

ISSN 0233-7673

КРИОБИОЛОГИЯ

1|89



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. Пушкарь, Б. П. Сандомирский, А. С. Снурников, К. М. Сытник, 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. Pankov, L. A. Piruzyan, N. S. Pushkar, B. P. Sandomirsky, A. S. Snurnikov, K. M. Sytnik, A. G. Fedotenko, 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

1 1989

ВСЕСОЮЗНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ОСНОВАН В ЯНВАРЕ 1985 ГОДА
ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

КИЕВ НАУКОВА ДУМКА 1989

СОДЕРЖАНИЕ

Чуйко В. А. Механизм криозащитной эффективности и фармакологические свойства ДМСО	3
Горбюенко Е. А., Некоз И. А. Осмотическая реакция эритроцитов на контакт с гипертоническими растворами непроникающего криопротектора	11
Загоруйко Г. Е., Загоруйко Ю. В., Бабийчук Г. А. Влияние краниocereбральной гипотермии на кинетику паренхиматозно-стромальных отношений в миокарде белых крыс при тканевой гипоксии	14
Гахова Э. Н., Чекурова Н. Р., Кислов А. Н., Вепринцев Б. Н. Гигантские нейроны сохраняют жизнеспособность после глубокого замораживания мозга пресноводного моллюска <i>Lymnaea stagnalis</i> L.	19
Тихонова В. Л., Яшина С. Г., Полевая В. С., Крастс И. В. Влияние глубокого замораживания семян на рост и развитие растений (на примере гвоздики Фишера)	23
Есьман С. С., Рикберг А. Б., Сергиенко В. П. Усиление криодеструкции ультразвуком. Моделирование на клеточном монослое	28
Лупальцев В. И., Цупрев Ю. В. Активное хирургическое лечение с криовоздействием при гнойно-некротических поражениях мягких тканей	33
Жегунов Г. Ф., Кудюкоцева Е. В. Особенности липидного обмена у сусликов при периодических пробуждениях от зимней спячки	36
Паращук Ю. С., Шраго М. И., Калугин Ю. В., Ханина Л. А., Коций С. В., Черныш Е. Н. Сравнительная оценка цитотоксичности и криозащитной эффективности глицерина и его алкиловых эфиров при замораживании спермиев человека	40
Дахно Ф. В., Каталевская Л. Г., Бульба Л. И. Значение степени зрелости ооцитов для оплодотворения <i>in vitro</i> и криоконсервации	43

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Павлова С. К. Сравнительное исследование состояния олигосахаридов плазматических мембран сперматозоидов барана и быка	45
Поздняков В. В., Бондаренко В. А. Взаимосвязь между исходными осмотическими условиями среды и чувствительностью эритроцитов к гипертоническому стрессу в 4М NaCl	47



<i>Бейгель М. З., Ковалев О. И., Соболева Н. Н., Трофимов В. И.</i> Влияние замораживания на биологические свойства суспензионных препаратов инсулина	49
<i>Василовский В. Ю., Мхитарьянц А. М.</i> Терморегулируемая насадка кр иоаппликатора	50
ХРОНИКА	51
ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИЙ	53

CONTENTS

<i>Chuyko V. A.</i> The mechanism of cryoprotective efficiency and pharmacologic properties of DMSO	3
<i>Gordiyenko E. A., Nekoz I. I.</i> The osmotic response to hypertonic solutions of non-penetrating cryoprotectants	11
<i>Zagoruyko G. E., Zagoruyko Yu. V., Babiychuk G. A.</i> The influence of craniocerebral hypothermia on the kinetics of parenchyma — stroma relations in white rat myocardium during tissue hypoxia	14
<i>Gakhova E. N., Chekurova N. R., Kislov A. N., Veprintsev B. N.</i> <i>Lymnaea stagnalis</i> L. brain neurones preserve their viability after deep freezing	19
<i>Tikhonova V. A., Yashina S. G., Polevaya V. S., Krasts I. V.</i> The effect of freezing of seeds on plant ontogenesis (Fischer's pink).	23
<i>Yesman S. S., Rikberg A. B., Sergiyenko V. P.</i> The intensification of cryodestruction with ultrasound. Modelling on a cell monolayer	28
<i>Lupaltsev V. I., Tsuprov Yu. V.</i> Active surgical treatment with cryoapplication of suppurative and necrotic lesions of soft tissues	33
<i>Zhegunov G. F., Kudokotseva E. V.</i> Peculiarities of lipid metabolism in ground squirrels on awakening from hibernation	36
<i>Parashchuk Yu. S., Shrago M. I., Kalugin Yu. V., Khanina L. A., Koshchiy S. V., Chernysh E. N.</i> The comparative estimation of cytotoxicity and cryoprotective efficiency of glycerol and its derivatives upon freezing of human sperm	40
<i>Dakhno F. V., Katalevskaya L. G., Bulba L. I.</i> The importance of the extent of oocyte maturation for <i>in vitro</i> fertilization and cryopreservation	43

SHORT COMMUNICATIONS

<i>Pavlova S. K.</i> Comparative investigation of the state of oligosaccharides of plasma membranes of ram and bovine sperm	45
<i>Pozdnyakov V. V., Bondarenko V. A.</i> The interrelation between initial osmotic medium conditions and erythrocyte sensitivity to hypertonic stress in 4 M NaCl	47
<i>Beigel M. Z., Kovalev O. I., Soboлева N. N., Trofimov V. I.</i> The effect of freezing on biological properties of suspension insulin specimens	49
<i>Vasilovsky V. Yu., Mkhitarianits A. M.</i> Thermally regulated nozzle of cryoapplicator	50

CHRONICLE	51
DEFENSE OF THESES	53

Адрес редакции:

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

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 14.10.88. Подп. в печ. 13.12.88. БЦ 23269. Формат 70 × 108/16. Бум. тип. № 1. Выс. печ. Усл. печ. л. 4,9. Уч. изд. л. 5,51. Усл. кр.-отт. 5,6. Тираж 1000 экз. Заказ № 8-924. Цена 65 к. Отпечатано с матриц Харьковской книжной фабрики им. М. В. Фрунзе в Харьковской городской типографии № 16. 310003, Харьков, Университетская, 16. Зак. 18.

В. А. Чуйко**МЕХАНИЗМ КРИОЗАЩИТНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ
И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ДМСО**

Высокая защитная эффективность ДМСО, относительно низкая токсичность, обратимость биологических эффектов способствовали широкому его использованию для консервации разнообразных биологических объектов от растительных клеток и микроорганизмов до высокоорганизованных тканей млекопитающих. Криозащитное действие ДМСО обуславливает целый ряд его химических и фармакологических свойств, которые выходят за рамки традиционных представлений о коллигативных эффектах соединений, обладающих криозащитным действием. Так, это соединение, наряду со способностью изменять физическое состояние воды, растворимость солей и органических растворителей, обладает выраженными противоишемическими и антиоксидантными свойствами [24, 31, 37] и повышает устойчивость тканей к повреждающему действию тепловой ишемии.

Сочетание в одном химическом соединении противоишемических и криопротекторных свойств выгодно отличает диметилсульфоксид от соединений, обладающих только одним из указанных свойств. Это позволяет существенно упростить сложные составы химических сред, используемых для стабилизации и криозащиты биологических объектов при их криоконсервировании, существенно снизить при этом побочные фармакологические или токсические эффекты соединений, применяемых с указанной целью. Химические соединения, используемые обычно с криозащитной целью, принято разделять, в зависимости от их способности проникать или не проникать в клетки, на проникающие и непроникающие. По своей химической природе к классу криопротекторов относится довольно обширная группа химических соединений: спиртов, амидов, гликолей, полисахаридов, белков, синтетических высокомолекулярных соединений [1]. Вещества с молекулярной массой ниже молекулярной массы сахарозы (342 Да), как правило, проникают в клетку, если молекулярная масса равна или выше этой величины, не проникают. Следует, однако, отметить, что деление криопротекторов на проникающие и непроникающие в зависимости от молекулярной массы этих соединений носит условный характер. Известны соединения, которые, несмотря на небольшую молекулярную массу, в клетки не проникают [24, 31]. Более того, некоторые криопротекторы, проникая в клетки одного вида, не проникают в клетки другого вида [24, 31, 37]. Поэтому при выборе криозащитного средства следует учитывать факторы, влияющие на его проникающую способность: структуру и свойства криопротектора, его молекулярную массу и размеры, наличие в молекуле тех или иных функциональных групп; характер его взаимодействия с растворителем и входящих в его состав ингредиентов (неорганических солей, глюкозы); коэффициент распределения в растворе липид — вода; наличие электрического заряда молекулы в растворе; концентрацию водородных ионов внутри клетки при проникновении в нее криопротектора; проницаемость мембраны для указанного соединения; температуру, при которой криопротектор вводится в биологическую систему [24, 31]. Существенное значение для проникновения криопротектора в клетки имеют также структурно-функциональные свойства самого биологического объекта. Так, для наиболее изученного с этой точки зрения диметилсульфоксида время проник-

новения в ткани в условиях их инкубации в растворах криопротектора колеблется от 5 до 60 мин. В срезы почки основное количество ДМСО поступает и равномерно распределяется между клетками и межклеточной жидкостью в первые 10 мин инкубации. В последующие сроки скорость проникновения резко снижается, и к 40-й минуте, когда в срезах почки достигается максимальная концентрация ДМСО 9 мМ/мг белка (в качестве основы для криопротектора используется среда Кребса-Ханзеляйта), дальнейшего поступления ДМСО в ткань практически не происходит [6]. В других опытах на срезах коры почки кролика установлено, что полупериод для транспорта 40 %-ного раствора ДМСО составляет 8 мин. Такая скорость проникновения ДМСО способствует лишь умеренному проявлению отрицательных последствий осмотического стресса при насыщении органа криопротектором или удалении его [6, 15, 18]. За 10 мин инкубации ткани роговицы в 7,5 %-ном водном растворе ДМСО в нее переходит 1,44 мМ криопротектора на 86 мг ткани, что составляет 1/4 часть ДМСО, присутствующего в растворе. После оттаивания и инкубации роговицы в течение 10 мин в растворе альбумина содержание ДМСО в ткани роговицы снижается на 0,94 мМ вследствие его освобождения из консервируемой ткани [11].

В работе Мейзура и соавт. [27, 30] исследована скорость проникновения ДМСО в ткань поджелудочной железы 17-дневного эмбриона крысы. Установлено, что указанное соединение имеет определенные преимущества перед глицерином. Так, полное насыщение поджелудочной железы ДМСО происходит при 0 °С за 10—15 мин, в то время как глицерин проникает в нее за 180 мин [19].

При исследовании захвата и освобождения $1\text{ M}^{14}\text{C}$ -ДМСО изолированными островками поджелудочной железы крысы выявлено, что полное равновесие между содержанием криопротектора в ткани островков и в среде инкубации при температуре 0 °С достигается за 5—15 мин. Максимум очищения ткани от диметилсульфоксида наблюдается за 3 мин. Температура инкубации, по-видимому, незначительно влияет на скорость проникновения ДМСО в островки, поэтому высказывается предположение о целесообразности проведения обработки тканей криопротектором не при физиологических температурах, а при 0 °С, поскольку в этих условиях снижается возможность проявления многообразных фармакологических эффектов используемого соединения [37, 19, 42].

Проникновение диметилсульфоксида в гладкомышечный препарат и распределение его в клетках и межклеточном пространстве занимает 20 мин при использовании 1,4 М (10 %) ДМСО [13] или 60 мин при 3 М (20 %) его концентрации [13, 30]. Прямая зависимость скорости насыщения ткани криопротектором от его концентрации обнаружена и другими исследователями. Так, максимальное проникновение ДМСО в ткань островков эмбриональной поджелудочной железы при 0 °С занимает 5 мин при использовании 1 М, и 15 мин — 2М концентрации криопротектора [19].

В некоторых тканях после достижения равновесия между концентрацией криопротектора внутри ткани и в среде инкубации происходит дальнейшее накопление ДМСО в тканях. Такое явление обнаружено при инкубации гладкой мышцы в течение 20 мин в 1,4 М или 60 мин — в 3 М растворе ДМСО [13], а также в срезах коры почки кролика [6]. Гипотеза, что указанное явление обусловлено связыванием ДМСО с макромолекулами клетки, прежде всего с белками, и этот процесс, по-видимому, сопровождается разнообразными биохимическими изменениями в инкубируемой ткани. Иногда эффект, оказываемый диметилсульфоксидом, может превосходить повреждающее действие замораживания. Например, ткань срезов почки сохраняет свою жизнеспособность при замораживании с 0,64 М ДМСО, несмотря на образовавшееся в ней при этом значительное количество льда и уменьшение ее объема на 75 % [15]. В то же время, если замораживание этой ткани проводить с 1,92 М ДМСО, то срезы почки утрачивают свою жизнеспособ-

ность, хотя при этом процесс кристаллообразования выражен значительно меньше. В условиях инкубации тонких и небольших по массе срезов ткани в 0,64—2 М растворах ДМСО процесс насыщения происходит быстрее, чем при перфузии органа массой 4—5 г 3 М его раствором [36].

О механизмах проникновения ДМСО в клетку высказано несколько предположений. Исследования, проведенные на дрожжевых клетках, позволили предположить, что механизм, с помощью которого это соединение проникает внутрь клетки, описывается уравнением первого порядка [9]. Это указывает на тип пассивного транспорта, диффузию. Энергия активации для данного процесса составляет 20—26 ккал/моль, что находится в соответствии с представлениями о проникновении растворителя через гидрофобный диффузионный барьер. Скорость транспорта ДМСО через мембрану усиливается при добавлении NaCl и хлорпромазина и не изменяется под влиянием ингибитора клеточного метаболизма — иодацетата. Имеются и другие наблюдения, где характер поступления ДМСО в клетку сопоставляется с проникновением в нее спиртов, ацетона [10].

В основе проникновения диметилсульфоксида в клетки, как полагают, лежит взаимодействие указанного соединения с липидами. Основанием для такого предположения служат модельные опыты с изолированными фосфолипидами [32]. В них установлено, что при взаимодействии ДМСО с олеиновой и линоленовой кислотами в ИК спектре этих кислот исчезают или уменьшаются полосы, характеризующие *цис*-конфигурацию атомов водорода при двойной связи, что, как предполагают, связано с образованием соединения, в котором наблюдается *цис-транс*-переход заместителей при двойной связи и изменяется микроконформация молекул фосфолипидов. В результате указанных молекулярных перестроек углеводородные цепи жирных кислот могут размещаться в молекуле кефалина параллельно друг другу, а при нахождении двойных связей в положении *цис-транс*, которое, согласно экспериментальным данным, возникает при действии ДМСО на линоленовую кислоту, углеводородные цепи обеих кислот расходятся. При этом возникает пространство, достаточное для прохождения ионов K^+ и Na^+ в гидратированной форме, других молекул, а также самого ДМСО.

Имеется также точка зрения, что в основе вызванного диметилсульфоксидом увеличения проницаемости мембран лежит способность этого вещества взаимодействовать с белками [41], она противоречит предположению об участии в этих процессах липидов. Экспериментальной основой для таких выводов служит наблюдение, что поверхностное давление пленок холестерина и фосфолипидов (дипальмитоиллецитина и яичного лецитина) под действием ДМСО не изменяется, в то время как изменяется поверхностное давление смешанных пленок фосфолипида и белка [40, 41]. Аналогичные результаты получены [29, 33] при действии на мембраны и их компоненты бензилового спирта. Высказано мнение, что влияние ДМСО на проницаемость мембран может быть связано с изменением структуры белка в результате дегидратации мембраны.

Однако наибольший интерес с точки зрения механизма проникновения ДМСО в клетку представляют данные о влиянии его на микрокапиллярную систему клетки, через которую указанное соединение не только проникает в клетку, но и циркулирует в ней, взаимодействуя с ее органеллами и компартментами [35, 37]. Указанная микрокапиллярная система клеток, которая была обнаружена с помощью электронно-микроскопических и иммуноцитохимических методов, обеспечивает не хаотическое распределение поступающих через мембрану в клетку субстратов и ионов, а направленный их транспорт к центру клетки, обеспечивая метаболизм внутри клетки за счет проникновения необходимых соединений в ее органеллы и компартменты. Гипотеза, разработанная Сэнборном, помогла объяснить механизм действия ДМСО на ткани с нарушенной вследствие механических повреждений циркуляцией. Она явилась тем «ключом», который помог открыть

такие до сих пор необъяснимые эффекты ДМСО, как очень быстрое его проникновение через кожу и поступление в системное кровообращение, а также эффективное купирование критических состояний, вызванных нарушением мозгового и кардиального кровообращения, ишемией почки, повреждением спинного мозга [2, 21, 37, 42].

В соответствии с представлениями Сэнборна, добавление 5 %-ного ДМСО к таким тканям, как тиреоидная и почечная паренхима, эпителий кишечника, вызывает значительное увеличение размеров мембранных структур и открытие мембранных «пор», которыми заканчивается на мембране микроциркуляторная тубулярная сеть, пронизывающая всю клетку. Функционирование пор обеспечивается сократительными филаментами, чувствительными к актину. Формирование открытых каналов, идущих по направлению к фолликулярным клеткам щитовидной железы и поверхности эпителия кишечника, дало основание высказать предположение, что ДМСО может проникать в клетку, не нарушая при этом мембранный барьер; отмечено также, что апикальные гранулы в щитовидной железе взаимосвязаны и открываются через протоки и в просвет фолликула, в связи с чем нет необходимости для его транспорта с использованием изолированных везикул в клетки. Методом ауторадиографии показано, что движение содержимого этих маленьких по размеру везикул происходит по направлению к протоку фолликула. Аналогичные наблюдения сделаны на секретирующих клетках яйцеводов кур. На основании проведенных исследований высказывается предположение, что ДМСО способствует образованию структурных элементов цитоскелета между различными органеллами клеток. При этом происходит открытие потенциальных пор в клеточной мембране, что позволяет проникать через нее различным субстратам, которые в обычных условиях в клетку не поступают. Поры открываются обычно непосредственно в каналы, представляющие собой часть сложной капиллярной системы для большинства клеток.

Вопрос проникновения криопротекторов в клетки тесно связан с проблемой механизма действия криопротектора. Поскольку считается, что скорость замораживания определяет локализацию кристаллообразования (быстрая приводит к внутриклеточной, а медленная — к внеклеточной кристаллизации [3, 26]), то для защиты от внутриклеточных криоповреждений предложено использовать проникающие, а внеклеточных — непроникающие криопротекторы. Вместе с тем указанный подход довольно упрощен и в значительной мере противоречив. Он не учитывает значения всех многообразных факторов криоповреждений, не вскрывает механизм действия криопротекторов. Так, по данным Ловлока, криозащитное действие глицерина при замораживании эритроцитов может быть обеспечено как при проникновении данного криопротектора в клетку, так и при блокировании этого процесса ионами меди [18]. В опытах по замораживанию эмбрионов мышей также представлены доказательства, что для проявления криозащитного эффекта диметилсульфоксида проникновение указанного криопротектора в ткань не имеет принципиального значения. На это указывает одинаковый процент выживших эмбрионов как после 20 с инкубации (когда криопротектор еще не успевает проникнуть в исследуемый биологический объект), так и после инкубации в течение 10, 20 и 60 мин, которая сопровождается проникновением в ткани эмбриона ДМСО [27].

Более прогрессивными оказались попытки связать механизм криозащитного действия некоторых криопротекторов, прежде всего глицерина и диметилсульфоксида, с наличием так называемых коллигативных свойств [24, 31]. Согласно этим представлениям, проникающие в клетку криопротекторы оказывают защитный эффект за счет снижения температуры начала кристаллизации жидкой фазы и нивелирования осмотических эффектов. Благодаря указанным эффектам криопротекторов снижается повреждающее действие градиента концентрации электролитов. Уменьшение потери воды клеткой происходит также за счет связывания свободной воды крио-

протектором внутри клетки и увеличения осмотического давления внеклеточной жидкости. Вместе с тем, несмотря на важное значение для криобиологии гипотезы о коллигативных механизмах криозащитных соединений, она не дает исчерпывающего ответа на вопрос о механизме действия криопротекторов [37]. Не лишена указанная гипотеза и отдельных противоречий. В частности, в нее не укладываются представления о защитном действии, которое оказывает ДМСО при гипертоническом стрессе в незамороженных биологических объектах, равно как и криозащитные эффекты, оказываемые физиологическими концентрациями непроникающих криопротекторов: оксиэтилированным крахмалом и поливинилпирролидоном. Вряд ли этот феномен можно объяснить исключительно способностью клеток к экзоцитозу крупных молекул [31, 13].

