

ISSN 0233-7673

КРИОБИОЛОГИЯ

3|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. Осташко, Е. Я. Панков, Л. А. Пирузян, Н. С. Пушкар, Б. П. Сандомирский, А. С. Снурников, К. М. Сытник, А. М. Утевский, 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. Белошицкий (Киев), Д. М. Гродзинский (Киев), В. Н. Запорожан (Одесса), Л. В. Калакуцкий (Пушино, Моск. обл.), В. А. Наер (Одесса), В. А. Никитин (Харьков), Г. П. Пинаев (Ленинград), Г. Б. Сергеев (Москва), М. А. Соловьева (Киев), Н. Г. Соломонов (Якутск), Н. Н. Тимофеев (Москва), В. М. Чередниченко (Харьков), В. В. Шенталь (Москва), 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. Lugovoj, F. I. Ostashko, E. Ya. Pan'kov, L. A. Piruzyan, N. S. Pushkar, B. P. Sandomirsky, A. S. Snurnikov, K. M. Sytnik, A. M. Utevsky, A. G. Fedotenzov, A. A. Tsutsayeva, V. I. Shumakov, T. N. Yurchenko

EDITORIAL COUNCIL

S. I. Aksenov (Moscow), N. G. Bakradze (Tbilisi), M. E. Beker (Riga), P. V. Beloshitsky (Kiev), D. M. Grodzinsky (Kiev), V. N. Zaporozhan (Odessa), L. V. Kalakutsky (Pushchino, 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 (Yakutsk), N. N. Timofeyev (Moscow), V. M. Cherednichenko (Kharkov), V. V. Shental (Moscow), E. Z. Emirbekov (Makhachkala)

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ОТДЕЛЕНИЕ ФИЗИОЛОГИИ

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ
И ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

КРИОБИОЛОГИЯ

3 1988

ВСЕСОЮЗНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Основан в январе 1985 года
выходит 4 раза в год

Киев Наукова думка 1988

СОДЕРЖАНИЕ

Международная конференция «Достижения и перспективы развития криобиологии и криомедицины»	3
Грищенко В. И. Итоги и перспективы развития криобиологии и криомедицины	5
Фаррант Дж. Консервирование и стеклование	12
Мнержичка П., Малец Р., Героут В., Конечный Б., Мотычка В. Низкотемпературное консервирование тканевых трансплантатов для клинического применения	15
Фуллер Б. Дж. Криоконсервирование изолированных гепатоцитов	18
Суббота Н. П., Белоус А. М. Проблемы криоконсервации гепатоцитов	21
Бабийчук Л. А. Влияние состава среды на чувствительность эритроцитов к охлаждению	27
Воротилин А. М., Зинченко А. В., Моисеев В. А., Аненко В. И. Влияние механического фактора на повреждение клеток при нагреве	31
Моисеенок А. Г., Омелянчик С. Н., Утно Л. Я., Гуринович В. А., Хомич Т. И. Структура фонда кофермента А (КоА) и содержание ацетил-КоА в печени животных при глубокой гипотермии	36
Утевский А. М., Чуйко В. А., Карпенко Л. Г., Щирова В. А., Таргони О. С. Влияние димексида на включение ^{14}C -аминокислот в белки и активность аденилатциклазы в щитовидной железе, замороженной без криопротектора	39
Межевикина Л. М., Березовская О. П., Вепринцев Б. Н. Низкотемпературная консервация 2-клеточных эмбрионов мышей в среде Виттена с добавлением органического буфера HEPES	42
Онищенко Н. А., Колоколова О. Б., Кирпатовский В. И. Возможности температурной и фармакологической адаптации донора и ее значение для защиты изолированных органов от низкотемпературного повреждения	45
КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ	
Сирота О. Н. Биосинтез белков и ДНК в клетках регенерирующей слизистой оболочки полости рта у крыс после крио- и диатермодеструкции	51



CONTENTS

<i>International Conference «Achievements and Prospects in Cryobiology and Cryomedicine»</i>	3
<i>Grishchenko V. I. Results and perspectives in cryobiology and cryomedicine</i>	5
<i>Farrant J. Preservation and vitrification</i>	12
<i>Měřická P., Malec R., Herout V., Konečný B., Motyčka V. Low temperature preservation of tissue grafts for clinical use</i>	15
<i>Fuller B. J. Cryopreservation of isolated hepatocytes</i>	18
<i>Subbota N. P., Belous A. M. Problems of hepatocyte cryopreservation</i>	21
<i>Babiychuk L. A. The effect of medium composition on the sensitivity of erythrocytes to cooling</i>	27
<i>Vorotilin A. M., Zinchenko A. V., Moiseyev V. A., Anenko V. I. The effect of mechanical factor on the cell damage upon rewarming</i>	31
<i>Moiseyenko A. G., Omelyanchuk S. N., Utro L. Ya., Gurinovich V. A., Khomich T. I. The structure of coenzyme A (CoA) pool and the content of acetyl-CoA in liver of animals subjected to deep hypothermia</i>	36
<i>Utevsky A. M., Chuyko V. A., Karpenko L. G., Shchyrova V. A., Targony O. C. The effect of dimexide on the incorporation of ¹⁴C-amino acids into proteins and the activity of adenylate cyclase in thyroid gland frozen without cryoprotectant</i>	39
<i>Mezhevikina L. M., Berezovskaya O. P., Veprintsev B. N. Low temperature preservation of 2-cell mouse embryos in Whitten's medium containing HEPES buffer</i>	42
<i>Onishchenko N. A., Kolokolova O. B., Kirpatovsky V. I. The possibilities of temperature and pharmacological adaptation of donors and its significance for the protection of isolated organs from cryoinjury</i>	45
SHORT COMMUNICATIONS	
<i>Sirota O. N. Protein and DNA synthesis in cells of regenerating mouth mucosa in rats after cryo- and diathermodestruction</i>	51

Адрес редакции:

310015, Харьков, 15,
ул. Переяславская, 23.
Научный редактор А. М. Белоус
Ответственный секретарь редакции
Ф. А. Приходько
Редактор З. В. Линевиц
Технический редактор В. Н. Волкова
Корректор Н. П. Спичак

Сдано в набор 12.04.88. Подп. в печ. 26.06.88. БИ 23015. Формат 70×108/16. Бум. тип. №1. Выс. печ. Усл. печ. л. 4,9. Уч. изд. л. 5,4. Усл. кр.-отт. 5,6. Тираж 1000 экз. Заказ № 8-678. Цена 65 к. Отпечатано с матриц Харьковской книжной фабрики им. М. В. Фрунзе в Харьковской городской типографии № 16. 310003, Харьков, Университетская, 16. Зак. 1127.

МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ «ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ КРИОБИОЛОГИИ И КРИОМЕДИЦИНЫ»

10—12 февраля 1988 г. в Харькове состоялась международная конференция «Достижения и перспективы развития криобиологии и криомедицины». Организаторами конференции были Академия наук Украинской ССР, Институт проблем криобиологии и криомедицины АН УССР, Комиссия Украинской ССР по делам ЮНЕСКО. В работе конференции приняли участие 204 ученых из 12 стран мира: СССР, ГДР, ЧССР, Великобритании, Канады, Японии, Нидерландов, ПНР, Бельгии, Ганы, ФРГ, США.

Участников конференции приветствовал председатель Харьковского городского Совета народных депутатов С. Н. Соколовский.

С докладом об итогах проведенных исследований в области криобиологии и криомедицины, а также о перспективах их развития и первоочередных задачах выступил директор Института проблем криобиологии и криомедицины АН УССР В. И. Грищенко.

На симпозиуме «Механизмы криоповреждения и криозащиты биологических систем разных уровней организации» в докладе А. М. Белоуса (Харьков) рассмотрена роль трансмембранных дефектов в плазматической мембране как одного из наиболее важных факторов криоповреждений. Р. де Леккер и Ф. Пеннинкс (Бельгия) провели анализ степени и условий набухания и гемолиза эритроцитов после осмотического воздействия различных по своей природе криопротекторов. В. А. Моисеев (Харьков) сообщил о молекулярных механизмах криоповреждений и криозащиты биообъектов. О роли свободных радикалов и перекисного окисления липидов при почечной ишемии и консервации органов доложил К. Грин (Великобритания). О последовательности биохимических, физических и физико-химических процессов при криоконсервировании биообъектов сообщил Г. Маттес (ГДР). Природа повреждений, возникающих непосредственно после отогрева в плазматических мембранах и клетках, изложена в докладе Л. Е. Мак-Гена (Канада). В докладе М. Б. Бекера (Рига) подробно освещены вопросы структурно-функциональной перестройки эукариотной клетки при анабиозе. В сообщении А. М. Утевского (Харьков) приведены экспериментальные данные по изучению функциональных свойств щитовидной железы животных и человека после криоконсервирования.

На секции «Криобиология мембран и макромолекул. Физико-химия водных растворов при низких температурах» С. И. Аксенов (Москва) предложил физико-химический механизм, связывающий криочувствительность клеток и клеточных структур с их физиологическим состоянием. В докладе Е. А. Гордиенко (Харьков) показано, что обезвоживание или оводнение бислойных липидных везикул или клеток и вызванная этими явлениями деформация их мембран приводит к латеральному перераспределению мембранных компонентов и образованию в них сквозной поры. Деформации мембран эритроцитов при субнулевых температурах был также посвящен доклад Ф. Тома (ГДР). Об изменении и моделировании осмотического поведения клеток доложил К. Диллер (США). Кинетике и физико-химическим условиям протекания химических реакций в замороженных водных растворах посвятили свое сообщение Г. Б. Сергеев и Б. М. Сергеев (Москва).

Влияние низких температур на ион-гидратную оболочку и конформацию ДНК освещено в докладе В. Я. Малеева (Харьков), о влиянии криопротекторов на структуру пиридиновых оснований нуклеиновых кислот доложил Ю. П. Благой (Харьков).

Проблемы криоконсервирования биологических объектов привлекли внимание ученых разных стран. Д. Виттингем (Великобритания) доложил о криоконсервировании ооцитов мыши и эмбрионов и подчеркнул, что консервация ценного жизнеспособного материала имеет значение с точки зрения общей биологии и медицины. Б. И. Протасов (Ленинград — Пушкин) сообщил, что низкотемпературная консервация ооцитов дает возможность повысить интенсивность использования высокоценных доноров и служит одним из приемов сохранения генетических ресурсов редких и эндемических пород. О перспективах криоконсервирования ооцитов человека доложил Ф. В. Дахно (Харьков), а о харьковской технологии криоконсервирования эмбрионов и спермы крупного рогатого скота — Ф. И. Остащенко. Проблемы криоконсервирования гамет рыб рассмотрены в докладе Г. Штайна (ФРГ). Обсуждение вопросов криоконсервирования репродуктивных клеток было продолжено в беседе «за круглым столом».

О консервировании клеточных суспензий с помощью витрификации доложили Дж. Фаррант (Великобритания) и Г. Цайльмакер (Нидерланды). Обзорное сообщение о криоконсервировании гепатоцитов сделал Б. Фуллер (Великобритания). Перспективы применения криоконсервированных клеток кроветворной ткани в клинической практике были изложены в докладе С. С. Лаврика (Киев). Многолетним опытом работы по консервированию биологических объектов и организации низкотемпературных банков поделился с участниками конференции Р. Клен (ЧССР). Об использовании низких температур с целью консервирования различных тканевых трансплантатов доложил П. Мнержичка (ЧССР).

О криосохранении культивируемых клеток и органов растений доложено в работах А. С. Попова (Москва) и М. А. Соловьевой (Киев). В докладе А. А. Цуцаевой (Харьков) показано, что криосохранение промышленных штаммов микроорганизмов и перевиваемых линий клеток позволяет создать низкотемпературные банки этих объектов. Оптимизации компонентов криопротекторных сред при криоконсервировании костного мозга посвятили свою работу Ф. Мох и А. Пельцер (ГДР). В. И. Луговой (Харьков) доложил о криозащитной эффективности оксиэтилированных производных полиолов. В докладе Т. Н. Юрченко (Харьков) рассмотрены вопросы адаптационных явлений в изолированных объектах.

Медико-биологическим проблемам использования холода были посвящены сообщения Л. Т. Малой (Харьков), А. Ю. Бредикиса (Каунас), С. Сумиды (Япония). О критериях летальных и обратимых изменений в тканях после криовоздействия доложено Б. П. Сандомирским (Харьков). Об использовании криодеструкции при обширных новообразованиях печени сообщил Д. В. Мясоедов (Киев), о возможности эндоскопической криодеструкции в гинекологии — В. Н. Запорожан (Одесса), о клиническом использовании деконсервированных тканей глаза — В. В. Волков (Ленинград).

При обсуждении проблем гибернации и гипотермии Л. Вонг (Канада) осветил физиологические и биохимические аспекты гибернации млекопитающих, а Г. А. Бабийчук — взаимодействия регуляторных систем, обеспечивающих запуск механизмов температурного гомеостаза при краниоцеребральной гипотермии (Харьков).

На секционном заседании, посвященном методическим вопросам криобиологии и криогенной аппаратуре, А. С. Снурниковым (Харьков) доложено устройство программного охлаждения для низкотемпературной консервации эмбрионов животных. О перспективности использования тепловизора и сонографа для криобиологических целей сообщил Ш. Молокач (ЧССР). Новые разработки фирмы «Бекман» продемонстрировал И. Бернат.

Вопросам использования ультразвука в криобиологии был посвящен доклад В. Б. Акопяна (Москва). Об использовании метода ^{31}P -ЯМР спектроскопии для оценки энергетического состояния миокарда донорского сердца доложил К. Эбине (Япония), а для изучения процессов энергетики в деконсервированных эритроцитах — М. Л. Кнубовец (Москва, Харьков). Обсуждение методических приемов работы, связанных с криомикроскопией, было продолжено на заседании «за круглым столом».

Аппаратуру для криобиологических и криомедицинских исследований демонстрировали СКТБ с ОП Института проблем криобиологии и криомедицины АН УССР (Харьков) и Институт физики АН УССР (Киев).

Участники конференции выразили признательность ЮНЕСКО, АН УССР, Институту проблем криобиологии и криомедицины АН УССР и Комиссии УССР по делам ЮНЕСКО, харьковским руководящим органам за содействие в проведении этого мероприятия. Единогласно была принята резолюция конференции, в которой внесено предложение ЮНЕСКО рассмотреть вопрос о возможности и целесообразности создания, под эгидой организации, Международного центра криобиологии и криомедицины. Целями такого центра могли бы быть: содействие развитию и применению криобиологии и криомедицины в сельском хозяйстве, медицине, охране окружающей среды, сохранении генетических ресурсов, в производстве продуктов питания; сбор, обработка, распространение научно-технической информации и популяризация научных исследований в области криобиологии и криомедицины; подготовка кадров для научной и практической деятельности в этой области.

Участие в деятельности центра могло бы быть открыто как для государств-членов ЮНЕСКО, так и для других заинтересованных стран. Такой центр, по мнению участников конференции, можно было бы создать на базе существующего Института проблем криобиологии и криомедицины АН УССР. Конференция показала готовность и стремление к научному сотрудничеству в области криобиологии и криомедицины ученых 12 стран мира.

Н. П. Суббота

УДК 57.043

В. И. Грищенко

ИТОГИ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ КРИОБИОЛОГИИ И КРИОМЕДИЦИНЫ

Успешное решение прикладных проблем криобиологии и криомедицины тесно связано с прогрессом фундаментальных разработок в данной отрасли науки. За последнее время были проведены глубокие исследования механизмов криоповреждений биологических систем, происходящих в широком температурном диапазоне, созданы и испытаны новые криозащитные соединения, которые позволяют существенно улучшить защиту клеток в процессе их замораживания и репарацию в период отогрева.

Исследование физико-химических реакций в биологических системах, находящихся в твердофазном состоянии, то есть при температурах ниже 0°C и вплоть до -196°C , — одно из ведущих направлений. Для изучения этих процессов применяются новые экспериментальные методы, позволяющие оценивать состояние замороженного биообъекта без его отогрева. Так, например, весьма полезным оказался метод ЭПР спиновых зондов для исследования образования кристаллической и стеклообразной фаз в цито-

золе клеток при низких температурах. Метод основан на использовании таких спиновых зондов ЭПР, которые свободно диффундируют через мембраны. При добавлении в систему парамагнитных агентов, не проникающих через мембрану, сигналы внеклеточных спиновых зондов уширяются и не регистрируются в спектрах ЭПР. Этим методом показано, что при понижении температуры ниже точки кристаллизации внеклеточной воды в эритроцитах происходит направленная диффузия молекул воды через мембрану вплоть до температуры -38°C , после чего происходит витрификация цитозоля эритроцитов. Такой метод позволяет наблюдать также кооперативные структурные перестройки гидратированных макромолекул белка и мембран под влиянием криопротекторов при различных температурах, в том числе в точке кристаллизации внеклеточной жидкости.

Выяснено, в частности, что молекулы полимерных криопротекторов в низких концентрациях взаимодействуют с мембранами и, возможно, встраиваются в мембраны, а в более высоких устраняют термоиндуцированные фазовые переходы липидов и белков.

Для исследования состояния органических и биологических молекул в зоне ультранизких температур можно использовать новые методы ультрафиолетовой и люминесцентной спектроскопии 4-тиоурацила и тиогуанина при температурах от -20 до -196°C . Установлено, что основания нуклеиновых кислот в растворах этанола, пропандиола и глицерина обладают интенсивной фосфоресценцией при температурах ниже -50°C в области 420—600 нм. При витрификации растворителя интенсивность фосфоресценции возрастает на порядок. Следует полагать, что содержащие серу основания нуклеиновых кислот можно использовать в качестве фосфоресцентных зондов для исследования структурных перестроек в криопротекторах и биополимерах при температурах ниже -20°C . Довольно ценную информацию о характере внутриклеточных перестроек в условиях фазового перехода воды в лед дает метод криофрактографии, с помощью которого можно исследовать динамику изменения кристаллов льда в эритроцитах человека при низкотемпературных воздействиях. Например, выявлено, что на этапе температурной остановки при быстром двухступенчатом замораживании наблюдается процесс рекристаллизации вне- и внутриклеточного льда, приводящий к таянию внутриклеточных кристаллов и обезвоживанию клеток.

Методом низкотемпературной дифференциальной сканирующей калориметрии можно исследовать биоматериалы после замораживания их с весьма большими скоростями. Выяснено, что после быстрого охлаждения водные растворы криопротекторов, в своем составе содержащие кристаллические и твердоаморфные включения, в процессе нагрева претерпевают две модификации: кристаллизацию аморфной фазы и рекристаллизацию, когда происходит рост крупных кристаллов за счет малых. Некоторые системы, например водные растворы 1,2-пропандиола, после быстрого охлаждения удается получить в твердоаморфном состоянии и при сравнительно небольших концентрациях неводных добавок (около 30 %).

Для выявления особенностей перестройки биосистем в твердофазном состоянии широко используется также техника криомикроскопирования. На основе исследования особенностей и кинетики захвата в лед различных клеток и гранул полистеролового латекса при одномерном росте кристалла в нашем институте построена физико-математическая модель этих процессов. Оказалось, что при малых скоростях охлаждения ($v > 0,1$ мкм/с) движение фронта льда оказывает механическое давление на клетки, а при более быстрых ($v > 1$ мкм/с) — не оказывает. Сейчас проводится детальный физико-математический анализ процессов кристаллизации, выясняется их механизм. Например, на основе физико-математического анализа процесса разделения заряда при одномерном медленном росте кристаллов льда в растворе электролита построена модель, описывающая возникновение кристаллизационной разности потенциалов между льдом и расплавом.

Теоретически предсказано, что в незакристаллизованной части раствора должен значительно изменяться pH в результате перераспределения ионов воды между льдом и раствором.

Существенно меньше имеется сведений о биохимических процессах, протекающих в биоматериалах при очень низких температурах. В нашем институте установлено, что в температурном диапазоне от 0 до $-25^{\circ}C$ в мембранах происходит активация процессов перекисного окисления липидов и их фосфолипазного гидролиза. Об этом можно судить по накоплению малонового диальдегида (конечного продукта ПОЛ), а также лизофосфатидов и лизолецитинов (продуктов гидролиза мембранных липидов фосфолипазой A_2). Оказалось, что по мере снижения температуры до $-25^{\circ}C$ процессы гидролиза липидов интенсифицируются. С помощью спектрофлуориметрического метода показано, что при температуре $-10^{\circ}C$ в суспензии лизосом наблюдается постепенное увеличение активности арилэстеразы, достигающее максимума спустя 2 ч, то есть при низких температурах происходит повреждение мембран лизосом и выход в окружающую среду повышенных количеств активного фермента.

До сих пор очень мало известно о молекулярных и кинетических процессах, протекающих в биообъектах при температурах ниже $-100^{\circ}C$ до $-196^{\circ}C$. Между тем исследование этих процессов имеет важное общебиологическое значение, например в вопросах исследования возникновения жизни, выявления новых, ранее неизвестных свойств биоматериалов или закономерностей их биохимических превращений в зоне отрицательных температур. С другой стороны, использование сильно переохлажденных незамерзающих смесей ($-70 \div -80^{\circ}C$) может быть эффективным при изучении тонких механизмов химической кинетики и биохимического катализа. Эти процессы, как и другие физико-химические реакции при ультранизких температурах, изучены в недостаточной мере и ждут своего разрешения.

Для изучения свойств клеток в институте разработана оригинальная методика ЯМР для исследования клеточного метаболизма, позволяющая выяснить механизмы репарации клеточных структур после низкотемпературного воздействия без последующего разрушения клеток. Этот метод широко используется для исследования характера вымораживания свободной воды и изменения содержания незамерзшей воды в зависимости от температуры и природы защитных сред, используемых в технике сублимационной сушки.

Новые данные получены при исследовании механизма термального шока клеток. Выявлена роль плазматических мембран, в частности мембранных белков и липидов, в этих процессах. На основании проведенных исследований выдвинута новая концепция о ведущей роли трансмембранных дефектов (ТМД) в развитии повреждений клеток на этапе эквilibрации с защитными растворами при $0^{\circ}C$, охлаждении и замораживании. Установлено, что существенное значение в инициации, развитии и репарации ТМД имеет форма и объем клеток, которые изменяются в зависимости от тоничности среды и температуры охлаждения, когда плазматическая мембрана деформируется и возникает локальная везикуляция. Это уменьшает площадь мембраны и увеличивает степень ее натяжения. Трансформация формы и объема связана с ответной реакцией элементов мембранного скелета клеток и низкотемпературной «усадкой» фосфолипидов плазматической мембраны. Проведенные исследования показали, что уменьшить повреждение клеток в результате понижения температуры в условиях термального шока можно путем их холодовой адаптации при $0^{\circ}C$ в присутствии криопротектора. При этом клетки приобретают новые свойства повышенной устойчивости к последующему замораживанию до $-196^{\circ}C$. После замораживания по этой методике хорошо сохраняются свойства клеток: снижается уровень гемолиза, увеличивается осмотическая резистентность, биохимические показатели по 2,3-ДФГ и АТФ не изменяются. Весьма перспективными для изу-

чения свойств нативных клеток и модельных систем при замораживании — отогреве являются методы ЭПР спектроскопии. С помощью этих методов обнаружено, что в процессе замораживания клеток до $-4 \div -6^\circ\text{C}$ в плазматических мембранах формируются ТМД, проницаемые только для катионов, а при $-8 \div -9^\circ\text{C}$ и повышении тоничности среды NaCl до 1,2 М из эритроцитов выходят гемоглобин и другие белки. В механизме развития ТМД в плазматических мембранах играют важную роль фазовые переходы основной массы липидов. По данным исследования спектров ЭПР липидных зондов при температурах $-17 \div -25^\circ\text{C}$, фосфолипиды мембран эритроцитов в своей основной массе переходят в гель-состояние. В диапазоне этих температур на графике Аррениуса наблюдается излом, свидетельствующий о переходе липидов из жидкокристаллического в твердое состояние. Этот переход в присутствии глицерина полностью исчезает. Фазовому переходу липидов способствует вымерзание свободной воды, которая, согласно данным ЯМР, при температуре ниже -25°C переходит в кристаллическое состояние. Детальные морфологические исследования показывают, что при действии низких температур в клетках возникает реакция внутриклеточных структур в следующей последовательности: отек органелл, расслоение плазматической мембраны, формирование микро- или макроспикул на поверхности мембраны. Эти закономерности достаточно четко проявляются при изучении свойств эритроцитов и других клеток (лимфоцитов, гепатоцитов), репродуктивных и эмбриональных тканей и бактерий.

Результаты проведенных фундаментальных исследований свойств мембран клеток показывают, что они являются важными для расшифровки механизмов криоповреждения и обоснования методов криозащиты биоматериалов от повреждения. Однако тот факт, что до настоящего времени существует еще эмпирический подход в подборе скоростей замораживания различных клеток, свидетельствует о недостаточности наших знаний о барьерных свойствах и репаративных потенциалах плазматических мембран, характере перестройки мембранного скелета и липидных монослоев в процессе замораживани — отогрева. Пока неясно, как осуществить селективную криозащиту мембран клеток от разрушения, какие по природе и характеру действия соединения должны быть при этом использованы. Необходимо определить, какой оптимальный криозащитный коктейль должен использоваться в цикле криоконсервирования для получения оптимального эффекта. Для успешного криоконсервирования различных биоматериалов важен не только выбор скоростей замораживания, температур охлаждения, но и создание и испытание эффективных консервирующих, криопротекторных растворов.

В области разработки новых консервирующих растворов следует отдать предпочтение криопротекторам, не требующим отмывания. Есть два вида перспективных криопротекторов на основе полиэтиленоксидов, которые находятся на стадии экспериментальной проверки. Продолжаются исследования криопротекторной активности новых синтезированных веществ (алкильных производных полиолов и амидов) и устанавливается взаимосвязь между физико-химическими и структурными свойствами соединений с их криозащитой эффективностью. Выяснено, что для защиты эритроцитов в процессе их консервации эффективен новый криопротектор пропандиосахароль. Перспективными криопротекторами при замораживании клеток крови могут оказаться также метилпроизводные алифатических амидов, фракции продуктов оксигилирования *N*-ацетилэтаноламина. Выявлено довольно хорошее защитное действие на эритроциты 1-моноэтилового эфира, глицерина, 1,3-пропандиола и монометилового эфира этиленгликоля. Однако работы в области защитных соединений, не требующих удаления из суспензионной смеси, нуждаются в дальнейшем развитии.

Несмотря на достигнутые успехи в области консервации клеточных суспензий, до настоящего времени некоторые клеточные фракции крови, костного мозга, а также тромбоциты не удается замораживать достаточно

успешно, то есть получать необходимую их сохранность в цикле криоконсервирования. Традиционный метод криоконсервирования эритроцитов с помощью глицерина довольно трудоемкий и дорогостоящий. Поэтому сейчас следует направлять усилия на создание методов криоконсервирования клеток крови под защитой непроникающих криопротекторов. Нами используются полиэтиленоксиды различной молекулярной массы либо среды, например пропандиосахароль, сокращающие число отмывок. Консервирование клеток костного мозга является также не полностью решенной проблемой, хотя в ряде учреждений (ЦНИИГПК, Киевский НИИГПК) предложен ряд оригинальных методов замораживания этих клеток. Необходимо в дальнейшем интенсивнее развивать методы криоконсервирования и лиофилизации штаммов микроорганизмов, которые не удается пока успешно замораживать и консервировать методом сублимационной сушки. С этой целью необходимо углублять исследования по выяснению механизмов криоповреждений микроорганизмов в зависимости от их природы и исходного состояния.

Для сохранения генетического фонда и улучшения селекционных процессов в животноводстве и растениеводстве весьма перспективным следует считать искусственное осеменение и трансплантацию криоконсервированных зародышей. В мировой практике предложен ряд технологий криоконсервирования спермы. Однако пока успехи достигнуты только при замораживании спермы быков, буйволов, собак. Разработанные методы криоконсервирования спермы баранов позволяют получать только 40—50 % случаев оплодотворения. Эти результаты являются неудовлетворительными и требуют интенсификации работ в данном направлении. Аналогичное положение существует и в проблеме криоконсервирования спермы птиц, хряков, жеребцов.

В нашей стране и в ряде зарубежных центров получены хорошие результаты по криоконсервированию ооцитов и зигот лабораторных и сельскохозяйственных животных. В настоящее время проводятся также фундаментальные исследования механизмов криоповреждений репродуктивных клеток (сперма, ооциты и эмбрионы человека). Разработан метод криоконсервирования спермы человека на основе глицеринового криоконсерванта, который обеспечивает выживаемость до 75—80 % клеток после размораживания. При этом морфологические особенности спермиев и их функциональная характеристика приближаются к показателям нативных образцов. Важно то, что процедура инсеминации криоконсервированной спермой весьма упрощена, поскольку упаковка, в которой осуществляется ее замораживание, служит также инструментом для инсеминации.

