

ISSN 0233-7673

КРИОБИОЛОГИЯ

2|88



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

В. И. Грищенко (главный редактор), А. М. Белоус (зам. гл. редактора), Ю. П. Благой, Р. Г. Бутенко, Б. Н. Вепринцев, В. И. Гольданский, В. И. Луговой, Ф. И. Ссташко, Е. Я. Панков, Л. А. Пирузян, Н. С. Пушки- карь, Б. П. Сандомирский, А. С. Снурников, К. М. Сытник, А. М. Утев- ский, А. Г. Федотенков, А. А. Цуцаева, В. И. Шумаков, Т. Н. Юрченко

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

С. И. Аксенов (Москва), Н. Г. Бакрадзе (Тбилиси), М. Е. Бекер (Рига), П. В. Бело- шицкий (Киев), Д. М. Гродзинский (Киев), В. Н. Запорожан (Одесса), Л. В. Кала- куцкий (Пущино, Моск. обл.), В. А. Наер (Одесса), В. А. Никитин (Харьков), Г. П. Пи- наев (Ленинград), Г. Б. Сергеев (Москва), М. А. Соловьева (Киев), Н. Г. Соломонов (Якутск), Н. Н. Тимофеев (Москва), В. М. Чередниченко (Харьков), В. В. Шенталь (Мос- ква), Э. З. Эмирбеков (Махачкала)

EDITORIAL BOARD

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

EDITORIAL COUNCIL

S. I. Aksenow (Moscow), N. G. Bakradze (Tbilisi), M. E. Beker (Riga), P. V. Beloshitsy (Kiev), D. M. Grodzinsky (Kiev), V. N. Zaporozhan (Odessa), L. V. Kalakutsky (Puk- chino, Moscow region), V. A. Naer (Odessa), V. A. Nikitin (Kharkov), G. P. Pinayev (Leningrad), G. B. Sergeyev (Moscow), M. A. Solovyeva (Kiev), N. G. Solomonov (Ya- kutsk), N. N. Timofeyev (Moscow), V. M. Cherednichenko (Kharkov), V. V. Shenta! (Moscow), E. Z. Emibekov (Makhachkala)

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ОТДЕЛЕНИЕ ФИЗИОЛОГИИ

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ
И ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

КРИБИОЛОГИЯ

2 1988

ВСЕСОЮЗНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Основан в январе 1985 года
выходит 4 раза в год

Киев Наукова думка 1988

СОДЕРЖАНИЕ

<i>Бабийчук Г. А.</i> Реакции организма на краниocereбральную гипотермию . . .	3
<i>Кирпатовский В. И.</i> Динамика насыщения срезов почки крысы диметилсульфоксидом при различных его концентрациях и температурных условиях . . .	8
<i>Цуцаева А. А., Гольцев А. Н., Слабкая И. А., Снурников А. С., Хайкин Р. К.</i> Использование математического моделирования для изучения процессов восстановления кроветворения летально облученных мышей после трансплантации костного мозга . . .	14
<i>Паращук Ю. С., Гордиенко Е. А., Кулешова Л. Г.</i> Влияние процессов замораживания-оттаивания на морфофункциональные показатели спермиев человека . .	19
<i>Тарасов В. Ф., Гальченко С. Е., Степанов И. О.</i> Динамика теплообразования в организме сусликов <i>Citellus undulatus</i> при пробуждении от зимней спячки . . .	22
<i>Нугманова Л. Б., Исмаилов С. И.</i> Динамика основных показателей системы иммунитета у больных послеоперационным гипотиреозом при лечении методом свободной трансплантации криоконсервированной щитовидной железы . . .	24
<i>Семенченко О. А., Кравченко Л. П., Луговой В. И.</i> Изучение эффективности полиэтиленгликоля-400 и диметилсульфоксида при криоконсервации изолированных клеток печени . . .	30
<i>Морозова Т. Ф., Зинченко А. В., Зинченко В. Д., Нардид О. А.</i> Термоиндуцированные переходы миозина в области температур ниже 273 К . . .	34
<i>Шафранов В. В., Тен Ю. В., Резницкий В. Г., Цыганов Д. И., Кожевников В. А.</i> СВЧ- и криовоздействие на биоткани в эксперименте и клинике . . .	38
<i>Запорожан В. Н., Хаит О. В., Морозов В. Г., Татарова А. М., Хавинсон В. Х., Пресняк И. Н.</i> Комплексное криохирургическое с тималином лечение гиперпластических процессов эндо- и миометрия . . .	43
<i>Никитин В. А., Куцевляк В. Ф., Крупник П. Б., Малик Т. Я.</i> Обоснование экономической эффективности применения оксигенации тканей в условиях локальной гипотермии при заболеваниях пародонта . . .	47

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

<i>Репина С. В., Цымбал Л. В.</i> Влияние цитоскелетных белков на температурозависимые перестройки в мембранах эритроцитов . . .	49
<i>Бронштейн В. Л., Бидный С. Ю., Кулешова Л. Л., Коций С. В.</i> Диаграмма состояния бинарной системы 1,1-ди-(β' -гидроксиэтокси)-2,3 пропандиол—вода . . .	51
ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИЙ . . .	52

© Издательство «Наукова думка», «Криобиология», 1988

This One



5W8W-ULQ-NQ48

Матеріал, захищений авторським правом

CONTENTS

<i>Babiychuk G. A.</i> Body reactions to craniocerebral hypothermia	3
<i>Kirpatovsky V. I.</i> The dynamics of saturation of rat kidney slices with dimethyl sulfoxide of different concentrations at various temperatures	8
<i>Tsutsayeva A. A., Goltsev A. N., Slabkaya I. A., Snurnikov A. S., Khaykin R. K.</i> The use of mathematic modelling for investigation of recovering hemopoietic processes in lethally irradiated mice after transplantation of bone marrow	14
<i>Parashchuk Yu. S., Gordiyenko E. A., Kuleshova L. G.</i> The effect of freeze-thawing on morphological and functional indices of human spermatozoa	19
<i>Tarasov V. E., Galchenko S. E., Stepanov I. O.</i> The dynamics of heat production in ground squirrels <i>Citellus undulatus</i> during arousal after hibernation	22
<i>Nugmanova L. B., Ismailov S. I.</i> The dynamics of main indices in patients with postoperative hypothyrosis treated by the method of free transplantation of cryopreserved thyroid gland	24
<i>Semenchenko O. A., Kravchenko L. P., Lugovoj V. I.</i> Investigation of the efficiency of PEG-400 and DMSO upon cryopreservation of isolated hepatocytes	30
<i>Morozova T. F., Zinchenko A. V., Zinchenko V. D., Nardid O. A.</i> Thermal transitions in myosin at temperatures below 273 K	34
<i>Shafranov V. V., Ten Yu. V., Reznitsky V. G., Tsyganov D. I., Kozhevnikov V. A.</i> Experimental and clinical UHF- and cryoapplication to biological tissues	38
<i>Zaporozhan V. N., Khait O. V., Morozov V. G., Tatarova A. M., Khavinson V. Kh., Presnyak I. N.</i> Complex cryosurgical treatment of hyperplastic processes in endometrium and myometrium using thymalin	43
<i>Nikitin V. A., Kutsevlyak V. F., Krupnik P. B., Malik T. Ya.</i> The substantiation of economic efficiency of application of tissue oxygenation under conditions of local hypothermia in treating paradontosis	47
 SHORT COMMUNICATIONS	
<i>Repina S. V., Tsymbal L. V.</i> The effect of cytokeletal proteins on temperature-dependent transformations in erythrocyte membranes	49
<i>Bronstein V. L., Bidny S. Yu., Kuleshova L. L., Koshchiiy S. V.</i> The diagram of the state of binary system 1,1-di- (β' -hydroxyetoxy)-2,3 propane diol — water	51
DEFENSE OF THESES	52

Адрес редакции:

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

Ответственный секретарь редакции **Ф. А. Приходько**
Научный редактор **В. И. Луговой**
Редактор **Л. А. Рябинина**
Технический редактор **В. Н. Волкова**
Корректор **Н. П. Спичак**

Сдано в набор 15.01.88. Подл. в печ. 25.03.88. БЦ 22654. Формат 70×108/16. Бум. тип. № 1. Выз. печ. Усл. печ. л. 3,5. Уч.-изд.л. 5,22. Усл. кр.-отт. 5,6. Тираж 1000 экз. Заказ №7-584. Цена 65 к. Отпечатано с матриц Харьковской книжной фабрики им. М. В. Фрунзе в Харьковской городской типографии № 16, 310003, Харьков, Университетская, 16. Зак. 673.

Г. А. Бабийчук

РЕАКЦИИ ОРГАНИЗМА НА КРАНИОЦЕРЕБРАЛЬНУЮ ГИПОТЕРМИЮ

Важным этапом в развитии лечебных методов охлаждения явилось обоснование и применение краниocereбральной гипотермии (КЦГ), что позволило понижать температуру тела, сохраняя температурный градиент между мозгом и внутренними органами в пределах 2—4 °С. Такой способ гипотермии снижает долю периферических рецепторов, участвующих в формировании ответа на генерализованное холодовое воздействие, и в значительной мере предопределяет выраженность неспецифических ответных реакций.

КЦГ при частичном медикаментозном выключении центров терморегуляции приводит к существенному изменению функционального статуса организма и, в частности, центральной нервной и сердечно-сосудистой систем. Степень выраженности этих изменений зависит от глубины и длительности гипотермического воздействия, которое в значительной мере обусловлено ответной реакцией центров терморегуляции, расположенных в основном в передних и задних отделах гипоталамуса.

Поскольку функционирование центральных механизмов терморегуляции осуществляется при участии норадренергических, серотонинергических, дофаминергических и холинергических нейромедиаторных систем [3] и во многом зависит от соотношения концентраций норадреналина и серотонина [7], вопрос о взаимоотношении регуляторных систем, обеспечивающих запуск механизмов терморегуляции, является весьма актуальным с теоретической и практической точек зрения. Поэтому всестороннее исследование синаптических процессов при гипотермических температурах позволит более полно оценить влияние КЦГ на функциональное состояние головного мозга, что может приблизить нас к пониманию молекулярно-клеточных нейрoхимических механизмов, лежащих в основе ответных реакций организма при использовании КЦГ, и, таким образом, получить данные для практических рекомендаций.

Исследования проводились на белых крысах-самцах массой 150—180 г линии Вистар, полученных из питомника АМН СССР «Столбовая». Им проводили КЦГ, применяя установку для программного охлаждения, созданную в Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР и позволяющую одновременно проводить КЦГ пяти животным. Для частичного блокирования реакций терморегуляции в ответ на охлаждение у мелких животных применяли инъекции 5 %-ного раствора тиопентала натрия в сочетании с 20 %-ной гамма-оксимасляной кислотой (ГОМК).

Секрецию ^3H -норадреналина в динамике КЦГ в опытах *in vivo* изучали методом локальной суперперфузии гипоталамуса с использованием push-pull канюли [1]. В опытах *in vitro* секрецию и захват нейромедиаторов определяли в фракции синапсом, выделенных из коры и гипоталамуса охлажденных животных по методу [8]; транспорт ионов Ca^{2+} синапсом — по [6]. Секрецию ^3H -норадреналина и ^3H -серотонина синапсом изучали, используя метод деполяризации синапсом ионами K^+ (50 мМ) [9]. Для ингибирования потенциал зависимых Ca^{2+} каналов в среду прединкубации добавляли верапамил (изоптин, фирма «ЛЕК», СФРЮ) с концентра-

цией в среде 100 мкМ. Определение активности аденилатциклазы в тканях мозга производилось методом [4].

Начальный период проведения КЦГ (15 мин) животным сопровождался усилением секреции ^3H -норадреналина в преоптической области гипоталамуса (табл. 1), которое сравнимо с величинами усиления высвобождения ^3H -норадреналина у группы животных, гипоталамус которых перфузировали раствором Кребса-Рингера с высоким содержанием ионов K^+ (60 мМ).

Т а б л и ц а 1

Секреция ^3H -норадреналина и ^3H -серотонина в преоптической области переднего гипоталамуса и в заднем гипоталамусе крыс при КЦГ

Экспериментальные серии	Уровень секреции ^3H -норадреналина ($M \pm m$)		Уровень секреции ^3H -серотонина ($M \pm m$)			
	Преоптическая область		Задний гипоталамус		Преоптическая область	
	Спонтанная секреция	K^+ -стимулированная секреция	Спонтанная секреция	K^+ -стимулированная секреция	Спонтанная секреция	K^+ -стимулированная секреция
Норма ($n = 12$)	$0,81 \pm 0,05$	$2,45 \pm 0,11$	$0,64 \pm 0,01$	$1,85 \pm 0,28$	$0,76 \pm 0,04$	$2,27 \pm 0,09$
Начало охлаждения (15 мин, $n = 6$)	$2,47 \pm 0,4^*$	—	$0,71 \pm 0,04$	—	$1,00 \pm 0,1$	—
КЦГ 32°C ($n = 12$)	$0,73 \pm 0,02$	$1,29 \pm 0,16^*$	$0,69 \pm 0,08$	$1,09 \pm 0,02$	$0,74 \pm 0,05$	$0,89 \pm 0,06^*$

П р и м е ч а н и е. * — различия по сравнению с нормой достоверны, $p < 0,05$.

Снижение температуры тела до $32\text{—}30^\circ\text{C}$ уменьшало спонтанное и особенно K^+ -индуцированное высвобождение медиатора в 1,9 раза по отношению к контролю. Такая динамика изменений в секреции ^3H -норадреналина обнаружена в преоптической области, однако при исследовании заднего гипоталамуса подобной закономерности секреции норадреналина не выявлено. В связи с тем, что повышение содержания ионов K^+ создает условия для деполяризации пресинаптических окончаний, выхода норадреналина и повышения нейрональной активности, усиление высвобождения ^3H -норадреналина в данных экспериментах при действии КЦГ является, очевидно, следствием активации группы нейронов, имеющих аксонные связи с передним гипоталамусом.

На начальных этапах, а также при дальнейшем понижении температуры тела до $32\text{—}30^\circ\text{C}$ КЦГ не изменяла показатели спонтанной секреции ^3H -серотонина, однако при этом уровень K^+ -стимулированного высвобождения медиатора уменьшался более чем в два раза по сравнению с контролем.

Параллельно с изучением динамики секреции медиаторов у одних и тех же животных нами исследована сверхмедленная биоэлектрическая активность в секундном диапазоне частот в коре и гипоталамусе. Установлено, что на первом этапе охлаждения одновременно с усилением секреции норадреналина в переднем гипоталамусе увеличивается мощность колебаний секундного ритма с последующим снижением при температуре тела 32°C . Полученные данные указывают на связь сверхмедленных колебаний секундного диапазона при КЦГ с нейрохимическими процессами, а их усиление в преоптической области может отражать повышенную реактивность норадренергической функциональной системы. Усиление секреции ^3H -норадреналина и биоэлектрической активности следует рассматривать как пусковой процесс реакций терморегуляции: чем раньше при более высокой температуре усиливается биоэлектрическая активность мозга, тем медленнее охлаждается организм, и наоборот. Полученные нами результаты свидетель-

ствуют о том, что терморегуляторные механизмы, ведущие к снижению скорости охлаждения, включаются только на фоне синхронности сверхмедленной активности в коре головного мозга (коэффициент корреляции $> 0,7$), возникающей через 15—20 мин после начала охлаждения, что, по-видимому, объясняется улучшением передачи возбуждения в нервных клетках ЦНС. Проведенное изучение спектральных функций биоэлектрической активности коры и гипоталамуса показало, что при низких значениях коэффициентов корреляции четкие закономерности в характере кривых спектрограмм отсутствуют, а при высоких — в спектре доминирует секундный диапазон осцилляций. Экспериментальные данные свидетельствуют также о важной роли моноаминов в механизмах запуска терморегуляции в ответ на КЦГ, а действие нейромедиаторов, в частности норадреналина, при КЦГ проявляется в биоэлектрических феноменах сверхмедленной ритмики, что дает возможность оценить активность компенсаторных реакций, в частности терморегуляции по электроэнцефалографическим показателям колебаний потенциалов в секундном диапазоне частот. Изучая секрецию норадреналина и серотонина из синапсом в опытах *in vivo*, мы установили, что в первые 15 мин после начала КЦГ усиливается выход ^3H -норадреналина из синапсом коры на 90 % по сравнению с нормой, а в гипоталамусе — на 140 % (табл. 2). В то же время в аналогичных экспериментальных условиях секреция ^3H -норадреналина под влиянием охлаждения не изменялась. Снижение температуры тела до 34°C сопровождалось усилением секреции ^3H -норадреналина в гипоталамусе по сравнению с предыдущим этапом охлаждения на 64 % и нормой — на 293 %, в то время как секреция этого медиатора из синапсом коры уменьшалась на 62 %. При этих температурах тела уровень высвобождения ^3H -серотонина из гипоталамуса снижался на 62 % по сравнению с нормой. Представленные данные согласуются с результатами исследований по изучению секреции ^3H -норадреналина в опытах *in vivo*, в которых также выявлены факты усиления секреции ^3H -норадреналина и ингибирование высвобождения ^3H -серотонина на начальных этапах КЦГ.

Таблица 2

Действие КЦГ на секрецию ^3H -норадреналина и ^3H -серотонина синапсом

Условия эксперимента ($n = 5$)	Секреция ^3H -нейромедиаторов, имп/мин/мг белка			
	^3H -норадреналин		^3H -серотонин	
	кора ($M \pm m$)	гипоталамус ($M \pm m$)	кора ($M \pm m$)	гипоталамус ($M \pm m$)
Контроль	31011 $\pm$ 4149	33978 $\pm$ 828	117111 $\pm$ 9462	144250 $\pm$ 22860
Действие наркоза	22072 $\pm$ 2023	24620 $\pm$ 2498**	78371 $\pm$ 2132	123640 $\pm$ 15176
Начало охлаждения	58767 $\pm$ 3746 *	81530 $\pm$ 4938*	92108 $\pm$ 5266*	119498 $\pm$ 26932
КЦГ 34°C	22275 $\pm$ 2491	133627 $\pm$ 12232*	107356 $\pm$ 9724	55173 $\pm$ 5194*
Контроль	15326 $\pm$ 1092	8933 $\pm$ 917		
Действие наркоза	9482 $\pm$ 1876***	5388 $\pm$ 921***		
КЦГ 32°C	4577 $\pm$ 631***	6331 $\pm$ 982		
Действие наркоза	9162 $\pm$ 1368***	6459 $\pm$ 844		
через 6 ч				
КЦГ 32°C через 6 ч	5191 $\pm$ 793***	6325 $\pm$ 377		

Примечание. * — различия по сравнению с контролем достоверны, $p < 0,01$; ** — различия по сравнению с действием наркоза, $p < 0,05$; *** — различия по сравнению с контролем достоверны, $p < 0,05$.

Умеренное охлаждение животных до температуры тела 32°C сопровождается снижением секреции ^3H -норадреналина синапсом коры головного мозга (табл. 2), однако в гипоталамусе по отношению к контролю с наркозом она при этом не уменьшалась. Пролонгирование гипотермии в течение 6 ч достоверно не изменяло в гипоталамусе уровень секреции ^3H -норадреналина.

Учитывая важную регулирующую роль Ca^{2+} , являющегося одним из главных звеньев в механизмах секреции нейромедиаторов, мы исследовали особенности базального и K^+ -индуцированного захвата Ca^{2+} синапсосомами, выделенными из коры и гипоталамуса головного мозга при КЦГ.

Исследование этих процессов показало, что при охлаждении тела экспериментальных животных с помощью КЦГ до 32°C в синапсосомах, выделенных из гипоталамуса, увеличивается K^+ -стимулированный захват, $^{45}\text{Ca}^{2+}$ до 9298 ± 440 имп/мин/мг белка (при контроле 7966 ± 425 имп/мин/мг белка). Однако в коре головного мозга этот процесс практически не меняется. Факт повышения захвата ионов Ca^{2+} синапсосомами, выделенными из гипоталамуса при охлаждении организма до 32°C , прежде всего связан с необходимостью поддержания адекватного уровня секреции норадреналина, поскольку известно, что повышение концентрации ионов Ca^{2+} в нервных клетках способствует деполяризации нервных окончаний и высвобождению нейромедиаторов.

Для более полного раскрытия механизма действия КЦГ на нейротрансмиссивную передачу в структурах мозга нами изучены кинетические параметры α_2 -адренорецепторов (α_2 -АР). Как следует из полученных данных, КЦГ до температуры тела 32°C не изменяет степень сродства α_2 -АР, так как кинетические параметры связывания радиолигандов рецепторами (Kd) и максимальное количество (B_{max}) оставались на уровне контроля (табл. 3). Результаты исследований показывают, что в динамике секреции ^3H -норадреналина, захвата ионов Ca^{2+} и функциональных свойств α_2 -АР при КЦГ прослеживается определенная связь между указанными выше процессами, свидетельствующая о том, что при охлаждении организма до 32°C функция механизма высвобождения норадреналина сохраняется.

Таблица 3

Динамика кинетических параметров α - и β -адренорецепторов под влиянием КЦГ

Серии экспериментов ($n = 12$)	α_2 -АР		β -АР	
	Kd , нМ	B_{max}	Kd , нМ	B_{max}
Норма	$7,01 \pm 0,58$	$237,8 \pm 8,3$	$1,57 \pm 0,18$	$181,5 \pm 4,2$
Действие наркоза	$7,88 \pm 0,82$	$262,0 \pm 31,5$	$3,0 \pm 0,24^{**}$	$157,2 \pm 8,19^*$
			$0,783 \pm 0,012^{**}$	$90,0 \pm 3,2$
КЦГ 32°C	$7,47 \pm 0,27$	$266,8 \pm 17,9$	$1,25 \pm 0,012^{**}$	$86,2 \pm 4,08$

Примечание. β -АР—фмоль/мг белка, ** — $p < 0,001$, * — $p < 0, 2$.

При изучении кинетических параметров β -АР после применения наркоза в мембранах нервных клеток обнаружены рецепторы с низким (Kd — $3,0 \pm 0,24$ нМ; B_{max} — $157,2 \pm 8,19$ фмоль/мг белка) и высоким сродством к лиганду (Kd — $0,783 \pm 0,072$ нМ; B_{max} — $90,0 \pm 3,2$ фмоль/мг белка) в отличие от показателей нормы (Kd — $1,57 \pm 0,18$ нМ; B_{max} — $181,5 \pm 4,2$ фмоль/мг белка). КЦГ до температуры 32°C снимает эффекты наркоза, о чем свидетельствует снижение константы диссоциации к показателям нормы ($1,25 \pm 0,012$ нМ), а количество рецепторов уменьшается ($86,2 \pm 4,08$ фмоль/мг белка), табл. 3.

При исследовании роли аденилатциклазы (АЦ) в охлажденном организме как «второго посредника», запускающего сложные биохимические реакции, выявлено, что умеренная КЦГ (32°C) снижает ее активность в тканях мозга до $0,59 \pm 0,06$ пмоль цАМФ/мг белка / мин ($p < 0,001$) по сравнению с контролем — $1,38 \pm 0,08$ пмоль/мг/мин. Добавление к ферментному препарату неспецифического активатора фторида натрия (NaF) незначительно изменяло активность АЦ ($0,88 \pm 0,07$ пмоль/мг/мин, $p < 0,01$) по сравнению с базальной. Несколько увеличивалась актив-

ность фермента в случае применения изопротеренола, осуществляющего активизацию аденилатциклазы через β -адренорецепторы ($0,91 \pm 0,1$ пмоль/мг/мин, $p < 0,02$) [5].

Пролонгирование КЦГ до 6 ч увеличивало активность аденилатциклазы в случае применения NaF до $2,31 \pm 0,26$ пмоль/мг/мин ($p < 0,002$) по сравнению с контролем (на наркоз) $0,69 \pm 0,02$ пмоль/мг/мин, в то время как добавление изопротеренола не изменяло активности фермента ($0,68 \pm 0,04$ пмоль/мг/мин, $p < 0,1$). Спустя сутки после пролонгированного охлаждения существенно понижалось количество ферментного препарата без применения эффекторов ($0,15 \pm 0,01$ при контроле $1,38 \pm 0,08$ пмоль/мг/мин, $p < 0,001$). Чувствительность АЦ была снижена к NaF до $1,08 \pm 0,19$ пмоль/мг/мин ($p < 0,001$) и к изопротеренолу — до $0,14 \pm 0,008$ пмоль/мг/мин ($p < 0,1$) по сравнению с аналогичными показателями в предыдущей серии.

Можно полагать, что десенсибилизация аденилатциклазной системы в тканях мозга при гипотермии объясняется уменьшением числа мест связывания для нейротрансмиттера в результате массивного выброса норадреналина на начальных этапах охлаждения, а также диссоциацией активного комплекса рецептор-фермент, в пользу чего свидетельствует снижение стимуляции аденилатциклазной системы посредством NaF.

КЦГ, применяемая в наших экспериментах, является причиной усиления активности нейронов коры головного мозга, что в свою очередь активирует ретикулярную формацию и влияет на усиление секреции норадреналина в преоптической области переднего гипоталамуса. Функциональное значение эффекта усиления секреции норадреналина в преоптической области гипоталамуса при охлаждении, по-видимому, обусловлено необходимостью активации процессов терморегуляции прежде, чем термочувствительные холодовые нейроны этой области начнут реагировать на сдвиг температуры от set point. Описанные взаимодействия между норадреналином и серотонином играют важную роль в механизмах запуска терморегуляции и температурной адаптации организма. Можно предположить, что наблюдаемые в экспериментах изменения свойств синаптической передачи представляют собой структурно-функциональные изменения синаптических мембран.

В процессе КЦГ происходят функциональные изменения метаболической и гормональной среды мозга, что, в свою очередь, приводит к модификации процессов секреции и обратного захвата.

Сопоставляя результаты, касающиеся изменений секреции норадреналина, захвата ионов Ca^{2+} и кинетики α_2 -адренорецепторов, мы пытались охарактеризовать изменения в механизмах нейротрансмиттерной передачи при КЦГ.

Существует гипотеза [2], согласно которой пресинаптические адренорецепторы принимают непосредственное участие в высвобождении медиатора с помощью механизма отрицательной обратной связи, зависящей от концентрации медиатора в пресинаптической щели. Предполагают также, что повышение активности α_2 -рецепторов уменьшает доступность кальция в важном процессе сопряжения возбуждение-секреция, т. е. существует второй независимый механизм пресинаптической регуляции высвобождения нейромедиаторов.

Анализ полученных результатов показывает аналогию направленности процессов секреции ^3H -норадреналина, захвата $^{45}\text{Ca}^{2+}$ и кинетических параметров α_2 -адренорецепторов, тем самым свидетельствуя о преобладании механизма отрицательной обратной связи для регуляции высвобождения норадреналина в ответ на раздражение холодным фактором.

Полученные результаты по изучению секреции и обратного захвата ^3H -норадреналина, серотонина и входа в синапсомы ионов Ca^{2+} могут свидетельствовать о том, что на уровне температуры тела 32°C создается качественно новое состояние синаптических процессов, призванных, оче-

видно, оказывать активное влияние на интеграцию и регуляцию вегетативных, обменных и эндокринных функций.

Реагирование ЦНС на температурные воздействия сопровождается синхронностью сверхмедленной активности коры и гипоталамуса, наличием ритмических компонентов в секундном диапазоне частот. Мы считаем, что генез сверхмедленных колебаний секундного диапазона при КЦГ связан с нейрохимическими процессами норадренергической синаптической передачи, и усиление сверхмедленных процессов может указывать на повышенную реактивность адренергической функциональной системы в ответ на охлаждение.

Приведенные материалы экспериментов свидетельствуют о том, что перестройка сверхмедленных процессов головного мозга при КЦГ интегрально отражает активность адаптационных механизмов в ответ на охлаждение.

Физиологическая сущность активации и последующего угнетения активности ЦНС под влиянием КЦГ заключается в выработке механизма приспособления обменных процессов в тканях организма к изменившимся условиям, мобилизации неспецифических и специфических защитных реакций. Выполняя функцию регуляторов, система медиаторов оперативно реагирует на изменившиеся требования, включая более или менее интенсивное функционирование мозга и всего организма в целом.

Следовательно, при адаптации биологически активные вещества вызывают перестройку реакций организма на новый уровень функционирования.

