проб осуществлялось в водяной бане при температуре воды +42°. Контейнерами служили герметически закрывающиеся полиэтиленовые сосуды емкостью 10 *см*³. Объем пробы составлял 2 *см*³. Измерялась температура на поверхности контейнера и в центре образца.

Термограммы охлаждения и оттаивания представлены в виде графической функции, где *t* — температура вещества в °С, время — в *сек*. Графики температурных кривых охлаждения суспензий костного мозга в хладозащитных растворах, содержащих в качестве основного криопротектора сополимеры винилпирролидона с кротоновой кислотой (ВП-КК), приведены на рис. 3. Состав хладозащитных растворов в этих сериях опытов следующий: 0,85% сополимера ВП-КК (КК соответственно 7,3; 14,4 или 21,7 вес.%), 0,85% мочевины, 1% альбумина, 5% сорбитола, 5% поливинилпирролидона (ПВП-17400) на глюкозо-сахарозном растворе с ЭДТУ Na_2. На рис. 3, *а* представлены термограммы суспензий клеток костного мозга. В этих 6 сериях опытов сравнивали эффективный криопротектор ВП-КК (КК 7,3 вес.%) с неэффективными (КК 14,4 и 21,7 вес.%) [2].

Сравнение графиков *а*, *б* на рис. 3 показывает, что введение клеток костного мозга в систему вызывает: 1) смещение кривых охлаждения и оттаивания в область более высоких температур; 2) некоторое увеличение продолжительности процессов, главным образом процессов оттаивания (в среднем в 1,5 раза); 3) увеличение продолжительности плато изометрического уровня кристаллизации воды (на 1 *мин* для сополимера с содержанием КК 7,3 *вес.%*, на 2 *мин* — сополимера, где КК 14,4 *вес.%* и на 3,5 *мин*, где КК 21,7 *вес.%*); 4) при введении клеток изменения

Матеріал, захищений авторським правом

термограмм более выражены в присутствии малоэффективных криопротекторов, где КК 14,4 и 21,7 *вес.*%.

Из графиков рис. 3, *б* видно, что зоны кристаллообразования при замерзании хладозащитных сред без костного мозга не имеют выраженного участка отогревания. Отсюда следует, что в присутствии 0,85% сополимера ВП-КК и 5% ПВП в среде устанавливаются устойчивые водородные связи и формируются обширные клатраты. Введение в среду клеток костного мозга ослабляет эти связи, приводя к появлению

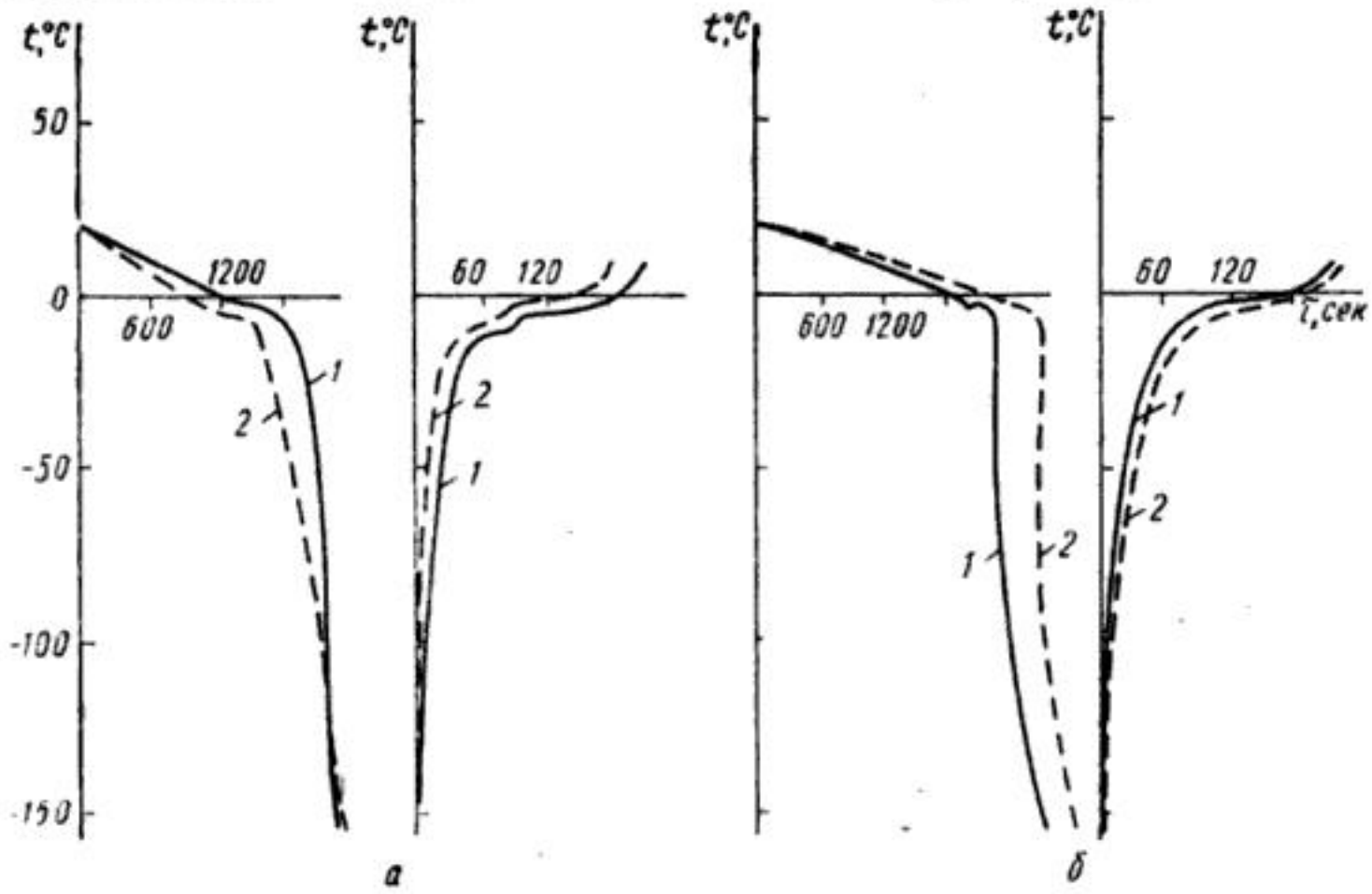


Рис. 4. Термограммы суспензий костного мозга (*а*) и хладозащитных сред (*б*):
1 — раствор с 1,25% желатины; *2* — 4% декальцинированного желатиноля.

нежелательного участка отогревания и связанной с ним рекристаллизации, при этом процессы охлаждения и оттаивания удлиняются. В связи с низкой температуропроводностью стенок полиэтиленовых контейнеров и растворов сополимеров процессы кристаллизации среды протекают при положительных температурах в центральной зоне. Температура на внешней стенке контейнера в это время составляет —16°.

Анализ кривых на рис. 3, *а, б* убеждает в том, что в присутствии костного мозга при наиболее эффективной концентрации градиентов в хладозащитной среде не происходит полной стабилизации структур воды. Это согласуется с данными Коллисона [6], исследовавшего растворы крахмала, и Меримэна [7], изучавшего растворы глицерина. Струк-турообразование в тех же средах без костного мозга находится на высоком уровне. Следовательно, достижение таких концентраций хладозащитных веществ, когда раствор их находится на пороге максимально достижимого в присутствии данных криопроекторов структурирования воды, а введение в раствор защищаемых клеток вызывает возможно меньшие разрушения их, является одним из признаков эффективности хладозащитного раствора.

Аналогичные закономерности можно установить, исследуя термограммы охлаждения и оттаивания растворов 1,25%-ной желатины или 40%-ного декальцинированного желатиноля в глюкозо-сахарозном растворе с ЭДТУ Na_2. Эти растворы обладают высокими хладозащитными свойствами [5]. Характерной особенностью является усиление процессов структурообразования при введении клеток костного мозга (рис. 4, *а, б*). При этом наблюдается укорочение плато, слабо выраженного на термограмме растворов, и сокращение продолжительности процессов оттаивания. На кривой оттаивания явственно определяется двухступенча-

Матеріал, захищений авторським правом

тость изотермического уровня — следствие разобщения глюкозо-сахарозного раствора с ЭДТУ Na_2 и желатинового (желатинольного) геля. Не исключено, что в это время происходят явления криолиза и последующего сгусткообразования, в постконсервационном периоде препятствующие трансфузии этих суспензий.

По изменению расположения кривых желатинового и желатинольного растворов можно полагать, что введение клеток костного мозга оказывает на раствор желатиноля более выраженное структурирующее действие. В целом же выводы о возможности усиления структурных явлений в суспензиях при введении в них клеток совпадают с наблюдениями Тринчера [3, 4]. Таким образом, анализ кривых охлаждения и оттаивания высокоэффективных и малоэффективных суспензионных сред и суспензии в них костного мозга показывает, что существует взаимосвязь между процессами структурирования в системе и особенностями изменения ее температуропроводности. Введение клеток костного мозга может ослаблять и усиливать структурность системы. Для высокоэффективных хладозащитных сред характерно колебание степени структурированности при некотором оптимуме, когда введение клеток влияет на структурные образования очень мало или практически не влияет совсем. В этом, по-видимому, заключен один из важнейших моментов определения оптимума концентрации криопротектора в хладозащитной среде.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беляков А. Д., Логинов Н. И., Бабенко Н. И., Медведев П. М. Краткие тез. докл. науч. сессии по вопросам трансфузиологии 22—23 мая 1973 г. ЛИГПК, Л., 1973, 78.
2. Медведев П. М., Фисанович Т. И., Кропачев А. А., Трухманова Л. Б., Алферова Л. В. — Пробл. гематол., 1972, 3, 34.
3. Тринчер К. С. — Успехи соврем. биол., 1966, **61**, 3, 338.
4. Тринчер К. С. — В кн.: Состояние и роль воды в биологических объектах. М., «Наука», 1967, 143.
5. Фисанович Т. И. Изучение процессов криоконсервации и хирургических аспектов получения посмертного костного мозга. Автореф. канд. дис. Л., 1972.
6. Collison R. — Nature (London), 1960, **188**, 4756, 1105.
7. Merryman H. T. — Cryobiology, 1971, **7**, 4—6, 252.

Ленинградский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови

Поступила в редколлегию в сентябре 1973 г.

ИЗМЕНЕНИЕ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА ПОДОПЫТНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ КРИОВОЗДЕЙСТВИИ

К. В. Григорьева, Е. А. Котык

В последние годы в клиническую практику все шире входят бескровные методы удаления патологически измененных органов и тканей путем криодеструкции. О применении низких температур при лечении заболеваний органов полости рта в литературе имеются лишь единичные сообщения.

Целью нашей работы явилось изучение реактивных и дегенеративных изменений слизистой оболочки полости рта подопытных животных в разные сроки после криовоздействия на нее криозондом конструкции В. А. Никитина и др.

Под эфирно-хлороформным наркозом у собак в слизистой оболочке полости рта укрепляли медь-константановые термопары (в эпителиальном слое, собственно слизистой и подслизистой), которые располагали в одной плоскости и соединяли с самопишущими приборами марки Н-373-1. Скорость и степень понижения температуры разных слоев

Матеріал, захищений авторським правом

в слизистой оболочке при криовоздействии на нее регистрировали графически. Макроскопические и микроскопические изменения определяли непосредственно после криовоздействия, через 1, 3, 5 и 10 суток. Реактивные и дегенеративные изменения в слизистой оболочке изучали после биопсии участков обморожения, последующей гистологической обработки их и окраски срезов гематоксилином-эозином и по Ван Гизон.