Начаты работы по созданию криобанка ооцитов и эмбрионов человека, создан автоматический замораживатель, аппараты и инструменты для забора материала, инкубации и т. д. Ооциты замораживали очень медленно многоступенчато до -196°C под защитой ДМСО. Большинство клеток после отогрева сохраняет свою морфологическую структуру и жизнеспособность, однако эта проблема не может считаться решенной и нуждается в дальнейшей разработке. В частности, следует расширить исследования по изучению особенностей витрификации и эффективности мембраностабилизирующих веществ в период эквilibрации, охлаждения и замораживания — отогрева репродуктивных клеток.

Имеются успехи главным образом при консервировании тканей: разработаны методы, позволяющие эффективно замораживать кожу, клапаны сердца, твердую мозговую оболочку, роговицу, костную и эндокринную ткани под защитой ДМСО, глицерина или ПЭО. В Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР разработан метод замораживания роговицы под защитой ПЭО с молекулярной массой 400, которая может храниться не менее года при температуре -196°C без потери своих свойств, она хорошо приживляется и восстанавливает потерянную зрительную функ-

цию. Весьма перспективным является консервирование эндокринных тканей. Широко используются для пересадок криоконсервированная щитовидная железа, овариальная ткань и некоторые другие эндокринные биоматериалы. Все шире внедряются в практику медицины криоконсервированные ткани поджелудочной железы. Работы в этом направлении нужно активно развивать. Следует признать также весьма перспективной областью криоконсервирование и трансплантацию тканей эмбрионального мозга, печени, кожи, фрагментов нервных стволов.

Анализ состояния проблемы криоконсервирования органов показывает, что пока проводятся малоуспешные экспериментальные поиски. Осуществить эффективное замораживание целого органа при отрицательных температурах не удастся. Известны попытки переохладить почку до $-10 \div -15^\circ\text{C}$ при насыщении ее высокими концентрациями ДМСО, однако этот метод оказался малоперспективным. Поэтому необходимо разрабатывать новые подходы, новую аппаратуру для замораживания органов. В частности, не исчерпаны проблемы охлаждения органов с применением высоких давлений.

Касаясь проблемы консервирования клеток, тканей и органов, следует также подчеркнуть перспективность изучения механизмов устойчивости биологических объектов различного уровня организации в онтогенетическом аспекте, включая эмбриональное развитие. Проблема эта очень сложная, малоизучена, однако уже сейчас получены обнадеживающие результаты после пересадок криоконсервированного эмбрионального мозга, клеток поджелудочной железы и печени.

За истекшие два десятилетия весьма расширилось использование холода в медицинской практике. Это стало возможным благодаря фундаментальным исследованиям характера локального действия низких температур на ткани *in situ* и особенностей общего холодового воздействия на организм. Этому также способствовало создание специальных технических средств, которые позволили реализовать на практике методы холодового лечения.

Развитие современной криомедицины сейчас идет в двух направлениях. Во-первых, исследование особенностей и эффективности локального криодеструктивного и криостимулирующего действия отрицательных температур и, во-вторых, выяснение механизмов перестройки метаболизма и нейро-эндокринных функций в процессе общего охлаждения организма. Успехи, достигнутые в понимании механизмов локального действия низких температур, привели к тому, что криодеструкция патологических тканей, преимущественно опухолей, локализованных на слизистой полости рта, кожи, шейки матки и доступных отделов толстой кишки, стала методом выбора. Например, при раннем выявлении опухолей кожи и открытых слизистых с помощью криовоздействия излечивается 97—98 % больных. Создание и внедрение в практику эндоскопических криоаппаратов позволяет успешно лечить эрозивные и язвенные процессы внутренних органов, например язвы двенадцатиперстной кишки, патологию матки и др. В настоящее время разрабатываются способы усиления криодеструкции опухолевых и других патологически измененных тканей путем комбинированного воздействия низкими температурами и ультразвуком, а также лазерным излучением.

Однако применение низких температур в лечении опухолей центральной нервной системы, желудка, кишечника, печени, поджелудочной железы, мочевого пузыря и других органов еще не вышло за пределы экспериментальных исследований и отдельных клинических наблюдений. Не получили окончательного решения вопрос о характере действия криодеструкции на оставшуюся опухолевую ткань, ее метастазы, и проблемы, связанные с иммунологическими перестройками в организме больного после криотерапии. Все эти аспекты требуют дальнейшего изучения и развития.

Касаясь проблемы общего охлаждения организма как инструмента, изменяющего характер метаболизма и эндокринных функций в организме,

можно отметить, что она имеет большое теоретическое и практическое значение в медицине, биологии и, возможно, в других областях науки. С одной стороны, речь идет об исследовании механизмов естественного гипобиоза на примере пойкилотермных и гибернирующих животных и, с другой стороны, об изучении тех же механизмов у теплокровных животных и человека с целью использования обнаруженных в эксперименте механизмов и свойств в практической медицине.

В нашем институте весьма глубоко исследованы нейрохимические процессы, происходящие в организме теплокровных животных при кранио-церебральной гипотермии (КЦГ). Установлено, что снижение температуры тела крыс на $2 \div 3^\circ\text{C}$ вызывает изменение нейрогуморальных и электрофизиологических параметров крови, нервной и сердечно-сосудистой систем. Секретция ^3H -норадреналина значительно усиливается в первые 15—20 мин действия КЦГ в коре и гипоталамусе, КЦГ при температуре 34°C подавляет секрецию ^3H -норадреналина в коре, а в гипоталамусе еще больше усиливает. При этом секреция ^3H -серотонина и ^3H -аминомасляной кислоты не изменяется и ингибируется при 30°C . Изучение сверхмедленной биоэлектрической активности головного мозга в процессе КЦГ показало, что охлаждение приводит к усилению мощности дзета-ритма на 150 %, причем синхронизация биоэлектрической активности возрастает.

На основе полученных данных были разработаны методы КЦГ в клинических условиях для лечения больных различными психозами, шизофренией, алкоголизмом, травмами черепа и головного мозга и другой патологией. Наблюдение более чем 400 больных показывает, что применение КЦГ способствует снижению смертности и сроков лечения тяжелых форм белой горячки и гипертонической шизофрении в 62 % случаев.

В дальнейшем следует углублять фундаментальные исследования, направленные на выяснение механизма действия холода на организм с целью расширения показаний к его применению при различных формах патологии.

Существенный интерес для медицинской практики могут представить исследования механизмов естественного гипобиоза у пойкилотермных и гибернирующих животных, которые в процессе эволюции выработали способность понижать температуру своего тела до 0°C и выживать в этих условиях. Сейчас механизмы этого явления достаточно интенсивно изучаются во всем мире, в том числе проводятся такие исследования и у нас. Получены данные о роли нейропептидов и белков-регуляторов, которые осуществляют перевод клеточного метаболизма на очень низкие энергетические и синтетические уровни. В случае раскрытия механизмов гибернации можно надеяться, что некоторые принципы функционирования клеток, тканей и органов зимне-спящих животных можно использовать для регуляции метаболизма у теплокровных животных и, возможно, человека. Потребуется дальнейшая концентрация наших усилий не только для изучения этого интересного феномена, но и выделения и испытания эффективности холодовых регуляторов, белков, которые способны вводить человека в длительное гипотермическое состояние для осуществления лечебных процедур, продления жизни и решения других проблем.

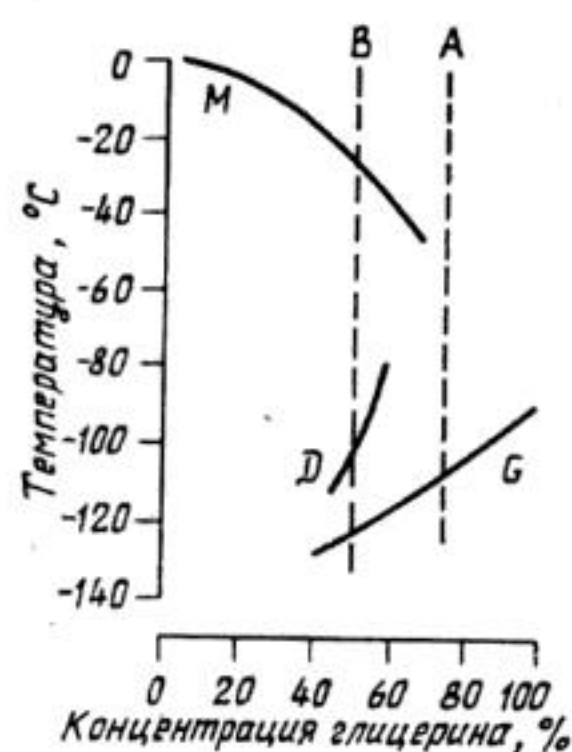
Таким образом, можно видеть существенный прогресс в области теоретических и прикладных аспектов криобиологии и криомедицины. Требуется дальнейшее углубление фундаментальных исследований с тем, чтобы создать ряд технологических процессов криоконсервирования биоматериалов и средств воздействия холодом на ткани, органы и организмы для создания новых, более эффективных методов лечения различного вида патологии.

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

Поступила 15. 02. 88.

КОНСЕРВИРОВАНИЕ И СТЕКЛОВАНИЕ

В 1938 г. Люйе и Ходап [3] при замораживании сперматозоидов лягушки использовали метод стеклования путем погружения тонкой пленки суспензии клеток на покровном стекле в жидкий воздух. Выживаемость сперматозоидов зависела от присутствия в среде сахарозы (в концентрации от 1 до 2 М). Авторы были убеждены, что клетки выживали только в той части образца, которая затвердевала в аморфном состоянии. Десять лет



Фазовая диаграмма системы глицерин—вода. Влияние концентрации глицерина в воде на температуру плавления (М), стеклования (G) и расстеклования (D). А и В — разные пути достижения истинного стеклования (см. текст).

спустя Полдж, Смит и Паркес [4] опубликовали работу «Восстановление сперматозоидов после стеклования и дегидратации при низких температурах», в которой использовали глицерин в концентрации от 10 до 20 % для получения живых сперматозоидов птиц после замораживания.

Что же такое стеклование? В физическом смысле — это затвердевание раствора в аморфном состоянии при охлаждении до температуры ниже точки стеклования без нуклеации как макро-, так и микрокристаллов. Точка перехода — это температура, ниже которой уже не происходит трансляционных движений молекул, хотя возможны еще колебательные движения. В этих условиях не только предотвращается образование кристаллов, но и прекращаются химические реакции между молекулами в растворе. Этот метод используется для криоконсервирования биологических объектов. На рисунке представлена фазовая диаграмма двухкомпонентной смеси криопротектора (глицерина) и воды. Задача заключается в следующем: как охладить водный раствор глицерина, возможно, содержащий живые клетки, ниже температуры стеклования (рисунок, G) без нуклеации? Существуют разные подходы.

Во-первых, концентрацию растворенного вещества (в данном случае глицерина) перед охлаждением можно взять столь высокой, чтобы при охлаждении достичь кривой стеклования G, не пересекая кривую плавления M (линия A на рисунке). Именно ниже кривой M проявляется тенденция раствора к кристаллизации. Одним из преимуществ этого подхода является то, что охлаждение может при необходимости быть как быстрым, так и медленным без риска замерзания. Однако к числу недостатков следует отнести то, что требуемые высокие концентрации глицерина могут оказаться токсичными для клеток с биохимической или осмотической точки зрения. В 1965 г. я предложил метод [2], в котором использован аналогичный подход для восстановления гладкой мышцы после воздействия низкими температурами.

Второй подход заключается в использовании более низких концентраций растворенного вещества (глицерина) и высоких скоростей охлаждения. Если охлаждение производить достаточно быстро, то образец может пересечь температурную зону между кривой плавления M и кривой стеклования G без замерзания из-за отсутствия нужного ядра кристаллизации (см. линию B на рисунке). К преимуществам этого подхода можно отнести меньший риск токсического действия криозащитной среды на клетки (поскольку используются более низкие концентрации), а к недостаткам — необходимость в повышении скоростей охлаждения, в результате чего ограничивается практический размер образца.

Аналогичные процессы происходят и при отогреве, но теперь зона, которую должен пересечь образец, начинается ниже кривой кристаллизации *D* (рисунок) и заканчивается на кривой плавления *M*. Все сказанное выше определяет стеклование в прямом смысле как общее отсутствие льда или ядер льда в образце. Мне бы хотелось вернуться сейчас к рассмотрению условий, которые могли бы быть зарегистрированы воображаемым миниатюрным наблюдателем внутри или на клеточной мембране охлаждаемой клетки.

Во-первых, если сосредоточить наше внимание на внутренней среде клетки в различных условиях медленного охлаждения с разными криозащитными добавками, в которых обязательно происходит внеклеточное замерзание, можно считать, что цитоплазма достигает температуры стеклоперехода «в стеклообразном» состоянии на пути к температурам хранения. Это происходит потому, что не образуется внутриклеточный лед или ядра льда.

Существует три причины, по которым содержимое клетки не замерзает.

1. В клетке нет центров истинной нуклеации.

2. Клетка или плазматическая мембрана представляет собой эффективный барьер, который не пропускает никаких, кроме самых малых, кристаллов внеклеточного льда.

3. Чрезвычайно высокие концентрации растворенного вещества вне клеток (обусловленные добавлением криозащитных веществ, удалением воды как растворителя при внеклеточном замораживании либо в обоих случаях) приводят к осмотическому удалению воды из клетки и созданию высоких тонцентратий, способствующих стеклованию внутриклеточного растворителя. К таким растворителям относятся как природные компоненты клетки, так и проникающие криозащитные вещества.

Конечно, если охлаждение осуществляется слишком быстро или по какой-либо причине клеточная мембрана разрушается, то образуется внутриклеточный лед. Следует подчеркнуть, что в различных условиях медленного охлаждения с наличием внеклеточного льда содержимое клетки будет «стекловаться» таким образом, что трудно будет отличить истинное стеклование с точки зрения нашего микронаблюдателя внутри клетки.

Теперь давайте попросим нашего миниатюрного исследователя направить его внимание на среду вне клеточной мембраны в условиях медленного охлаждения, в которых образуется внеклеточный лед. В процессе охлаждения, в зависимости от видимости, он может увидеть формы кристаллов льда, приближающихся к клетке. При этом концентрация растворенных веществ, включая и криозащитные вещества, будет возрастать на фронте растущих кристаллов. На киноплёнке медленного замораживания изолированных клеток в суспензии видно, что они остаются в каналах без льда. Таким образом, снова биологические молекулы на внешней поверхности клеточной мембраны будут находиться в растворе с высокими концентрациями растворенных веществ, вследствие чего эти области будут достигать температуры стеклоперехода без замерзания. То, что эти концентрации обусловлены образованием льда, а не добавлением большего количества растворенного вещества до начала замерзания, не имеет принципиального значения.

Если мы согласимся с таким расширенным понятием «стеклования», согласно которому биологические компоненты находятся только в контакте со средами в стеклообразном состоянии при самых низких температурах хранения, даже если где-то есть лед, то мы можем использовать возможности стеклования для прогнозирования влияния изменения скорости охлаждения на клетки.

В рамках практического использования повышение скорости охлаждения увеличит шансы внеклеточного «стеклования», но уменьшит шансы внутриклеточного (из-за недостатка времени для осмотической потери клеточной воды). Было бы нетрудно построить теорию взаимозависимости между скоростью охлаждения и выживаемостью на такой модели, которая

была бы сравнима с оптимальной скоростью охлаждения для выживаемости, если не учитывать, например, повреждения, обусловленного концентрацией растворенного вещества и т. п.

Можно разграничить два вида проявления токсичности — биохимическую и осмотическую токсичность, на которые по-разному влияют температура и скорости охлаждения и отогрева.

Биохимическую токсичность можно в свою очередь подразделить на токсичность растворенного вещества и токсичность растворителя. В первом случае молекулы криозащитной добавки реагируют с клеточной мембраной, вызывая повреждение. Во втором токсичность растворителя заключается в том, что повреждение происходит в результате изменения свойств растворителя, окружающего клетки в тех водных системах, к которым относится и биологический растворитель, представляющий собой смесь воды и криозащитной добавки. В общем, биохимическая токсичность уменьшается при уменьшении времени экспозиции и температуры.

Осмотическая токсичность объясняется хорошо известными эффектами сморщивания клетки при удалении веществ. Вероятно, это самый важный вид повреждения клетки при использовании обычных криопротекторов. В большинстве случаев клеточные мембраны способны выдерживать осмотический стресс лучше при более высоких температурах, то есть имеется зависимость, обратная биохимической токсичности.

В последнее время возобновился интерес к стеклованию [1, 5] в связи с возникновением идеи о том, что криозащитные растворенные вещества в смеси могут «нейтрализовать» токсичность друг друга. Однако выдвинутые мной аргументы свидетельствуют о том, что применительно к клеткам трудно разграничить истинное стеклование и медленное замерзание, приводящее к «стеклованию» среды вокруг клеточной мембраны. Чем выше начальная концентрация (концентрации) криозащитных добавок, тем более точным становится это утверждение. Почему бы не попытаться медленно заморозить смеси криопротекторов и достичь таким способом автоматического увеличения концентрации путем образования внеклеточного льда? Попытки заморозить клетки таким образом были немногочисленными.

Главная мысль настоящей работы — предположение, что условия, созданные медленным замораживанием внутри клетки и вблизи клеточной мембраны, сходны с условиями, возникающими в системе с чистым стеклованием. Поэтому я сейчас смотрю менее оптимистично, чем в 1965 г. на то, что сохранность органов может быть достигнута либо при наличии стеклования, либо в его отсутствие. Проблема упирается не в лед, а в концентрацию, вязкость, химическую и осмотическую токсичность растворов вокруг клеток. Если «биостеклование» при медленном замораживании не позволит сохранить, например, орган, то, на мой взгляд, истинное стеклование также этого не сделает.

1. Fahy G. M., Levy D. I., Ali S. E. Some emerging principles underlying the physical properties, biological actions and utility of vitrification solutions // *Cryobiology*.— 1987.— 24.— P. 196.
2. Farrant J. Mechanism of cell damage during freezing and thawing and its prevention // *Nature*.— 1965.— 205.— P. 1284.
3. Luyet B. J., Hodapp E. L. Revival of frog's spermatozoa vitrified in liquid air // *Proc. Assoc. Exp. Biol. Med.*— 1938.— 39.— P. 433.
4. Polge C., Smith A. U., Parkes A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures.— *Nature*.— 1949.— 164.— P. 666.
5. Rall W. F. Cryopreservation of mouse embryos by vitrification // *Cryobiology*.— 1986.— 23.— P. 548.

Центр клинических исследований,
г. Харроу, Великобритания

Поступила 21.03.88

П. Мнержичка, Р. Малец, В. Героут, Б. Конечный, В. Мотычка

НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЕ КОНСЕРВИРОВАНИЕ ТКАНЕВЫХ ТРАНСПЛАНТАТОВ ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Подготовка тканевых трансплантатов для клинического применения в наших условиях производится в соответствии с Чехословацкой фармакопеей и нормами асептического забора материала, согласно которым стерильным считается препарат, стерилизованный разрешенными методами или приготовленный с соблюдением асептики в определенных условиях, а также после проверки на стерильность. При лиофилизации или замораживании трансплантатов можно использовать один из методов стерилизации. В практике нашего тканевого банка производят асептический забор ткани от умерших доноров до вскрытия с последующей асептической обработкой тканей в камере с ламинарным потоком фильтрованного воздуха. В некоторых случаях асептический метод дополняется использованием мертиолята, если консервируют массивные костно-хрящевые трансплантаты. При лиофилизации трансплантатов обычно применяется метод стерилизации. Без стерилизации тканей также нельзя обойтись при ограниченном количестве тканевых проб, получаемых в процессе вскрытия, например твердой мозговой и хорион-амниотической оболочек, а также других ксеногенных тканей.

В прошлые годы для стерилизации лиофилизированных тканевых трансплантатов мы использовали γ -облучение в дозе 25 кГр. Однако при таком способе изменялись механические свойства тканей, в частности фасций и хрящевой ткани. Поэтому мы используем чаще метод замораживания с последующей стерилизацией γ -облучением. Для этого мы применяем также метод стерилизации тканей с помощью жидкого глутаральдегида, этиленоксида и жидкого формальдегида. Тем не менее даже строгое соблюдение правил асептики не исключает возможность переноса инфекции. Действенность γ -облучения на бактерии зависит от исходной контаминации. При использовании асептического подхода или стерилизации облучением существует опасность вирусной инфекции. Ни облучение, ни глутаральдегид, ни этиленоксид не действуют на возбудителя болезни Крейтцфельда—Жакоба, а химическая стерилизация требует удаления средств стерилизации, поскольку они обладают токсическим или канцерогенным действием. Поэтому необходимы тщательная оценка клинических данных умершего донора, диагноз при вскрытии и посмертное серологическое исследование на присутствие *HBsAg* и анти-*HIV-1*.

Методы снижения иммуногенности биоматериалов основаны главным образом на экстрагировании антигена или изменении его структуры (повторное замораживание и размораживание), вымывании клеточных элементов и растворимых белков, экстракции липоидных веществ, обработке протеолитическими ферментами, автолизе клеточных структур или γ -облучении. Существуют также методы, основанные на стабилизации межклеточного вещества путем образования поперечных связей в коллагене.

Мы используем в основном метод стабилизации иммунокомпетентных систем глутаральдегидом низкой концентрации в случае ксеногенных перикардиальных трансплантатов либо метод экстракции антигена в сочетании с контролируемым автолизом в случае применения костных трансплантатов. До 1986 г. мы лиофилизировали биоматериалы в сосудах по методу, разработанному Гегером. Мягкие ткани (кожа, фасция, твердая мозговая оболочка) лиофилизировали на носителях из полиамидной ткани.

В настоящее время нами изменена эта технология, в частности, при использовании образцов из соединительной ткани производится поверхностно-плоскостная лиофилизация с последующей доводкой образцов в пакетах из пластических материалов.

Однако производимое до сих пор фирмой Фригера («Колин», ЧССР) лиофилизационное оборудование невозможно стерилизовать, хотя процесс приготовления должен быть закончен стерилизацией лиофилизированного препарата. Однако на практике это не всегда удается. Поэтому в будущем планируется установить оборудование для лиофилизации, стерилизуемое горячим паром в асептических условиях, что позволит получать стерильные трансплантаты. Данное оборудование в настоящее время разрабатывается предприятием Фригера («Колин», ЧССР). Возможность сохранения асептических условий при лиофилизации также исключало все негативные стороны стерилизации газообразным этиленоксидом. Использование оборудования, стерилизуемого горячим паром, рассматривается нами как вполне эффективное, которое в случае лиофилизации первично контаминированных тканей может предупредить перенос вирусной инфекции и снять угрозу для здоровья обслуживающего персонала.

Для сохранения тканей, закрытых асептически в сосудах *NTS*, чашках Петри или пластмассовых пакетах, мы используем замораживание до температуры от -70 до -75 °C на приборах типа *NZ 280—75*, *350/75* Фригера («Колин») или при температуре -80 °C на оборудовании *REVCO ULT 1786* (США). В клинических отделениях ткани сохраняются при температуре -20 °C.

В ходе криоконсервации требования, предъявляемые фармакопеей, могут быть выдержаны, если извлеченная ткань консервирована асептически в стерильных средах. В случае первично контаминированных тканей опасность инфицирования можно снизить с помощью дезинфекционных средств или антибиотиков, а также соблюдения асептики приготовления. В случае дермоэпидермальных трансплантатов мы используем поверхностную дезинфекцию кожи этанолом и иодоналом *B*, а отобранные для консервации трансплантаты дополнительно обезвреживаем в растворе антибиотиков. Далее проводится бактериологический и микологический контроль, который в случае обнаружения активной микрофлоры дополняется исследованием ее чувствительности к антибиотикам.

Криоконсервирование проводится в программных замораживателях, а также в собственном несложном оборудовании, изготавливаемом фирмой «Гегер», либо в программных приборах фирмы «Планер». Специальные способы замораживания жидких или нетипичных проб разрабатываются в тесном сотрудничестве с Научно-исследовательским институтом пищевой и морозильной техники в Градце Кралоуе. Для длительного хранения образцов мы пользуемся жидким азотом, а для кратковременного — механическими морозильными агрегатами при температуре от -70 до -80 °C.

При гипотермическом консервировании в процессе хранения может происходить размножение микрофлоры, в частности психрофилл, грибов и плесени. Данный способ консервирования нами применяется в особых случаях, например при сохранении в этих условиях роговицы, когда трансплантат будет использован до 48 ч, или дермоэпидермальных трансплантатов, со сроком использования до 14 дней.

Из приведенных данных следует, что приготовление идеального стерильного, неантигенного, нетоксичного и полностью совместимого с тканью реципиента трансплантата при сохранении его первоначальных механических свойств практически неосуществимо. При лиофилизации стерильных или химически модифицированных трансплантатов (например, стабилизация глутаральдегидом) нарушаются их механические свойства, а также способность к перестройке после пересадки. Гистологический анализ трансплантатов, полученных при вскрытии умерших после нейрохирургических операций, показал медленное прорастание ткани реципиента в перикардальный трансплантат, обработанный глутаральдегидом. Аналогичные наблюдения были получены после пересадки твердой мозговой оболочки. При этом немаловажное значение придается технике сшивания, а в некоторых случаях целесообразно использовать биологический клей.

Для пластики твердой мозговой оболочки нами были приготовлены трансплантаты трех видов с разными свойствами, из которых хирург может выбрать оптимальный.

В 1987 г. в клиническую практику нами был внедрен новый вид лиофилизированного трансплантата твердой мозговой оболочки, который можно использовать без предварительной регидратации. В случае лиофилизированных костных трансплантатов важным является снижение их иммуногенности и сохранение способности к быстрой перестройке путем частичной деминерализации при сохранении остеогенных свойств межклеточного вещества. Такие требования могут быть выдержаны в случае так называемой аллогенной, не содержащей антиген аутолизированной кости. В Чехословакии впервые данные имплантаты приготовил и использовал в клинической практике Яновец. Приготовленные нами имплантаты по такому способу применяются в пародонтологии. Мы также используем криоконсервированные дермоэпидермальные трансплантаты для лечения ожогов. Трансплантаты можно использовать в качестве биологической повязки либо как временные кожные заменители. В первом случае используются ксеногенные трансплантаты свиньи, в другом — создается запас жизнеспособных аллогенных трансплантатов. Аллогенные трансплантаты консервируются программным замораживанием в специальных кассетах из нержавеющей стали с подвеской для помещения в контейнер с жидким азотом (ЛКВ 32, МТС, Ржичаны). При консервировании ксеногенных трансплантатов применяется метод неуправляемого замораживания в чашках Петри.

Криоконсервированные свиные дермоэпидермальные трансплантаты хранятся непосредственно в хирургической клинике в агрегате НЗ 280/75. При этом регистрируется температура с помощью записывающего устройства. В случае выключения сетевого питания имеется автономный источник тока. Однако идеальным следует считать оснащение холодильного агрегата предохранительной системой добавочного охлаждения для поддержания необходимой температуры и питания, чему соответствует комплекс криогенной аппаратуры типа REVCO ULT 1786 (США).

В случае ожогов 2-й степени трансплантаты помещаются на раневую поверхность, их замена производится каждые 3 дня, пока не произойдет произвольная эпителизация, либо на некротизированные участки при ожогах 3-й степени в качестве подготовки к аутотрансплантации. Для лечения применяли как гипотермически сохраняемые трансплантаты, так и криоконсервированные методом глубокого замораживания. Использование трансплантатов при больших ожоговых поражениях 2-й степени является особенно трудоемким в аспекте наличия достаточных запасов биоматериалов. Так, 6 больным нужно было произвести 24 перевязки, в процессе которых потребовалось 7,5 м² трансплантационной ткани. Мы считаем, что при значительных по объему ожоговых поражениях (более 40 %) поверхности тела повторные перевязки лишь ухудшают клиническое состояние больного.

В нашем тканевом банке криоконсервируются не только кожные трансплантаты, проводится также замораживание клеток тканевых культур, спермы человека для искусственного оплодотворения, гибридом, продуцирующих моноклональные антитела против гипофизарных гормонов. В настоящее время мы разрабатываем метод замораживания стеоловых клеток костного мозга для аутотрансплантации.

Тканевый банк факультетской
больницы,
г. Градец Кралове, ЧССР

Поступила 21.03.88

КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ ГЕПАТОЦИТОВ

Изолированные гепатоциты широко применяются в биологических и физиологических исследованиях, например, при изучении метаболизма печени, ее гормональной регуляции, биотрансформации ксенобиотиков и т. д. Не менее интересной областью исследований является трансплантация изолированных гепатоцитов для коррекции патологических состояний. Поэтому в последнее десятилетие исследователи пытаются найти надежный метод их хранения в замороженном состоянии. Особенно важно сохранить гепатоциты, полученные из ткани печени человека, поскольку подобного рода биопсии делают в исключительных случаях.

В настоящей работе сделан обзор современного состояния проблемы криоконсервирования гепатоцитов и представлены результаты последних исследований, направленных на повышение их жизнеспособности.