Более универсальной и научно обоснованной гипотезой о механизме действия криопротекторов является концепция Кэроу [23, 24, 25]. По мнению этого автора, действие криопротекторов обусловлено следующими эффектами: частичной осмотической дегидратацией клеток; витрификацией клеточной воды благодаря замедлению образования кристаллов льда; способностью криопротекторов к образованию водородных связей, в результате чего при взаимодействии с макромолекулами сохраняется связанная вода, необходимая для их гидратации и стабилизации; замещением молекул связанной воды в белках молекулами криопротекторов (это действие отличается от указанных выше свойств криопротекторов тем, что в данном случае стабилизация молекул белка происходит уже после исчезновения гидратной оболочки в результате замораживания, а не за счет непосредственного замещения связанной воды криопротектором); хелатированием ионов поливалентных металлов криопротекторами. Указанная концепция объясняет многие эффекты криопротекторов как проникающего, так и непроникающего типа, поскольку всем соединениям этого класса присуще свойство стабилизировать макромолекулы, а взаимодействуя в той или иной степени с мембраной клетки, они могут реализовать свое защитное влияние путем изменения ее физико-химических характеристик или функциональных свойств при действии неблагоприятных факторов: создания высококонцентрированных растворов органических и неорганических соединений, осмотического сжатия, формирования в клетке участков нестабильности за счет изменения состава и характера распределения внутримембранных частиц, обусловленного фазово-структурными переходами в липидах мембран [28].

Наиболее распространенные криопротекторы (ДМСО, глицерин, декстран, оксиэтилкрахмал, ПВП) являются поверхностно активными соединениями и способны оказывать стабилизирующее влияние на процесс денатурации белков [7, 17, 41]. Это свойство обусловлено способностью этих соединений к образованию водородных связей с водой [34, 38]. Некоторые непроникающие криопротекторы могут взаимодействовать с гидрофобными областями мембраны [24, 40], способствуя при этом увеличению их эластичности и сохранению функциональных свойств клеток в условиях действия на них при замораживании механических напряжений. Вместе с тем имеются доказательства того, что ДМСО и глицерин в концентрациях, используемых обычно при криопротекции, могут повышать вязкость и существенно снижать температуру фазового перехода липидов, способствуя увеличению сопротивляемости мембран осмотическому стрессу и появлению микротрещин и микроразрывов в клеточной мембране. Более того, установлено, что ДМСО и глицерин могут не только предотвращать, но и восстанавливать структуру белков после действия на нее высоких концентраций мочевины или гуанидина [17, 20]. Комбинация декстрана с глицерином или ДМСО (равные объемы) обеспечивает аддитивность и даже потенцирование эффектов криопротекторов, направленных на стабилизацию конформационного состояния белков [13, 22]. Эти наблюдения позволили обосновать некоторые физико-химические положения о механизме действия криопротекторов, целесообразности тех или иных их сочетаний или неблагоприятном

действии определенных комбинаций криопротекторов [13, 37], определить роль в защитном действии криопротекторов величины диэлектрической постоянной среды [39], концентрации водородных ионов, характер ионного состава среды [12].

Стабилизирующее влияние криопротекторов при замораживании проявляется в обеспечении активности каталитических процессов при измененных оптимумах pH , частичной денатурации белков, концентрировании ионов. Диметилсульфоксид повышает растворимость обычно плохо растворимых и выпадающих в осадок ионов (бикарбонатов, фосфатов, кальция и магния [12, 19]), восстанавливает структуру белков [17, 24], способствует функционированию транспортных процессов в мембране, направленных на поддержание ионной асимметрии и сохранение клеточного объема [8, 9, 21].

В развитии представлений о дискретных механизмах в действии криопротекторов определенный интерес представляют данные о защитном влиянии криопротекторов на мембранные гликопротеины, выполняющие функции структурных элементов и рецепторов [19, 37].

Особое значение в криозащитном действии диметилсульфоксида и глицерина имеет их способность захватывать свободные гидроксильные радикалы, образующиеся под влиянием замораживания в мембранах митохондрий и микросом, предотвращая при этом мембранные структуры от токсического действия продуктов, образующихся при перекисном окислении липидов [4, 5].

Способность криопротекторов выступать в качестве фактора, модулирующего скорость замораживания, также играет важную роль в повышении эффективности криоконсервирования [3].

Представления о дискретных механизмах криопротекции, впоследствии получившие развитие в работах Шлафера [37], включают в себя способность криопротекторов проявлять не только общие, характерные для всех представителей этого класса веществ свойства, которые мы только что рассмотрели, но и черты, которые присущи только определенному криопротектору при его взаимодействии с конкретной тканью, органом. Данное положение основывается на значительном количестве экспериментальных данных, показывающих, что некоторые криопротекторы, преимущественно проникающего типа, не являются, как считалось до недавнего времени, биологически индифферентными соединениями, способными проявлять только криозащитный эффект, а обладают широчайшим диапазоном биологических эффектов на молекулярном, субклеточном, клеточном, тканевом и органном уровнях. Причем указанные свойства таких криопротекторов проявляются уже в концентрациях, которые в 100—1000 раз ниже применяющихся с криозащитной целью. В связи с многообразными биологическими эффектами ряда криопротекторов, в первую очередь диметилсульфоксида, при выборе вида криопротектора необходимо учитывать его способность оказывать защитное действие при замораживании и изменять некоторые биохимические процессы в ткани или органе. Данный подход позволяет не только выбрать наиболее эффективный криопротектор, но и выделить в повреждающем действии криоконсервации эффект, вызываемый непосредственно криопротектором, и эффект, производимый замораживанием. Так, в опытах, проведенных на срезах почки, было показано, что оптимальной концентрацией для сохранения ее в жизнеспособном состоянии при замораживании является концентрация ДМСО 0,64 М, что почти вдвое ниже того минимального количества этого соединения, которое применяется с криозащитной целью. Применение указанной концентрации диметилсульфоксида позволяет сохранить жизнеспособность срезов почки, несмотря на образование в ткани значительного количества кристаллов льда и уменьшение ее объема на 75 %. В то же время использование 1,92 М раствора ДМСО, препятствующего кристаллообразованию в ткани, не оказывает выраженного защитного эффекта при ее замораживании [14, 15, 16].

Большинство эффектов диметилсульфоксида являются обратимыми и исчезают после удаления криопротектора. Это обстоятельство следует учитывать при выборе криопротектора и определении его концентрации. Вместе с тем отдельные фармакологические эффекты ДМСО можно устранить добавлением некоторых фармакологических средств. Так, кардиотропное действие, производимое 140 мМ ДМСО на изолированное сердце, устраняется добавлением 10 мМ атропина. Некоторые фармакологические эффекты диметилсульфоксида, оказывающие обратимое действие на сердце, могут использоваться в процессе консервации. В частности, действие ДМСО, приводящее к снижению сократительной активности миокарда, может быть применено для остановки сердца в состоянии диастолы в процессе его насыщения криопротектором [37]. Это позволяет сохранить в мышце значительное количество АТФ и равномерно насытить данный орган перфузатом.

Таким образом, имеющиеся в научной литературе данные свидетельствуют о том, что ДМСО обладает разнообразными химическими свойствами, оказывает многогранное биологическое действие на молекулярном, субклеточном, клеточном, тканевом, органном и организменном уровнях. Это обстоятельство позволяет предполагать, что суммарный криозащитный эффект ДМСО объясняется не только его коллигативными свойствами, с чем обычно связывают защитный эффект криопротекторов, но определяется многообразными биологическими эффектами этого соединения. Благодаря этим эффектам ДМСО способен предотвращать разрушение клеток и тканей при замораживании, стимулировать репаративные процессы после консервации, повышая тем самым жизнеспособность трансплантата, оказывать противовоспалительное и противоишемическое действие, обеспечивая благоприятные условия для приживания трансплантата и восстановления его жизнеспособности.

1. Шраго М. И. Биологические антифризы и криопротекторы // Криобиология и криомедицина.— 1977.— Вып. 3.— С. 81—83.
2. Alsup M. Dimethyl sulfoxide // J. Amer. Vet. Med. Assoc.— 1984.— 185, N 9.— P. 1011—1014.
3. Bendayan M., Sanborn E. B., Rasio E. The intracellular capillary endot helium in microcirculation.— New York: Plenum Publ. Corp., 1978.— 169 p.
4. Bruce C. G., Norman R. O. C., Seely R. C. Electron spin resonance studies. Reaction of dimethyl sulfoxide with hydroxyl radical // J. C. S. Perkin II.— 1975.— 2, N 4.— P. 303—308.
5. Cederbaum J. L., Dicker E., Rubin E., Cohen C. The effect of dimethyl sulfoxide and other hydroxyl radical scavengers on the oxidation of ethanol by rat liver microsomes // Biochem. Biophys. Res. Commun.— 1977.— 78, N 4.— P. 1254—1262.
6. Clark P., Fahy G. M., Karow A. M. Factors influencing renal cryopreservation. Effects of three vehicle solutions and the permeation kinetics of three cryoprotectants with rabbit cortical slices // Cryobiology.— 1984.— 21, N 2.— P. 260—273.
7. Colonna G., Alexander S. S., Yamade R. M., Pastam I. The stability of cell surface protein to surfactants and denaturants // J. Biol. Chem.— 1978.— 253, N 21.— P. 7787—7790.
8. DeBeran P. D. Dimethyl sulfoxide as a potential pool for analysis of compartmentalization in living plant cells // Plant. Physiol.— 1979.— 64, N 4.— P. 6323—6329.
9. De Bruijne A. W., Steveninck J. V. Asymmetry of the yeast cell membrane with respect to influx and efflux of dimethyl sulfoxide // Biochim et biophys. acta.— 1970.— 211, N 4.— P. 555—564.
10. De Bruijne A. W., Steveninck J. V. The influence of dimethyl sulfoxide on the red cell membrane // Biochem. Pharmacol.— 1974.— 23, N 23.— P. 3243—3258.
11. Edelhauser H. F., Gallun A. B., Van Horn D. L., Schuliz R. O. Uptake and removal of dimethyl sulfoxide in rabbit and human corneas during cryopreservation // Cryobiology.— 1971.— 8, N 1.— P. 104—107.
12. Eharach N., Thyagarajen B. S. Structural basis for biological activities of dimethyl sulfoxide // Ann. N. Y. Acad. Sci.— 1984.— 411, N 4.— P. 391—404.
13. Elford B. C. Functional recovery of smooth muscle after exposure to dimethyl sulfoxide and low temperatures // Cryobiology.— 1970.— 7, N 2.— P. 148—153.
14. Fahy G. M. Analysis of «solution effects» injury; rabbit renal cortex frozen in the presence of dimethyl sulfoxide // Ibid.— 1980.— 17, N 4.— P. 371—388.
15. Fahy G. M. Cryoprotectant toxicity: biochemical or osmotic? // Cryo-Lett.— 1984.— 5, N 9.— P. 79—90.

16. Fahy G. M. Analysis of «solution effects» injury; cooling rate dependence of the functional and morphological sequelae of freezing in rabbit renal cortex protected with dimethyl sulfoxide // *Cryobiology*.— 1981.— 18, N 6.— P. 550—570.
17. Fujita V., Izumiguchi S., Noda Y. Effect of dimethyl sulfoxide and its homologous on the thermal denaturation of lysosome as measured by differential scanning calorimetry // *Int. J. Peptide a. Protein Res.*— 1982.— 19, N 1.— P. 25—31.
18. Farrant J. Is there a common mechanism of protection of living cells by polyvinylpyrrolidone and glycerol during freezing? // *Nature*.— 1969.— 222, N 5191.— P. 1175—1176.
19. Gordon C., Wise M. H. Permeation of dimethyl sulfoxide in isolated adult porcine islets of Langerhans // *Cryo-Lett.*— 1984.— 5, N 1— P. 47—63.
20. Herskovitz T. T. Nonaqueous solutions of DNA factors favouring the stability of the helical configuration in solution // *Arch. Biochem. Biophys.*— 1962.— 97, N 3.— P. 474—484.
21. Jacob S. W., Herchler R. J., Bichel M. D. DMSO effects on permeability of biological membranes // *Curr. Therap. Res. Clin. Exptl.*— 1964.— 6, N 2.— P. 193—198.
22. Jacobsen I. A., Pegg D. E. Cryopreservation of organs: A review // *Cryobiology*.— 1984.— 21, N 4.— P. 377—384.
23. Karow A. M. Biophysical and chemical considerations // *Organ Preservation for Transplantation*.— New York; Basel: Marcel Dekker, 1981.— P. 113—142.
24. Karow A. M. Cryoprotectants. A new class of drugs // *J. Pharm. Pharmacol.*— 1969.— 21, N 2.— P. 209—217.
25. Karow A. M. Problems of organ preservation // *Organ Preservation for Transplantation*.— New York; Basel: Marcel Dekker, 1981.— P. 517—552.
26. Leibo S. P., Mazur P. The role of cooling rates in low temperature preservation // *Cryobiology*.— 1971.— 8, N 4.— P. 447—452.
27. Leibo S. P., Mazur P. The role of glycerol and dimethyl sulfoxide in protecting mouse embryos against freezing damage // *J. Cell. Biol.*— 1974.— 63, N 2.— P. 189.
28. Lepock J. R., Morse P. D., Kruuv J., Keith A. D. A model system approach to freezing injury using lobster sarcoplasmic reticulum // *Biophys. J.*— 1975.— 15, N 2.— P. 15a.
29. Lyman G. H., Preisler N. D., Papahadjopoulos D. Membrane action of DMSO and other chemical inducers of friend leukemic cell differentiation // *Nature*.— 1976.— 262, N 5567.— P. 360—363.
30. Mazur P., Kemp J. A., Miller R. H. Survival of foetal rat pancreas frozen to -78 and -196°C // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.— 1976.— 73, N 11.— P. 4105—4109.
31. Mazur P. Fundamental cryobiology and the preservation of organs by freezing // *Organ Preservation for Transplantation*.— New York; Basel: Marcel Dekker, 1981.— P. 143—176.
32. Muset P., Martin-Esteve I. Physiological cell permeability and pharmacological action of DMSO // *Experientia*.— 1965.— 21, N 11.— P. 649—651.
33. Nicolson G. L., Smith J. R., Poste G. Effects of local anesthetics on cell morphology and membrane associated cytoskeletal organization in BAIB / 373 cells // *J. Cell. Biol.*— 1976.— 68, N 2.— P. 395—402.
34. Rammler D. M., Zaffaroni A. Biological implications of DMSO based on a review of the chemical properties // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*— 1967.— 141, N 1.— P. 13—23.
35. Sandborn N., Stephens N., Bendayan M. The influence of dimethyl sulfoxide on cellular ultrastructure and cytochemistry // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*— 1975.— 243, N 1.— P. 122—138.
36. Segal N. B., Guilman F. M. Function of 47 rabbit kidneys *in vitro* at normothermia following equilibration with 3 M Me_2SO and removal by hypertonic wash-out at 10°C // *Cryobiology*.— 1972.— 19, N 1.— P. 50—60.
37. Shlafer M. Pharmacological considerations in cryopreservation // *Organ Preservation for Transplantation*.— New York; Basel: Marcel Dekker, 1981.— P. 117—211.
38. 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.
39. Taylor M. J., Pignat Y. Practical acid dissociation constants, temperature coefficients and buffer capacities for some biological buffers in solutions containing dimethyl sulfoxide between 25 and -12°C // *Cryobiology*.— 1982.— 19, N 1.— P. 99—109.
40. Weiner N. D., Lu M. Y., Rosoff M. Interactions of dimethyl sulfoxide with lipid and protein monolayers // *J. Pharmacol. Sci.*— 1972.— 61, N 7.— P. 1098—1101.
41. Williams R. J., Harris D. The distribution of cryoprotective agents into lipid interfaces // *Cryobiology*.— 1977.— 14, N 6.— P. 670—680.
42. Wood D. C., Wood J. Pharmacologic and biochemical considerations of dimethyl sulfoxide // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*— 243, N 1.— P. 1—19.

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

Поступила 29.03.88

ОСМОТИЧЕСКАЯ РЕАКЦИЯ ЭРИТРОЦИТОВ НА КОНТАКТ С ГИПЕРТОНИЧЕСКИМИ РАСТВОРАМИ НЕПРОНИКАЮЩЕГО КРИОПРОТЕКТОРА

Криобиологам хорошо известен тот факт, что сохранность деконсервированной эритроцитной массы сильно зависит от ее гематокрита, концентрации криопротектора в криозащитной среде и разведения (отношения объема суспензии эритроцитов к объему криозащитной среды) [1, 4, 6].

Нами изучено влияние указанных параметров на сохранность эритроцитов в период экспозиции клеток с водным раствором непроникающего через мембрану клеток криопротектора: полиэтиленоксида с молекулярной массой 1500 (ПЭО-1500). Концентрации криопротектора в суспензии составляли 15, 25, 35 и 45 %. При расчете концентрации и приготовлении растворов считалось, что независимо от концентрации эритроцитов в плазме эритроцитная масса разбавляет раствор криопротектора так же, как и плазма. Разведение Φ в наших экспериментах принимало значения 1:5, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 5:1, а исходные концентрации эритроцитов $\Phi = 0,1; 1,0; 10$, где

$\Phi = \frac{V_{0in}}{V_{0ext}}$, V_{0in} — объем эритроцитов в суспензии, V_{0ext} — объем плазмы.

После 30 с перемешивания к эритроцитной массе добавляли исследуемый раствор криопротектора одной порцией. Образец перемешивался в течение 5 мин, затем определяли сохранность эритроцитов по уровню процентного гемолиза по формуле:

$$Hb \% = \frac{Hb_m}{Hb_s} \cdot \frac{\frac{1}{\Phi} + \left(1 + \frac{1}{\Phi}\right) \cdot \frac{1}{\Phi}}{1 + \frac{1}{\Phi}},$$

где Hb_m — уровень свободного гемоглобина в суспензионной среде, Hb_s — уровень общего гемоглобина в суспензии.

Как видно из таблицы, на этапе экспозиции с криопротектором оптимальными оказываются следующие значения параметров: $\Phi = 1$; $\phi = 1:1$; $\pi_{\infty cr} = 25\%$. При этом значение показателя сохранности эритроцитов почти не изменяется при отклонении параметра ϕ от оптимального значения вплоть до 1:5. Коррелирует ли сохранность эритроцитов на этом этапе с объемом или скоростью изменения объема клеток? Этот вопрос возникает в связи с гипотезой «минимального объема» [5] и предположением Ф. И. Осташко [2,3] о возможности повреждения мембран при быстрым оттоке воды из клеток.

Зависимость гемолиза эритроцитов после пятиминутного контакта с гипертоническими растворами ПЭО-1500 при различных значениях параметров $\pi_{\infty cr}$, ϕ и Φ

Hb, %			Разведение, Φ	Конечная концентрация криопротектора, $\pi_{\infty cr}$
$\Phi: 0,1$	1,0	10		
3,6 ± 1,0	0,9 ± 0,2	0,65 ± 0,39	1:5	15
1,9 ± 0,5	0,12 ± 0,08	0,41 ± 0,39	1:5	25
4,8 ± 0,6	0,48 ± 0,12	0,21 ± 0,12	1:5	35
4,5 ± 0,3	1,4 ± 0,9	0,79 ± 0,40	1:5	45
1,8 ± 0,2	0,54 ± 0,04	0,41 ± 0,23	1:3	15
1,4 ± 0,4	0,13 ± 0,02	0,54 ± 0,48	1:3	25
3,5 ± 1,1	0,56 ± 0,10	0,22 ± 0,06	1:3	35
6,2 ± 1,2	0,89 ± 0,14	1,2 ± 0,3	1:3	45
1,6 ± 0,4	0,55 ± 0,08	0,61 ± 0,40	1:2	15
1,7 ± 0,4	0,17 ± 0,03	0,42 ± 0,39	1:2	25
3,6 ± 1,0	0,53 ± 0,07	0,25 ± 0,05	1:2	35
3,9 ± 0,1	1,4 ± 0,9	1,4 ± 0,4	1:2	45
1,5 ± 0,5	0,45 ± 0,07	3,6 ± 3,1	1:1	15
1,2 ± 0,2	0,09 ± 0,02	0,29 ± 0,23	1:1	25
2,2 ± 0,2	0,40 ± 0,05	0,32 ± 0,00	1:1	35
30,9 ± 6,7	5,4 ± 2,3	1,6 ± 0,4	1:1	45
1,3 ± 0,3	0,8 ± 0,3	4,3 ± 2,6	2:1	15
1,2 ± 0,2	0,34 ± 0,18	0,7 ± 0,18	2:1	25
1,5 ± 0,5	0,65 ± 0,25	3,8 ± 0,9	3:1	15
2,6 ± 0,7	0,93 ± 0,59	8,1 ± 4,1	5:1	15

Рассмотрим процесс обезвоживания клетки в гипертоническом растворе, считая, что в отличие от растворителя (воды) растворенные в системе вещества не проникают через плазматическую мембрану. В этом случае процесс изменения объема клетки описывается дифференциальным уравнением

$$\frac{dV}{dt} = SL_p [\pi^i - \pi^e - \Delta p], \quad (1)$$

где t — время, π^e и π^i — суммарное осмотическое давление растворенных вне и внутри клетки веществ, Δp — перепад гидростатического давления на мембране клетки, S и L_p — площадь поверхности и коэффициент фильтрации клеточной мембраны. Поскольку основным препятствием для диффузии в системе являются клеточные мембраны, градиентами осмотического давления внутри и вне клеток можно пренебречь. В силу закона сохранения массы растворенных в системе веществ имеем

$$\pi^e = (\pi_\infty - g_0 \pi_0^i) / \left(1 - g_0 \frac{V}{V_0}\right), \quad (2)$$

где g_0 — начальное значение отношения суммарного объема клеток к полному объему системы (в случае эритроцитов — гематокрит), π_0^i — начальное значение суммарного осмотического давления внутри клетки, π_∞ — асимптотическое значение суммарного осмотического давления растворенных в суспензии веществ, соответствующее их равномерному распределению вдоль системы, V_0 — начальный объем клеток.