Низкотемпературной обработке было подвергнуто 240 участков слизистой оболочки полости рта у 12 собак.

При исследовании срезов, взятых непосредственно после криовоздействия при экспозиции 10—20 *сек*, микроскопически в эпителиальном слое определяются разной формы и размеров пузырьки, местами сливающиеся между собой. Эпителиальные клетки крупные, светлые, набухшие, многие из них вакуолизированы, сосуды подэпителиального слоя резко расширены, выполнены эритроцитами. Под слоем базальных клеток эпителия обнаруживается воспалительная инфильтрация соединительнотканной основы нейтрофильными лейкоцитами.

При экспозиции 30 *сек* альтеративные изменения более выражены: эпителиальный слой разрыхлен, между клетками — полости, выполненные эритроцитами, эпителиальные клетки истончены, некоторые из них с гиперхромными ядрами. В поверхностных слоях эпителия встречаются очаговые и более диффузные инфильтраты, представленные преимущественно нейтрофильными лейкоцитами. В подлежащих отделах наблюдается очаговая и более диффузная инфильтрация, очаговые кровоизлияния, полнокровие сосудов.

Для изучения процесса регенерации тканей иссекали участки слизистой через 24 *ч*, на 3, 5, 10-е сутки и через 1 месяц.

При экспозиции 10—20 *сек* через 24 *ч* микроскопически обнаруживается язвенный дефект, доходящий до подслизистого слоя, дно язвенного дефекта представлено волокнистой соединительной тканью, диффузно инфильтрированной преимущественно нейтрофильными лейкоцитами, сосуды расширены, просветы их выполнены эритроцитами. В подслизистом слое выражен отек и обширная диффузная воспалительная инфильтрация нейтрофильными лейкоцитами с примесью лимфогистиоцитарных клеточных элементов.

На 3—5-е сутки в дне язвы еще сохраняется некротический слой, однако с краев язвы отмечается нарастание молодого эпителия, представленного в основном светлыми клетками. Подэпителиальный слой остается инфильтрированным.

На 10-е сутки отмечается полная эпителизация язвенного дефекта, в собственном слое соответственно бывшему язвенному дефекту обнаруживается разрастание молодой грануляционной ткани, представленной значительным количеством сосудов капиллярного типа, фибробластами, фиброцитами с примесью лимфоидных клеточных элементов; встречаются очажки мелких кровоизлияний.

Через месяц на месте бывшей язвы слизистой обнаруживается истончение эпителиального пласта, отсутствие воспаления.

Полученные данные свидетельствуют о том, что выраженность реактивных и дегенеративных изменений слизистой оболочки зависит от экспозиции криовоздействия. При минимальной экспозиции (10 *сек*) наступает крионекроз эпителиального слоя, при удлинении времени воздействия — собственно слизистой и подслизистой.

Полученные данные могут явиться отправным пунктом при криотерапии патологии слизистой оболочки полости рта.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР
Украинский институт усовершенствования врачей

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

Матеріал, захищений авторським правом

ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТАЗНОЙ АКТИВНОСТИ В ГЕПАТОЦИТАХ КРЫС В ПЕРИОД КОМПЕНСАТОРНО-ПРИСПОСОБИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ

В. С. Зыбин

Для выяснения структурно-функционального состояния мембран клеток в последнее время определяют локализацию продукта глюкозо-6-фосфатазной (Д-глюкозо-6-фосфат-фосфогидролаза КФ 3.1.3.9) реакции как ключевого фермента, расположенного на внутренней поверхности мембран эндоплазматического ретикулума [1, 2, 3, 4, 8].

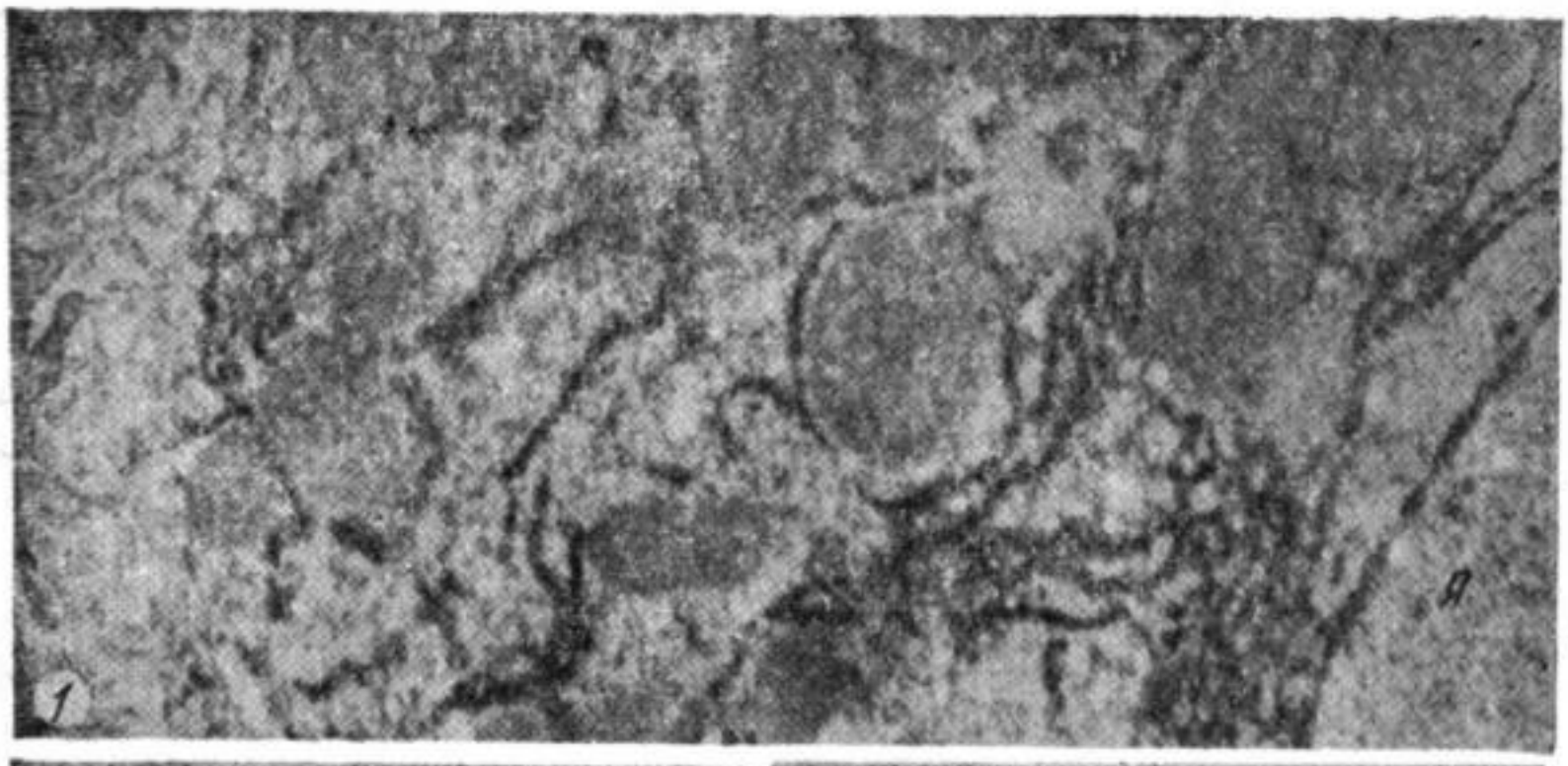
До настоящего времени отсутствуют электронно-цитохимические данные об активности Г6Фазы в период компенсаторно-приспособительной реакции клетки. Изучение активности Г6Фазы в гепатоцитах может служить тестом для оценки степени повреждения паренхимы печени при подготовке ткани для консервации и последующих различных способах замораживания.

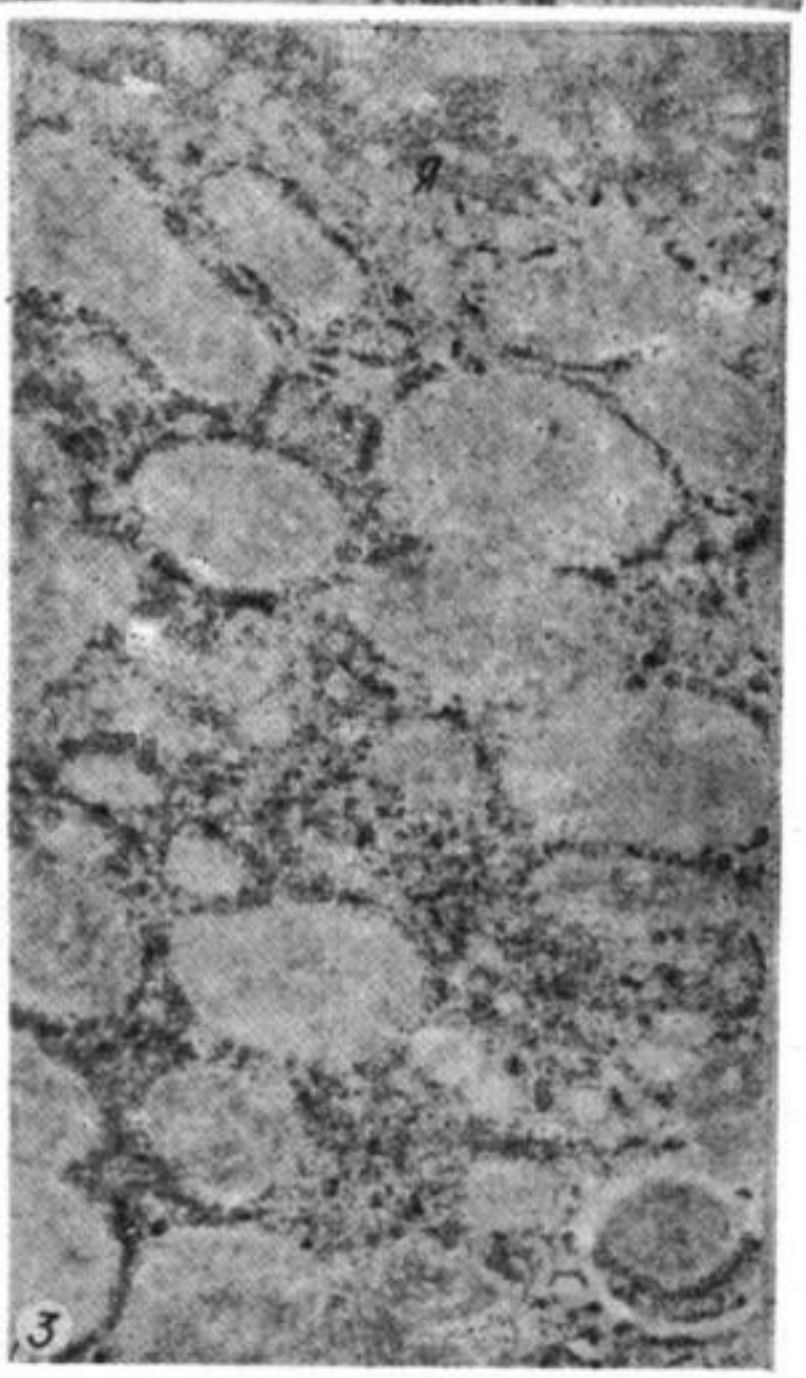
Для сохранения активности Г6Фазы проводили перфузию печени крыс в течение 5 *мин* 0,1 М кокадилатным буфером pH 6,8 с 6 *мМ* Г6Ф, затем 4 *мин* 2%-ным очищенным глютаральдегидом в 0,1 М кокадилатном буфере pH 6,8 с 6 *мМ* Г6Ф. Замораживание печени осуществляли по разным программам. Кусочек печени размером 5 *мм*^{3} быстро погружали в сосуд с 100%-ным ацетоном или петролейным эфиром, предварительно охлажденным до —60° или —150°. Срезы толщиной 40—50 *мк* при температуре —10°, —15° помещали на 30 *мин* при +24°, —25° и +37° в инкубационную среду Вакштейн-Мейселя [5] в модификации, предложенной Лескеса и др. [9]. Срезы заливали в смесь эпона с араллитом, окрашивали уранилацетатом и цитратом свинца и исследовали в электронном микроскопе ЕМ-100Б. Для контрольных исследований срезы печени помещали в инкубационную среду, не содержащую Г6Ф.