1. Годухин О. В., Жариков А. Д. Push-pull канюля для локальной перфузии головного мозга с одновременной регистрацией электрической активности // Физиологич. журн. им. Сеченова.— 1979.— 65, — № 1.— С. 141—143.
2. Ланге С. З. Пресинаптические адренорецепторы и регуляция высвобождения // Освобождение катехоламинов из адренергических нейронов.— М.: Медицина.— 1982.— С. 59—82.
3. Лупандин Ю. В. Медиаторные механизмы терморегуляции // Физиология терморегуляции.— Л.: Наука, 1984.— С. 348—377.
4. Ткачук В. А., Балденков Г. Г. Выделение, очистка и характеристика регуляторных свойств аденилатциклазы сердца кролика // Биохимия.— 1978.— 43.— Вып. 6.— С. 1097—1110.
5. Чижевская И. В. Влияние гипотермии на сопряжение β -адренорецепторов с аденилатциклазной системой в ЦНС // Важнейшие теоретические и практические проблемы терморегуляции: Тез. докл. II Всесоюз. конф. по терморегуляции.— Минск, Б. и. 1986.— С. 315.
6. Blanstein M. P., Ratzlaff R. W., Schweitzer E. S. Control of intracellular calcium in presynaptic nerve terminals // Fed. Proc.— 1980.— 39, N 10.— P. 2790—2795.
7. Feldberg W., Myers R. A new concept of temperature regulation by amines in the hypothalamus // Nature.— 1963.— 200, — N 4913.— P. 1313—1325.
8. Hajos F. An improved method for the preparation of synaptosomal fractions in high purity // Brain Res.— 1975.— 93.— P. 485—489.
9. Haycock J. W., Levi W. B., Deuner L. A., Cotman C. W. Effects of elevated $(K^+)_o$ on the release of neurotransmitters from cortical synaptosomes: efflux or secretion? // J. Neurochem.— 1978.— 30, N 5.— P. 1113—1127.

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

Поступила 12.02.86

УДК 57.043

В. И. Кирпатовский

ДИНАМИКА НАСЫЩЕНИЯ СРЕЗОВ ПОЧКИ КРЫСЫ ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДОМ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ЕГО КОНЦЕНТРАЦИЯХ И ТЕМПЕРАТУРНЫХ УСЛОВИЯХ

Сохранение жизнеспособности органов при криоконсервации во многом определяется эффективностью защитных мероприятий, проводимых в подготовительном периоде. Основным фактом защиты органов в этот период

является насыщение раствором криопротектора, эффективность которого в значительной степени зависит от условий его добавления в раствор, концентрации и температуры насыщения.

Оценке динамики насыщения ткани органов криопротектором при различных температурах посвящен ряд работ [1, 2, 6]; в [3, 7] исследовалась проницаемость ткани почки для диметилсульфоксида (ДМСО). Однако в этих работах не проводился анализ влияния концентрации протектора и температуры насыщения на параметры проницаемости ткани почки для ДМСО.

Целью данного исследования является количественное определение параметров проницаемости срезов почки крысы для ДМСО в процессе насыщения при различных концентрациях протектора при 18 и 4 °С, а также изучение влияния на этот процесс предварительного введения ДМСО животным.

Проведено 48 экспериментов на почках белых беспородных крыс массой 180—230 г. Под гексеналовым наркозом удаляли почки и готовили из них срезы толщиной 1—1,5 мм. После отмывания от крови путем споласкивания в холодном физиологическом растворе срезы погружали в консервирующий раствор НИИТиО-2 с добавлением ДМСО в различных концентрациях. В состав раствора входили (г/л): KH_2PO_4 — 1,02, K_2HPO_4 — 3,80, NaHCO_3 — 0,84, Na цитрат — 0,3, Na сукцинат — 0,5, маннит — 38,0. Осмолярность основного раствора 290—300 мосм/л; ДМСО добавляли в концентрации от 10 до 60 %.

Инкубацию срезов почки в растворе проводили при температурах 16—18 и 2—4 °С. Для уменьшения возможности ишемического повреждения клеток почки при инкубации в условиях 16—18 °С проводили постоянную оксигенацию консервирующего раствора 96 % O_2 + 4 % CO_2 .

Через фиксированные промежутки времени регистрировали изменение массы срезов, брали пробы ткани почки для определения в ней содержания ДМСО и пробы перфузата для определения активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) набором реактивов фирмы «Берингер». Тканевое содержание ДМСО находили по осмолярности гомогената, приготовленного на дистиллированной воде в соотношении 1 : 9, регистрируемой на осмометре «Эдванс Диги Мэтик Осмометр 3D II» (США). В начале и конце периода насыщения брали пробы ткани для определения содержания K^+ и Na^+ (на пламенном фотометре фирмы «Цейс»), молочной кислоты (набором реактивов фирмы «Берингер») и общетканевого содержания воды (методом высушивания до постоянной массы). С целью количественной оценки процесса насыщения рассчитывали следующие параметры: содержание ДМСО в ткани почки, скорость накопления ДМСО в почке и процент насыщения ткани почки ДМСО от максимально возможного.

Тканевое содержание ДМСО (C) рассчитывали по формуле:

$$C = \frac{(R - 420) \cdot W \cdot 0,078}{P}, \text{ мг/г сухой массы,}$$

где R — тканевая осмолярность почки в данный момент насыщения, мосм/кг; 420 — тканевая осмолярность интактных почек, мосм/кг; W — тканевое содержание воды в данный момент насыщения, г; P — сухая масса ткани почки, г; 0,078 — коэффициент, полученный при умножении 78 (перевод содержания ДМСО из ммоль в мг) на 1000 (перевод массовых единиц из кг в г). Скорость накопления ДМСО в ткани почки (V) рассчитывали по формуле:

$$V = \frac{C_1 - C_2}{t}, \text{ мг/мин/г сухой массы,}$$

где C_1 — тканевое содержание ДМСО в начальный момент времени, мг/г сухой массы; C_2 — тканевое содержание ДМСО в конечный момент времени, мг/г сухой массы; t — время между измерениями, мин. Процент насыще-

ния ткани почки ДМСО от максимально возможного рассчитывали по формуле:

$$\frac{(R_n - 420) W}{P_1 \cdot R_p \left(\frac{C_p - C_n}{C_p} \right) \left(\frac{P_1 - P_2}{P_1} \right)},$$

где R_n — осмолярность ткани почки в данный момент насыщения, мосм/кг; 420 — осмолярность ткани интактной почки, мосм/кг; W — содержание

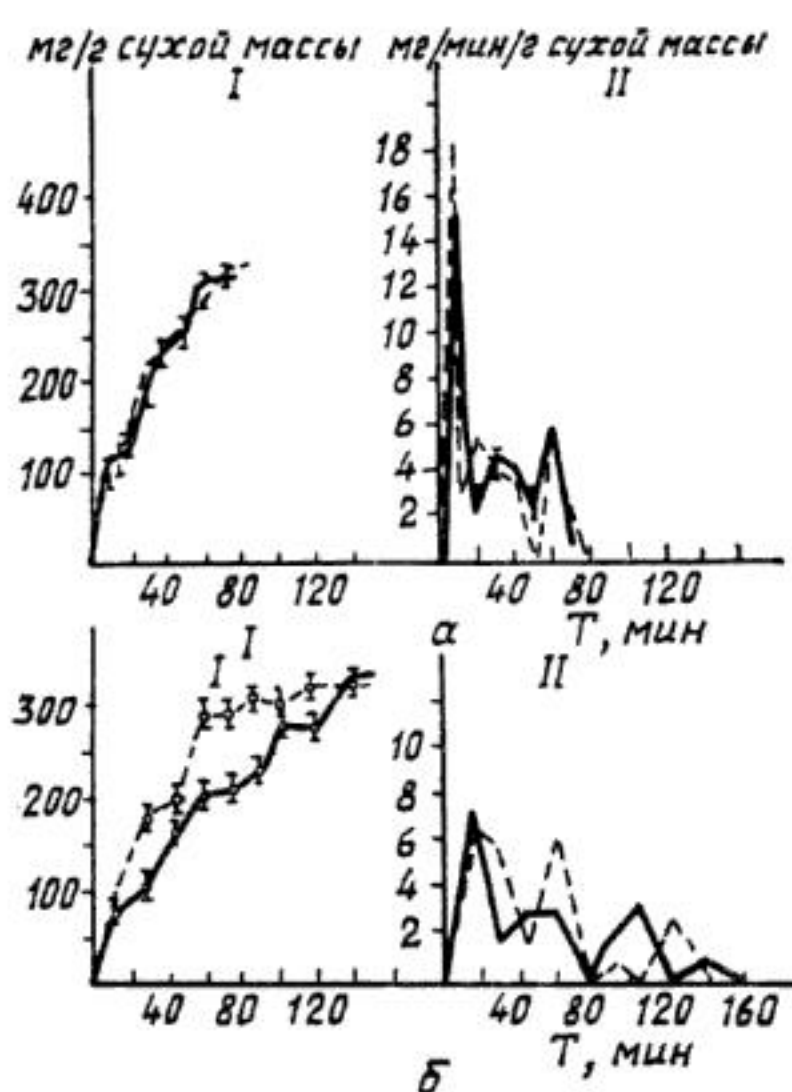


Рис. 1

Рис. 1. Динамика проникновения ДМСО в ткань почки (I) и скорости его накопления (II) при насыщении срезов почки крысы в 20 %-ном растворе ДМСО при 18°C (а) и при 4°C (б):

— срезы почек интактных крыс;
- - - срезы почек крыс, которым предварительно вводили ДМСО 0,5 г/кг за 3—4 ч до опыта

Рис. 2. Динамика насыщения срезов почки крысы ДМСО при 4°C в растворе с различной концентрацией криопротектора: 1 — 10 %, 2 — 20 %, 3 — 40 %, 4 — 60 %

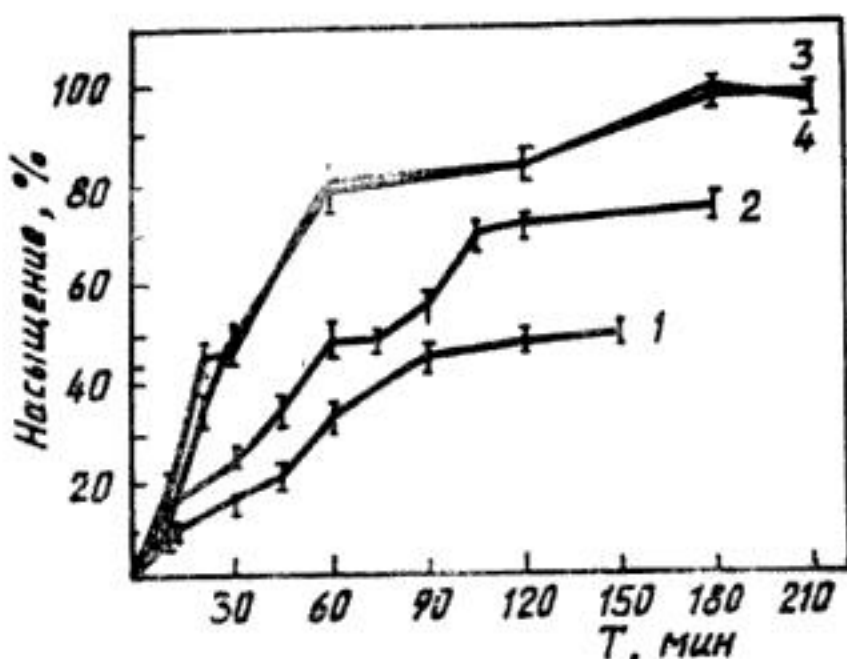


Рис. 2

Рис. 3. Изменение скорости насыщения срезов почки ДМСО во времени при 4°C в зависимости от концентрации криопротектора в насыщающем растворе: 1 — 10 %, 2 — 20 %, 3 — 40 %, 4 — 60 %

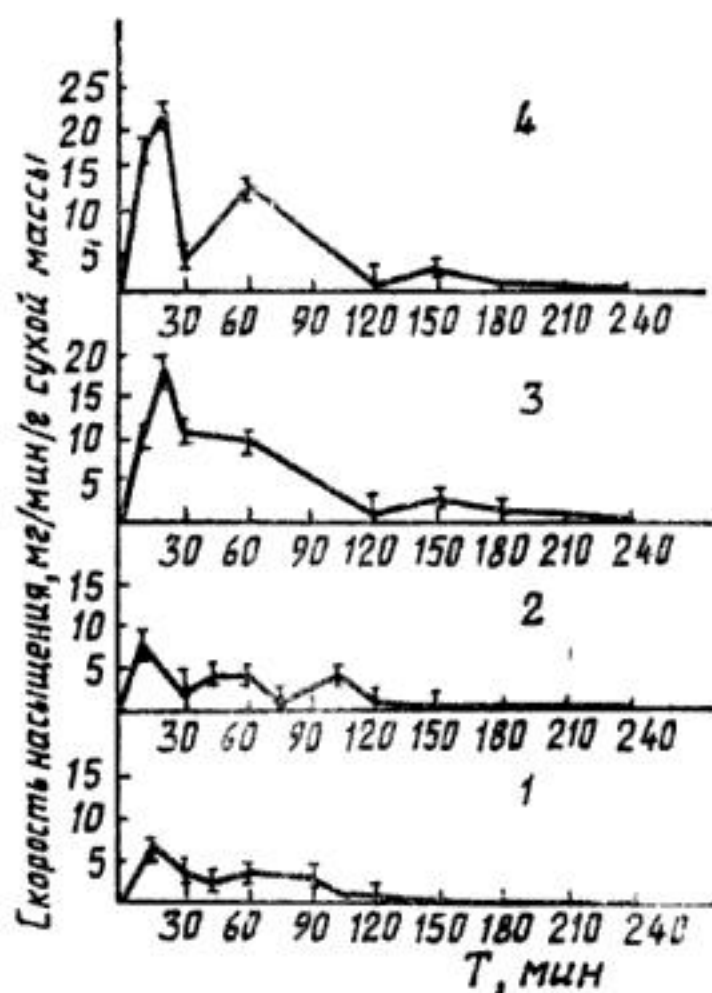


Рис. 3

воды в почке в данный момент насыщения, г; P_1 — начальная сырая масса почки, г; P_2 — сырая масса почки в данный момент насыщения, г; R_p — осмолярность насыщающего раствора криопротектора, мосм/кг; C_p — содержание ДМСО в насыщающем растворе, мг; C_n — содержание ДМСО в почке в данный момент насыщения, мг.

В части опытов за 3—4 ч до экспериментов животным вводили ДМСО внутривенно в дозе 0,5 г/кг. Статистическую обработку проводили по методу Стьюдента, достоверность разницы результатов оценивали по критерию t .

При погружении срезов почки в раствор с криопротектором ДМСО сразу проникал в почечную паренхиму. Однако этот процесс протекал неравномерно (рис. 1). Было зарегистрировано 3 периода ускоренного поступления ДМСО в ткань срезов почки, которые чередовались с периодами замедленного его поглощения, причем они выявлялись как при насыщении в условиях 18 °С, так и при 4 °С. При более низкой температуре длительность процесса увеличивается, скорость насыщения достоверно ниже, но периоды ускоренного и замедленного насыщения за счет этого более четко выражены. Стабилизация тканевого содержания ДМСО наступала при 18 °С через 60 мин инкубации, а при 4 °С — через 135 мин.

В процессе насыщения срезов почек ДМСО в различных концентрациях (от 10 до 60 %) при 4 °С периоды ускоренного и замедленного проникновения ДМСО в ткань почки сохранялись (рис. 2,3), причем при всех концентрациях совпадали по времени. Скорость проникновения ДМСО в срезы с увеличением концентрации протектора в насыщающем растворе возрастала (рис. 3).

Неравномерность процесса насыщения может быть связана с неодновременностью насыщения вне- и внутриклеточного пространства за счет низкой проницаемости клеточных мембран для ДМСО и с изменением этой проницаемости во времени. Сразу после погружения срезов в насыщающий раствор криопротектор плохо проникает в клетки и насыщает преимущественно внеклеточное пространство. Отражением этого процесса являются отмеченный нами 1-й период ускоренного проникновения ДМСО в срезы почки и последующее замедление этого процесса. Затем в результате прямого контакта поступившего криопротектора с компонентами клеточной мембраны происходит изменение ее физико-химических свойств, в том числе повышается проницаемость для ДМСО. Поэтому 2-й период ускоренного насыщения срезов почки криопротектором связан, на наш взгляд, с усиленным поступлением ДМСО во внутриклеточный сектор и продолжающейся диффузией во внеклеточное пространство, последний этап — с дальнейшим повышением проницаемости цитоплазматической мембраны для ДМСО.

Сходная динамика проникновения криопротектора была обнаружена Мейзуrom и др. [6] в опытах по насыщению 2 М ДМСО и глицерином поджелудочной железы плода крысы при 22 и 0 °С. Выделены, по крайней мере, 2 периода ускоренного насыщения ткани железы криопротектором, причем неравномерность насыщения во времени более выражена в условиях пониженной проницаемости ткани для протектора, а именно в условиях 0 °С и при использовании глицерина в качестве криопротектора. Авторы также объясняют наблюдаемый процесс неравномерным проникновением криопротектора во вне- и внутриклеточное пространство.

Слабое разграничение 1-го и 2-го периодов ускоренного насыщения срезов в опытах с использованием высоких концентраций ДМСО (40 и 60 %) объясняется, по-видимому, повреждением клеточных мембран вследствие резкого осмотического стресса при погружении срезов в эти растворы и быстрым возрастанием их пассивной проницаемости. Это подтверждается данными по выходу ЛДГ из срезов почки в окружающий раствор. При использовании 20 %-ного ДМСО достоверное увеличение активности ЛДГ в растворе начинается после 2 ч инкубации; в опытах с 40 %-ным ДМСО активность ЛДГ через 2—4 ч инкубации была достоверно выше, чем в опытах с 20 %-ным ДМСО (рис. 4).

Для подтверждения предположения, что в результате контакта клеточной мембраны с ДМСО ее исходно низкая проницаемость для этого соединения повышается, были проведены эксперименты по предварительному введению ДМСО животным, рассчитанные на то, что такая модификация клеточных мембран произойдет заранее и обнаружатся более высокие скорости насыщения. Это предположение подтвердилось (рис. 1). В опытах с предварительным введением ДМСО прослеживалось объединение 1-го и 2-го периодов ускоренного насыщения, что свидетельствовало об ускоре-

нии поступления ДМСО во внутриклеточное пространство, увеличении скорости проникновения ДМСО в ткань почки в начальный период насыщения и сокращении времени достижения максимальной тканевой концентрации криопротектора. Особенно это ускорение выражено при 4 °С.

Необходимо отметить, что лишь при концентрации ДМСО в 40 и 60 % насыщение срезов почки приближалось к максимально возможному, составляя 98 и 96 % соответственно. При инкубации в 20 %-ном ДМСО насыщение составило 80 %, а в 10 %-ном — лишь 50 % от максимально возможного.

Неполное насыщение срезов почки ДМСО могло быть связано с затруднением диффузии криопротектора в ткань почки, так как использовались толстые срезы (1—1,5 мм). Однако при сопоставлении наших результатов с данными, опубликованными в работе [3], где в сходных условиях проводили насыщение более тонких срезов почек кролика (0,5 мм), не было найдено существенной разницы в количестве ДМСО, поглощенного тканью

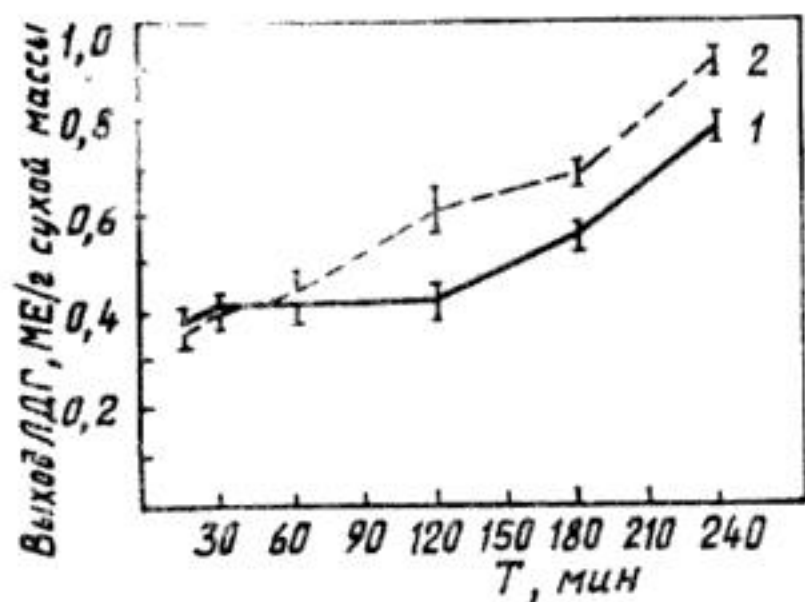


Рис. 4. Влияние концентрации ДМСО в насыщающем растворе на динамику выхода ЛДГ из срезов почки: 1 — 20 %, 2 — 40 %

почки на 1 г сухой массы. В опытах по насыщению срезов в 20 %-ном ДМСО этот показатель составил 290—320 мг/г сухой массы, а в аналогичных опытах, описанных в работе [3], — 290—330 мг/г сухой массы при использовании 20 %-ного ДМСО в растворе Кребса-Хензелейта, правда, при использовании в качестве основного раствора среды RPS-2 накопление ДМСО составило 400—450 мг/г сухой массы, но это различие может быть объяснено модулирующим действием основного раствора. Учитывая это, а также то, что тканевое содержание ДМСО после 90—105 мин насыщения при 4 °С держится стабильно, лишь слегка увеличиваясь со временем,

можно сделать заключение, что затрудненная диффузия ДМСО при использовании толстых срезов почки не должна определять конечную тканевую концентрацию ДМСО, а может влиять лишь на скорость процесса насыщения. Кроме того, достижение полного насыщения в опытах с высокими концентрациями ДМСО сопряжено с более выраженным повреждением клеток, отражением чего является массивный выход ЛДГ в окружающий раствор (рис. 4). Из этого следует, что возможно существование клеточных механизмов, ограничивающих поступление ДМСО в клетку. Одним из них является низкая проницаемость клеточной мембраны для ДМСО по сравнению с ее проницаемостью для воды. В наших опытах скорость выхода воды из срезов почки в окружающий 20 %-ный раствор ДМСО при 18 °С в первые 10 мин составила 42,2 мг/мин/г сухой массы, а при 4 °С — 27,9 мг/мин/г сухой массы (2,34 и 1,56 ммоль/мин/г сухой массы). В то же время скорость поступления ДМСО в ткань почки при 18 °С составляла 16,7 мг/мин/г сухой массы, а при 4 °С — 9,1 мг/мин/г сухой массы (0,214 и 0,115 ммоль/мин/г сухой массы). Клетка выравнивает осмотический градиент через мембрану не столько за счет поглощения ДМСО, сколько за счет дегидратации. Это было экспериментально подтверждено в работе [3], где непосредственно определяли изменение внутриклеточного содержания воды и ДМСО в процессе насыщения. Было установлено, что клетка в первые минуты после погружения в 20 %-ный ДМСО теряет более 50 % внутриклеточной воды и в последующем лишь частично восстанавливает ее содержание. В работе [7] также обнаружено, что при насыщении почек кролика 3 М ДМСО клетки почечных канальцев оставались дегидратированными в течение всего процесса насыщения. При этом в корковом слое так и не удалось достичь полного насыщения ткани почки криопротектором.

Другим возможным механизмом, препятствующим увеличению внутриклеточного содержания ДМСО, является его связывание с внутриклеточным содержимым, а именно с белками, липидами, углеводами, нуклеиновыми кислотами [3, 4, 5]. Связанный ДМСО не обладает осмотической активностью и поэтому не может быть выявлен методом определения осмолярности гомогената ткани почки. Возможно, что этим процессом обусловлена выявленная нами разница в степени насыщения срезов почки в различных концентрациях ДМСО. При относительно небольших концентрациях (10 и 20 %) с внутриклеточным содержимым связывается количество ДМСО, соизмеримое с общим его содержанием в клетке. При этом тканевая осмолярность оказывается значительно заниженной. При высоких концентрациях ДМСО в насыщающем растворе (40 и 60 %), даже при максимальном связывании с внутриклеточным содержимым, доля ДМСО будет значительно меньше, а следовательно, меньше будет влиять на тканевую осмолярность.

Взаимосвязь между количеством связанного ДМСО и его криозащитным действием, а также токсическим действием неизвестна, но возможно, существуют прямые количественные взаимоотношения между этими тремя параметрами.

Третьим механизмом регуляции внутриклеточного содержания ДМСО может быть активное выведение протектора из клетки. На вероятность существования такого механизма указывают данные об интенсификации клеточных энерготрат в растворах с высокой концентрацией ДМСО (табл.). При инкубации срезов почки в течение 4 ч в растворе с 5, 10, 15 и 20 %-ным ДМСО при 4 °С обнаружено, что с увеличением концентрации ДМСО в растворе прогрессивно увеличивается образование молочной кислоты и ее выход из ткани почки в окружающий раствор. Тканевое содержание K^+ при этом прогрессивно уменьшается.

Влияние концентрации ДМСО в насыщающем растворе на продукцию молочной кислоты и содержание K^+ в срезах почки крысы

Концентрация ДМСО в растворе, %	Содержание молочной кислоты, мг/г сухой массы			Тканевое содержание K^+ , мэкв/кг сухой массы
	В ткани срезов	В растворе	Общая продукция	
0	$20,5 \pm 0,6$	$3,9 \pm 0,2$	$24,4 \pm 0,5$	341 ± 10
5	$14,9 \pm 0,9^*$	$4,2 \pm 0,3$	$19,1 \pm 0,7^*$	330 ± 9
10	$17,6 \pm 1,4$	$4,9 \pm 0,3$	$22,5 \pm 0,8$	317 ± 6
15	$20,3 \pm 0,7$	$5,6 \pm 0,2^*$	$25,9 \pm 0,5$	$309 \pm 7^*$
20	$20,6 \pm 1,3$	$8,2 \pm 0,4^{**}$	$28,8 \pm 0,8^*$	$304 \pm 9^*$

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

Полученные данные свидетельствуют о сложности и многофакторности процесса насыщения органов криопротектором при их подготовке к криоконсервации и ставят под сомнение целесообразность использования концентраций ДМСО выше 15—20 %.

1. Дворцовой В. К. Исследование влияния криопротекторов и отрицательных температур на функцию почки: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. — Харьков, 1986. — 23 с.
2. Carter J. N., Collins J. M., Halasz N. A. Subzero nonfreezing kidney preservation // Transplant. Proc. — 1981. — 13, N 1. — P. 718—720.
3. Clark P., Fahy G. M., Karow A. M. Factors influencing renal preservation. 1. Effect of three vehicle solutions and the permeation kinetics of three cryoprotectants assessed with rabbit cortical slices // Cryobiology. — 1984. — 21, N 2. — P. 260—273.
4. Farrant M. Permeability of guinea pig smooth muscle to nonelectrolytes // J. Physiol. — 1965. — 178, N 1. — P. 1—13.
5. Gerhard E., Gibian H. The metabolism of dimethyl sulfoxide and its metabolic effect in man and animals // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1967. — 141, N 1. — P. 65—76.

6. Mazur P., Rajotte R. V. Permeability of 17-day fetal rat pancreas to glycerol and dimethyl sulfoxide // Cryobiology. — 1981. — 18, N 1. — P. 1—16.
7. Segal N. B., Guttman F. M. Kinetics of permeation and intracellular events associated with Me_2SO permeation of rabbit kidneys during perfusion at 10 °C // Cryobiology. — 1982. — 19, N 1. — P. 41—49.

НИИ трансплантологии
и искусственных органов,
г. Москва

Поступила 30.06.86

УДК 61.001.57

**А. А. Цуцаева, А. Н. Гольцев, И. А. Слабкая, А. С. Снурников,
Р. К. Хайкин**

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МАТЕМАТИЧЕСКОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПРОЦЕССОВ ВОССТАНОВЛЕНИЯ КРОВЕТВОРЕНИЯ ЛЕТАЛЬНО ОБЛУЧЕННЫХ МЫШЕЙ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ КОСТНОГО МОЗГА

После трансплантации летально облученным реципиентам (мышам) гемопоэтической ткани кроветворные клетки оседают в органах лимфоидного комплекса, пролиферируют и дифференцируются в зрелые элементы различных рядов кроветворения. Образование таких элементов является сложным, многостадийным процессом, в регуляции которого принимают участие различные факторы. Ввиду отсутствия объективных способов морфологической идентификации кроветворных клеток не представляется

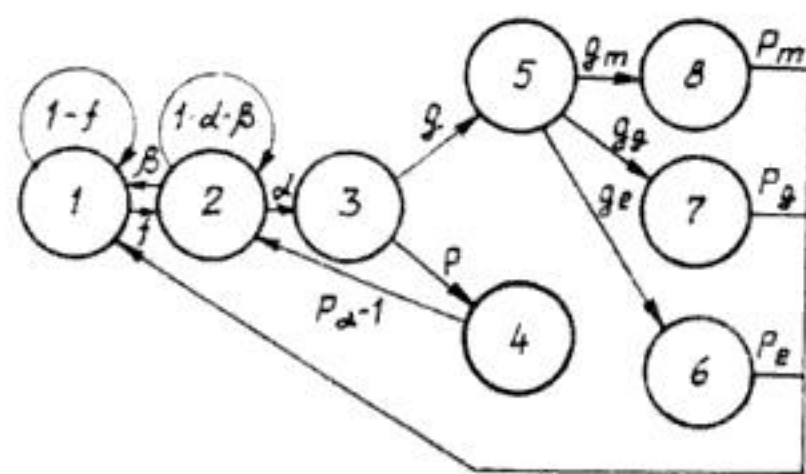


Рис. 1. Граф клеточных переходов в различные состояния

возможным проследить динамику ранних этапов процесса пролиферации и дифференцировки стволовых и коммитированных клеток в организме реципиента. Этим объясняются трудности при изучении характера влияния на этот процесс экстремальных факторов, в частности криоконсервирования.