Легко показать, что

$$\pi_\infty = \pi_{\infty \text{ cr}} + \frac{\Phi}{1 + \Phi} \pi_0^i,$$

где $\pi_{\infty \text{ cr}}^i$ — асимптотическое значение осмотического давления растворенного вне клеток криопротектора, соответствующее его равномерному распределению вдоль системы, а Φ — начальное значение отношения объема клеточной суспензии к объему раствора криопротектора, с которым суспензия смешивается (то есть разведение). Объемная концентрация эритроцитов в эритроmasсе до смешения с раствором криопротектора Φ связана с исходным гематокритом в криозащитной среде g_0 следующим соотношением:

$$\Phi = \frac{g_0 (1 + \Phi)}{g_0 (1 + \Phi) - \Phi}.$$

Осмотическое давление внутриклеточного раствора, очевидно, равно

$$\pi^i = \pi_0^i V_0 / V. \quad (3)$$

С учетом (2) и (3) уравнение (1) принимает вид

$$\frac{dV}{dt} = SL_p \left[\frac{\pi_0^i V_0}{V} - \frac{\pi_\infty - g_0 \pi_0^i}{1 - g_0 V / V_0} \right]. \quad (4)$$

Здесь перепадом гидростатического давления на мембране Δp мы пренебрегаем в связи с тем, что при обезвоживании клетки ее мембране энергетически выгодно деформироваться путем изгиба, а не растяжения или сжатия. При такого типа деформациях площадь поверхности мембраны остается неизменной, а перепад давления на ней ничтожно мал по сравнению с перепадом давления, возникающим при растяжении мембраны. Введя обозначения

$$\kappa \equiv \frac{V}{V_0} \text{ и } \frac{1}{\tau_0} = \gamma_0 L_p \pi_0^i,$$

где γ_0 — поверхностно-объемное отношение клетки в исходном состоянии, вместо уравнения (4) получаем

$$\frac{d\kappa}{dt} = \frac{1}{\tau_0} \left(1 - \frac{\pi_\infty}{\pi_0^i} \kappa \right) \frac{1}{\kappa (1 - g_0 \kappa)}, \quad (5)$$

решение которого при начальном условии $\kappa(0) = 1$ есть

$$\frac{t}{\tau_0} = a(1 - \kappa)(1 - g_0 a) - \frac{1}{2} g_0 a(1 - \kappa^2) + a^2(1 - g_0 a) \ln \frac{1 - a}{\kappa - a}, \quad (6)$$

где $a \equiv \pi_0^i / \pi_\infty$. Графики изменения относительного объема клетки V/V_0 от безразмерного времени t/τ_0 , рассчитанные по (6) при различных значениях параметров задачи g_0 и a , представлены на рис. 1 и 2.

Исходя из (6), можно найти значение минимального объема при контакте с гипертонической средой (в зависимости от гематокрита, разведения

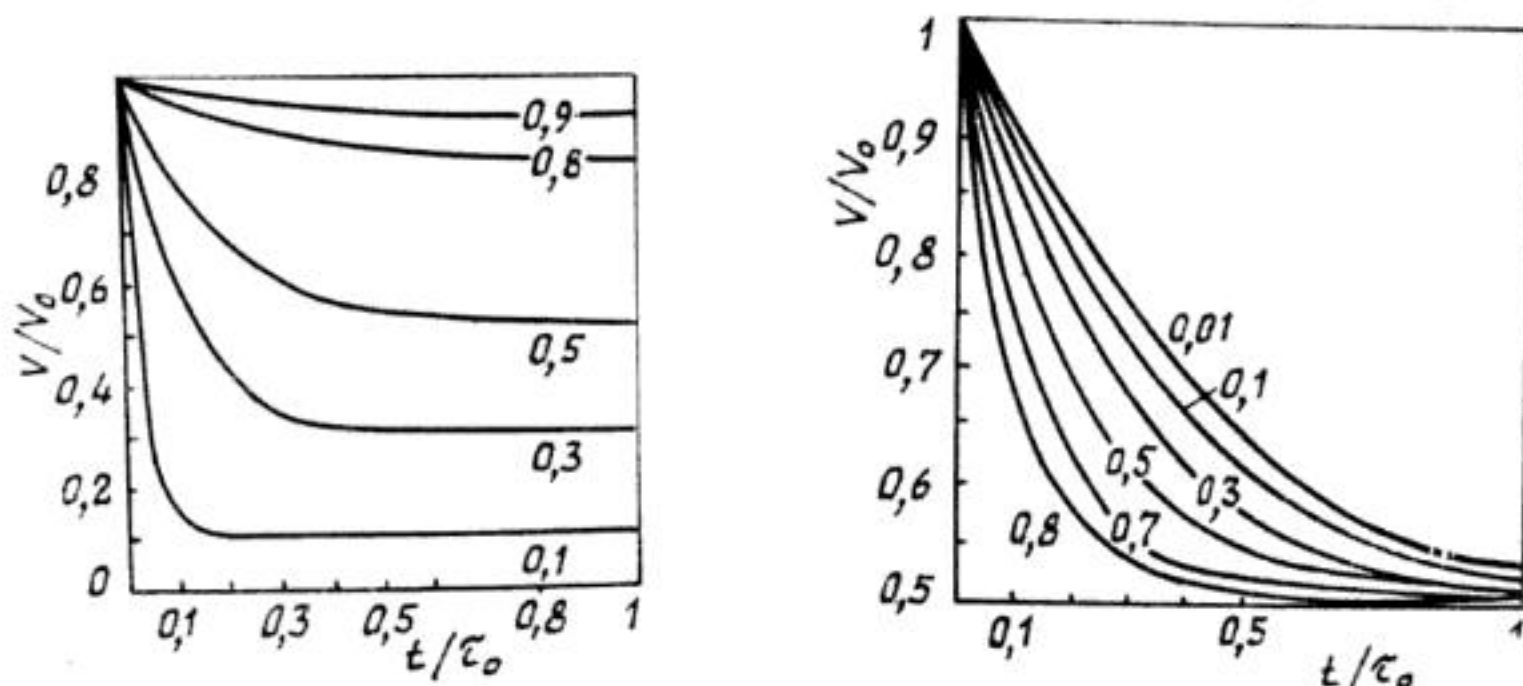


Рис. 1. Зависимость относительного объема клеток от времени при различных значениях параметра a

Рис. 2. Зависимость относительного объема клеток от времени при различных значениях параметра g_0

и концентрации криопротектора), а также максимальной скорости изменения клеточного объема, которые достигаются при заданных значениях g_0 и $\frac{\pi_0^i}{\pi_\infty}$:

$$\kappa_{\min} = \frac{V_{\min}}{V_0} = a,$$

$$|\dot{\kappa}_{\text{extr}}| = \frac{1}{\tau_0} \frac{1 - a}{a(1 - g_0)}.$$

Как минимальный объем, так и максимальная по модулю скорость обезвоживания клеток монотонно зависят от параметров a и g_0 , а вместе с ними и от параметров Φ , ϕ и $\pi_{\infty \text{ cr}}$, в то время как в эксперименте оптимальные значения сохранности достигаются при промежуточных значениях этих параметров. Таким образом, сопоставление теоретических результатов с экспериментальными приводит к выводу о том, что сохранность эритроцитов на этапе экспозиции их с ПЭО-1500 не коррелирует с объемом обезвоженных клеток или со скоростью их обезвоживания.

1. Пушкарь Н. С., Шраго М. И., Белоус А. М., Калугин Ю. В. Криопротекторы. — Киев: Наук. думка, 1978. — 204 с.
2. Осташко Ф. И. О природе холодового удара живчиков // Искусственное осеменение сельскохозяйственных животных. — Харьков: Прапор, 1963. — С. 22—40.
3. Осташко Ф. И. Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей. — Киев: Урожай, 1968. — 248 с.
4. Mazur P., Cole K. W. Influence of cell concentration on the contribution of unfrozen fraction and salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes // Cryobiology. — 1985. — 22, N 6. — P. 509—536.
5. Meryman H. T. The exceeding of minimum tolerable cell volume in hypertonic suspension as a cause of freezing injury // The Frozen Cell. — London: Churchill, 1970. — P. 10—67.
6. Nei T. Effect of initial cell concentration on the post-thaw hemolysis of frozen erythrocytes // Cryobiology. — 1976. — 13, N 6. — P. 651.

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

Поступила 25.02.87

Г. Е. Загоруйко, Ю. В. Загоруйко, Г. А. Бабийчук

ВЛИЯНИЕ КРАНИОЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ГИПОТЕРМИИ НА КИНЕТИКУ ПАРЕНХИМАТОЗНО-СТРОМАЛЬНЫХ ОТНОШЕНИЙ В МИОКАРДЕ БЕЛЫХ КРЫС ПРИ ТКАНЕВОЙ ГИПОКСИИ

Известно, что ряд современных средств для неингаляционного наркоза обладает побочным токсическим действием на организм и вызывает депрессию респираторного и вазомоторного центров, снижает сердечный выброс, уменьшает коронарный кровоток, нарушает кровоснабжение сердечной мышцы [4, 16]. Каким бы ни было первичное токсическое повреждение, оно рано или поздно приводит к нарушению жизненно важных функций организма и в первую очередь системы транспорта кислорода на тканевом и клеточном уровнях, вызывая развитие тканевой гипоксии [3, 7, 9, 13]. Если учесть, что при хирургических операциях часто требуется длительное и многократное введение наркотических веществ [3, 15], становится очевидным актуальность изучения клеточных и субклеточных проявлений побочного действия компонентов наркоза и разработка на основе этих исследований научно обоснованных мероприятий по предупреждению развития и уменьшению повреждающего действия гипоксии, вызванной лекарственными средствами. В настоящее время наряду с разработкой новых лекарственных препаратов, действие которых основано на повышении устойчивости организма к гипоксии, ведутся исследования по применению немедикаментозных средств снижения интенсивности обменных процессов в органах и тканях с целью повышения их устойчивости к явлениям гипоксии, ишемии, отравлениям и другим видам патологии. К таким немедикаментозным средствам повышения устойчивости организма к экстремальным состояниям относится краниоцеребральная гипотермия (КЦГ) [1, 10, 12, 14].

Целью работы явилось изучение морфологических проявлений влияния КЦГ различной глубины охлаждения организма на кинетику развития тканевой гипоксии (ТГ) миокарда лабораторных животных.

В экспериментах были использованы белые крысы-самцы в возрасте 2,5 мес. и массой тела 150—180 г. ТГ миокарда вызывали путем внутрибрюшинного однократного введения животным натрия-тиопентала в дозе 120 мг/кг и 20 %-ного раствора оксибутирата натрия в дозе 200 мг/кг массы тела. Обоснованием для применения вышеперечисленных лекарственных средств с целью моделирования на животных (ТГ) является характерное для натрия-тиопентала в дозах, в 5—10 раз превышающих снотворную, угнетение дыхания и деятельности сердечной мышцы [11, 16]. КЦГ осуществляли путем охлаждения затылочной области головы животных хладагентом (мешочки с мелко колотым льдом). По изменению ректальной температуры определяли глубину охлаждения организма крыс [1, 14]. Для контроля за функциональным состоянием сердца животных в процессе проводимых экспериментов периодически, каждые 30 мин, записывали электрокардиограмму во 2-ом стандартном отведении у каждого животного с помощью электрокардиографа. Кинетические кривые изменения ректальной температуры у животных в группе 1 (ТГ, нормотермия) и в группе 2 (ТГ + КЦГ) в процессе проводимых экспериментов приведены на (рис. 1). Разброс цифровых данных изменения ректальной температуры крыс в экспериментальных группах 1 и 2 не превышал $\pm 0,4$ °С. После окончания экспериментов ($T \geq 5$ ч) активное согревание животных происходило самостоятельно. Для электронно-микроскопических исследований через каждые 30 мин на протяжении 5 ч проводили забой трех животных в первой и во второй экспериментальных группах. У декапитированных крыс извлекали сердце и вырезали кусочки миокарда из левого желудочка, которые затем фиксировали,

обезвоживали и заключали в эпоксидные смолы по общепринятым методам. Серийные срезы миокарда изготавливали на ультрамикротоме УМТП-5, собирали на предметные сеточки, контрастировали и исследовали с помощью электронного микроскопа ЭМВ-100АК. Морфометрический анализ электронно-микроскопических изображений миокарда животных проводили точечным методом на негативах с помощью механического устройства [8]. Определяли объемные доли стромального компонента и капилляров в миокарде, в кардиомиоцитах — объемные доли миофибрилл, митохондрий, гиалоплазмы. Статистический анализ цифровых данных проводили с помощью графико-аналитического метода [6].

На рис. 2 приведены графики кинетик изменения объемной доли стромального компонента миокарда крыс при ТГ, кривая 1, и в условиях ТГ + КЦГ, кривая 2. Оба графика обладают выраженной правосторонней асимметрией. Каждая кривая имеет две стационарные точки и одну вершину. Однако координаты вершины графика 2 существенно отличаются от соответствующих координат вершины графика 1. Так, значение ординаты вершины кривой 1 составляет 27,00 %, кривой 2 — 25,50 % ($\epsilon = \pm 0,30$ %)

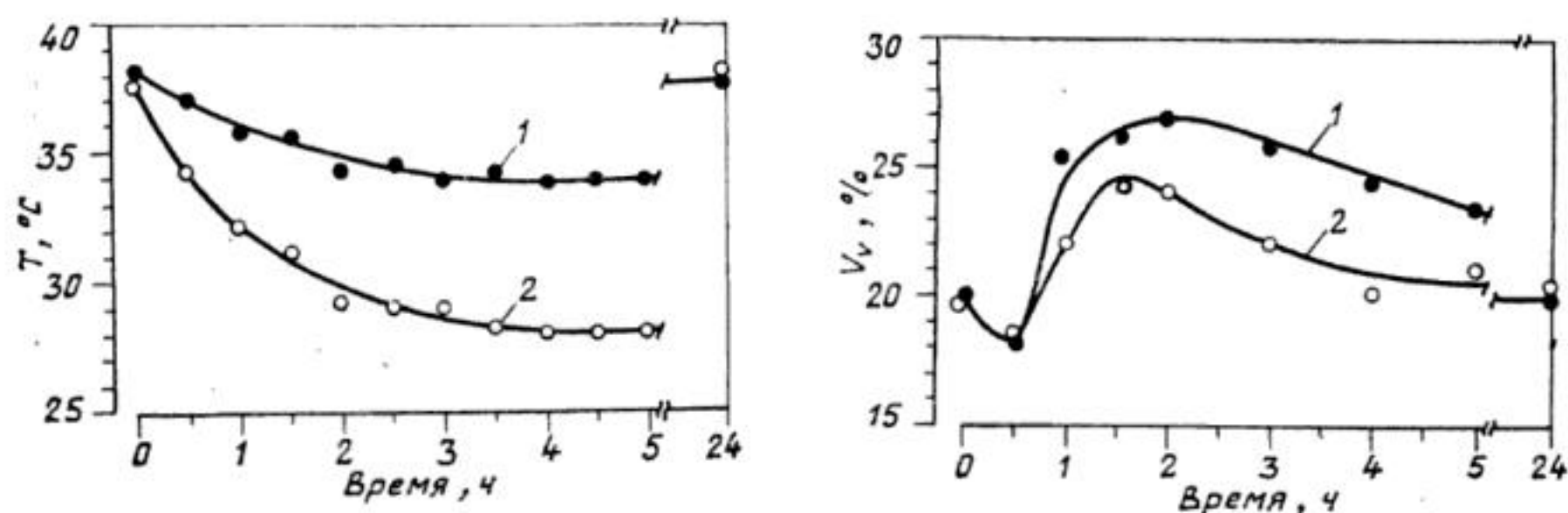


Рис. 1. Кинетические кривые изменения ректальной температуры животных при ТГ, график 1, и при ТГ + КЦГ, график 2

Рис. 2. Кинетика изменения объемной доли стромального компонента миокарда крыс при ТГ, кривая 1, и при ТГ + КЦГ, кривая 2

Соответственно абсцисса вершины графика 1 равна 2,0 ч, графика 2 — 1,5 ч. Эти данные свидетельствуют о том, что в условиях применения КЦГ достоверно сокращается период развития отека соединительной ткани миокарда и уменьшается максимальное значение объемной доли стромального компонента. Существенно отличаются правые ветви графиков 1 и 2. В интервале времени $T \in (2, 5)$ ч правая ветвь кривой 2 расположена ниже соответствующей ветви кривой 1. Это свидетельствует о более быстром уменьшении величины отека соединительной ткани миокарда у животных в условиях применения КЦГ. Уже к концу пятого часа эксперимента объемная доля стромального компонента миокарда у животных, находившихся в состоянии ТГ + КЦГ, существенно уменьшается и приближается к норме (20,50 %), в то время как у животных в состоянии ТГ этот показатель равен 23,50 %. И только в интервале времени $T \in (0, 30)$ мин левые участки графиков 1 и 2 достоверно не отличаются друг от друга. Следовательно, в течение первых 30 мин эксперимента влияние КЦГ на ультраструктуру соединительной ткани миокарда при ТГ не проявляется. В дальнейшем ($T > 5$ ч) наблюдается постепенное сближение правых ветвей графиков 1 и 2, что свидетельствует об уменьшении отека соединительной ткани и нормализации структурной организации стромального компонента миокарда у животных в обеих экспериментальных группах.

На рис. 3 приведены кинетические кривые изменения объемной доли капилляров в миокарде крыс при ТГ, график 1, и в условиях применения КЦГ (ТГ + КЦГ), график 2. Оба эмпирических графика имеют по две стационарные точки, соответствующие максимальному и минимальному

значениям объемной доли капилляров. В интервале времени $T \in (0,30)$ мин правые ветви графиков 1 и 2 в пределах погрешности измерений ($\varepsilon = \pm 0,30\%$) совпадают друг с другом. Это свидетельствует о том, что в течение первых 30 мин эксперимента влияние КЦГ на состояние капилляров миокарда при ТГ не проявляется. В дальнейшем при $T > 30$ мин кинетические кривые 1 и 2 достоверно отличаются друг от друга. Правая ветвь графика 2 в интервале времени $T \in (1,5)$ ч расположена выше соответствующей ветви графика 1. Координаты точки минимума кривых 1 и 2 существенно разнятся между собой. Так, ордината точки минимума графика 1 равна 5,00 %, графика 2 — 5,70 % ($\varepsilon = \pm 0,30\%$). Абсцисса точки минимума графика 1 равна 2,0 ч, графика 2 — 1,5 ч. Эти результаты свидетельствуют о том, что при ТГ в условиях применения КЦГ существенно сокращается период развития спазма сосудов микроциркуляторного русла миокарда и возрастает минимальное значение объемной доли капилляров. В интервале времени $T \in (2,5)$ ч наблюдается постепенный рост относитель-

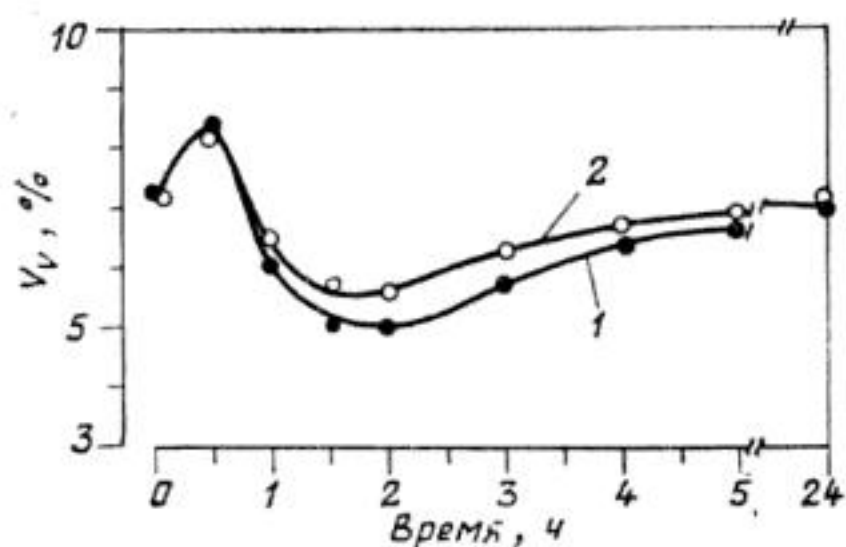


Рис. 3. Кинетика изменения объемной доли капилляров в миокарде животных при ТГ, кривая 1, и при ТГ + КЦГ, кривая 2

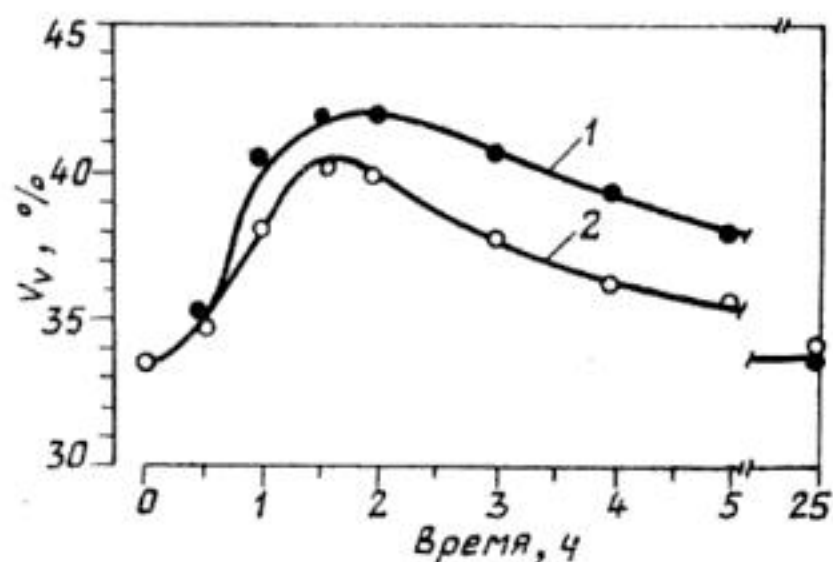


Рис. 4. Кинетика изменения объемной доли митохондрий в кардиомиоцитах животных при ТГ, график 1, при ТГ + КЦГ, график 2

ного объема капилляров в миокарде животных обеих экспериментальных групп, что свидетельствует об уменьшении тонуса сосудов и нормализации кровотока в микроциркуляторном русле миокарда.