Фиксация 2%-ным глютаральдегидом в течение 4 *мин* с последующей дополнительной фиксацией 1%-ным OsO_4 позволяет получить хорошую сохранность клеточных компонентов. Во всех случаях замораживания наблюдали повреждение паренхимы печени вследствие кристаллизации тканевой жидкости, причем активность Г6Фазы после оттаивания срезов печени была идентичной. В гепатоцитах при инкубации при температурах от +24 до —25° глыбок свинца было больше, чем при +37°. Глыбки свинца обнаруживались в виде гранул, расположенных на внутренней поверхности мембран, образующих гранулярную и агранулярную форму эндоплазматической сети, а также в перинуклеарном пространстве. В большинстве случаев гранулы свинца наблюдались непосредственно в полости канальцев эндоплазматического ретикулума, что, по-видимому, обусловлено частичной его диффузией. В остальных клеточных компонентах гранулы свинца отсутствуют (рисунок, *1*). Полученные данные о локализации продукта Г6Фазной реакции согласуются с результатами других авторов [1, 2, 6, 7, 9].

При изучении Г6Фазной активности в гепатоцитах крыс сразу после 30 *мин* плавания в ряде клеток наблюдается некоторое уменьшение продукта реакции в канальцах гранулярного и агранулярного эндоплазматического ретикулума, а также в перинуклеарном пространстве (см. рисунок, *2*). После двухчасовой физической нагрузки в гепатоцитах наблюдается дальнейшая редукция продукта Г6Фазы в обоих видах ретикулума и в перинуклеарном пространстве.

Матеріал, захищений авторським правом





Участок цитоплазмы гепатоцита крыс в зоне ядра (*я*):

1 — преципитат свинца располагается в эндоплазматическом ретикулуме и перинуклеарном пространстве (×25 000); *2* — через 30 *мин* плавания крыс, наблюдается уменьшение Г6Фазной активности (×35 000); *3* — через 4 *ч* плавания, значительное снижение Г6Фазной активности (×28 000).

Сразу после четырехчасового плавания в гепатоцитах происходит дальнейшее уменьшение активности Г6Фазы по сравнению с предыдущими сроками исследования (см. рисунок, *3*).

Следовательно, в период компенсаторно-приспособительной реакции гепатоцитов крыс происходит снижение Г6Фазной активности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лысенко А. Г. — Архив патологии, 1971, 33, 10, 83.
2. Ericsson L. E. — J. Histochem. Cytochem., 1966, **14**, 4, 361.
3. Borgers M., Schaper J., Schaper W. — J. Histochem. Cytochem., 1971, **19**, 9, 526.

Матеріал, захищений авторським правом

4. Hugon I. S., Maestracci D., Menard D. — J. Histochem. Cytochem., 1971, 19, 9, 515.
5. Wachstein M., Meissel E. — J. Histochem. Cytochem., 1956, 4, 6, 592.
6. Goldfischer J., Essner E., Novikoff A. — J. Histochem. Cytochem., 1964, 12, 72.
7. Kanamura S. — J. Histochem. Cytochem., 1971, 19, 6, 386.
8. Rosen S. I. — Experientia, 1970, 26, 839.
9. Leskes A., Siekivitz R., Polade E. — J. Cell Biology, 1971, 49, 2, 264.

Институт трансплантации
органов и тканей АМН СССР

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г.

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ГЕПАТОЦИТОВ КРЫС В ПЕРИОД КОМПЕНСАТОРНО-ПРИСПОСОБИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ

В. С. Зыбин, Н. Г. Серебряков

Решение некоторых проблем консервации клеток и органов во многом зависит от изучения механизма общих закономерностей компенсаторно-приспособительных и восстановительных процессов. В связи с этим нами была предпринята попытка изучить механизм адаптации гепатоцитов крыс при неспецифическом факторе воздействия — физической нагрузке (плавание).

Исследование проводилось на крысах линии Вистар (самцах) весом 150—250 *г*. Моделью служила нагрузка в виде одноразового плавания крыс в течение 1, 2 и 4 *ч*. Ультраструктуру гепатоцитов изучали через 1 и 4 *ч* после плавания. Фиксация материала осуществлялась по методу Милонинга [2]. Материал заливали в смесь эпона с аралдитом. Срезы толщиной 250—300 Å изготавливали на ультрамикротоме ЛКБ-4800, контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и исследовали на электронном микроскопе ЕМ-100 Б.

Сразу после одноразового плавания крыс в течение 1 *ч* в ряде гепатоцитов наблюдается расширение канальцев гранулярного эндоплазматического ретикулума (ГЭР), увеличение мембран агранулярного эндоплазматического ретикулума (АЭР), преимущественно состоящего из мелких пузырьков. В пузырьках АЭР часто выявляется субстанция, по осмиофилии приближающаяся к липидным включениям. Комплекс Гольджи состоит из расширенных цистерн и пузырьков, заполненных веществом, которое по осмиофилии приближается к липидным включениям, и субстанции, наблюдаемой в пузырьках АЭР. Митохондрии, как правило, имеют овальную форму, в некоторых органеллах кристы незначительно расширены. Хроматин ядра расположен равномерно, перинуклеарное пространство расширено. Ядрышко увеличено в размерах. В некоторых гепатоцитах митохондрии набухшие и имеют неровный контур. Иногда в цитоплазме наблюдаются вытянутые и изогнутые митохондрии, а также цитосегресомы (рис. 1).

Через 1 *ч* после плавания в течение 1 *ч* в паренхиме печени выявляются гепатоциты с набухшими митохондриями. В некоторых клетках несколько расширены канальцы и цистерны ГЭР. В ряде гепатоцитов наблюдаются вытянутые формы митохондрий. Количество АЭР увеличено. Хроматин располагается равномерно по всей поверхности среза ядра. Ядрышко увеличено в размере (рис. 2).

Через 4 *ч* после плавания крыс в течение 1 *ч* в гепатоцитах часто обнаруживаются вытянутые, гантелевидные, изогнутые и кольцеобразные митохондрии, кристы в которых располагаются параллельно оболочке органеллы. Канальцы ГЭР в некоторых клетках расширены и ва-

Матеріал, захищений авторським правом

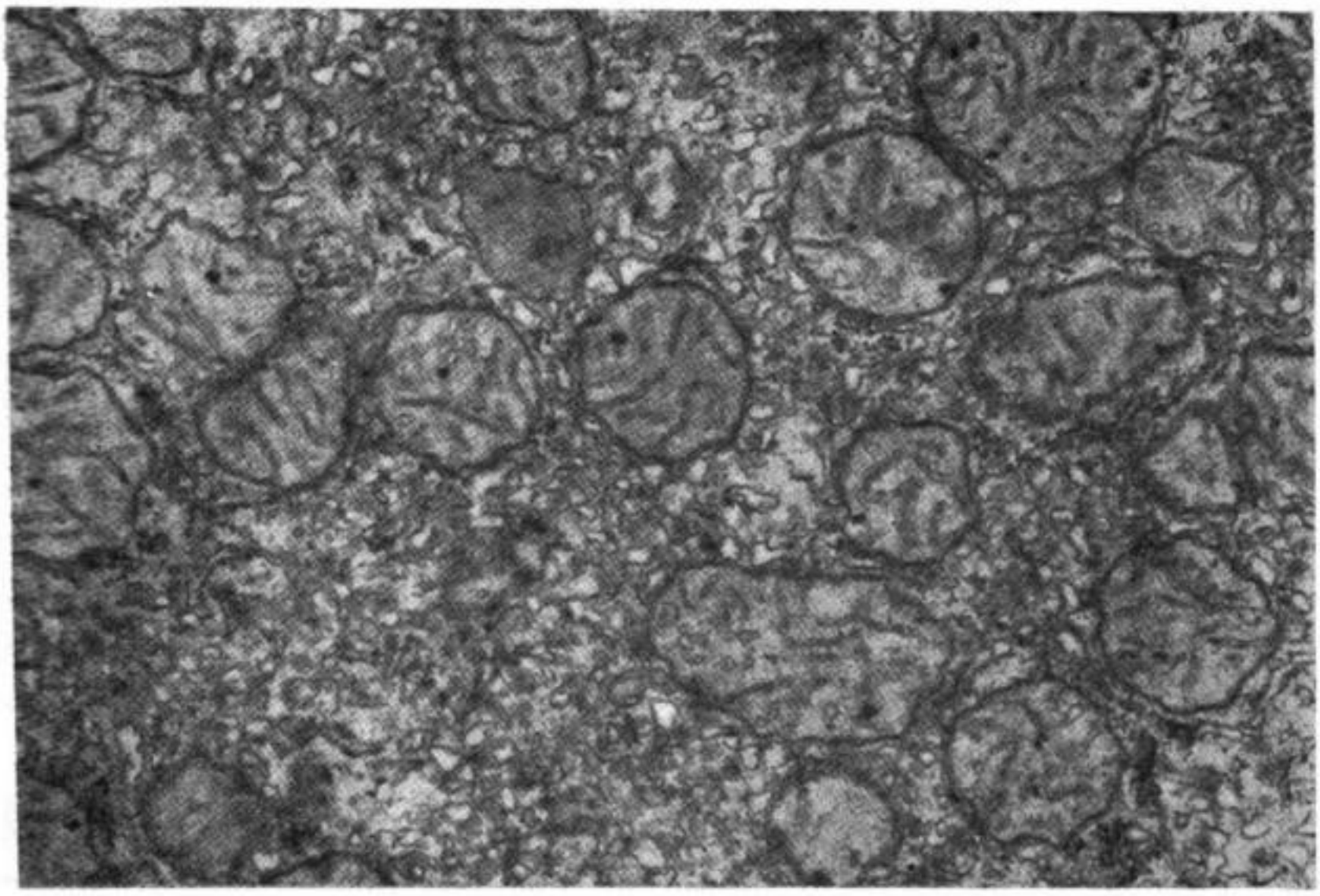


Рис. 1. Участок цитоплазмы гепатоцита крысы, сразу после плавания в течение 1 *ч*. Увеличенное количество агранулярного эндоплазматического ретикулума. Митохондрии набухшие, с неровным контуром. (×25000).