Для изучения целого ряда свойств стволовых кроветворных клеток (КОЕ_с) применяется метод их клонирования в селезенке летально облученного реципиента (мыши) [7]. Кроветворные клет-

ки после введения начинают пролиферировать и дифференцироваться, в результате в селезенке образуются дискретно-расположенные колонии, каждая из которых образована одной колониеобразующей клеткой и состоит из форменных элементов разной степени зрелости, включая кроветворные клетки [9], количество которых в колонии определяется их размножением и выходом в дифференцировку.

Имеется ряд концепций механизмов, объясняющих процесс кроветворения в целом, последовательность и взаимосвязь отдельных его этапов, а также свойства кроветворных клеток на различных стадиях этого процесса [6]. Проверка степени соответствия этих концепций результатам экспериментальных исследований по клонированию кроветворных клеток может быть осуществлена методами математического моделирования. Однако разработанные ранее математические модели [1,8] не дают возможности получения совокупной информации о динамике роста отдельных колоний, о количественном составе колониеобразующих единиц в селезенке и их дифференцированных потомках, что затрудняет сравнение модели с экспериментом.

В данной работе предлагается модель, имитирующая процессы развития колоний кроветворных клеток и позволяющая получить информацию о количестве и размерах колоний, о продолжительности генерационного цикла, вероятности перехода КОЕ_с из «фазы покоя» в активную фазу и т. д.

Модель реализована на ЭВМ, полученные данные проверялись экспериментально. В основу модели положена гипотеза о том, что процесс кроветворения является вероятностным и регулируемым. На данном этапе моделирования предполагалось, что регуляция процесса кроветворения осуществляется путем изменения следующих основных параметров: вероятности перехода КОЕ_с из «фазы покоя» в активную фазу, вероятности для них остаться в пуле КОЕ_с после митоза из расчета на один генерационный цикл и продолжительности генерационного цикла. Вместе с тем предполагалось, что процесс дифференцировки клеток в различные ряды кроветворения является неуправляемым, т. е. стабильность распределения частот дифференцировки сохраняется. Популяция кроветворных клеток есть некоторая система, состояние которой определяется совокупностью состояний отдельных клеток к определенному моменту процесса. Изменение состояния системы происходит за счет пролиферации и дифференцировки элементов. Клетки могут также выходить в кровяное русло. Вероятность того, что система, находящаяся в некотором состоянии в момент времени t_i , перейдет в другое состояние к моменту времени t_j , зависит только от ее состояния в момент времени t_i и не зависит от состояний системы в моменты времени, предшествующие t_i , т. е. рассматриваем марковский процесс.

Состояние кроветворной клетки определяется ее пребыванием в одной из фаз клеточного цикла, а также зависит от условий компартментализации, что иллюстрирует график марковской цепи (рис. 1). В состоянии 1 КОЕ_с находится в кровяном русле. В модели предполагаем, что каждая КОЕ_с, из числа введенных реципиенту, независимо от других клеток с вероятностью f попадает в селезенку и начинает образовывать колонию. Большинство КОЕ_с попадает в селезенку в «фазе покоя» (состояние 2). Со временем эти клетки могут перейти в активную фазу (состояние 3) с вероятностью α , вернуться в кровяное русло с вероятностью β или остаться в «фазе покоя» с вероятностью $1 - \alpha - \beta$. Однако в начальный момент времени моделировалась наблюдаемая в эксперименте задержка в развитии процесса дифференцировки на время $T_0 = 48$ ч [4]. Гипотеза Скофилда [6] предполагает, что скорость пролиферации попавших в селезенку («нишу») КОЕ_с снижается по мере мультипликации этих клеток в «нише». Следовательно, величина α зависит от численности КОЕ_с, и поэтому регулирование процесса может быть представлено следующей зависимостью:

$$\alpha = 1 - aN^{(2)}(t_i), \quad (1)$$

где $N^{(2)}$ — число КОЕ_с в «фазе покоя» в момент времени t_i во всех селезеночных колониях; a — положительная константа, которая определяется по значениям α и $N^{(2)}$ в норме при отсутствии возмущающих воздействий.

Таким образом, вероятность перехода из «фазы покоя» в активную фазу возрастает с уменьшением числа КОЕ_с и, наоборот, с увеличением числа КОЕ_с — уменьшается.

Число КОЕ_с, перешедших из «фазы покоя» в активную фазу за характерное время Δt , определяем вводя индикатор события $C_k(t_i)$, состоящего в том, что k -я КОЕ_с из m -й колонии перешла из состояния 2 в состояние 3:

$$C_k(t_i) = \begin{cases} 1 & \text{с вероятностью } \alpha \\ 0 & \text{с вероятностью } 1 - \alpha, \end{cases} \quad (2)$$

где $k = (1, n^{(2)})$; $n^{(2)}$ — число КОЕ_с в «фазе покоя» в одной колонии; M — число колоний в селезенке; $m = (1, M)$.

Общее число КОЕ_с в m -й колонии, перешедших из «фазы покоя» в активную фазу за время Δt , равно:

$$n^{(3)}(t_i) = \sum_{k=1}^{n^{(2)}(t_i)} C_k(t_i). \quad (3)$$

А число КОЕ_с, перешедших из «фазы покоя» в активную фазу за время Δt во всех колониях, равно:

$$N^{(3)}(t_i) = \sum_{m=1}^M n^{(3)}(t_i). \quad (4)$$

Индикатор события, состоящего в том, что l -я КОЕ_с из m -й колонии перешла из состояния 2 в состояние 1, определяется следующим образом:

$$d_l(t_i) = \begin{cases} 1 & \text{с вероятностью } \beta \\ 0 & \text{с вероятностью } 1 - \beta. \end{cases} \quad (5)$$

Тогда число КОЕ_с в m -й колонии, вышедших в кровяное русло за время Δt , равно:

$$n^{(1)}(t_i) = \sum_{l=1}^{n^{(2)}(t_i)} d_l(t_i). \quad (6)$$

Проследим «историю» каждой КОЕ_с, попавшей в активную фазу. Эта клетка может подвергнуться дифференцировке с вероятностью q за характерное время Δt (состояние 5), т. е. превратиться в клетку-предшественник одной из линий кроветворения: эритроидной (состояние 6), гранулоцитарной (состояние 7), мегакариоцитарной (состояние 8) или делению с вероятностью p за характерное время τ (состояние 4), где τ — продолжительность генерационного цикла. Величина τ , как указывалось, регулируется и зависит от численности КОЕ_с в селезенке:

$$\tau = \tau_{\min} + bN^{(2)}(t_i), \quad (7)$$

где $\tau_{\min}$ — минимальное время пребывания КОЕ_с в активной фазе клеточного цикла (моделируем его как случайную величину, распределенную по равномерному закону в интервале $[t_1, t_2]$); b — положительная константа, которая определяется по значениям τ , $\tau_{\min}$ и $N^{(2)}$ в норме.

Вероятность дифференцировки одной из дочерних КОЕ_с в j -ю линию кроветворения в интервале $[t, t + \Delta t]$ равна $q_j = \lambda_j \Delta t$, где положительная константа λ_j — частота дифференцировки в данную линию кроветворения. Вероятность отсутствия дифференцировки в интервале $[t, t + \Delta t]$ равна $1 - \lambda \Delta t$. Разобьем интервал τ на частичные интервалы Δt , количество таких интервалов $\frac{\tau}{\Delta t}$. Вероятность того, что не произойдет дифференцировки за время τ , равна $(1 - \lambda \Delta t)^{\tau/\Delta t}$. Переходя к пределу при $\Delta t \rightarrow 0$, получим вероятность пролиферации за время τ

$$p = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} (1 - \lambda \Delta t)^{\tau/\Delta t} \approx \exp(-\lambda \tau). \quad (8)$$

Вводя индикатор события, состоящего в том, что s -я КОЕ_с из m -й колонии перешла из состояния 3 в состояние 4

$$g_s(t_i) = \begin{cases} 1 & \text{с вероятностью } p \\ 0 & \text{с вероятностью } 1 - p, \end{cases} \quad (9)$$

по аналогии с (2) — (4) определяем число КОЕ_с, находящихся в состоянии 2.

Число КОЕ_с в m -й колонии в «фазе покоя»:

$$n^{(2)}(t_i + \Delta t) = n^{(2)}(t_i) - n^{(3)}(t_i) + 2 \sum_{s=1}^{n^{(2)}(t_i)} g_s(t_i) - n^{(1)}(t_i). \quad (10)$$

В уравнении (10) наличие члена $2 \sum_{s=1}^{n^{(2)}(t_i)} g_s(t_i)$ означает тот факт, что разделившиеся клетки сразу же переходят в состояние 2.

Перейдем к количественному описанию процесса дифференцировки. При делении КОЕ_с происходит постепенное коммитирование каждой дочерней клетки с повышенной вероятностью дальнейшей дифференцировки [5]. На определенном этапе морфологически идентифицируемые клеточные элементы делятся с образованием зрелых форм, выходящих в кровяное русло (эритроциты, мегакариоциты, гранулоциты). Тогда, зная число митозов, проделываемых наиболее ранними членами эритроидного, гранулоцитарного и мегакариоцитарного рядов и число митозов в морфологически распознаваемом ряду, мы можем рассчитать количество зрелых клеточных элементов. Запишем изменение численности популяции какой-либо линии кроветворения за время Δt :

$$y_j(t_i + \Delta t) = y_j(t_i) - p_j \Delta t y_j(\Delta t) + x(q_j, \Delta t), \quad (11)$$

где $-p_j \Delta t y_j(\Delta t)$ означает уменьшение популяции за счет выхода в кровяное русло; p_j — вероятность выхода в кровяное русло; $x(q_j, \Delta t)$ — число КОЕ_с, которые вследствие дифференцировки превратились в клетки типа y_j за интервал времени Δt . Общее число КОЕ_с, вышедших в дифференцировку в интервале Δt , равно:

$$x(\Delta t) = \sum_{j=1}^3 x(q_j, \Delta t). \quad (12)$$

В программе, реализующей данную модель, использован метод Монте-Карло; она написана на языке ФОРТРАН-4 для ЭВМ СМ-4. С помощью данной модели была описана динамика функционирования кроветворных клеток после возмущающего действия (облучения). В частности, для описания процессов пролиферации и дифференцировки кроветворных клеток и образования зрелых потомков выводились, в первую очередь, параметры, значения которых определяются экспериментально — количество визуально наблюдаемых колоний, количество так называемых микроколоний, имеющих диаметр менее 0,1 мм, количество колоний эритроидного, гранулоцитарного и мегакариоцитарного ряда, общее число КОЕ_с, число ядерных клеток в колониях. Кроме того, при моделировании регистрировалась динамика внутренних параметров стохастического процесса, таких как вероятность образования КОЕ_с в процессе пролиферации в расчете на один генерационный цикл, вероятность перехода из «фазы покоя» в активную фазу, продолжительность генерационного цикла.

В качестве исходных и постоянных параметров модели использовались следующие: $f = 0,17$; $\lambda_m = 0,01$; $\lambda_g = 0,36$; $\lambda_e = 0,03$; $N^{(2)}$ в норме = 4200; τ в норме = 10 ч; $\tau_1 = 4$ ч; $\tau_2 = 6$ ч. Эти значения были выбраны в соответствии с литературными данными [4,5].

На рис. 2 представлена полученная в модели динамика развития колоний различного типа в селезенке мышей. При подсчете среднего процентного содержания колоний различного типа были получены следующие результаты: эритроидных колоний — 62,5 %; гранулоцитарных колоний — 25 %; мегакариоцитарных колоний — 12,5 %. Полученные величины хорошо согласуются с экспериментальными данными, приведенными в [2]. Уменьшение количества клеток в колониях различного типа в более поздние сроки происходит за счет вымывания зрелых клеток крови в кровяное русло, что также согласуется с экспериментом [2].

Динамику накопления клеток различного типа в колониях в селезенке мышей иллюстрирует рис. 3. Через 10 сут после трансплантации в колониях эритроидного типа формируется $\sim 2 \cdot 10^7$ ядерных клеток, в колониях гранулоцитарного типа $\sim 5 \cdot 10^6$ ядерных клеток. Эти данные согласуются с данными [4]. Однако динамика роста КОЕ_с, полученная в модели, несколько расходится с экспериментальными данными [3], что, по нашему мнению, связано с принятой в модели стабильностью дифференцировки КОЕ_с. В действительности интенсивность дифференцировки не является

постоянной величиной, что проявляется в повышенной скорости дифференцировки на 5—7-е сут при одновременном уменьшении скорости накопления КОЕ_с.

Таким образом, в работе рассмотрена математическая модель, с помощью которой возможно изучить механизмы регуляции пролиферации и дифференцировки КОЕ_с. Нами изучен один из возможных механизмов регуляции КОЕ_с, когда параметры α и τ являются регулируемыми величинами, а параметры λ_m , λ_e , λ_g постоянны. Сравнение с экспериментом показало необходимость введения в модель более сложных вариантов регуляции, а именно, регуляции дифференцировки КОЕ_с в различные ряды кроветворения.

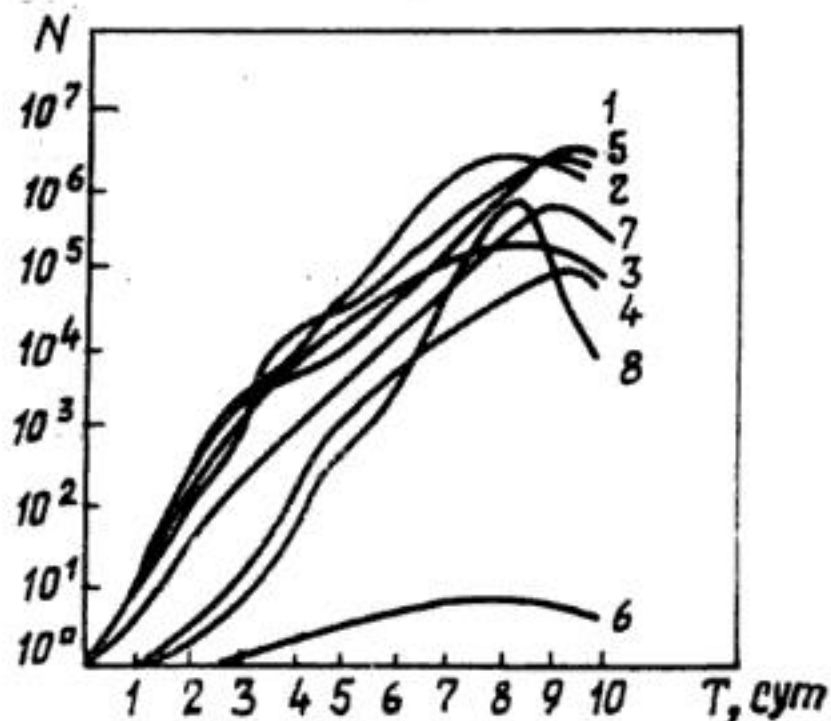


Рис. 2. Динамика развития колоний различного типа в селезенке мышей: 1, 2, 5, 7, 8 — эритроидные колонии; 3, 4 — гранулоцитарные колонии; 6 — мегакариоцитарная колония. По оси ординат — количество клеток в колонии

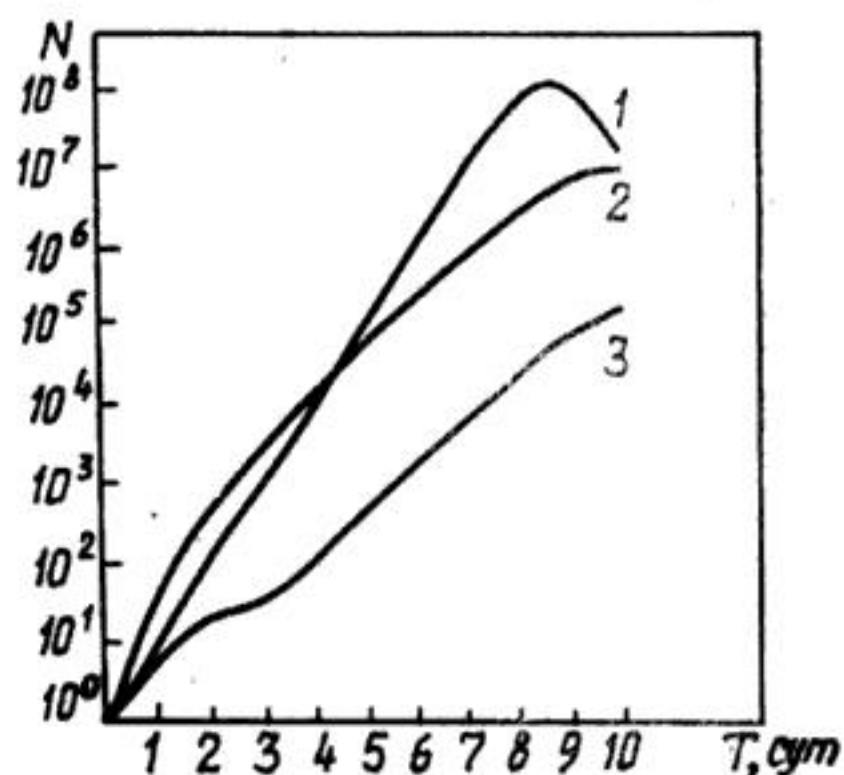


Рис. 3. Динамика накопления ядерных элементов в колониях эритроцитов (1), гранулоцитов (2) и динамика накопления КОЕ_с (3). По оси ординат — суммарное количество клеток во всех селезеночных колониях

1. Перцев Н. В. Некоторые результаты математического моделирования процессов размножения и дифференцировки стволовых кроветворных клеток в селезенке облученных мышей // Математические модели в иммунологии и медицине. — М.: Мир, 1986. — С. 199—211.
2. Цуцаева А. А., Гольцев А. Н., Останкова Л. В. Влияние низких температур на иммунобиологические свойства стволовых гемопоэтических клеток // Роль стволовых клеток в лейкозо- и канцерогенезе. — Киев: Наук. думка, 1977. — С. 74—78.
3. Цуцаева А. А., Гольцев А. Н. «Хомминг» и пролиферация кроветворных клеток (КОЕ_с) криоконсервированного костного мозга в селезенке и костном мозге реципиента // Криобиология. — 1987, № 4. — С. 9—15.
4. Чертков И. Л., Фриденштейн А. Я. Клеточные основы кроветворения. — М.: Медицина, 1977. — 270 с.
5. Чертков И. Л., Гуревич О. А. Стволовая кроветворная клетка и ее окружение. — М.: Медицина, 1984. — 238 с.
6. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. A hypothesis // Blood Cells. — 1978. — 4. — P. 7—25.
7. Till J. E., McCulloch E. A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells // Rad. Res. — 1961. — 14, N 12. — P. 213—233.
8. Till J. E. A stochastic model of stem cell proliferation based on the growth of spleen colony forming cells // Proc. Natl. Acad. Sci. — 1964. — 51, No 1. — P. 29—36.
9. Trentin J. J. Hemopoietic inductive microenvironment // Stem Cells of Renewing Cell Populations. — New York: Acad. Press., 1976. — P. 255—264.

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

Поступила 16.07.87

Ю. С. Паращук, Е. А. Гордиенко, Л. Г. Кулешова

ВЛИЯНИЕ ПРОЦЕССОВ ЗАМОРАЖИВАНИЯ-ОТТАИВАНИЯ НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ СПЕРМИЕВ ЧЕЛОВЕКА

С использованием в клинических условиях метода искусственной инсеминации при бесплодии возникла необходимость разработки способов криоконсервирования и длительного хранения спермы человека. Для успешного решения данного вопроса необходимо всесторонне исследовать особенности повреждений спермиев при воздействии низких температур [1,2]. Целью настоящей работы явилось изучение влияния охлаждения-оттаивания на двигательную активность спермиев человека и процессы кристаллизации.

Семенную жидкость замораживали в отсутствие криопротектора и под защитой глицерина в 10 %-ной концентрации. Охлаждение осуществляли четырьмя способами: 1) сперму охлаждали со скоростью 1 °С/мин до 5 °С и экспонировали при этой температуре в течение 30 мин, затем замораживали со скоростью 20—25 °С/мин до —140 °С и далее — форсированно до —196 °С; 2) сперму охлаждали со скоростью 20—25 °С/мин до —140 °С и далее форсированно до —196 °С; 3) сперму охлаждали со скоростью 1 °С/мин до —15 °С, экспонировали при этой температуре в течение 30 мин, далее охлаждали со скоростью 20—25 °С/мин до —140 °С и после этого — форсированно до —196 °С; 4) сперму охлаждали со скоростью 1 °С/мин до —140 °С и далее — форсированно до —196 °С. Особенности спермограмм исследовали с помощью микроскопа ЛЮМАМ-Р2. Влияние различных программ замораживания на сперму человека изучали криомикроскопически. Температуру контролировали дифференциальной термопарой, помещенной непосредственно в эякулят. Точность измерения температуры составляла $\pm 0,5$ °С. Скорость отогрева 10 °С/мин. Кинетику физико-химических явлений в замораживаемом образце регистрировали кинематографически в режиме кадровой съемки. Подвижность спермиев после криоконсервации под защитой 10 %-ного глицерина в процентном отношении составила $43,7 \pm 2,5$; $39,8 \pm 1,4$; $30,3 \pm 4,2$; $10,1 \pm 3,6$ соответственно указанным программам замораживания. Таким образом, наиболее высокую подвижность имеют спермии, замороженные по первой программе.

Криомикроскопический анализ процессов кристаллизации и плавления в суспензии показал, что по мере снижения температуры подвижность спермиев существенно снижается. При температуре 5 °С их движения становятся в основном колебательными и по истечении 25—30 мин полностью прекращаются. При температуре ниже 2 °С движение спермиев отсутствует. При отогреве эякулята, в случае благоприятного исхода цикла замораживание-отогрев, подвижность клеток восстанавливается в этой же температурной зоне (2—5 °С).

Поскольку семенная жидкость представляет собой вязкую среду, при охлаждении она значительно переохлаждается, что обуславливает формирование мелкокристаллической структуры льда независимо от программы охлаждения. Так, если при охлаждении незащищенных спермиев температура замерзания составляла —11 °С, то в среде, содержащей 10% глицерина, фазовый переход наблюдался при более низких температурах.

В отсутствие криопротектора в среде замораживания сформировавшаяся при фазовом переходе мелкокристаллическая структура льда претерпевает рекристаллизационные изменения, которые более выражены при медленном охлаждении (программы 3, 4; рис. 1), чем при быстром (программы 1, 2; рис. 2). После отогрева в препарате наблюдается фрагментация спер-

миев (рис. 1), головки их несколько увеличены. Независимо от программы замораживания двигательная активность спермиев полностью утрачивается.

При замораживании эякулята в присутствии глицерина 10 %-ной концентрации по первой программе сформировавшаяся первичная кристаллическая структура льда претерпевает не столь выраженные рекристаллизационные изменения вплоть до температуры -140°C . При отогреве рекристаллизационные перестройки наблюдались в области температур от -40°C до -30°C , т. е. при температурах, превышающих эвтектическую температуру водного раствора глицерина. Ввиду наличия в этой области температур жидкой фазы в образцах процесс рекристаллизации, по-видимому, не

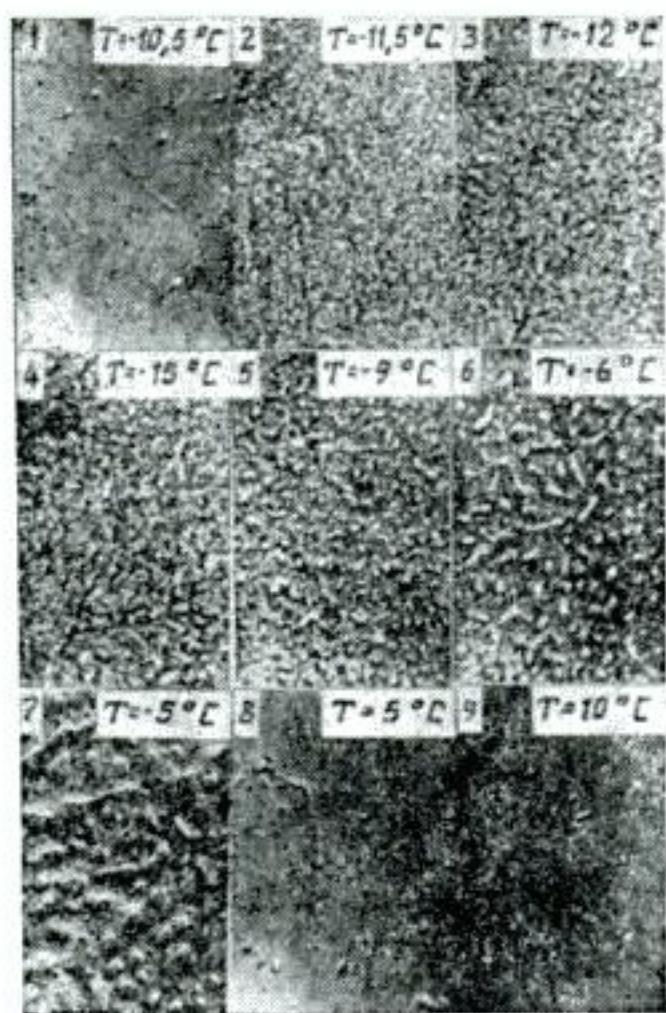


Рис. 1. Явления рекристаллизации структуры льда при медленном замораживании-отогреве спермиев человека без защиты глицерином

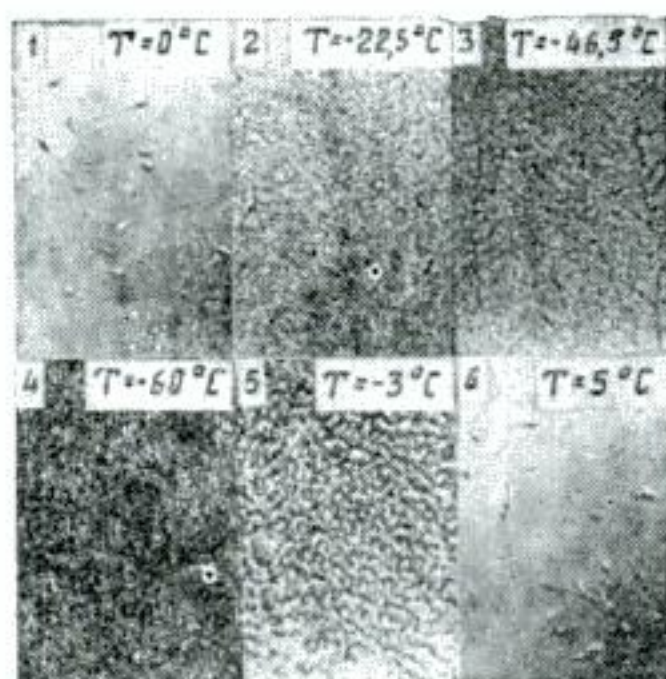


Рис. 2. Кинетика процесса замораживания-отогрева спермиев без защиты глицерином при быстром охлаждении на этапе фазового перехода

вызывает сильных повреждений клеток. Интенсивное плавление льда начинается при -15°C и завершается при -5°C . Первые признаки движения спермиев отмечаются при температуре $2-4^{\circ}\text{C}$. По мере повышения температуры движение спермиев становится более интенсивным и при 24°C восстанавливается полностью.

При замораживании эякулята в присутствии глицерина 10 %-ной концентрации по второй программе образующаяся при фазовом переходе мелкокристаллическая структура льда подвергается слабо выраженной рекристаллизации. Однако после отогрева движение спермиев менее интенсивно, чем после замораживания по первой программе. Часть из них совершает только колебательные движения.

При замораживании спермиев под защитой 10 %-ного глицерина по третьей программе рекристаллизация происходит уже в процессе замораживания, так что при -140°C структура льда значительно укрупняется по сравнению с первичной (рис. 3). После отогрева спермии малоподвижны, некоторые из них имеют увеличенные размеры головки, что можно считать морфологическим признаком повреждения (рис. 3).

При медленном замораживании эякулята под защитой 10 %-ного глицерина по четвертой программе процессы рекристаллизации также существенно выражены. После отогрева подвижных спермиев очень мало, движения носят в основном колебательный характер, часть спермиев имеет увеличенный размер головки. Важно отметить, что независимо от программы

замораживания спермиев в присутствии 10 %-ного глицерина упомянутая выше фрагментация спермиев отсутствует.