Для биохимических целей чаще всего используют гепатоциты, выделенные из печени крыс или мышей. Для этого применяют двухэтапный метод перфузии печени, описанный Сегленом [13]. Сначала под анестезией канюлируют портальную вену печени и промывают 50 мл базового раствора Хенкса, из которого исключены Ca^{2+} и Mg^{2+} . После этого печень помещают в рециркулирующую перфузионную систему с 250 мл среды «Лейбовиц L-15», содержащую 10 мМ буфер *HEPES* (pH 7,4 при 37 °C). Оксигенацию осуществляют путем медленной подачи O_2 . Коллагеназу («Боринджер Корпорейшн Лтд.») добавляют в концентрации 0,05 г на 100 мл раствора. Перфузию проводят в течение 15 мин со скоростью потока перфузата около 50 мл/мин, после чего из размягченной печени выделяют гепатоциты по методу, описанному ранее [3].

Гепатоциты можно также получать из небольших кусочков ткани печени без перфузии. Согласно этому методу, раствор коллагеназы вводят в паренхиму печени для очистки от крови, а затем ткань измельчают на мелкие кусочки, которые инкубируют около 1 ч во вращающемся шейкере при 37 °C в трипсинизированном флаконе, содержащем раствор коллагеназы [14]. Однако этим методом получают меньше клеток, чем при использовании перфузионного метода.

Перфузионный метод лучше использовать при получении гепатоцитов из фрагментов печени крупных животных и человека, в которых портальные вены можно легко канюлировать силиконовыми или резиновыми трубками, через которые пропускают раствор коллагеназы [12].

Один из первых зарегистрированных экспериментов по сохранению гепатоцитов крысы методом криоконсервирования выполнили Ле Кам и др. [10], которые использовали раствор Игла, содержащий 10 % сыворотки плода телят и 10 %-ный раствор Me_2SO . Клетки эквilibрировали с Me_2SO при 4 °C и замораживали со скоростью от 2 до 100 °C/мин. Оптимальное восстановление клеток, о котором судили по исключению красителя, было достигнуто при медленных скоростях охлаждения. Однако в этом случае глюконеогенез уменьшался при сравнении с незамороженными клетками на 50 %. В собственных экспериментах по криоконсервированию гепатоцитов [3] также отмечалось, что клетки выдерживают экспозицию с криопротектором Me_2SO гораздо лучше, чем с глицерином. Поэтому мы для криоконсервирования гепатоцитов использовали 1,5 М раствор Me_2SO , замораживание проводили с медленными скоростями и быстро отогревали. По данным исключения красителя, морфологическая целостность таких гепатоцитов составляла около 70 % по сравнению с нативными клетками, хотя синтез белка в них снижался на 80 %. Такой низкий уровень восстановления был также отмечен в культуре клеток [14]. Исследования ультраструктуры гепатоцитов, восстановленных после замораживания до раз-

личных отрицательных температур, показали, что в большинстве случаев после замораживания до -30°C происходит набухание мембраны и образование пузырьков, изменяются биохимические показатели [4].

Карлберг и Линдал-Киссинг [7] исследовали детоксикационную функцию микросомальных ферментов гепатоцитов после замораживания клеток печени крысы со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ в среде *RPMI*, содержащей 20 %-ную сыворотку телят и 10 % Me_2SO , и последующего быстрого отогрева. При таком способе консервации гепатоцитов достаточно хорошо сохранялась функция микросомальной системы. Известно также, что хорошее сохранение активности микросомальных ферментов может быть достигнуто после быстрого замораживания препаратов изолированных микросом [11]. Е. В. Кудоцева и др. [8] также обнаружили, что после быстрого замораживания (от 20 до $30^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) гепатоцитов печени крысы под защитой 10 % Me_2SO или 10 %-ного этиленгликоля хорошо сохранялись свойства цитохрома Р-450 и b_5 , если образцы быстро отогревали. После криоконсервирования гепатоцитов крысы со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ с использованием 10 и 20 % Me_2SO или 10 %-ного глицерина выявлено [11], что эквивибрацию и замораживание с глицерином клетки переносят очень плохо, однако свойства микросомальных цитохромов Р-450 и b_5 в клетках сохранялись хорошо только после криоконсервирования с Me_2SO . При этом число интактных клеток, выживающих в культуре ткани, уменьшалось почти на 50 %.

Гомез и др. [6] использовали быстрое охлаждение ($40^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) гепатоцитов крысы в растворе, содержащем сыворотку плода телят и 10 %-ный Me_2SO . Было получено хорошее восстановление синтеза белка и глюконеогенеза. Однако этот метод не воспроизводился в других исследованиях.

Описан способ [2] криоконсервирования гепатоцитов крысы под защитой 30 %-ного раствора Me_2SO , содержащего 25 % сыворотки плода телят, с медленным охлаждением ($1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$). После замораживания выявлена достаточно хорошая сохранность функции цитохрома Р-450, хотя жизнеспособность клеток уменьшалась на 50 %, по данным исключения красителя. Получены аналогичные результаты и при исследовании изолированных гепатоцитов человека. В другой работе [12] гепатоциты взрослого человека криоконсервировали с использованием 20 %-ной сыворотки плода телят и 10 % Me_2SO при медленном охлаждении ($1,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$). После размораживания эффективность прикрепления клеток в культуре ткани уменьшалась на 88—55 %, хотя уровень синтеза белка клеток, восстановленных в культуре, был таким же, как и в нативных клетках. Сообщается, что криоконсервированные гепатоциты могут быть успешно использованы для культивирования в них паразитических штаммов *Plasmodium falciparum*.

В исследованиях по трансплантации криоконсервированных гепатоцитов одним крыс в селезенку других показано [9], что клетки в селезенке можно дифференцировать по их ультраструктурным характеристикам. Нами [5] использована ауотрансплантационная модель пересадки гепатоцитов крысы в селезенку. При этом выявлено увеличение выживаемости трансплантированных клеток, их ультраструктурные характеристики, накопление гликогена и образование желчи были такими же, как у нормаль-

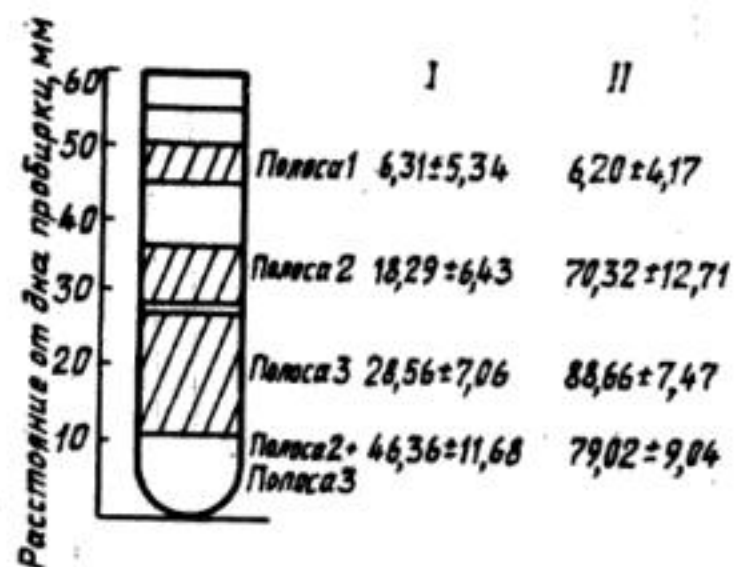


Рис. 1. Центрифугирование криоконсервированных гепатоцитов в градиенте плотности: клетки наплаивались на предварительно сформированную колонку перкола в центрифужных пробирках объемом 50 мл. В полосе 1 содержались в основном разрушенные клетки и клетки, окрашенные трипановым синим. В полосе 2 и 3 содержались клетки, которые в большинстве исключали трипановый синий. I — среднее число жизнеспособных клеток, %, и жизнеспособных клеток, нанесенных на градиент; II — средняя жизнеспособность криоконсервированных гепатоцитов, %

ных гепатоцитов. Метаболическую активность этих клеток можно продемонстрировать путем измерения поглощения ^{99}mTc HIDA, специфической функции печени. Однако при трансплантации трудно оценить точное число клеток, выживших в селезенке после криоконсервирования. Поэтому эти данные свидетельствуют о том, что определенная популяция гепатоцитов сохраняет жизнеспособность после замораживания.

Одним из путей оценки истинной функциональной активности гепатоцитов, выдержавших криоконсервирование без особых осложнений, может

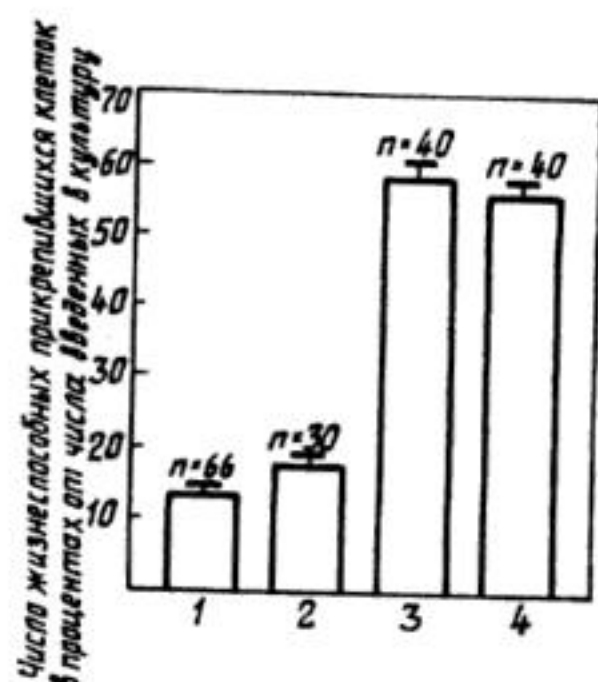


Рис. 2. Прикрепление гепатоцитов в культуре ткани в процентах от общего числа исключающих краситель клеток. Эффективность прикрепления свежих клеток составляла около 60 %, этот показатель не изменялся после обработки перколом. Прикрепление криоконсервированных клеток составляло 15—20 %, обработка перколом также не изменяла эту величину. 1 — криоконсервированные гепатоциты, без обработки; 2 — криоконсервированные гепатоциты, градиент плотности; 3 — свежие изолированные гепатоциты, без обработки; 4 — свежие изолированные гепатоциты, градиент плотности

было разделение живых клеток и мертвых и поврежденных гепатоцитов. Это может быть достигнуто, если клетки центрифугировать в градиенте плотности в инертной среде. Нами исследовано разделение их в непрерывном градиенте перкола («Фармация Лтд»). Для формирования колонки градиента плотности 25 мл перкола 400 («Фармация», Швеция), силиконового коллоида, изосоматического в 0,15 М хлориде натрия, центрифугировали при 30 000 g в течение 90 мин при 4 °C в пробирках объемом 50 мл. Гепатоциты (в объеме 2 мл среды L-15) наслаивали на образовавшуюся колонку и затем центрифугировали при 700g в течение 10 мин при 4 °C. Приготовленные идентично градиенты калибровали с использованием покрытых декстраном бус с известной плотностью.

Гепатоциты крысы выделяли описанным выше методом и наслаивали на колонки. Другие клетки вначале криоконсервировали с использованием 1,5 М Me_2SO и медленного охлаждения [2], а затем наслаивали на перкол. После центрифугирования в обеих группах экспериментов наблюдали три четкие полосы клеток с разной плотностью, как указано на рис. 1. В полосе 1 свежих и криоконсервированных клеток содержались разрушенные клетки и клетки, которые окрашивались в синий цвет при контакте с трипановым синим. Полосы 2 и 3 свежих и криоконсервированных образцов содержали гепатоциты с хорошими морфологическими характеристиками, в обоих случаях большинство клеток исклю-

чало трипановый синий (полосы 2 и 3 комбинировались: свежих клеток 86 % $\pm$ 5 %; криоконсервированных клеток — 79 % $\pm$ 9 %). Проводили сравнение с исходным образцом клеток (не центрифугированных в перколе), в которых исключение красителя было следующим: свежие клетки — 88 % $\pm$ 7 %; криоконсервированные — 67 % $\pm$ 6 %. Таким образом, центрифугирование криоконсервированных клеток в градиенте плотности увеличивало число клеток, исключающих краситель, примерно на 10—15 %.

После обработки в перколе свежие и криоконсервированные клетки из полос 2 и 3 помещали в культуру ткани исключающих краситель клеток в концентрации 2×10^6 в чашки диаметром 55 мм («Фалкон Лтд») в среде «Лейбовиц L-15», содержащей 10 % сыворотки плода теленка («Гибко Лтд»). Флаконы инкубировали при 37 °C в течение 3 ч во влажной атмосфере (95 % воздуха / 5 % двуокиси углерода). После этого в каждой чашке проверяли прикрепление клеток путем подсчета числа прикрепившихся в 20 случайно выбранных участках. Полученное число сравнивали с исходным количеством исключающих краситель клеток в процентах. На рис. 2 показано число нативных и криоконсервированных клеток, прикрепившихся в культуре в процентах. Видно, что прикрепление нативных клеток составляет

60 % (нормальная величина для культуры гепатоцитов), после обработки в перколе она не изменялась. Однако прикрепление криоконсервированных клеток в этом случае уменьшилось на 20 %, несмотря на то, что после обработки в перколе их способность к исключению красителя улучшилась до степени свежих клеток.

Таким образом, центрифугирование в градиенте плотности может повысить популяцию исключающих краситель гепатоцитов после криоконсервирования. Однако существуют также некоторые более тонкие изменения, происходящие в криоконсервированных клетках, которые уменьшают их способность к прикреплению и выживаемости в культуре. Это может быть связано, например, с угнетением синтеза белка в криоконсервированных клетках [2], поскольку для осуществления процесса прикрепления необходимо сохранение синтеза белков внеклеточного матрикса.

Упомянутые выше исследования свидетельствуют о том, что необходимы дальнейшие исследования для разработки воспроизводимого и эффективного метода сохранения функциональных гепатоцитов в замороженном состоянии.

1. Ashwood-Smith M. J. // *Cryobiology*.— 1977.— 14.— P. 240.
2. Coundouris J., Hannah C., Grant H., Hawksworth G. // *Biochem. Soc. Transac.*— 1986.— 14.— P. 692.
3. Fuller B. J., Morris G. J., Nutt L., Attenburrow V. D. // *Cryo-Lett.*— 1980.— 1.— P. 139.
4. Fuller B. J., Grout B. W., Woods R. J. // *Cryobiology*.— 1982.— 19.— P. 439.
5. Fuller B. J., Lewin J., Sage L. // *Transplantation*.— 1983.— 35.— P. 15.
6. Gomez L. M., Lopez P., Castell J. // *In Vitro*.— 1984.— 20.— P. 826.
7. Karlberg L., Lindahl-Kiessling K. // *Mutation Res.*— 1981.— 85.— P. 411.
8. Kudokotseva E., Gordienko A., Belous A. // *Cryo-Lett.*— 1981.— 2.— P. 257.
9. Kusano M., Ebata H., Onishi T. et al. // *Transplant. Proc.*— 1981.— 13.— P. 848.
10. Le Cam A., Guillouzo A., Freychet P. // *Exp. Cell. Res.*— 1972.— 98.— P. 382.
11. Novicki D., Irons G., Strom S. et al. // *In Vitro*.— 1982.— 18.— P. 393.
12. Rijntjes P., Moshage H., Van Gemert P. et al. // *J. Hepatol.*— 1986.— 3.— P. 7.
13. Seglen P. O. // *Exp. Cell. Res.*— 1973.— 82.— P. 391.
14. Woods R. J., Fuller B. J., Nutt L. et al. // *Transplantation*.— 1982.— 33.— P. 123

Ин-т медицины при
Королевской больнице,
г. Лондон, Великобритания

Поступила 21.03.88.

УДК 57.043

Н. П. Суббота, А. М. Белоус

ПРОБЛЕМЫ КРИОКОНСЕРВАЦИИ ГЕПАТОЦИТОВ

Для устранения патологических изменений, возникающих при различных формах гепатаргий, могут быть с успехом использованы клетки аллогенной печени (КАП). В настоящее время доказано, что КАП при этом сохраняют свои органоспецифические функции и способны включаться в процессы детоксикации [6]. Целесообразность использования КАП [7, 21], а также гомогенатов ткани печени [10, 24] для компенсации утраченных функций пораженной печени показана в ряде работ.

Вместе с тем использование гепатоцитов в клинике носит пока весьма ограниченный характер, поскольку экстренное применение их в качестве заместительной терапии при ряде патологических состояний организма невозможно без создания низкотемпературного банка, в котором можно длительно сохранять гепатоциты в жизнеспособном состоянии. В этом случае появляется возможность использовать их в клинике по мере необходимости. Вопросы консервации КАП с помощью низких температур до настоящего времени окончательно не решены [20, 14], поскольку отсутствуют твердо устоявшиеся параметры эффективных криопротекторов, скоростей

охлаждения, режимов хранения и отогрева. В настоящем сообщении представлены последние достижения, полученные при консервации гепатоцитов, используемых как модельные системы для изучения фундаментальных процессов, протекающих в ядродержащих клетках при действии холода, а также в качестве компонентов заместительной] терапии при острых гепатаргиях.

Одним из основных факторов, обеспечивающих сохранность гепатоцитов после деконсервации, является скорость охлаждения. Для получения жизнеспособных гепатоцитов в процессе криоконсервирования используются различные скорости замораживания: медленные ($5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) [15], быстрые ($200\text{--}300^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) [9] и комбинированные [12, 24]. Описаны режимы охлаждения с использованием температурной остановки (зона температур $-5 \div 6^{\circ}\text{C}$ или $-12 \div 15^{\circ}\text{C}$) на несколько минут (3—5 мин) [12, 13, 17]. Используется также [19] скорость охлаждения $38^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и погружение в азот [9].

Показано, что при медленном замораживании клеток в среде с 3 М ДМСО со скоростью $2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до различных температур ($-6,5$, -20 , -30 , -40 , -60°C), а затем погружении в азот [26] сохранялись лишь те клетки, которые были охлаждены до -20°C . При медленном замораживании гепатоцитов до $-12 \div 15^{\circ}\text{C}$ с последующей остановкой и погружением в азот [13, 12], независимо от концентрации ДМСО (она была в 2 раза ниже, чем в цитированной выше работе [9]), сохраняли свои свойства опять-таки лишь те клетки, которые охлаждены были до -20°C . Эти данные сходны с представленными в работе [19], в которой клетки печени человека замораживали со скоростью $2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -30°C (под защитой ДМСО), а затем погружали в азот. Показано также [28], что при медленной скорости охлаждения от $0,5$ до $5,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -80°C или -196°C КАП в присутствии 20 %-ной концентрации ДМСО или 10% глицерина при использовании скорости $3,3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ сохраняются лишь при охлаждении до -20°C . Полученные данные согласуются с приведенными в целом ряде других работ [12, 13, 19, 26]. Однако эта температура, как известно, не является достаточно низкой для длительного хранения клеток и поэтому практически не используется [22, 23].

В ряде работ при криоконсервировании гепатоцитов апробированы многоступенчатые скорости охлаждения [8, 17]. Так, описана методика [8], предусматривающая вначале медленное охлаждение КАП в среде с 10 % ДМСО с регулированием скоростей охлаждения в различных температурных точках ($-6 \div 8^{\circ}\text{C}$ и $-30 \div 35^{\circ}\text{C}$). При этом получен высокий уровень сохранности гепатоцитов.

Гепатоциты можно замораживать также со скоростью $5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -6°C в среде, содержащей 10 %-ный раствор ДМСО, затем осуществить остановку при этой температуре на 3 мин, индуцировать кристаллизацию, после чего замораживать со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -35°C с последующим быстрым погружением в азот [17].

Основными критериями оценки жизнеспособности деконсервированных клеток в большинстве приведенных выше работ являются уровень синтеза белка, морфологическая сохранность клеток по исключению красителя трипанового синего и эффективность культивирования. В отдельных работах исследовали глюконеогенез [19], активность глюкозо-6-фосфатазы [8, 27], способность к гидроксигированию [8, 29], уровень окислительного фосфорилирования и дыхательную активность митохондрий клеток [8].

Из приведенных выше данных по использованию различных скоростей замораживания как основного фактора криоконсервации, определяющего ее успешность, следует, что более высокая сохранность клеток может быть получена при многоступенчатых режимах, при которых используются медленные скорости, холодовые остановки, индуцированная кристаллизация и другие приемы, позволяющие осуществить плавную дегидратацию клеток.

При консервации гепатоцитов в составе консервирующих сред чаще всего используют ДМСО и глицерин [28]. При этом наиболее эффективными свойствами обладает ДМСО в концентрации от 1,5 до 3 М [13, 26]. Имеются данные [29] об эффективности сочетанного использования 10 %-ной сыворотки плода и 15 %-ного раствора ДМСО с медленной (0,5 °С/мин) скоростью охлаждения до —196 °С. При таком способе хорошо сохраняется детоксикационная функция гепатоцитов. Для этих же целей целесообразно также использовать сыворотку плода теленка в сочетании с 10 %-ным раствором ДМСО [19], увеличив при этом скорость замораживания до 38 °С/мин. В этом случае культивируемые клетки не имели существенных ультраструктурных изменений, уровень синтеза мочевины и альбумина практически не отличался от контрольных показателей. Однако, если гепатоциты в такой защитной среде замораживали медленно (≈ 2 °С/мин), морфологические и биохимические свойства клеток нарушались.

В качестве среды замораживания гепатоцитов предлагают использовать многокомпонентный раствор «Лейбовиц-15», содержащий ДМСО. При его применении криоконсервацию клеток рекомендуют проводить под защитой 1,5 М раствора ДМСО в 3 этапа: на первом этапе следует охладить до —5,5 °С (при этой температуре искусственно индуцируют кристаллизацию), на втором — со скоростью 2—3 °С/мин до —60 °С, после чего пробы следует погружать в жидкий азот (—196 °С) [14]. С целью уменьшения шока клеток при отогреве необходимо производить разведение проб в 10-кратном объеме среды «Лейбовиц-15», содержащей 1 М глюкозы. После трансплантации таких гепатоцитов в селезенку выявлено хорошее приживание клеток. Для повышения жизнеспособности клеток рекомендуется в используемую среду добавлять сыворотку плода в сочетании с ДМСО, варьируя при этом скорости замораживания.

Вопрос о том, на каком этапе замораживания — отогрева гепатоцитов происходят наиболее выраженные повреждения мембран и цитоплазматических структур, окончательно не выяснен. Очевидно, основная доля повреждений клеток происходит на тех этапах замораживания, на которых в закристаллизованной матрице сохраняются жидкие микрофазы, а также в момент отогрева, когда проявляются латентные изменения.

Известно [27], что жизнеспособность гепатоцитов, консервированных под защитой 20 % ДМСО, после хранения в жидком азоте в течение месяца несколько снижается. Так, по тесту исключения трипанового синего, жизнеспособность составляла 70 % от контроля, хотя активность маркерного фермента глюкозо-6-фосфатазы при этом была в пределах нормы.

В настоящее время судьба пересаженных криоконсервированных гепатоцитов изучена в недостаточной мере. Показано, что размороженные гепатоциты, трансплантированные в ткань селезенки, через месяц по своей структуре подобны трансплантированным клеткам, не подвергшимся криоконсервации. В частности, в деконсервированных гепатоцитах хорошо сохранились структура митохондрий и шероховатого ретикулума, которые обеспечивают постоянство генерации энергии и биосинтетических процессов. Наблюдения за судьбой трансплантированных криоконсервированных гепатоцитов в течение года показали, что в клетках не развивались признаки их деградации.

В некоторых работах [9, 16—18] освещаются особенности криоповреждений гепатоцитов при различных режимах консервации. При медленных скоростях охлаждения до —30 °С, несмотря на отсутствие в гепатоцитах внутриклеточного льда, они резко деформируются и сжимаются [16]. Было замечено, что значительное уменьшение площади поверхности клеток при замораживании (более чем на 40 %) приводит к уменьшению их объема при отогреве. Считают, что потеря жизнеспособности частью клеток после отогрева обусловлена их обезвоживанием в процессе замораживания и последующим коллоидно-осмотическим шоком в момент отогрева. Подтверждается [16] то обстоятельство, что изменение площади поверхности клеточ-

ной мембраны гепатоцитов, связанное с метаболическими и осмотическими сдвигами при медленных скоростях замораживания в среде без криопротектора, вносит большой вклад в криоповреждение гепатоцитов. При этом считают, что изменение объема гепатоцитов происходит из-за появления дефектов в клеточной мембране и перераспределения ионов воды вне и внутри клетки. Выявлено, что изменяя ионный состав среды, можно уменьшить осмотические эффекты и, таким образом, повысить жизнеспособность гепатоцитов после криоконсервации [25]. При замораживании гепатоцитов даже с применением традиционных криопротекторов всегда нарушается структурно-функциональная целостность внутриклеточных органелл: лизосом [2], митохондрий [4, 5], в то время как микросомы сравнительно устойчивы к повреждающему действию низких температур [8].

Изучение структурно-функциональных параметров гепатоцитов после действия низких температур свидетельствует [1, 3], что деконсервированные гепатоциты, замороженные по различным программам, практически во всех случаях теряют то или иное количество ферментов гликолиза (гексокиназа, фосфофруктокиназа), лизосомальных гидролаз (РНКаза, кислая фосфатаза, арилэстераза). Выход ферментов в надосадочную жидкость, независимо от использованных скоростей охлаждения, свидетельствует о том, что в процессе замораживания в плазматической мембране гепатоцитов формируются трансмембранные дефекты, которые являются основой для элиминации ионов и метаболитов.

При исследовании структуры плазматической мембраны гепатоцитов методом флуоресцентных зондов [3,4] выявлено увеличение положительного заряда мембраны, изменение подвижности молекул воды в примембранном слое и молекул фосфолипидов, снижение вязкости липидного бислоя, а также нарушение взаимоотношений в белок-липидных комплексах клеточной мембраны.

Существенное значение для оценки жизнеспособности деконсервированных гепатоцитов имеет адекватный выбор морфологических и биохимических тестов [11, 13, 27, 28]. На основании анализа существующей литературы можно сделать вывод, что оценка жизнеспособности гепатоцитов должна охватывать оценку их структурно-функционального состояния на различных уровнях. Наиболее традиционным тестом оценки деконсервированных клеток является простой морфологический прием — окраска клеток трипановым синим, который легко проникает внутрь клетки, если ее плазматическая мембрана содержит дефекты, образовавшиеся в процессе замораживания — отогрева.

Некоторые авторы [12, 13] показывают, что при замораживании гепатоцитов со скоростью от 0,5 до 10 °C/мин трипановый синий плохо проникает через плазматическую мембрану, хотя синтез мочевины в деконсервированных клетках составляет при таких вариантах замораживания всего лишь 50 % от исходных величин, полученных на незамороженных клетках. Хорошая морфологическая сохранность гепатоцитов [28], определенная по исключению красителя, может быть получена после замораживания гепатоцитов со скоростью 0,5—5,5 °C/мин до —80 °C или —196 °C под защитой 10 % глицерина или 20 % ДМСО. Однако показатели морфологических тестов при этом плохо коррелировали с показателями белкового синтеза, который был существенно подавлен в деконсервированных клетках.

Аналогичные результаты были получены в работе [11], в которой показано, что при скоростях охлаждения от 1 до 10 °C/мин гепатоциты, судя по исключению красителя, характеризуются высоким уровнем морфологической сохранности, однако синтез глюкозы и белка составлял соответственно 50 и 25 % от уровня контроля.

Считают [9], что окрашивание трипановым синим, как и выделение лактатдегидрогеназы из гепатоцитов, свидетельствует о грубых необратимых повреждениях клеток, которые могут возникнуть, например, при быстром замораживании (погружении в азот) гепатоцитов. При таких неадекватных

режимах замораживания 95 % клеток окрашиваются трипановым синим, а активность лактатдегидрогеназы в надосадке значительно увеличивается. Более адекватные режимы, медленные, комбинированные (под защитой ДМСО) оказывают менее повреждающее действие на клетки, а имеющиеся при этом изменения происходят как в ядре, так и рибосомном аппарате клеток, поскольку независимо от скорости охлаждения синтез белка очень сильно угнетался. В связи с этим при оценке жизнеспособности гепатоцитов тестирование их по уровню биосинтеза белка является весьма целесообразным. Для нормального функционирования деконсервированных гепатоцитов необходимо сохранение их дыхательной активности и окислительного фосфорилирования, уровня эндогенного дыхания, соответствующего соотношения АТФ/АДФ.

Чувствительным тестом на изменение барьерных свойств плазматической мембраны может явиться определение клеточного дыхания, стимулируемого сукцинатом, поскольку сукцинат проникает только через поврежденную плазматическую мембрану [5, 28].

Важным тестом оценки свойств деконсервированных гепатоцитов является сохранение их способности к детоксикации [17]. Выяснено, что система микросомального гидроксилирования веществ довольно устойчива к замораживанию — отогреву. Например, концентрация цитохрома Р-450 в замороженных и отогретых гепатоцитах изменяется незначительно (26 % от контроля). Однако при этом обнаружено [8] некоторое снижение скорости гидроксилированная этилморфина, аминопирина, анилина и диметиланилина в деконсервированных гепатоцитах. Кроме того, показано, что в деконсервированных клетках процесс связывания билирубина резко снижен и составляет всего лишь 18 % от контрольных величин [17, 18]. Следует отметить, что сохранение структурно-функциональной полноценности системы микросомального гидроксилирования в деконсервированных гепатоцитах является очень важным в аспекте практического использования гепатоцитов в качестве заместительной терапии при острых гепатаргиях.