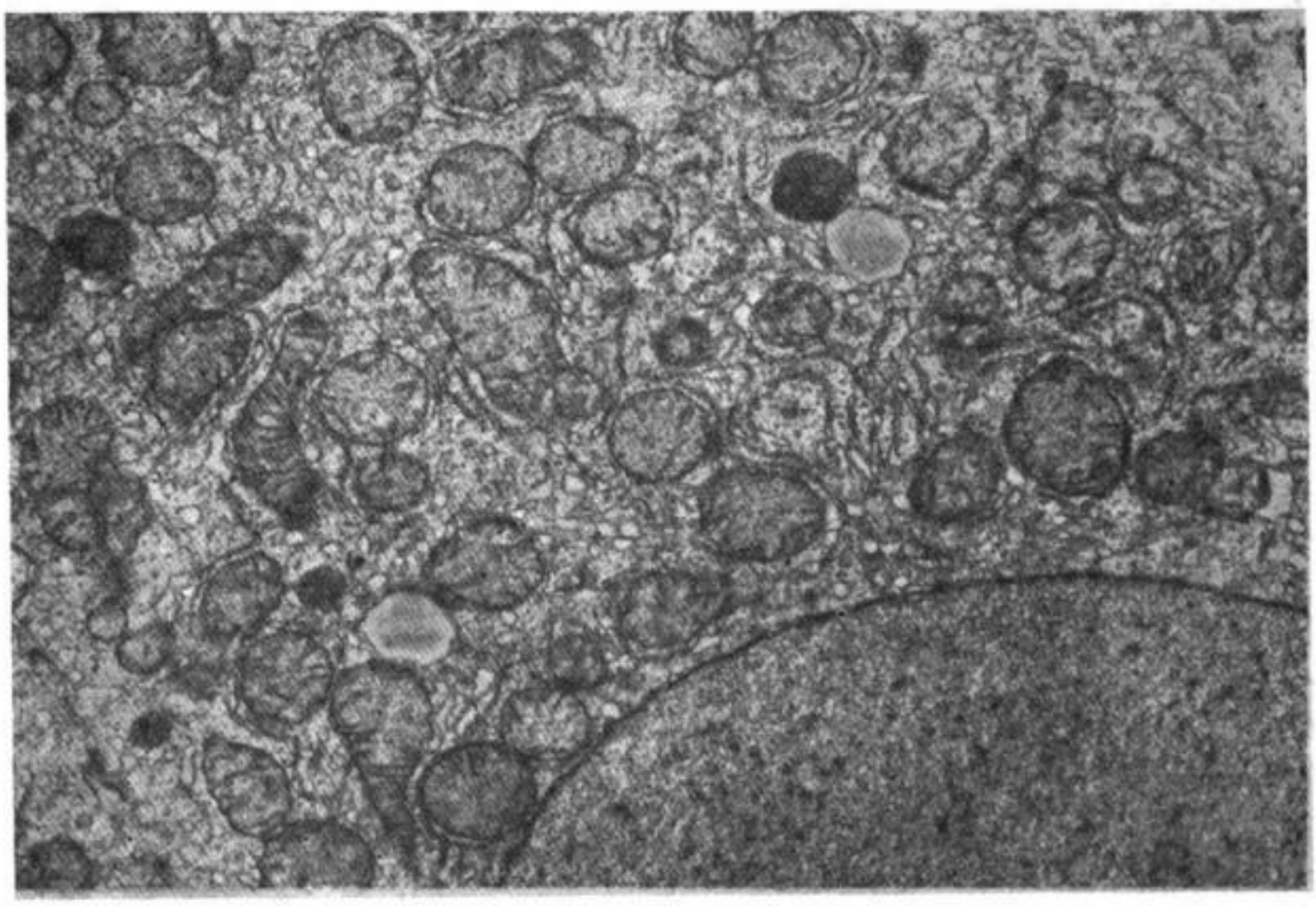


Рис. 2. Участок цитоплазмы гепатоцита крысы через 1 *ч* после плавания в течение 1 *ч*. Митохондрии набухшие, увеличенное количество агранулярного эндоплазматического ретикулума, уменьшенное — гранулярного эндоплазматического ретикулума. Хроматин равномерно расположен по всей поверхности среза ядра (×1900).

Матеріал, захищений авторським правом

куолизированы. Наблюдается уменьшение количества АЭР. В ряде гепатоцитов увеличено количество митохондрий и липидных включений. Часто ядрышко обнаруживается у ядерной мембраны.

Сразу после 2 *ч* плавания в ряде гепатоцитов наблюдали увеличение количества элементов АЭР, уменьшение ГЭР. Митохондрии, как правило, умеренно набухшие, с зубчатым контуром. Ядра на срезах имеют волнистый профиль. Наблюдается скопление хроматина у ядерной мембраны. Ядрышки увеличены в размерах и расположены у ядер-

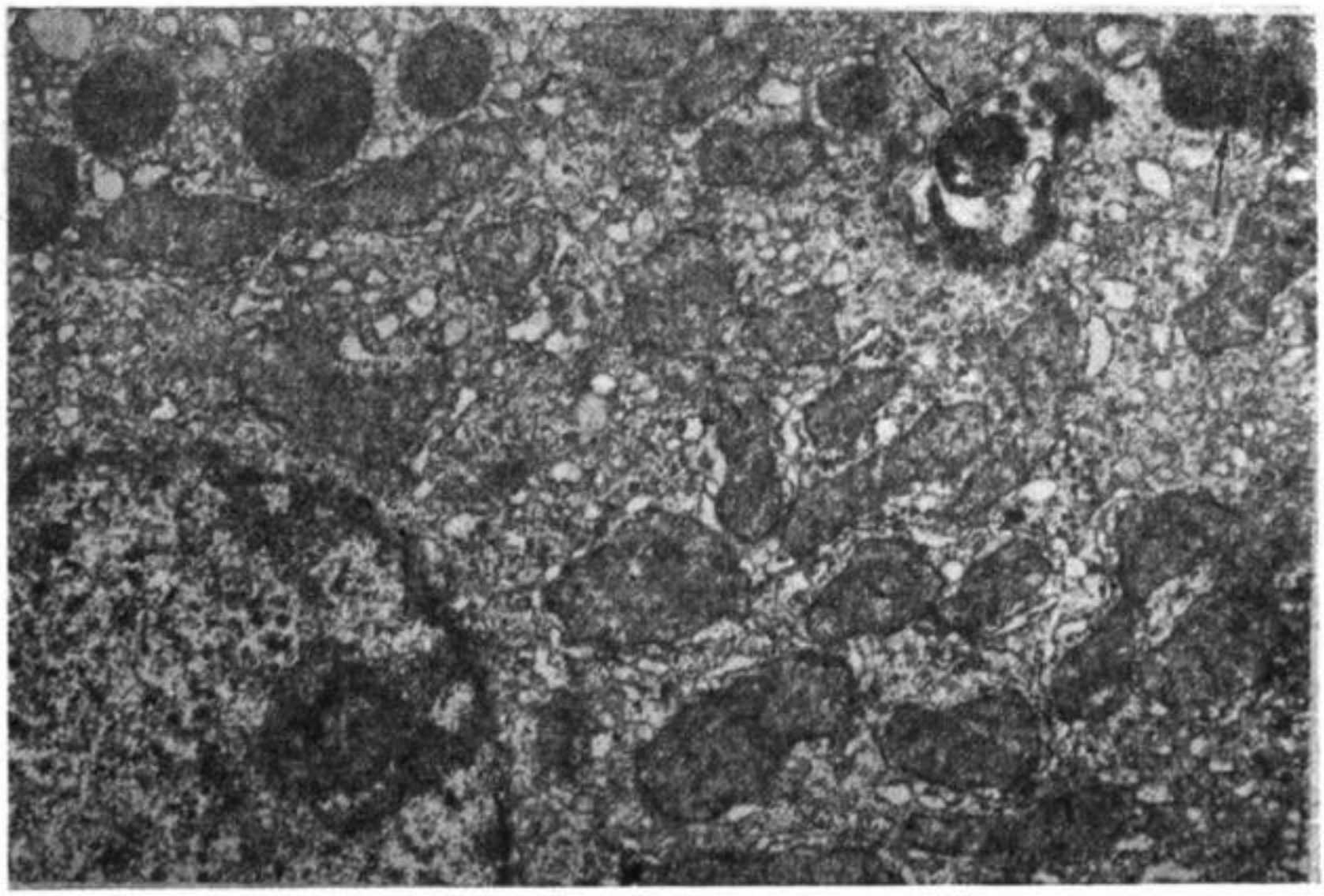


Рис. 3. Фрагмент цитоплазмы гепатоцита в зоне ядра крысы, сразу после 4-часового плавания. Ядрышко и скопления хроматина расположены у ядерной мембраны. Канальцы гранулярного эндоплазматического ретикулума расширены. Митохондрии без изменений. Видны микротельца и липофусциновые гранулы (показано стрелкой) (×21000).

ной мембраны. В некоторых гепатоцитах набухание митохондрий и расширение канальцев ГЭР более выражено. Пузырьки АЭР содержат включения, по осмиофилии приближающиеся к липидным включениям.

Через 1 *ч* после двухчасового плавания в гепатоцитах увеличено количество АЭР, в пузырьках которого часто обнаруживается субстанция. В одних клетках ядра овальные, с равномерно расположенным хроматином, в других — с зубчатым профилем (на срезах) хроматин скапливается у ядерной мембраны. Иногда встречаются митохондрии вытянутой формы. Через 4 *ч* после двухчасового плавания крыс в ряде клеток наблюдаются изменения, аналогичные тем, которые мы обнаружили через 1 *ч* после плавания. Сразу после 4 *ч* плавания в большом количестве гепатоцитов обнаруживается значительное количество пузырьков АЭР, содержащих субстанцию липидной природы. В зоне расположения АЭР увеличено число липидных включений разной формы и величины. Митохондрии значительно набухшие, часто видны гантелевидные и кольцеобразные формы. Лизосомы содержат осмиофильные и осмиофобные включения. Часто видны цитосегресомы. В некоторых гепатоцитах обнаруживается значительное количество липофусциновых гранул, преимущественно в зоне АЭР (рис. 3).

Через 1 *ч* после 4 *ч* плавания в большинстве гепатоцитов канальцы ГЭР расширены, в некоторых клетках ГЭР очень мало и он представлен

Матеріал, захищений авторським правом

в виде вакуолей. Количество АЭР увеличено, в зоне его расположения часто обнаруживаются липидные включения разной величины, охваченные мембраной. В пузырьках АЭР содержится вещество, по осмиофилии приближающееся к липидным включениям. В большинстве клеток изменений в структуре митохондрий не обнаруживается.

Через 4 *ч* после четырехчасового плавания наблюдаются изменения такие же, как и через 1 *ч* после плавания такой продолжительности.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что в период компенсаторно-приспособительной реакции гепатоцитов на неспецифический фактор воздействия — физическую нагрузку — происходят определенные структурные изменения ряда клеточных компонентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Карнаухов В. Н. — В кн.: Биофизика живой клетки. Пущино, 1971, 68.
2. Milloning G. — J. Appl. Phys., 1961, **32**, 1637.