Таким образом, нами установлено, что оптимальной скоростью прохождения области фазового перехода при замораживании спермиев человека под защитой 10 %-ного глицерина является скорость 20—25 °C/мин. Спермии человека, как и спермии быков, рыб подвержены температурному шоку, т. е. гибели клеток при резком охлаждении в области положительных температур. Для уменьшения этого отрицательного фактора на начальном этапе охлаждения вплоть до температуры 5 °C спермии охлаждались со скоростью 1 °C/мин с последующей экспозицией при этой температуре не менее 30 мин. Введение в режим замораживания температуры адаптации способствует повышению сохранности спермиев после реконсервации. После достижения температуры адаптации дальнейшее охлаждение целесообразно проводить со скоростью 20—25 °C/мин, так как в этих условиях рекристаллизационные процессы отсутствуют. Если после этапа температурной адаптации охлаждение осуществлять медленно (1 °C/мин), процессы рекристаллизации приводят к разрушению спермиев [2,4].

Вероятность и степень рекристаллизации при отогреве значительно уменьшаются с увеличением скорости отогрева и в присутствии криопротектора. Поэтому нами использован быстрый отогрев клеток путем погружения их в водяную баню 37 °C.

Таким образом, проведенные криомикроскопические исследования позволяют утверждать, что программа I является оптимальной эмпирической программой замораживания спермиев человека.

1. Грищенко В. И., Паращук Ю. С., Калугин Ю. В. Современные аспекты криоконсервации спермы человека // Механизмы криоповреждения и криозащиты биологич. объектов: Тез. докл. II Всесоюзн. конф. (Харьков, 1984 г.). — Харьков: Б. и., 1984. — 2. — С. 247.
2. Иткин Ю. А., Гордиенко Е. А., Бронштейн В. Л. Физико-математический анализ механизмов криоповреждений и криозащиты клеток // Актуальные проблемы криобиологии. — Киев: Наук. думка, 1981. — С. 300—343.
3. Паращук Ю. С., Грищенко В. И., Калугин Ю. В., Черныш Е. Н. Влияние различных условий криоконсервации на выживаемость спермиев человека // Криобиология. — 1985. — № 4. — С. 22—28.
4. Пушкарь Н. С., Гордиенко Е. А., Розанов Л. Ф. Некоторые аспекты повреждения клеток при замораживании // Проблемы гематологии и переливания крови. — 1975. — № 4. — С. 44—47.

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

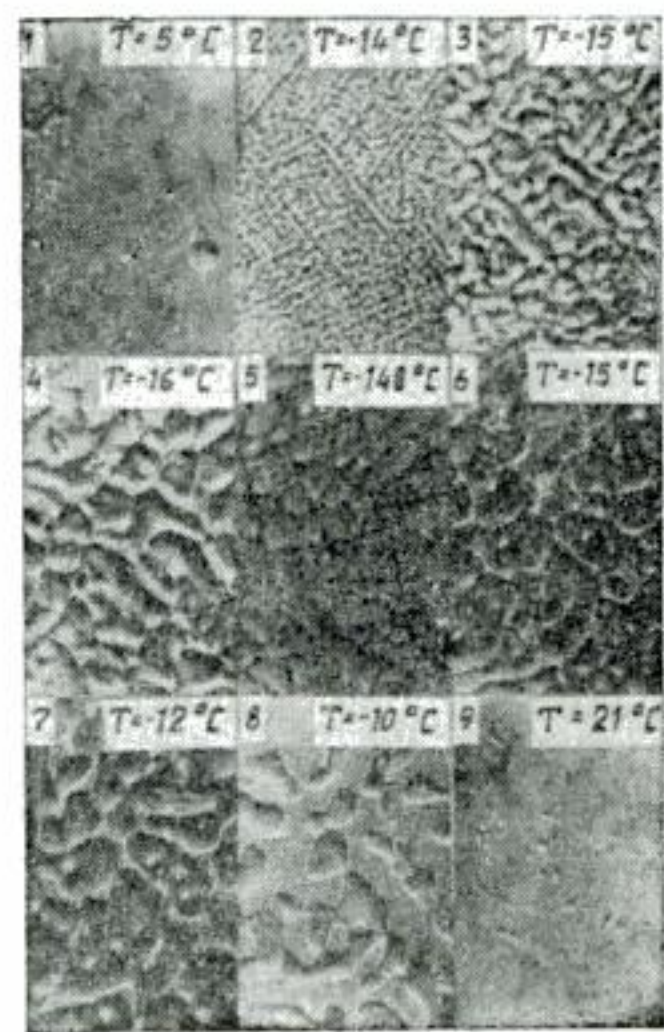


Рис. 3. Явления рекристаллизации структуры льда при замораживании-отогреве спермиев человека под защитой глицерина по двухэтапной программе с медленным прохождением этапа фазового перехода

Поступила 07.05.86

В. Ф. Тарасов, С. Е. Гальченко, И. О. Степанов

ДИНАМИКА ТЕПЛООБРАЗОВАНИЯ В ОРГАНИЗМЕ СУСЛИКОВ
CITELLUS UNDULATUS ПРИ ПРОБУЖДЕНИИ
ОТ ЗИМНЕЙ СПЯЧКИ

Известно, что разогревание пробуждающихся от зимней спячки животных осуществляется механизмами как несократительного, так и сократительного термогенеза. Так, если инициировать пробуждение животных, не изменяя температуру внешней среды, то у них наблюдается учащение дыхания, увеличение частоты сердечных сокращений, повышение температуры тела и увеличение теплоотдачи [1,2]. При этом температура передней части тела повышается быстрее, чем задней [1,4]. Значительную роль в повышении эффективности несократительного термогенеза играют разобщение дыхания и окислительного фосфорилирования [1,3], а также, вероятно, окисление жиров и, прежде всего, бурого жира, который имеется у всех зимоспящих в относительно больших количествах. Увеличивается утилизация глюкозы. Показано также, что потребление кислорода возрастает во время пробуждения от спячки до максимума, а после полного пробуждения снижается до величин, характерных для бодрствующих на холоде животных [4]. Мобилизация всех этих механизмов теплообразования при пробуждении вызывает быстрое (в течение нескольких часов) повышение температуры животного от 4—6 °С до температуры, характерной для бодрствующего животного. В связи с этим представляется важным оценить максимальную мощность этих механизмов, способствующих выходу из зимней спячки.

В общем случае уравнение теплового баланса организма выглядит следующим образом:

$$W_1 - W_2 = mc \frac{dT}{dt}, \quad (1)$$

где W_1 — мощность теплопродукции, W_2 — мощность теплоотдачи, m — масса тела животного, c — средняя удельная теплоемкость животного, T — средняя температура тела. Следовательно, теплопродукция равна:

$$W_1 = mc \frac{dT}{dt} + W_2. \quad (2)$$

Зная теплоотдачу организма и динамику его температуры, можно рассчитать теплопродукцию и мощность механизмов теплопродукции.

Работа проведена на пяти сусликах (*Citellus undulatus*) массой 0,43—0,5 кг. В период зимней спячки животные содержались в холодильной камере при температуре 5 ± 1 °С. Измерение теплоотдачи производилось методом прямой калориметрии. Температура в калориметре поддерживалась равной 5 ± 1 °С. Поскольку у пробуждающегося от зимней спячки суслика имеется большой градиент температуры по телу [1], измерялась температура шести областей: головы, плечевого пояса, груди, живота, прямой кишки и задних конечностей. Измерение температуры проводили с помощью медь-константановых игловатых термодпар на потенциометре Р-363-3 кл. 0,005. Количество тепла, которое идет на повышение температуры организма суслика, условно рассчитывали для шести частей тела, температура которых принималась равной измеренной температуре в этой области.

При расчете величины $mc \frac{dT}{dt}$ мы принимали, исходя из наших данных, что масса головы составляет в среднем 12 % от массы всего тела, плечевого

пояса — 10%, груди — 18%, живота — 30%, задних конечностей — 14% и ректальной части — 16%. Удельная теплоемкость была принята равной 3340 Дж/кг · град [3]. Мощность теплопродукции и теплоотдачи рассчитывалась на 1 кг массы животного. Манипуляции, связанные с закреплением термопар и помещением животного в калориметр, длились около 10 мин; постоянная времени калориметра равна 15 мин. Таким образом, от прикосновения к суслику до начала регистрации всех параметров прошло не более 30 мин.

В результате проведенных исследований получены данные по теплоотдаче выходящих из спячки сусликов и их термограммы. На рис. 1 представлена усредненная по пяти экспериментам мощность теплоотдачи сусликов,

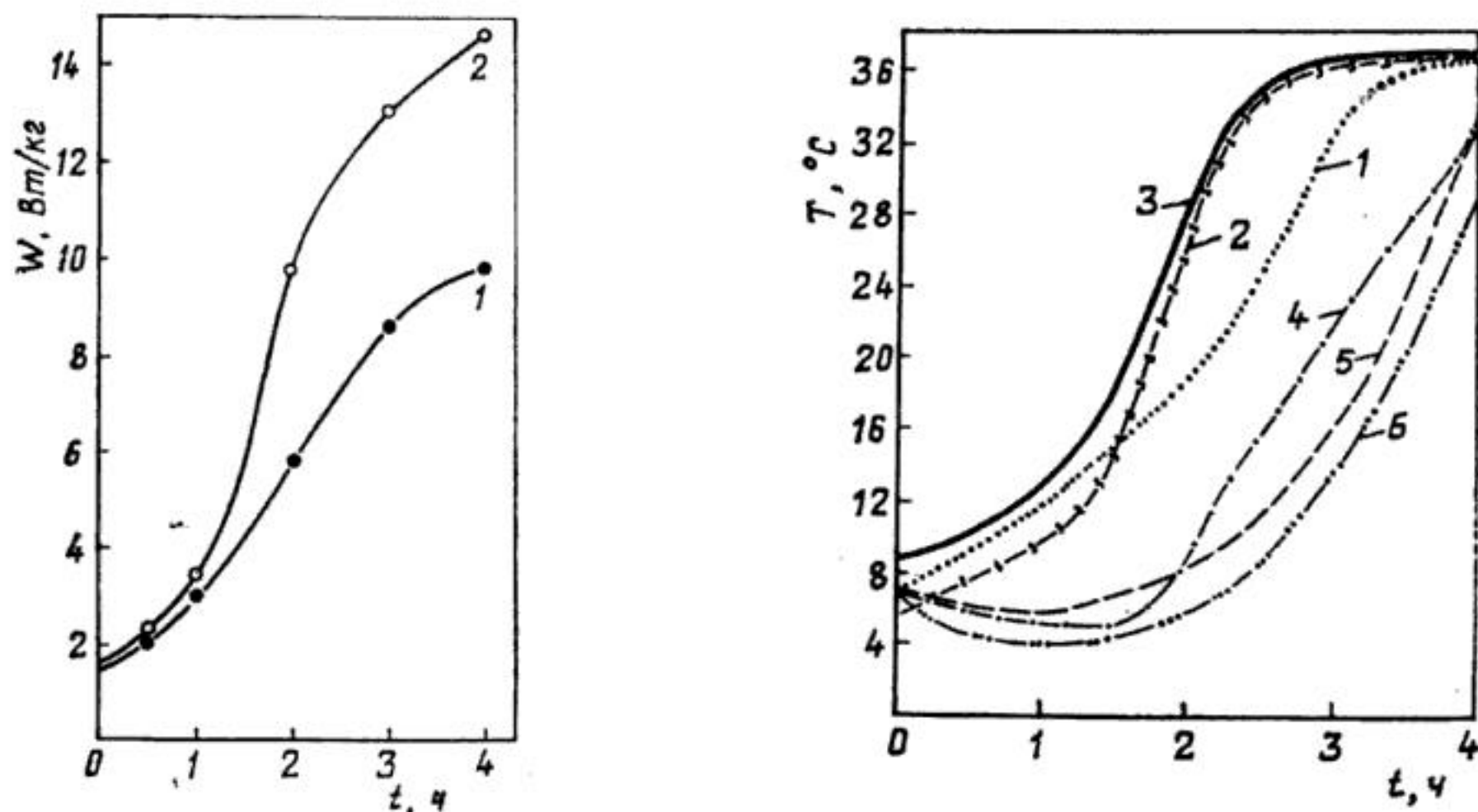


Рис. 1. Динамика теплоотдачи (1) и теплопродукции (2) организмом суслика при пробуждении от зимней спячки

Рис. 2. Динамика изменения температуры различных частей тела суслика при пробуждении от зимней спячки: 1 — голова, 2 — грудь, 3 — плечевой пояс, 4 — задние конечности, 5 — живот, 6 — ректальная часть

измеренная с помощью калориметра, а также рассчитанная мощность теплопродукции. На рис. 2 представлены усредненные данные по изменению температуры шести различных участков тела сусликов.

Из рисунков видно, что как процесс теплоотдачи, так и динамика изменения температуры состоят из трех характерных периодов. Первый период продолжительностью около одного часа характеризуется незначительным ростом всех исследуемых параметров. За этот период мощность теплообразования увеличивается с 1,6 до 3,3 Вт/кг; повышается температура передней части тела и достигает порядка 12°C, соответственно увеличивается и теплоотдача во внешнюю среду. Теплоотдача, в соответствии с законом Ньютона, определяется по формуле:

$$Q = K (T_2 - T_1) S, \quad (3)$$

где K — коэффициент теплопередачи, T_2 — температура тела, T_1 — температура среды, S — площадь поверхности. Из приведенной формулы видно, что теплоотдача пропорциональна разности температур тела и внешней среды.

Второй период начинается с появлением сильной дрожи животного. Температура передней половины тела начинает быстро расти, а температура задней части остается практически постоянной. Однако в этот период температура груди и плечевого пояса растет более быстрыми темпами, чем

температура головы. Это объясняется тем, что при пониженной функциональной деятельности сердца и легких мозгу обеспечивается щадящий режим. К концу этого периода животное становится активным.

Третий период пробуждения характеризуется снижением скорости роста температуры передней половины тела и началом роста температуры задней половины. К концу этого периода температура животного практически достигает температуры бодрствующего суслика.

За время проведения опыта мощность теплообразования в организме суслика увеличивается примерно в десять раз, достигая в среднем 14,5 Вт/кг. Это в два раза больше, чем уровень теплопродукции бодрствующего суслика, находящегося при температуре $5 \pm 1^\circ\text{C}$. По нашим данным, при этой температуре мощность теплообразования бодрствующего суслика в среднем равна 6,9 Вт/кг (данные получены весной). Всего за время эксперимента в организме сусликов в среднем образуется 209 000 Дж/кг тепла или 94 000 Дж на одного животного, из них 38 % идет на повышение температуры тела, а 62 % рассеивается в окружающую среду, т. е. на разогревание животного идет примерно 38 000 Дж.

Количество тепла, затраченное на разогревание организма, рассчитанное по экспериментальным данным, соответствует рассчитанному теоретически. Так, если принять массу суслика равной 0,450 кг, то количество тепла, необходимое для нагрева животного от 7°C до средневзвешенной температуры сусликов в конце эксперимента ($33,5^\circ\text{C}$), составит:

$$Q = mc\Delta T = 0,450 \text{ кг} \cdot 3340 \text{ Дж/кг} \cdot \text{град} \cdot 26,5 \text{ град} \approx 40000 \text{ Дж.} \quad (4)$$

В заключение можно сделать следующие выводы:

— динамика пробуждения суслика от зимней спячки имеет три характерных периода;

— температура и скорость ее увеличения для головы ниже, чем соответствующие показатели для груди и плечевого пояса, что, по-видимому, имеет адаптационное значение и обеспечивает щадящий режим головному мозгу при пробуждении животного;

— мощность механизмов теплообразования при пробуждении суслика в два раза превышает мощность теплообразования активного животного, находящегося при той же температуре.

1. Даудова Г. М. Образование тепла в организме сусликов *Citellus pygmaeus* при пробуждении от зимней спячки // Журн. эвол. биохим. и физиол.— 1975.— XI, № 2.— С. 147—152.
2. Пантелеев П. А. Биоэнергетика мелких млекопитающих. — М.: Наука, 1983.— 277с.
3. Хаскин В. В. Энергетика теплообразования и адаптации к холоду. — Новосибирск: Наука, 1975.— 200 с.
4. Экологическая физиология животных. Часть первая.— Л.: Наука, 1979.— 440 с.

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

Поступила 23.04.84

УДК 616.441—00864:616—089.843:616.133.211:612.017.1

Л. Б. Нугманова, С. И. Исмаилов

ДИНАМИКА ОСНОВНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СИСТЕМЫ ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННЫМ ГИПОТИРЕОЗОМ ПРИ ЛЕЧЕНИИ МЕТОДОМ СВОБОДНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Многочисленные исследования, посвященные изучению состояния иммунной системы при гипотиреозе, как правило, раскрывают лишь отдельные ее звенья. Согласно рекомендациям Р. В. Петрова [4], иммунную систе-

му необходимо изучать комплексно с выявлением взаимосвязи между ее параметрами. Такой системный подход с определением Т-, $Fc\gamma^+$ -антигенсвязывающих лимфоцитов и Т-супрессоров позволяет дать полноценную характеристику глубины и направленности ее нарушений при заболевании.

Целью настоящего исследования явилась комплексная оценка состояния иммунной системы больных послеоперационным гипотиреозом при трансплантации криоконсервированной ткани щитовидной железы.

Проведено клинико-иммунологическое обследование 29 больных с послеоперационным гипотиреозом. Контрольную группу составили 30 человек. Диагноз заболевания устанавливался на основании жалоб больного, анамнеза, клинических проявлений и подтверждался лабораторными и радиоизотопными методами исследования. Больные обследовались в стадии декомпенсации и после свободной аллотрансплантации криоконсервированной тиреотоксически измененной ткани щитовидной железы в динамике со сроками наблюдения через неделю, 1, 3 и 6 месяцев (21 человек). Тиреотоксическая ткань забиралась в процессе субтотальной резекции щитовидной железы у больных диффузным токсическим зобом (ДТЗ). Консервация ткани проводилась по методу, разработанному в Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР [5].

Подбор пар донор-реципиент проводился по системе HLA с учетом совместимости по ABO и резус-фактору. Трансплантацию проводили при совместимости не менее 3 антигенов, из которых обязательной являлась совместимость по двум сильным антигенам локуса В. Трансплантация криоконсервированной тиреоидной паренхимы осуществлялась в подкожно-жировую клетчатку живота. Пересаживалось 4—5 г тиреоидной паренхимы. Раны зажили первичным натяжением. Местной реакции на трансплантат не отмечалось. Антигеном в иммунологических реакциях служил тиреоглобулин (ТГ), получаемый из солевых экстрактов срезов щитовидной железы случайно погибших людей с помощью метода гельфильтрации на колонке с сефадексом G-200 и на сефарозе 4 В [1].

Иммунологический мониторинг больных проводился с использованием следующих методов:

- 1) количественной оценки Т-лимфоцитов методом спонтанного розеткообразования (Ерок) [7] с учетом рекомендаций [11] с дополнениями [3];
- 2) количественной оценки В-лимфоцитов методом комплементарного розеткообразования (ЕАСрок) по методу [9] с дополнениями [3];
- 3) выявления $T\gamma$ — лимфоцитов [10] в модификации [2];
- 4) определения $Fc\gamma^+$ — лимфоцитов [12];
- 5) определения содержания иммуноглобулинов классов А, М, G в сыворотке крови [8];
- 6) выявления антигенсвязывающих лимфоцитов методом непрямого розеткообразования [2];
- 7) определения «нулевых» лимфоцитов косвенным методом вычитания суммы Т- и В-лимфоцитов от 100 % [6];
- 8) определения антитиреоглобулиновых антител в реакции пассивной гемагглютинации.

Статистический анализ полученных данных проведен с использованием следующих вычислений: среднего арифметического изучаемого показателя и его стандартной ошибки ($M \pm m$), квадратичного отклонения ($M \pm 2\sigma$), доверительных границ при вероятности 95 % (I_p). Достоверность различий определялась согласно критерию t Стьюдента. Положительными пробами считали значения $<M - 2\sigma$ (Т, $T\gamma$, $Fc\gamma^+$) и $>M + 2\sigma$ (В, АСЛ, «нулевые», Ig), поскольку показатели «нормы», вычисленные для здоровых людей, лежат в пределах $M \pm 2\sigma$.

Динамика вышеуказанных показателей (Т-, Т-супрессоры ($T\gamma$) и $Fc\gamma^+$ -лимфоциты) при применении трансплантации больным послеоперационным гипотиреозом представлена в табл. 1. Установлено, что в крови больных

данной группы в состоянии декомпенсации циркулирует сниженное число Т-розеткообразующих клеток, достоверно отличающихся от показателей группы контроля ($P < 0,001$ — для двух значений). С учетом границ «нормы» ($M \pm 2\sigma$) число сниженных проб составляет по относительным значениям 70 %, по абсолютным — 64 %. Аналогичные изменения обнаружены в состоянии Fc_{γ}^{+} -лимфоцитов ($P < 0,001$ — для двух значений). Число сниженных проб составляет по относительным значениям 75 %, по абсолютным — 60 %.

Т а б л и ц а 1

Показатели Т-, T_{γ} - и Fc_{γ}^{+} -лимфоцитов у больных послеоперационным гипотиреозом в динамике до и после трансплантации криоконсервированной тиреоидной паренхимы ($M \pm I_p$)

Группы больных	Т-лимфоциты		Fc_{γ}^{+} -лимфоциты		T_{γ} -лимфоциты		
	%	в 1 мкл	%	в 1 мкл	в % к Т-лимфоцитам ($T_{\gamma 1}$)	в 1 мкл крови ($T_{\gamma 2}$)	в % к общему пулу лимфоцитов ($T_{\gamma 3}$)
Контроль (здоровые люди) $n = 30$	63,0 66,7 $\div$ 59,3	1035,2 117,9 $\div$ 952,5	16,8 18,4 $\div$ 16,2	260,4 291,4 $\div$ 229,4	14,3 15,7 $\div$ 12,9	140,0 178,8 $\div$ 101,2	9,3 10,1 $\div$ 8,5
До трансплантации $n = 29$	32,4 37,1 $\div$ 27,7	657,6 750,0 $\div$ 565,2	8,7 9,6 $\div$ 6,8	167,2 210,4 $\div$ 124,0	16,5 21,6 $\div$ 11,4	104,8 132,0 $\div$ 77,6	3,0 4,1 $\div$ 1,9
После трансплантации:							
1 неделя $n = 9$	39,6 54,1 $\div$ 25,1	749,6 829,2 $\div$ 670,0	12,5 16,1 $\div$ 8,9	191,8 261,9 $\div$ 121,7	14,7 19,4 $\div$ 10,0	103,4 144,8 $\div$ 62,0	5,5 7,5 $\div$ 3,5
1 месяц $n = 9$	42,2 48,5 $\div$ 35,9	885,8 1002,1 $\div$ 769,5	8,4 9,8 $\div$ 7,0	156,2 216,6 $\div$ 95,8	27,2 36,0 $\div$ 18,4	375,3 443,4 $\div$ 307,2	14,3 16,1 $\div$ 12,5
3 месяца $n = 9$	25,6 33,7 $\div$ 17,5	675,6 747,5 $\div$ 603,7	9,0 11,7 $\div$ 6,3	206,4 248,0 $\div$ 164,8	28,0 35,9 $\div$ 20,1	380,4 452,8 $\div$ 308,0	13,2 15,9 $\div$ 10,5
6 месяцев $n = 9$	31,1 36,8 $\div$ 25,4	783,9 892,7 $\div$ 675,1	19,1 16,4 $\div$ 10,2	279,9 327,1 $\div$ 292,7	15,0 20,2 $\div$ 9,8	141,3 173,2 $\div$ 76,4	6,7 8,6 $\div$ 2,8

Как видно из таблицы, показатели Т-лимфоцитов супрессоров у больных послеоперационным гипотиреозом в состоянии декомпенсации не отличаются достоверно от данных группы контроля, за исключением содержания $T_{\gamma 3}$ -лимфоцитов, которое достоверно ниже уровня нормы ($P_1 < 0,001$).

Через неделю после трансплантации отмечается тенденция к повышению содержания Т-лимфоцитов, при этом число сниженных проб составляет 60 и 40 % соответственно для двух значений. К месяцу число сниженных проб уменьшается до 50 и 30 % соответственно для двух значений. Несмотря на тенденцию к повышению, показатели Трок продолжают оставаться достоверно сниженными в сравнении с данными контрольной группы. На 3-м месяце содержание Т-лимфоцитов, вновь снижаясь, достигает к 6-му месяцу значения, близкого к исходному. При этом число сниженных проб достигает 85 % для относительных значений и 40 % — для абсолютных.

Дефицит Fc_{γ}^{+} -лимфоцитов, обнаруженный до операции, сохраняется с незначительными колебаниями до трех месяцев. Число сниженных проб в эти периоды варьирует от 40 до 50 % для относительных значений и от 25 до 35 % — для абсолютных. Однако необходимо отметить, что снижение абсолютного содержания Fc_{γ}^{+} -лимфоцитов на 3-м месяце не имеет достовер-

ного различия с показателями здоровых лиц. На 6-м месяце после трансплантации содержание $Fc\gamma^+$ -лимфоцитов достоверно не отличается от показателей здоровых лиц уже по двум значениям ($P_1 > 0,5$). При этом число сниженных значений составляет всего 16 % для относительных показателей и 0 % — для абсолютных.

В состоянии Т-лимфоцитов супрессоров на 1-й неделе после трансплантации изменений не происходит, сохраняется дефицит уровня T_{H2} -лимфоцитов, а значения T_{H1} и T_{H2} не имеют достоверного отличия от уровня нормы. На 1-м и 3-м месяцах наблюдения отмечается выраженное повышение Т-лимфоцитов супрессоров, имеющих статистически достоверное отличие как от данных здоровых лиц ($P_1 < 0,001$ — для всех значений), так и в сравнении с показателями предыдущих сроков наблюдения ($P < 0,001$ — для всех значений). Такой подъем, по-видимому, объясняется обнаружением в этот период у данных больных высоких титров антител к ТГ и повышенной концентрацией IgG и IgA. На 6-м месяце после трансплантации содержание T_H -лимфоцитов достигает значений, не имеющих достоверного отличия от показателей группы контроля ($P_1 > 0,5$ — для всех значений).

Динамика показателей В-, «нулевых» лимфоцитов и иммуноглобулинов отражена в табл. 2, из которой следует, что в стадии декомпенсации у больных послеоперационным гипотиреозом содержание В-лимфоцитов не имеет статистически достоверного различия с показателями здоровых лиц ($P_1 > 0,2$; $P_1 > 0,5$). Кроме того, констатировано достоверное повышение как относительного, так и абсолютного содержания «нулевых» лимфоцитов ($P_1 < 0,001$ — для двух значений). Число повышенных проб составляет 50 и 75 % соответственно относительным и абсолютным значениям.

Таблица 2

Показатели В-, «нулевых» лимфоцитов и иммуноглобулинов у больных послеоперационным гипотиреозом в динамике до и после трансплантации криоконсервированной тиреоидной паренхимы ($M \pm I_p$)

Группы больных	В-лимфоциты		IgG, мг/мл	IgA, мг/мл	IgM, мг/мл	«Нулевые» лимфоциты	
	%	в 1 мкл				%	в 1 мкл
Контроль (здоровые люди) $n = 30$	15,8 18,1 ÷ 13,1	263,6 322,2 ÷ 205,7	9,6 11,4 ÷ 7,8	3,6 4,0 ÷ 3,2	1,2 1,3 ÷ 1,1	91,7 27,4 ÷ 16,0	347,2 395,2 ÷ 299,2
До трансплантации $n = 29$	11,8 17,9 ÷ 5,7	236,6 305,9 ÷ 46,9	16,9 17,7 ÷ 16,1	4,6 6,4 ÷ 2,8	1,2 1,4 ÷ 1,0	54,8 53,5 ÷ 38,5	1096,3 1293,2 ÷ 899, 4
После трансплантации:							
1 неделя $n = 9$	10,9 13,6 ÷ 8,2	222,5 261,4 ÷ 183,6	14,2 16,9 ÷ 11,5	5,4 6,8 ÷ 4,0	1,0 1,5 ÷ 0,5	54,6 79,0 ÷ 30,2	1091,6 1112,6 ÷ 1970,6
1 месяц $n = 9$	11,8 15,9 ÷ 7,7	249,6 308,2 ÷ 191,0	16,2 20,7 ÷ 11,7	8,6 10,4 ÷ 6,8	1,4 1,6 ÷ 1,2	49,8 61,6 ÷ 38,0	1082,5 1225,7 ÷ 939,3
3 месяца $n = 9$	11,0 20,1 ÷ 5,1	228,8 281,3 ÷ 176,3	14,6 17,1 ÷ 12,1	3,2 5,2 ÷ 1,2	1,9 2,1 ÷ 1,7	61,6 76,5 ÷ 46,7	1698,4 1834,6 ÷ 1562,2
6 месяцев $n = 9$	11,6 16,6 ÷ 6,6	250,5 381,1 ÷ 182,9	12,4 17,2 ÷ 7,6	3,4 5,0 ÷ 1,8	1,2 1,4 ÷ 1,0	56,6 65,0 ÷ 48,2	1245,4 1374,3 ÷ 1116,4

Достоверное различие с показателями группы контроля также имеет уровень IgG, повышенный до $16,9 \pm 0,4$ мг/мл ($P_1 < 0,001$). Число повышенных значений с учетом границ «нормы» ($M \pm 2\sigma$) составляет 45 %. Среднее содержание IgA и IgM не имеет достоверного отличия от такового группы контроля ($P_1 > 0,5$ — для двух значений).