На рис. 4 приведены графики кинетик изменения объемной доли митохондрий в кардиомиоцитах крыс при ТГ, кривая 1, и в условиях ТГ + КЦГ, кривая 2. Оба эмпирических графика имеют выраженную правостороннюю асимметрию и по одной вершине. Это свидетельствует о том, что в условиях эксперимента ТГ и ТГ + КЦГ наблюдается быстрое развитие аноксического повреждения митохондрий, их набухание и увеличение объемной доли в мышечных клетках сердца. Стадия аноксического повреждения значительно короче последующей стадии восстановления первоначально поврежденных энергопродуцирующих структур кардиомиоцитов. Координаты вершины графика 2 достоверно отличаются от соответствующих координат вершины графика 1. Так, значение ординаты вершины кривой 1 составляет 42,00 %, а кривой 2 — 40,50 % ($\varepsilon = \pm 0,20\%$). Соответственно абсцисса вершины графика 1 равна 2,0 ч, а графика 2 — 1,5 ч. Следовательно, в условиях применения КЦГ достоверно сокращается период развития аноксического повреждения митохондрий при ТГ, уменьшается отеочность этих органелл. В интервале времени $T \in (2,5)$ ч правая ветвь графика 2 расположена ниже соответствующей ветви графика 1. Это свидетельствует о более быстром восстановлении ранее поврежденных митохондрий в условиях применения КЦГ. Уже к концу пятого часа эксперимента объемная доля митохондрий в кардиомиоцитах животных, находящихся в состоянии ТГ + КЦГ, существенно уменьшается и составляет 35,50 %, в то время как в кардиомиоцитах животных, находящихся в состоянии ТГ, этот показатель равен 38,00 %. В дальнейшем ($T > 5$ ч) наблюдается сближение эмпи-

рических графиков 1 и 2, что свидетельствует о постепенной нормализации ультраструктуры митохондрий сердечных миоцитов животных в обеих экспериментальных группах.

На рис. 5 приведены кинетики изменения объемной доли миофибрилл в сердечных миоцитах животных при ТГ, кривая 1, и в состоянии ТГ + КЦГ, кривая 2. Оба эмпирических графика обладают правосторонней асимметрией и имеют по одной стационарной точке, соответствующей минимальному значению относительного объема миофибрилл. В интервале времени $T \in (1,5)$ ч правая ветвь графика 2 расположена выше соответствующей ветви графика 1. Координаты точки минимума кривых 1 и 2 достоверно отличаются друг от друга. В состоянии ТГ + КЦГ минимальное значение объемной доли миофибрилл в кардиомиоцитах животных составляет 44,00 %, а в состоянии ТГ — 42,00 % ($\epsilon = \pm 0,20\%$). Временная координата точки минимума графика 1 равна 1,5 ч, а графика 2 — 2,0 ч. Приведенные морфометрические данные свидетельствуют о том, что в условиях применения КЦГ заметно со-

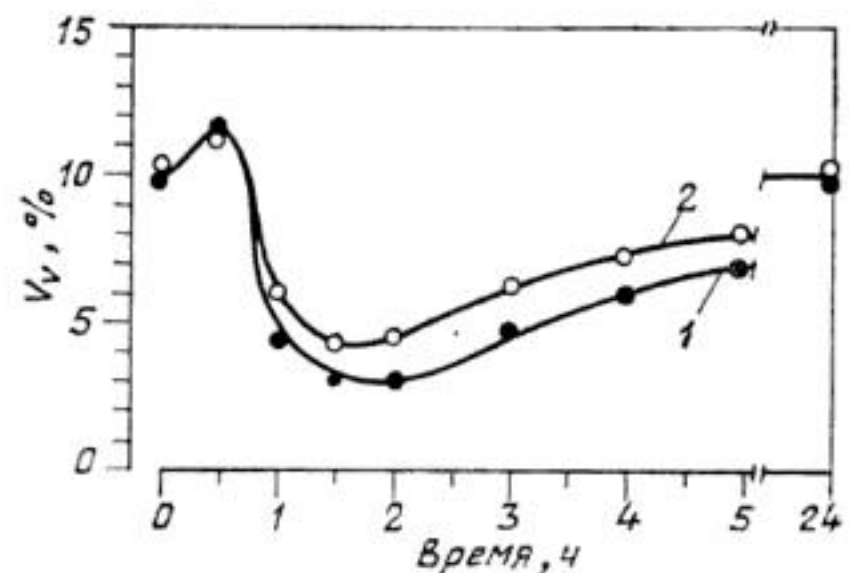
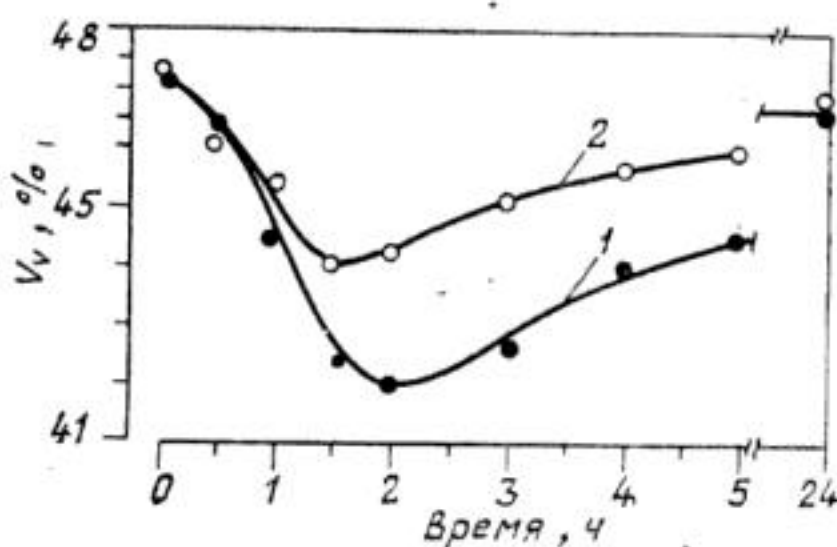


Рис. 5. Кинетика изменения объемной доли миофибрилл в кардиомиоцитах животных при ТГ, график 1, и при ТГ + КЦГ, график 2

Рис. 6. Кинетика изменения объемной доли гиалоплазмы в кардиомиоцитах животных при ТГ, график 1, и при ТГ + КЦГ, график 2

кращается период развития морфологических изменений миофибрилл (их контрактура) в кардиомиоцитах животных при ТГ. К концу пятого часа эксперимента в результате постепенной релаксации ранее сокращенных саркомеров происходит увеличение объемной доли миофибрилл в сердечных миоцитах. При этом в экспериментальной группе (ТГ + КЦГ) относительный объем миофибрилл возрастает до 46,00 %, а в группе ТГ — до 44,50 %. В дальнейшем ($T > 5$ ч) происходит постепенное сближение графиков 1 и 2 и цифровые значения объемных долей миофибрилл в кардиомиоцитах животных приближаются к норме.

На рис. 6 представлены кинетические кривые изменения объемной доли гиалоплазмы в сердечных миоцитах крыс при ТГ, кривая 1, и в состоянии ТГ + КЦГ, кривая 2. Оба эмпирических графика имеют по две стационарные точки, соответствующие максимальному и минимальному значениям относительного объема гиалоплазмы. В течение первых 30 мин эксперимента в обеих группах лабораторных животных наблюдается достоверное увеличение объемной доли гиалоплазмы в кардиомиоцитах с 10,00 % до 11,50 % ($\epsilon = \pm 0,30\%$). В дальнейшем ($T > 30$ мин) ветви графиков 1 и 2 расходятся и эмпирическая кривая 2 располагается выше, чем кривая 1. Ордината точки минимума графика 2 равна 4,40 %, а графика 1 — 3,00 % ($\epsilon = \pm 0,30\%$). Соответственно временная координата точки минимума графика 2 равна 1,5 ч, а графика 1 — 2,0 ч. Приведенные морфометрические данные свидетельствуют о том, что в условиях применения КЦГ уменьшается период развития процесса дегидратации кардиомиоцитов, находящихся в состоянии аноксии, возрастает величина минимального значения объемной доли гиалоплазмы. К концу пятого часа эксперимента в сердечных миоцитах наблюдается постепенное увеличение относительного объема гиалоплазмы в группе ТГ + КЦГ до 8,00 %, а в группе ТГ — до 7,00 % ($\epsilon =$

$= \pm 0,30 \%$). В дальнейшем ($T > 5$ ч) происходит сближение эмпирических графиков 1 и 2 и объемные доли гиалоплазмы в кардиомиоцитах животных в обеих экспериментальных группах приближаются к норме (10,00 %).

На основе проведенных электронно-микроскопических и морфометрических исследований построены кинетические кривые, характеризующие изменение во времени различных количественных показателей структурной организации миокарда животных в условиях ТГ и ТГ + КЦГ. Анализ кинетик изменения объемных долей стромального компонента и капилляров в миокарде, относительных объемов миофибрилл, митохондрий и гиалоплазмы в кардиомиоцитах позволил выявить и определить естественные границы трех последовательных стадий развития ТГ миокарда в условиях нормотермии и в условиях применения КЦГ. Критериями дифференциации ТГ на последовательные стадии явились точки экстремума на временной шкале, в которых объемные доли вышеперечисленных морфометрических показателей принимают минимальные и максимальные значения. В точках экстремума происходит чередование процессов роста и убыли относительных объемов клеточных и неклеточных компонентов миокарда животных. Поэтому координаты точек экстремума и являются естественными границами трех последовательных стадий развития тканевой гипоксии сердечной мышцы.

1. Стадия мобилизации структурно-функциональных резервов миокарда продолжительностью 30 мин. Характерной особенностью этой стадии ТГ является достоверный рост объемной доли капилляров, митохондрий и гиалоплазмы в кардиомиоцитах. В условиях повышения функциональной нагрузки на сердце в миокарде животных увеличивается количество открытых капилляров, происходит умеренное набухание митохондрий, возрастает объем гиалоплазмы. В этом и заключаются основные морфологические проявления мобилизации структурно-функциональных резервов сердечной мышцы.

2. Стадия преимущественного накопления дистрофических изменений миокарда, продолжительностью 90 мин при ТГ и 60 мин в условиях применения КЦГ. Для этой стадии обратимых гипоксических изменений клеточных и неклеточных элементов миокарда характерно развитие отека соединительной ткани сердечной мышцы, наблюдается стойкий спазм капилляров, происходит набухание и частичная вакуолизация митохондрий и цистерн саркоплазматической сети, появляются контрактурные изменения миофибрилл в сердечных миоцитах, происходит умеренная дегидратация кардиомиоцитов. Временная координата, соответствующая экстремальным значениям морфометрических показателей структурной организации миокарда, и определяет время окончания второй стадии тканевой гипоксии сердечной мышцы.

3. Стадия восстановления первоначально поврежденных ультраструктур миокарда. Это самая продолжительная стадия тканевой гипоксии. Характерными морфологическими особенностями третьей стадии являются: постепенное уменьшение отека стромального компонента миокарда, снижение тонуса сосудов микроциркуляторного русла, в кардиомиоцитах происходит постепенная релаксация миофибрилл, нормализуется ультраструктура митохондрий и цистерн саркоплазматической сети, возрастает объем гиалоплазмы. В сердечных миоцитах выявляются морфологические признаки активации процессов внутриклеточной регенерации ранее поврежденных миофибрилл, митохондрий, увеличивается содержание свободных рибосом и элементов зернистой саркоплазматической сети. В условиях применения КЦГ значительно быстрее происходит восстановление и нормализация структурной организации миокарда животных.

Результаты исследований позволили установить, что наиболее выраженный кардиозащитный эффект КЦГ наблюдается при ТГ в диапазоне ректальной температуры животных $29 \div 28^\circ\text{C}$. Эти данные подтверждают име-

ющиеся в литературе сведения об эффективности применения КЦГ с глубиной охлаждения $29 \div 28^\circ\text{C}$ для защиты миокарда от гипоксии, развивающейся при различных экстремальных состояниях организма [1, 2, 5, 7, 10].

1. Бабийчук Г. А. Механизмы нейрохимических и патофизиологических процессов в организме животных при краниocereбральной гипотермии: Автореф. дис... докт. биол. наук.— Харьков, 1986.— 33 с.
2. Бабийчук Г. А., Белостоцкий А. В., Арцыбушев Ю. Н. Насосная функция ишемизированного миокарда при краниocereбральной гипотермии // Криобиология.— 1986.— № 1.— С. 38—48.
3. Голиков С. Н., Санццкий И. В., Тиунов Л. А. Общие механизмы токсического действия.— Л.: Медицина, 1986.— 280 с.
4. Гологорский В. А., Ахметсафин Н. Ф., Усватова И. Я. и др. Влияние вводного барбитурового наркоза на обмен циркулирующей крови и некоторые показатели центральной гемодинамики // Кровообращение.— 1971.— 4, № 3.— С. 57—63.
5. Грудина Г. Р. Динамика сердечного выброса в условиях краниocereбральной гипотермии: Автореф. дис.. канд. биол. наук.— Воронеж, 1973.— 22 с.
6. Загоруйко Г. Е. Графико-аналитический метод в морфометрическом анализе ультраструктур мышечных клеток сердца // Научно-технический прогресс в кардиологии.— Харьков: Б. и., 1986.— С. 11—14.
7. Загоруйко Ю. В., Загоруйко Г. Е., Бабийчук Г. А. Влияние гипоксии и краниocereбральной гипотермии на ультраструктуру миокарда белых крыс // Криобиология.— 1987.— № 1. С. 32—38.
8. Загоруйко Г. Е., Офицеров В. Н. Механическое устройство для морфометрического и ориентационного анализа биологических структур. // Бюл. эксперим. биологии и медицины.— 1979.— № 11.— С. 625—626.
9. Колчинская А. З., Дударев В. П., Кеферов М. Т. и др. Вторичная тканевая гипоксия.— Киев: Наук. думка, 1983.— 256 с.
10. Копшев С. Н. Краниocereбральная гипотермия в акушерстве.— М.: Медицина, 1985.— 111 с.
11. Машковский М. Д. Лекарственные средства.— М.: Медицина, 1984.— 624 с.
12. Мешалкин Е. Н., Вережагин И. П. Оклюзии в условиях неглубокой гипотермической защиты.— Новосибирск: Наука, 1985.— 197 с.
13. Самойлов М. О. Реакция нейронов мозга на гипоксию.— М.: Наука, 1985.— 210 с.
14. Сумбатов Л. А. Искусственная гипотермия.— М.: Медицина, 1985.— 84 с.
15. Шифрин Г. А., Шноль В. Я., Хижняк А. А. Концентрация оксibuтирата натрия в крови при повторном его применении. // Анестезиология и реаниматология.— 1978.— № 1.— С. 19—22.
16. Чекман И. С., Пелешук А. П., Пятак О. А. и др. Справочник по клинической фармакологии и фармакотерапии.— Киев: Здоров'я.— 1986.— 736 с.

Харьковский НИИ терапии МЗ УССР,
Ин-т проблем криобиологии и
криомедицины АН УССР,
г. Харьков

Поступила 07.08.87

УДК 57.043:577.352.53

Э. Н. Гахова, Н. Р. Чекурова, А. Н. Кислов, Б. Н. Вепринцев

ГИГАНТСКИЕ НЕЙРОНЫ СОХРАНЯЮТ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ПОСЛЕ ГЛУБОКОГО ЗАМОРАЖИВАНИЯ МОЗГА ПРЕСНОВОДНОГО МОЛЛЮСКА *Lymnaea stagnalis* L.

Гигантские нейроны моллюсков давно стали классическим объектом для электрофизиологических, фармакологических и функционально-метаболических исследований. На этом объекте детально изучены электрические характеристики мембраны, параметры одиночных ионных каналов [5], свойства основных хеморецептивных систем [3, 10], связь между электрической активностью и синтезом макромолекул в нейроне [2]. Гигантские нейроны моллюсков как модельная система представляют несомненный интерес для криобиологии при изучении механизмов криоповреждения и процессов репарации на клеточном уровне. Однако при работе с моллюсками эксперимен-

татору необходимо учитывать изменение функциональных свойств нейронов в зависимости от места обитания, условий содержания животных в аквариумах, сезона года и т. д. Так, многолетний опыт нашей лаборатории на примере пресноводных моллюсков показывает, что для исследований лучше использовать нейроны, выделенные из мозга моллюсков, в период с мая по октябрь. Сохранение нервных клеток в глубокозамороженном состоянии позволяет проводить эксперименты на однородном материале в течение всего года.

Ранее мы показали, что диметилсульфоксид, этиленгликоль и формамид в концентрации 1—1,5 М не вызывали существенной модификации потенциалзависимых ионных каналов нейронов прудовика [7]. Целью настоящей работы явилось изучение криопротекторных свойств этих веществ и характера электрического ответа нейронов мозга прудовика *Lymnaea stagnalis* после замораживания до температуры жидкого азота, -196°C .

Работа выполнена на изолированном мозге пресноводного моллюска *Lymnaea stagnalis*. Выделенное кольцо ганглиев помещали в среду для культивирования нейронов прудовика [9], либо в физиологический раствор следующего состава: 80 мМ NaCl; 1,6 мМ KCl; 1,5 мМ MgCl_2 ; 4 мМ CaCl_2 ; *трис*-HCl буфер, $\text{pH} = 7,5$. В качестве криопротектора использовали диметилсульфоксид (ДМСО), этиленгликоль (ЭГ) и формамид (ФА) («Сигма», «Серва») с конечной концентрацией 1,5 М. Время инкубирования ганглиев в растворе криопротектора для осмотического уравнивания составляло 20—30 мин при комнатной температуре. Затем ганглии, каждый в отдельности, помещали на алюминиевую фольгу, охлаждали в парах жидкого азота со скоростью $500^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и переносили в жидкий азот, где они хранились в металлических контейнерах от 2 ч до 2 мес. Оттаивание образцов осуществляли в водяной бане при $23 \div 25^{\circ}\text{C}$. Криопротектор отмывали постепенным его разбавлением физиологическим раствором или средой для культивирования в течение 30 мин при комнатной температуре. Отмытые от криопротектора ганглии в течение 2—3 ч культивировали в физиологическом растворе или в среде для культивирования. Жизнеспособность нейронов оценивали по морфологическим и электрофизиологическим характеристикам. Выделение идентифицированных нейронов [4] из стромы ганглия проводили по стандартной методике обработкой ганглиев 0,1 %-ной проназой при комнатной температуре в течение 30—40 мин. Обработка проназой размороженных ганглиев была сокращена до 5—10 мин, поскольку в результате процедуры замораживания — оттаивания ганглионарные соединительнотканые оболочки были более чувствительны к ферментативной обработке. После 20—30-минутной отмывки от проназы клетки выделяли при помощи вольфрамовых игл. Живые клетки, размером от 30 до 100—200 мкм имели грушевидную или округлую форму с равномерным распределением по цитоплазме оранжевого пигмента. Ядро нейронов не просматривалось. Измерение электрических параметров мембраны нейронов осуществляли в физиологическом растворе с помощью внутриклеточного микроэлектрода по мостовой схеме на приборах, изготовленных СКБ БП АН СССР в г. Пущино. Определяли следующие параметры: мембранный потенциал (МП), входное сопротивление ($R_{\text{вх}}$), амплитуду потенциала действия (ПД) и овершут (превышение ПД над нулевым уровнем), пороговый потенциал, следовую гиперполяризацию после генерации ПД, измеренную по отношению к МП, длительность ПД.