Институт трансплантации органов
и тканей АМН СССР

Поступила в редколлегию
в сентябре 1973 г

Матеріал, захищений авторським правом

СОДЕРЖАНИЕ

Пушкарь Н. С. О некоторых достижениях и проблемах криобиологии и криомедицины 3
Белоус А. М., Луговой В. И., Гулевский А. К. Актуальные проблемы современной криобиохимии 8
Серебряков Н. Г., Зыбин В. С. Консервация сердца в условиях переохлаждения и замораживания 15
Шенберг М. Г. Исследование жизнеспособности гемопоэтической ткани . . 21
Шраго М. И., Бредихина Л. П. Критерии жизнеспособности эритроцитов (о функциональном направлении в криобиологии) 27
Медведев П. М., Недельский Г. Т., Фисанович Т. И. Аппаратура для замораживания биологических объектов 33
Иткин Ю. А., Бронштейн В. Л., Гордиенко Е. А. Анализ процессов кристаллизации и обезвоживания клеточных суспензий 40
Грек А. М., Луговой В. И., Бондаренко Т. П. Влияние криопротекторов на белковую флуоресценцию мембран эритроцитов человека 42
Бондаренко В. А. Влияние быстрого замораживания-оттаивания на стимулируемую Fe^{2+} хемилюминесценцию митохондрий 45
Сахнович В. М. Применение полярографического метода определения напряжения кислорода в семенниках крыс при оценке их биологической сохранности 46
Вишневский В. И., Марющенко А. В. Влияние ультразвуковых колебаний на кристаллизацию спермы быков 48
Осташко Ф. И., Раковский Я. П., Павленко М. П., Скорняков Б. А. Криоскопические исследования спермы быков-производителей 51
Тимошенко Ю. П. Калориметрические исследования некоторых криофилактиков 54
Моисеев В. А., Кулешова Л. Г., Тимошенко Ю. П., Волина В. В. Исследование процессов кристаллизации в ткани роговой оболочки при замораживании . 56
Обозная Э. И., Маркова О. П. Исследование конечного звена цитохромной цепи цитохромоксидазы в клетках костного мозга после глубокого охлаждения 60
Суббота Н. П. Изучение функционального состояния мембран митохондрий при инкубации срезов коры почки крыс в растворах криопротекторов . . . 62
Кравченко Л. П., Луговой В. И., Белоусова Е. В. Влияние скорости оттаивания изолированных лизосом печени на акивность гидролаз 64
Лемешко В. В., Чаплай Е. В. Активация глюкозо-6-фосфатазы печени крыс замораживанием 66
Лемешко В. В., Белоус А. М., Мишнева Л. Г. Влияние криопротекторов (глицерина и ПЭО-400) на дыхательную цепь, митохондрий печени крыс . . 67
Цуцаева А. А., Лобасенко Н. П., Маркова В. М. Сравнительное изучение активности нативной и деконсервированной антимакрофагальной и антилимфоцитарной сывороток 70
Останкова Л. В., Калмыков К. К., Медведева Г. Г., Вороновская А. И. Изучение биологической активности кожных трансплантатов 74
Маркова В. М., Медведева Г. Г. Активность комплемента сыворотки морских свинок в условиях действия низких температур и криофилактика . . . 76
Микулинский Ю. Е., Андрусенко В. В. Влияние экзогенной РНК на синтез белка и нуклеиновых кислот в клетках костного мозга после низкотемпературной консервации 77
Федотенков А. Г., Курбанова Г. А., Королев В. М., Федоров Н. А. Консервирование размороженного костного мозга при положительных температурах 79
Мацко С. Н. Терминология криобиологических явлений 82
Гусарова Э. С., Ткаченко Д. А., Михайличенко З. П. Токсико-фармакологическая оценка оксиэтилированного пентаэритрита 84
Кривич В. С., Кочуровская Г. Г., Матвиец Н. М. Определение молекулярно-весового распределения оксиэтилированного пентаэритрита с помощью газохроматографического анализа 86

Матеріал, захищений авторським правом

Карева Л. В. О методах количественного определения полиэтиленоксида в биологических субстратах 88
Бреславский А. С., Вартапетов Б. А., Гладкова А. И., Криворотько В. Ф., Масловский С. Ю. Морфологические изменения в предстательной железе после ее криодеструкции 90
Вартапетов Б. А., Гладкова А. И., Бондаренко Л. А. Криворотько В. Ф. Гормональные изменения при замораживании предстательной железы . . 92
Волимерец Л. П., Пышкина Т. А., Козлова В. Ф. К изучению действия криопротектора полиэтиленоксида с молекулярным весом 400 на морфо-функциональную сохранность семенника 94
Даценко Б. М., Чуйко В. А., Алюшина А. А. Содержание тиреоидных гормонов в крови тиреоидэктомированных крыс при трансплантации щитовидной железы, консервированной замораживанием 96
Даценко Б. М., Алюшина А. А., Брук Г. З., Пышкина Т. А. Низкотемпературное консервирование щитовидной железы в эксперименте. I. Выбор оптимальной концентрации криопротектора 98
Козлова-Лавриненко Т. Е., Холодный А. Я., Ткаченко С. С., Крылов К. М., Соколова Н. Б., Киселева М. В. Сравнительное изучение эффективности консервирования тканевых трансплантатов холодом и при комнатной температуре в газообразных средах 104
Ошерова О. А., Панков Е. Я., Дедух Н. В. Изучение морфологической сохранности овариальной ткани на этапах низкотемпературной консервации . 107
Осташко Ф. И., Скорняков Б. А. Нарушения ультраструктуры спермиев при низкотемпературной консервации 110
Чуйко В. А., Медведева И. А., Ошерова О. А. Содержание серотонина в трансплантате яичника 114
Юрченко Т. Н., Шарлай Т. М. Влияние низких температур (—196°) на дыхательную функцию роговой оболочки человека 116
Воротилин А. М., Бурмака Л. Г. Изучение дзета-потенциала клеток в связи с механизмом криозащиты 117
Наконечный А. А., *Михайличенко З. П.* Токсикологическая характеристика полиэтиленоксида с молекулярным весом 400 (ПЭО-400) 120
Карташевский Н. Г., Михнович Е. П., Шулутко Л. С., Ханина Т. М., Кузьмин В. А. Клиническое применение размороженных эритроцитов . . . 121
Полякова А. И., Гордиенко Е. А. Выбор оптимального режима оттаивания для ядросодержащих клеток крови, консервированных глубоким охлаждением 124
Иткин Ю. А., Полякова А. И., Гордиенко Е. А. Влияние скорости замораживания на жизнеспособность лейкоцитов периферической крови 127
Бабийчук Г. А., Маркова О. П., Луговой В. И., Обозная Э. И., Воловельская Е. Л., Шевердин Ю. П., Вартанова Л. А. Эффективность трансплантаций криоконсервированной аллогенной миелоидной ткани онкологическим больным при химио- и лучевой терапии 129
Лобынцева Г. С., Щербак Г. М. Сравнительная оценка эффективности различных криофилактиков при низкотемпературной консервации ядерных клеток крови 131
Лаврик С. С., Глухенькая Г. Т., Когут Г. И., Карабанова Л. Л., Афанасьева Е. Ю., Коротя Т. А. Опыт длительного хранения консервированного костного мозга при температуре —196° 133
Пушкарь Н. С., Обозный Э. П. Пластмассовые контейнеры для замораживания и длительного хранения костного мозга 136
Киселев А. Е., Рудаев Я. А., Федорова Л. И., Полякова Л. П., Демкин Г. И. Использование прямоугольной жидкоазотной камеры для хранения эритроцитов в парах азота 139
Никитин В. А., Медведев Е. М., Муринец-Маркевич Б. Н., Носов М. Е., Григорьева К. В. Стоматологический криозонд 141
Скорняков Б. А. Лиофилизационная приставка к универсальному вакуумному посту ВУП-2К 143
Медведев П. М., Фисанович Т. И., Недельский Г. Т. Исследование процессов замораживания костного мозга трупов на низкотемпературной установке 144
Григорьева К. В., Котык Е. А. Изменение слизистой оболочки полости рта подопытных животных при криовоздействии 148
Зыбин В. С. Электронно-микроскопическое исследование глюкозо-6-фосфатазной активности в гепатоцитах крыс в период компенсаторно-приспособительной реакции 150
Зыбин В. С., Серебряков Н. Г. Ультраструктурные изменения гепатоцитов крыс в период компенсаторно-приспособительной реакции 152

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 61:57:615.832.98

О некоторых достижениях и проблемах криобиологии и криомедицины. Пушкарь Н. С. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 3—8.

В статье обзорного характера приводятся данные о развитии основных направлений криобилогии и криомедицины, анализируются успехи, достигнутые на современном этапе развития криобиологии и рассматриваются проблемы, требующие решения. Разбираются основные положения современных теорий криоповреждения и криопротекции.

УДК 576.343:615.832.98

Актуальные проблемы современной криобиохимии. Белоус А. М., Луговой В. И., Гулевский А. К. — В кн: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 8—15.

В обзоре представлены современные данные литературы по биохимии низких температур. Рассмотрены вопросы влияния замораживания на структурно-функциональное состояние очищенных ферментов, а также ферментов в составе органов, тканей и биологических сред. Отдельные разделы обзора посвящены характеристике структурно-функционального состояния митохондриальных мембран и белоксинтезирующего аппарата клетки в условиях действия низких температур.

Библ. 53.

УДК 611:12:615.832.98

Консервация сердца в условиях переохлаждения и замораживания. Серебряков Н. Г., Зыбин В. С. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 15—21.

Изучение литературы по консервации сердец холоднокровных и теплокровных животных при переохлаждении и замораживании показало, что существующие методы не позволяют сохранить жизнеспособность органа на продолжительный срок. Применение криопротекторов увеличивает период сохранения жизнеспособности органа при отрицательных температурах. Однако существующие в настоящее время криофилактические вещества не безвредны для живой биологической системы (органеллы, клетки, органы). Кроме того, применяемые криопротекторы увеличивают период сохранности органа от воздействия холода на непродолжительный срок. Эмбриональная ткань менее чувствительна к кристаллам льда, высокой концентрации электролитов в клетке и действию криопротекторов.

Библ. 28.

УДК 611—018.46.1.004.4

Исследование жизнеспособности гемопоэтической ткани. Шенберг М. Г. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 21—27.

Излагаются современные представления о критериях жизнеспособности клеток, свидетельствующих об их биологической полноценности.

Библ. 26.

УДК 612.387:611—018.51

Критерии жизнеспособности эритроцитов (о функциональном направлении в криобиологии). Шраго М. И., Бредихина Л. П. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 27—33.

В настоящее время единственным путем оценки состояния биологического объекта является сочетанное исследование как структуры и функции субклеточных структур и компонентов, так и состояния всего объекта. На примере эритроцитов человека показано значение функциональных тестов, в частности транспорта кислорода, в оценке жизнеспособности клеток в процессе консервирования при температурах выше и ниже нуля.

Библ. 14.

УДК 612.56

Аппаратура для замораживания биологических объектов. Медведев П. М., Недельский Г. Т., Фисанович Т. И. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 33—39.

В обзоре описаны и сопоставлены наиболее оригинальные конструкции некоторых аппаратов для замораживания крови и костного мозга. Отмечены достоинства и недостатки рассматриваемой аппаратуры. Проанализирована тенденция развития криобиологического аппаратостроения для указанных выше целей.

Библ. 31.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 536,421,48.576.3

Анализ процессов кристаллизации и обезвоживания клеточных суспензий. Иткин Ю. А., Бронштейн Е. А., Гордиенко Е. А. — В кн.: Криобиололгия и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 40—42.

В работе получено уравнение, позволяющее сделать выводы об условиях образования внутриклеточных кристаллов и изменении концентрации растворенных в клетке веществ в процессе низкотемпературной консервации клеточной суспензии. Дана оценка скоростей охлаждения, при которых вероятность замерзания клеток мала.

Библ. 3.

УДК 678.048:611—018.51:576.314;616—073.584

Влияние криопротекторов на белковую флуоресценцию мембран эритроцитов человека. Грек А. М., Луговой В. И., Бондаренко Т. П. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 42—45.