Наиболее чувствительным тестом оценки жизнеспособности деконсервированных гепатоцитов, наряду с определением синтеза белка и стимуляцией дыхания сукцинатом, является определение мембранного потенциала и содержания внутри клеток K^+ , поскольку считают [5, 18], что эти параметры позволяют регистрировать даже незначительные изменения плазматических мембран клеток.

Таким образом, хотя в настоящее время достигнуты определенные положительные результаты при криоконсервации КАП, обнаруженные изменения в состоянии деконсервированных клеток позволяют сделать заключение, что механизмы криоповреждений их изучены в недостаточной мере. Это побуждает к проведению исследований, направленных на оптимизацию способов криоконсервирования клеток печени для ускоренного внедрения их в практику здравоохранения.

1. Андриенко А. Н., Золочевская Л. И. Ферменты энергетического обмена в гепатоцитах после низкотемпературного воздействия // II Всесоюз. конф. по теорет. и прикл. вопр. криобиологии. — Харьков : Наук. думка, 1984. — С. 5.
2. Карева Л. В., Семенченко О. А., Коптелов В. А. Активность некоторых лизосомальных ферментов после замораживания — оттаивания изолированных гепатоцитов // III Всесоюз. симпозиум. «Структура и функция лизосом» — Тбилиси : Б. и., 1986. — С. 86.
3. Коптелов В. А. Структурные изменения плазматической мембраны изолированных гепатоцитов при замораживании // Криобиология. — 1986. — № 3. — С. 49—50.
4. Суббота Н. П., Андриенко А. Н., Тарасов В. Ф. Индуцирование низкими температурами изменения биоэнергетических систем клетки // Всесоюз. симпозиум. «Молекулярные механизмы и регуляция энергетического обмена». — Пущино : Наука, 1986. — С. 90.
5. Суббота Н. П., Луговой В. И., Белоус А. М., Коптелов В. А. Конформационные изменения мембранных белков при замораживании // VI Всесоюз. симпозиум. «Конформационные изменения биополимеров в растворах». — Тбилиси : Б. и., 1985. — С. 71.

6. Шиманко И. И., Комаров Б. Д. Сорбционная детоксикация при неотложных состояниях // Хирургия.— 1984.— № 11.— С. 22—28.
7. А.с. 644485, МКИ² А61К 35/40. Способ детоксикации организма при печеночной недостаточности / В. Г. Бруслик, Г. Е. Островерхов, И. И. Шиманко, Э. Ф. Мажугин.— Оpubл. 30.01.79, Бюл. № 4.
8. А.с. 902695, МКИ³ А01N 1/02. Способ консервирования гепатоцитов в питательной среде / Е. В. Кудокочева, А. Д. Гордиенко, А. М. Белоус.— Оpubл. 07.02.82, Бюл. № 5.
9. Baur H., Kasperck S., Plaff E. Criteria of viability of isolated liver cells // Hoppe-Seyler Ztschr. physiol. Chem.— 1975.— 356, N 6.— P. 827—838.
10. Becker W., Lillehei R. Transplantation of cryopreserved hepatocytes for experimental acute liver failure // Cryobiology.— 17, N 1.— P. 85—136.
11. Cam A. Le, Guillonzo A., Freychet P. Ultrastructural and biochemical studies of isolated adult rat hepatocytes prepared under hypoxic conditions // Exp. Cell. Res.— 1976.— 98, N 2.— P. 139—146.
12. Fuller B. J., Morris G. I., 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.
13. Fuller B. J., Woods R. J., Howe H., et al. Metabolic effects of cryopreservation on isolated hepatocytes of rat // Cryobiology.— 1980.— 17, N 6.— P. 618.
14. Fuller B. J., Grout B. W., Woods R. J. Biochemical and ultrastructural examination of cryopreserved hepatocytes in rat // Ibid.— 1982.— 19, N 4.— P. 493—503.
15. Fuller B. J., Lewin J., Sage L. Ultrastructural assessment of cryopreserved hepatocytes after prolonged ectopic transplantation // Transplantation.— 1983.— 35, N 1.— P. 15—18.
16. Fuller B. J., Grout B. W., James E. Cell membrane surface area changes related to metabolic and osmotic behavior in isolated rat hepatocytes after freezing and hypertonic exposure // Cryo-Lett.— 1984.— 5, N 4.— P. 239—254.
17. Fuller B. J., James E. Cryopreservation of isolated rat hepatocytes in pellet form // Ibid.— 1985.— 6, N 1.— P. 49—56.
18. Fuller B. J., De Loecker W. Changes in the permeability characteristics of isolated hepatocytes during slow freezing // Cryo-Lett.— 1985.— 6, N 6.— P. 361—371.
19. Gomez-Lechon M., Lopez J. P., Castell J. Cryopreservation of isolated adult hepatocytes // Biol. Cell.— 1984.— 52, N 1B.— P. 58.
20. Grout B. W., Fuller B. J. Hepatocyte plasma membrane response to hypertonic stress and related cell viability // Cryo-Lett.— 1982.— 3, N 1.— P. 51—56.
21. Kusano M., Ebata H., Oniski T. et al. Transplantation of cryopreserved isolated hepatocytes into the rat spleen // Transplant. Proc.— 1981.— 13, N 1.— P. 848—854.
22. Law P., Lepock J. R., Kruuw J. Effect of protective agents on amount and repair of sublethal freeze-thaw damage in mammalian cells // Cryobiology.— 16, N 5.— P. 430—453.
23. Law P., Lepock J. R., Kruuw J. Effect of temperature and protein synthesis inhibitors on repair of sublethal freeze-thaw damage in mammalian cells // Cryo-Lett.— 1980.— 1, N 10.— P. 324—336.
24. Makowka L., Rotstein L. E., Falk R. E. et al. Allogenic and xenogenic hepatocyte transplantation // Transplant. Proc.— 1981.— 13, N 1.— P. 855—859.
25. Morris G. J. Cold shock — a widespread cellular reaction // Cryo-Lett.— 1983.— 4, N 3.— P. 179—192.
26. Nutt L. H., Attenburrow V. D., Fuller B. J. Investigation into repair of freeze-thaw damage in isolated rat hepatocytes // Ibid.— 1980.— 1, N 15.— P. 513—518.
27. Sekiguchi S., Kusano M., Oniski T. et al. Cryogenic preservation of isolated hepatocytes in rat // Cryobiology.— 1978.— 15, N 6.— P. 724—725.
28. Sekiguchi S., Kasai Shin-ichi, Mito Michio. Freezing of hepatocytes // Refrigeration.— 1982.— 57, N 656.— P. 600—605.
29. Thul P., Grandmann R., Waters W., Koebe H. G. Transplantation of cryopreserved hepatocytes to improve survival of rats with hepatic failure // Cryobiology.— 1983.— 20, N 6.— P. 743—744.

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

Поступила 14.05.87

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА СРЕДЫ НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ К ОХЛАЖДЕНИЮ

Уменьшение объема клеток в гипертонических условиях сопровождается увеличением в них концентрации органических и неорганических ионов. При этом осмотический дисбаланс будет наиболее выражен при помещении клеток в гипертонические растворы неэлектролитов, поскольку экспонирование эритроцитов в среде с низким содержанием электролита, например в изотоническом растворе сахарозы, приводит к тому, что вследствие исключительно высокой проницаемости мембраны эритроцита для анионов мембранный потенциал становится положительным внутри и отрицательным снаружи [9]. Результирующий градиент электрохимического потенциала представляет собой движущую силу, ответственную за внезапную потерю клетками катионов в неэлектролитной среде. Равновесная пассивная утечка солей из эритроцитов человека на два порядка величин больше в растворах неэлектролитов, чем в изотонических солевых растворах [7], так как резкие изменения катионной проницаемости происходят при некоторых дискретных величинах мембранного потенциала [5]. Возрастание катионной проницаемости при изменении мембранного потенциала может явиться одним из факторов, влияющих на холодочувствительность эритроцитов.

Помимо этого, в неэлектролитных средах на фоне быстрой потери ионов будет происходить внутриклеточное защелачивание, развивающееся при одновременном внеклеточном закислении, причиной которого является обмен хлорида на наружные анионы гидроксила или бикарбоната [6].

Процесс внутриклеточного защелачивания является фактором, препятствующим протонной диссоциации гемоглобина [4], что обуславливает уменьшение общего числа осмотически активных молекул внутри клетки. Поэтому конечный эффект суспендирования эритроцитов в растворе неэлектролита будет проявляться в изменении характера осмотического ответа клетки и в более сильном изменении ее объема.

В связи с этим целью данной работы явилось изучение влияния анионного состава среды на чувствительность эритроцитов к охлаждению в гипертонических растворах хлористого натрия и сахарозы.

Исследования проведены на эритроцитах свежей донорской крови человека, заготовленной на консерванте ЦОЛИПК-76. Из отмытой эритроцитарной массы готовили 50 %-ную суспензию эритроцитов на 0,02 М фосфатном буфере, содержащем 0,15 М NaCl, pH 7,4. Полученную суспензию (0,2 мл) микропипеткой вносили в растворы (5 мл), содержащие 0,86 М сахарозу и различные концентрации (0—250 мМ) NaCl, Na_2SO_4 , CH_3COONa или KCl при заданной температуре (конечная концентрация эритроцитов 2 %). Исследования проводили при сдвиге температуры $37 \rightarrow 0^\circ C$ и $0 \rightarrow 37 \rightarrow 0^\circ C$. Время инкубации на всех этапах 10 мин.

Уровень свободного гемоглобина определяли спектрофотометрически при 543 нм и выражали в процентах по отношению к 100 %-ному гемолизу клеток.

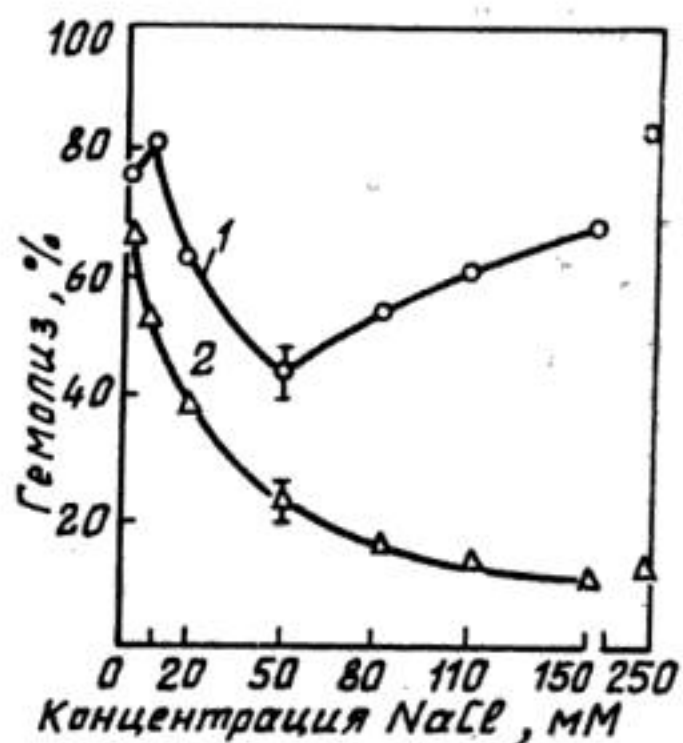


Рис. 1. Уровень гемолиза эритроцитов при охлаждении от 37 до $0^\circ C$ (1) и при циклическом изменении температуры $0 \rightarrow 37 \rightarrow 0^\circ C$ (2) в присутствии 0,86 М сахарозы и NaCl в различных концентрациях

Изучение устойчивости клеток к охлаждению в присутствии высоких концентраций неэлектролита (0,86 М сахара) и различных концентраций электролитов (0—250 мМ) показало, что изменение температуры, при которой инкубируются эритроциты, по-разному влияет на поведение клеток при последующем охлаждении в зависимости от концентрации электролита (рис. 1). Для клеток, подвергнутых инкубации при 37 °С, уменьшение концентрации NaCl проявляется в постепенном снижении гемолиза при последующем охлаждении, причем минимальный гемолиз наблюдается при уменьшении концентрации NaCl от 250 до 50 мМ. Дальнейшее снижение концентрации NaCl сопровождается увеличением гемолиза. После предварительной инкубации клеток при 0 °С снижение концентрации NaCl сопровождается увеличением гемолиза во всем интервале концентраций электролита. Таким образом, характер изменения, наблюдаемого в области концентраций 0—50 мМ, был таким же, как и в клетках, подвергнутых инкубации при 37 °С. При более высокой концентрации NaCl изменения носят противоположный характер.

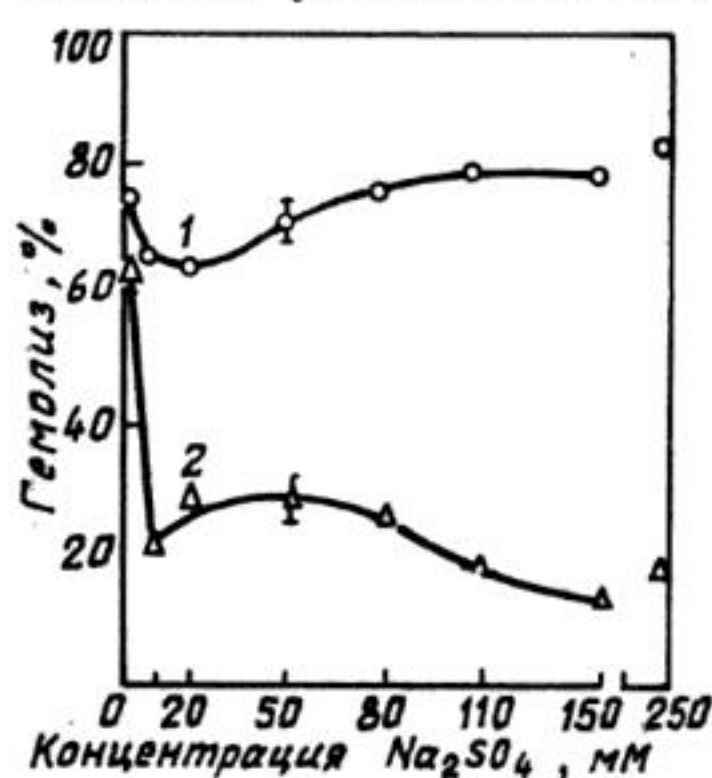


Рис. 2. Уровень гемолиза эритроцитов при охлаждении от 37 до 0 °С (1) и при циклическом изменении температуры 0 → 37 → 0 °С (2) в присутствии 0,86 М сахара и Na_2SO_4 в различных концентрациях

онной проницаемости, равна 45 мВ [5]. Сходная зависимость наблюдается и в наших экспериментах, когда клетки подвергаются охлаждению от 37 до 0 °С. В этом случае регистрируются изменения вблизи 50 мМ NaCl и при снижении концентрации соли ниже 10 мМ. Таким образом, обнаруженные различия можно объяснить влиянием мембранного потенциала на транспортные характеристики мембраны.

Так как осмотическая реакция эритроцитов в неэлектролитных средах обусловлена изменением равновесного распределения хлорида, представляло интерес выяснить, как влияет анионный состав среды на чувствительность эритроцитов к охлаждению в гипертоническом растворе сахара. Эксперименты показали, что замена хлорида сульфатом приводит к изменению поведения эритроцитов при охлаждении в присутствии 0,86 М сахара (рис. 2). Прежде всего следует отметить, что изменение концентрации сульфата практически не влияет на холодовую чувствительность эритроцитов, подвергнутых инкубации при 37 °С. В отличие от условий, когда клетки инкубировались в среде, содержащей хлорид, в данном случае не наблюдалось уменьшение гемолиза при снижении концентрации анионов. Небольшие изменения происходили только в интервале концентраций 0—50 мМ, однако они были выражены слабо. Гипертоническая преинкубация клеток при 0 °С приводила к резкому снижению уровня гемолиза при охлаждении с 0,86 М сахарозой практически во всем интервале концентраций сульфата. Только при снижении концентрации ниже 10 мМ наблюдалось скачкообразное увеличение уровня гемолиза. Это указывает на то, что замещение хлорида сульфатом влияет на процессы, контролируемые

мембранным потенциалом. Причиной подобных изменений может быть изменение эффективности работы анионных переносчиков при замещении хлорида сульфатом.

Анионообменная система эритроцитов проявляет значительную специфичность по отношению к различным анионам [4]. Система более специфична для одновалентных, чем для двухвалентных ионов: обмен хлорида происходит в 10—100 тыс. раз быстрее, чем сульфата [4]. Это может играть существенную роль в наблюдаемых нами различиях между поведением эритроцитов при охлаждении в средах, содержащих хлорид и сульфат. В зависимости от относительного сродства к переносчику кривая зависимости потока анионов от концентрации может быть вогнутой, линейной или выпуклой. Так, если хлорид заменить сульфатом, кривая зависимости потока анионов от концентрации будет выпуклой [8]. Подобные особенности наблюдались и в наших экспериментах, в частности для клеток, подвергнутых инкубации при 0 °C в присутствии сульфата.

При сравнении осмотического поведения эритроцитов в средах, содержащих хлорид и сульфат, следует учитывать и кинетические параметры транспорта анионов. При увеличении концентрации хлорида (без изменения концентрации других анионов) его поток будет приближаться к лимитированной величине и затем медленно снижаться при дальнейшем возрастании концентрации анионов [3]. Сульфат достигает лимитирующей границы при более высоких концентрациях. Подобные различия могут быть обусловлены двухфазным характером влияния хлорида на гемолиз эритроцитов, инкубированных при 37 °C (рис. 1), и отсутствием такового в случае сульфата (рис. 2). Различия, наблюдаемые в поведении

эритроцитов, подвергнутых инкубации при температурах 37 и 0 °C, могут основываться на нескольких механизмах. Во-первых, набухание (сжатие) клеток может происходить по-разному в зависимости от температуры и состава наружного раствора. При температурах ниже 20 °C, когда транспорт воды происходит быстрее транспорта хлорида, в начальной фазе осмотического ответа клеток их набухание (сжатие) определяется движением воды [2]. В этом случае водное равновесие устанавливается ранее каких-либо значительных изменений в распределении хлорида. Подобная особенность осмотического поведения эритроцитов при изменении температуры может явиться причиной различий, обнаруженных нами при анализе холодовой чувствительности клеток в присутствии NaCl (рис. 1.). Во-вторых, конкурентное ингибирование транспорта хлорида другими анионами может стать причиной отсутствия резких изменений осмотического поведения клеток при снижении концентрации анионов как при 0 °C, так и при 37 °C. Только при снижении концентрации электролита ниже критической может наблюдаться резко-изменение осмотического поведения клеток.

При замещении хлорида другими одновалентными (CH_3COO^-) анионами (рис. 3) наблюдается картина, напоминающая таковую в случае хлорида, хотя изменения в присутствии CH_3COO^- при 37 °C менее выражены.

Влияние анионов на холодовую чувствительность клеток может быть обусловлено изменением пассивной проницаемости мембран. Действительно, результирующий градиент электрохимического потенциала не только является движущей силой, регулирующей активный транспорт катионов, но также контролирует изменение пассивной проницаемости мембраны [5]. Поэтому изменение равновесной пассивной утечки солей из эритроцитов,

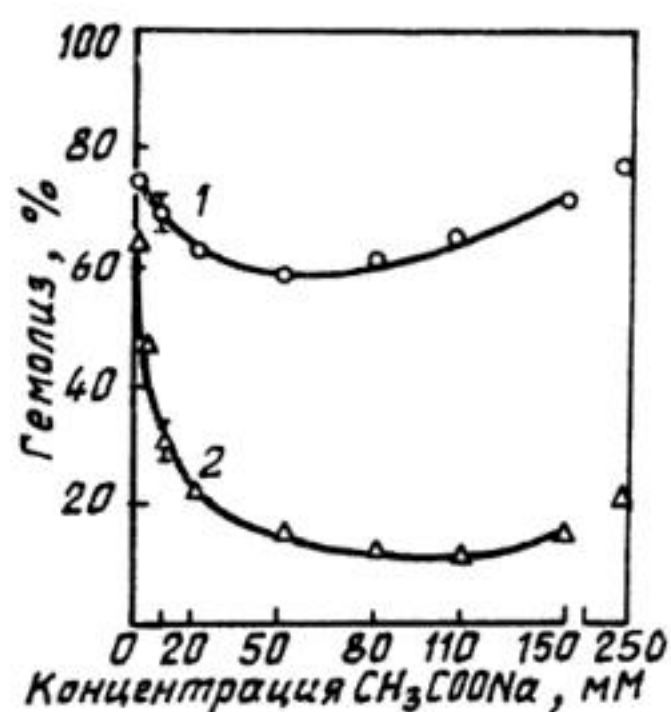


Рис. 3. Уровень гемолиза эритроцитов при охлаждении от 37 до 0 °C (1) и при циклическом изменении температуры 0 → 37 → 0 °C (2) в присутствии 0,86 М сахарозы и CH_3COONa в различных концентрациях

наблюдаемое при уменьшении наружной концентрации соли в интервале 20—50 мМ и 0,1—0,3 мМ NaCl [5], можно рассматривать как потенциал-зависимые изменения к новому состоянию проницаемости. При этом «хлорный» потенциал замещается «катионным» [2]. При низкой наружной концентрации электролитов определяющий вклад в мембранный потенциал вносится катионами и прежде всего калием. Так как внутриклеточная концентрация K^+ в эритроцитах человека невелика (130 мМ) [2], можно предположить, что относительно небольшие сдвиги в распределении клеточного калия могут отражать достаточно высокий уровень модификации мембраны.

В экспериментах по изучению чувствительности эритроцитов к охлаждению в среде, содержащей 1,2 М NaCl и различные концентрации KCl

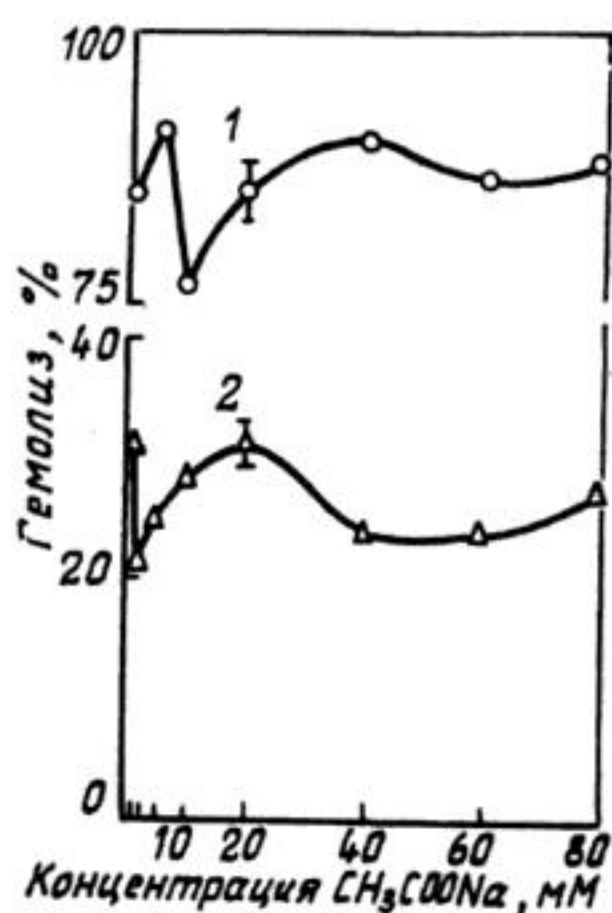
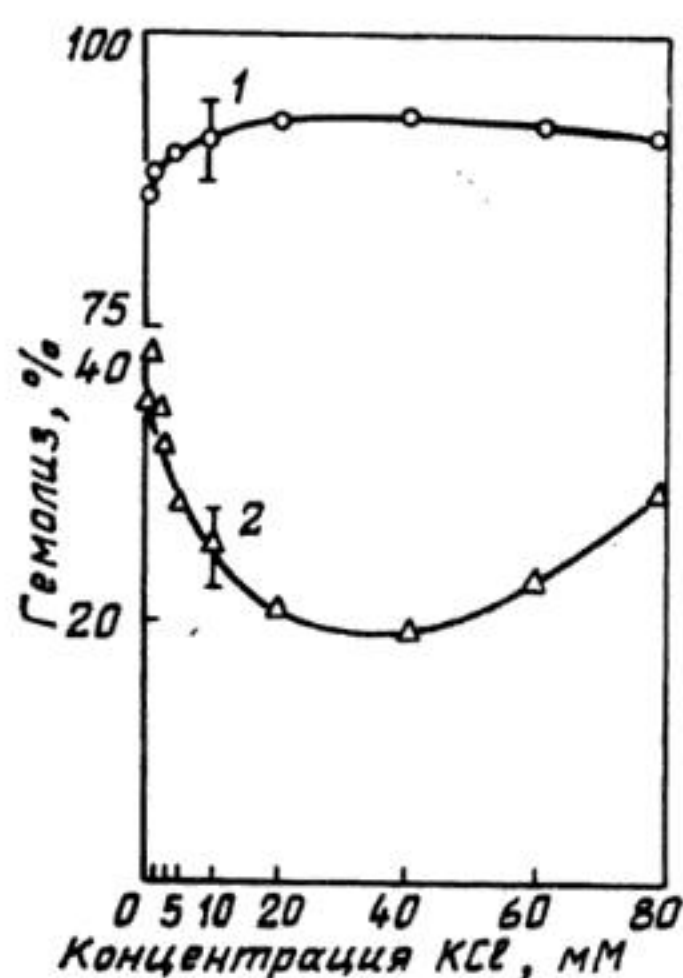


Рис. 4. Уровень гемолиза эритроцитов при охлаждении от 37 до 0 °С (1) и при циклическом изменении температуры 0 → 37 → 0 °С (2) в присутствии 1,2 М NaCl и KCl в различных концентрациях

Рис. 5. Уровень гемолиза эритроцитов при охлаждении от 37 до 0 °С (1) и при циклическом изменении температуры 0 → 37 → 0 °С (2) в присутствии 1,2 М NaCl и CH₃COONa в различных концентрациях

(рис. 4), выявлено, что присутствие KCl при 37 °С не влияет на чувствительность эритроцитов к последующему охлаждению. Однако после инкубации клеток при 0 °С выявляется область концентраций KCl (20—60 мМ), при которой уровень гемолиза снижается. При более высоких и более низких концентрациях KCl гемолиз возрастает. Наблюдаемые температурные различия могут быть связаны с тем, что при 0 °С, где пассивная утечка ионов K^+ в присутствии 1,2 М NaCl существенно ниже, чем при 37 °С, стабилизирующий эффект внеклеточного KCl может быть выше, чем при 37 °С. Однако наличие концентрационного оптимума этого эффекта указывает, что в этом случае важную роль может играть изменение трансмембранного потенциала, то есть температурозависимые характеристики транспорта анионов на начальных этапах осмотической реакции эритроцитов.

Изменение состава наружной среды (замена сахарозы 1,2 М NaCl) и добавление различных концентраций ацетата от 1 до 80 мМ приводит к тому, что как для клеток, инкубированных при 37 °С, так и для предварительно инкубированных при 0 °С наблюдаются характерные изменения кривой гемолиза (рис. 5.). У предварительно инкубированных клеток наблюдается сдвиг кривой в сторону более низких концентраций ацетата. В целом эти изменения напоминают таковые при охлаждении инкубированных при 0 °С эритроцитов в сахарозной среде в присутствии сульфата (рис. 2), то есть могут отражать влияние анионов на насыщение анионного переноса

счика [1]. При этом кинетика ингибирования может определяться конкуренцией между анионами за два участка связывания на мембране: транспортный участок (конкурентное ингибирование) и второй участок, который модифицирует максимальный транспорт хлорида (неконкурентное ингибирование) [1]. В случае ацетата наблюдаемые нами эффекты, по-видимому, обусловлены вторым типом ингибирования.

1. *Brahm J.* Temperature-dependent changes of chloride transport kinetics in human red cells // *J. Gen. Physiol.*— 1977.— 70, N 3.— P. 283—306.
2. *Brumen M., Glaser R., Svetina S.* Osmotic states of red blood cell // *Bioelectrochem. Bioenerg.*— 1979.— 6, N 2.— P. 227—243.
3. *Cass A., Dalmark M.* Equilibrium dialysis of ions in nystatin-treated red cells // *Nat. New Biol.*— 1973.— 244, N 1.— P. 47—49.
4. *Dalmark M.* Chloride and water distribution in human red cells // *J. Physiol.*— 1975.— 250, N 1.— P. 65—84.
5. *Donlon J. A., Rothstein A.* The cation permeability of erythrocytes in low ionic strength media of various tonicities // *J. Membrane Biol.*— 1969.— 1, N 1.— P. 37—51.
6. *Gunn R. B., Dalmark M., Fosteson D. C., Wieth J. O.* Characteristics of chloride transport in human red blood cells // *J. Gen. Physiol.*— 1973.— 61, N 2.— P. 185—206.
7. *La Celle P. L., Rothstein A.* The passive permeability of the red blood cell to cations // *Ibid.*— 1966.— 50, N 1.— P. 171—188.
8. *Lepke S., Passow H.* The permeability of the human red blood cell to sulfate ions // *J. Membrane Biol.*— 1971.— 6, N 2.— P. 158—182.
9. *Willbrandt W., Shatzmann H. J.* Changes in passive cation permeability of erythrocytes in low electrolyte media // *Regulation of inorganic ion content of cells.*— London: Acad. Press, 1960.— P. 34—52.