Начиная с 1-й недели после трансплантации и во все последующие периоды наблюдения, содержание В-лимфоцитов, претерпевая незначительные изменения, не имеет достоверного отличия от показателей группы контроля.

В состоянии «нулевых» лимфоцитов на первой неделе отмечалась тенденция к снижению, сохраняющаяся до первого месяца. Тем не менее, содержание их достоверно превышает показатели контрольной группы, что видно из табл. 2.

Таблица 3

Показатели антигенсвязывающих лимфоцитов (АСЛ) у больных послеоперационным гипотиреозом в динамике до и после трансплантации криоконсервированной тиреоидной паренхимы ($M \pm I_p$)

Группы больных	АСЛ	
	%	в 1 мкл
Контроль (здоровые люди) $n = 30$	1,8	32,8
До трансплантации $n = 29$	$2,2 \div 1,4$	$46,3 \div 19,3$
После трансплантации ($n = 9$):	7,5	193,3
1 неделя	$10,7 \div 4,3$	$225,6 \div 161,0$
1 месяц	10,7	189,8
3 месяца	$15,2 \div 6,2$	$275,3 \div 104,3$
6 месяцев	4,6	65,7
	$8,2 \div 1,0$	$77,7 \div 38,6$
	6,8	174,7
	$7,7 \div 5,9$	$191,2 \div 158,2$
	2,5	55,3
	$4,3 \div 0,7$	$76,7 \div 33,9$

Таблица 4

Динамика циркулирующих антитиреоглобулиновых антител у больных послеоперационным гипотиреозом при применении трансплантации криоконсервированной тиреоидной паренхимы ($n = 9$)

Группы больных	Титры антител к тиреоглобулину, %			
	1:10—1:20	1:40—1:160	1:320—1:640	1:1280 и выше
До трансплантации	22	34	—	44
После трансплантации:				
1 неделя	33	12	22	33
1 месяц	44	22	22	12
3 месяца	66	12	22	—
6 месяцев	77	11	12	—

На третьем и шестом месяцах вновь обнаружено высокое содержание «нулевых» лимфоцитов ($P_1 < 0,001$ — для двух значений). Число положительных проб увеличилось до 80 % для относительных и абсолютных значений.

Определяемое в стадии декомпенсации повышенное содержание IgG, несколько снизившись на первой неделе после трансплантации, продолжает достоверно превышать показатель здоровых людей ($P_1 < 0,001$). И в последующие периоды до третьего месяца включительно его концентрация держится на таком же высоком уровне ($P_1 < 0,001$). Число повышенных значений, равное на первой неделе 30 %, через месяц увеличивается до 56 %, через три месяца становится равным 45 %. На шестом месяце наблюдения среднее содержание IgG снижается до уровня, не имеющего достоверного отличия от показателей здоровых людей ($P_1 > 0,2$). Число повышенных проб составляет всего 11 %.

Определяемое до трансплантации среднее содержание IgA, не отличавшееся достоверно от контрольного, через неделю после трансплантации повышается до $5,4 \pm 0,6$ мг/мл ($P < 0,05$) с числом положительных проб, равным 57 %. Через месяц концентрация IgA возрастает до $8,6 \pm 0,9$ мг/мл ($P_1 < 0,001$) с числом положительных проб равным 100 %.

На третьем месяце концентрация IgA достигает значения, близкого к нормальному ($P_1 > 0,5$), с числом положительных проб равным 23 %.

Через шесть месяцев после трансплантации нами констатирована нормализация содержания IgA ($P_1 > 0,5$). При этом все индивидуальные значения находятся в пределах границы «нормы» ($M \pm 2\sigma$).

В отличие от предыдущих классов, концентрация IgM, не имеющая достоверного отличия от данных контроля в период до трансплантации, продолжает сохраняться в этих пределах до первого месяца ($P > 0,5$). На

3-м месяце отмечается достоверное повышение концентрации IgM ($P_1 < 0,001$). Число положительных проб равнялось 57 %.

К шестому месяцу содержание IgM, снижаясь, достигает уровня нормы ($P_1 > 0,5$) с числом повышенных проб равным 23 %.

Динамика антигенсвязывающих лимфоцитов (АСЛ), реагирующих с тиреоглобулином при применении трансплантации криоконсервированной тиреоидной паренхимы, у больных послеоперационным гипотиреозом отражена в табл. 3, из которой следует, что у больных данной группы в период декомпенсации содержание АСЛ достоверно превышает показатели группы контроля ($P_1 < 0,001$ — для двух значений). Число положительных проб составляет для относительных значений 83, для абсолютных — 100 %.

Через неделю после трансплантации содержание АСЛ повышается. Число положительных проб становится равным 100 % для относительных значений и 80 % — для абсолютных. Заметное снижение АСЛ отмечается через месяц после трансплантации, когда в среднем их количество не отличается достоверно от данных контроля. Число положительных проб составляет для относительных значений 40 %, для абсолютных — не определяется.

Через три месяца вновь определяется высокое содержание АСЛ. И только к шестому месяцу их уровень снижается до нормальных значений ($P_1 > 0,2$; $P_1 > 0,1$). Число повышенных проб составляет 16 % как для абсолютных, так и для относительных значений.

Динамика циркулирующих анти-тиреоглобулиновых антител у больных послеоперационным гипотиреозом при применении трансплантации отражена в табл. 4, из которой следует, что в период декомпенсации у 78 % больных обнаруживаются антитела к ТГ в различных титрах. У 44 % из них выявляются титры 1 : 1280 и выше. Через неделю после трансплантации число больных с антителами снижается до 67 %. Количество больных с высокими титрами антител сокращается до 33 %.

Через один и три месяца после трансплантации число больных с антителами к ТГ сокращается до 56 и 34 % соответственно. Через 6 месяцев только у 26 % больных данной группы определяются антитела к ТГ.

Следует отметить, что к 4—6-му месяцу после пересадки отмечалась клиническая ремиссия заболевания, сопровождавшаяся нормализацией уровней тиреоидных и тиреотропного гормонов, йодаккумуляционной способности культи щитовидной железы. Уровень суточного накопления йода трансплантатом во все сроки наблюдения составлял 2—8 %.

Таким образом, можно сделать следующие выводы:

1) в стадии декомпенсации у больных послеоперационным гипотиреозом выявлены достоверное снижение числа Т-, FC_{γ}^+ - и $T_{\gamma 3}$ -лимфоцитов, достоверное повышение уровня IgG, «нулевых» и антигенсвязывающих клеток, а также антител, реагирующих с тиреоглобулином;

2) свободная трансплантация криоконсервированной ткани щитовидной железы больных послеоперационным гипотиреозом, наряду с клиническим эффектом, обладает выраженным иммунокорригирующим действием. Нормализация показателей иммунитета наступает к шестому месяцу после трансплантации.

1. Алимбабаева Н. Т., Виха Г. В., Бабаева Т. А., Каверзнева Е. Д. Выделение и очистка от эндогенных протеиназ тиреоглобулина из щитовидной железы крупного рогатого скота // Прикладная биохимия и микробиология. — 1966. — 22, № 3. — С. 13—15.
2. Гариб Ю. Ф., Залялиева М. В. Регистрация Т-лимфоцитов супрессоров у человека // Сб. науч. тр. Актуальные вопросы иммунологии при различных патологических состояниях. — Ташкент. — 1982. — С. 12—15.
3. Петров Р. В. Иммунология и иммуногенетика. — М.: Медицина. — 1976. — 316 с.
4. Петров Р. В. Иммунология. — М.: Медицина. — 1982. — 118 с.
5. А. с. 935050 СССР, МКИ² А 01 N 1/02. Способ консервирования щитовидной железы / Н. С. Пушкар, А. М. Утевский, В. А. Чуйко и др. Опубл. 15.06.82. Бюл. № 22.
6. Froland S. S., Natvig J. B. Identification of three different human lymphocyte populations by surface markers // Transpl. Rev. — 1973. — 16. — P. 114.

7. Jondal M., Holm G., Wigzeu H. Surface markers on human T-, B-lymphocytes. I. A large population of lymphocytes forming nonimmunorosettes with sheep red blood cells // J. Exp. Med.— 1972.— 136.— P. 207—218.
8. Mancini G., Carbonara A. O., Harems J. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion // Immunochemistry. — 1965. — 2. — P. 235—245.
9. Mendes N. F., Tolnai M. E. A., Silveira N. P. A. et al. Technical aspect of the rosette tests used to detect human complement reception (B) lymphocytes // J. Immunol.— 1973.— VIII, N 3.— P. 860—867.
10. Moretta L., Webb S. R., Grossi C. E. et al. Functional analysis of two T-cell subpopulations: help and suppression of B-cell responses by T-cells bearing receptors for IgM and IgG // J. Exp. Med.— 1977.— 146.— P. 184—192.
11. Pang G. T. M., Baguley D. M., Wilson J. O. Spontaneous rosettes as T-lymphocytes markers; a modified method giving consistent results with SRBL rosettes // J. Immunol. Meth.— 1974.— 4.— N 1.— P. 41—45.
12. Wittemeyer S., Bankhurst A. D., Williams E. C. A population of human cord blood lymphocytes which generates Fc-receptor in vitro // Cell Immunol.— 1977.— 30.— N 1, — P. 54—65.

НИИ краевой медицины,
г. Ташкент

Поступила 16.07.86

УДК 612.35.085.2:547.422

О. А. Семенченко, Л. П. Кравченко, В. И. Луговой

ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЯ-400 И ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДА ПРИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ

В настоящее время в экспериментальной биологии и медицине большое внимание уделяется вопросу криоконсервирования гепатоцитов с целью дальнейшего их использования в медицинской практике [2]. Известно, что конечный результат криоконсервации биологического материала определяется рядом исходных условий, среди которых существенное значение имеет состав криоконсервирующего раствора, в том числе тип криопротектора, а также выбор оптимального режима замораживания-оттаивания [3]. Согласно литературным данным [4], до сих пор еще нет приемлемого способа криоконсервации гепатоцитов, который способствовал бы удовлетворительному сохранению их морфофункциональных свойств.

В настоящей работе поставлена задача изучения влияния полиэтиленгликоля-400 (ПЭГ-400) и диметилсульфоксида (ДМСО) в составе различных физиологических сред на морфобиохимические показатели целостности гепатоцитов при замораживании-оттаивании. Работа выполнена на беспородных белых крысах (самцах) массой 200—220 г. Гепатоциты выделяли модифицированным методом [1]. Свежевыделенные клетки оценивались микроскопически по степени окрашивания 0,2 %-ным раствором трипанового синего. В работе использовалась суспензия гепатоцитов с низким (не более 5 %) включением красителя в клетки.

Полученные осадки клеток ресуспендировали в растворах ПЭГ-400 и ДМСО (конечная концентрация 10 %), приготовленных на различных физиологических средах: 0,15 М NaCl, буфере Кребса-Рингера, растворе Хенкса, альбуминовой среде и среде-199 (рН всех растворов 7,4). После полчасовой экспозиции на холоду (0 °С) пробы замораживали в полиэтиленовых ампулах объемом 5 мл со скоростью 2 °С/мин до —196 °С на установке с программным управлением, изготовленной в СКТБ Института проблем криобиологии и криомедицины АН УССР. После отогрева проб при 37 °С (на водяной бане) размороженные и контрольные образцы центрифугировали 2 мин при 1500 об/мин.

Степень повреждения изолированных клеток печени оценивалась по морфологическим (количество клеток, уровень включения трипанового си-

него) и биохимическим показателям (выход в среду замораживания некоторых лизосомальных ферментов и ионов калия). Активность кислой фосфатазы и РНК-азы определяли по Баррету. Общую активность ферментов определяли после обработки проб тритоном X-100 (конечная концентрация 0,1 %). Выход ионов калия определяли на пламенном фотометре ПАЖ-2. Общее содержание калия находили суммируя содержание ионов в супернатанте и осадке. Количество клеток подсчитывали в камере Горяева.

Результаты исследований показали (табл. 1), что инкубация свежeweделенных клеток в средах различного солевого состава при 0 °С в течение 30 мин не влияла на их количество. Суправитальное окрашивание 0,2 % -ным раствором трипанового синего выявило достаточно высокую степень интактности гепатоцитов, о чем свидетельствует низкий уровень включения красителя в клетки. При микроскопировании свежeweделенные гепатоциты, ресуспендированные в различных средах, характеризовались плотным желто-зеленоватым матриксом, четким контуром плазматической мембраны. Клетки имели в основном полигональную форму, наблюдались диплоидные клетки с четкой разделительной бороздкой на их поверхности.

Необходимо отметить, что в контрольных пробах наблюдался достаточно высокий уровень ионов калия во внеклеточной среде, что является, по-видимому, следствием однократной отмывки клеток от среды выделения.

Добавка в суспендирующие растворы криопротекторов (ПЭГ-400 и ДМСО) не вызвала дополнительных морфологических и биохимических изменений клеток (табл. 1.), что послужило предпосылкой для дальнейших исследований по выяснению криозащитного эффекта этих соединений.

Медленное замораживание гепатоцитов в средах различного солевого состава баз криопротекторов приводило к резкому повышению во внеклеточной среде активности кислых гидролаз и содержания ионов калия (табл. 2). Значительно возрастает степень включения в клетки трипанового синего (до 50 %), который, проникая через поврежденную мембрану клеток, адсорбируется ядерными белками. При подсчете клеток в камере Горяева не обнаружено существенного изменения их количества. При микроскопическом исследовании обнаружены значительные повреждения клеток, которые проявлялись в их набухании, вакуолизации цитозоля, прокрашивании ядер после контакта с красителем от голубого до интенсивного синего цвета.

После медленного замораживания гепатоцитов в присутствии криопротекторов процент поврежденных клеток значительно снижался, о чем свидетельствуют данные включения трипанового синего (табл. 2.). Несмотря на то, что степень включения красителя в клетки, замороженные с криопротекторами, значительно снижалась, имели место определенные нарушения морфологической структуры гепатоцитов, которые характеризовались некоторым увеличением объема и округлением формы клеток при сохранении четкого контура плазматической мембраны. При этом отмечался более низкий уровень выхода ионов калия во внеклеточную среду (табл. 2).

Уровень активности гидролитических ферментов — кислой фосфатазы и РНК-азы (табл. 2), который свидетельствует о степени лабильности лизосом, при замораживании гепатоцитов с криопротекторами был значительно ниже, чем в контрольных пробах (табл. 1).

Сопоставляя данные, полученные при исследовании криозащитной эффективности ПЭГ-400 и ДМСО в различных физиологических растворах, следует отметить, что ДМСО, в отличие от ПЭГ-400, приготовленный на среде-199 и буфере Кребса-Рингера, способствует значительному снижению выхода в экзоцеллюлярную среду кислой РНК-азы после отогрева клеток. Снижение же выхода в среду кислой фосфатазы характерно для всех случаев применения ДМСО, приготовленного на всех изучаемых физиологических средах. Наиболее благоприятными являются альбуминово-солевая среда и среда-199 в присутствии 10 %-ного раствора ДМСО (табл. 2).

Морфо-биохимические показатели сохранности гепатоцитов при инкубации (0°C) в различных криоконсервирующих растворах

Показатели структурной целостности клеток	0,15M NaCl			Буфер Krebs-Рингера			Раствор Хенкса			Альбуминово-солевая среда			Среда-199		
	без крио- протекто- ра	+ПЭО	+ДМСО	без крио- протек- тора	+ПЭО	+ДМСО	без крио- протек- тора	+ПЭО	+ДМСО	без крио- протек- тора	+ПЭО	+ДМСО	без крио- протек- тора	+ПЭО	+ДМСО
К-во клеток, в 1 мл · 10 ⁷	3,4	3,4	2,8	3,4	3,4	3,2	3,0	3,3	2,6	3,6	4,0	4,0	3,8	3,9	3,7
Включение три- панового син- го, %	2	1,5	2	2	2	2	2	1,5	2	1	1	1,5	1,5	1,5	2
Выход K ⁺ , %	22±2	29±3	26±2	27±6	35±2	25±3	25±5	35±1	25±3	23±3	28±2	27±2	24±4	27±3	26±3
Кислая фосфа- таза, % от об- щей активности	7±1	7±1	10±2	7±1	7±1	10±1	8±1	7±2	10±2	7±1	7±1	10±1	6±1	5±1	7±1
РНК-аза, % от общей актив- ности	7±1	8±1	10±1	9±2	8±1	9±2	9±2	8±2	10±2	8±2	5±0	10±1	8±1	6±1	8±1

Таблица 2
Влияние замораживания-оттаивания на морфо-биохимические показатели сохранности гепатоцитов г. различных криоконсервирующих растворах

Показатели структурной целостности клеток	0,15M NaCl			Буфер Krebs-Рингера			Раствор Хенкса			Альбуминово-солевая среда			Среда 199		
	без крио-протек-тора	+ПЭО	+ДМСО	без крио-протек-тора	+ПЭО	+ДМСО	без крио-протек-тора	+ПЭО	+ДМСО	без крио-протек-тора	+ПЭО	+ДМСО	без крио-протек-тора	+ПЭО	+ДМСО
К-во клеток, в 1 мл · 10 ⁷	3,2	2,9	2,7	2,9	3,2	3,1	2,7	3,2	2,5	3,2	3,8	3,8	3,4	3,7	3,6
Включение трипанового синего, %	45	8	8,5	47	9	10	46	11	10	39	7	6	41	9	8
Выход K ⁺ , %	65±1	39±3	33±4	87±1	42±3	35±3	85±2	41±3	35±3	80±7	35±2	34±5	76±3	36±4	34±2
Кислая фосфатаза, % от общей активности	63±6	45±5	32±4	55±6	47±6	33±2	55±5	41±5	31±1	57±6	37±4	27±2	58±7	39±7	28±1
РНК-аза, % от общей активности	62±7	36±4	31±4	67±9	41±8	30±3	64±5	36±5	33±5	66±5	36±5	33±4	60±7	38±6	24±5

Полученные данные согласуются с данными Фуллера и соавторов [4], которые установили, что медленное замораживание гепатоцитов с использованием 1,5 М ДМСО является одним из наиболее щадящих режимов, хотя он далек еще от оптимального, так как при этом обнаруживаются довольно значительные метаболические нарушения, проявляющиеся в увеличении выхода лизосомальных ферментов и ионов калия в среду замораживания. Необходимы дальнейшие исследования по выявлению оптимальных условий криоконсервации гепатоцитов.

1. Луговой В. И., Кравченко Л. П., Карева Л. В. и др. Метод получения изолированных клеток печени // Криобиология и криомедицина. — 1983. — Вып. 13. — С. 36—39.
2. Маргулис М. С., Ерухимов Е. А., Андрейман Л. А., Померанец О. Г. Первый клинический опыт использования взвеси живых гетерогенных гепатоцитов в сорбционном контуре для лечения печеночной недостаточности // Трансплантация органов. — Киев: Б. и., 1985. — С. 64—65.
3. Farrant J., Lee H., Walter C. A. Effects of interactions between cooling and rewarming conditions on survival of cell. // Freezing of Mammalian Embryos. — New York: Acad. Press, 1977. — P. 49—67.
4. Fuller B. J., Morris G. Y., Nutt L. H., Attenburrow V. D. Functional recovery of isolated rat hepatocytes upon thawing from -196°C . // Cryo-Lett. — 1980. — 1, N 5. — P. 139—146.

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

Поступила 04.07.86

УДК 57.043:577.322

Т. Ф. Морозова, А. В. Зинченко, В. Д. Зинченко, О. А. Нардид

ТЕРМОИНДУЦИРОВАННЫЕ ПЕРЕХОДЫ МИОЗИНА В ОБЛАСТИ ТЕМПЕРАТУР НИЖЕ 273 К

Одно из важных фундаментальных направлений криобиологии — изучение влияния низких температур и криопротекторов на структурные и функциональные свойства белков. Криолабильным, но мало изученным в указанных аспектах белком является миозин-фермент сократительного аппарата, широко распространенный как в мышечных, так и в немышечных клетках [6].

В настоящей работе изучалось структурное состояние миозина и растворителя для белка в зоне температур ниже 273 К методами низкотемпературной флуоресценции, ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Миозин из скелетных мышц кролика выделяли по методу Перри с некоторыми модификациями [7]. Замораживание-оттаивание миозина проводили в средах, содержащих 0,5 М KCl ЭДТА, pH 6,8. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически. При этом для нативного миозина использовали коэффициент экстинкции $E_{280}^{1\%}$ равный 5,6 [6].

Спектры поглощения записаны на спектрофотометре «Пай Уникам СП 80000» (Англия). Спектры флуоресценции записывали на спектрофлуориметре «Хитачи МПФ-2А» (Япония); низкотемпературные спектры флуоресценции — при помощи низкотемпературной приставки. Рассчитывали следующие характеристики спектров люминесценции белка: положение максимумов спектров ($\lambda_{\text{макс}}$), интенсивность флуоресценции в относительных единицах (I фл. отн. ед) в максимуме спектров поглощения. Люминесцентные измерения проводили при возбуждении свечения образца светом с длиной волны 280 и 296 нм.

Поляризационные характеристики рассчитывали по интенсивности флуоресценции в максимумах соответствующих спектров излучения белка. Образец возбуждался вертикально поляризованным светом. Интенсивность

испускания при параллельно ориентированном поляризаторе и перпендикулярно ориентированном поляризаторе — $I_{\parallel}$ и $I_{\perp}$ соответственно. Поляризацию P определяли как $\frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}$.

ЯМР-исследования проводили на спектрометре ядерного магнитного резонанса «Тесла ВС 567/А» (Чехословакия) с рабочей частотой 100 МГц для протонов. Температуру исследуемого раствора поддерживали с точностью ± 1 К. Образцы помещали в специальную ампулу из фторопласта, которая не разрушается при замораживании раствора. В качестве внешнего стандарта использовали тетраметилсилан в запаянных стеклянных капиллярах.

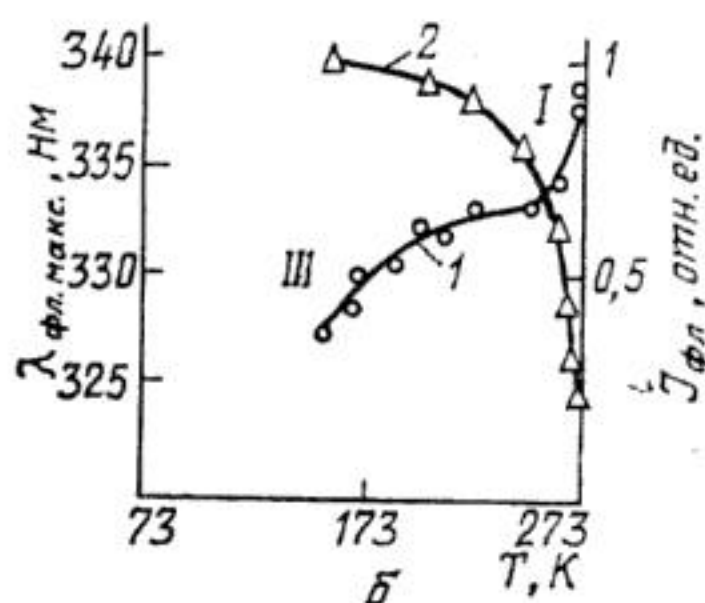
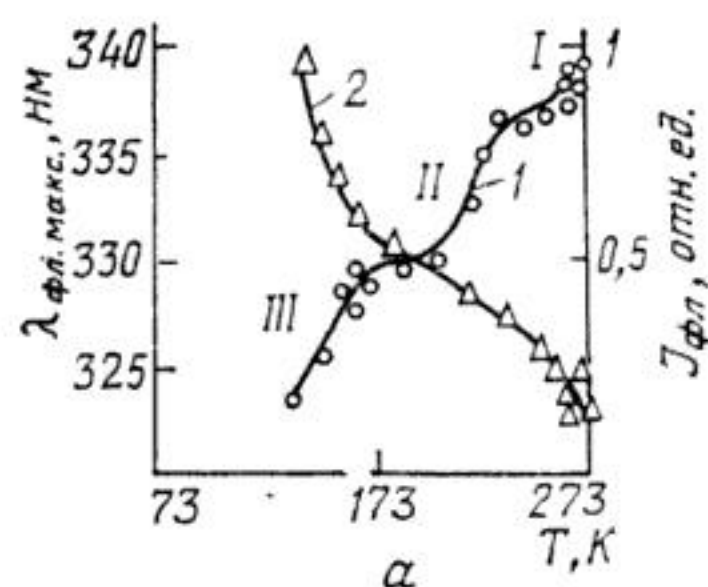
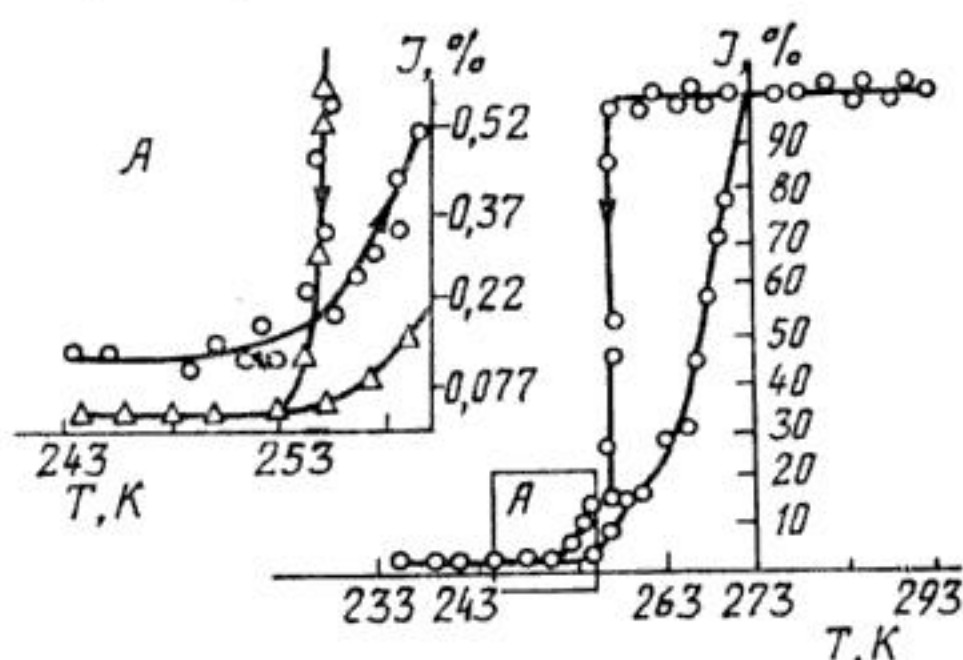


Рис. 1. Температурные зависимости спектральных характеристик флуоресценции миозина: $I_{\text{фл}}$ (1) и $\lambda_{\text{фл. макс}}$ (2). Условия: 0,5 М КСl, 1 мМ ЭДТА, рН 6,8, концентрация белка — 2,5 мг/мл. $\lambda_{\text{возб}} = 280$ нм (а); $\lambda_{\text{возб}} = 296$ нм (б)

Рис. 2. Зависимость интенсивности сигнала ЯМР воды (нормированной к интенсивности при 293 К) от температуры в растворах миозина: Δ — растворитель, $\circ$ — раствор миозина. Условия: 0,5 М КСl, 5 мМ ЭДТА, рН 6,8, концентрация белка — 15 мг/мл



Калориметрические измерения проводили на дифференциальном сканирующем микрокалориметре [3].

Температурные зависимости параметров спектров флуоресценции миозина снимали на образцах, охлажденных предварительно до 77 К, в процессе нагрева их в диапазоне температур от 123 до 273 К. Было установлено, что при повышении температуры и возбуждении собственной люминесценции триптофановых и тирозиновых остатков светом с $\lambda_{\text{возб}} = 280$ нм наблюдаются ступенчатые сдвиги $\lambda_{\text{макс}}$ флуоресценции белка в длинноволновую область при температурах ниже 173 К, около 228 К и вблизи 273 К (соответственно переходы III, II, I (рис. 1, а). При возбуждении свечения только триптофановых остатков белка ($\lambda_{\text{возб}} = 296$ нм) сдвиги $\lambda_{\text{макс}}$ флуоресценции наблюдались при температурах ниже 193—173 К и выше 253 К (рис. 1, б). Изучение переходов начинали от температуры 123 К.

Интенсивность флуоресценции в максимуме спектра замороженных водных растворов миозина при повышении температуры от 77 до 273 К имеет тенденцию к снижению с изменением наклона кривой при температурах около 163 и 253 К ($\lambda_{\text{возб}} = 280$ нм) и около 253 К ($\lambda_{\text{возб}} = 296$ нм).