Исследовали влияние криопротекторов: полиэтиленоксида (с молекулярным весом 400 и 4000), поливинилпирролидона (с молекулярным весом 19 900) и глицерина на флуоресцентные характеристики мембран эритроцитов. Установлено, что криопротекторы могут определенным образом влиять на физико-химические свойства микроокружения, систему водородных связей, приводящих к изменению квантово-механического состояния хромофорных групп мембранных белков.

Табл. 1. Библ. 1.

УДК 536.421.4:535.379:576.347

Влияние быстрого замораживания-оттаивания на стимулируемую хемилюминесценцию митохондрий. Бондаренко В. А. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 45—46.

В опытах с митохондриями печени крыс изучали влияние быстрого замораживания-оттаивания на хемилюминесценцию митохондрий. Показано, что кинетика хемилюминесценции митохондрий, не подвергнутых замораживанию, не изменяется в течение 3 ч после выделения. Замораживание-оттаивание митохондрий приводит к изменению интенсивности и кинетики свечения в фазах «медленной вспышки» и стационарного свечения. Отмечено первоначальное увеличение интенсивности свечения митохондрий в опыте.

Библ. 5.

УДК 611.631:543.253

Применение полярографического метода определения напряжения кислорода в семенниках при оценке их биологической сохранности. Сахнович В. М. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 46—47.

Исследовалась возможность использования полярографического метода определения напряжения кислорода в семенниках крыс при оценке их биологической сохранности. Отмечено, что уровень напряжения кислорода в тестикулярной ткани существенно зависит от различных воздействий: кратковременной ишемии, перфузии раствором Хенкса, перфузии 5%-ным раствором ПЭО-400.

Библ. 7.

УДК 591.463.1:572,78:534—8

Влияние ультразвуковых колебаний на кристаллизацию спермы быков. Вишневский В. И., Марющенко В. А. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 48—51.

На установке для криомикроскопии исследовали кристаллизацию спермы быков, разбавленную глюкозо-цитратно-желточными разбавителями с разными концентрациями глицерина. Сперма замораживалась со скоростями 1, 2, 6, 12° в 1 *мин* в ультразвуковом поле.

Наблюдение и фотографирование под микроскопом процессов кристаллизации спермы показало, что характер и размеры кристаллов льда изменяются: под действием ультразвука кристаллы становятся более разветвленными и теряют линейную направленность. Это объясняется появлением дополнительных центров кристаллизации льда при замораживании в ультразвуковом поле.

Библ. 6.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 591.463.1:612.014.462,2

Криоскопические исследования спермы быков-производителей. Осташко Ф. И., Раковский Я. П., Павленко М. П., Скорняков Б. А. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 51—53.

Описаны схемы и работа двух конструкций криомикроосмометров, предложенных для определения осмотических параметров биологических жидкостей в малых объемах. Принцип действия приборов основан на точном измерении депрессии температуры замерзания жидкостей. Для измерения температуры с точностью ±0,01° в приборах использован в качестве датчика малогабаритный термистор МТ-54. В одном из приборов измерительная мостовая схема питалась постоянным электрическим током и использован высокочувствительный индикатор, а в другом — переменным током и применен транзисторный усилитель.

С помощью разработанных приборов измерена концентрация осмотически активных веществ в трех последовательных эякулятах 137 клинически здоровых быков-производителей разных пород. Математическая обработка позволила изучить законы распределения эякулятов по осмотическим концентрациям и установить, что связь их с породой быков и физиологическим состоянием спермы практически отсутствует. Отмечено также, что максимум в распределении по концентрациям осмотически активных веществ технологически выбракованных эякулятов смещен в область заниженных величин. Удельный вес эякулятов с заниженными осмотическими концентрациями ниже в сперме, выдержавшей завораживание, по сравнению со спермой, допущенной к замораживанию.

Рис. 3. Библ. 10.

УДК 536.6:678.048

Калориметрические исследования некоторых криофилактиков. Тимошенко Ю. П. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып 1, Киев, «Наукова думка», 1975, с. 54—56.

Измеряли теплоемкость глицерина и ПЭО-400 в диапазоне температур —196°÷÷+30° методом абсолютной и дифференциально сканирующей калориметрии. Показано, что метод дифференциально-сканирующей калориметрии обладает высокой чувствительностью, достаточной для регистрации тепловых процессов, сопровождающих охлаждение или нагревание биологических объектов в диапазоне температур —100°÷÷+100°. Погрешность измерения удельной теплоемкости этим методом составляет 5—7%.

Рис. 3. Библ. 7.

УДК 611.841.2:532,78

Исследование процессов кристаллизации в ткани роговой оболочки при замораживании. Моисеев В. А., Кулешова Л. Г., Тимошенко Ю. П., Волина В. В. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 56—60.

Представлены результаты исследования процессов кристаллизации нативной, инкубированной в 10%-ном растворе глицерина и 10%-ном растворе ПЭО-400 и отмытой от этих криофилактиков ткани роговой оболочки человека методами рентгено- и термографии. Данные позволяют сделать предварительный вывод о характере проникновения различных криозащитных веществ в ткань роговицы.

Табл. 1. Библ. 8.

УДК 621.015.11:611—018.46:547.422:615 832.98

Исследование конечного звена цитохромной цепи—цитохромоксидазы в клетках костного мозга после глубокого охлаждения. Обозная Э. И., Маркова О. П. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 60—61.

Дана морфологическая и цитохимическая оценка клеток костного мозга после замораживания-оттаивания. Показана достаточная морфологическая сохранность деконсервированных миелоидных клеток. Анализ активности окислительно-восстановительных ферментов выявил различную чувствительность их к действию глубокого холода. Проведенные исследования указывают на существенную роль криоповреждений в цитохромной цепи переноса электронов. Добавление экзогенного цитохрома С способствует восстановлению процессов окисления.

Библ. 4.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 576.314:611—611:678.048

Изучение функционального состояния мембран митохондрий (в гомогенате) при инкубации срезов коры почки крыс в растворах криопротекторов. Суббота Н. П. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 62—64.

Изучали влияние инкубирования срезов коры почки крыс в 10%-ных растворах низкотемпературных криопротекторов — глицерина, ДМСО и ПЭО с молекулярным весом 100, 200, 300, 400 — при температуре 2÷4° на функциональное состояние митохондрий и проницаемость их внутренней мембраны для НАД-Н. Показано, что инкубация в течение 2,5 ч не оказывает существенного влияния на структурно-функциональное состояние митохондрий.

Табл. 2. Библ. 11.

УДК 577,151:591.436:612.014.43

Влияние скорости оттаивания изолированных лизосом печени на активность гидролаз. Кравченко Л. П., Луговой В. И., Белоусова Е. В. — В кн.: Криобиология и криомедицина. вып. 1, Киев, «Наукова думка», 1975, с. 64—65.

В работе представлен материал по изучению влияния режимов замораживания-оттаивания на уровень неседиментируемой активности лизосомальных гидролаз (кислых РНКазы, ДНКазы, фосфатазы и катепсинов). Показано, что оба режима замораживания-оттаивания приводят к резкому увеличению неседиментируемой активности гидролаз лизосом в супернатанте, но наиболее значительный выход ферментов из лизосом отмечался при медленном способе оттаивания.

Библ. 13.

УДК 577.15.024:591.436:612.014.43

Активация глюкозо-6-фосфатазы крыс замораживанием. Лемешко В. В., Чаплай Е. В. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 66—67.

Изучали активность глюкозо-6-фосфатазы гомогенатов печени крыс после замораживания-оттаивания срезов этого органа. Показано, что в результате такого воздействия активность глюкозо-6-фосфатазы увеличивается на 21—25%. Повторное замораживание-оттаивание вызывает повреждение мембран эндоплазматического ретикулума.

Табл. 2 Библ. 6.

УДК 612.015.11:576.347:591.436:547.462:547.422

Влияние криопротекторов (глицерина и ПЭО-400) на дыхательную цепь митохондрий печени крыс. Лемешко В. В., Белоус А. М., Мишнева Л. Г. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 67—70.

В опытах с митохондриями печени крыс и субмитохондриальными «ультразвуковыми» частицами митохондрий сердца быка изучали влияние ПЭО-400, ПЭГ-400 и глицерина на дыхательную цепь митохондрий. Показано, что в 10%-ных концентрациях ПЭО-400 и ПЭГ-400 ингибируют прямой и обратный перенос электронов в НАД-Н-дегидрогеназном комплексе дыхательной цепи, однако предварительное суспендирование митохондрий в среде с 10%-ным ПЭО-400 и последующее добавление суспензии в среде без ПЭО-400 не оказывает значительного влияния на активность этого участка дыхательной цепи. Глицерин во всех случаях не влиял на активность дыхательной цепи.

Табл. 2. Рис. 2. Библ. 4.

УДК 615.383:576.8.097:612.014.43

Сравнительное изучение активности нативной и деконсервированной антимакрофагальной и антилимфоцитарной сывороток. Цуцаева А. А., Лобасенко Н. П., Маркова В. М. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 70—74.

Применение иммунных и изоиммунных сывороток в биологии и медицине предполагает разработку методов их длительного хранения. Работа посвящена сравнительному изучению эффективности хранения иммунных препаратов при плюсовой температуре (4°) и температуре жидкого азота (—196°). Показано, что в процессе хранения при температуре холодильника уже через месяц специфическая активность сывороток падала. Резко снижались содержание агглютининов и комплементсвязывающих антител. Консервация сывороток при температуре —196° способствовала сохранению активности в течение 3 месяцев. Показано, что разные виды антител неодинаково устойчивы в процессе хранения.

Табл. 2. Библ. 3.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 612,7:616—089.843

Изучение биологической активности кожных трансплантатов. Останкова Л. В., Калмыков К. К., Медведева Г. Г., Вороновская А. И. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 74—76.

В работе представлены экспериментальные данные, полученные при изучении иммунобиологических свойств кожных трансплантатов, подвергнутых воздействию низких температур и криофилактика ПЭО-400. Показано, что под влиянием низкотемпературной консервации биологические свойства кожных лоскутов сохраняются, поэтому приживление этих трансплантатов в сингенных системах не отличалось от приживления интактных лоскутов.

Библ. 7.

УДК 615.383:547.422:615.832.98

Активность комплемента сыворотки морских свинок в условиях действия низких температур и криофилактика. Маркова В. М., Медведева Г. Г. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 76—77.

Сыворотку крови морских свинок с криофилактиком ПЭО-400 и без него хранили в течение месяца в разных температурных условиях: в холодильнике при 4° и в жидком азоте при —196°. Активность комплемента в сыворотке при хранении ее в холодильнике снизилась в 9,4 раза. При температуре —196° комплементарная активность сохранялась в течение всего срока наблюдения.

Табл. 1. Библ. 4.

УДК 547.96:547.963.32:611—018.46:615.832.98

Влияние экзогенной РНК на синтез белка и нуклеиновых кислот в клетках костного мозга после низкотемпературной консервации. Микулинский Ю. Е., Андрусенко В. В. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 77—79.

Целью работы было сравнительное изучение особенностей течения репаративных процессов в нативной и деконсервированной ткани и изучение механизмов действия экзогенной РНК. Показано, что под влиянием гомологичной экзогенной РНК течение репаративных процессов в деконсервированных миелокариоцитах ускоряется, судя по интенсивности синтеза белка, РНК и ДНК.

Табл. 1. Библ. 8.

УДК 547.96:547.963.32:611—018.46:678:048

Консервирование размороженного костного мозга при положительных температурах. Федотенков Г. Н., Курбанова В. М., Королев В. М., Федоров Н. А. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 79—82.