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

Поступила 03.09.86

УДК 57.043:612.111:536.54

А. М. Воротилин, А. В. Зинченко, В. А. Мусеев, В. И. Аненко

ВЛИЯНИЕ МЕХАНИЧЕСКОГО ФАКТОРА НА ПОВРЕЖДЕНИЕ КЛЕТОК ПРИ НАГРЕВЕ

Одним из наиболее часто применяемых на практике способов размораживания криоконсервированных при температуре -196°C биологических объектов является перенос их из жидкого азота в водяную баню ($42 \div 45^{\circ}\text{C}$). В масштабе скоростей, применяемых в криобиологии, такой нагрев считается сравнительно быстрым. При этом в образце в процессе нагрева неизбежно возникают значительные температурные перепады между слоями, лежащими на различном удалении от поверхности. Вместе с тем известно, что в твердых телах температурные градиенты служат причиной появления механических напряжений [5]. Следовательно, при быстром размораживании на клетки, кроме известных повреждающих факторов, могут действовать механические напряжения и дополнительно травмировать их.

В настоящей работе на основе экспериментальных данных сделана попытка проанализировать вклад механических напряжений в повреждение эритроцитов на этапе деконсервации.

Исследования проводили на эритроцитах донорской крови человека, стабилизированной раствором 76. После центрифугирования и отделения плазмы эритроцитарную массу смешивали в отношении 1 : 1 с криоконсервантом на основе 1,2-пропандиола (1,2-ПД) или глицерина [1] и охлаждали до -196°C соответственно со скоростями 13 и $100^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. При одноэтапном размораживании образцы переносили из жидкого азота в водяную баню с температурой 20°C или 45°C . При двухэтапном нагреве их помещали в чехол из пенопласта, где осуществлялся медленный нагрев ($8 \div 10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$)

до некоторой температуры ($-196^{\circ}\text{C} < t < 0^{\circ}\text{C}$), после чего образцы помещали в водяную баню для окончательного размораживания. В зависимости от поставленной задачи объем эритроэвеси составлял 2 или 30 мл. Изменение температуры во времени в определенных точках образца в процессе охлаждения — нагрева измеряли термометром сопротивления ТСУ-1 и регистрировали самописцем «Эндим 622.01». Разность температур между различными слоями образца находили из полученных зависимостей $t = f(T)$.

Для установления корреляции между характером кристаллообразования и степенью повреждения эритроцитов исследовали изменения физического состояния и фазовые превращения в использованных нами криозащитных средах, водных растворах 1,2-ПД и глицерина, методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) [3, 4]. Образцы охлаждали со скоростью $200^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Термограммы, снятые при нагреве со скоростью

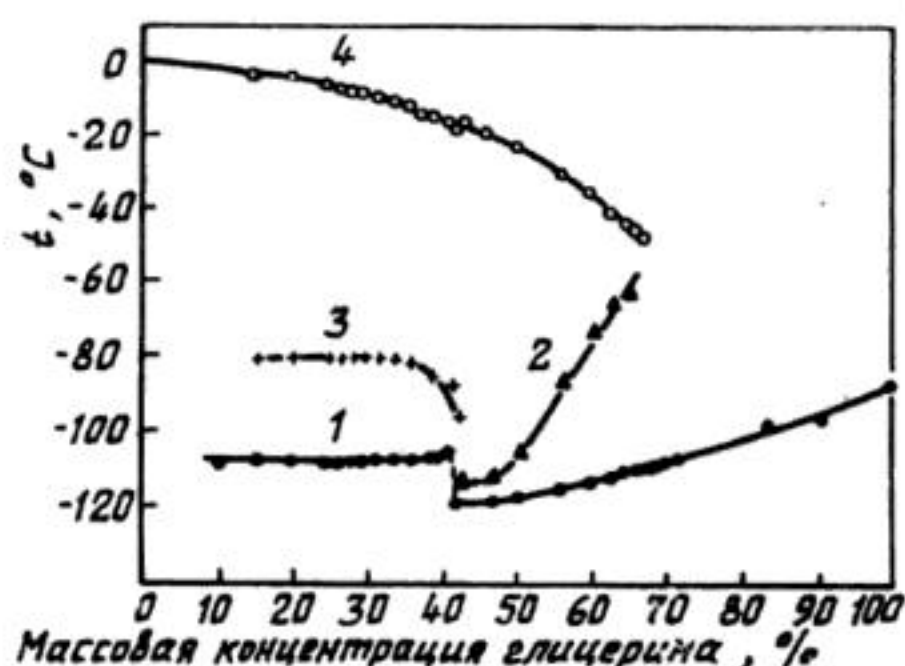
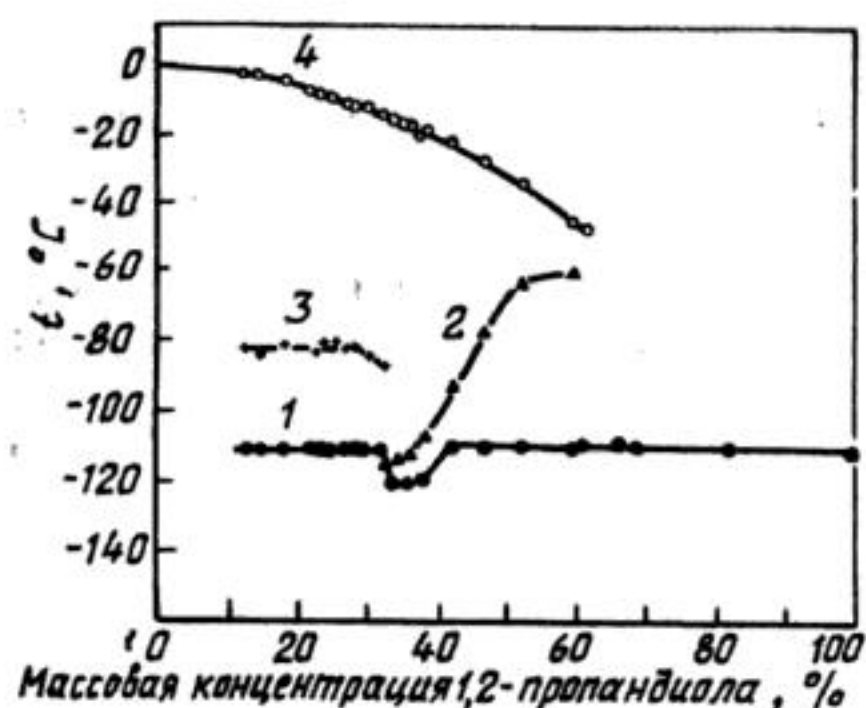


Рис. 1. Диаграмма физических состояний системы вода — 1,2-ПД (пояснения в тексте)

Рис. 2. Диаграмма физических состояний системы вода—глицерин (пояснения в тексте)

$0,4^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, использовали для построения диаграмм физического состояния. Вклад повреждающего действия механических напряжений на клетки оценивали по их сохранности после размораживания в зависимости от скорости нагрева в интервале от -196°C до температуры расстеклования (t_g). Степень повреждения клеток после размораживания оценивали фотоколориметрическим методом по выходу гемоглобина в надосажок.

Полученные нами на основании исследований методом ДСК диаграммы физических состояний для систем вода—1,2-ПД и вода—глицерин представлены на рис. 1 и рис. 2. Анализ линий и полей подобных диаграмм проведен нами ранее [3, 4]. Из диаграмм видно, что в области температур $-196 \div -120^{\circ}\text{C}$ во всем диапазоне концентраций отсутствуют процессы, связанные с тепловыми эффектами, отвечающими фазовым превращениям в системе. Аналогичная картина наблюдается в суспензиях эритроцитов с добавками 1,2-ПД и глицерина. При повышении температуры в растворах происходит ряд превращений, температуры которых отмечены соответствующими линиями на диаграмме. Линия 1 соответствует расстеклованию аморфных включений в системе, линия 2 — кристаллизации льда из аморфной фазы при нагреве, линия 3 — завершению кристаллизации льда на этапе нагрева, линия 4 — плавлению раствора.

Растворы 1,2-ПД с концентрациями менее 32 % после охлаждения со скоростью $200^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ ниже линии 1 представляют собой смесь кристаллов льда и стеклообразных включений остаточного раствора. Образцы, содержащие 1,2-ПД более 32 %, при охлаждении полностью стеклуются. Выше линии 1 после расстеклования в системах появляется переохлажденная жидкость. При дальнейшем повышении температуры в зависимости от концентрации исходного раствора происходит завершение кристаллиза-

ции льда (линия 3) или кристаллизация из аморфной фазы (линия 2). Таким образом, выше линий 2 и 3 система расслаивается на кристаллическую фазу и переохлажденный раствор, состав которого близок к эвтектическому. При температурах выше $-50 \div -40^\circ\text{C}$ в системах вода — 1,2-ПД и вода — глицерин, как показали рентгенографические исследования [3], наблюдается рекристаллизация льда.

Система вода — глицерин в отличие от системы вода — 1,2-ПД полностью переходит в стеклообразное состояние при более высоком содержании глицерина — 42 %. Объясняется этот факт, вероятно, меньшей стабильностью водных растворов глицерина в стеклообразном состоянии. Наблюдается монотонный рост температуры стеклования [4] в зависимости от

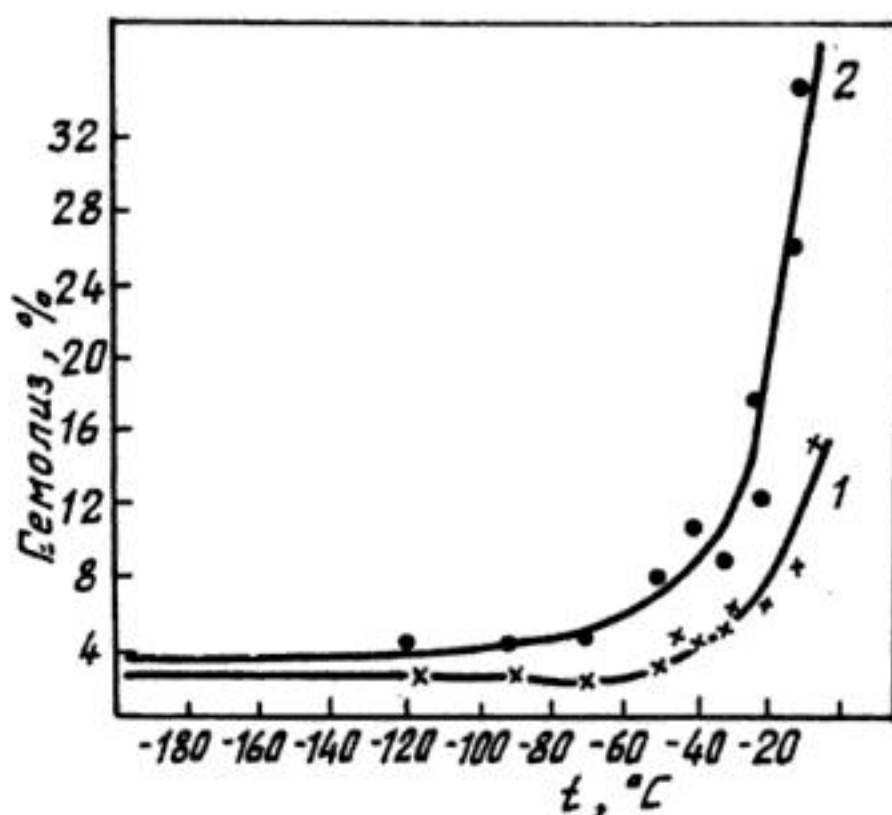
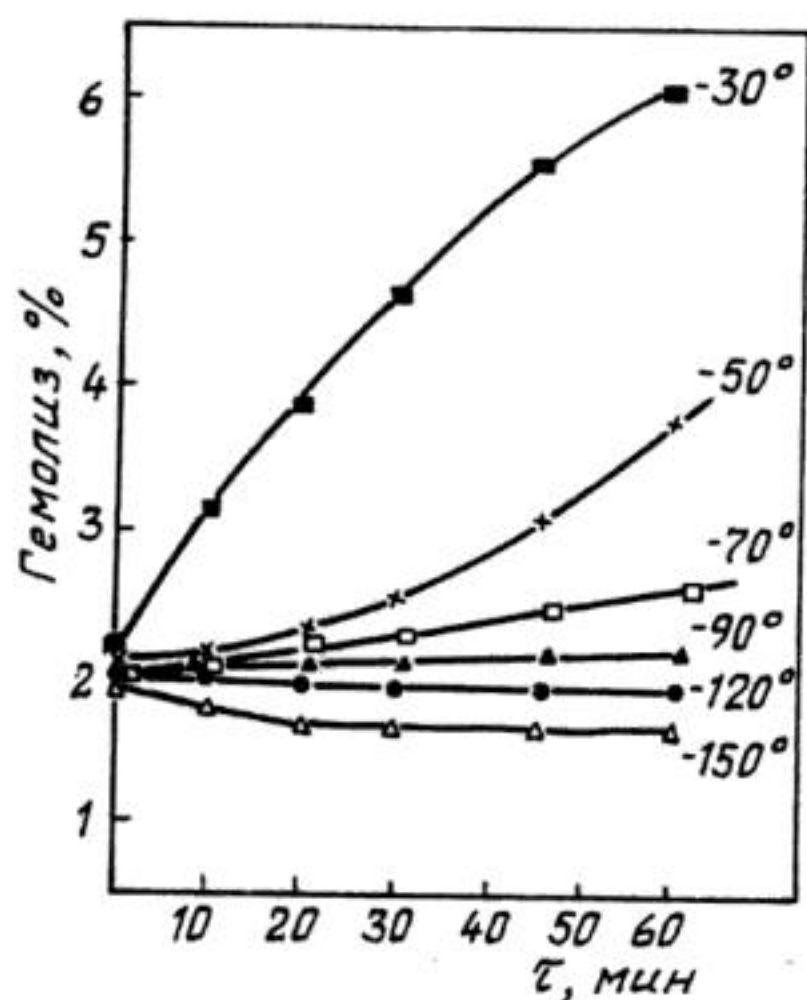


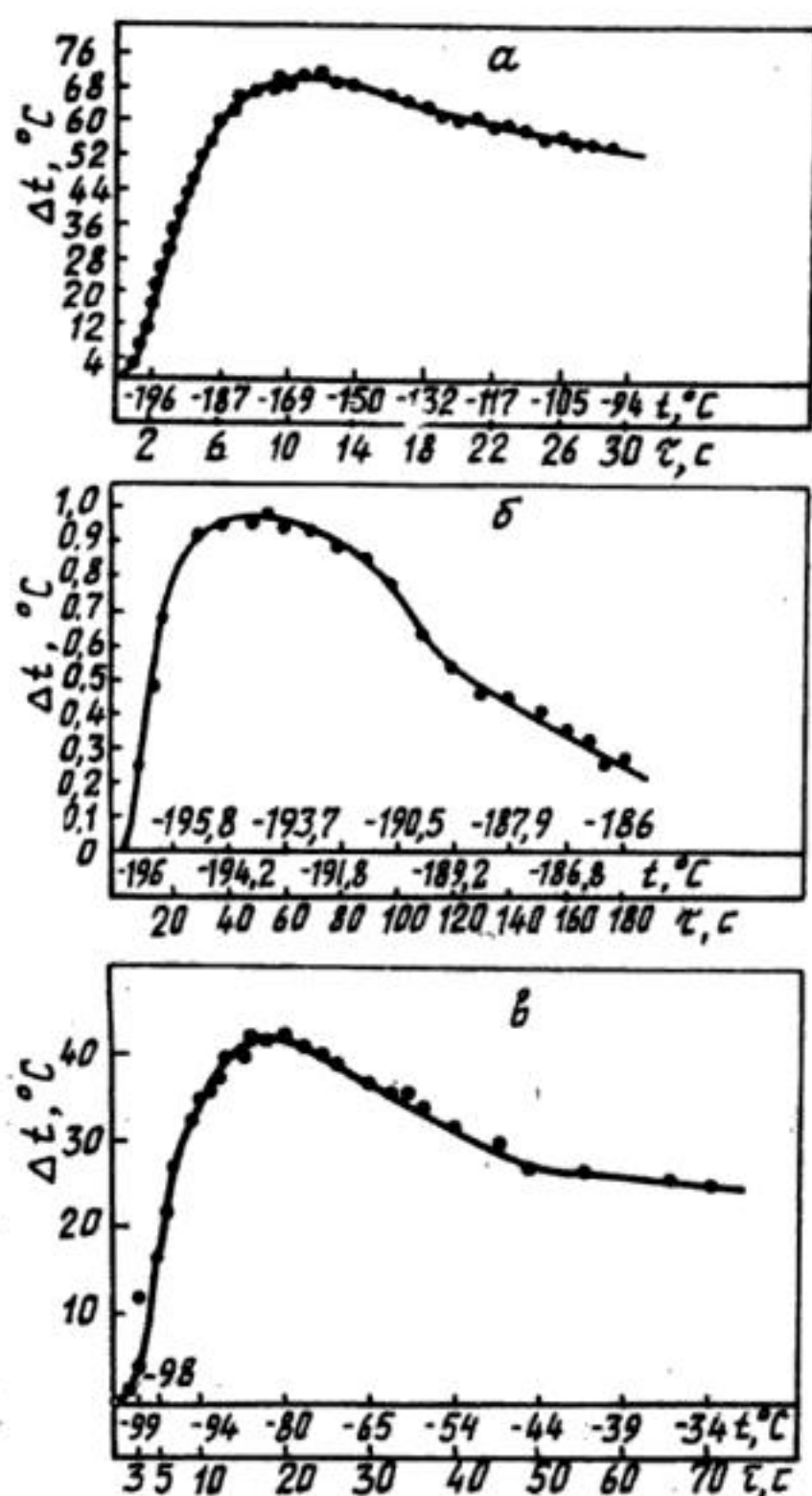
Рис. 3. Зависимость гемолиза эритроцитов от времени выдержки при температуре предварительного нагрева. Значения температур указаны цифрами на кривых

Рис. 4. Влияние криозащитной среды (1 — 1,2-ПД; 2 — глицерин) и медленного нагрева ($1^\circ\text{C}/\text{мин}$) до различных температур на гемолиз эритроцитов

концентрации глицерина, в то время как для системы вода — 1,2-ПД за исключением особенности в диапазоне концентраций 32—42 %, она постоянна. В литературе нет пока убедительного объяснения этого факта.

Согласно существующим представлениям, к повреждающим факторам относят концентрирование внеклеточного раствора в результате кристаллизации льда, механические повреждения клеток растущим льдом, рекристаллизацию и др. Их температурные зоны действия можно оценить из анализа диаграмм физических состояний. Выше линии 1 в концентрированной переохлажденной жидкости возникают молекулярные движения, в результате чего возможны химические реакции. При повышении температуры происходит дальнейший рост кристаллов льда, зародившихся на этапе охлаждения, что может способствовать развитию дегидратации клеток. Дальнейший нагрев приводит к развитию процессов рекристаллизации в системе и ее плавлению. Таким образом, в процессе нагрева клетки подвергаются воздействию указанных факторов. Для подтверждения их повреждающего действия на клетки образцы, замороженные до -196°C по описанной выше методике под защитой криоконсерванта, содержащего 35 % 1,2-ПД, 3 % сахарозы и 0,6 % NaCl, переносили из жидкого азота в предварительно охлажденную до различных температур спиртовую баню. Средняя скорость нагрева при этом составляла около $5^\circ\text{C}/\text{с}$. Образцы выдерживали при этих температурах от 10 до 60 мин (рис. 3). После экспозиции при температуре предварительного нагрева, образцы размораживали погружением в водяную баню (45°C). Из рис. 3 видно, что при нагреве до -120°C гемолиз не зависит от

времени выдержки при этой температуре. С ростом температуры предварительного нагрева и времени экспозиции гемолиз эритроцитов возрастает. Следовательно, медленный нагрев образцов выше $-100 \div -90^\circ\text{C}$ будет приводить к росту повреждения клеток в результате более длительного воздействия на них перечисленных выше повреждающих факторов. При этом степень повреждения зависит от использованного криоконсерванта. Для эритроцитов, криоконсервированных под защитой глицерина, повреждающее действие с ростом температуры предварительного нагрева выражено в большей степени, что, по-видимому, обусловлено меньшей стабильностью аморфной фазы консерванта (рис. 4).



При температуре ниже t_g клетки находятся в окружении аморфной среды или смеси аморфной фазы и мелкокристаллического льда, не подвергаясь воздействию кристаллообразования вплоть до -196°C . Как показывает термографический анализ, после переноса суспензии клеток из жидкого азота в водяную баню (45°C) разность температур (Δt°) между центральным и периферическим слоями цилиндрического образца в течение первых 10 с возрастает до 70°C . В последующие 3 с разность температур сохраняется и при дальнейшем нагреве медленно убывает (рис. 5, а). При нагреве пристеночного слоя до 0°C температура центрального слоя дости-

Рис. 5. Влияние режима размораживания на разность температур между центральным и периферическими слоями. Эритроцитарный объем 30 мл помещали в цилиндрический сосуд диаметром 22 мм с толщиной стенок 1 мм. Температура в центре образца — по оси абсцисс. а — перенос образца из жидкого азота в водяную баню при 45°C ; б — медленный нагрев образца в чехле из пенопласта; в — перенос образца из -100°C в водяную баню при 45°C

гает только -23°C . Таким образом, на протяжении всего периода размораживания сохраняется градиент температур между внешними и внутренними слоями материала. Неравномерное тепловое расширение этих слоев порождает термоупругие напряжения в объеме образца. Релаксация этих напряжений сопровождается образованием микротрещин в замороженном материале [5]. Возникшие напряжения действуют, естественно, и на клетки, что приводит к их повреждению.

Устранить повреждающее действие механических факторов можно путем медленного нагрева образца. При размораживании образцов со скоростью $3^\circ\text{C}/\text{мин}$ (рис. 5, б) максимальная разность температур в образце достигает не более 1°C , что, вероятно, не приводит к появлению значительных термоупругих напряжений в твердой матрице и не вызывает повреждения клеток.

Показать вклад термоупругих напряжений в повреждение клеток можно, если сравнить гемолиз размороженных эритроцитов после быстрого и медленного нагрева их в диапазоне температур $-196 \div -100^\circ\text{C}$, где, как указано выше, исключаются другие повреждающие факторы (рис. 1, 2). В таблице представлены времена нагрева образца от -196°C до различных температур при одноэтапном размораживании (перенос из жидкого азота

в водяную баню при 20 °С) и двухэтапном (медленный нагрев от —196 до —100 °С, затем перенос в водяную баню при 20 °С). Как следует из таблицы, времена нагрева от —196 до —100 °С при одноэтапном размораживании в десятки раз меньше, чем при двухэтапном. Однако нагрев от —100 °С до более высоких температур в обоих случаях осуществляется в водяной бане и, как видно из таблицы, времена нагрева близки, то есть режимы размораживания от —100 до 0 °С совпадают при одно- и двухэтапном размораживании. Совпадение режимов обусловлено тем, что в этом интервале происходит плавление одной и той же массы льда. Теплоприток идет в основном на плавление льда, поскольку в отличие от его теплоемкости (0,47 кал/°С) теплота плавления равна 80 кал/г. Поэтому имеющийся дисбаланс в теплосодержании образца при —100 °С в случаях одно- и двухэтапного размораживания не оказывает существенного влияния на времена размораживания от —100 °С.

Ранее [2] показано, что гемолиз эритроцитов при двухэтапном размораживании уменьшается в сравнении с одноэтапным в 1,5—2 раза. Следовательно, можно предположить, что повышенный гемолиз эритроцитов в случае одноэтапного размораживания обусловлен повреждающим действием термоупругих напряжений на клетки, возникающих в образце при быстром нагреве в интервале температур —196 ÷ —100 °С.

Таким образом, режим двухэтапного размораживания можно считать более совершенным, однако и он не является оптимальным. Как показано на рис. 5, в, после перенесения образца из —100 °С в водяную баню, разность температур между центральным и периферическим слоями достигает 42 °С, что также приводит к определенным механическим воздействиям на клетки на втором этапе размораживания. Для смягчения их повреждающего действия целесообразно использовать криоконсерванты, в которых фазовые превращения и рекристаллизация протекают при более высоких температурах. Это позволит повысить температуру нагрева на первом этапе размораживания и, таким образом, уменьшить воздействие механических напряжений на клетки и сузить интервал температур, в котором проявляется повреждающее действие роста кристаллов льда.

Времена нагрева образца от —196 °С до —100 °С и от —100 °С до промежуточных температур при одноэтапном и двухэтапном размораживании

Нагрев, °С		Время нагрева, с	
От	До	Одноэтапное размораживание	Двухэтапное размораживание
—196	—100	23	680
—100	—80	10	12
—100	—60	25	28
—100	—40	55	60
—100	—20	170	177
—100	—10	328	335
—100	—5	337	341
—100	0	347	355

1. Аграненко В. А., Федорова Л. И. Замороженная кровь и ее клиническое применение. — М. : Медицина, 1983. — 96 с.
2. Воротилин А. М. Замораживание клеток крови до —196 °С под защитой низкомолекулярных гликолей и глицерина. Повышение эффективности криоконсервации // Криобиология. — 1984. — № 3. — С. 15—20.
3. Зинченко А. В., Манк В. В., Моисеев В. А. и др. О фазовых переходах и физических состояниях систем вода — пропандиол // Докл. АН СССР. — 1983. — 269, № 1. — С. 144—146.
4. Зинченко А. В., Манк В. В., Овчаренко Ф. Д. и др. Строение и фазовые состояния водно-глицериновых растворов // Докл. АН УССР, сер. Б. — 1982. — № 8. — С. 38—42.
5. Коваленко А. Д. Термоупругость. — К. : Высшая школа, 1975. — 265 с.

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

Поступила 07.07.86

А. Г. Моисеенок, С. Н. Омелянич, Л. Я. Утно,
В. А. Гуринович, Т. И. Хомич

СТРУКТУРА ФОНДА КОФЕРМЕНТА А (КоА) И СОДЕРЖАНИЕ АЦЕТИЛ-КоА В ПЕЧЕНИ ЖИВОТНЫХ ПРИ ГЛУБОКОЙ ГИПОТЕРМИИ

В ранних исследованиях, относящихся к рассматриваемому вопросу, было обращено внимание на резкое снижение устойчивости лабораторных животных к переохлаждению в условиях дефицита витаминного предшественника КоА — пантотеновой кислоты. Позже обнаружено увеличение содержания КоА в печени при переохлаждении животных, что хорошо соответствовало концепции предпочтительного окисления жирных кислот и аминокислот посредством метаболизма их в ацетил-КоА [3, 5, 6] в условиях гипотермии. Предполагалось, что расход этого важнейшего метаболита осуществляется на энергетические потребности клетки, поскольку, например, альтернативные реакции *N*-ацетилирования в условиях гипотермии оказались резко сниженными [6]. В настоящей работе исследовали характер изменений отдельных компонентов фонда КоА и их соотношения в условиях гипотермии.

Работа проводилась на 34 крысах-самцах линии Вистар массой 200—220 г. Животные под морфинно-тиопенталовым наркозом охлаждались со скоростью 0,60—0,67 °С/мин до температуры (20 ± 2) °С с последующим выдерживанием в этих условиях 30 или 60 мин. В первой серии опытов части животным за 24 ч перед охлаждением (30 мин) вводили внутримышечно предшественник биосинтеза КоА-4'-фосфопантотенат кальция в дозе 50 мг/кг массы. Другой эксперимент предусматривал изучение биосинтеза КоА в печени при гипотермии. Схема опыта: I группа — контрольные наркотизированные крысы, которым вводили изотоп ^{14}C -пантотената в дозе 0,013 ммоль/кг с удельной активностью 7,70 мКи/ммоль внутрибрюшинно за 30 мин до забоя; II группа — крысы, подвергнутые глубокой гипотермии в течение 30 мин, изотоп вводили за 30 мин до забоя; III группа — гипотермия 60 мин + изотоп за 30 мин до забоя.

В печени крыс определяли ферментативным методом содержание КоА [4], отдельные фракции КоА, уровень общей радиоактивности и удельную радиоактивность фракций КоА, активности ацетил-КоА-синтетазы (К.Ф.6.2.1.1), пантотенаткиназы (К.Ф.7.1.33) и *N*-ацетилтрансферазы (К.Ф.2.3.1.5.) по принятым в настоящее время методикам. Суммарный уровень КоА и предшественников его биосинтеза анализировали в системе ацетилирования ПАБК. В этом методе, как и при определении активности *N*-ацетилтрансферазы, остаточной неацетилированный субстрат измеряли реакцией с парадиметиламинобензальдегидом [4]. Радиоактивность образцов определяли в супернатанте гомогенатов или хроматографических фракциях на жидкостном сцинтилляционном счетчике «МАРК-2» (США). Результаты обработаны статистически.