Были использованы 3 варианта сред: среда для культивирования нейронов без криопротектора, та же среда для культивирования с одним из криопротекторов, физиологический раствор с криопротектором. При замораживании ганглиев без криопротектора клетки после оттаивания погибали. Сохранность клеток при криоконсервации обеспечивалась только в присутствии криопротекторов: ДМСО, этиленгликоля или формамида в концентрации 1,5 М. Все три исследованных криопротектора одинаково хорошо защищали клетки от действия низких температур. На рис. 1 приведены

примеры генерации ПД у нейронов после оттаивания ганглиев, замороженных в средах с разными криопротекторами. Внешний вид нейронов и электрические характеристики клеточной мембраны зависели от промежутка времени с момента оттаивания образцов. Так, через 3—5 мин после размораживания цитоплазма гигантских нейронов (100—200 мкм) была окрашена неравномерно: пигмент в виде глыбок концентрировался в области отхождения аксона. Через 2—2,5 ч окраска цитоплазмы становилась более равномерной. Электрические параметры клеточной мембраны нейронов через 30 мин после размораживания значительно отличались от нормы: уровень мембранного потенциала не превышал $-10 \div -20$ мВ, $R_{вх} - 10 \div 20$ МОм. Клетки не генерировали ПД и быстро погибали после введения микроэлектрода. Электрические характеристики восстанавливались через 2—3 ч после оттаивания и отмывки от криопротектора. Процесс восстановления протекал одинаково как в физиологическом растворе, так и в среде для культивирования нейронов.

Морфологические и электрические характеристики как гигантских, диаметром до 200 мкм, так и более мелких нейронов, диаметром 30—50 мкм, через 2—3 ч после размораживания не отличались от контрольных. Клетки имели четкие контуры, правильную округлую форму, ядро не просматривалось. Гистограммы распределений значений МП нейронов до замораживания и через 2—3 ч после оттаивания нейронов приведены на рис. 2. Значения МП находились в пределах $-40 \div -70$ мВ, $R_{вх}$ составляло в среднем $50 \div 90$ МОм. После периода восстановления нейроны генерировали спонтанные ПД со следующими характеристиками (таблица): амплитуда ПД $80 \div 90$ мВ, пороговый потенциал $-40 \div -45$ мВ, овершут $10 \div 40$ мВ, следовая гиперполяризация $7 \div 20$ мВ, длительность ПД $15 \div 25$ мс. Эти параметры практически не отличались от контрольных.

Способность клеток к восстановлению МП свидетельствует о сохранении после замораживания — оттаивания системы ионного транспорта. Мембраны нейронов сохраняли после замораживания — оттаивания чувствительность к ацетилхолину. Идентифицированные гигантские нейроны БП-1, БП-2 и БП-4 отвечали на ацетилхолин в концентрации 10^{-6} М деполяризацией на $7 \div 10$ мВ.

Успех криоконсервации в значительной степени зависел от сезона года. Лучшие результаты получены при работе с моллюсками в мае — июле месяцах. При использовании в эксперименте мозга осенних моллюсков, которые находились в аквариуме в течение месяца при $4 \div 7$ °С в состоянии полуметаболизма, количество оживших нейронов после замораживания — оттаивания резко снижалось.

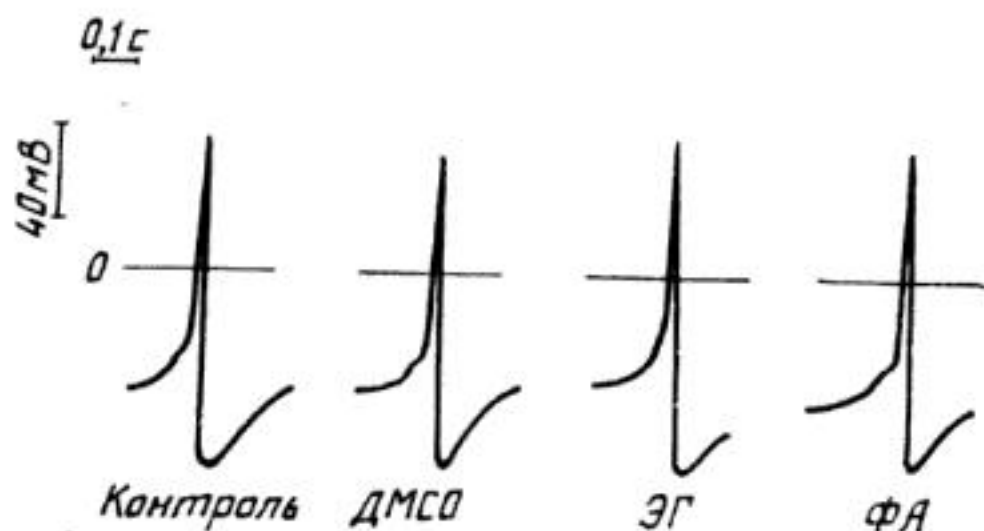


Рис. 1. Примеры генерации потенциалов действия нейронов прудовика в норме и через 2,5 ч после оттаивания ганглиев, замороженных в средах с разными криопротекторами: ДМСО, этиленгликолем (ЭГ) и формамидом (ФА) в концентрации 1,5 М

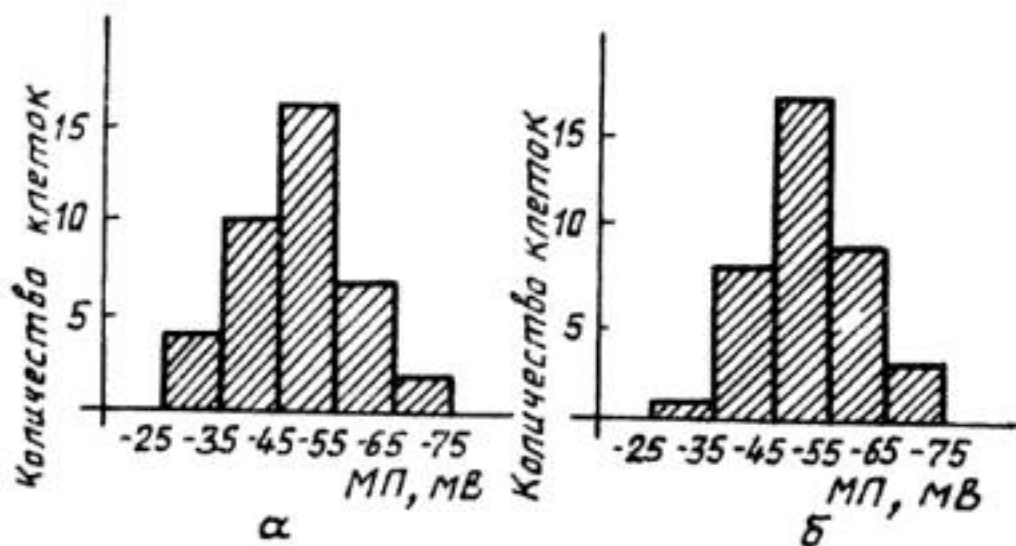


Рис. 2. Гистограммы распределения значений мембранного потенциала (МП) нейронов прудовика в норме (а) и через 2,5 ч после оттаивания ганглиев, замороженных в среде для культивирования нейронов с 1,5 М ДМСО (б)

Электрические характеристик мембран нейронов прудовика через 2,5 ч после оттаивания ганглиев, замороженных в среде для культивирования с разными криопротекторами

Электрический параметр	Контроль (n=38)	После замораживания — оттаивания			
		Без крио- протектора (n=21)	1,5 М ДМСО (n=39)	1,5 М ЭГ (n=24)	1,5 М ФА (n=19)
МП, мВ	-54 ± 8	0	-52 ± 11	-51 ± 16	-50 ± 17
$R_{вх}$, МОм	81 ± 14	0	80 ± 16	83 ± 12	79 ± 14
Амплитуда ПД, мВ	86 ± 6	—	82 ± 6	88 ± 9	84 ± 7
Пороговый потенциал, мВ	-46 ± 4	—	-44 ± 5	-48 ± 8	-46 ± 6
Овершут, мВ	22 ± 12	—	24 ± 8	26 ± 10	22 ± 14
Следовая гиперполяризация, мВ	15 ± 5	—	16 ± 6	17 ± 8	15 ± 9
Длительность ПД, мс	20 ± 5	—	21 ± 6	20 ± 5	20 ± 6

Хранение ганглиев в жидком азоте до двух месяцев не сказывалось на морфологических и электрических характеристиках нейронов.

В работе показано, что при замораживании мозга прудовика с высокой скоростью охлаждения, $500^\circ\text{C}/\text{мин}$, в присутствии 1,5 М ДМСО, этиленгликоля или формамида наблюдались повреждения клеточной мембраны нейронов. Об этом свидетельствовали низкие значения МП, $R_{вх}$, отсутствие возбудимости нейрональной мембраны через 30 мин после оттаивания образцов. Многие исследователи считают, что наиболее чувствительными к действию низких температур оказываются мембраны клетки [1], но структурные изменения мембран, приводящие к утечке ионов, обратимы и не являются обязательно летальными [8]. В наших опытах нейроны моллюска были способны восстанавливать свойства клеточной мембраны через 2-3 ч после размораживания и отмывки от криопротектора. Восстановление значений МП, $R_{вх}$ и способности генерировать ПД говорит о том, что в течение этого времени происходит репарация мембран, нормализация работы Na, K-насоса, восстановление ионных градиентов между клеткой и средой. Проведенные нами исследования не позволяют однозначно ответить на вопрос является ли репарация нейрональной мембраны мозга моллюсков метаболически зависимым процессом или происходит в результате спонтанного самозалечивания клеточной мембраны. Как показали наши опыты, время восстановления электрической активности не зависело от наличия экзогенных метаболитов: процесс репарации проходил одинаково в физиологическом растворе и в среде для культивирования нейронов. Нервные клетки моллюсков имеют значительные резервы для внутриклеточного синтеза макромолекул, и препарат изолированного мозга может длительное время (до 2 сут) работать в физиологическом растворе. При этом существенно не нарушается электрическая и метаболическая активность нейронов, о чем свидетельствуют работы по изучению синтеза РНК [2]. Поэтому не исключено, что реализация репаративных процессов мембраны нейронов может осуществляться за счет синтеза макромолекул *de novo* или использованием макромолекулярных заготовок, имеющихся в цитоплазме клеток.

Мозг прудовика представлен гетерогенной массой нейронов, размеры которых варьировали от 30 до 200 мкм. Несмотря на существенные поверхностно-объемные различия все нейроны одинаково сохраняли способность к выживанию и восстановлению электрических функций мембраны при охлаждении со скоростью $500^\circ\text{C}/\text{мин}$. Успешная криоконсервация нейронов, по-видимому, непосредственно связана со способностью нейронов хорошо переносить высокие концентрации криопротекторов. В предыдущей работе [7] мы показали, что электрические функции мембран нейронов прудовика не нарушались при повышении концентрации ДМСО, этиленгликоля и формамида до 2,5—3 М и выдерживании нейронов в этих растворах в течение 1 ч при комнатной температуре и до 12 ч при 4°C . Критическим моментом

при замораживании — оттаивании нейронов моллюска был процесс отмычки от криопротектора: резкий перепад осмотического давления во время отмычки приводил к разрыву цитоплазматической мембраны, массивной ионной утечке и гибели клеток. Чем медленнее была скорость разбавления криопротектора, тем лучше сохранность клеток.

Устойчивость нейронов моллюска к замораживанию — оттаиванию и способность к репарации, приуроченные к определенному сезону года, могут быть объяснены уровнем функционального состояния внутриклеточных структур и всей системы нервной ткани в целом. Известно, что состояние транспортных систем и внутриклеточное содержание неорганических ионов в ткани моллюсков находятся в непосредственной зависимости от времени года [6].

Таким образом, в работе показана принципиальная возможность глубокого замораживания и последующего оттаивания нейронов моллюска *Lymnaea stagnalis*. Успешная криоконсервация нейронов прудовика позволяет надеяться на распространение этого метода на нервные клетки других видов, включая морские и сухопутные виды, обладающих клетками, сходными по морфологическим и функциональным особенностям с нейронами прудовика.

1. Белоус А. М., Бондаренко В. А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. — Киев: Наук. думка, 1982. — 255 с.
2. Вепринцев Б. Н. О путях регуляции биосинтеза РНК и белка в нейронах // Клеточные механизмы памяти. — Пущино на Оке: Б. и., 1973. — С. 167—186.
3. Гапон С. А. Действие медиаторных веществ на идентифицированные нейроны брюхоногого моллюска *Planorbis corneus* // Журн. эволюцион. биохимии и физиологии. — 1983. — 19, № 1. — С. 38—45.
4. Дьяконова Т. Л., Вепринцев Б. Н. Особенности структурной и функциональной организации и метаболической активности нейронов прудовика. — М., 1970. — 26 с. — Деп. в ВИНТИ 01.06.70, № 819—69.
5. Казаченко В. Н., Гелетюк В. И. Два типа потенциалозависимых калиевых каналов в нейронах моллюсков. Кластерная организация // Биол. мембраны. — 1984. — 1, № 6. — С. 629—639.
6. Сорокина З. А. Состояние калия, натрия и воды в цитоплазме клеток. — Киев: Наук. думка, 1978. — 211 с.
7. Чекурова Н. Р., Кислов А. Н., Вепринцев Б. Н. Действие некоторых криопротекторов на ионные каналы мембраны нейронов // Криобиология. — 1987. — № 1. — С. 21—25.
8. Griffiths J. B., Beldon I. Assessment of cellular damage during cooling to -196°C using radiochemical markers // Cryobiology. — 1985. — 22, N 1. — P. 69—77.
9. Kostenko M. A., Musienko V. S., Smolikhina T. I. Ca^{2+} and pH affect the neurite formation in cultured mollusc isolated neurones // Brain Res. — 1983. — 276, N 1. — P. 43—50.
10. Zeimal E. V., Vulfius C. A. Pharmacology of cholinergic systems in molluscs // International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics. — New York: Pergamon Press, 1973. — P. 111—168.

Ин-т биол. физики АН СССР,
г. Пущино

Поступила 22.02.88

УДК 577.95; 575; 592/599

В. Л. Тихонова, С. Г. Яшина, В. С. Полевая, И. В. Красте

ВЛИЯНИЕ ГЛУБОКОГО ЗАМОРАЖИВАНИЯ СЕМЯН НА РОСТ И РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ (НА ПРИМЕРЕ ГВОЗДИКИ ФИШЕРА)

За последние десятилетия проблема сохранения генофонда растительного богатства мира приобрела очень важное значение. Становится очевидным, что пассивная охрана растений в виде природных популяций на охраняемых территориях (заповедники, заказники) не может обеспечить сохранность всех редких и исчезающих видов. Необходимы меры активной охраны:

организация питомников размножения и работы по восстановлению численности редких и исчезающих видов растений путем создания искусственных популяций в природных биотопах на территории ареала (реинтродукция растений); организация банков долговременного сохранения геномов в виде семян, меристем, пыльцы и др. [1, 2, 3, 9].

Наиболее долговременное сохранение всхожести семян обеспечивает их криоконсервация. Принципиально возможность глубокого замораживания семян уже доказана для многих видов [8, 11]. В Советском Союзе работы по замораживанию семян сельскохозяйственных культур ведутся во Всесоюзном институте растениеводства [5, 6]. Ботанические сады СССР, работающие с природной флорой, пока не ставят своей целью долговременное хранение семян; обменные семенные фонды (для делектусов) хранятся в комнатных условиях, приводящих семена к быстрому старению и потере ими генетической целостности [7].

Большинство исследователей, работающих по глубокому замораживанию семян, после криоконсервации ограничиваются обычно определением всхожести их в лабораторных условиях, иногда отмечая при этом процент уродливых проростков. Но вопрос о сохранении генетической целостности в процессе замораживания, хранения при сверхнизких температурах и отогревания нельзя решать только на основании сохранения всхожести — необходимо накопление данных о влиянии глубокого замораживания на процент гибели проростков, на гибель ювенильных растений, на темпы роста и развития контрольных и опытных экземпляров, на появление растений, резко отличающихся по своим биоморфологическим показателям от контрольных (возможные мутации). Для получения всей этой информации необходимо выращивание растений из семян после замораживания, доведение их до цветения и плодоношения и изучение потомства этих растений.

Экспериментальные работы по криоконсервации семян дикорастущих видов растений начаты в 1984 г. совместно ВНИИ охраны природы и заповедного дела, Институтом почвоведения и фотосинтеза АН СССР и Институтом биологической физики АН СССР по инициативе Б. Н. Вепринцева в рамках Программы сохранения генетических ресурсов [4]. Химический состав семян большинства видов дикорастущих растений, возможности их подсушивания и реакция на глубокое замораживание практически не изучены, поэтому для начала были выбраны охраняемые растения, семена которых можно собрать в достаточном количестве без ущерба для вида. Одним из модельных видов послужила гвоздика Фишера *Dianthus fischeri Spreng.* (взята под охрану в Ярославской, Горьковской, Псковской, Ивановской, Владимирской и др. обл.), травянистый многолетник из семейства гвоздичных. Семена этого вида обладают высокой всхожестью, легко прорастают в комнатных условиях, при выращивании из семян растения быстро зацветают. Семена были собраны в 1984 и 1985 гг. в природной популяции (Московская обл., дер. Чулково); длина их ($1,97 \pm 0,03$) мм, ширина ($1,65 \pm 0,03$) мм, масса 100 шт. ($53,0 \pm 0,3$) мг, влажность (без подсушивания) 6—7 %.

Семена для замораживания помещали в полиэтиленовые ампулы и плотно закрывали. При быстром замораживании (ЖА) ампулы погружали в сосуды с жидким азотом СДС-30 (скорость охлаждения $700^\circ\text{C}/\text{мин}$), при замораживании семян в парах жидкого азота (ПА) ампулы подвешивали в тех же сосудах над поверхностью азота (скорость охлаждения $100^\circ\text{C}/\text{мин}$); медленное замораживание (МЗ) проводили в открытой спиртовой бане, которую охлаждали со скоростью $2,8^\circ\text{C}/\text{мин}$ и $0,8^\circ\text{C}/\text{мин}$ с помощью устройства для программируемого замораживания биообъектов [10] до -50°C , а затем переносили ампулы в жидкий азот. Продолжительность пребывания семян в жидком азоте (или парах) 40—42 ч. Отогревание семян проводили в водяной бане при 36°C (быстрое) и в холодильнике при 4°C (медленное). Лабораторную всхожесть определяли путем проращивания семян в чашках Петри в комнатных условиях, по 50 шт. в чашке, повторность — трехкрат-

ная. Проросшие семена высаживали в стеллаж в теплице, где периодически проводили измерения растений. Площади питания растений в контроле и в вариантах опыта всегда были одинаковыми ($0,02 \text{ м}^2$), растения не испытывали угнетения от загущения. В зимний период в пасмурные дни растения получали дополнительное освещение в течение 12 ч (лампы ДРЛФ-400). Показатели лабораторной всхожести статистически обрабатывали по алгоритму для малых выборок, результаты измерений — по способу отклонения от условной средней [4]. В таблицах показатели представлены в виде среднего арифметического с ошибкой ($M \pm m$), минимального и максимального значения признака и вариационного коэффициента ($V, \%$), позволяющего оценить степень варьирования признаков в общих единицах ($\%$) и сравнить их колебания. Для оценки степени достоверности разницы по показателям между контролем и вариантами вычисляли коэффициент достоверности разницы (коэффициент Стьюдента).