Исследовали жизнеспособность размороженного костного мозга, консервированного при низких температурах, по интенсивности включения H^3-тимидина. Авторы установили, что добавка в суспензию клеток экзогенного дезоксиаденозина и оротовой кислоты оказывает тормозящее влияние на включение C^{14}-оротовой кислоты, C^{14}-уридина и H^3-тимидина в ДНК. Экзогенный аденозин ингибировал включение C^{14}-оротовой кислоты в ДНК и РНК, но стимулировал — C^{14}-уридина в РНК. Добавление к размороженному костному мозгу дезоксиаденозина, оротовой кислоты и уридина не удлиняет срока сохранения миелокариоцитов при температуре $+4° \div +5°$.

УДК 57:536.48.047

Терминология криобиологических явлений. Мацко С. Н. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 82—84.

В работе приводятся рекомендации определения терминов: криобиология, зимняя спячка, критерии жизни, холодостойкость, переохлаждение, анабиоз, и рассматривается вопрос о температурных зонах и использовании терминов — мезабиоз, стеклообразное состояние, пред- и постанабиоз, химический анабиоз.

УДК 615.9:547.427

Токсико-фармакологическая оценка оксиэтилированного пентаэритрита. Гусарова Э. С., Ткаченко Д. А., Михайличенко З. П. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 84—86.

Изучали острую и субхроническую токсичность оксиэтилированного пентаэритрита, синтезированного в лаборатории криофилактиков Института проблем криобиологии и криомедицины АН УССР. Результаты исследований показали, что указанный препарат относится к малотоксичным веществам и является безвредным при применении его в дозах, в 3—5 раз превышающих терапевтическую.

Библ. 6.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 578.088.1:541.24.547.427

Определение молекулярно-весового распределения оксиэтилированного пентаэритрита с помощью газохроматографического анализа. Кривич В. С., Кочуровская Г. Г., Матвиец Н. М. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 86—88.

Разработан газохроматографический метод определения состава оксиэтилированного пентаэритрита со степенью замещения 7 оксиэтильных звеньев. Анализ проводили на хроматографе «Цвет-4», температура колонки —270°, температура испарителя 400°.

Показано, что оксиэтилированный пентаэритрит содержит полимергомологи со степенью замещения от одной оксиэтильной группы (1,8%) до 13 звеньев окиси этилена (1,5%). Содержание основной фракции (степень замещения 5—8) не превышает 50%.

Библ. 3.

УДК 578.088.1:547.422:57

О методах количественного определения полиэтиленоксида в биологических субстратах. Карева Л. В. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 88—90.

Для количественного определения полиэтиленоксида испытывали ряд методов, основанных на способности этого вещества к комплексообразованию с различными соединениями в кислой среде. В результате проведенных экспериментов установлено, что метод Е. Ш. Гронсберг, применяемый для определения этиленгликоля в воздухе, можно предложить для определения количества ПЭО-400 в водных растворах и в биологических средах.

Библ. 17.

УДК 616.65—089:615.832.9

Морфологические изменения в предстательной железе после ее криодеструкции. Бреславский А. С., Вартапетов Б. А., Гладкова А. И., Криворотько В. Ф., Масловский С. Ю. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 90—92.

Изучалась морфологическая структура предстательной железы у 14 собак после криодеструкции ее жидким азотом посредством специального криокатетера.

В ранние сроки после криодеструкции (до 6 дней) в предстательной железе наблюдались явления острого альторативного воспаления различной степени выраженности. В отдаленные сроки (5—6 месяцев) развивался хронический (пролиферативный) воспалительный процесс с исходом в фиброз и склероз и почти полной потерей железистых элементов. По предварительным данным, в отдаленные сроки после операции в окружающих предстательную железу тканях и органах патологических изменений не выявлено.

УДК 616,65 577.17:615.832.97

Гормональные изменения при замораживании предстательной железы. Вартапетов Б. А., Гладкова А. И., Бондаренко Л. А., Криворотько В. Ф. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 92—94.

В эксперименте на 25 собаках изучали функциональную зависимость между предстательной и половыми железами, а также характер экскреции половых стероидов после замораживания предстательной железы. Авторы установили подавление функциональной активности предстательной железы, сперматогенного эпителия и интерстициальных клеток гонад.

После криодеструкции предстательной железы экскреция индивидуальных 17-КС, прежде всего андростерона, а также дегидроэпиндростерона и этихолонолона, уменьшалась. Экскреция 11-окси-17КС достоверно не изменялась, что, по мнению авторов, свидетельствует об угнетении функции семенников при существенно неизменной функции надпочечников. Полученные данные подтверждают роль предстательной железы для инкреторной функции мужского организма.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 611.631:547,422:616—089:843

К изучению действия криопротектора полиэтиленоксида с молекулярным весом 400 на морфо-функциональную сохранность семенника. Волимерец Л. П., Пышкина Т. А., Козлова В. Ф. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 94—96.

Изучено действие возрастающих концентраций криопротектора ПЭО-400 (от 5 до 40% в растворе Хэнкса) на структуру и функциональную активность семенников половозрелых крыс при их гипотермической перфузии.

Показано, что оптимальная степень гидратации ткани (метод ЯМР) после перфузии семенников наблюдается при содержании 25% ПЭО-400 в перфузате; при этом гистоструктура сперматогенного эпителия извитых канальцев, а также интерстициальной ткани сохраняется.

При изучении функциональной активности семенников путем экстракорпорального подключения их к организму промежуточного хозяина выявлено ингибирующее действие ПЭО-400 на тестостеронпродуцирующую функцию этого органа.

Библ. 6.

УДК 611.631:547.422:616—089.843

Содержание тиреоидных гормонов в крови тиреоидэктомированных крыс при трансплантации щитовидной железы, консервированной замораживанием (—196°). Даценко Б. М., Чуйко В. А., Алюшина А. А. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 96—98.

При изучении функции щитовидной железы, консервированной замораживанием (—196°) с применением ПЭО-400, производилось непосредственное определение состава фракций тиреоидных гормонов в крови тиреоидэктомированных крыс после пересадки им консервированного органа.

На протяжении срока наблюдения (1 месяц) содержание тиреоидных гормонов в крови при трансплантации криоконсервированной железы приближалось к величинам, близким контрольным (пересадка свежезаготовленной железы). При трансплантации щитовидной железы, замороженной без использования криозащитных веществ, нормализация уровня тиреоидных гормонов не отмечалась.

Библ. 8.

УДК 612.441:615.832.5 47.422:001.6

Низкотемпературное консервирование щитовидной железы в эксперименте. I. Выбор оптимальной концентрации криопротектора. Даценко Б. М., Алюшина А. А., Брук Г. З., Пышкина Т. А. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 98—103.

Разработана модель криогенной гипотермической перфузии щитовидной железы, позволяющая равномерно насытить орган криозащитной смесью. Проведенные исследования показали, что перфузия щитовидной железы 30%-ным ПЭО-400 обуславливает максимальную стабилизацию воды в ее тканях и мелкокристаллическую структуру замораживаемых образцов. Удаление криопротектора из ткани щитовидной железы сопровождается восстановлением функциональных показателей органа (кислородпоглотительной и иоднакопительной способности) почти к исходному уровню. Полученные результаты свидетельствуют также, что перфузия щитовидной железы 30%-ным раствором ПЭО-400 не оказывает существенного влияния на приживляемость органа и его специфическую функцию.

Библ. 9.

УДК 616—089.843:611.77.611.71:615.012.41.615.832.98

Сравнительное изучение эффективности консервирования тканевых трансплантатов холодом и при комнатной температуре в газообразных средах. Козлова-Лавриненко Т. Е., Холодный А. Я., Ткаченко С. С., Крылов К. М., Соколова Н. Б., Киселева М. В. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 104—106.

Изучалась эффективность метода консервирования кожи и костной ткани газообразным гелием в эксперименте на кроликах. Консервированная ткань (74 образца кожи и 38 образцов костной ткани) при комнатной температуре погружалась в пакеты из полимерной пленки, наполненные газообразным гелием. Наблюдения за состоянием консервированной ткани продолжались до 3 месяцев. Характер изменений в тканях изучали с использованием морфологических и биохимических тестов, а также путем трансплантации. Установлено, что кожные и костные трансплантаты, консервированные в среде газообразного гелия при комнатной температуре, пригодны как пластический материал для лечения больных с ожогами и больных с заболеваниями костей.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 611.651:615.832.98

Изучение морфологической сохранности овариальной ткани на этапах низкотемпературной консервации. Ошерова О. А., Панкова Е. Я., Дедух Н. В. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 107—110.

Изучали действие низких температур на морфологическую сохранность овариальной ткани и отрабатывали методы защиты при замораживании с помощью криопротекторов и щадящего режима охлаждения. Отмечено, что ферментативная активность овариальной ткани зависит от возрастающих концентраций ПЭО-400. Снижение активности ферментов отмечается после перфузии яичника 10—20%-ным ПЭО-400, явное изменение ферментативной активности выражено после перфузии раствором криофилактика в концентрации 30% и выше. При анализе препаратов яичников, охлажденных до —196° после перфузии раствором ПЭО-400 в концентрации 10—20—30—40%, выявлено, что деструктивные изменения больше выражены при быстром, чем при медленном одноэтапном охлаждении.

УДК 612.444:086:615.832.98

Нарушения ультраструктуры спермиев при низкотемпературной консервации. Осташко Ф. И., Скорняков Б. А. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 110—114.

В работе изучены закономерности ультраструктурных нарушений спермиев на основных этапах низкотемпературной консервации. Описана методика количественной оценки, представлены данные, отражающие нарушения элементов морфологии и микрофотографии типичных повреждений ультраструктуры спермиев. Показано, что степень отрицательного действия возрастает по мере прохождения технологических этапов консервации. Это выражается количеством поврежденных клеток и соотношением клеток с сильными и слабыми морфологическими нарушениями. Наиболее повреждаемыми структурными элементами спермиев являются цитоплазматическая мембрана и акросома.

Табл. 1. Рис. 4. Библ. 7.

УДК 611.651.1:616—089.842:577.17

Содержание серотонина в трансплантате яичника. Чуйко В. А., Медведева И. А., Ошерова О. А. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 114—116.

При исследовании содержания серотонина в трансплантате яичника — свежезаготовленного и подвергнутого замораживанию (—196°) без применения криозащитных веществ — отмечено в обоих случаях снижение содержания серотонина на 3, 5 и 14-е сутки. В эти сроки уменьшался и вес трансплантатов. Восстановление содержания серотонина в тканях трансплантата и увеличение его веса отмечалось лишь при пересадке свежезаготовленной железы; к 30-м суткам содержание серотонина возвращалось к исходному уровню. В тканях замороженного яичника в отличие от свежезаготовленного содержание серотонина не восстанавливалось, не наблюдалось и увеличения веса трансплантата.

Библ. 12.

УДК 611.841.2:612.015.11:615.832.98

Влияние низких температур (—196°) на дыхательную функцию роговой оболочки человека. Юрченко Т. Н., Шарлай Т. М. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 116—117.

В статье излагаются вопросы определения жизнеспособности роговой оболочки, подвергнутой воздействию низких температур. В качестве теста биологической сохранности использована интенсивность кислорода и гистоэнзимологическое определение сукцинатдегидрогеназы. Полученные данные свидетельствуют о выраженном повреждающем действии низких температур, что проявляется в значительном снижении дыхания и изменении распределения зерен формазана во всех слоях роговой оболочки. Наиболее чувствительны к повреждающему действию низких температур клетки эндотелия и эпителия роговицы. Авторы считают, что низкие температуры вызывают нарушение митохондриальных мембран.