Содержание общего КоА в печени при глубокой гипотермии продолжительностью 30 мин достоверно уменьшалось (табл. 1). Однако этот эффект оказался результирующим разнонаправленных изменений отдельных фракций КоА. Так, при уменьшении кислоторастворимого КоА увеличивался уровень ДЦ-КоА. Несмотря на заметное уменьшение фракции свободного КоА и суммарного уровня короткоцепочечных ацил-КоА, более чем в 2 раза увеличилось содержание ацетил-КоА в ткани печени животных, подвергнутых глубокой гипотермии. В результате отмеченных перестроек компонентов фонда КоА существенно изменились соотношения ацетил-КоА/общий КоА и ДЦ-КоА/общий КоА. В частности, первый увеличился с 0,12 до 0,29, а последний с 0,19 у контрольных животных до 0,26 у подвергнутых гипотермии. Практически полная нормализация содержания отдельных

Таблица 1

Изменение содержания фракций КоА и активности ферментов метаболизма ацетил-КоА в печени животных при гипотермии

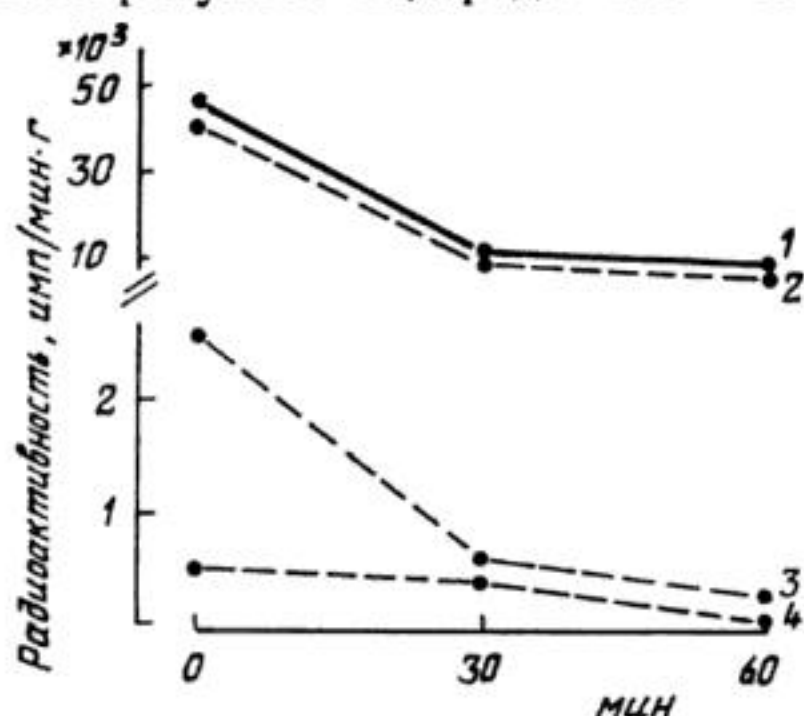
Параметр	Контроль	Гипотермия	Гипотермия + фосфопан- тотенат
Общий КоА, нмоль/г	307±8	273±9*	297±11
Общий кислоторастворимый КоА, нмоль/г	248±19	201±12*	235±16
ДЦ-КоА, нмоль/г	58±7	72±4	61±6
КоА — SH + ФЭ — КоА, нмоль/г	172±12	135±9*	156±15
Ацетил-КоА, нмоль/г	36±3	78±6*	53±6**
Сумма КоА, дефосфо-КоА и 4'-фосфопантотеина, нмоль/г	701±19	670±14	520±33*
Ацетил-КоА-синтетаза, нмоль ацетил-КоА · мин ⁻¹ · мг ⁻¹ белка	4,90 ± 0,44	8,68 ± 0,39*	6,47 ± 0,48**
N-ацетилтрансфераза, нмоль ацетил-КоА · ч ⁻¹ · мг ⁻¹ белка	0,12 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,12 ± 0,01

Примечание. * Достоверно ($P < 0,05$) относительно контроля; ** достоверно ($P < 0,05$) относительно показателя группы животных с гипотермией; ФЭ — КоА — короткоцепочечные ацил-КоА, реагирующие с фосфотра сацетил-азой.

фракций КоА и в меньшей мере их соотношения наблюдалась при введении 4'-фосфопантотеновой кислоты. Как следует из результатов, представленных в табл. 1, в условиях гипотермии имеет место резкое увеличение активности ацетил-КоА-синтетазы печеночной ткани, тогда как активность важнейшего фермента утилизации ацетил-КоА в N-ацетилтрансферазных реакциях сохраняется постоянной. Профилактическое введение фосфопантотената частично стабилизирует ацетил-КоА-синтетазную активность. Изменение активности последнего фермента происходит на фоне противоположных изменений суммарного уровня кофакторов ацетилирования (КоА + дефосфо-КоА + 4'-фосфопантотеин), однако, весьма схожих с соотношением содержания ацетил-КоА в печени подопытных животных.

Отмеченные выше изменения структуры фонда КоА происходили на фоне значительного снижения транспорта в гепатоциты витаминного предшественника КоА — пантотеновой кислоты. Как явствует из результатов второго эксперимента, отмечено достоверное ($p < 0,05$) прогрессивное снижение депонирования радионуклида витамина в печени, почках, сердце, легких, селезенке, скелетных мышцах, причем степень уменьшения общей радиоактивности была особенно заметной в ткани печени (контроль — 42300 ± 1450 , гипотермия 30 и 60 мин — 12000 ± 1170 и 9350 ± 3098 имп/мин · г ткани соответственно).

На рисунке показаны результаты исследования биотрансформации радиоактивного пантотената в печени у контрольных и опытных животных. Основная масса радионуклида была представлена во фракции неизменного витамина и лишь его незначительная часть определялась во фракциях фосфо-



Уровень общей радиоактивности (1) фракций пантотеновой кислоты (2), фосфопантотеина и фосфопантотената (3), КоА (4) после хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе водного экстракта печени крыс, получивших ¹⁴C-пантотенат натрия за 30 мин до декапитации и подвергнутых гипотермии. По оси абсцисс — продолжительность гипотермии

рилированных производных (фосфопантотената и фосфопантетеина) и КоА. Уровень радиоактивности последних фракций снижался соответственно продолжительности действия охлаждения.

В табл. 2 приведены данные расчета удельной радиоактивности двух основных фракций, содержащих меченый пантотенат и характеризующих процесс биотрансформации его. Результаты свидетельствуют о снижении использования радиоактивного пантотената в реакциях биосинтеза КоА более чем в 5 раз под влиянием глубокой гипотермии. Исследование активности пантотенаткиназы цитозоля печени обнаружило снижение ее через 30 мин гипотермии.

Таблица 2

Удельная радиоактивность фракций предшественников КоА и КоА ($\text{имп} \times \text{мин}^{-1} \cdot \text{нмоль}^{-1}$) печени, активность пантотенаткиназы ($\text{нмоль/мг белка} \times \text{ч}$) в цитозоле печени крыс, подвергнутых гипотермии

Группа животных	Фракция метаболитов (предшественников КоА)	Фракция КоА	Пантотенаткиназа
Контроль	$3,95 \pm 1,2$	$0,85 \pm 0,2$	$3,36 \pm 0,20$
^{14}C -ПАН 30 мин + гипотермия 30 мин	$1,5 \pm 0,5$	$0,9 \pm 0,5$	$2,13 \pm 0,40^*$
^{14}C -ПАН 30 мин + гипотермия 60 мин	$0,5 \pm 0,25^{**}$	$0,11 \pm 0,05^*$	$2,49 \pm 0,40$

Примечание. * Достоверно ($P < 0,05$) относительно контроля; ** достоверно ($P < 0,05$) относительно показателя группы животных с гипотермией.

Обращает на себя внимание резкое увеличение содержания ацетил-КоА в печени животных, подвергнутых гипотермии. Увеличение уровня этого важнейшего метаболита межугочного обмена, по всей вероятности, является следствием не только состояния предпочтительного окисления жирных кислот, характерного для гипотермии [3, 6], но и увеличения его биосинтеза в ацетил-КоА-синтетазной реакции (табл. 1). Подобно тому, как это показано в ранних исследованиях [6], увеличение использования ацетил-КоА в реакциях N-ацетилирования не наблюдается. Можно полагать, что это является следствием строгой компартментализации фонда ацетил-КоА в окислительных реакциях метаболизма, сопряженных с поддержанием температуры гомеостаза [1, 3, 6]. Следует также иметь в виду, что суммарный уровень кофакторов N-ацетилтрансферазных реакций (КоА, дефосфо-КоА, 4'-фосфопантетеин) снижается при гипотермии на 26 % (табл. 1), что может иметь определяющее значение для характерного при гипотермии снижения интенсивности этих реакций *in vivo* [6].

Снижение уровня общего КоА и основных фракций кофермента является следствием, вероятно, двух основных причин: уменьшения транспорта витаминного предшественника в органы и одновременного снижения процесса его биотрансформации ферментативной системой биосинтеза КоА. Однако необходимо заметить, что снижение уровня депонирования радиоактивного пантотената в печени не соответствовало характеру изменений активности пантотенаткиназы, но достаточно удовлетворительно отражало степень биотрансформации радионуклида до предшественников КоА и КоА (табл. 2.). Можно полагать, что в условиях гипотермии пантотенаткиназная реакция не является лимитирующей скоростью в биосинтезе КоА.

Полученные результаты позволяют констатировать существование двух характерных проявлений перестройки системы метаболизма КоА, имеющих место в печени при глубокой гипотермии. Речь идет об изменении соотношения фракций КоА с относительным увеличением фракции кислото-растворимого КоА (в особенности ацетил-КоА) при гипотермии. Расчетные

данные показывают, что изменения структуры фонда КоА в условиях гипотермии приводят к соотношению основных регуляторных величин (ацетил-КоА/КоА, ДЦ-КоА/КоА), благоприятных для функционирования ферментов утилизации свободных жирных кислот, интенсивно поступающих вследствие липолиза [2] и последующего окисления ацил-КоА [4]. С другой стороны, имеет место снижение процесса биосинтеза КоА, несомненно ограничивающее адаптивные процессы в гепатоцитах. Как показано настоящим исследованием, однократным профилактическим введением предшественника КоА могут быть в значительной степени устранены изменения структуры фонда КоА в печени, характерные для гипотермии.

Таким образом, глубокая гипотермия приводит к уменьшению содержания основных фракций и суммарного уровня кофермента А с одновременным увеличением количества длинноцепочечных ацилов КоА и ацетил-КоА в печени крыс. В условиях гипотермии снижается как накопление пантотеновой кислоты в тканях крыс, так и биотрансформация витаминного предшественника КоА ферментативной системой его биосинтеза.

1. Биохимические процессы в миокарде при нарушениях кровообращения / Под ред. В. А. Корзан.— Рига : Изд-во Рижского мед. ин-та, 1986.— 86 с.
2. Гурин В. Н. Обмен липидов при гипотермии, гипертермии и лихорадке.— Минск : Беларусь, 1986.— 190 с.
3. Исаакян Л. А. Метаболическая структура температурных адаптаций.— Л. : Наука, 1972.— 135 с.
4. Моисеенок А. Г. Пантотеновая кислота (биохимия и применение витамина).— Минск : Наука и техника, 1980.— 264 с.
5. Семенюк А. В. Активность микросомальных монооксигеназ и интенсивность перекисного окисления липидов печени в условиях действия холодового фактора на организм человека и животных : Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— Томск, 1984.— 22 с.
6. Campbell J., Green G. R., Socol H. Effects of exposure to cold on acetylation in the rat // Canad. J. Biochem. Physiol.— 1960.— 38, N 2.— P. 115—124, 171—174.

Ин-т биохимии АН БССР, г. Гродно,
Рижский мед. ин-т МЗ Латв. ССР

Поступила 21.07.87

УДК 57.043.612.43

**А. М. Утевский, В. А. Чуйко, Л. Г. Карпенко,
В. А. Щирова, О. С. Таргони**

ВЛИЯНИЕ ДИМЕКСИДА НА ВКЛЮЧЕНИЕ ¹⁴С-АМИНОКИСЛОТ В БЕЛКИ И АКТИВНОСТЬ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ В ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЕ, ЗАМОРОЖЕННОЙ БЕЗ КРИОПРОТЕКТОРА

Замораживание ткани щитовидной железы до температуры —196 °С сопровождается изменением в ней активности ряда биохимических процессов [1]. Разнонаправленный характер этих изменений затрудняет определение причин, лежащих в их основе, оценку жизнеспособности тиреоидной паренхимы и не позволяет объективно определить пригодность ее к трансплантации.

Для выяснения возможного механизма повреждающего действия замораживания и обратимости происходящих при этом изменений нами были проведены эксперименты с применением димексида. При этом мы полагали, что указанное соединение в силу своей способности влиять на структурные характеристики макромолекул, характер распределения внутримембранных частиц, вязкость, барьерно-транспортные функции мембраны, ферменты [2, 3] позволит определить локализацию криоповреждений и наметить пути их устранения.

Было исследовано влияние димексида на активность включения ^{14}C -аминокислот в суммарные белки, которая после замораживания щитовидной железы без криопротектора существенно снижалась, и активность аденилатциклазы, которая при этом возрастала [1].

Фрагменты тиреоидной паренхимы быка замораживали в специальном устройстве путем быстрого погружения в жидкий азот. Оттаивание образцов ткани производилось на водяной бане при 37°C . Размороженные образцы инкубировались в растворах димексида в течение 30 мин.

При исследовании включения ^{14}C -аминокислот в суммарные белки срезы тиреоидной паренхимы толщиной 1—1,5 мм и массой 10 мг инкубировали в фосфатном буфере Кребс — Рингера ($\text{pH } 7,4$), содержащем 0,185 МБк

Влияние 0,5 и 10 %-ного димексида на включение ^{14}C -аминокислот в белки щитовидной железы (имп/мин/мг белка), замороженной без криопротектора

№ п/п	Условия эксперимента	Включение ^{14}C -аминокислот в белки
1	Интактная тиреоидная паренхима (контроль)	$0,037 \pm 0,004$
2	Замораживание срезов щитовидной железы без криопротектора ($85\text{—}100^\circ\text{C}/\text{мин}$) до -196°C	$0,014 \pm 0,002^*$
3	Добавление 0,5 %-ного димексида к замороженной без криопротектора тиреоидной паренхиме	$0,042 \pm 0,004^{**}$
4	Добавление 10 %-ного димексида к замороженной без криопротектора тиреоидной паренхиме	$0,039 \pm 0,006^{**}$

* Достоверно по отношению к контролю; ** достоверно по отношению к п. 2.

ной без криопротектора со скоростью $85\text{—}100^\circ\text{C}/\text{мин}$, приведены в таблице, из которой следует, что замораживание вызывает достоверное снижение активности исследуемого процесса. После добавления димексида в концентрациях 0,5 и 10 % уровень включения ^{14}C -аминокислот восстанавливается до контрольного значения. Восстановление включения ^{14}C -аминокислот происходит, возможно, по двум различным механизмам. В случае использования физиологической концентрации димексида (0,5 %) имеет место специфическое влияние данного соединения на исследуемый процесс. Оно обусловлено взаимодействием димексида с молекулами функциональных элементов, участвующих в переносе аминокислот через мембрану тироцитов: мембранных АТФаз, белков рибосом, а также непосредственно с самими аминокислотами. Подобные эффекты димексида описаны для АТФаз других тканей [4]. В основе вызываемого 10 %-ным димексидом увеличения включения аминокислот в белки щитовидной железы, замороженной без криопротектора, по-видимому, лежит другой механизм. В указанной концентрации проявляются коллигативные свойства проникающих криопротекторов, обусловленные, прежде всего, их взаимодействием с водой и электролитами в клетках [2].

Замораживание щитовидной железы со скоростью $1\text{—}3^\circ\text{C}/\text{мин}$ увеличивает активность каталитической и регуляторной (фторидчувствительной) субъединиц аденилатциклазы (рис. 1), в то время как ТТГ-зависимая аденилатциклаза не изменяется под влиянием димексида (0,25—5 %) на замороженную без криопротектора щитовидную железу (рис. 2). Изменения в активности исследуемого фермента приобретают иной характер: базальная,

^{14}C , в течение 60 мин на водяной бане при 37°C . Для удаления адсорбированного на поверхности ткани изотопа срезы отмывали в физиологическом растворе. Ткань гомогенизировали. Гомогенат фильтровали через фильтры «Синпор» № 4. Измерение радиоактивности осадков производилось на β -счетчике «Бэкман» (модель LS 7800). Активность аденилатциклазы определяли в плазматических мембранах тироцитов по приросту содержания цАМФ после инкубации их в среде, содержащей АТФ-буфер. Количество цАМФ в пробах измеряли радиохимическим методом.

Данные о влиянии димексида на процесс включения ^{14}C -аминокислот в белки щитовидной железы, заморожен

стимулированная фторидом и ТТГ аденилатциклаза при этом уменьшается, а при использовании 10 %-ного димексида активность базальной и фторид-чувствительной аденилатциклазы увеличивается. Уменьшение базальной активности аденилатциклазы при использовании малых концентраций димексида, возможно, обусловлено способностью этого соединения замещать структурированную воду, входящую в состав белковых молекул, и модифицировать их липидное микроокружение [2], что приводит к изменению конформации молекулы каталитической субъединицы. Используемых концентраций димексида, возможно, недостаточно для восстановления функциональной активности аденилатциклазы, так как изменения, вызванные в ней замораживанием, могут включать в себя как структурные перестройки ин-

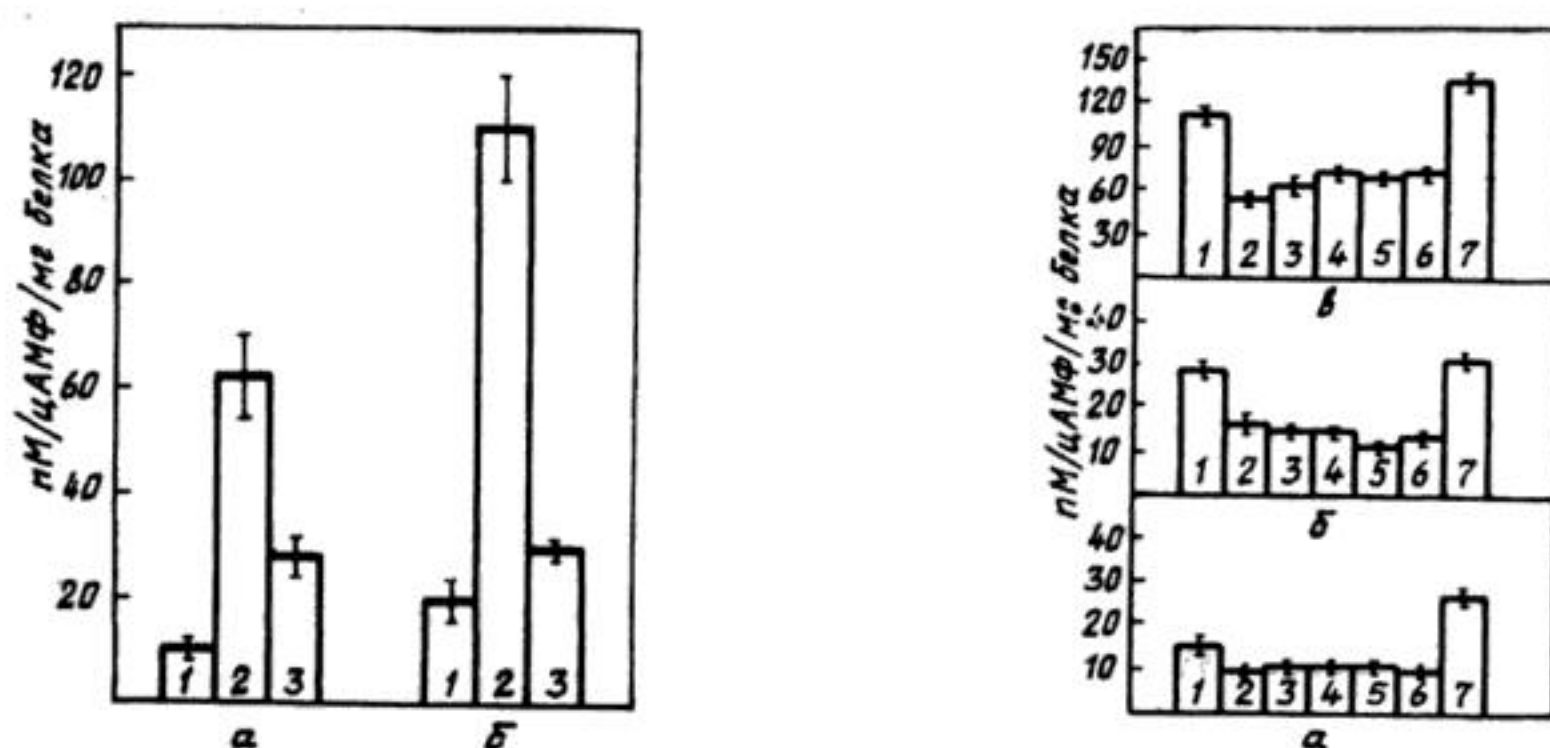


Рис. 1. Влияние замораживания (1—3 °C/мин) на активность аденилатциклазы в мембранах клеток щитовидной железы: а — интактная ткань; б — замораживание; 1 — базальная активность; 2 — 40 мМ NaF; 3 — 50 мЕ ТТГ

Рис. 2. Влияние димексида на активность аденилатциклазы в мембранах клеток щитовидной железы, замороженной без криопротектора со скоростью 1—3 °C/мин: а — базальная активность; б — ТТГ — 50 мЕ ТТГ; в — NaF — 40 мМ NaF; 1 — замораживание без криопротектора; с димексидом, %: 2 — 0,25; 3 — 0,5; 4 — 1,0; 5 — 2,5; 6 — 5,0; 7 — 10,0

тегральных белков, так и физико-химические изменения их микроокружения и мембраны в целом. В замороженной без криопротектора щитовидной железе димексид в концентрациях 0,25—5 % оказывает угнетающее действие на аденилатциклазу, стимулируемую фторидом. Этот факт свидетельствует о том, что замораживание и димексид вызывают структурные перестройки в молекуле регуляторной субъединицы, затрагивающие участки, ответственные за связывание ионов фтора. Снижение активности аденилатциклазы, стимулируемой ТТГ, в результате добавления димексида (0,25—5 %) к замороженной ткани свидетельствует о том, что действие данного соединения может реализоваться на этапе узнавания гормонов соответствующими рецепторами и образования гормон-рецепторного комплекса. В отличие от физиологических концентраций димексида добавление его в 10 %-ной концентрации приводит к восстановлению ТТГ-зависимой аденилатциклазы, увеличению фторидчувствительной и базальной активности.

Сопоставление результатов, полученных при исследовании действия димексида на активность аденилатциклазы и процесса включения ^{14}C -аминокислот в суммарные белки щитовидной железы, замороженной без криопротектора, позволяет заключить, что димексид как в физиологических концентрациях (0,5 %), так и в концентрации, используемой с криозащитной целью (10 %) оказывает стабилизирующее влияние на некоторые биохимические процессы, активность которых была нарушена при замораживании. Эти данные свидетельствуют об обратимости повреждений, вызываемых в щитовидной железе замораживанием, о молекулярно-клеточной природе этих

повреждений и об эффективности димексида как средства для их устранения.

1. Чуйко В. А., Утевский А. М. Биохимия криоконсервированной щитовидной железы. — Киев : Наук. думка. — 1985. — 213 с.
2. Szmant H. H. Physical properties of dimethyl sulfoxide and its function in biological systems // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1975. — 243, N 1. — P. 20—23.
3. Rammler D. H., Zaffaroni A. Biological implications of DMSO based on a review of its chemical properties // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1967. — 141, N 1. — P. 13—23.
4. The K., Hasselbach W. Stimulatory and inhibitory effects of dimethyl sulfoxide and ethylene glycol on ATPase activity and calcium transport of sarcoplasmic membranes // Eur. J. Biochem. — 1977. — 74, N 6. — P. 611—621.

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

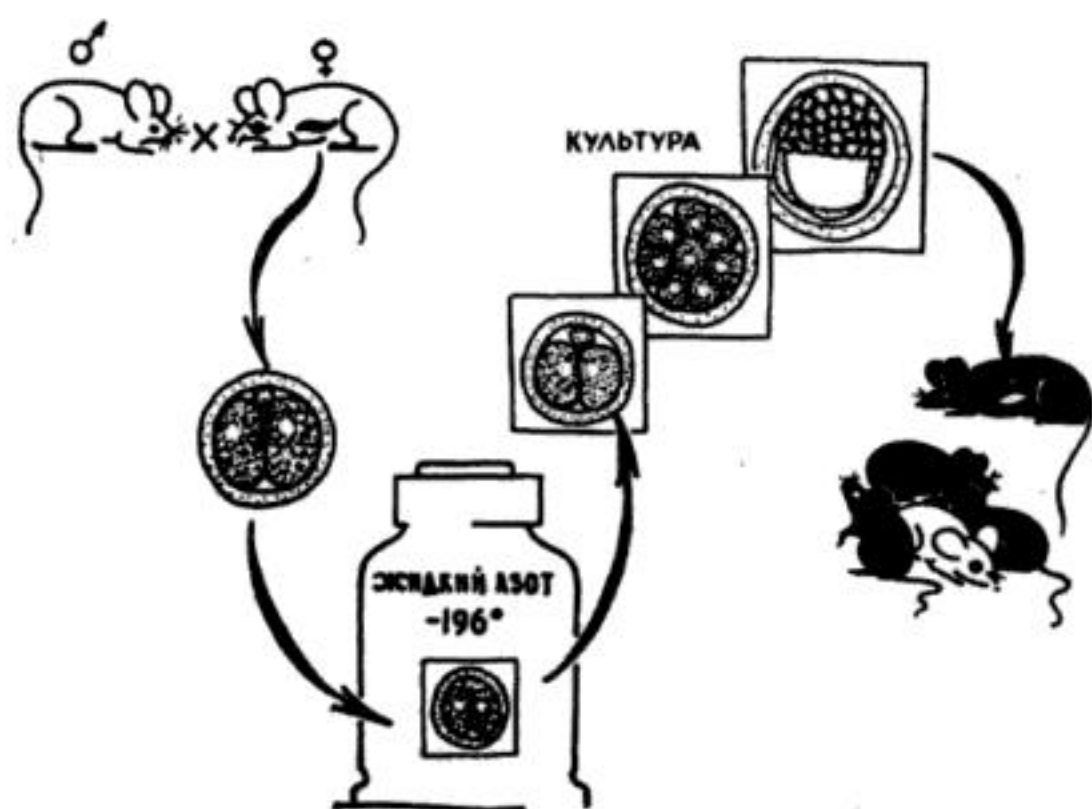
Поступила 15.12.86

УДК 57.043

Л. М. Межевикина, О. П. Березовская, Б. Н. Вепринцев

НИЗКОТЕМПЕРАТУРНАЯ КОНСЕРВАЦИЯ 2-КЛЕТОЧНЫХ ЭМБРИОНОВ МЫШЕЙ В СРЕДЕ ВИТТЕНА С ДОБАВЛЕНИЕМ ОРГАНИЧЕСКОГО БУФЕРА *HEPES*

Успехи современной биологии и техники глубокого замораживания ранних эмбрионов лабораторных мышей делают задачу длительного сохра-



Основные этапы низкотемпературной консервации доимплантационных эмбрионов лабораторных мышей

нения генетически чистых линий путем низкотемпературного замораживания реально разрешимой. Основные этапы криоконсервации: получение эмбрионов от самок-доноров, замораживание, хранение при температуре жидкого азота, размораживание и оценка жизнеспособности, трансплантация жизнеспособных эмбрионов «приемным» матерям с целью получения полноценного потомства показаны на рисунке.

Для всех перечисленных процедур, за исключением культивирования, ис-

пользуют среды с фосфатным буфером, не токсичные для клеток и поддерживающие pH 7,2—7,4 при равновесии с воздухом. Однако в среде только с фосфатным буфером эмбрионы мышей проходят 1—2 деления дробления. Для нормального развития эмбрионов обязательно присутствие буферной системы бикарбонат — CO_2 [5]. Основное назначение бикарбоната в среде состоит в поддержании внутриклеточной концентрации этого иона, необходимого для нормального метаболизма. Недостаток или отсутствие бикарбоната в среде нарушает развитие эмбрионов *in vitro* [3, 4].

Ранее нами было показано, что введение в состав культуральной среды Виттена органического буфера *HEPES* в соотношении с бикарбонатом 1 : 1 стабилизирует pH и не препятствует нормальному развитию 2-клеточных эмбрионов мышей до стадии бластоцисты [1]. Такая среда пригодна для

различных манипуляций с эмбрионами на открытом воздухе, так как в ней не происходит сдвига pH ; что имеет место при работе с бикарбонатным буфером.

Целью настоящей работы была оценка возможности использования культуральной среды Виттена, содержащей бикарбонат и *HEPES*, для криоконсервации эмбрионов мыши. Выживаемость после замораживания — отогрева определяли на каждом этапе эмбрионального развития: доимплантационном, имплантационном, постимплантационном.