Согласно существующим представлениям, структура белковых макромолекул и их функционирование в растворе в значительной степени определяются состоянием связанной с макромолекулами воды. Вместе с тем известно, что процесс замораживания-оттаивания влияет на состояние различных фракций воды биополимеров [2]. В связи с этим нами исследовано

состояние незамерзающего водного компонента в тройной системе вода-белок-соль в области температур ниже 273 К. Проанализированы температурные зависимости параметров спектров ЯМР-интенсивности I (т. е. площади под сигналом поглощения) и ширины $\Delta\nu$ протонных сигналов воды (рис. 2).

Интенсивность сигнала воды не изменяется при понижении температуры от комнатной до 261 К, после чего она резко уменьшается. Это связано с возникновением кристаллов льда в системе, ширина сигнала ЯМР которого на несколько порядков превышает ширину сигналов фракций подвижной воды, и сигнал не регистрируется в спектрах высокого разрешения [8]. Поэтому при температурах ниже точки кристаллизации основной массы растворителя в спектрах ЯМР наблюдаются сигналы только тех молекул воды, которые сохраняют достаточно высокую трансляционную и вращательную подвижность. Это вода, связанная с определенными гидрофильными центрами макромолекул или входящая в состав незамерзших включений солевого раствора.

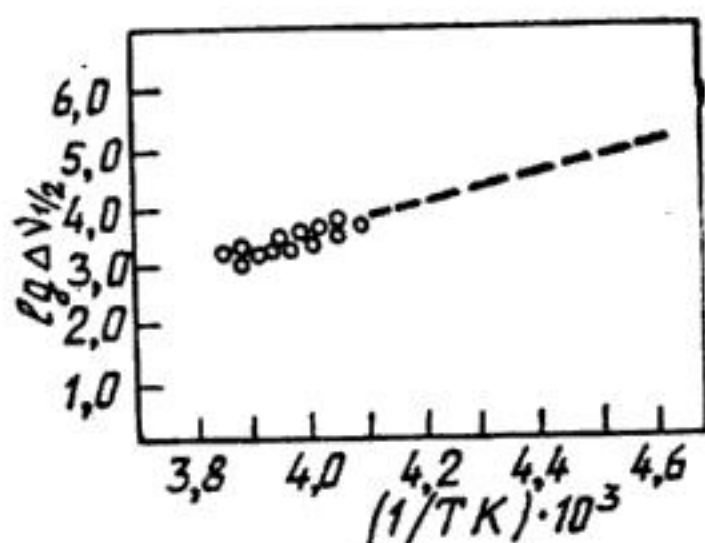


Рис. 3. Температурная зависимость ширины линии спектров ЯМР. Условия: 0,5 М КСl, 5 мМ ЭДТА, рН 6,8, концентрация белка — 15 мг/мл

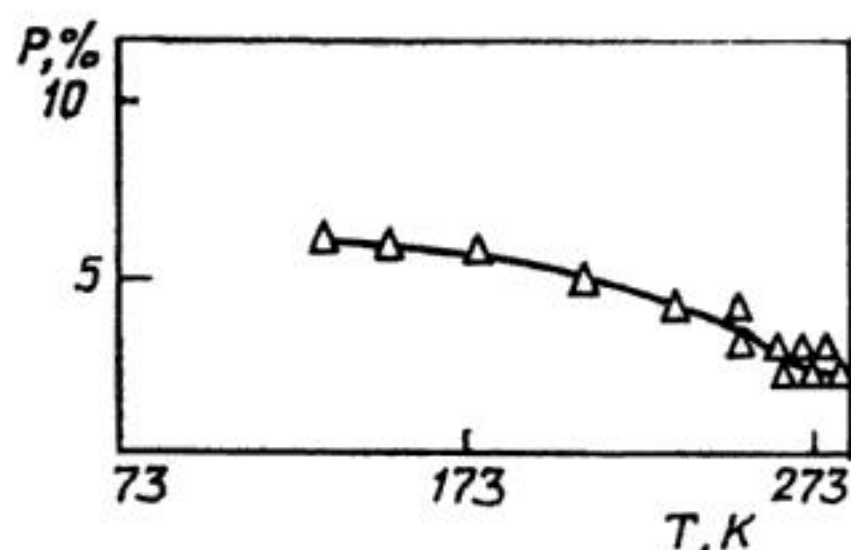


Рис. 4. Температурная зависимость поляризации флуоресценции миозина $\lambda_{\text{возб}} = 280$ нм. Условия: 0,5 М КСl, 5 мМ ЭДТА, рН 6,8, концентрация белка — 2,5 мг/мл

Резкое уменьшение интенсивности сигнала при 261—254 К связано с кристаллизацией переохлажденных эвтектик. По мере дальнейшего понижения температуры интенсивность сигнала H_2O плавно уменьшается в результате постепенного вымерзания связанной воды. При нагреве замороженного раствора интенсивность сигнала воды возрастает по новой ветви, т. е. наблюдается температурный гистерезис. Его существование объясняется переохлаждением системы на этапе понижения температуры [2]. Количество незамерзшей воды в системе при температуре ниже 248 К составляет приблизительно 0,3—0,6 г H_2O /г белка.

Анализ температурной зависимости полуширины линии $\Delta\nu$ при температуре ниже 248 К показывает, что в координатах $\ln \Delta\nu = f(1/T)$ она хорошо укладывается на прямую линию (рис. 3). Предполагая, что такая зависимость сохраняется и для более низких температур, можно экстраполировать эту прямую до значения $\Delta\nu$, характерного для льда при 273 К, т. е. 46000 Гц [5] и оценить температуру, при которой подвижность молекул связанной воды станет такой же, как и во льду при 273 К. Это значение температуры для исследуемой нами системы находится в диапазоне 119—121 К.

Именно в этом интервале температур наблюдается и уменьшение степени поляризации миозина (рис. 4) до значений, характерных для фермента выше 273 К. Такое изменение поляризационных характеристик миозина может возникнуть в результате растормаживания движения молекул воды и соответствующего этому процессу растормаживания подвижности некоторых фрагментов белковых макромолекул. Однако при этом всегда следует учитывать возможность значительных искажений истинных поляризационных характеристик белка за счет влияния различных факторов: изменения опти-

ческих свойств раствора по мере появления жидкой фазы, рекристаллизации и т. д.

Как известно, при вымерзании свободной воды состав растворителя изменяется за счет возрастания концентрации солевых компонентов растворителя. Для выяснения влияния добавок белка и ЭДТА на эвтектические концентрации и эвтектическую температуру в растворах KCl (концентрация KCl при 293 К составляла 0,5 М) было проведено калориметрическое изучение тройных систем вода-соль-белок при добавлении различных концентраций ЭДТА (до 0,5 М) и миозина (до нескольких десятков мг/мл). При этом использовали результаты исследований методом ДСК. Данные о температурах плавления, получаемых этим методом, являются важным и надежным источником термодинамической информации о взаимодействиях растворенных веществ в растворе.

Исследуемые образцы охлаждали со скоростью $16 \text{ К} \cdot \text{с}^{-1}$ погружением в жидкий азот и снимали зависимость теплопоглощения от температуры в режиме нагрева со скоростью $6,67 \cdot 10^{-3} \text{ К} \cdot \text{с}^{-1}$. На всех термограммах регистрируется узкий эндотермический пик при температуре около 262 К. Он соответствует плавлению эвтектики вода-KCl. Эвтектические включения содержат около 20 масс. % KCl. Интенсивный пик вблизи 273 К соответствует полному плавлению системы. Концентрация ЭДТА весьма незначительно влияет на значение температуры плавления эвтектики. Эвтектического плавления других компонентов системы не наблюдалось, что обусловлено, вероятно, их стеклованием. Характерного скачка теплопоглощения, связанного с расстеклованием на этапе нагрева, не было зарегистрировано ни на одной из полученных термограмм. Это может быть объяснено неоднородностью состава жидких микрофаз замороженного раствора и распределением значений температуры стеклования в широком интервале температур.

Таким образом, в исследуемых образцах на этапе нагрева при температуре около 262 К появляется жидкая фаза в результате плавления эвтектики. Концентрация растворенных в воде веществ при этом весьма высока. Она равна эвтектической при температуре 262 К и понижается с ростом температуры. Следовательно, наблюдаемые при этой температуре изменения спектральных характеристик могут быть объяснены действием фактора гиперконцентрации KCl и ЭДТА.

В спектральные сдвиги при температурах от 253 до 223—213 К может давать вклад как затормаживание подвижности гидратной, прочно связанной с белком воды, так и затормаживание подвижности самой белковой матрицы. Следует отметить, что у миозина при этих температурах не происходит значительного спектрального регистрируемого возмущения триптофановых остатков, так как переход II отсутствует при возбуждении низкотемпературной люминесценции светом с $\lambda_{\text{возб}} = 296 \text{ нм}$.

Причина спектральных изменений при температурах ниже 173 К на данном этапе остается неясной. В настоящее время весьма сложно получить прямые экспериментальные данные о состоянии гидратной оболочки миозина при температурах ниже 173 К. Одним из возможных объяснений полученных результатов является предположение о затормаживании подвижности самой белковой матрицы в интервале температур ниже 116—173 К.

Полученные результаты согласуются с высказанными в свое время Пермяковым Е. А. и Бурштейном Э. А. представлениями о причинах появления низкотемпературных спектральных сдвигов у белков. По данным этих авторов [1], сдвиги спектров в области температур от 273 до 253 К существуют лишь у белков, обладающих внешними, поверхностными ароматическими остатками, доступными растворителю, и связаны с замерзанием-размерзанием той части водно-белковой матрицы, в состав которой входят эти поверхностные ароматические остатки. В то же время, переходы в области температур 253—183 К связаны с затормаживанием-растормаживанием той части кооперативной водно-белковой матрицы, в состав которой входят внутрен-

ние остатки ароматических аминокислот. Такая интерпретация полученных данных находится в согласии и с результатами, полученными другими авторами [4], которые с помощью методов спиновых меток и мессбауэровской спектроскопии зарегистрировали изменение подвижности в системе белок-вода в тех же диапазонах температур.

Однако в интерпретации полученных результатов авторы вышеуказанных работ не учитывали возможность возникновения спектральных сдвигов за счет конформационных изменений миозина при температурах ниже 273 К, считая такую возможность маловероятной. Анализ литературных данных [9] свидетельствует все же в пользу той точки зрения, что при температурах ниже 273 К у такого криолабильного белка, как миозин, возможность конформационных изменений вполне вероятна.

Исследование вопроса о наличии конформационных изменений миозина в области температур ниже 273 К, выяснение температурных интервалов криоповреждения белка, особенности криоповреждения миозина в тех или иных температурных точках представляются достаточно важными с точки зрения криобиологии и требуют дальнейшего изучения.

1. Бурштейн Э. А. Собственная люминесценция белка (природа и применение) // Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. — 6. — М.: ВИНТИ, 1976. — 214 с.
2. Вода и водные растворы при температурах ниже 0 °С // Киев: Наук. думка, 1985. — 387 с.
3. Зинченко А. В., Моисеев В. А. Исследование низкотемпературных фазовых переходов в водных растворах ПЭГ-400 калориметрическим методом. — Криобиология и криомедицина, 1979. — Вып. 5. — С. 27—30.
4. Лихтенштейн Г. И., Фролов Е. Н., Белоногова О. В. Исследование динамической структуры белков и ферментов методом спиновых и γ -резонансных меток // Конформационные изменения биополимеров в растворах. — Тбилиси, Б. и., 1973. — С. 206—207.
5. Манк В. В., Куриленко О. Д. Исследование межмолекулярных взаимодействий в ионообменных смолах // Киев: Наук. думка, 1976. — 79 с.
6. Поглазов Б. Ф., Левицкий Д. И. Миозин и биологическая подвижность. — М.: Наука, 1982. — 160 с.
7. Тартаковский А. Д. Методы выделения и характеристика миозина и его субъединиц из поперечнополосатых мышц // Биофизические и биохимические методы исследования мышечных белков. — Л.: Наука, 1978. — С. 55—76.
8. Kuntz I. D., Brassfield T. S., Law G. D., Purcell G. V. Hydration of macromolecules // Science. — 1969. — N 3873. — P. 1329—1331.
9. Matsumoto J. J. Denaturation of fish muscle proteins during frozen storage (a review) // Proteins at Low Temperatures, Advances in Chemistry. — Series 180. — Washington: American Chem. Soc. — 1979. — P. 205—225.

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

Поступила 20.07.87

УДК 615.832.97:616—006.311.03

**В. В. Шафранов, Ю. В. Тен, В. Г. Резницкий, Д. И. Цыганов,
В. А. Кожевников**

СВЧ- И КРИОВОЗДЕЙСТВИЕ НА БИОТКАНИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ И КЛИНИКЕ

Проблема лечения объемных сосудистых опухолей у детей окончательно не решена, несмотря на наличие большого количества способов лечения. Особенно трудно поддаются лечению кавернозные и комбинированные гемангиомы головы и шеи, которые практически не подвергаются спонтанной регрессии и имеют склонность к бурному росту, нередко приводящему к значительному косметическому и функциональному дефекту. Наиболее распространенными методами лечения объемных гемангиом открытых частей

тела в настоящее время является склерозирующий и хирургический способы [3]. Однако склерозирующая терапия эффективна лишь при гемангиомах небольших размеров [6]. Хирургический же метод, который позволяет получить наиболее обнадеживающие результаты, таит в себе ряд опасностей: возможность кровотечения и повреждения близлежащих нервных стволов, рецидивирование и образование грубых деформирующих рубцов, зачастую приводящее к гораздо большему косметическому и функциональному дефекту, нежели сама опухоль [7].

Одним из наиболее простых и безопасных методов лечения гемангиом у детей является криовоздействие. Метод сопровождается минимальным числом осложнений, однако он имеет существенный недостаток — ограниченность зоны криовоздействия, что сдерживает его применение при лечении объемных сосудистых опухолей. Новые возможности лечения объемных гемангиом с помощью низких температур открылись с установлением факта усиления криодеструкции с помощью микроволн сверхвысокочастотного электромагнитного поля — СВЧ ЭМП [8].

Известно, что глубина замораживания и крионекроза биоткани во многом определяется ее теплофизическими свойствами (ТФС) и основной ее характеристикой является теплопроводность [1]. Способность биоткани проводить тепло в стационарном режиме характеризуется ее теплопроводностью — λ , Вт/м · К. Эта величина зависит главным образом от количества и структуры воды биообъекта [4]. Для механизмов криоповреждения существенное значение имеет состояние «связанной» воды в клеточных и тканевых системах [10]. В частности, если вода находится в «связанном» состоянии, она может вообще не кристаллизоваться в лед при понижении температуры [5].

Влияние СВЧ ЭМП на биоткани неоднозначно, но по мнению большинства авторов, объектом воздействия микроволн являются дипольные структуры, основную часть которых представляет «связанная» вода [9]. Под влиянием микроволн полярные молекулы приходят в возбужденное состояние, возникают резонансные явления. Возможны также изменение зоны гидратации, разрывы внутримолекулярных связей. Все это дестабилизирует структуру воды, делает ее более подвижной и чувствительной к различным влияниям, в том числе и к холодовому воздействию.

Клинический опыт подтверждает положительное влияние СВЧ ЭМП на усиление криодеструкции [2]. Однако недостаточная изученность механизма действия микроволн, отсутствие четких научно обоснованных режимов СВЧ- и криовоздействия при лечении кавернозных и комбинированных гемангиом вызывает определенные трудности для более широкого применения метода в практике.

Целью нашей работы явилось изучение механизма действия СВЧ ЭМП в аспекте усиления криодеструкции, научное обоснование СВЧ-криохирургического метода лечения сосудистых опухолей у детей с определением оптимальных режимов СВЧ- и криовоздействия.

Для решения поставленной задачи была проведена серия экспериментальных исследований: изучение динамики льдообразования в биоткани после СВЧ-облучения, определение теплопроводности биоткани после воздействия микроволнами, морфологическое исследование биоткани с изучением температурных полей под влиянием комбинированного СВЧ- и криовоздействия.

Опыты выполнены на печени кроликов, которая по ТФС ближе других тканей стоит к гемангиомам и является моделью сосудистых опухолей [4]. Для эксперимента использованы кролики породы «Шиншилла» массой от 2,5 до 3,0 кг, всего — 89 животных. Источником микроволн служил серийно выпускаемый аппарат «Плот» с длиной волны 33 см, частотой колебаний — 915 МГц, диаметром излучателя — 3,0 см. В качестве охлаждающего устройства применяли автономный криоприбор заливного типа с диаметром охлаждающей головки 0,8 см и температурой наконечника — 160 °С.

Динамика льдообразования в биоткани при воздействии на нее микроволновым электромагнитным излучением и холодом изучалась методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР). При этом использовали лабораторный стенд, который содержит модифицированную установку — релаксометр ЯМР-1 с пересчетным устройством, систему терморегуляции и термостатирования образцов, СВЧ-генератор, контрольно-измерительную аппаратуру. Исследованию подвергались образцы печени объемом $0,1 \text{ см}^3$, что позволяло получить наилучшее отношение сигнала к шуму и исключить работу приемника в области насыщения; всего проведено 25 исследований.

Теплопроводность биоткани в результате СВЧ-воздействия определялась с помощью прибора «ИТЭМ-1» на изолированном материале и экспериментального стенда с применением датчиков теплового потока, разработанных и аттестованных в Институте технической теплофизики АН УССР — на неизолированном материале. Мощности СВЧ-воздействия: 5, 10, 15, 20 Вт, экспозиция от 1 до 10 мин с дискретностью в 1 мин. Всего проведено 515 измерений. Морфологическое исследование биоткани с изучением температурных полей проводилось после комбинированного СВЧ-криохирургического воздействия.

Под кеталаровым наркозом путем продольной лапаротомии обнажалась печень, пузырная доля которой служила контролем криовоздействия, левая — подопытной. Замораживали участок пузырной доли в течение 3 мин (контроль 2). Затем осуществляли облучение левой доли, после чего сразу же выполняли локальное замораживание облученного участка печени (опыт). Лапаратомный разрез зашивали наглухо. Кроме того, контролем служили: интактная печень (контроль 1), которой под наркозом была произведена лапаратомия без каких-либо воздействий, а также печень, облученная СВЧ-полем (режимы СВЧ ЭМП выбраны на основании исследования теплопроводности; плотность потока мощности — $1,42 \text{ Вт/см}^2$, экспозиция — 3 мин), без локального замораживания (контроль 3). Животных выводили из опыта сразу после операции, через 24 и 72 ч, а также через 10, 20, 30 сут; изучались макро- и микроструктура печени. При этом использовались гистологические окраски: гематоксилин-эозин, PAS-реакция.

Изучение температурных полей при СВЧ-криовоздействии осуществляли с помощью медь-константановых термопар, а регистрация термо-ЭДС проводилась прибором «В7-27». Сделано 168 измерений.

Анализ экспериментальных данных, характеризующих процесс льдообразования в биоткани под влиянием микроволн, показывает, что при предварительном облучении СВЧ-полем этот процесс идет интенсивнее. При этом, вероятно, разрушается квазикристаллическая структура воды и растворов протеинов, то есть вода из «связанного» состояния переходит в «свободное», что приводит к более интенсивному процессу вымерзания влаги при последующем криовоздействии на облученный образец. Количество вымерзшей воды в охлажденных образцах с предварительным СВЧ-воздействием на 10—15 % больше, чем в контрольных, а поскольку одним из основных критериев некротического действия холода на биообъект является количество вымерзшей воды, то можно предположить и увеличение зоны криодеструкции.

Изучение теплопроводности показало, что микроволны увеличивают ее значение при одних параметрах СВЧ-поля и уменьшают при других, что дает возможность определить оптимальные режимы СВЧ-воздействия для достижения максимального увеличения объема крионекроза при комбинированном методе. Оптимальные режимы СВЧ-воздействия: плотность потока мощности — $1,42 \text{ Вт/см}^2$, экспозиция — 3—5 мин (чем больше теплоприток с кровью — тем больше экспозиция). Установлено, что в результате микроволнового облучения повышенная теплопроводность сохраняется в пределах 30 мин, причем в первые 5 мин последняя держится на высоких уровнях, а затем идет резкое ее падение, из чего можно сделать вывод, что наибо-

лее оптимальное время для криовоздействия — непосредственно после облучения СВЧ-полем и в первые 5 мин после него.

Данные морфологического исследования показали, что СВЧ ЭМП в указанных режимах не приводит к стойким повреждениям биоткани, и в то же время в комбинации с холодом способствует значительному увеличению объема крионекроза. Так, только по глубине некроза различие достигает более чем в 6 раз (глубина СВЧ-крионекроза — $2,60 \pm 0,09$ см, глубина «чистого» крионекроза — $0,40 \pm 0,04$ см). Сразу после СВЧ-воздействия в ткани печени, преимущественно в гепатоцитах, отмечается накопление в большом количестве вакуолей воды, что подтверждает мысль — объектом воздействия микроволн является «связанная» вода. В ранние сроки (24—72 ч) обнаружены незначительные и нестойкие циркуляторные расстройства — капиллярное полнокровие и расширение вен портальных трактов. Эти изменения носят временный характер и нивелируются к 10-м сут. В более поздние сроки: 10, 20, 30 сут, строение печени правильное, и о перенесенной травме свидетельствует только умеренная лимфонидная инфильтрация портальных трактов, постепенно снижающаяся к 30-м сут до типичной для печени интактных кроликов. Процесс заживления раны после СВЧ-криовоздействия протекал так же, как при «чистом» криовоздействии, асептически, несмотря на значительно большую зону некроза. Формирующийся рубец имел незначительные ответвления в глубину печени без деформации органа. Полное заживление наблюдается к 30-м сут (в контроле — к 20—30-м сут) путем формирования плоского линейного рубца.

Изучение температурных полей показало, что при комбинированном СВЧ-криовоздействии повышается температурный порог девитализации с $-8,00 \pm 0,80$ °C в контроле до $5,00 \pm 0,69$ °C в опыте. Эти данные позволили объективизировать процесс криовоздействия, так как зона СВЧ-крионекроза практически равна зоне замораживания и, таким образом, для достижения некроза заданного объема биоткани необходимо то же, что и для его замораживания. Отмечено также повышение и температурного порога заморзания биоткани с $-1,00 \pm 0,10$ °C в контроле до $-0,30 \pm 0,06$ °C в опыте. Существенно отличалась и зона замораживания. Так, при «чистом» криовоздействии диаметр ее равнялся в среднем 1,6 см, а при СВЧ-криовоздействии — 2,5 см, то есть линейные размеры ее во втором случае были более чем в 1,5 раза больше. Причем, если для замораживания заданной зоны в контроле требовалось в среднем 2 мин 25 с (в течение последующих 35 с зона замораживания не увеличивалась), то в опыте — всего 1 мин, то есть скорость замораживания увеличилась более чем в 2 раза при предварительном воздействии на биоткань микроволнами.

Таким образом, экспериментальные данные показали, что микроволны в предлагаемых нами режимах не вызывают необратимых изменений биоткани и в то же время способствуют значительному увеличению объема крионекроза. Механизм усиливающего влияния микроволн на процесс криодеструкции, очевидно, заключается в дестабилизации структуры «связанной» воды, которая переходит в более подвижное и чувствительное к влиянию холода состояние вследствие появления «свободной» воды. Полученные данные позволили обосновать СВЧ-криохирургический метод лечения с четкими, объективными режимами СВЧ- и криовоздействия. На основании полученных данных была разработана методика СВЧ-криодеструкции кавернозных и комбинированных гемангиом у детей.

В клинике по поводу объемных сосудистых опухолей головы и шеи СВЧ-криодеструкция проведена у 323 больных в возрасте от периода новорожденности до 6 лет. Сложная анатомическая локализация гемангиом (веки, нос, околоушная область и др.), когда применение наиболее радикального хирургического метода весьма проблематично, имела место у 143 больных (44,3 %). Следует отметить, что 218 больным (67,4 %) с кавернозными и комбинированными гемангиомами ранее проводилось какое-либо лечение (склерозирующая терапия, гормонотерапия и др.) без особого

эффекта. У 48 больных лечение было начато только криохирургическим методом; при этом разрушалась только кожная часть гемангиомы, а подкожная продолжала расти даже при криовоздействии с экспозицией 5—7 мин, что потребовало проведения комбинированного лечения. При анализе результатов лечения установлено, что данный метод оказался эффективным в 94,6 % случаях и лишь в 18 не удалось вылечить объемные гемангиомы указанным способом. Однако нужно отметить, что даже в группе неизлеченных больных удалось добиться заметного улучшения в виде уменьшения размеров опухоли и временной остановки роста гемангиомы на 1—2 мес. Неэффективные случаи лечения мы связываем с наличием крупного питающего сосуда опухоли, затрудняющего эффективное криовоздействие вследствие большого теплопритока в область замораживания. Анализ косметических и функциональных результатов лечения показал, что в большинстве случаев (92,3 %) достигнут хороший результат. Рецидивов опухоли не наблюдалось.

Таким образом, экспериментальные исследования показали, что комбинированное применение микроволн и низких температур расширяет границы применения криохирургического метода в лечении объемных сосудистых опухолей у детей. СВЧ-криодеструкция — эффективный способ лечения кавернозных и комбинированных гемангиом у детей, для которого практически нет сложных анатомических локализаций, позволяющий более чем в 90 % случаев отказаться от сложных оперативных вмешательств и длительной, зачастую неэффективной склерозирующей терапии.

1. Демидов Ф. П., Микулин Е. И., Резницкий В. Г., Цыганов Д. И. Устройство для теплопроводящих свойств биоткани // Электронная промышленность. — 1983. — Вып. 11. — С. 60—61.
2. Исаков Ю. Ф., Гераськин В. И., Шафранов В. В., Резницкий В. Г. Перспективы применения низких температур в детской хирургии // Хирургия. — 1984. — № 4. — С. 122—126.
3. Кручинский Г. В., Криштопенко Л. С. Особенности гемангиом лица у детей раннего возраста и их склерозирующая терапия // Вестник хирургии им. И. И. Рекова. — 1986. — 136, № 4. — С. 83—85.
4. Микулин Е. И., Демидов Ф. П., Резницкий В. Г., Цыганов Д. И. Исследование теплопроводности биоткани в области фазовых превращений воды // Холодильная техника. — 1984. № 4. — С. 34—36.
5. Мревлишвили Г. И. Калориметрическое состояние воды в биологических объектах. — Тбилиси, Б. и., 1969. — 48 с.
6. Ситковский Н. Б., Гераськин В. И., Шафранов В. В., Новак М. М. Лечение гемангиом у детей жидким азотом. — Киев: Здоров'я, 1986. — 120 с.
7. Соловей А. Н. Выбор метода лечения сосудистых опухолей, локализуемых в области околоушной железы // Актуальные вопросы детской хирургии и анестезиологии. — Ростов-на-Дону, Б. и., 1979. — 97. — С. 170.
8. Шафранов В. В., Резницкий В. Г., Шестиперов В. А. и др. Сочетанное действие СВЧ-электромагнитного поля и локального замораживания на биоткани // Бюлл. exper. биол. и мед. — 1983. — № 4. — С. 95—98.
9. Штемлер В. М. Исследование некоторых сторон биологического действия микроволн: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 1974. — 31 с.
10. Mazur P. M. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing // J. Gen. . Physiol. — 1963. — 47, N 2. — P. 247—369.

2-й Московский ордена Ленина
государственный мед.
ин-т им. Н. И. Пирогова

Поступила 10.10.86

*В. Н. Запорожан, О. В. Хаит, В. Г. Морозов, А. М. Татарова,
В. Х. Хавинсон, И. Н. Пресняк*

КОМПЛЕКСНОЕ КРИОХИРУРГИЧЕСКОЕ С ТИМАЛИНОМ ЛЕЧЕНИЕ ГИПЕРПЛАСТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ЭНДО- И МИОМЕТРИЯ

Проблема лечения гиперпластических процессов матки в настоящее время привлекает все большее внимание исследователей [3]. Актуальность её обусловлена неуклонным увеличением заболеваемости этим видом опухолей [1,2], возможностью малигнизации, появлением новых лекарственных препаратов, а также новых данных о состоянии эндокринной, иммунной систем, обменных процессов при миоме матки и гиперплазии эндометрия. В то же время вопросы состояния иммунологического гомеостаза, необходимости применения иммуномодуляторов в комплексном лечении больных с гиперпластическими процессами матки изучены недостаточно, им посвящены единичные работы [8, 9].

Основными методами лечения гиперпластических процессов матки в настоящее время являются гормональный, хирургический, а также криохирургический [4,6]. Появление последнего обусловлено прежде всего наметившейся в последние годы тенденцией к омоложению указанного контингента больных и необходимостью более широкого применения органосохраняющих методов лечения.

Общепризнанными достоинствами внутриматочного криовоздействия являются простота, общедоступность, малое количество осложнений, бескровность, возможность сохранения органа [5,6]. Это единственный из существующих методов лечения, не угнетающий, а стимулирующий иммунную систему. В то же время установлено, что этот эффект сохраняется лишь в течение 1,5 мес послеоперационного периода, а затем показатели возвращаются к исходному уровню. Не нормализуются также показатели функционального состояния иммунитета [7].