Опыт I был заложен в декабре 1984 г., семена замораживались опусканием в азот (ЖА), в парах азота (ПА) и со скоростью $2,8 \text{ }^\circ\text{C}/\text{мин}$ (МЗ), отогревание семян проводили при $36 \text{ }^\circ\text{C}$. Проростки высаживали в кюветы, а в феврале 1985 г. — в теплицу (субстрат вермикулит). Всхожесть семян после глубокого замораживания немного снизилась (в этом опыте она определялась без повторов: контроль — 98 %, ЖА — 94 %, ПА — 90 %, МЗ — 86 %), прорастание семян слегка замедлилось по сравнению с контролем (контроль — 3 дня, ЖА — 9 дней, ПА — 4 дня, МЗ — 7 дней).

Измерения в июле 1985 г. (табл. 1) показали, что развитие растений во всех вариантах опыта опережало контроль (число цветущих растений достигало 100 %, в контроле — 75 %). В контроле у 95 % растений главная ось долго оставалась укороченной вегетативной, из пазушных почек семядолей и первых листьев образовывались пазушные укороченные вегетативные побеги; в вариантах опытов это наблюдалось у 60 % (ЖА) — 65 % (ПА, МЗ). В связи с этим в возрасте 7 мес. число пазушных укороченных вегетативных побегов у 1 экз. в контроле составило $2,4 \pm 0,4$, после азота — в 2 раза меньше (ЖА — $1,2 \pm 0,4$; ПА — $1,3 \pm 0,3$; МЗ — $1,1 \pm 0,3$). У растений из замороженных семян главная ось быстрее переходила в генеративное состояние — вытягивались междоузлия, появлялись бутоны (поэтому длина генеративных побегов в вариантах больше). Более раннее цветение особенно заметно при анализе числа бутонов, цветков и плодов на побеге: в контроле на побегах преобладают бутоны (92,3 %), а у опытных растений уже массовое цветение и образование семян. Вариационные коэффициенты были достаточно высоки (так как выборка небольшая, было выращено по 20—25 экз.). Коэффициенты достоверности разницы (t) по длине побега и числу генеративных элементов на нем показали сильное достоверное различие контрольных и опытных растений на этом этапе онтогенеза (t значительно больше 2,0).

Измерения растений в сентябре 1985 г. показали, что различия между контрольными и опытными растениями по большинству показателей сгладились. Раньше зацветшие побеги в вариантах опыта так и остались с меньшим количеством метамеров (междоузлий), но за счет несколько большего развития на них пазушных генеративных побегов число генеративных элементов (бутоны, цветки и плоды) на побегах как в контроле, так и в вариантах опытов очень близки. В контроле и в МЗ отмечено по одному незацветшему растению и единичные экземпляры с очень мощным развитием (контроль — 16 побегов у 1 экз., МЗ — 25 побегов). Вариационные коэффициенты по большинству изученных признаков выше в вариантах с замедленным охлаждением (ПА, МЗ). Таким образом, глубокое замораживание семян повлияло на темпы роста и развития растений в начале опыта, но к концу разница между контрольными и опытными растениями сгладилась.

Весной 1986 г. было изучено влияние разных режимов охлаждения и отогрева на всхожесть семян. После быстрого погружения в жидкий азот лабораторная всхожесть семян при медленном отогреве ($4 \text{ }^\circ\text{C}$) составила $98,0 \pm$

Таблица 1

Влияние глубокого замораживания семян на рост и развитие растений гвоздики Фишера (опыт I)

Показатель	Контроль		Вариант замораживания						t			
	M ± m, минимум— максимум	V, %	ЖА		ПА		МЗ		ЖА	ПА	МЗ	
			M ± m, минимум— максимум	V, %	M ± m, минимум— максимум	V, %	M ± m, минимум— максимум	V, %				
Измерения растений в возрасте 7 мес. (июль 1985 г.)												
Процент цветущих экземпляров	75,0	—	100,0	—	90,0	—	90,0	—	—	—	—	—
Генеративный побег:												
длина, см	45,8±2,4 29—67	20,5	52,2±1,5 43—65	12,5	56,7±2,0 37—70	15,3	58,7±2,2 44—84	15,8	2,3	3,5	4,0	4,0
число генеративных элементов (бут + цв + плоды)	6,1±1,0 1—14	62,2	15,5±2,5 5—49	70,2	17,3±2,6 4—39	64,0	18,4±2,2 5—35	50,2	3,5	4,0	5,1	5,1
в том числе (%):												
бутоны	92,3	—	32,5	—	31,4	—	25,8	—	—	—	—	—
цветки	7,7	—	20,6	—	31,7	—	24,9	—	—	—	—	—
плоды	—	—	46,9	—	36,9	—	49,3	—	—	—	—	—
Измерения растений в возрасте 9 мес. (сентябрь 1985 г.)												
Процент цветущих экземпляров	95,0	—	100,0	—	95,0	—	100,0	—	—	—	—	—
Число генеративных побегов у 1 экз.	3,5±0,4 1—16	62,3	2,7±0,5 1—12	82,8	3,0±0,4 1—7	62,6	5,4±1,1 1—25	104,6	0,5	0	1,6	1,6
Генеративный побег:												
длина, см	54,8±1,9 37—75	16,6	53,5±1,9 37—74	16,9	53,8±1,9 33—68	16,3	54,7±2,1 41—82	19,2	0,5	0,4	0	0
число междоузлий на главной оси	15,5±0,4 13—20	11,9	13,3±0,3 11—27	11,1	13,1±0,4 10—17	13,7	13,5±0,4 9—17	16,7	4,4	4,3	3,6	3,6
число пазушных генеративных по- бегов на главной оси	4,7±0,4 2—9	37,0	5,2±0,4 1—10	40,6	5,4±0,6 1—13	52,9	5,7±0,5 2—12	43,1	0,9	1,0	1,6	1,6
число генеративных элементов (бут + цв + плоды)	21,1±2,2 8—41	49,8	24,5±3,2 5—68	61,6	22,5±3,9 3—87	81,8	22,2±3,3 5—58	74,1	0,9	0,3	0,3	0,3
Диаметр главного корня, см	0,59±0,04 0,3—1,0	30,8	0,52±0,03 0,3—0,8	29,0	0,64±0,04 0,3—1,0	34,8	0,89±0,07 0,3—2,0	38,6	1,4	0,9	3,7	3,7

t — коэффициент достоверности разницы; при изучаемых выборках (как в I, так и во II опыте) разница достоверна при $t \geq 2,0$ на 95 %-ном доверительном уровне.

$\pm 1,1$ %), при быстром (36°C) — ($95,3 \pm 1,8$ % (коэффициент достоверности разницы $t = 1,2$; разница недостоверна); после медленного охлаждения ($0,8^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) всхожесть семян при медленном отогреве была ($95,3 \pm 2,9$ %), при быстром — ($97,2 \pm 0,6$ %) ($t = 0,6$; разница недостоверна). Число дней от посева до начала прорастания было одинаковым во всех вариантах опыта и в контроле (2 дня), продолжительность прорастания семян была также одинаковой (8 дней). Таким образом, изученные режимы охлаждения и отогрева семян гвоздики Фишера не показали достоверного влияния на лабораторную всхожесть.

Повторный опыт был заложен 25 февраля 1986 г. После быстрого замораживания в жидком азоте и медленного ($0,8^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) семена отогревали при 36°C и сеяли в теплице в кюветы; 18 марта растения пересадили в стеллаж (субстрат — торф). Число выращиваемых растений в контроле и в вариантах было увеличено до 50 экз. Надо отметить, что условия выращивания растений в I и II опытах были неидентичны: опыты были заложены в разное время, использовался разный субстрат; скорость медленного замораживания семян была неодинаковой.

Лабораторная всхожесть семян составила в контроле (100 ± 0 %), в ЖА — ($99,2 \pm 0,5$ %), в МЗ — (100 ± 0 %), то есть была практически одинакова. Измерения в фазу бутонизации (табл. 2) в мае 1986 г. показали, что растения из семян после замораживания, как и в I опыте, были более

Таблица 2

Влияние глубокого замораживания семян на рост и развитие растений гвоздики Фишера (опыт II)

Показатель	Контроль		Вариант замораживания				<i>t</i>	
	$M \pm m$, минимум— максимум	V, %	ЖА		МЗ		Контроль	
			$M \pm m$, минимум— максимум	V, %	$M \pm m$, минимум— максимум	V, %	ЖА	МЗ

Измерения растений в возрасте 2,5 мес. (май 1986 г.)

Процент цветущих экземпляров	12,0	—	16,0	—	28,0	—	—	—
Генеративный побег:	$29,2 \pm 5,4$	45,3	$31,1 \pm 2,3$	21,3	$36,8 \pm 0,5$	9,6	0,3	1,4
длина, см	11,5—47,0		24,0—41,5		26,0—48,5			
число бутонов на 1 побеге	$3,3 \pm 1,8$	130,9	$4,7 \pm 0,9$	53,0	$6,1 \pm 0,7$	43,9	0,7	1,4
	1—12		1—8		2—12			

Измерения растений в возрасте 3,5 мес. (июнь 1986 г.)

Процент цветущих экземпляров	82,0	—	74,0	—	72,0	—	—	—
Число генеративных побегов у 1 экз.	$1,9 \pm 0,2$	69,3	$1,7 \pm 0,2$	71,5	$1,9 \pm 0,2$	40,7	0,7	0
	1—6		1—6		1—4			
Генеративный побег:	$48,7 \pm 1,3$	16,5	$39,9 \pm 1,5$	23,2	$42,5 \pm 1,6$	23,0	4,4	3,0
длина, см	30—59		23—60		21,5—57,0			
Число междоузлий на главной оси	$14,1 \pm 0,3$	13,3	$14,1 \pm 0,3$	13,2	$14,3 \pm 0,3$	12,6	0	0,5
	9—17		10—19		11—18			
Число пазушных генеративных побегов на главной оси	$5,6 \pm 0,5$	56,8	$5,5 \pm 0,5$	52,5	$4,6 \pm 0,2$	31,6	0,1	1,8
	0—14		0—11		0—13			
Число генеративных элементов (бут + цв + плоды) на 1 побеге, %	$18,7 \pm 2,2$	71,2	$16,6 \pm 1,7$	61,3	$19,2 \pm 1,9$	60,1	0,7	0,2
	2—48		1—37		1—45			
в том числе:								
бутоны	59,9	—	54,9	—	45,8	—	—	—
цветки	28,3	—	30,7	—	27,1	—	—	—
плоды	11,8	—	14,4	—	27,1	—	—	—
Диаметр цветка, см	$2,77 \pm 0,04$	15,3	$2,78 \pm 0,04$	16,8	$2,79 \pm 0,03$	15,4	0,2	0,3
	2,0—3,8		2,0—3,8		1,6—3,5			
Диаметр главного корня, см	$0,54 \pm 0,01$	23,7	$0,50 \pm 0,01$	18,8	$0,61 \pm 0,03$	31,7	2,8	2,2
	0,3—0,8		0,3—0,8		0,3—2,0			

развиты по сравнению с контролем: процент растений, перешедших в генеративную фазу, выше; генеративные побеги длиннее и с большим числом бутонов (1 экз. уже цвел).

Выкопка растений в возрасте 3,5 мес показала, что различия по степени развития растений в контроле и вариантах опыта начали сглаживаться (коэффициент достоверности разницы по большинству показателей меньше 2,0). Субстрат в теплице для гвоздики во II опыте был очень неудачен, контрольные растения перенесли его лучше: по степени развития они довольно быстро стали догонять варианты опыта, а по некоторым показателям (длина генеративного побега) опередили их; процент плодов на побеге в ЖА и МЗ все же выше, чем в контроле (как и в I опыте).

Таким образом, экспериментальное изучение хода онтогенеза растений гвоздики Фишера из семян после криоконсервации показало неидентичность темпов развития контрольных и опытных растений. Подобные опыты сейчас продолжаются в грунтовых условиях питомника, заложенного в Биологическом центре АН СССР (г. Пущино, Московской обл.) осенью 1986 г., где высеяны после разных режимов замораживания 30 охраняемых видов растений Московской обл. Изучена их полевая всхожесть, процент гибели ювенильных растений в контроле и вариантах опытов; изучается ход онтогенеза растений; проверяется влияние криоконсервации семян на развитие растений последующих поколений.

1. Бутенко Р. Г., Попов А. С. Банк клеток растений — возможности и проблемы // Природа. — 1976. — № 4. — С. 2—11.
2. Вепринцев Б. Н., Ротт Н. Н. Проблема сохранения генофонда. — М.: Знание, 1985. — 48 с.
3. Вепринцев Б. Н., Ротт Н. Н. Консервация генетических ресурсов. Программа исследований. — Пущино: ОНТИ ЦБНТИ, 1984. — 23 с.
4. Зайцев Г. Н. Методика биометрических расчетов. — М.: Наука, 1973. — 256 с.
5. Молодкин В. Ю. Хранение семян зерновых, бобовых и технических культур при сверхнизких температурах // Бюл. ВИР. — 1984. — Вып. 144. — С. 38—40.
6. Молодкин В. Ю. Влияние сверхнизкотемпературной обработки на твердосемянность бобовых трав // Бюл. ВИР. — 1985. — Вып. 152. — С. 60—64.
7. Орлова Н. Н. Естественный мутационный процесс в семенах при их хранении // Успехи современной генетики. — М.: Б. и., 1972. — С. 206—228.
8. Попов А. С. Сохранение семян и меристем высших растений с помощью глубокого замораживания. — Пущино: ОНТИ ЦБНТИ, 1982. — 37 с.
9. Тихонова В. Л. Стратегия мобилизации и сохранения генофонда редких и исчезающих видов растений — Пущино: ОНТИ ЦБНТИ, 1985. — 34 с.
10. А. с. 1195157 СССР, МКИ⁴ F 25 D 3/10. Устройство для программируемого замораживания биобъектов / И. В. Красте, А. М. Хохлов // Открытия. Изобретения. — 1985. — № 44. — С. 178.
11. Stanwood P. S. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation // Cryopreservation of Plant Cells and Organs. — Boca Ration: C. R. C. Press, 1985. — P. 200—226.

ВНИИ охраны природы и заповедного дела,
Ин-т почвоведения и фотосинтеза АН СССР,
Ин-т биол. физики АН СССР,
г. Москва

Поступила 20.02.87

УДК 57.043:615.832.9

С. С. Есьман, А. Б. Рикберг, В. П. Сергиенко

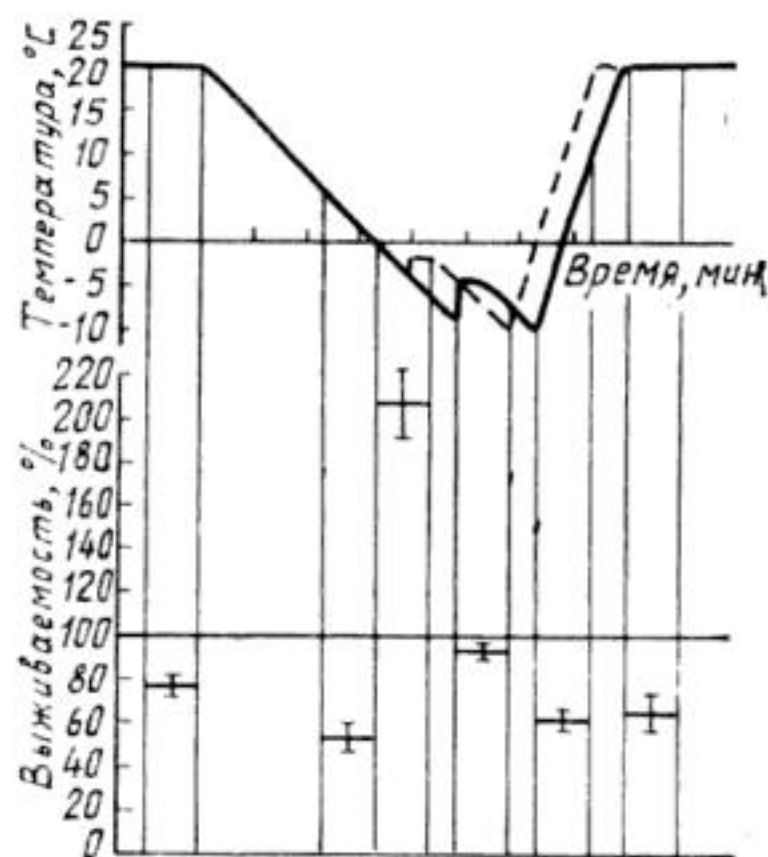
УСИЛЕНИЕ КРИОДЕСТРУКЦИИ УЛЬТРАЗВУКОМ. МОДЕЛИРОВАНИЕ НА КЛЕТОЧНОМ МОНОСЛОЕ

В последние годы для усиления криодекструкции патологически измененных тканей в ряде случаев используется ультразвук малой интенсивности, и получен довольно обширный экспериментальный и клинический материал. Однако механизмы усиления криодекструкции ультразву-

ком остаются неясными. В связи с этим представляет интерес детальный анализ влияния ультразвука на выживаемость клеток после криовоздействия в зависимости от температурной области или этапа охлаждения — отогрева, на котором накладывалось действие ультразвука. Проведение такого анализа на основании экспериментов *in vivo* нам представляется весьма сложным из-за значительных вариаций тепловых и акустических параметров воздействия внутри зоны замораживания как в пространстве, так и во времени, а также из-за наложения первичных и вторичных факторов повреждений.

Нами изучалось влияние ультразвука на криповреждения клеток *in vitro* в суспензии (асцитная саркома 37) и в монослойной культуре на стекле (*L*-клетки) [5]. Клетки в суспензии замораживали до -15°C , клетки в монослое — до -10°C . Ультразвук включали на 0,5 или 1 мин на одном

Рис. 1. Термограмма замораживания — отогрева и зависимость выживаемости *L*-клеток в монослое от этапа озвучивания. Пунктиром показан ход температуры после срыва переохлаждения ультразвуком. Параметры ультразвука: частота 0,88 МГц, плотность энергии 1,2 Дж/м³, длительность воздействия 60 с. Выживаемость в образцах, замороженных без ультразвука (криоконтроль), — от 44 до 48 %; в образцах, озвученных без замораживания (ультразвуковой контроль), — 95%. Каждый столбец со значением выживаемости в процентах от выживаемости в криоконтроле приведен под тем участком кривой, на котором проводилось озвучивание



из этапов охлаждения или отогрева. В суспензии клеток проявлялось преимущественно криозащитное действие при озвучивании на этапах охлаждения, как до, так и во время кристаллизации внеклеточной среды, выживаемость клеток после отогрева была выше, чем в образцах, замороженных по той же программе без ультразвука. Аналогичный эффект был нами позже получен и для *L*-клеток в суспензии. Эти результаты согласуются с данными [1] по замораживанию клеточных суспензий в ультразвуковом поле и могут представлять интерес в плане криоконсервации опухолевых штаммов. Вместе с тем, с точки зрения моделирования *in vitro* криоультразвуковых воздействий на реальные ткани, клеточные суспензии оказались, очевидно, малопригодными. В монослойной культуре *L*-клеток значительное увеличение выживаемости наблюдалось тогда, когда ультразвук включали во время охлаждения при достижении 0°C . При этом он вызывал срыв переохлаждения внеклеточного раствора [2] при $-2 \div -3^{\circ}\text{C}$, в отличие от остальных опытов, где кристаллизация внеклеточной среды начиналась спонтанно после переохлаждения до $-7 \div -11^{\circ}\text{C}$ (рис. 1). Во всех остальных случаях ультразвук приводил к усилению криповреждений. Механизм его «криозащитного» действия на этапе начала кристаллизации, как оказалось, связан со срывом переохлаждения в ультразвуковом поле, такое же увеличение выживаемости дает внесение ледяной затравки при замораживании по той же программе без ультразвука. Следует отметить, что при реальном криохирургическом воздействии, в отличие от описанных выше экспериментов, промораживание основного объема ткани происходит практически без переохлаждения, так как оно осуществляется в присутствии кристаллов льда на границе растущей зоны замораживания. Более или менее значительно могут переохлаждаться ткани лишь у наконечника криоинструмента или поверхностные участки тканей в случае орошения их жидким хладагентом. Поэтому практическое значение имеет изучение применения ультразвука

в сочетании именно с такими режимами замораживания, для которых переохлаждение не характерно. Целью настоящей работы явилось исследование выживаемости клеток после криовоздействия в сочетании с озвучиванием на различных этапах в условиях переохлаждения внеклеточной среды. Работа выполнена на монослоях клеток линии *L*.

Культуру *L*-клеток выращивали в термостате при 37 °С на стеклах размером 5 × 7 мм² толщиной 0,2 мм в среде, содержащей 10 % сыворотки крови крупного рогатого скота, 45 % гидролизата лактальбумина и 45 % среды 199. В эксперименте использовали стекла с культурой, выросшей до сплошного монослоя, на четвертые сутки после посева.