Использовали гибридных мышей F_1 , полученных от скрещивания ♀ *CBA* с ♂ $C_{57}Bl/6$. Эмбрионы на стадии 2 бластомеров вымывали из яйцеводов беременных самок на второй день после обнаружения влагалищной пробки. Бластоцисты получали от самок на четвертый день беременности.

Для вымывания эмбрионов из половых путей доноров использовали среду Дальбекко с фосфатным буфером [6] и среду Виттена с бикарбонатным и органическим буфером *HEPES* [1].

Для замораживания и трансплантации применяли те же среды, что и для выделения. В качестве криопротектора добавляли 1,5 М ДМСО («Серва»). Эквивалицию эмбрионов с ДМСО проводили при комнатной температуре в течение 15 мин, затем переносили на $-6^\circ C$ и через 2—3 мин инициировали кристаллизацию льда в растворе. Эмбрионы замораживали в пластиковых трубочках в 0,05 мл среды с криопротектором. До $-40^\circ C$ образцы замораживали со скоростью $0,5-0,7^\circ C/мин$, затем переносили в жидкий азот на 3 ч. Для восстановления эмбрионов после криоконсервации использовали быстрое оттаивание на водяной бане при температуре $40^\circ C$. Концентрацию ДМСО в среде снижали постепенно путем разбавления в течение 30 мин при комнатной температуре. Жизнеспособность размороженных от $-196^\circ C$ эмбрионов оценивали по морфологическим данным и по развитию *in vitro* и *in vivo*.

Для культивирования морфологически нормальные эмбрионы помещали в питательную среду Виттена, содержащую 21 мМ *HEPES* (pH 7,2) и инкубировали в чашках Петри при $37^\circ C$ с содержанием 5 % CO_2 в воздухе. Развитие от 2-клеточной стадии до бластоцисты проходило в течение 72 ч культивирования.

Эмбрионы, развившиеся после культивирования до стадии бластоцисты, трансплантировали в матку самкам-реципиентам на третий день псевдобеременности. Для контроля использовали эмбрионы, не подвергавшиеся замораживанию.

Результаты оценивали по количеству эмбрионов, имплантировавшихся в матку, и по количеству живорожденных. Статистическую обработку проводили по методу Стьюдента.

Явные повреждения криоконсервированных эмбрионов, такие как нарушение целостности блестящей оболочки, отдельных бластомеров, нарушение симметричности, компактности, формы, размеров для гибридных мышей F_1 , составили около 20 % (табл. 1). Морфологическая сохранность эмбрионов при замораживании в среде Дальбекко или модифицированной среде Виттена была одинаковой. Однако отсутствовала строгая корреляция между морфологическим и функциональным состоянием эмбрионов в культуре (табл. 2). После замораживания в модифицированной среде Виттена до стадии бластоцисты развивалось на 20 %, а после замораживания в среде Дальбекко на 40 % эмбрионов меньше, чем в контроле. Причиной

Таблица 1
Морфологическая сохранность 2-клеточных эмбрионов мышей F_1 (♀ *CBA* × ♂ $C_{57}Bl/6$) после размораживания от $-196^\circ C$

Среда для замораживания	Общее количество замороженных эмбрионов до $-196^\circ C$	Количество морфологически нормальных эмбрионов после размораживания	%
Дальбекко	163	127	$77,9 \pm 2,9$
Виттена	154	123	$79,9 \pm 3,4$

Таблица 2

Выживаемость в культуре криоконсервированных 2-клеточных эмбрионов гибридных мышей F_1 ($\varnothing$ CBA $\times$ σ C₅₇Bl/6)

Среда для замораживания	Общее число морфологически нормальных эмбрионов, эксплантированных в культуру	Развитие в культуре, % от общего числа		
		24 ч	48 ч	72 ч
Дальбекко	83	70 (84,3 $\pm$ 4,3)	62 (74,7 $\pm$ 5,3)	35 (42,2 $\pm$ 4,0)
Виттена	76	66 (86,8 $\pm$ 2,4)	54 (72,4 $\pm$ 7,0)	45 (59,3 $\pm$ 5,9)
Контроль (без замораживания)	77	73 (94,8 $\pm$ 2,8)	70 (90,9 $\pm$ 4,0)	63 (81,8 $\pm$ 5,2)

снижения выживаемости были не выявленные по морфологическим данным повреждения. Различия между криоконсервированными эмбрионами проявлялись через 48 ч культивирования на стадии формирования поздней морулы, являющейся, по-видимому, критической в развитии.

При трансплантации свыше 60 % эмбрионов из культуры имплантировалось в матку (табл. 3). Снижения в частоте имплантаций криоконсервированных эмбрионов, по сравнению с интактными, не было. Значительные потери на этом этапе, вероятно, происходили за счет техники трансплантации и подбора реципиентов.

Таблица 3

Выживаемость после трансплантации криоконсервированных эмбрионов гибридных мышей F_1 ($\varnothing$ CBA $\times$ σ C₅₇Bl/6)

Среда для замораживания до -196°C	Количество трансплантированных эмбрионов	Количество эмбрионов, имплантированных в матку, % от числа трансплантированных	Количество живорожденных, %
Дальбекко	34	25 (73,5 $\pm$ 6,6)	13 (38,2 $\pm$ 8,9)
Виттена	42	33 (78,6 $\pm$ 6,9)	15 (35,7 $\pm$ 3,2)
Контроль (без замораживания)	57	35 (61,4 $\pm$ 6,7)	20 (35,1 $\pm$ 8,0)

Постимплантационная гибель эмбрионов во всех случаях была примерно одинаковой и близкой к 30 %. Увеличение гибели трансплантированных эмбрионов, по сравнению с развитием при естественной беременности на 10—15 % [2], обусловлено скорее всего нарушением нормального взаимодействия эмбрионов с организмом матери. Развитие криоконсервированных эмбрионов после имплантации проходило нормально и заканчивалось рождением полноценных детенышей. Рождаемость после трансплантации составила 35—38 %. Мыши, развившиеся из пересаженных бластоцист, не отличались по весу от контрольных. По достижении половозрелого возраста от них было получено жизнеспособное потомство.

Таким образом, при криоконсервации повышалась вероятность функциональных повреждений, выявляющихся только в процессе развития в культуре и после трансплантации. В то же время на каждом этапе происходили дополнительные повреждения, не связанные с замораживанием—отогревом или действием ДМСО.

Фактически все нарушения эмбрионов, полученные в результате экспериментальных воздействий, выявлялись в доимплантационном периоде развития. Снижение выживаемости при имплантации и в постимплантационном периоде зависело от техники проведения трансплантации, а также взаимодействия донор-реципиент. Лучшие результаты по развитию доимплантационных эмбрионов от 2-клеточной стадии до бластоцисты были при замора-

живании в модифицированной среде Виттена с бикарбонатом и органическим буфером *HEPES*. Использование одной среды на всех этапах криоконсервации от выделения до трансплантации позволило избежать дополнительных повреждений при переносе эмбрионов из одной среды в другую.

1. Березовская О. П., Межевикина Л. М., Вепринцев Б. Н. Метод культивирования доимплантационных зародышей мышей // *Онтогенез*.— 1986.— 17, № 5.— С. 553—555.
2. Бландова З. К., Душкин В. А., Малащенко А. М., Шмидт Е. Ф. Линии лабораторных животных для медико-биологических исследований.— М.: Наука, 1983.— 156 с.
3. Brinster R. L. *In vitro* cultivation of mammalian ova // *Adv. Biosci.*— 1970.— 4, N 1.— P. 199—234.
4. Quinn P., Wales R. G. Growth and metabolism of preimplantation mouse embryos cultured in phosphate-buffered medium // *J. Reprod. Fert.*— 1973.— 35, N 3.— P. 289—300.
5. Witten W. K. Nutrient requirements for the culture of preimplantation embryos // *Adv. Biosci.*— 1971.— 6, N 1.— P. 129—141.
6. Whittingham D. G. Composition of phosphate buffered medium (PBI) for mouse embryos storage. Embryo banks in the future of developmental genetics // *Genetics*.— 1974.— 78, N 4.— P. 399—402.

Ин-т биологической
физики АН СССР,
г. Пущино

Поступила 16.02.87

УДК 57.043

Н. А. Онищенко, О. Б. Колоколова, В. И. Кирпатовский

ВОЗМОЖНОСТИ ТЕМПЕРАТУРНОЙ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АДАПТАЦИИ ДОНОРА И ЕЕ ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ ЗАЩИТЫ ИЗОЛИРОВАННЫХ ОРГАНОВ ОТ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ

Реализация идеи создания банка донорских органов требует дальнейшего исследования путей совершенствования методов их низкотемпературного консервирования. Для предотвращения криповреждений в органах исследователи идут по пути оптимизации хирургической техники их иссечения и подготовки, разработки адекватных режимов воздействия на орган криопротекторами, а также подбора режимов замораживания, хранения и отогрева [10, 11, 17].

Для ослабления повреждающего действия многочисленных факторов низкотемпературного консервирования производится предварительная подготовка организма донора [10, 11, 18] с целью повышения устойчивости органов к действию экстремальных температур и приближения ее к резистентности органов акклиматизированных и гибернирующих (зимоспящих) животных [1, 2, 16], холодоустойчивость которых сформировалась в результате эволюционных или ускоренно выработанных нейроэндокринных механизмов адаптивной перестройки метаболизма на организменном, органном, клеточном и субклеточном уровнях [1, 4, 7, 9, 23, 24, 25]. Показано, что животные в состоянии гибернации способны длительное время сохранять клеточный гомеостаз и жизнеспособность при околонулевых температурах, что не свойственно теплокровным животным [1, 3, 13].

Сердца гибернирующих животных, удаленные в период их зимней спячки, способны поддерживать сократительную активность при гораздо более низкой температуре ($7 \div 0,5$ °C), чем сердца этих животных в период бодрствования или сердца теплокровных животных ($10 \div 16$ °C) [24]. В культуре клеток, выделенных из органов зимоспящих хомяков, хранящейся при 5 °C, способность к росту сохранялась в течение 4—5 мес,

тогда как клетки незимоспящих животных теряли ее в течение 4—5 недель хранения [2].

При гипотермическом консервировании почек суслика в растворе Маршалла при 4 °С они сохраняли свою жизнеспособность в течение 9 дней, если были удалены в период зимней спячки, и в течение 4 дней, если их удалили в период бодрствования. Почки же крыс, предварительно подвергнутых охлаждению, сохранялись лишь 1 сут [16].

Известно, что в организме зимоспящих животных становлению гибернации предшествует период реализации молекулярных, биохимических, физиологических и поведенческих адаптационных реакций. За счет этих реакций, несмотря на снижение температуры, основные метаболические процессы в организме продолжают поддерживаться хотя и на сниженном, но достаточно высоком уровне, обеспечивающем структурную и функциональную целостность клеток и органов гибернаторов [19, 24].

В основе способности зимоспящих животных поддерживать адекватные метаболические функции органов и тканей [3, 23, 24, 25] лежат механизмы так называемой мембранной адаптации, связанные с изменением липидного состава и функционирования мембранных белков и ионтранспортных систем [3, 9, 12, 15]. Качественные изменения липидного обмена сводятся к изменению соотношения между основными классами липидов в направлении увеличения фосфолипидов, содержащих повышенное количество полиненасыщенных жирных кислот [3, 12, 13]. Очевидно, вследствие изменений физических свойств мембран (повышение их текучести) фазовые переходы в липидах мембран сдвигаются в область более низких температур [4, 6, 13], и это обуславливает адекватную работу мембраносвязанных ферментов и работу органов в условиях гибернации [3, 12, 14, 15, 23]. Однако повышение ненасыщенности жирных кислот мембранных липидов у гибернирующих животных во время спячки происходит не во всех клеточных органеллах и не во всех тканях [3]. Это позволяет предполагать, что для проявления оптимальной активности мембраносвязанных ферментов важно, прежде всего, чтобы в окружении этих ферментов присутствовали именно те фосфолипиды и те жирные кислоты [3], которые приспособливают вязкость липидов к требуемой функции ферментов [3, 22] (гомеовязкостная адаптация).

По мнению ряда авторов [4, 12, 22, 23], требуемые жидкостные свойства липидов мембран при гибернации обеспечиваются комбинацией нескольких механизмов молекулярной перестройки липидов: путем увеличения как насыщенных, так и ненасыщенных жирных кислот, изменением соотношения основных классов фосфолипидов и холестерина, изменением асимметрии в распределении белков и липидов, путем гомеовязкостной адаптации, а также появлением новых классов липидов. Указанные способы адаптации липидов, выработанные в процессе эволюции, позволяют ферментам приобрести необходимую для своей активности конформацию и активно участвовать в синтезе ферментов с различными степенями каталитической активности, регулировать изменения состава внутриклеточной среды, а также участвовать в сопряжении процессов гидролиза АТФ и активного транспорта ионов через мембрану [14, 15]. Показано, что при гибернации и в процессе подготовки к ней возрастает активность мембранных АТФаз, в то время как активность других мембраносвязанных ферментов (ацетилхолинэстеразы, кислой и щелочной фосфатазы и НАДФ-диафоразы) не изменяется [3]. Выявлено также, что повышение активности $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -АТФазы в корковом слое почки не связано с увеличением количества этого фермента в составе мембраны [14, 24].

Следствием формирования адаптивных изменений структуры мембран служит метаболическая адаптация системы клеточного дыхания, окислительного фосфорилирования и гликолиза, которая выражается в том, что у гибернирующих животных эти пути энергообеспечения ингибируются при охлаждении в значительно меньшей степени и в значительно большей сте-

пени поддерживается адекватность энергетического обмена, чем у неадаптированных к холоду животных [1, 21, 23, 24].

Из метаболических особенностей адаптации зимоспящих обращает на себя внимание также активация работы пентозофосфатного шунта и повышенная способность к липолизу и глюконеогенезу [1, 21, 24] со снижением внутриклеточного pH [21]. Указанные приспособительные изменения структуры мембран и метаболизма клеток развиваются на фоне эволюционно приобретенной способности к перестройке работы гипоталамуса, ретикулярной формации и эндокринного аппарата (угнетение функции щитовидной и половых желез, активация работы островковых клеток поджелудочной железы), приводящей к подавлению всех видов термогенеза (сократительного и несократительного) и переходу жизнедеятельности организмов на сниженный уровень (естественный гипобиоз).

Гипотермия и искусственный гипобиоз привлекли наше внимание в связи с изучением возможности использования их для ускоренной холодовой адаптации органов в организме теплокровных животных. Данные литературы свидетельствуют о том, что однократное снижение температуры тела животного в области положительных температур само по себе не вызывает каких-либо необратимых повреждений в органах. Однако чем глубже достигнутое охлаждение, тем короче безопасное время выживания животных. Так, при охлаждении тела крыс до $15^{\circ}C$ безопасное время для выживания составило 5—6 ч [21], при снижении температуры тела до $8,5 \pm 4^{\circ}C$ допустимое время оживления после остановки сердца уже не превышало 35—44 мин [20].

Основные причины, препятствующие длительному поддержанию жизнедеятельности организма в условиях гипотермии, оцениваются различными авторами по-разному. Однако все они сходятся на том, что в основе их лежат молекулярные механизмы повреждения мембран, когда конформационные изменения структуры липидов и белков приводят к дискоординации зависящих от них биохимических процессов [1, 10]. Повреждение выражается в активации мембранных фосфолипаз, процессов перекисного окисления липидов и в развитии признаков тканевой гипоксии [7, 10]. С нарушением клеточного метаболизма связывают холодное угнетение функции дыхания и сердечной деятельности [7, 19], изменение физико-химических свойств крови, увеличение вязкости, повышение внутрисосудистой агрегации, нарушение транспорта O_2 в связи со сдвигом кривой диссоциации оксигемоглобина и т.д. [7], которые и приводят животных к гибели. В то же время имеются данные, что животные, например крысы, хорошо переносят неоднократные охлаждения до температуры чуть выше $0^{\circ}C$. После повторных охлаждений эти животные оживали быстрее (судя по возвращению к ним способности сохранять нормальную температуру тела в холодной среде), а сроки переносимого прекращения жизнедеятельности удлинялись при увеличении кратности охлаждений. Так, при увеличении числа охлаждений до $0^{\circ}C$ с 3 до 10, доля крыс, переживших остановку сердца в течение 2 ч, достоверно повышалась [21].

Кратковременное согревание, даже если оно продолжалось несколько минут между двумя продолжительными периодами гипотермии [21], также заметно увеличивает безопасное время выживания охлажденных животных. Эти данные дают основание полагать, что адаптирующим воздействием обладает не сама гипотермия, при которой угнетаются приспособительные реакции, опосредуемые симпатoadреналовой системой, и наступает гипометаболическое состояние, а те нейроэндокринные реакции, которые активируются в организме в восстановительном периоде.

Состояние искусственного гипобиоза более физиологично для организма, чем состояние гипотермии, ибо оно наступает вследствие первичного снижения уровня метаболизма. Искусственный гипобиоз позволяет поддерживать сниженный теплообменный и метаболический гомеостаз организма в течение нескольких суток [7] и более надежно защищать организм от дей-

ствия различных неблагоприятных факторов, чем гипотермия. Это обусловлено тем, что даже при глубоком охлаждении эффективность метаболизма при гипобии поддерживается на более высоком уровне, несмотря на общность принципов поддержания метаболизма при холодом воздействии [7, 8, 19].

Состояние искусственного гипобии достигается двумя основными способами: 1) центральной и периферической инактивацией гормонально-медиаторной активности симпатoadренальной системы, активацией свойств депонированного серотонина и угнетением активности щитовидной железы при введении животным нейроплегических препаратов (рауседил, орнид) пролонгированного действия (до 40 и более часов); 2) воздействием на животных гипоксической или гипоксигиперкапнической газовой среды [7], которая блокирует термогенные реакции катехоламинов и работу центров терморегуляции, создавая условия для снижения и стабилизации теплообменного гомеостаза при температурах, близких к 0 °C. Анализ имеющихся данных показывает, что гипометаболическое состояние при гипотермии и при искусственном гипобии снижает восприимчивость и повышает резистентность целостного организма к действию неблагоприятных факторов. Открытым остается вопрос: возрастает ли резистентность отдельных органов к дополнительному холодому воздействию после их изоляции? Однако информация об этом в литературе практически отсутствует [16]. Возможно, что повышение холодоустойчивости с помощью гипобии, как и с помощью гипотермии, может быть достигнуто путем многократного введения и выведения животного из этого состояния (акклимация), поскольку для включения систем, участвующих в реализации реакций активной клеточной (мембранной) адаптации, требуется перестройка регуляции метаболизма за счет активации работы различных регулирующих систем организма, в том числе и активации симпатoadренальной системы. Гипотермия же и особенно искусственный гипобий лишь приспособляют организм к действию холода, так как устраняют возможность активного включения всего комплекса адаптивных реакций в организме.

Многочисленными наблюдениями установлено, что фармакологические средства с мембранотропными свойствами способны при заблаговременном введении тормозить повреждение клеточных структур, связанное с низкотемпературной консервацией [10], и способны выступать, таким образом, в роли молекулярных механизмов клеточной адаптации. Эффект «стабилизации» клеточных мембран наступает благодаря энергозависимой конформационной перестройке их на уровне слабых внутри- и межмолекулярных связей [10, 11]. Такая перестройка приводит к пространственной перекомпоновке распределения катионов, внутримембранных молекул и липидов и созданию функционально более прочной их внутренней конформации.

Среди фармакологических средств, являющихся мощными стимуляторами гомеостазизирующей конформации мембран, следует выделить вещества, оказывающие генерализованное воздействие на белковую и липидную компоненты клеточных мембран (глюкокортикоидные гормоны, ингибиторы мембранных фосфолипаз — совкаин, лидокаин и др.), и препараты, действующие преимущественно на липидный матрикс мембраны (антиоксиданты) [10].

Так, применение β -бутилированного гидроокситолуола влияющего на вязкостные свойства липидов мембран, существенно повышало жизнеспособность клеток, подвергнутых медленному замораживанию до —196 °C в присутствии диметилсульфоксида; замораживание же в присутствии одного лишь криопротектора было менее эффективно [15]. Применение антиоксидантов, производных 1,4-дигидропиридина [1], ингибировало процессы свободнорадикального окисления при замораживании митохондрий печени крыс. Это проявлялось в уменьшении степени деградации кардиолипина, фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина. Матес с соавт. [18] указывают на способность диметилсульфоксида (ДМСО) и соединений селена (L-селен-

метионина и селенита натрия) уменьшать степень перекисного окисления липидов (ПОЛ). Предварительное введение животным и добавление в консервирующий раствор наряду с ДМСО селен-метионина уменьшало образование продуктов ПОЛ, а также увеличивало жизнеспособность фрагментов сердечной мышцы после хранения при -196°C . Этот защитный эффект соединений селена авторы связывают с антиоксидантной активностью селензависимого фермента глутатион-пероксидазы.

Одним из наиболее эффективных природных антиоксидантов является α -токоферол (витамин *E*), механизм защитного действия которого связывают также с воздействием его на микровязкость липидов мембран (изменение их пассивной проницаемости) и торможением гидролиза мембранных фосфолипидов [10].

Как было показано выше, процессы устойчивой адаптации к низким температурам характеризуются значительным увеличением доли ненасыщенных жирных кислот в фосфолипидах мембранных структур. Проведенные нами исследования показали, что фармакологическая подготовка животного-донора препаратами с мембраностабилизирующими и антиоксидантными свойствами действует аналогично: под влиянием этих препаратов происходит трансформация («разжижение») структуры насыщенных липидов в ненасыщенные [11]. Было установлено, что предварительное введение донору таких препаратов, как α -токоферол, преднизолон, лидокаин и трентал, позволяет снизить температуру фазовых переходов в тканевых макромолекулярных структурах за счет изменения состава клеточных липидов (накопления в них непредельных жирных кислот). Было показано, что преднизолон, лидокаин и трентал меняют также соотношение свободной и связанной воды в клетке в сторону увеличения связанной [10]. Благодаря этим изменениям создаются предпосылки для более активной работы мембраносвязанных ферментов в условиях гипотермии, снижается температурная лабильность белка, что чрезвычайно важно для пролонгирования адекватного клеточного метаболизма при низкотемпературной консервации.

В наших экспериментах при замораживании почек крыс предварительное введение α -токоферола значительно уменьшало степень метаболических расстройств, развивающихся после отогрева органов: уменьшался выход глутаматдегидрогеназы в перфузат, сохранялась более высокая концентрация K^+ и Na в ткани [1].

Практически малоизученным остается вопрос о путях усиления эффективности защитного действия криопротекторов. Однако уже сейчас имеются данные, что предварительное введение донору диметилсульфоксида улучшает функцию почечного трансплантата, уменьшает степень его гипотермического и криповреждения [11] после консервирования. Можно предположить, что в результате ускоренной адаптационной перестройки метаболизма, происходящей в ответ на предварительное введение в организм криопротектора, уменьшается чувствительность иссеченного органа к токсическому действию криопротектора и, следовательно, повышается эффективность его защиты [5].

Вводимый в организм донора криопротектор вызывает обратимые конформационные перестройки мембранных структур клетки, приводит к торможению активности некоторых ферментов, способствует частичной дегидратации клеток и, подготавливая их таким образом к глубокому охлаждению, делает более устойчивыми к температурному и осмотическому шоку.

Медикаментозная подготовка органов в организме гомеотермного донора создает эффект ускоренной неспецифической адаптации его мембран, и поэтому возникающая холодоустойчивость органов является менее совершенной, чем при естественном гипобиозе. Тем не менее, с практической точки зрения, она представляется нам более надежной, чем подготовка донора искусственным индуцированием состояния гипометаболизма (гипотермия, искусственный гипобиоз).

1. Белоус А. М., Бондаренко В. А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении — Киев : Наук. думка, 1982.— 225 с.
2. Гаврилюк Б. К. Устойчивость к пониженной температуре культур клеток и тканей, выделенных из органов зимоспящих животных // Криобиология.— 1985.— № 3.— С. 28—30.
3. Жегунов Г. Ф., Белоус А. М. Роль липидов и нонтранспортирующих систем биомембран в процессах адаптации животных к низким температурам // Криобиология и криомедицина.— 1983.— Вып. 3.— С. 3—12.
4. Ивков В. Г., Берестовский Г. Н. Липидный бислой биологических мембран.— М. : Наука, 1982.— С. 28—33.
5. Колдаев Я. Я., Кирпатовский В. И., Онищенко Н. А. О возможности уменьшения повреждающего действия криопротекторов при консервации // Криобиология и криомедицина.— 1984.— Вып. 15.— С. 40—44.
6. Крепс Е. М. Липиды клеточных мембран.— Л. : Наука, 1981.— 339 с.
7. Тимофеев Н. Н. Искусственный гипобноз — М. : Медицина, 1983.— С. 35—77.
8. Хаскин В. В. Биохимические механизмы адаптации к холоду // Физиология терморегуляции.— Л. : Наука, 1984.— С. 144.
9. Хочачка П., Сомеро Д. Стратегия биохимической адаптации.— М. : Мир, 1977.— 398 с.
10. Шумаков В. И., Онищенко Н. А., Кирпатовский В. И. Фармакологическая защита трансплантата.— М. : Медицина, 1983.— С. 76—92.
11. Шумаков В. И., Онищенко Н. А., Кирпатовский В. И., Лубяко А. А. Значение фармакологической адаптации к низким температурам при консервации органов в условиях гипотермии и глубокого замораживания // Криобиология.— 1985.— № 3.— С. 3—8.
12. Aloia R. C. The role of membrane fatty acids in mammalian hibernation // Fed. Proc.— 1980.— 39, N 3.— P. 2974.
13. Charnock J. C. Membrane lipid phase transition: a possible biological response to hibernation // Strategies in the Cold : Natural Torpidity and Thermogenesis.— New York : Acad. Press, 1978.— P. 417—460.
14. Ellory I. C., Willis J. E. Adaptive changes in membrane-transport systems of hibernators // Biochem. Soc. Trans.— 1983.— 11, N 4.— P. 330—332.
15. Frim J., Rule G. S., Rance M. A., Male R. S. The effect of membrane lipid perturbation on cold (—5 °C) and freeze—thaw survival of mammalian cells // Cryobiology.— 1976.— 13, N 6.— P. 645—646.
16. Fuller B., Marley S. P., Green C. J. A comparison of renal metabolism in stored kidneys from hibernatory and artificially cold-acclimated animals // Ibid.— 1985.— 22, N 6.— P. 606.
17. Guttman F. M., Robitaille P., Zizin J. et al. Physiologic investigation of frozen-thawed canine kidneys // Transplant. Proc.— 1977.— 9, N 1.— 255.
18. Matthes G., Hackensellner H. A., Ientzsch K. D., Oehme P. Oxygen-dependent cryoinjuries and their prevention by seleno-methionine // Cryo-Lett.— 1982.— 3, N 1.— P. 57—60.
19. Musacchia X. J. Comparative physiological and biochemical aspects of hypothermia as a model for hibernation // Cryobiology.— 1984.— 21, N 6.— P. 583—592.
20. Niazi S. A., Lewis F. J. Tolerance of adult rats to profound hypothermia and simultaneous cardiac arrest // Surgery.— 1954.— 36.— P. 25—32.
21. Popovic V., Popovic P., Karow A. Hypothermia and hibernation // Organ Preservation for Transplantation.— Boston : Little Brown a. Comp., 1974.— P. 11—18.
22. Sinesky M. Homeoviscous adaptation — a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipid in *E. coli* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1974.— 71.— P. 522—525.
23. Storey K. B. Metabolic approach to cold hardiness // Cryo-Lett.— 1984.— 5, N 1.— P. 147—161.
24. Wang L. C. H. Life and low temperature : mammalian hibernation // Ibid.— 1985.— 6, N 2.— P. 257—274.
25. Willis G. S. Hibernation: cellular aspects // Ann. Rev. Physiol.— 1979.— 41, N 3.— P. 275—286.

НИИ трансплантологии и искусственных
органов МЗ СССР,
г. Москва

Поступила 10.11.86

**БИОСИНТЕЗ БЕЛКОВ И ДНК В КЛЕТКАХ
РЕГЕНЕРИРУЮЩЕЙ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ
ПОЛОСТИ РТА У КРЫС ПОСЛЕ КРИО-
И ДИАТЕРМОДЕСТРУКЦИИ**

В настоящее время по данным клинических и экспериментальных исследований установлено, что регенерация слизистой оболочки полости рта после криовоздействия протекает более благоприятно, чем после диатермокоагуляции. Это выражается в ускорении процесса очищения раневой поверхности и сокращения сроков окончательного заживления [4]. Важной особенностью регенерации слизистой оболочки полости рта после криодеструкции является также полное отсутствие или уменьшение рубцовых изменений, которые характерны для многих видов травм, в частности диатермокоагуляции [1, 3]. По-видимому, такое течение воспалительного процесса обусловлено особенностями метаболических реакций: биосинтеза нуклеиновых кислот, белков, полисахаридов, определяющих характер регенерации тканей. Однако данные литературы по этому вопросу, в частности об интенсивности обмена нуклеиновых кислот и белков, отсутствуют, что послужило основанием для проведения настоящего исследования.