УДК 537.363:612.117:678.048:616.001.19

Изучение дзета-потенциала клеток в связи с механизмом криозащиты. Воротилин А. М., Бурмака Л. Г. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 117—120.

Исследовано влияние различных криофилактиков на сохранность эритроцитов в процессе низкотемпературной консервации. Установлено, что способность к гемолизу клеток убывает с ростом концентрации диметилформамида и диэтиленгликоля. Обратный эффект наблюдается в растворах мальтозы, ацетамида и мочевины. Изучение дзета-потенциала эритроцитов в этих растворах показало, что наибольшее разрушение клеток наблюдается при понижении указанного потенциала.

Табл. 1. Библ. 12.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 547.422:615.9

Токсикологическая характеристика полиэтиленоксида с молекулярным весом 400. Наконечный А. А., Михайличенко З. П. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 120—121.

Полиэтиленоксид с молекулярным весом 400 скармливали белым крысам в дозах, в несколько раз превышающих предполагаемую терапевтическую. Определена физиологическая индифферентность препарата $ЛД_{50}$: для самцов она составляет 12,3 *г/кг* веса, для самок — 8—5 *г/кг*. Установлено отсутствие токсического влияния при длительном внутрибрюшинном введении полиэтиленоксида белым крысам в дозе, составляющей 1/5 $ЛД_{50}$.

Табл. 2. Библ. 4.

УДК 615.387:611—018.51

Клиническое применение размороженных эритроцитов. Карташевский Н. Г., Михнович Е. П., Шулутко Л. С., Ханина Т. М., Кузьмин В. А. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 121—124.

В работе приводятся первые наблюдения по клиническому применению трансфузий размороженных эритроцитов больным с анемиями разного происхождения. Размороженные эритроциты готовили деглицеринизацией двумя методами: троекратным и предлагаемым двукратным методами отмывания. При применении размороженных эритроцитов наблюдалась высокая лечебная эффективность. Отмечены некоторые преимущества двукратного метода деглицеринизации: сокращение времени, затрачиваемого на отмывание, а также уменьшение количества отмывающего раствора.

Табл. 2.

УДК 615.387:612.014.43

Выбор оптимального режима оттаивания для ядросодержащих клеток крови, консервированных глубоким охлаждением. Полякова А. И., Гордиенко Е. А. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 124—126.

Исследовано влияние разных режимов оттаивания на жизнеспособность лейкоцитов периферической крови человека, замороженных по двухэтапной программе (1° в 1 *мин* от +20° до —15° и 300—400° в 1 *мин* до —196° под защитой ПЭО-400 в 10, 15 и 20%-ной концентрациях). Полученные результаты свидетельствуют о лучшей сохранности клеток при быстром оттаивании.

Табл. 1. Библ. 7.

УДК 615.383:611—018.53:615.832.98

Влияние скорости замораживания на жизнеспособность лейкоцитов периферической крови. Иткин Ю. А., Полякова А. И., Гордиенко Е. А. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 127—129.

Изучена выживаемость лейкоцитов периферической крови при консервации лейкомассы по десяти режимам замораживания под защитой полиэтиленоксида с молекулярным весом 400 в трех концентрациях. Обнаружено, что лейкомасса неоднородна по отношению к условиям консервации Оптимальный режим для моноядерных клеток по сравнению с полиядерными смещен в сторону больших скоростей замораживания.

Библ. 4.

УДК 612.119:616—089.843:616—006:616—08

Эффективность трансплантаций криоконсервированной аллогенной миелоидной ткани онкологическим больным при химио- и лучевой терапии. Бабийчук Г. А., Маркова О. П., Луговой В. И., Обозная Э. И., Воловельская Е. Л., Шевердин Ю. П., Вартанова Л. А. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 129—131.

В работе с помощью клинических и биохимических методов исследования изучалась терапевтическая эффективность трансплантаций аллогенного костного мозга онкологическим больным с гипоплазией кроветворения. Показано, что пересадка миелоидной ткани ведет к частичной нормализации гемопоэза.

Табл. 1. Библ. 9.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 615.387:547.422:547.427

Сравнительная оценка эффективности различных криофилактиков при низкотемпературной консервации ядерных клеток крови. Лобынцева Г. С., Щербак Г. М. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 131—133.

Проведено сравнительное исследование полиэтиленоксидов и оксиэтилированных пэнтаэритритов различных молекулярных весов, применяемых в качестве криофилактиков при консервации лейкомассы, полученной из донорской крови. Установлено, что полиэтиленоксид молекулярного веса 400 и оксиэтилированный пэнтаэритрит с молекулярным весом 466 в 10%-ной концентрации обеспечивают наилучшую сохранность клеток, замороженных со скоростью 1° в 1 *мин* от +20° до —15° и 300° в 1 *мин* от —15° до —198° и отогретых в водяной бане при +42°.

Табл. 2.

УДК 611—018.46:678.048

Опыт длительного хранения консервированного костного мозга при температуре —196°. Лаврик С. С., Глухенькая Г. Т., Когут Г. И., Карабанова Л. Л., Афанасьева Е. Ю., Коротя Т. А. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 133—136.

Разработан метод консервирования и длительного хранения костного мозга глубоким замораживанием при температуре —196° с помощью защитной среды, содержащей низкомолекулярный поливинилпирролидон. Жизнеспособность клеток консервированного костного мозга определялась с помощью комплекса методов. При хранении клеток консервированного костного мозга в жидком азоте в течение 8 лет жизнеспособные клетки составили 84%.

Библ. 9.

УДК 615.014.8:678.5:611—018.46

Пластмассовые контейнеры для замораживания и длительного хранения костного мозга. Пушкарь Н. С., Обозный Э. П. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 136—139.

В настоящей работе описаны контейнеры одноразового пользования из полиэтилена высокого давления марки П-2020т, разработанные в институте.

Результаты лабораторных и клинических испытаний полиэтиленовых контейнеров, модифицированных радиохимическим облучением, показали высокую биологическую инертность материала и большую механическую прочность. Низкая стоимость контейнеров при массовом производстве позволяет использовать их одноразово. Авторы рекомендуют применять полиэтиленовые контейнеры в медицинской практике.

Рис. 2. Библ. 2.

УДК 611—018:621.565

Использование прямоугольной жидкоазотной камеры для хранения эритроцитов в парах азота. Киселев А. Е., Рудаев Я. А., Федорова Л. И., Полякова Л. П., Демкин Г. И. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 139—141.

В статье рассматриваются предпосылки создания прямоугольного рефрижератора для хранения биологических объектов (эритроцитов) в парообразной фазе жидкого азота. Представлены сравнительные данные о гемолизе эритроцитов, хранившихся при двух температурных режимах: в парах азота (—138°, —165°) и жидком азоте (—196°). Подтверждено, что длительное хранение клеток в парах жидкого азота не оказывает повреждающего действия.

Табл. 2. Рис. 3.

УДК 616—7 616.314 621.56

Стоматологический криозонд. Никитин В. А., Медведев Е. М., Муринец-Маркевич Б. Н., Носов М. Е., Григорьева К. В. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 141—143.

Описаны автоматический стоматологический криозонд и методика лечения пульпы зуба с помощью воспроизведения локального крионекроза. Конструкция криозонда позволяет получать направленную капиллярную струю жидкого хладоагента и обеспечивает мгновенную подачу и прекращение подачи хладоагента. В качестве последнего применяется жидкий азот.

Рис. 2.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 615.47:66.047.2

Лиофилизационная приставка к универсальному вакуумному посту ВУП-2К. Скорняков Б. А. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 143—144.

В статье представлены схема и краткое описание приставки к универсальному посту, позволяющей лиофилизировать биологические объекты с целью фиксации их для электронно-микроскопических исследований. Приставка состоит из вакуумно-контактного фланца, помещаемого на столик поста ВУП, вакуумпровода с соединительным фланцем, стеклянного сублиматора со съемным стаканчиком для образцов и криостата. Предложенный конструктивный принцип позволяет изготавливать приставки к любым вакуумным постам для сублимации различных объектов. Лиофилизационная приставка дает возможность осуществлять предварительное замораживание объектов и контролировать температуру сушимого образца и парогазовой смеси в сублиматоре.

Рис. 1.

УДК 611—018.46:612.565

Исследование процессов замораживания костного мозга трупов на низкотемпературной установке. Медведев П. М., Фисанович Т. И., Недельский Г. Т. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 114—148.

Приведены краткое описание конструкции и технико-эксплуатационные данные низкотемпературной (—180°) установки для замораживания костного мозга и ядросодержащих элементов крови. Описаны результаты выполненных с помощью этой установки термографических исследований костного мозга трупов, защищенного как высокоэффективными, так и малоэффективными криоконсервантами. Обоснован термографический признак высокоэффективной хладозащитной среды.

Библ. 7.

УДК 591.475.475:615.832.97

Изменение слизистой оболочки полости рта подопытных животных при криовоздействии. Григорьева К. В., Котык Е. А. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 148—149.

Исследовалась возможность применения низких температур для лечения предопухолевых заболеваний полости рта. Экспериментально установлено, что при замораживании слизистой жидким азотом с экспозицией 10 *сек* наступает некроз эпителиального слоя, а при более длительной экспозиции — некроз собственно слизистой и подслизистой. Полученные данные могут служить обоснованием метода криотерапии в патологии слизистой полости рта.

УДК 578.6:612.015.11

Электронно-микроскопическое исследование глюкозо-6-фосфатазной активности в гепатоцитах крыс в период компенсаторно-приспособительной реакции. Зыбин В. С. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 150—152.

Электронно-микроскопическое исследование глюкозо-6-фосфатазной активности в гепатоцитах крыс в период компенсаторно-приспособительной реакции вызывало снижение глюкозо-6-фосфатазной активности в канальцах гранулярного и агранулярного эндоплазматического ретикулума, а также в перинуклеарном пространстве.

Библ. 12.

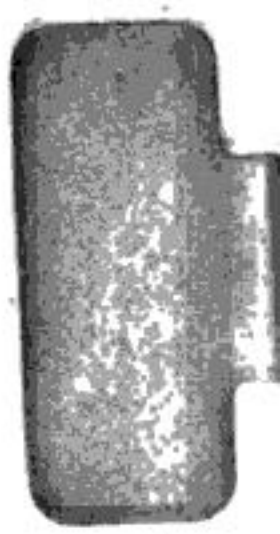
УДК 578.6:612.015.11

Ультраструктурные изменения гепатоцитов крыс в период компенсаторно-приспособительной реакции. Зыбин В. С., Серебряков Н. Г. — В кн.: Криобиология и криомедицина, вып. 1. Киев, «Наукова думка», 1975, с. 152—155.

Изучение общих закономерностей адаптации клеток может в значительной степени способствовать выяснению перестройки метаболических процессов в клетках и органах при разных методах консервации. С помощью электронно-микроскопического метода анализа ультраструктуры клеток проведено исследование тонкого строения гепатоцитов при компенсаторно-приспособительной реакции, обусловленной физической нагрузкой. Оказалось, что большинство клеточных компонентов в период адаптации клетки изменяется. Характер ультраструктурных изменений свидетельствует об интенсификации биоэнергетических процессов.

Рис. 3. Библ. 2.

Матеріал, захищений авторським правом



Матеріал, захищений авторським правом

1 руб. 53 коп.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКОВА ДУМКА»

Матеріал, захищений авторським правом