Целью настоящего исследования явилось изучение состояния Т-лимфоцитарной системы у больных с миомой матки в сочетании с гиперплазией эндометрия, а также динамики иммунного гомеостаза после изолированного криохирургического и комплексного с тималином воздействия.

Под наблюдением находилось 55 больных, у которых была диагностирована миома матки и гиперплазия эндометрия. Все больные находились в позднем репродуктивном и переменнo-паузальном возрасте, менструальная функция у всех была сохранена, средний возраст составил $43,9 \pm 0,8$ лет. Все больные подверглись кольпо- и гистероскопии, диагностическому выскабливанию с последующим гистологическим исследованием соскоба; было произведено ультразвуковое скенирование органов малого таза.

По данным анамнеза установлено, что жалобы на обильные менструации, переходящие в кровотечения, предъявляли 6 женщин, на обильные менструации — 13, на ациклические кровотечения — 16, на контактные кровотечения — 3, на скудные кровянистые выделения из половых путей до и после менструации — 14, жалоб не предъявляли 3 человека. Необходимо отметить, что одновременно с основными больные предъявляли жалобы на слабость, головокружение — 19 человек, на боли внизу живота — 32.

Менструации начались раньше 12 лет у 6 человек, в период с 12 до 14 лет — у 42, позже 14 лет — у 7. Длительность менструации в течение 2—3 дней наблюдалась у 19 женщин, 3—5 дней — у 19 и 6—8 дней — у 17. Необходимо отметить, что нарушения менструального цикла в период заболевания носили характер удлинения менструации, сокращения светлых промежутков между последними, увеличения количества менструальной крови, а также наблюдалось нарушение цикличности. Большинство больных связывают возникновение нарушений с развитием основного забо-

левания, остальные отметили возникновение нарушений после аборт, родов, введения или удаления ВМС, смены климата, а также после стрессовых ситуаций. Так, из общего числа обследованных женщин климат меняли 15 человек.

Длительность заболевания колебалась от 0,5 года до 15 лет, причем менее 1 года болели 10 женщин, от 1 до 5 лет — 36 и более 5 лет — 9. Раннее начало половой жизни (до 20 лет) отмечено у 16, в возрасте 21—25 — у 29 и позже 25 лет — у 10. Рожали и делали аборт — 49 женщин, только роды — у 3; первичное бесплодие имело место у 3 человек, вторичное — у 6. Из общего числа обследованных у 10 были самопроизвольные аборт в сроке от 6 до 16 недель беременности. Необходимо отметить, что у 42 женщин течение беременности и родов осложнялось токсикозами I-й и II-й половины, угрозой прерывания, слабостью родовых сил, кровотечением с последующим ручным обследованием полости матки, разрывами шейки матки и промежности, а также различными воспалительными заболеваниями.

По данным генеалогического обследования выявлена высокая степень наследственной отягощенности — у родственниц 32 женщин в I-м и II-м поколениях имели место миомы матки, рак тела и шейки матки, злокачественные новообразования других органов, заболевания сердечно-сосудистой системы, печени и желудочно-кишечного тракта. Одновременно у обследованных женщин наблюдалась высокая степень отягощенности соматического статуса, причем наибольший удельный вес в структуре заболеваемости принадлежал заболеваниям дыхательных путей. Особенно четко эта зависимость прослеживалась в периодах детства и полового созревания. Так, в детстве 29 женщин перенесли детские инфекции, из них у 16 наблюдалось сочетание с ангинами, бронхитами и т. д., тонзиллэктомия была произведена 10. В период полового созревания инфекционные и другие заболевания наблюдались у 6 человек, а заболевания дыхательных путей (ангины, бронхиты, пневмонии) — у 25. В периоде половой зрелости отмечалось повышение процента заболеваний печени и желудочно-кишечного тракта, а также нарушение обмена веществ. Обследованные женщины ранее страдали хроническими воспалительными процессами придатков матки — 33 человека, эрозия шейки матки была обнаружена у 21, по поводу чего 6 подвергались диатермокоагуляции; полипы цервикального канала обнаруживали ранее у 15, вторичную альгодисменорею отмечали 3 человека, ювенильные кровотечения у 3, ранее получали противовоспалительную терапию — 10 женщин, у 10 осуществляли удаление полипов цервикального канала. Диагностическому выскабливанию ранее подвергались 51 женщина, из них 27 — один раз, 15 — два-три раза, более трех — 9.

В результате обследования выявлены сопутствующие гиперпластические процессы в молочных железах — у 24. Изменения на рентгенограмме черепа выявлены у 15, они выражались в усилении сосудистого рисунка, расширении диплоических вен, склеротических изменениях костной ткани, в истончении стенок «турецкого седла», сужении его входа. Изучение результатов кольпоскопического исследования продемонстрировало наличие у 12 женщин лейкоплакии, у 5 — коагуляционного цервикоза, у 3 — эктопии, у 9 — зоны превращения шейки матки.

Состояние эндокринного фона определялось по данным ректальной температуры, кольпоцитологии, по содержанию 17-кетостероидов и оксикортикостероидов в моче. Необходимо отметить, что у 19 больных выявлено наличие ановуляторного цикла с различной степенью эстрогенной насыщенности мазков, а у 36 — овуляторного цикла. По данным бимануального осмотра установлено, что у всех женщин размеры матки не превышали 10 недель беременности. Изучение гистероскопической картины и гистологического строения выявило у 19 женщин железисто-кистозную гиперплазию эндометрия, у 21 — железистую и у 15 — очаговую железистую гиперплазию на фоне секреторной трансформации эндометрия.

Изучение состояния иммунной системы у больных осуществляли на 5—7-й и 20—24-й дни менструального цикла. У группы женщин с ановуляцией взятие крови производили в те же сроки, принимая за 1-й день цикла первый день менструально-подобной реакции. Состояние Т-системы иммунитета определяли по таким показателям, как общее количество Т-клеток и их активной субпопуляции [13]; Т-лимфоциты, имеющие рецепторы для эритроцитов кролика; Т-клетки, несущие рецепторы к Fc-фрагментам иммуноглобулина М и G [11], лимфоциты, образующие розетки с собственными эритроцитами (А-РОК). Количество клеток определяли как в относительных, так и в абсолютных единицах. После учета всех показателей результаты обрабатывали методом вариационной статистики.

Из общего числа больных 30 подверглись изолированному криохирургическому воздействию, а 25 — комбинированному с применением иммуномодулятора тималина. Последний назначали по разработанной нами схеме.

Изучение состояния Т-системы иммунитета у больных с миомой матки и гиперплазией эндометрия, развившихся на фоне сохраненного менструального цикла, продемонстрировало нарушения отдельных показателей по сравнению с таковыми практически здоровых женщин. Так, установлено, что у больных с гиперпластическими процессами матки наблюдается достоверное повышение процентного содержания общего количества Т-лимфоцитов как в I-й, так и во II-й фазах цикла (с $53,8 \pm 3,9\%$ до $69,6 \pm 4,8\%$ и с $49,8 \pm 4,1\%$ до $71,7 \pm 5,8\%$, $P < 0,05$, $P < 0,01$ соответственно). В то же время абсолютное содержание этих клеток в I-й фазе цикла снижено ($2,76 \pm 0,46$ Г/л и $1,5 \pm 0,16$ Г/л, $P < 0,05$). Обращает на себя внимание дисбаланс между Т-клетками преимущественно хелперами (T_H) и Т-клетками преимущественно супрессорами (T_γ). Если у практически здоровых женщин соотношение абсолютных показателей T_H/T_γ составляет 1,0—0,8 в зависимости от фазы цикла, то у больных это соотношение составляет 0,2—0,4.

После внутриматочного криовоздействия на 3—7-е сут послеоперационного периода больные предъявляли жалобы на слабость, недомогание, что обусловлено потерей большого количества микроэлементов, в частности калия с экссудатом [6]. У 13 из 30 больных температура тела повышалась на $0,6—0,9^\circ\text{C}$ и сохранялась до 5—7-х сут послеоперационного периода. К 14—16-м сут эти жалобы исчезли, а к 28—30-м полностью прекращалось выделение экссудата. В то же время необходимо отметить, что у 6 женщин на 1-е сут после криовоздействия наблюдались спазмирование внутреннего зева цервикального канала, задержка экссудата в полости матки и, как следствие, повышение температуры тела до $37,5—38^\circ\text{C}$, усиление болей внизу живота; у 9 из 30 больных, в анамнезе которых имелись указания на наличие хронического воспаления придатков матки, наблюдалось усиление болей внизу живота, при осмотре определялись чувствительные при пальпации увеличенные придатки. Своевременно проведенные лечебные мероприятия (бужирование цервикального канала, назначение спазмолитиков в комплексе с противовоспалительной терапией) позволили купировать возникшие жалобы в течение 7 сут. Применение тималина в послеоперационном периоде заметно повлияло на выраженность и частоту возникновения у больных жалоб и осложнений. Женщины этой группы практически не предъявляли жалоб на слабость, недомогание после вмешательства. Одновременно отмечалось сокращение количества экссудата в послеоперационном периоде, температура тела повышалась в среднем на $0,3—0,4^\circ\text{C}$. Из 25 женщин лишь у одной наблюдалась задержка выделений в полости матки, что потребовало назначения дополнительной терапии. Осложнения, связанные с обострением ранее существовавших воспалительных процессов гениталий практически отсутствовали. Среднее количество койко-дней в группе больных, получавших тималин, сократилось на 4 дня.

В то же время необходимо отметить, что на введение тималина у больных наблюдались следующие реакции: после первой инъекции у 1 больной появилось чувство жара через 5 мин без подъема температуры, у 1 больной

с хроническим воспалением придатков матки повысилась температура до $37,2^{\circ}\text{C}$ и сохранялась в течение 3 ч с одновременным усилением болей в очаге хронического воспаления, у 1 пациентки наблюдалась резкая слабость в течение 3 ч после укола, у 1 пациентки через 10 мин появилось головокружение. После второй инъекции у двух женщин наблюдались схваткообразные боли внизу живота в течение 1 ч; у 1 пациентки через 30 мин появились боли в области сердца, которые прошли через 10 мин; слабость и головокружение в течение 5 ч наблюдались у 1 больной. После остальных инъекций реакции отмечено не было.

Изучение состояния иммунной системы в обследованных группах больных выявило преимущественное влияние тималина на субпопуляции Т-лимфоцитов (T_{μ} ; T_{γ} ; А-РОК). Так, у женщин, перенесших изолированное криовоздействие, уже на 7-е сут послеоперационного периода наблюдалось достоверное повышение процентного содержания T_{γ} -клеток ($P < 0,01$). Однако наиболее значительным это повышение становится на 45-е сут — абсолютное количество T_{γ} -клеток достигает $2,27 \pm 0,53$ Г/л. Аналогичная ситуация наблюдалась и с $T_{кр}$. В группе женщин, получавших в послеоперационном периоде тималин, отмечалась противоположная картина: количество T_{γ} и $T_{кр}$ снижалось. В то же время необходимо отметить, что одновременно у всех больных наблюдалось снижение и T_{μ} -клеток, которое становится достоверным ($P < 0,01$) на 7-е и 14-е сут послеоперационного периода в группе женщин, получавших тималин.

Исходя из вышеизложенного, было изучено изменение соотношения субпопуляций T_{μ}/T_{γ} , что явилось более показательным, чем сравнение абсолютных величин. Установлено, что у практически здоровых женщин этот показатель составляет $1,0 \pm 0,1$ и $0,8 \pm 0,09$ соответственно в I и II фазы менструального цикла. В группе женщин с гиперпластическими процессами матки за счет повышения T_{γ} -клеток этот показатель снижался до $0,2 \pm 0,01$ и $0,4 \pm 0,01$ соответственно. На 3-и сут послеоперационного периода наблюдалась его нормализация в обеих группах женщин — подвергнутых изолированному криовоздействию ($1,2 \pm 0,1$) и сочетанному с тималином ($1,3 \pm 0,1$). Однако для больных первой группы уже 7-е сут характеризовались снижением этой величины до $1,0 \pm 0,1$ и это снижение продолжало прогрессировать по мере проведения дальнейших исследований (14-е сут — $0,47 \pm 0,08$; 30-е сут — $0,79 \pm 0,09$ и 45-е сут — $0,2 \pm 0,02$). У женщин, получавших тималин, в те же сроки исследования соотношение T_{μ}/T_{γ} было соответственно равно: 7-е сут — $1,25 \pm 0,01$; 14-е сут — $1,0 \pm 0,09$; 30-е сут — $0,75 \pm 0,09$ и 45-е сут — $0,69 \pm 0,08$. В то же время наблюдалось необратимое снижение абсолютного количества клеток, образующих розетки с аутологичными эритроцитами (А-РОК). Причем, если после криовоздействия с тималином это снижение становится достоверным уже на 3-и сут послеоперационного периода ($P < 0,05$), то после изолированного криовоздействия достоверность достигается лишь на 45-е сут ($P < 0,01$).

В связи с изложенным 10 женщин получили повторный курс препарата тималин по прежней схеме (через месяц после воздействия). Все больные отмечали улучшение состояния, повышение общего тонуса; 4 женщины с выраженным предменструальным синдромом отметили значительное улучшение состояния в этот период в течение 3 мес после повторного курса препарата. Результаты исследований в течение года после приема препарата свидетельствовали об уменьшении размеров матки у всех больных в среднем на $10,2 \pm 1,1$ мм (по данным ультразвукового исследования органов малого таза). Отмечено прекращение маточных кровотечений, мажущих кровянистых выделений до и после менструации, у женщин репродуктивного возраста — восстановление менструального цикла.

Полученные результаты соответствуют данным [10] о способности пептидов тимуса улучшать регенерацию тканей и повышать количество Е-РОК и Т-хелперов ($ОКТ4^{+}$) в культуре клеток крови. Известно также, что тималин не оказывает существенного влияния на нормальный имму-

нитет [12], в связи с чем изменений нормальных показателей не обнаружено.

Таким образом, можно сделать вывод о целесообразности комбинированного применения криохирургического воздействия и иммуномодулятора тималина для лечения больных с гиперпластическими процессами матки. Вопросы оптимальных схем применения требуют проведения дальнейших исследований в этом направлении.

1. Бохман Я. В. Рак тела матки.— Кишинев: Штиинца.— 1972.— 202 с.
2. Бохман Я. В., Прянишников В. А., Чепик О. Ф. Комплексное лечение при гиперпластических процессах и раке эндометрия.— М.: Медицина, 1979.— 271 с.
3. Вихляева Е. М., Паллади Г. А. Патогенез, клиника и лечение миомы матки.— Кишинев: Штиинца, 1982.— 299 с.
4. Вихляева Е. М. Актуальные вопросы клинической практики при консервативном ведении больных миомой матки // Акушерство и гинекология. — 1980, № 1.— С. 8—13.
5. Грищенко В. И., Курмангалиева Д. А., Моргулян В. П. Влияние криовоздействия на состояние эндометрия в эксперименте и клинической практике // Развитие и применение криогенной техники в медицине: Матер. Всес. конф.— М.; Б. и., 1980.— С. 100—102.
6. Запорожан В. Н. Комбинированное криогенное лечение при гиперпластических процессах матки // Советская медицина.— 1982, № 12.— С. 108—110.
7. Запорожан В. Н. Некоторые показатели иммунологической системы при криохирургии матки // Акушерство и гинекология.— 1983, № 4.— С. 20—23.
8. Зудикова С. И. Аутоиммунные процессы у больных миомой матки // Акушерство и гинекология.— 1980, № 1.— С. 29—30.
9. Минкина Г. Н., Вольф В. Е. Особенности гормонального и иммунного статуса больных с гиперпластическими процессами эндометрия // Акушерство и гинекология.— 1984, № 11.— С. 24—26.
10. Морозов В. Г., Хавинсон В. Х. Выделение, биологическая активность и механизм действия регуляторных пептидов тимуса и костного мозга // Медиаторы иммунного ответа в эксперименте и клинике: Тез. докл. Всес. симпоз.— М.: Б. и. 1983.— С. 106—107.
11. Оценка субпопуляций Т-лимфоцитов у человека: Т-супрессоры и Т-помощники / Методич. рекоменд. ЦНИЛ 2 МОЛГМИ им. Н. И. Пирогова.— М.: Б. и. 1982. 28 с.
12. Ярцев М. Н. Применение тималина при первичной иммунологической недостаточности // Медиаторы иммунного ответа в эксперименте и клинике: Тез. докл. Всес. симпоз. — М.; Б. и. 1983. — с. 185—186.
13. Felsburg F. J., Edelman R., Bilman R. H. The active E rosette test correlation with delayed cutaneous hyper sensitivity // J. Immunol.— 1976.— 116, N 4.— P. 1110—1114.

Одесский мед. ин-т
им. Н. И. Пирогова

Поступила 22.01.87

УДК 616.089.583.29

В. А. Никитин, В. Ф. Куцевляк, П. Б. Крупник, Т. Я. Малик

ОБОСНОВАНИЕ ЭКОНОМИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ОКСИГЕНАЦИИ ТКАНЕЙ В УСЛОВИЯХ ЛОКАЛЬНОЙ ГИПОТЕРМИИ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ПАРОДОНТА

В практической медицине, в частности в стоматологии, в последние годы все большее распространение получает применение холода. Разработана серия криогенной медицинской аппаратуры различного функционального применения, использование которой позволяет качественно по-новому решить ряд сложных проблем лечения многих заболеваний. Кафедрой терапевтической стоматологии Украинского института усовершенствования врачей накоплен положительный опыт по применению разработанных совместно с Физико-техническим институтом низких температур АН УССР устройств для оксигенации тканей полости рта в условиях локальной

гипотермии, позволяющих регулировать температуру и расход хладагента в широком диапазоне [1—3].

Эффективность использования предлагаемого метода лечения достигается благодаря сочетанию локальной гипотермии азотом с одновременным насыщением тканей кислородом. Воздействие кислорода, с одной стороны, снижает гипоксию тканей, а с другой стороны — отрицательно влияет на анаэробную микрофлору.

Предложенный способ заключается в следующем. Изготавливаются назубные каппы на верхнюю и нижнюю челюсти из мягкой пластмассы для исключения влияния хладагента на пульпу зубов. Полость рта прополаскивают антисептическим раствором, на зубные ряды вводят каппы и производят обработку тканей полости рта парожидкостной струей азота с одновременным насыщением ткани кислородом в соотношении кислорода к азоту 8 : 2; 9 : 2 при температуре потока смеси $-12 \div -16^\circ\text{C}$. Струя потока такой смеси перемещается по обрабатываемому участку с одновременной экспозицией 3 : 5 с и общей экспозицией 300 с.

Предлагаемым способом было пролечено 280 больных с легкой, средней и тяжелой степенью пародонтита.

Параллельно в контрольной группе с идентичной паталогией было проведено лечение медикаментозным методом. Нами установлено, что по сравнению с контрольной группой показатели функциональных проб восстанавливались на 3—5 дней быстрее у больных, которым применяли оксигенацию в условиях гипотермии.

Результаты лечения позволяют сделать вывод, что использование предлагаемого метода обеспечивает местную неспецифическую стимуляцию ткани, суть которой сводится к улучшению кровообращения, обезболиванию, противовоспалительному действию и активации гипоталамус-гипофизадренокортиковой системы, способствует повышению оксидационных процессов в тканях и отрицательно влияет на жизнедеятельность анаэробной флоры. Одновременно, одним из преимуществ применения специального устройства для оксигенации тканей в условиях локальной гипотермии при лечении пародонтитов является экономия затрат на медикаменты, а также снижение затрат времени на лечение.

Выполненное на основе накопленных статистических данных сравнение предлагаемого метода лечения с традиционным показало, что получение одного и того же лечебного эффекта достигается через 10—12 процедур, в то время как раньше их надо было проводить не менее 15.

Стоимость полного курса лечения (в год необходимо проводить в среднем 2 курса лечения) снизилась с 44,6 р. до 30,8 р. в год на одного больного. Такое снижение затрат позволит при пропускной способности стоматологического отделения, например, 3 тыс. больных в год, условно высвободить средств на сумму более 40 тыс. р.

Т а б л и ц а

Наименование показателей	Обозначение	Варианты	
		базовый	новый
Число необходимых курсов в течение года	n	2	2
Текущие затраты на 1 курс лечения, р.	C'_k, C''_k	22,9	15,38
Годовые текущие затраты на лечение одного больного	C'_1, C'_2	44,58	30,76
Число больных, пролеченных в течение года		2805	2805
Годовые затраты на лечение, тыс. р.	C_1, C_2	125,04	86,28
Удельные капитальные вложения, тыс. р.	$K_{уд}$	—	2,26
Нормативный коэффициент экономической эффективности	E_n	15	
Условно-годовой экономический эффект, тыс. р. $\Delta_2 = (C_1 - C_2) - E_n K_{уд}$	Δ_r	$\Delta_r = [(125,4 - 86,28) - 0,15 \cdot 2,26] = 38,4$	

С учетом удельных затрат на разработку стоимости самого устройства и изменения текущих затрат на лечение (стоимости расходуемых медикаментов и препаратов, затрат на непосредственное обслуживание медицинским персоналом и др.) был рассчитан условно-годовой экономический эффект от использования предлагаемого метода, который составил 38,4 тыс. р. Результаты выполненных расчетов представлены в таблице.

Необходимость оценки социального результата предлагаемого метода диктуется усилением социальной направленности научно-технического прогресса в системе здравоохранения, основной целью которого является увеличение средней продолжительности жизни и трудоспособности человека.

Внедряемый метод благодаря сокращению времени полного курса лечения создает реальную возможность более полного охвата населения высокоэффективным медицинским обслуживанием, т. е. социальный результат может быть выражен посредством таких показателей, как увеличение пропускной способности каждого стоматологического кабинета (K_n) по данному виду заболеваний или повышение процента своевременного охвата (K_o) больных пародонтитом лечением с использованием более современных методов:

$$K_n = \frac{N_m}{N_6} \text{ или } K_o = \frac{N_m - N_6}{N_6} \cdot 100,$$

где N_m , N_6 — число больных пародонтитом, пролеченных соответственно с применением нового и традиционного методов лечения, чел. Таким образом, внедрение нового метода лечения заболеваний пародонта обеспечивает высокий лечебный эффект в большинстве случаев, позволяет отказаться от медикаментозного лечения, сокращает время лечения и является безболезненным, повышает производительность труда медицинского персонала, увеличивая пропускную способность пародонтологического кабинета.

1. А. с. 969258 СССР, МКИ³ А 61 В 17/36. Устройство для локального охлаждения биологической ткани / Б. Н. Муринец-Маркевич, В. А. Никитин, А. Р. Красников и др. — Оpubл. 30.10.82, Бюл. № 40.
2. А. с. 1115743 СССР, МКИ³ А 61 В 17/36. Устройство для локального охлаждения биологической ткани / Б. Н. Муринец-Маркевич, А. Р. Красников, В. А. Никитин и др. — Оpubл. 30.09.84, Бюл. № 36.
3. А. с. 1159576 СССР, МКИ³ А 61 К 6/00//А61В 17/36. Способ лечения тканей пародонта и слизистой оболочки полости рта / В. А. Никитин, В. Ф. Куцевляк, Л. Е. Серебрянников и др. — Оpubл. 07.06.85, Бюл. № 21.

Украинский ин-т
усовершенствования врачей,
г. Харьков,
Физико-технический ин-т
низких температур
АН УССР, г. Харьков

Поступила 30.06.86

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 57.043:611.018.51

С. В. Репина, Л. В. Цымбал

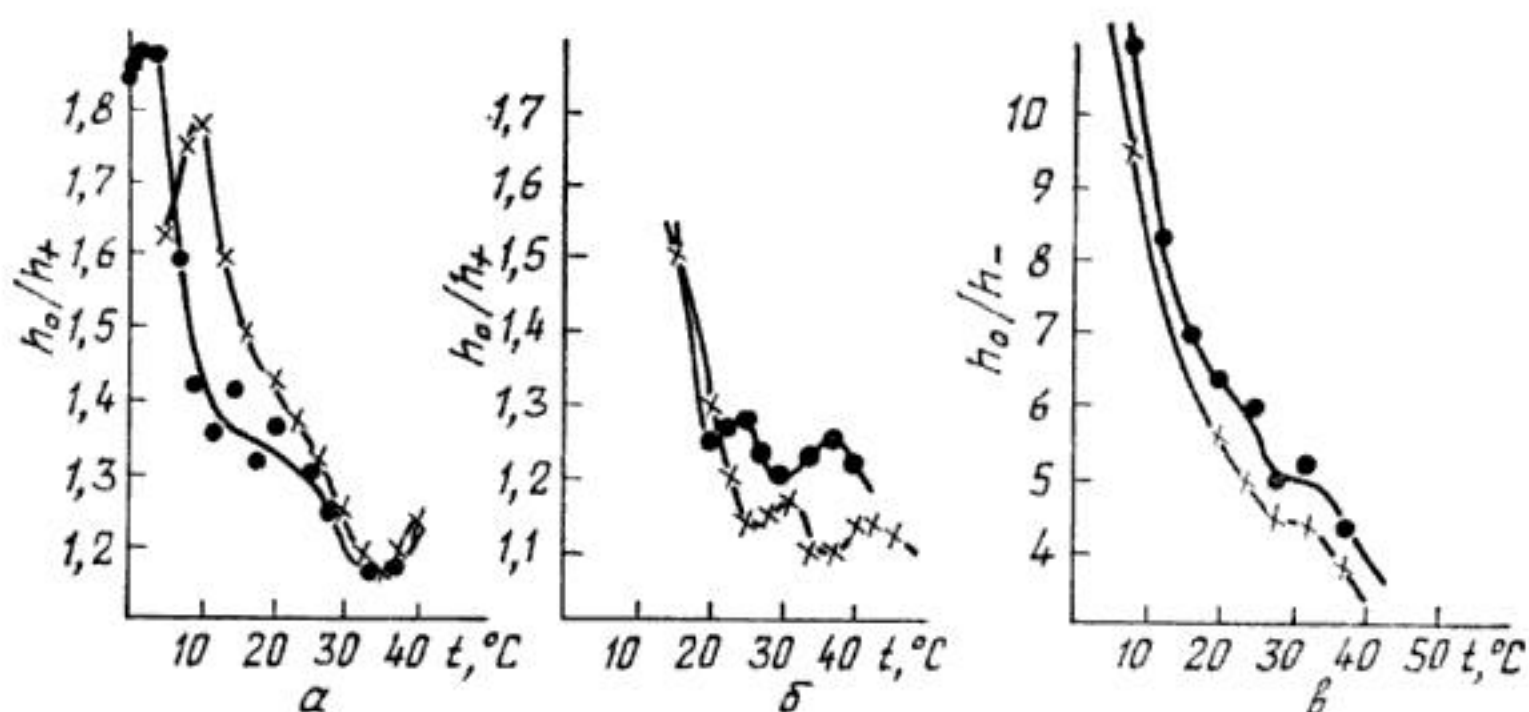
ВЛИЯНИЕ ЦИТОСКЕЛЕТНЫХ БЕЛКОВ НА ТЕМПЕРАТУРОЗАВИСИМЫЕ ПЕРЕСТРОЙКИ В МЕМБРАНАХ ЭРИТРОЦИТОВ

Исследования структуры и свойств мембраны эритроцитов показали важную роль цитоскелетных белков, в частности спектрина, в поддержании формы эритроцитов, асимметрии в распределении липидов, регуляции латеральной подвижности белковых компонентов. С целью выяснения участия спектрина в реакции мембран на замораживание-оттаивание были проведены исследования динамического состояния

теней эритроцитов человека и везикул, истощенных по спектрину, методом ЭПР-спиновых зондов.

Тени получали из эритроцитов донорской крови гипотоническим лизисом в 5 мМ Na-фосфатном буфере pH 7,6. Удаление спектрина осуществляли инкубированием белых теней в 0,1 мМ ЭДТА pH 8,0 при 37 °С в течение часа. Мечение спин-меченым амидом пальмитиновой кислоты проводили, как указано в работе [2]. Спектры регистрировались на ЭПР-спектрометре «Брукер ER-100D» (ФРГ). Точность термостатирования $\pm 0,5^\circ C$.

При охлаждении теней эритроцитов и истощенных по спектрину везикул в интервале 37 — 0 °С наблюдались изменения хода зависимости вращательной подвижности зонда от температуры, что свидетельствует о перестройках в микроокружении зонда. Температурные области таких перестроек практически соответствуют наблюдаемым в эритроцитах [2], а именно 18—23, 28—33 °С. Более того, времена корреляции вращательной подвижности зонда, определяемые при 37 °С, составляют $(1,06 \pm 0,15) 10^9$, $(1,03 \pm 0,12) 10^9$ и $(0,942 \pm 0,09) 10^9$ с для эритроцитов, теней и истощенных по спектрину везикул соответственно, т. е. удаление спектрина не оказывает непосредственного влияния на микровязкость липидов мембраны.