Опыты проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 160—180 г. Температурное разрушение слизистой оболочки полости рта проводили под эфирным наркозом. Размеры очага криоразрушения были обусловлены экспозицией 6—7 с. Криовоздействие осуществляли при помощи аппарата КАС-01, который подает открытую парожидкостную струю азота. Диатермокоагуляцию слизистой оболочки полости рта проводили аппаратом ДКС-2. Очаг разрушения в обоих случаях располагался в пределах собственно слизистой. Биосинтез белков исследовали по включению в суммарные белки ^{14}C -аминокислот (гидролизат белков хлореллы, удельная активность 35 мКи/мл) или ^3H -пролина (удельная активность 70 мКи/мл) в пролинсодержащие белки. Аминокислоты вводили внутрибрюшинно за 3 ч до забоя из расчета 50 мКи/100 г массы тела животного. Навеску регенерата гомогенизировали в 10 %-ной холодной ТХУ и для определения радиоактивности суммарных белков обрабатывали на фильтрах, а выделение пролинсодержащих белков и определение их радиоактивности проводили как описано ранее [2].

Для исследования биосинтеза ДНК использовали ^3H -тимидин, который вводили внутрибрюшинно из расчета 50 мКи/100 г массы тела за 3 ч до забоя животного. После гомогенизации навески в 10 %-ной холодной ТХУ обработку материала проводили как описано ранее [2]. Радиоактивность фильтров с образцами просчитывали в толуольном сцинтилляторе на счетчике.

Из результатов клинических наблюдений за ходом воспалительной реакции после крио- и диатермодеструкции слизистой полости рта известно, что регенерация обычно начинается на 2—4 сут после температурного разрушения и характеризуется

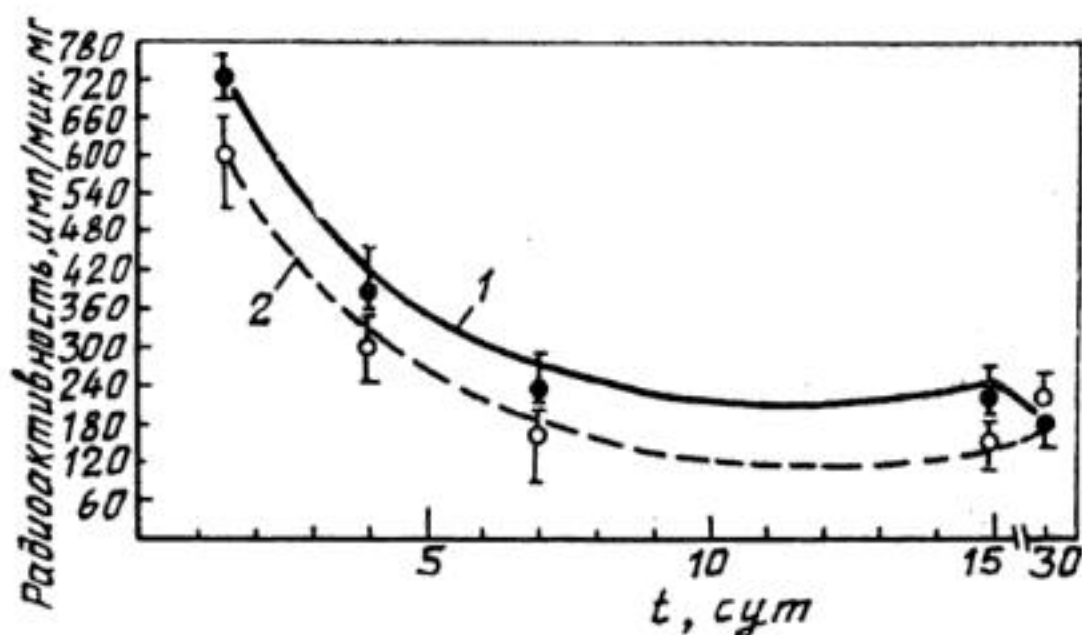


Рис. 1. Включение ^{14}C -аминокислот в суммарные белки регенерата слизистой оболочки полости рта у крыс после крио- и диатермодеструкции: 1 — криодеструкция; 2 — диатермокоагуляция

обильным размножением соединительнотканых клеток. Судя по полученным нами данным, на 2 сут после температурного воздействия клетки в регенерате обладают наибольшей белоксинтезирующей активностью как после криодеструкции, так и после диатермокоагуляции ткани (рис. 1). Однако после криодеструкции интенсивность биосинтеза белков выше, чем после диатермокоагуляции. Нормализация биосинтеза белков после любого температурного разрушения ткани происходит на 7—15 сут регенерации. Следует отметить, что после этого срока уровень биосинтеза суммарных белков

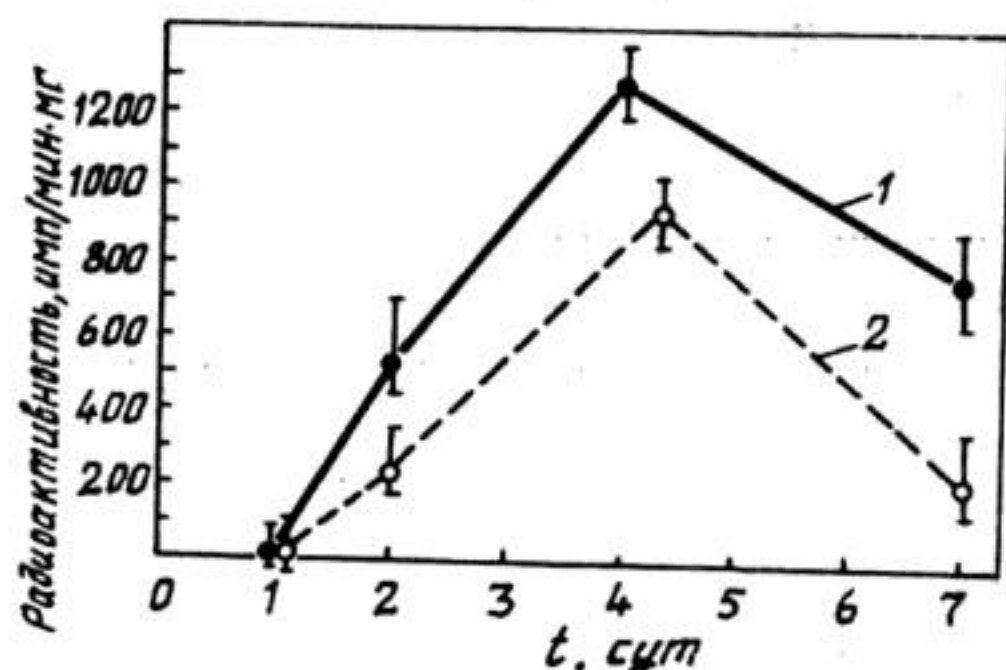


Рис. 2. Включение ^3H -тимидина в нуклеиновые кислоты регенерата слизистой оболочки полости рта у крыс после крио- и диатермодеструкции: 1 — криодеструкция; 2 — диатермокоагуляция

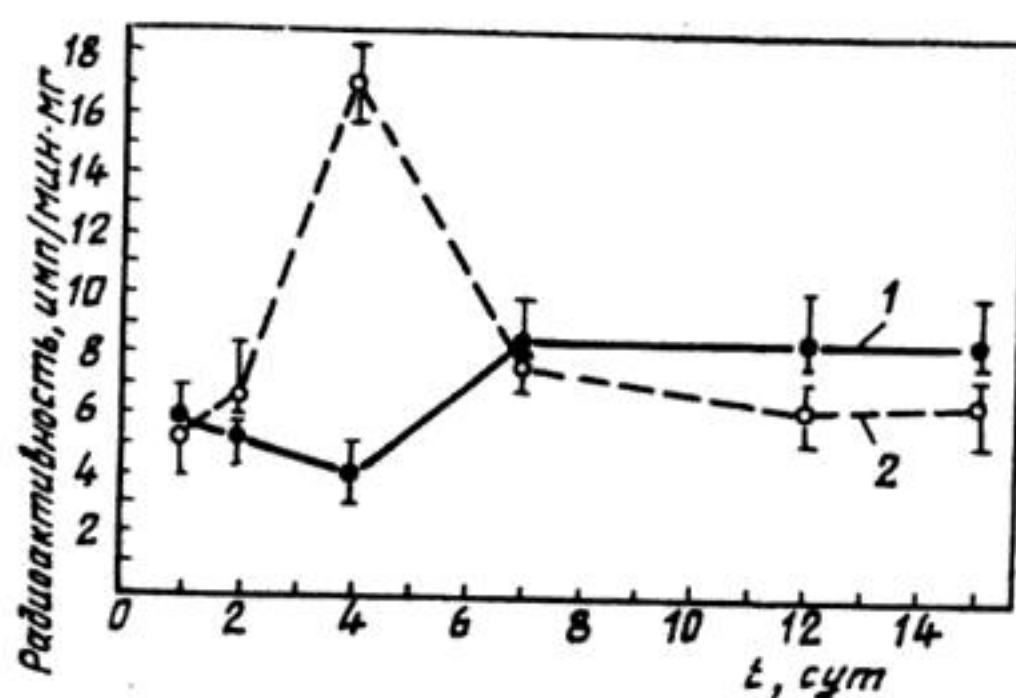


Рис. 3. Включение ^3H -пролина в пролинсодержащие белки регенерата слизистой оболочки полости рта у крыс после крио- и диатермодеструкции: 1 — криодеструкция; 2 — диатермокоагуляция

содержащих белков, что видно из данных включения ^3H -пролина в пролинсодержащие белки (рис. 2). Представленные результаты показывают, что пик увеличения биосинтеза пролинсодержащих белков, наблюдаемых при диатермокоагуляции на 4 сут регенерации, отсутствует после криодеструкции (рис. 3). Поскольку биосинтез пролинсодержащих белков отражает рост соединительной ткани в регенерате, обнаруженный факт объясняет уменьшение рубцовых изменений при криодеструкции.

Таким образом, полученные в данном исследовании результаты позволили установить, что метаболизм регенерирующей ткани слизистой оболочки полости рта характеризуется более высоким уровнем биосинтеза суммарных белков и ДНК и более низким уровнем пролинсодержащих белков после криодеструкции. Отличительной особенностью регенерации после криовоздействия по сравнению с диатермокоагуляцией является более высокий уровень биосинтеза суммарных белков и ДНК при пониженном биосинтезе соединительнотканых белков. Это во многом объясняет различия в клинической и морфологической картинах регенерации после сопоставляемых видов воздействия.

в регенерате слизистой оболочки полости рта у крыс, подвергнутых криодеструкции, выше, чем при диатермокоагуляции. Обнаруженный факт, по-видимому, обусловлен большим содержанием клеточных элементов в регенерате после криовоздействия или их иным качественным составом, чем при диатермодеструкции. Это предположение хорошо подтверждается данными о включении ^3H -тимидина во вновь синтезируемые ДНК клеток регенерата, которое отражает уровень пролиферации тканей. Как видно, пик интенсивности биосинтеза ДНК в регенерате приходится на 4 сут. При этом уровень включения ^3H -тимидина в ДНК регенерата после криовоздействия в 1,3—1,4 раза выше, чем после высокотемпературного разрушения тканей. Несмотря на снижение уровня биосинтеза ДНК на 7 сут регенерации при обоих видах температурного воздействия, включение предшественника в ДНК регенерата после криовоздействия остается на более высоком уровне, чем при диатермокоагуляции.

Важной особенностью метаболизма регенерирующей слизистой оболочки полости рта после криодеструкции, наряду с более высоким уровнем биосинтеза суммарных белков и ДНК, является пониженная интенсивность биосинтеза пролинсо-

1. *Балиева И. А., Антипова З. П.* Структурные изменения в тканях слизистой оболочки полости рта у крыс после криовоздействия // *Стоматология*.— 1976.— № 5.— С. 7--10.
2. *Кеннед Д.* Использование фильтров для разделения радиоактивных РНК, ДНК и белка // *Методы исследования нуклеиновых кислот*.— М. : Мир, 1970.— С. 53—68.
3. *Личковская Л. Т.* Применение криогенного метода при лечении лейкоплакии и красного плоского лишая // *Тез. докл. V съезда УССР стоматологов*.— Одесса : Б. и., 1978.— С. 129—130.
4. *Сандомирский Б. П.* Деструктивное и защитное действие низких температур на кожу : Автореф. дис. ... д-ра мед. наук.— Харьков, 1982.— 36 с.

Украинский ин-т усовершенствования
врачей МЗ СССР, г. Харьков

Поступило. 25.06.87

НОВЫЕ КНИГИ ИЗДАТЕЛЬСТВА «НАУКОВА ДУМКА»

Барьерные свойства биомембран при низких температурах / А. К. Гулевский, В. А. Бондаренко, А. М. Белоус.— Киев: Наук. думка, 1988.— 208 с.— ISBN 5—12—000257—9.

В монографии систематизирован и обобщен большой экспериментальный материал о влиянии физико-химических факторов, формирующихся при замораживании — отогреве, на структуру и барьерно-транспортные свойства природных и искусственных мембран. Приведены данные о зависимости структурной организации липидов и белков биомембран от температуры, концентрации соли, содержания воды, криопротекторов. В условиях охлаждения рассмотрены функциональные характеристики биомембран: пассивный и активный транспорт веществ, барьерные свойства, активность мембранно-связанных ферментов. Особое внимание уделено исследованию механизмов образования и репарации дефектов в мембранах. Развиваются представления о ведущей роли понижения температуры и вымерзания воды в инициации структурных перестроек, приводящих к формированию «каналов утечки» веществ и нарушению асимметрии клеток.

Для физиков, физиологов и биохимиков.

УДК 57.043

Итоги и перспективы развития криобиологии и криомедицины / Грищенко В. И. // Криобиология.— 1988.— № 3.— С. 5—11.

Сделан анализ современного состояния исследований в области криобиологии и криомедицины. Обобщены полученные результаты, обрисованы перспективы фундаментальных разработок в данной отрасли науки.

УДК 57.043

Консервирование и стеклование / Фаррант Дж. // Криобиология.— 1988.— № 3.— С. 12—14.

Условия, созданные медленным замораживанием внутри клетки и вблизи клеточной мембраны, сходны с условиями, возникающими в системе с чистым стеклованием. Выделены биохимическая и осмотическая токсичность растворов, окружающих клетку. Ил. 1. Библиогр.: 5 назв.

УДК 57.043

Низкотемпературное консервирование тканевых трансплантатов для клинического применения / Мнержичка П., Малец Р., Героут В., Конечный Б., Мотычка В. // Криобиология.— 1988.— № 3.— С. 15—17.

Приводятся данные о консервировании тканевых трансплантатов, например роговицы, кости, кожи, фасции, твердой мозговой оболочки, с использованием методов лиофилизации, замораживания и гипотермического ранения и различных способов стерилизации.

УДК 57.043

Криоконсервирование изолированных гепатоцитов / Фуллер Б. Дж. // Криобиология.— 1988.— № 3.— С. 18—21.

Сделан обзор современного состояния проблемы криоконсервирования гепатоцитов и представлены результаты последних исследований, направленных на повышение жизнеспособности клеток печени, восстановленных после криоконсервирования. Ил. 2. Библиогр.: 14 назв.

УДК 57.043

Проблемы криоконсервации гепатоцитов / Суббота Н. П., Белоус А. М. // Криобиология.— 1988.— № 3.— С. 21—26.

Приведены литературные данные о структурно-функциональном состоянии паренхиматозных клеток печени при разработке методов длительного хранения с использованием низких (-196°C) температур. Библиогр.: 29 назв.

УДК 57.043

Влияние состава среды на чувствительность эритроцитов к охлаждению // Бабийчук Л. А. // Криобиология.— 1988.— № 2.— С. 27—31.

Исследована устойчивость эритроцитов к охлаждению в присутствии высоких концентраций неэлектролита (0,86 М сахара) и электролитов в различных концентрациях (0—250 мМ). Показано, что изменение состава среды оказывает более существенное влияние на эритроциты, находящиеся в гипертонических условиях при 0°C , чем при 37°C . Зависимость величины гемолиза при охлаждении от 37 до 0°C в средах, содержащих неэлектролит, от концентрации и состава электролитов становится более выраженной после предварительной инкубации при 0°C . Ил. 5. Библиогр.: 9 назв.

УДК 57.043:612.111:536.54

Влияние механического фактора на повреждение клеток при нагреве / Воротилин А. М., Зинченко, А. В., Моисеев В. А., Аненко В. И. // Криобиология.— 1988.— № 3.— С. 31—35.

Методами дифференциальной сканирующей калориметрии и термического анализа исследованы изменения физического состояния и фазовые переходы в криозащитных средах на основе 1,2-пропандиола и глицерина, а также при добавлении к ним эритроцитов. Показано, что превращения, связанные с термическими эффектами, и другие изменения в рассматриваемых системах наблюдаются при температурах выше температуры расстеклования ($-120 \div -100$ °C). Вклад повреждающего действия термомеханических напряжений на клетки оценивали по их сохранности после размораживания в зависимости от скорости нагрева в интервале от -196 °C до температуры расстеклования, где отсутствуют указанные выше превращения. Ил. 5. Табл. 1. Библиогр.: 5 назв.

УДК 577.164.14:612.014.43:591.436.2

Структура фонда кофермента А (КоА) и содержание ацетил-КоА в печени животных при глубокой гипотермии / Моисеев А. Г., Омелянчик С. Н., Утно Л. Я., Гуринович В. А., Хомич Т. И. // Криобиология.— 1988.— № 3.— С. 36—39.

В печени белых крыс, подвергнутых глубокой гипотермии, снижался уровень общего КоА, кислоторастворимой фракции КоА и суммарное содержание кофакторов ацетилирования (КоА, дефосфо-КоА, 4-фосфопантетеин). Содержание ацетил-КоА увеличивалось более чем в 2 раза на фоне активации ацетил-КоА-синтетазы, равно как и соотношения длинноцепочечные ацил-КоА/КоА и ацетил-КоА/КоА. Накопление меченого пантотената во внутренних органах животных через 30 и 60 мин глубокой гипотермии прогрессивно снижалось, в особенности в печени, где биотрансформация витамина до фосфорилированных метаболитов и КоА оказалась сниженной в 7—8 раз. Ил. 1. Табл. 2. Библиогр.: 6 назв.

УДК 57.043.612.43

Влияние димексида на включение ^{14}C -аминокислот в белки и активность аденилатциклазы в щитовидной железе, замороженной без криопротектора / Утевский А. М., Чуйко В. А., Карпенко Л. Г., Щирова В. А., Таргони О. С. // Криобиология.— 1988.— № 3.— С. 39—42.

Установлено, что добавление димексида в концентрациях 0,5 и 10 % восстанавливает включение ^{14}C -аминокислот до контрольного уровня. Димексид в концентрациях 0,25—5 % снижает активность аденилатциклазы в щитовидной железе, замороженной без криопротектора. Использование 10 %-ного димексида приводит к увеличению уровня базальной и фторидчувствительной аденилатциклазы. Ил. 2. Табл. 1. Библиогр.: 4 назв.

УДК 57.043

Низкотемпературная консервация 2-клеточных эмбрионов мышей в среде Виттена с добавлением органического буфера *HEPES* / Межевикина Л. М., Березовская О. П., Вепринцев Б. Н. // Криобиология.— 1988.— № 3.— С. 42—45.

Показана возможность использования культуральной среды Виттена с добавлением органического буфера *HEPES* на всех этапах криоконсервации: выделения, замораживания, культивирования, трансплантации. Морфологическая сохранность 2-клеточных эмбрионов гибридных мышей $F_1(\text{♀ } CBA \times \text{♂ } C_{57}Bl/6)$ после размораживания от -196 °C составляла 80 %, в культуре до стадии бластоцисты развивалось 60 %, после трансплантации псевдобеременным самкам-реципиентам — 36 %. Повреждения эмбрионов, связанные непосредственно с замораживанием — отогревом и действием ДМСО, выявлялись в доимплантационном периоде развития. Ил. 1. Табл. 3. Библиогр.: 6 назв.

УДК 57 043

Возможности температурной и фармакологической адаптации донора и ее значение для защиты изолированных органов от низкотемпературного повреждения / Онищенко Н. А., Колоколова О. Б., Кирпатовский В. И. // Криобиология. — 1988. — № 3. — С. 45—50.

Представлены современные данные о структурных и метаболических изменениях в организме гибернирующих животных, обеспечивающих их устойчивость к холодовому воздействию. Обсуждаются возможные механизмы индуцирования аналогичных перестроек в гомойотермном организме путем воссоздания состояния гипометаболизма (гипотермия, искусственный гипобиоз) и с помощью медикаментозной подготовки. Показано, что искусственный гипобиоз является наиболее физиологичным способом повышения холодоустойчивости организма донора. В то же время он требует довольно длительного и неоднократного холодового воздействия на организм. Поэтому для повышения устойчивости донорских органов к низкотемпературному повреждению более целесообразно применять медикаментозную подготовку донора. Библиогр.: 25 назв.

UDC 57.043

Results and perspectives in cryobiology and cryomedicine / Grishchenko V. I. // Kriobiologiya. — 1988. — N 3. — P. 5—11.

The current state of research in the field of cryobiology and cryomedicine has been analysed. The results achieved in this field of science and perspectives of fundamental investigations are discussed.

UDC 57.043

Preservation and vitrification / Farrant J. // Kriobiologiya. — 1988. — N. 3—P. 12—14.

It has been suggested that the conditions produced by slow freezing will be similar both inside the cell and near the cell membrane to those achieved in a system of pure vitrification. Biochemical and osmotic toxicities of the solutions around the cells are discussed. 1 fig. Refs.: 5 titles

UDC 57.043

Low temperature preservation of tissue grafts for clinical use / Měřicka P., Malec R., Herout V., Konečný B., Motýčka V. // Kriobiologiya. — 1988. — N 3. — P. 15—17.

The data on preservation of tissue grafts such as cornea, skin, bone, fascia, dura mater by liophilization, freezing or hypothermic storage using different sterilization methods are presented.

UDC 57.043

Cryopreservation of isolated hepatocytes / Fuller B. J. // Kriobiologiya. — 1988. — N. 3. — P. 18—21.

The current state of the problem of hepatocyte cryopreservation is reviewed. Recent data on storing high yields of functional liver cells in the frozen state are discussed. 2 figs. Refs.: 14 titles

UDC 57.043

Problems of hepatocyte cryopreservation / Subbota N. P., Belous A. M. // Kriobiologiya. — 1988. — N 3. — P. 21—26.

The literature data on structural and functional state of parenchyma hepatocytes preserved by methods of long-term storage using low temperatures (—196 °C) are discussed. Refs.: 29 titles

UDC 57.043

The effect of medium composition on the sensitivity of erythrocytes to cooling / Babiychuk L. A. // Kriobiologiya. — 1988. — N 3. — P. 27—31.

The resistance of erythrocytes to cooling in the presence of high non-electrolyte concentrations (0.86 M sucrose) and different electrolyte concentrations (0 to 250 mM) was studied. It has been demonstrated that changes in the medium composition have more significant effects on erythrocytes under hypertonic conditions at 0 °C than at 37 °C. The stronger dependence of haemolysis, upon cooling from 37 to 0 °C in media containing a non-electrolyte, on the concentration and composition of electrolytes has been shown after preincubation at 0 °C. 5 figs. Refs.: 9 titles

UDC 57.043:612.111:536.54

The effect of mechanical factor on the cell damage upon rewarming / Vorotilin A. M., Zinchenko A. V., Moiseyev V. A., Anenko V. I. // Kriobiologiya.— 1988.— N 3.— P. 31—35.

Changes in the physical state and phase transitions in cryoprotective media containing 1,2-propane diol or glycerol and those with added erythrocytes were studied using methods of differential scanning calorimetry and thermal analysis. Transformations caused by thermal effects as well as other changes in the studied systems have been shown to occur at temperatures higher than the devitrification point, namely at -120 to -100 °C. The contribution of detrimental effect of thermal and mechanical tensions on cells were estimated by their integrity after thawing as a function of rewarming rates in a range of -196 °C to the devitrification point where the mentioned transformations were not observed. 5 figs. 1 table. Refs.: 5 titles

UDC 577.164.14:612.014.43:591.436.2

The structure of coenzyme A (CoA) pool and the content of acetyl-CoA in liver of animals subjected to deep hypothermia / Moiseyenko A. G., Omelyanchik S. N., Utro L. Ya., Gurinovich V. A., Khomich T. I. // Kriobiologiya.— 1988.— N 3.— P. 36—39.

The level of total CoA, acid-soluble CoA and the overall content of acetylation cofactors (CoA, dephospho-CoA, 4'-phosphopantethein) decreased in liver of albino rats subjected to deep hypothermia. With acetyl-CoA-synthetase being activated, both the acetyl-CoA concentration and the ratios of long-chain acyl-CoA/CoA and acetyl-CoA/CoA increased by more than two-fold. After 30 and 60 min of deep hypothermia, the accumulation of labelled pantothenate in animal inner organs progressively decreased, particularly in livers with reduced vitamin biotransformation to phosphorylated metabolites and CoA by 7 to 8-fold. 1 fig. 2 tables. Refs.: 6 titles

UDC 57.043.612.43

The effect of dimexide on the incorporation of ^{14}C -amino acids into proteins and the activity of adenylate cyclase in thyroid gland frozen without cryoprotectant / Utevsky A. M., Chuyko V. A., Karpenko L. G., Shchyrova V. A., Targony O. C. // Kriobiologiya.— 1988.— N 3.— P. 39—42.

The addition of dimexide in concentrations of 0.5 and 10 % has been found to restore the incorporation of ^{14}C -amino acids to the control values. Dimexide in concentrations of 0.25 to 5 % decreased the activity of adenylate cyclase in thyroid gland frozen without cryoprotectant. The use of 10 % dimexide resulted in increasing the level of basal and fluorine-sensitive adenylate cyclase. 2 figs. 1 table. Refs.: 4 titles

UDC 57.043

Low temperature preservation of 2-cell mouse embryos in Whitten's medium containing HEPES buffer / Mezhevichina L. M., Berezovskaya O. P., Vepintsev B. N. // Kriobiologiya.— 1988.— N. 3.— P. 42—45.

The cultural Whitten's medium with HEPES buffer has been used at such stages of cryopreservation as isolation, freezing, cultivation, and transplantation. After thawing from -196 °C, 80 % of 2-cell embryos of mice F_1 ($\text{♀CBA} \times \text{♂C}_{57}\text{Bl}/6$) had normal morphology, 60 % of normal embryos developed *in vitro* from 2-cell stage to blastocysts, and 36 % of embryos developed into normal mice if transplanted into pseudopregnant foster mothers. Embryo damages caused by freezing-thawing and DMSO effects were pronounced in the preimplantation periods of development. 1 fig. 3 tables. Refs.: 6 titles

UDC 57.043

The possibilities of temperature and pharmacological adaptation of donors and its significance for the protection of isolated organs from cryoinjury / Onishchenko N. A., Kolokolova O. B., Kirpatovsky V. I. // Kriobiologiya.— 1988.— N 3.— P. 45—50.

The modern data on structural and metabolic changes in hibernating animals responsible for the resistance to cold are presented. Possible mechanisms of induction of similar transformations in homoithermal animals by recreation of the state of reduced metabolism (hypothermia and artificial hypobiosis) using pharmacological pretreatment are discussed. It has been shown that artificial hypobiosis is the most physiological method of increasing the cold resistance of donors. However, it requires prolonged and repeated cold actions on the body. It is reasonably to suppose that pharmacological pretreatment of donors increases the resistance of donor organs to low temperatures. Refs.: 25 titles

Продолжается подписка на 1989 год на всесоюзный научно-теоретический журнал «Криобиология». В журнале публикуются научные работы по всем аспектам действия охлаждения и замораживания в биологии, медицине и пищевой промышленности, по проблемам гипотермии, низкотемпературному консервированию клеток и тканей, криохирургии, по сублимационному высушиванию, о криопротекторных веществах и их фармакологическом действии. Освещаются вопросы гибернации, зимостойкости растений, конструирования приборов и оборудования для низкотемпературного консервирования биологических объектов и криомедицины.

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

Периодичность — 4 номера в год. Подписная цена: на 3 мес.— 65 к., на 6 мес.— 1 р. 30 к., на 12 мес.— 2 р. 60 к.

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

Our journal KRIOBIOLOGIYA (CRYOBIOLOGY) is published by Naukova Dumka Publ. Co. in Russian with abstracts in English. The journal is designated for the communication of papers on aspects of low temperature studies covering the chemical and life sciences and their associated technologies. Coverage includes: physical and chemical changes accompanying freezing and thawing, low temperature biophysics; biochemistry and molecular biology at sub-zero temperatures; preservation of cells, tissues and organs; effects of low temperatures on cell physiology; the use and mode of action of cryoprotectants; cell damage and its avoidance; freeze-drying and substitution; chill and frost injury, cold acclimation and hardiness in plants; cold survival mechanisms in animals and micro-organisms; low temperature techniques and instrumentation, e. g. food and pharmaceuticals.

KRIOBIOLOGIYA is published 4 times a year.

Subscription Rates: 65 copecks for 3 months, 1 rouble and 30 copecks for 6 months, 2 roubles and 60 copecks for 12 months. Subscriptions to the journal are taken at SOYUZPECHAT agencies of the USSR Ministry of Communications.