Замораживание клеток и ультразвуковое воздействие осуществляли в специальной криоультразвуковой камере [2]. Образцы помещали в алюминиевую ячейку, стенки которой охлаждались потоком паров азота и обогревались электронагревателем. Ко дну ячейки через кварцевый буфер подводились ультразвуковые колебания частотой 880 кГц от прибора УТП-1М. Температура измерялась медь-константановой термопарой, встроенной в дно ячейки. Контроль температуры и скорости ее изменения осуществлялся с помощью цифрового вольтметра В7—21 и вычислительного устройства «Электроника ДЗ-28». Погрешность измерений температуры не превышала 0,5 °С. Стекла с клеточными монослоями помещали непосредственно над спаем термопары, заливали 0,5 мл раствора Хенкса и охлаждали со скоростью около 6 °С/мин до —15 °С. При достижении 0 °С в раствор вводили ледяную затравку в виде инея, осевшего на предварительно охлажденной тонкой трубке. Выделение теплоты кристаллизации компенсировали увеличением расхода паров азота. После охлаждения до —15 °С образцы сразу же обогревали со скоростью 15 ÷ 20 °С/мин до комнатной температуры. По сравнению с более ранним исследованием [5] конечную температуру охлаждения понизили на 5 °С, так как после замораживания до —10 °С со снятием переохлаждения выживает более 90 % клеток; при этом трудно было бы зарегистрировать криозащитный эффект ультразвука в том случае, если бы он имел место. Применявшийся в данной работе режим охлаждения — обогрева близок к тем режимам, которые реализуются на периферии реальных зон замораживания. При таких режимах в большинстве исследованных тканей значительная часть клеток выживает после криовоздействия и поэтому задача усиления криоповреждений особенно актуальна.

Действие ультразвука с плотностью энергии 1,2 Дж/м³ и продолжительностью 1 мин (в непрерывном режиме) накладывалось на одном из этапов охлаждения — обогрева, до или после криовоздействия. Опыты по охлаждению — обогреву в сочетании с ультразвуковым воздействием периодически чередовали с опытами по охлаждению — обогреву без него (криоконтроль). Выживаемость клеток после криоультразвуковых воздействий определяли с помощью контрастного люминесцентного теста на целостность мембран [5, 6]. Сразу после обогрева стекла с клеточными монослоями помещали на 10 мин в раствор диацетата флуоресцеина и бромида этидия, а затем по люминесценции, наблюдаемой в ультрафиолетовом микроскопе, вели подсчет живых и погибших клеток. В каждом образце подсчитывалось около тысячи клеток.

Значения выживаемости *L*-клеток в монослое после замораживания — обогрева в сочетании с ультразвуком на различных этапах представлены в таблице. После самостоятельно примененного ультразвукового воздействия с теми же параметрами в изотермических условиях при 20 и 0 °С выживаемость составила соответственно (96 ± 4) % и (98 ± 3) % (ультразвуковой контроль). То есть, ультразвук с параметрами, использованными в работе, практически не повреждает *L*-клетки в монослойной культуре. На рис. 2 значения выживаемости после криоультразвуковых воздействий представлены в привязке к термограмме охлаждения — обогрева образцов. Каждый столбец со значением выживаемости после замораживания — обогрева, отнесенный к соответствующему значению в криоконтроле, для на-

Выживаемость клеток линии L в монослойной культуре после замораживания-отогрева в сочетании с ультразвуковым воздействием на различных этапах (частота ультразвука 0,88 МГц, плотность энергии 1,2 Дж/м³, длительность воздействия 60 с)

Этап наложения ультразвука	Выживаемость в криоконтроле, %	Выживаемость после криоультразвукового воздействия, %	Процент от криоконтроля
Перед охлаждением	57±2 (4)	42 ± 9 (4)	74 ± 16
При охлаждении от 6 до 0 °С	57±4 (7)	39 ± 7 (7)	69 ± 12
от 0 до —6 °С	59±5 (7)	46 ± 12 (7)	77 ± 15
от —7 до —13 °С	61±5 (5)	43 ± 10 (5)	70 ± 12
При отогреве от —15 до —1 °С	59±5 (7)	33 ± 8 (7)	56 ± 12
После отогрева	56±2 (4)	42 ± 3 (4)	75 ± 4

В таблице приведены средние по сериям опытов значения и среднеквадратичные погрешности. В скобках указано число опытов.

глядности приведен под тем участком кривой, на котором накладывалось действие ультразвука. Из приведенных результатов видно, что ультразвук малой мощности, не оказывающий повреждающего действия сам по себе, вызывает существенное усиление криоповреждений клеток в монослое при воздействии на всех этапах охлаждения — отогрева, а также до и после криовоздействия.

Полученные результаты хорошо согласуются с экспериментальными и клиническими данными о том, что ультразвук в неповреждающих дозах может усиливать степень криодеструкции тканей при воздействии до начала замораживания, во время охлаждения и во время отогрева. В частности, интересно отметить, что при криоультразвуковой терапии некоторых гиперпластических заболеваний [3] и в экспериментах на перевивных опухолях Герена [4], также как и в данной работе, степень повреждений несколько выше при воздействии ультразвука на этапе отогрева. Прежде всего это говорит о том, что клеточный монослой можно рассматривать, в отличие, скажем, от клеточной взвеси, в качестве подходящей модели *in vitro* для изучения ряда особенностей криоультразвуковых воздействий применительно к задачам криохирургии. Видимо, отличия клеточного монослоя от клеточной взвеси, заключающиеся, прежде всего, в наличии межклеточных контактов, столь существенны, что определяют качественно иной отклик на криоультразвуковое воздействие, приближая в этом отношении монослой к тканям.

Результаты настоящей работы подтверждают также, что полученное ранее [5] криозащитное действие ультразвука на монослой L-клеток в области температур чуть ниже 0 °С полностью обусловлено снятием переохлаждения в ультразвуковом поле. При замораживании без переохлаждения его криозащитный эффект не проявляется ни на одном из этапов охлаждения — отогрева. В связи с вопросом о переохлаждении может представлять интерес следующее обратное заключение: если и в реальных тканях выживаемость клеток после замораживания до сравни-

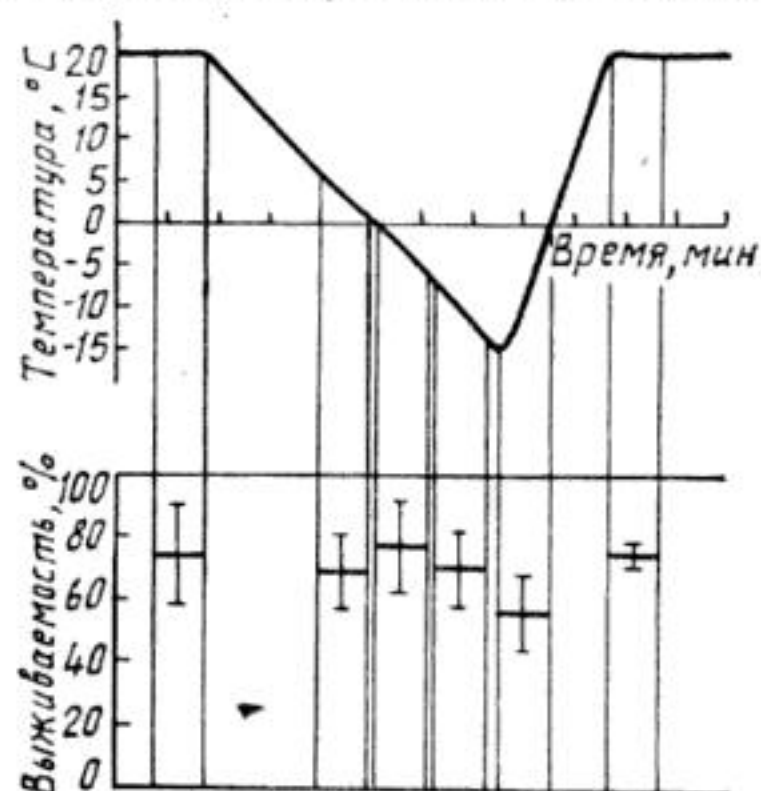


Рис. 2. Термограмма замораживания-отогрева L-клеток в монослое без переохлаждения внеклеточной среды и выживаемость клеток после отогрева в зависимости от этапа озвучивания (в процентах от криоконтроля). Частота ультразвука 0,88 МГц, плотность энергии 1,2 Дж/м³, длительность воздействия 60 с

тельно неглубоких температур так же сильно зависит от начального переохлаждения внеклеточной среды, как и в клеточном монослое, то это переохлаждение следует создавать искусственно там, где это только возможно.

Далее, наличие эффекта усиления криоповреждений *in vitro* свидетельствует в пользу того, что ультразвук оказывает действие *in vivo* уже на уровне прямых повреждений, не связанных с сосудистыми явлениями или откликом на уровне организма. В процессе воздействия он может изменять как состояние самих клеток, так и среды, в которой они находятся; последнее подразумевает влияние на ход физико-химических процессов, связанных с образованием, ростом и последующим плавлением кристаллов льда. Озвучивание монослоя *L*-клеток до начала охлаждения и в околонулевой области температур до начала кристаллизации заметно уменьшает выживаемость после замораживания, в то время как такое же по параметрам озвучивание при 20 и 0 °С без последующего замораживания оказывается безвредным для клеток. Следовательно, один из механизмов усиления криоповреждений ультразвуком проявляется в сенсibilизации клеток к повреждениям при последующем замораживании — отогреве. С другой стороны, при воздействии ультразвука до начала кристаллизации и на этапах образования и роста льда эффекты усиления криоповреждений незначительно отличаются по величине, в то время как физические состояния системы существенно различны. Это позволяет допустить, что и после появления льда в системе при наложении ультразвука действует тот же фактор, что и на предыдущих этапах. Усиление криоповреждений ультразвуком может быть связано с нарушениями проницаемости клеточных мембран, которые сами по себе обратимы, но при замораживании могут приводить к необратимым последствиям. Такие нарушения могут облегчать проникновение льда внутрь клетки из внеклеточной среды или замороженных соседних клеток на этапах замораживания — отогрева, увеличивая процент гибели за счет возрастания доли клеток с внутриклеточным льдом. Нарушения проницаемости на этапах отогрева и после плавления могут приводить к осмотическому шоку и пост-осмотическим нарушениям водно-ионного транспорта клетки. Конечно, мы не исключаем при этом и других механизмов усиления криоповреждений ультразвуком.

1. Вишневский В. И., Душейко А. Г., Маркова О. П. Замораживание клеток костного мозга в ультразвуковом поле // Криобиология и криомедицина. — 1980. — Вып. 7. — С. 17—21.
2. Есьман С. С., Лыков И. Г., Рикберг А. Б. Влияние ультразвука на переохлаждение воды и некоторых биологических сред // Криобиология. — 1986. — № 1. — С. 15—18.
3. Запорожан В. Н., Хаит О. В., Рикберг А. Б., Бакай Э. А. Криоультразвуковая терапия доброкачественных заболеваний шейки матки // Криобиология и криомедицина. — 1983. — Вып. 12. — С. 64—69.
4. Рикберг А. Б. Усиление криоповреждений опухолей с помощью ультразвука малой интенсивности (экспериментальное исследование): Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Киев, 1982. — 23 с.
5. Рикберг А. Б., Есьман С. С. Влияние ультразвука на криоповреждения клеток. — Киев, 1984. — 20 с. (Препринт / ИФ АН УССР, № 31).
6. Dankberg F., Persidsky M. D. A test of granulocyte membrane integrity and phagocytic function // Cryobiology. — 1976. — 13, N 5. — P. 430—432.

Ин-тут физики АН УССР,
г. Киев

Получена 18.06.87

В. И. Лупальцев, Ю. В. Цупров

АКТИВНОЕ ХИРУРГИЧЕСКОЕ ЛЕЧЕНИЕ С КРИОВОЗДЕЙСТВИЕМ ПРИ ГНОЙНО-НЕКРОТИЧЕСКИХ ПОРАЖЕНИЯХ МЯГКИХ ТКАНЕЙ

Исследования отечественных и зарубежных авторов [1, 2, 3, 8] показали целесообразность активного хирургического лечения гнойных ран и гнойно-некротических поражений мягких тканей. В последнее время наряду с другими физическими методами в лечении гнойных ран определенное место заняло применение холода, под воздействием которого уменьшается микробная обсемененность патологического очага, сокращается период вторичного очищения раны, ускоряются репаративные процессы [4, 5, 6, 7].

Активный хирургический метод, дополненный дозированным охлаждением, применен у 92 больных в возрасте от 18 до 71 года. Из них мужчин было 39, женщин — 53. У 39 больных были постинъекционные абсцессы, у 4 — флегмоны, у 6 — карбункулы, у 8 — гнойный мастит, у 4 — нагноившаяся киста копчика, у 6 — гнойный бурсит. У 15 больных имелись посттравматические гнойные раны, у 10 — нагноившиеся послеоперационные раны. Контрольную группу составили 35 больных с аналогичной патологией, которым проводилось активное хирургическое лечение без дозированного охлаждения патологического очага. По полу и возрасту основная и контрольная группы однородны.

Оперативное вмешательство проводилось под общим обезболиванием. В зависимости от распространенности воспалительной инфильтрации мягких тканей и формы гнойной полости метод осуществлялся в трех вариантах. В случаях, когда гнойная полость была сложной конфигурации и имелась выраженная инфильтрация мягких тканей, производилось широкое вскрытие гнойника с иссечением явно нежизнеспособных тканей и разрушением перемычек, после чего гнойная полость тщательно промывалась антисептиками и осушивалась. Далее производилась криообработка гнойного очага парожидкостной струей азота при помощи криораспылителя КР-02 на расстоянии 20—30 см до побеления раны и кратковременного появления на ней инея. Затем гнойная полость через отдельные разрезы дренировалась полихлорвиниловыми трубками с последующим ушиванием раны наглухо. В послеоперационном периоде проводилось постоянное промывание гнойной полости растворами антисептиков со скоростью 30—40 капель в минуту (водный раствор фурацилина 1 : 5000, риванол 0,05 % и др.) с активной аспирацией раневого содержимого с помощью электровиброотсоса.

При лечении локализованных абсцессов мягких тканей небольших размеров применялось сквозное дренирование без широкого вскрытия гнойника, достаточное для пальцевой ревизии и проведения криообработки гнойной полости. В дальнейшем рана капельно промывалась антисептическими растворами с активной аспирацией отделяемого. В случаях, когда имелась обширная зона воспалительной инфильтрации тканей вокруг гнойника, появлялись некротические изменения на коже и отсутствовали условия для наложения швов на рану без натяжения, после проведения дозированного охлаждения и дренирования раны края ее стягивались липким пластырем, послеоперационное ведение раны осуществлялось по вышеописанной методике. При лечении нагноившихся посттравматических и послеоперационных ран вслед за первичной хирургической обработкой производилось криоорошение и дренирование раны с последующим капельным промыванием и активной аспирацией диализата.

Оценка эффективности лечения проводилась на основании показателей температуры ран, концентрации водородных ионов в раневой среде, уровня

бактериальной обсемененности, общей цитологической характеристики регенерации с подсчетом основных клеточных элементов в раневом экссудате и уровня активности катионных белков лейкоцитов. Перечисленные исследования проводились до начала лечения, на 1-е, 3-и и 6-е сутки. Кроме того, о ходе заживления судили по внешнему виду ран, характеру и количеству экссудата. При этом учитывались сроки очищения ран от гноя и некротических масс, начала эпителизации и длительность пребывания больных в стационаре.

Причиной гнойного процесса явился стафилококк в монокультуре у 39 (42,4 %) больных, стафилококк в ассоциациях с грамотрицательной флорой — у 9 (9,3 %) больных. Стрептококк был обнаружен у 10 (10,7 %) человек. Грамотрицательные палочки, принадлежащие семейству *Enterobacteriaceae*, а также палочка сине-зеленого гноя выделены у 43 (46,8 %) больных, причем у 9 (9,3 %) — в ассоциациях со стафилококком, у 3 (2,9 %) — в других ассоциациях. Интересно отметить, что причиной острых гнойно-некротических заболеваний мягких тканей в подавляющем большинстве случаев (86,4 %) являлись грамположительные кокки, тогда как при нагноениях послеоперационных и посттравматических ран преобладала грамотрицательная флора, соответственно 87,3 % и 56,8 %.

Перед началом лечения раны были покрыты гнойно-некротическими массами. Кожа вокруг ран гиперемирована, пальпаторно определялся плотный, болезненный инфильтрат. Исходная температура ран была $(34,9 \pm 0,06)^\circ\text{C}$. Уровень pH раневой среды в большинстве случаев доходил до $6,0 \pm 0,02$. В цитограммах все поле зрения иммерсионного объектива микроскопа занимали эритроциты ($19,4 \pm 1,8$) и лейкоциты ($33,2 \pm 3,41$). Причем лейкоцитов с выраженными структурными изменениями было $(30,1 \pm 2,1) \%$, а погибших — $(29,4 \pm 2,1) \%$; отдельные поля зрения были сплошь представлены клеточным детритом и фибрином. Большая часть лейкоцитов была лишена способности к захвату микроорганизмов и только $(16,4 \pm 1,8) \%$ из них содержали активные катионные белки. В этот срок исследования лейкоциты содержали живые бактерии, одновременно в мазках определялось большое количество микробов, находящихся вне клеток. Микробная обсемененность ран была $(6,2 \pm 56) \cdot 10^6$ бактерий в 1 г тканей раны.

В первые сутки лечения почти у всех больных отмечалось наличие воспалительной инфильтрации тканей вокруг ушитых ран, гиперемия кожи и болезненность. Перед началом промывания из дренажных трубок поступало жидкое гнойное отделяемое. Вокруг ран у больных контрольной группы в этот срок исследования наблюдались аналогичные изменения, однако гнойное отделяемое было значительно гуще и в меньшем количестве. Температура ран у больных основной группы достигала $(35,8 \pm 0,05)^\circ\text{C}$, тогда как у больных контрольной группы в этот срок исследования она была $(34,6 \pm 0,04)^\circ\text{C}$. При определении pH раневой среды было установлено, что у большинства больных реакция раневого отделяемого становилась более кислой и находилась в пределах $5,9 \pm 0,08$. У больных контрольной группы в этот срок исследования концентрация водородных ионов была $6,6 \pm 0,7$. Цитологическое исследование экссудата из дренажных трубок у больных основной группы в это время указывало на то, что процессы воспаления характеризовались меньшей остротой. На фоне большого количества полиморфноядерных лейкоцитов менее выражен цитолиз и распад клеток; в мазках появлялись единичные мононуклеарные элементы: лимфоциты, макрофаги, молодые полибласты. При этом существенно возрастали показатели бактерицидной активности катионных белков нейтрофилов, достигавшие $(72,0 \pm 4,5) \%$. Для цитограмм контрольных ран характерно преобладание нейтрофилов с выраженными структурными изменениями $(28,7 \pm 5,1) \%$ и погибших клеток $(28,4 \pm 3,12) \%$. Бактерицидная активность катионных белков нейтрофилов составляла $(15,0 \pm 3,9) \%$. Микробная обсемененность ран у больных основной группы значительно снижалась в сравнении с пре-

дыдущим сроком исследования и контрольной группой, составляя $(7,0 \pm 1,6) \cdot 10^4$ бактерий в 1 мл раневого экссудата. Температура тела у больных основной группы в этот срок была $(36,9 \pm 0,03)^\circ\text{C}$, а у больных контрольной группы — $(37,2 \pm 0,07)^\circ\text{C}$.

На третьи сутки лечения у всех больных основной группы полностью исчезали боли, значительно улучшалось самочувствие; гиперемия кожи, инфильтрация и болезненность вокруг ран значительно уменьшались, гнойного отделяемого из дренажных трубок становилось меньше. У контрольных в указанный срок исследования по-прежнему сохранялась гиперемия кожи, выраженная отечность тканей, при пальпации отмечалась болезненность, гнойного отделяемого оставалось значительное количество. Локальная температура у больных основной группы несколько повышалась и равнялась $(35,1 \pm 0,03)^\circ\text{C}$ (в контроле $(34,5 \pm 0,03)^\circ\text{C}$), хотя и снижалась на $(0,6-0,5)^\circ\text{C}$ по сравнению с предыдущим сроком исследования. Реакция раневого экссудата становилась менее кислой и достигала $7,1 \pm 0,02$, при этом в цитограммах значительно уменьшалось общее число нейтрофильных лейкоцитов до $14,4 \pm 1,3$ нейтрофила в поле зрения, увеличивалось количество гистиоцитарных элементов до $2,8 \pm 1,2$ в поле зрения. Бактерицидная активность катионных белков нейтрофилов оставалась высокой и находилась в пределах $(88,0 \pm 4,2)\%$. Цитограммы контрольных ран в этот срок исследования характеризовались лейкоцитарной реакцией (до $30,5 \pm 4,20$ нейтрофилов в поле зрения) с высоким относительным содержанием дистрофически измененных и погибших нейтрофилов, причем бактерицидная активность их катионных белков была в пределах $(20,0 \pm 1,08)\%$. Бактериологическое исследование экссудата из дренажных трубок показало снижение уровня микробной обсемененности ран у больных основной группы на третьи сутки лечения до $(1,9 \pm 0,38) \cdot 10^4$ бактерий в 1 г тканей раны. Температура тела у больных основной группы в этот срок исследования была $(36,7 \pm 0,03)^\circ\text{C}$, а у больных контрольной группы — $(37,1 \pm 0,07)^\circ\text{C}$.