Температурная зависимость параметра подвижности зонда: а — замораживание-отогрев теней; б — замораживание-отогрев теней после 10-минутной инкубации при 46 °С; в — замораживание-отогрев истощенных по спектрину везикул (● — замораживание, × — отогрев).

Исследование обратимости температурных перестроек после замораживания до $-50^\circ C$ показало различия в поведении теней и везикул. Как видно из рисунка (а), замораживание теней приводит к увеличению параметра микровязкости по сравнению с его значением на этапе охлаждения, однако при температурах около 30 °С и выше значения параметра вращательной подвижности практически совпадают, что свидетельствует об обратимости этих процессов. В везикулах же (рис. в) после замораживания мы, наоборот, наблюдаем уменьшение параметра микровязкости во всем исследованном температурном диапазоне. Подобное необратимое снижение параметра микровязкости бислоя после замораживания отмечалось нами и в тенях, подвергнутых прогреванию при 46 °С в течение 10 мин, что, как известно, приводит к необратимой денатурации спектрина [3] (рис. б). В этом случае мы наблюдали и смещение температур переходов на 5—6 °С.

Отмеченное нами значительное разжижение липидной фазы мембран с нарушенной цитоскелетной системой, вероятно, обусловливается облегченной агрегацией белковых компонентов с образованием больших участков свободных от белков липидов уже на этапе охлаждения [4], что чрезвычайно затруднено в интактных эритроцитах. Причем нарушение цитоскелета может препятствовать распределению компонентов, имеющему место в нативных мембранах, даже при возвращении к физиологическим температурам.

На этапе оттаивания исследуемых объектов нами отмечалось восстановление нитроксильного радикала (уменьшение интенсивности сигнала), которое отсутствовало в случаях, когда мембраны только охлаждались до 0 °С без замораживания. Посколь

ку восстановление нитроксильных радикалов в биологических объектах обуславливается, в частности, их взаимодействием с SH-группами белков [1], можно предположить, что индуцирование этого процесса низкими температурами происходит вследствие конформационных перестроек мембранных белков, приводящих к обнажению новых, ранее не доступных зонду SH-групп.

Таким образом, нарушение структурной целостности мембран эритроцитов путем модификации спектринового комплекса приводит к их повреждению при замораживании-отогреве, что проявляется в нарушении белок-липидных взаимодействий, вероятно, вследствие изменения конформации интегральных белков.

1. Жданов Р. И. Парамагнитные модели биологически активных соединений. — М.: Наука, 1981. — 280 с.
2. Цымбал Л. В., Моисеев В. А. Исследование термoinдуцированных структурных изменений мембран эритроцитов методом спиновых зондов // Биол. мембраны. — 1985. — 2, № 2. — С. 190—194.
3. Черницкий Е. А., Воробей А. В. Структура и функции эритроцитарных мембран. — Минск: Наука и техника, 1981. — 216 с.
4. Gerritsen W. J., Verkleij A. J., Van Deenen L. L. M. The lateral distribution of intramembrane particles in the erythrocyte membrane and recombinant vesicles // Biochim. Biophys. Acta. — 1979. — 555. — P. 26—41.

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

Поступило 25.04.85

УДК 517.42:536.425

В. Л. Бронштейн, С. Ю. Бидный, Л. Л. Кулешова, С. В. Коцкий

ДИАГРАММА СОСТОЯНИЯ БИНАРНОЙ СИСТЕМЫ 1,1-ди-(β'-ГИДРОКСИЭТОКСИ)-2,3 ПРОПАНДИОЛ — ВОДА

Установление влияния модификации структуры соединений на физико-химические и криопротекторные свойства является необходимым для обоснованного подхода к созданию новых криопротекторов.

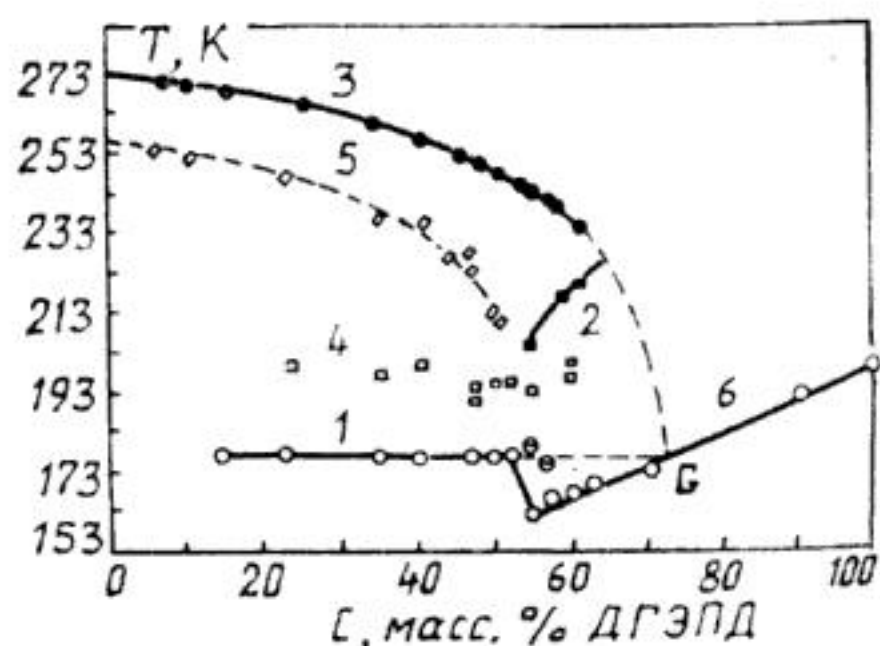
В работе представлены результаты изучения диаграммы состояния бинарной системы 1,1-ди-(β'-гидроксиэтоксигидрокси)-2,3 пропандиол (ДГЭПД) — H₂O в области температур 273—150 К.

ДГЭПД был получен по реакции Вильямсона действием α-моноклоргидрина глицерина на натриевую соль диэтиленгликоля. После образования осадка хлористого натрия реакционную смесь фильтровали и удаляли избыток диэтиленгликоля. Остаток подвергали вакуумной разгонке ($p \approx 2$ Па) при $T = 433 - 443$ К с последующей повторной перегонкой и отбором фракций при $T = 432 - 434$ К. Был получен ДГЭПД бесцветный без запаха с $n_D^{20} = 1,4736$, $d_4^{20} = 1,1916$. Строение подтверждалось молекулярной рефракцией ($MR_{теор} = 42,39$; $MR_{экc} = 42,42$), содержание примесей определялось гель-хроматографией. Термограммы регистрировали на дифференциальном сканирующем микрокалориметре ДСМ-2М при скорости нагрева $6,7 \cdot 10^{-2}$ К · с⁻¹ после охлаждения со скоростью $13,3 \cdot 10^{-2}$ К · с⁻¹.

На основании полученных термограмм построена диаграмма фазовых и физических состояний системы ДГЭПД — H₂O (рис.). Все концентрации приведены в массовых процентах неэлектролита. Анализируя полученную диаграмму, можно выделить несколько характерных концентрационных областей образования кристаллической или аморфной структуры: 1) область высокого содержания воды $C < 50$ масс. %, в которой кристаллы льда образуются на этапе охлаждения (кривая 5); 2) при концентрациях $54 \text{ масс. \%} < C < 61 \text{ масс. \%}$ водные растворы при выбранной скорости охлаждения переходят в стеклообразное состояние, а образование льда (кривая 2) происходит на этапе нагрева; 3) область концентраций $C > 61$ масс. %, в которой кристаллизация не происходит, и водные растворы находятся в жидком или стеклообразном состоянии.

Ранее для водных растворов 1,2-пропандиола, 1-гидроксиэтоксигидрокси-2,3 пропандиола и др. между областями концентраций 1 и 2 была обнаружена узкая концентрационная

зона, в которой лед частично кристаллизовался при охлаждении и докристаллизовывался при нагреве. Для водных растворов ДГЭПД данная область находится, по-видимому, в интервале концентрации 51—54 масс. %. В первом концентрационном диапазоне температура расстеклования (T_g) не зависит от исходной концентрации и равна 177 К. Во втором и третьем интервалах, когда в системе образования льда не происходило, T_g является монотонно возрастающей функцией концентрации.



Если водные растворы ДГЭПД с концентрациями ($54 \text{ масс. \%} < C < 61 \text{ масс. \%}$), при которых кристаллизация льда происходит на этапе нагрева, после образования льда вновь охладить, то при повторном повышении температуры процесс рас-

Диаграмма фазовых и физических состояний системы ДГЭПД — Н₂О: 1 — расстеклование аморфной части раствора, 2 — кристаллизация льда при отогреве, 3 — плавление льда, 4 — S — образное изменение теплопоглощения (эффект «предплавления»), 5 — спонтанная кристаллизация льда при охлаждении

стеклования отмечается при температурах также около 177 К (отмечено разделенными кружками для концентраций 54 и 57 масс. %).

Изложенное позволяет предположить, что концентрация раствора при вымерзании льда в двухфазной системе может достигать величины около 75 масс. %, соответствующей точке G на диаграмме состояния.

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

Поступило 30.12.86

ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИЙ

В специализированном совете при Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР в 1987 г. защищена диссертационная работа на соискание ученой степени кандидата медицинских наук В. М. Гучком на тему: «1,2-пропандиол в составе консерванта для низкотемпературного консервирования эритроцитов». Создан новый оригинальный метод низкотемпературного консервирования эритроцитов, основанный на применении в качестве криопротектора 1,2-пропандиола (1,2-ПД). Изучена эффективность консерванта при криоконсервировании эритроцитов в условиях низкотемпературного банка и разработаны основные медико-технические требования к нему. Показано, что криоконсервант на основе 1,2-ПД в условиях низкотемпературного банка обеспечивает высокую сохранность эритроцитов при замораживании.

В диссертационной работе Н. Н. Чуб на соискание ученой степени кандидата биологических наук «Морфо-функциональное состояние овариальной ткани человека на этапах низкотемпературного консервирования» установлено, что ткань яичника человека после гипотермического хранения (4°C) в течение 24 ч, действия полиэтиленоксида м. м. 400 и низкотемпературного консервирования по разработанной программе сохраняет структурную целостность, гормональную активность и способность к пролиферации и росту при культивировании *in vitro*. На основании разработанного способа криоконсервирования овариальной ткани человека создан низкотемпературный банк на базе Института проблем криобиологии и криомедицины АН УССР. Срок хранения биологически полноценного трансплантационного материала составляет от 1 мес до 2 лет.

УДК 612.82:612.592

Реакции организма на краниocereбральную гипотермию / Бабийчук Г. А. // Криобиология. — 1988. — № 2. — С. 3—8.

Изучено влияние краниocereбральной гипотермии (КЦГ) на синаптические процессы в ЦНС. Установлено, что на начальных этапах охлаждения у крыс усиливается секреция норадреналина и сверхмедленная активность, возрастает мощность корреляционных плеяд по мере понижения температуры. На уровне температуры тела 32 °С существенно снижается активность аденилатциклазы в мозге и не претерпевает изменений в миокарде. КЦГ на фоне частичного выключения центров терморегуляции с помощью наркоза вызывает в организме реакции, которые позволяют лучше приспособиться к изменившимся условиям существования. Табл. 3. Библиогр.: 9 назв.

УДК 57.043

Динамика насыщения срезов почки крысы диметилсульфоксидом при различных его концентрациях и температурных условиях / Кирпатовский В. И. // Криобиология. — 1988. — № 2. — С. 8—14.

На срезах почки крысы исследовали динамику проникновения ДМСО в ткань при инкубации в 10—60 %-ном растворе ДМСО, приготовленном на основе раствора НИИТиО-2 для консервации почек, при температуре 18 или 4 °С. Установили, что процесс насыщения срезов протекает неравномерно. Во всех опытах отмечали 3 периода ускоренного нарастания содержания ДМСО в срезах и периоды замедления процесса насыщения между ними. Длительность и выраженность этих периодов варьировались в зависимости от концентрации ДМСО в растворе и температуры. Полученные факты свидетельствуют о том, что насыщение вне- и внутриклеточного пространства протекает неодновременно за счет ограничения поступления ДМСО во внутриклеточное пространство. Обсуждены механизмы, препятствующие избыточному поступлению ДМСО в клетку. Ил. 4. Табл. 1. Библиогр.: 7 назв.

УДК 61.001.57

Использование математического моделирования для изучения процессов восстановления кроветворения летально облученных мышей после трансплантации костного мозга / Цуцаева А. А., Гольцев А. Н., Слабкая И. А., Снурников А. С., Хайкин Р. К. // Криобиология. — 1988. — № 2. — С. 14—18.

Предложена математическая модель, описывающая процессы формирования кроветворных колоний в селезенке летально облученных мышей после трансплантации костного мозга, с помощью которой проведены численные расчеты. Результаты расчетов сопоставлялись с экспериментальными данными. Ил. 3. Библиогр.: 9 назв.

УДК 618.177—089.888.11

Влияние процессов замораживания-оттаивания на морфофункциональные показатели спермиев человека / Паращук Ю. С., Гордиенко Е. А., Кулешова Л. Г. // Криобиология. — 1988. — № 2. — С. 19—21.

Установлено, что замораживание спермиев без защиты криопротектора приводит к полной утрате двигательной активности независимо от режима замораживания. Введение в эякулят в качестве криопротектора глицерина способствует сохранению подвижности спермиев, однако часть их повреждается, поскольку спермии человека подвержены явлениям температурного шока и процессам рекристаллизации на этапе фазового перехода. В связи с этим предложена методика, включающая этап температурной «адаптации» и быстрое замораживание при прохождении температурной зоны фазового перехода. Криоконсервация по разработанной методике позволяет после отогрева достичь подвижности спермиев в пределах $43,7 \pm 2,5 \%$, что делает возможным использование их в условиях клиники. Ил. 3. Библиогр.: 4 назв.

УДК 536.6:599.322.2

Динамика теплообразования в организме сусликов *Citellus undulatus* при пробуждении от зимней спячки / Тарасов В. Ф., Гальченко С. Е., Степанов И. О. // Криобиология. — 1988. № 2. — С. 22—24.

Проведено исследование динамики теплопродукции и теплоотдачи организмом сусликов при пробуждении от зимней спячки. Выявлены три характерных периода этого процесса. Получены термограммы пробуждения сусликов. Количество тепла, образующегося в организме при пробуждении, равно 94 тыс. Дж. Из них 38 % идет на повышение температуры тела, а 62 % отдается в окружающую среду. Ил. 2. Библиогр.: 4 назв.

УДК 616.441—00864:616—089.843:616.133.211:612.017.1

Динамика основных показателей системы иммунитета у больных послеоперационным гипотиреозом при лечении методом свободной трансплантации криоконсервированной щитовидной железы / Нугманова Л. Б., Исмаилов С. И. // Криобиология. — 1988. — № 2. — С. 24—30.

У больных послеоперационным гипотиреозом изучены основные показатели системы иммунитета до и после лечения трансплантацией криоконсервированной щитовидной железы. Установлено, что в стадии декомпенсации снижается число T -, $Fc\gamma^+$ и $T\gamma$ -лимфоцитов, достоверно повышается уровень IgG, «нулевых» и антигенсвязывающих клеток, а также антител, реагирующих с тиреоглобулином. Свободная трансплантация криоконсервированной ткани щитовидной железы больным послеоперационным гипотиреозом, наряду с клиническим эффектом, приводила к нормализации показателей иммунитета к шестому месяцу после пересадки. Табл. 4. Библиогр.: 12 назв.

УДК 612.35.085.2:547.422

Изучение эффективности полиэтиленгликоля-400 и диметилсульфоксида при криоконсервации изолированных клеток печени / Семенченко О. А., Кравченко Л. П., Луговой В. И. // Криобиология. — 1988. — № 2. — С. 30—34.

Изучено влияние медленного замораживания до -196°C в присутствии криопротекторов ПЭГ-400 и ДМСО на устойчивость изолированных клеток печени. Показано, что применение криопротекторов (конечная концентрация 10 %) в составе различных солевых растворов (0,15 М NaCl, буфер Кребса-Рингера, раствор Хенкса, альбуминовая среда, среда-199) способствует сохранности изолированных клеток печени, что проявляется снижением выхода в среду замораживания ионов калия и ферментных белков. Использование 10 %-ного раствора ДМСО, приготовленного на изучаемых средах, способствует эффективному сохранению криоконсервированных клеток по сравнению с 10 %-ным ПЭГ-400. Табл. 2. Библиогр.: 4 назв.

УДК 57.043:577.322

Термоиндуцированные переходы миозина в области температур ниже 273 К / Морозова Т. Ф., Зинченко А. В., Зинченко В. Д., Нардид О. А. // Криобиология. — 1988. — № 2. — С. 34—38.

Установлено, что спектроскопические характеристики миозина в области температур ниже 273 К претерпевают ступенчатые изменения. Отмечена связь между процессами, протекающими в водно-солевом растворителе, и термоиндуцированными переходами миозина. Выяснены некоторые особенности поведения связанной с миозином воды при температурах ниже 273 К. Ил. 4. Библиогр.: 9 назв.

УДК 615.832.97:616—006.311.03

СВЧ- и криовоздействие на биоткани в эксперименте и клинике / Шафранов В. В., Тен Ю. В., Резницкий В. Г., Цыганов Д. И., Кожевников В. А. / Криобиология.— 1988.— № 2.— С. 38—42.

Проведенные экспериментальные исследования на печени 89 кроликов показали, что микроволны при определенных режимах не вызывают необратимых изменений биоткани и в то же время способствуют значительному увеличению объема крионекроза. Установлено, что точкой приложения микроволн является «связанная» вода, которая под влиянием СВЧ-поля переходит в более подвижное и чувствительное к влиянию холода состояние, чем можно в значительной мере объяснить эффект усиления криодеструкции микроволнами. СВЧ-криохирургическим методом пролечено 323 больных в возрасте от периода новорожденности до 6 лет с опухолями головы и шеи. СВЧ-криодеструкция позволила избежать сложных оперативных вмешательств и длительной склерозирующей терапии более чем в 90 % случаев. Библиогр.: 10 назв.

УДК 618.14—006.6—036.3—08—059:[615.832.98+615.37]

Комплексное криохирургическое с тималином лечение гиперпластических процессов эндо- и миометрия / Запорожан В. Н., Хаит О. В., Морозов В. Г., Татарова А. М., Хавинсон В. Х., Пресняк И. Н. // Криобиология.— 1988.— № 2.— С. 43—47.

Изучены показатели Т-системы иммунитета у больных с гиперпластическими процессами эндо- и миометрия в I-ю и II-ю фазы имеющегося или предполагаемого менструального цикла. Состояние Т-системы лимфоцитов определяли по таким показателям, как общее количество Т-клеток и их активной фракции, Т-лимфоциты, имеющие рецепторы для эритроцитов кролика, Т-клетки, несущие рецепторы к Fc-фрагментам иммуноглобулина М (Т_μ-преимущественно хелперы) и G (Т_γ-преимущественно супрессоры), лимфоциты, образующие розетки с собственными эритроцитами (А-РОК). Установлено наличие иммунодефицитного состояния Т-системы иммунитета у больных с указанной патологией. Всем больным было проведено криохирургическое воздействие на эндометрий с последующим назначением 25 женщинам препарата тималина в послеоперационном периоде. Установлена необходимость такого сочетания, а также проведения повторного курса приема препарата через один месяц после воздействия. Библиогр.: 13 назв.

УДК 616.089.583.29

Обоснование экономической эффективности применения оксигенации тканей в условиях локальной гипотермии при заболеваниях пародонта / Никитин В. А., Куцевляк В. Ф., Крупник П. Б., Малик Т. Я. // Криобиология.— 1988.— № 2.— С. 47—49.

Проведена социально-экономическая оценка использования в стоматологии оксигенации тканей в условиях локальной гипотермии при заболеваниях пародонта. Использование предлагаемого способа обеспечивает местную неспецифическую стимуляцию тканей, повышение оксидационных процессов в тканях и отрицательно влияет на анаэробную микрофлору. Табл. 1. Библиогр.: 3 назв.

UDC 612.82:612.592

Body reactions to craniocerebral hypothermia / Badiychuk G. A. // Kriobiologiya.— 1988.— N 2.— P. 3—8.

The effect of craniocerebral hypothermia (CCH) on synaptic processes in CNS was studied. The noradrenaline release and superslow activity in rats as well as the magnitude of correlation Pleiades have been found to increase at the initial steps of cooling with decrease in temperature. The activity of adenylate cyclase decreased markedly in brain and remained unchanged in myocardium. CCH with partial block of thermoregulation centers by anesthesia induced body reactions which allowed to adapt better to changed environmental conditions. 3 tables. Refs.: 9 titles

UDC 57.043

The dynamics of saturation of rat kidney slices with dimethyl sulfoxide of different concentrations at various temperatures / Kirpatovsky V. I. // Kriobiologiya.— 1988.— N 2.— P. 8—14.

The dynamics of DMSO penetration into rat kidney slices incubated in NIITiO-2 solution for kidney preservation with 10 to 60 % of DMSO was studied at 18 and 4 °C. The process of tissue saturation has been found to proceed irregularly. Three periods of accelerated increasing of DMSO content in slices and intermediate periods of deceleration of the process were noted in all experiments. The duration and expression of these periods varied with DMSO concentration and temperature. The data obtained indicated that extra- and intracellular saturation proceed at different times because of limited intracellular permeation of DMSO. Mechanisms preventing redundant intracellular DMSO influx are discussed. 4 figs. 1 table. Refs.: 7 titles

UDC 61.001.57

The use of mathematic modelling for investigation of recovering hemopoietic processes in lethally irradiated mice after transplantation of bone marrow / Tsutsayeva A. A., Goltsev A. N., Slabkaya I. A., Snurnikov A. S., Khaykin R.K. // Kriobiologiya.— 1988.— N 2.— P. 14—18.

A mathematic model has been suggested which describes processes of hemopoietic colony formation in spleen of lethally irradiated mice after transplantation of bone marrow. Calculations performed using the model were compared with experimental results. 3 figs. Refs.: 9 titles

UDC 618.177—089.888.11

The effect of freeze-thawing processes on morphological and functional indices of human spermatozoa / Parashchuk Yu. S., Gordiyenko E. A., Kuleshova L. G. // Kriobiologiya.— 1988.— N 2.— P. 19—21.

Freeze-thawing of spermatozoa without cryoprotection has been found to result in their complete immobility independent of freezing regimen. Glycerol added to ejaculate as a cryoprotectant favoured the preservation of sperm motility. However, a part of sperm was damaged by thermal shock and recrystallization processes during phase transition. A method has been suggested providing for thermal adaptation and rapid freezing at the temperature of phase transition. Cryopreservation by this method permits the postthaw motility to be near 43.7 ± 2.5 %, thus making it possible to be used in clinic. 3 figs. Refs.: 4 titles

UDC 536.6.599.322.2

The dynamics of heat production in ground squirrels *Citellus undulatus* during arousal after hibernation / Tarasov V. F., Galchenko S. E., Stepanov I. O. // Kriobiologiya.— 1988.— N 2.— P. 22—24.

The dynamics of heat production and release in ground squirrels was studied during arousal after hibernation. Three specific periods of this process have been outlined. The quantity of heat produced in the body during arousal appeared to be equal to 94000 J, 38 % of which is used for increasing the body temperature, and 62 % is released into the environment. 2 figs. Refs.: 4 titles

UDC 616.441—00864:616—089.843:616.133.211:612.017.1

The dynamics of main indices in patients with postoperative hypothyrosis treated by the method of free transplantation of cryopreserved thyroid gland / Nugmanova L. B., Ismailov S. I. // Kriobiologiya.— 1988.— N 2.— P. 24—30.

Main indices of the immune system in patients with postoperative hypothyrosis were studied before and after treatment by the method of transplantation of cryopreserved thyroid gland. It has been found that the number of T-, Ec_{γ}^{+} and T_{γ} -lymphocytes decreased along with increased level of IgG, «zero» and antigen-binding cells as well as antibodies which react with thyroglobulin. Good clinical results were obtained by free transplantation of cryopreserved thyroid tissue to patients with postoperative hypothyrosis, and immune indices became normal 6 months after transplantation. 4 tables. Refs.: 12 titles

UDC 612.35.085.2:547.422

Investigation of the efficiency of PEG-400 and DMSO upon cryopreservation of isolated hepatocytes / Semenchenko O. A., Kravchenko L. P., Lugovoj V. I. // Kriobiologiya.— 1988.— N 2.— P. 30—34.

The effect of slow cooling to -196°C with cryoprotectants PEG-400 or DMSO on the resistance of hepatocytes was studied. It has been shown that cryoprotectants in a final 10 % concentration used in salt solutions such as 0.15 M NaCl, Krebs-Ringer buffer, Hank's solution, albumin medium or medium-199 favour the preservation of isolated hepatocytes, as evidenced by decreasing the liberation of potassium ions and enzyme proteins into the freezing medium. The solutions of 10 % DMSO appeared to be more effective in protecting the cells from freezing injury as compared to those of 10 % PEG-400. 2 tables. Refs.: 4 titles

UDC 57.043:577.322

Thermal transitions in myosin at temperatures below 273 K / Morozova T. F., Zinchenko A. V., Zinchenko V. D., Nardid O. A. // Kriobiologiya.— 1988.— N 2.— P. 34—38.

Spectroscopic indices of myosin at temperatures below 273 K have been shown to undergo stepwise changes. The association between processes in aqueous salt solvents and thermal transitions in myosin has been noted. Some behavioural peculiarities of myosin-bound water at temperatures below 273 K have been found. 4 figs. Refs.: 9 titles

UDC 615.832.97:616—006.311.03

Experimental and clinical UHF- and cryoapplication to biological tissues / Shafranov V. V., Ten Yu. V., Reznitsky V. G., Tsyganov D. I., Kozhevnikov V. A. // Kriobiologiya.— 1988.— N 2.— P. 38—42.

Experiments on liver of 98 rabbits showed that microwaves in certain regimens did not induce irreversible changes in biological tissues and increased markedly the necrotic zone. It has been found that microwaves affect bound water which becomes more mobile and sensitive to cold. This is probably responsible for the promotion of cryodestruction by microwaves. 323 patients aged from a newborn to 6 years old with tumors of head and neck were treated by UHF-cryosurgery. The UHF-cryodestruction method allowed to avoid complex surgical operations and prolonged sclerosing therapy in more than 90 % cases. Refs.: 10 titles

UDC 618.14—006.6—036.3—08—059:[615.832.98—615.37]

Complex cryosurgical treatment of hyperplastic processes in endometrium and myometrium using thymalin / Zaporozhnh V. N., Khait O. V., Morozov V. G., Tatarova A. M., Khavinson V. Kh., Presnyak I. N. // Kriobiologiya.— 1988.— N 2.— P. 43—47.

Indices of the immune T-system in patients with hyperplasia of endometrium and myometrium during phase I or II of existing or expected menstrual cycle were studied. The state of lymphocyte T-system was determined by such estimates as total number of T-cells, and their active fraction, T-lymphocytes having receptors for rabbit erythrocytes, T-cells with receptors for Fc-fragments of immunoglobulin M (T_{μ} , mainly helpers) and immunoglobulin G (T_{γ} , mainly suppressors), lymphocytes forming rosettes with inherent erythrocytes (A-ROK). The immune deficient condition of immune T-system has been found in patients with the pathology mentioned above. Cryosurgery of endometrium has been performed in all patients with subsequent administration of thymalin to 25 females in the post-operative period. The necessity of such combined treatment as well as repeating the administration of thymalin a month after cryoapplication have been shown. Refs.: 13 titles.

UDC 616.089.583.29

The substantiation of economic efficiency of application of tissue oxygenation under conditions of local hypothermia in treating paradontosis / Nikitin V. A., Kutsevlyak V. F., Krupnik P. B., Malik T. Ya. // Kriobiologiya.— 1988.— N 2.— P. 47—49.

Social and economic estimation of application of tissue oxygenation under local hypothermia for treating paradontosis has been performed. The proposed method provides for local non-specific stimulation of tissues, increases oxydation processes in tissues and affects the anaerobic microflora. 1 table. Refs.: 3 titles

ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКОВА ДУМКА» ГОТОВИТ К ВЫПУСКУ:

Гемопоэтические клетки эмбриональной печени / В. И. Грищенко, Г. С. Лобынцева, И. А. Вотякова, С. И. Шерешков. — Киев: Наук. думка, 1988 (III). — 15 л.: ил. — (В пер.): 2 р. 60 к.

В монографии систематизированы литературные данные о родоначальных гемопоэтических клетках эмбриональной печени человека, особенностях их пролиферации и дифференцировки, иммунологических свойствах. Рассмотрены проблемы трансплантации эмбриональной кроветворной ткани при врожденных дефектах стволовых клеток у детей и патологических состояниях гемопоэза у взрослого человека, изучаются особенности криоконсервирования гемопоэтических клеток печени плода человека.

Для биологов, медиков и специалистов, работающих в области криобиологии и криомедицины.

ISSN 0233—7673 Криобиология. 1988. № 2. 1—56