На шестые сутки лечения кожа вокруг ран у больных основной группы приобретала обычную окраску, инфильтрации и болезненности не отмечалось, гнойное отделяемое становилось скудным. Температура ран у больных основной группы в этот период была $(34,8 \pm 0,05)^\circ\text{C}$. Кислотность раневого экссудата снижалась вплоть до щелочной реакции: $7,9 \pm 0,04$. Цитологическое исследование свидетельствовало о стихании воспаления и активации регенерации ран с увеличением в мазках малодифференцированных (до $4,4 \pm 1,6$ в поле зрения) и соединительнотканых клеток полибластов (до $3,1 \pm 1,4$). Антибактериальная активность сохраняющихся нейтрофилов оставалась достаточно высокой ($87,1 \pm 1,2$). Микробная обсемененность ран у больных основной группы в этот срок исследования составляла $(2,9 \pm 0,33) \cdot 10^3$ бактерий в 1 мл экссудата. Температура тела у больных этой группы на шестые сутки лечения была $(36,6 \pm 0,02)^\circ\text{C}$. У больных контрольной группы в этот период сохранялась гиперемия кожи вокруг ран, отечность тканей и выраженная болезненность при пальпации. Гнойного отделяемого было значительное количество. Локальная температура ран у больных этой группы составляла $(34,7 \pm 0,3)^\circ\text{C}$. Реакция раневой среды была слабощелочной ($7,5 \pm 0,07$). При этом в цитограммах содержалось большое количество нейтрофилов, $30,5 \pm 4,2$ в поле зрения, и хотя отмечалось снижение содержания дегенеративно измененных лейкоцитов до $(21,2 \pm 1,2)\%$ и увеличение нормально сегментированных нейтрофилов до $(46,3 \pm 1,2)\%$, бактерицидная активность их катионных белков была $(32,0 \pm 4,2)\%$. Микробная обсемененность ран у больных контрольной группы в этот срок исследования составляла $(5,5 \pm 1,8) \cdot 10^4$ бактерий в 1 г тканей раны. Температура тела у больных контрольной группы была $(36,9 \pm 0,04)^\circ\text{C}$.

Клинические анализы крови, мочи, сахара крови не выявили существенных различий между показателями основной и контрольной групп. Ка-

ких-либо отрицательных сдвигов в показателях гемодинамики в ходе лечения обнаружено не было.

Дренажные трубки у больных основной группы удалялись обычно на 5—6 сут, и у большинства больных (89 человек) раны зажили первичным натяжением. Полное очищение ран у больных основной группы заканчивалось к $(5,9 \pm 0,11)$ сут. Больные этой группы находились в стационаре $(8,6 \pm 0,52)$ сут. В процессе лечения у 3-х больных наступило полное расхождение краев раны, что мы связываем с недоучетом противопоказаний к наложению первичного шва при наличии обширной зоны воспалительной инфильтрации вокруг ран. Своевременное снятие швов и ведение раны открытым способом позволило быстро ликвидировать последствия этого осложнения, однако длительность процесса заживления ран увеличилась вдвое. У 2-х больных отмечались осложнения, не повлекшие серьезных последствий — вторичное инфицирование по ходу прокольных каналов швов; снятие швов на шестые сутки позволило быстро санировать очаги инфекции. На сроки лечения и конечный результат эти осложнения не повлияли.

Дренажные трубки из ран больных контрольной группы удалялись на 7—8-й день. Полное очищение ран заканчивалось к $(7,3 \pm 0,68)$ сут. Больные этой группы находились в стационаре $(12,8 \pm 1,4)$ сут. Нагноение послеоперационных ран отмечено у 3-х больных. У одной больной длительное нахождение дренажей в тканях повлекло за собой образование ниспадающего канала с постоянным серозным отделяемым, что потребовало дополнительного вскрытия и дренирования.

Таким образом, воздействие на гнойные очаги парожидкостной струей азота является эффективным дополнением к первичной хирургической обработке гнойной раны, позволяющим уменьшить микробную обсемененность, ускорить очищение ран и сократить число осложнений и длительность лечения больных с гнойно-некротическими поражениями мягких тканей.

1. Костюченко Б. М., Карлов В. А. Принципы активного хирургического лечения гнойных ран // II Всесоюз. конф. «Раны и раневая инфекция». — М.: Б. и., 1986. — С. 17—19.
2. Кузин М. И., Костюченко Б. М. Раны и раневая инфекция. — М.: Медицина. — 1981. — 236 с.
3. Куликов Ю. С., Ефимов Е. А., Гордеев Е. Г. О возможности и целесообразности первичного шва гнойной раны // I Всесоюз. конф. по ранам и раневой инфекции. — М.: Б. и., 1977. — С. 107—108.
4. Пушкарь Н. С., Сандомирский Б. П., Митасов В. И. и др. Криохирurgia гнойных ран // I Всесоюз. конф. по ранам и раневой инфекции. — М.: Б. и., 1977. — С. 142—143.
5. Сандомирский Б. П., Панков Е. Я., Шенберг М. Г. и др. Особенности заживления гнойных ран после криовоздействия // Вопросы криоконсервирования биологических объектов. — Киев: Наук. думка, 1978. — С. 92—96.
6. Сандомирский Б. П., Чеканов В. П. Криотерапия гнойных ран // II Всесоюз. конф. «Раны и раневая инфекция». — М.: Б. и., 1986. — С. 32—33.
7. Чеканов В. П. Применение холода для лечения гнойных ран: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Харьков, 1984. — 15 с.
8. Benson E., Goodman M. Incision with primary suture in the treatment of acute purulent breast abscess // Brit. J. Surg. — 1970. — 57, N 3. — P. 276—279.

Харьковский мед. ин-т

Поступила 29.12.86

УДК 574.24:577.125

Г. Ф. Жсгунов, Е. В. Кудокоцева

ОСОБЕННОСТИ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА У СУСЛИКОВ ПРИ ПЕРИОДИЧЕСКИХ ПРОБУЖДЕНИЯХ ОТ ЗИМНЕЙ СПЯЧКИ

Зимоспящие млекопитающие обладают уникальной особенностью: гетеротермией. Причем эта особенность является не только сезонной, так как известно, что на протяжении всего периода зимней спячки (6—8 мес.) живот-

ные пробуждаются и разогреваются от $2 \div 5$ до 37°C каждые 10—15 сут [8], а также могут изменять температуру тела в течение всего года, исключая период гона [2]. Процесс перехода животного из состояния гомеотермии в состояние пойкилотермии и наоборот протекает довольно быстро: в течение нескольких часов [3]. Остаются неизвестными механизмы, обеспечивающие адекватное функционирование клеток в разных физиологических состояниях гибернаторов. Известно, что при подготовке к зимней спячке грызуны запасают большое количество липидов как в жировой ткани, так и в клетках других тканей и органов [2]. При этом происходят изменения липидного состава клеточных мембран [7]. Считается, что модификация жирнокислотного и фосфолипидного состава мембран перед гибернацией является адаптивным процессом и обеспечивает функционирование клетки в условиях пониженных температур на протяжении всей зимы [8]. Однако остается неизвестной роль липидного обмена в клетках (и клеточных мембранах) в обеспечении быстрых перестроек метаболизма при временных пробуждениях и изменении физиологического статуса животных. В данной работе изучали липидный состав и интенсивность обмена липидов мембран клеток печени и сердца гибернирующих, пробуждающихся и активных сусликов.

Опыты проводились зимой на длиннохвостных сусликах *Citellus undulatus*. Исследовались ткани сердца и печени гибернирующих (температура тела $2 \div 5^\circ\text{C}$), пробуждающихся (разогревающихся от $2 \div 5$ до $30 \div 32^\circ\text{C}$) и активных ($36 \div 37^\circ\text{C}$), бодрствующих в течение суток сусликов. С целью изучения интенсивности синтеза липидов животным внутрибрюшинно вводили ^{14}C -ацетат (предшественник синтеза жирных кислот) из расчета 0,65 мКи/кг веса. Гибернирующие суслики не пробуждались после инъекций, если укол делали очень аккуратно, не вынимая их из гнезда и не нарушая позы зимней спячки. Спустя 3 ч животных декапитировали, извлекали органы и гомогенизировали в 0,25 М сахарозе, забуференной 10 мм гистидина, $\text{pH } 7,4$. Фракции митохондрий и микросом выделяли из гомогенатов методом дифференциального центрифугирования [1]. Экстракцию, фракционирование и определение концентрации липида проводили стандартными методами [5]. Радиоактивность фракций определяли в диоксановом сцинтилляторе на счетчике «Бекман 7800».

Т а б л и ц а 1

Интенсивность включения ^{14}C -ацетата в липиды клеток сердца и печени сусликов, количество распадов/(мин · мг липида)

Исследуемый препарат	Суслик		
	гибернирующий	пробуждающийся	активный
Гомогенат сердца	170 ± 20	1240 ± 150	3650 ± 430
Микросомы сердца	150 ± 25	1350 ± 200	3800 ± 350
Митохондрии сердца	180 ± 30	1550 ± 210	3400 ± 370
Гомогенат печени	1700 ± 320	14000 ± 1500	40000 ± 5000
Микросомы печени	4000 ± 380	16000 ± 1200	40000 ± 3500

Как видно из табл. 1, во время зимней спячки происходит включение меченых предшественников в липиды тканей сердца и печени сусликов. Это свидетельствует о протекании процесса синтеза липидов во время оцепенения, несмотря на низкую температуру тела животных. Более активно включается ацетат в липиды печени, особенно много вновь синтезированного липида обнаруживается в микросомальной фракции. При пробуждении сусликов происходит активация синтетических процессов во всех изучаемых объектах, наиболее значительно — в микросомальной фракции сердца и печени. Однако самая высокая скорость включения метки в липиды клеток органов из всех групп животных наблюдается у активных грызунов.

Следует отметить, что в клетках печени сусликов интенсивность липидного обмена значительно выше, чем в сердце (табл. 1). Это характерно для всех групп изучаемых животных. Причем в печени гибернарующих сусликов поддерживается довольно высокий уровень липидного обмена, несмотря на низкую температуру тела. Видимо, во время зимней спячки печень сусликов играет более значительную роль в обеспечении липидного обмена гетеротермных млекопитающих. При пробуждении грызунов происходит повышение интенсивности включения вновь синтезируемых липидов в мембраны клеток печени в 4—8 раз и в 10—20 раз у активных животных. При разогревании сусликов наблюдается также существенная интенсификация обмена липидов и в клетках сердца, в 8—10 раз, а у активных сусликов эта величина в 20—25 раз выше, чем у гибернарующих грызунов.

При исследовании липидного состава микросомальных фракций сердца и печени установлено, что соотношение фракций общих липидов мембран во время спячки, пробуждения и бодрствования практически не изменяется (табл. 2). Изменения обнаружены только во фракции жирных кислот.

Таблица 2

Липидный состав мембран клеток сердца и печени сусликов

Класс липидов	Процентное отношение липидных фракций к общему количеству липидов (средние данные 3-х экспериментов)					
	Микросомы сердца суслика			Микросомы печени суслика		
	гибернарующего	пробуждающегося	активного	гибернарующего	пробуждающегося	активного
Фосфолипиды	37,0	37,2	37,3	38,6	36,8	40,4
Холестерин	17,2	17,5	16,8	18,6	17,6	18,2
Жирные кислоты	12,6	12,0	16,8	10,8	15,6	13,1
Триглицериды	12,6	11,3	10,7	10,3	10,6	8,8
Метиловые эфиры жирных кислот	8,6	9,5	7,4	9,4	8,4	9,0
Эфиры холестерина	12,0	12,5	11,0	12,3	11,0	10,5

Интенсивность обмена липидных фракций в мембранах находится на низком уровне у гибернарующих грызунов, возрастает в несколько раз при пробуждении и затем остается на том же уровне или несколько уменьшается у активных животных (табл. 3). При пробуждении млекопитающих во фракции микросом сердца наиболее активно обмениваются жирные кислоты, а в микросомах печени наиболее значительно обмениваются фосфолипиды, жирные кислоты и триглицериды. Другие липидные фракции: холестерин и его эфиры, а также эфиры жирных кислот практически не включают метку независимо от состояния гибернаторов.

Таблица 3

Интенсивность включения ^{14}C -ацетата во фракции общих липидов микросом сердца и печени, количество распадов/(мин · мг липида)

Класс липидов	Микросомы сердца суслика			Микросомы печени суслика		
	гибернарующего	пробуждающегося	активного	гибернарующего	пробуждающегося	активного
Фосфолипиды	100±15	240±25	195±20	130±20	1000±130	1140±150
Жирные кислоты	120±15	3140±320	1230±150	360±45	620±75	600±45
Триглицериды	70±10	120±15	210±25	80±15	600±75	290±35

Полученные данные свидетельствуют о том, что во время периодических пробуждений и изменений физиологического состояния животных ли-

липидный состав мембран существенно не меняется (табл. 2). Хотя интенсивность обмена липидов увеличивается при пробуждении млекопитающих, она не достигает уровня, характерного для активных животных. Вышеуказанное согласуется с представлениями о том, что липиды мембран клеток зимоспящих изменяются перед началом периода гибернации и в дальнейшем уже существенно не модифицируются на протяжении всей спячки [8]. Однако это не означает, что мембраны клеток гетеротермных животных не изменяют свойств при периодических пробуждениях во время спячки. Во-первых, даже незначительные изменения качественного и количественного состава мембран могут существенно модифицировать их барьерные свойства и активность встроенных ферментов [6]. Во-вторых, как нами показано ранее [4], при искусственном пробуждении происходит значительная активация синтеза белка в различных тканях сусликов, в 1,5—4 раза превышающая интенсивность синтеза в клетках активных животных. При этом происходит включение вновь синтезированных белков в мембраны клеток сердца и печени. Вероятно, изменение белкового состава клеток и их мембран также может способствовать адаптации тканей гибернирующих животных к быстро изменяющимся условиям функционирования при разогревании.

Таким образом, установлено, что метаболизм липидов зимоспящих животных имеет следующие особенности:

- липидный обмен в печени значительно выше чем, в клетках сердца;
- наиболее высокая скорость синтеза липидов в изучаемых органах отмечена у активных сусликов;

— интенсивность биосинтеза липидов во время зимней спячки существенно снижается, причем в клетках сердца значительно сильнее, чем в печени;

— при пробуждении животных происходит постепенное повышение скорости биосинтеза липидов, но не до уровня активных животных;

— при пробуждении сусликов наиболее интенсивно в исследуемых тканях синтезируются жирные кислоты;

— липидный состав клеточных фракций как сердца, так и печени практически не отличается у сусликов в различных физиологических состояниях; видимо, липидный обмен не является определяющим при изменении гомеостаза гетеротермных животных в период гибернации.

1. Биохимическое исследование мембран / Под ред. Э. Мэдди.— М.: Мир, 1979. — 460 с.
2. Виноградов В. Н., Ахременко А. К. Популяционная экология длиннохвостых сусликов Якутии.— Якутск: Изд-во Якутского филиала СО АН СССР, 1982.— 164 с.
3. Жегунов Г. Ф. Электрофизиологические параметры функционирования сердца сусликов *Citellus undulatus* в процессе пробуждения от зимней спячки // Криобиология.— 1986.— № 1.— С. 31—34.
4. Жегунов Г. Ф., Микулинский Ю. Е. Активация синтеза белка в тканях зимоспящих животных при пробуждении // Укр. биохим. журн.— 1987.— 11, № 5.— С. 75—77.
5. Кейтс М. Техника липидологии.— М.: Мир, 1975.— 322 с.
6. Крепс Е. М. Липиды клеточных мембран.— Л.: Наука, 1981.— 339 с.
7. Aloia R. C., Pengelly E. T. Lipid composition of cellular membranes of hibernating mammals // Chem. Zool.— 1979.— 11, N 1.— P. 1—42.
8. Wang L. C. H. Live at low temperature: mammalian hibernation // Cryo-Lett.— 1985.— 6, N 4.— P. 257—274.

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

Поступила 06.07.87.

Ю. С. Паращук, М. И. Шраго, Ю. В. Калугин,
Л. А. Ханина, С. В. Коций, Е. Н. Черныш

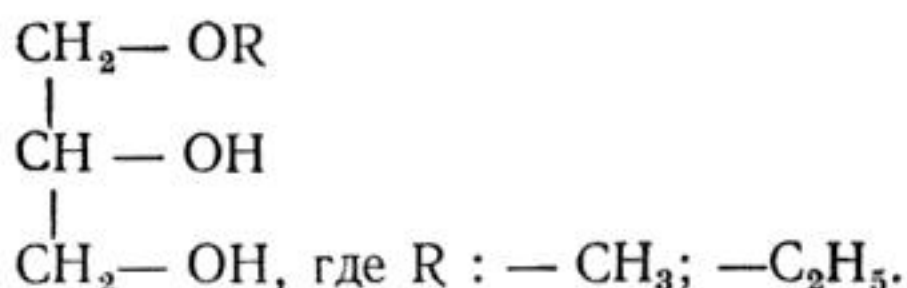
СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ И КРИОЗАЩИТНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ГЛИЦЕРИНА И ЕГО АЛКИЛОВЫХ ЭФИРОВ ПРИ ЗАМОРАЖИВАНИИ СПЕРМИЕВ ЧЕЛОВЕКА

Эффективность криоконсервирования биологических объектов во многом зависит от их структурно-функциональных особенностей, а также от вида примененного криопротектора и состава криоконсерванта. В последнее время возрос интерес к созданию низкотемпературных банков спермы человека, замороженных под защитой глицерина, который обеспечивает сохранение 65 % клеток [1, 4, 3]. Однако растворы, применяемые при криоконсервации спермы человека, плохо проникают через плазматические мембраны, что может привести к возникновению градиента осмотического давления, отрицательно влияющего на физиологическое состояние клеток.

В связи с этим целью данной работы явилось выяснение особенностей взаимодействия модифицированных молекул глицерина с клеточной мембраной. В настоящем сообщении приведены данные о действии указанной модификации структуры молекулы глицерина на его криопротекторные свойства при замораживании спермы человека.

В отделе криопротекторов Института проблем криобиологии и криомедицины АН УССР были получены монометиловый (1-ММЭГ) и моноэтиловый (1-МЭЭГ) эфиры глицерина путем взаимодействия 1-моноклоргидрина глицерина с соответствующими алкоголями по разработанной методике [2]. Строение полученных соединений подтверждалось молекулярной рефракцией и ИК спектроскопией. Идентификацию полученных веществ проводили путем сравнения показателя преломления и плотности с литературными данными [2]. Чистоту веществ контролировали методом газожидкостной хроматографии.

При введении алкильных групп в молекулу глицерина, образуются неполные эфиры глицерина, имеющие свойства как спиртов, так и эфиров:



Изменяется липофильно-гидрофильный баланс молекулы, характеризующий полярность соединений и описываемый логарифмом коэффициента распределения ($\lg P$) между водой и фазой, моделирующей липид, Н-октанолом. Из экспериментальных данных по $\lg P$ для глицерина, 1-ММЭГ и 1-МЭЭГ [5] следует, что с увеличением алкильного радикала гидрофобность ($\lg P$) полученных производных глицерина растет от $-2,66$ для глицерина, $-1,39$ для 1-ММЭГ до $-1,22$ для 1-МЭЭГ.

Изучение криозащитных свойств этих соединений, ранее проведенное на клетках костного мозга крыс, клетках перевиваемой линии почки теленка и тромбоцитах донорской крови человека, показало более высокую криопротекторную активность у ММЭГ по сравнению с глицерином при рабочей концентрации в 2—3 раза более низкой.

Действие глицерина, ММЭГ, МЭЭГ в проводимых опытах оценивалось по интегральным показателям жизнеспособности клеток: характеру и продолжительности движения после пребывания в средах, содержащих испытуемые растворы как до, так и после замораживания.

Всего исследовано 60 образцов спермы, заготовленной от доноров.

Условия опыта были унифицированы: температура инкубации в среде (20 ± 2) °С, растворителем являлась глюкозо-желточно-холино-хлоридная среда с концентрацией криопротектора 2,5 %, плотность клеточной суспензии — 40 млн клеток в 1 мл. Спермии замораживали по двухэтапной программе: 1 °С/мин до —5 °С, затем $85 \div 90$ °С/мин до —170 ÷ —180 °С. Цитотоксичность веществ определялась в динамике в процессе инкубации клеток в испытуемой среде в течение 6 ч.

В результате проведенных исследований установлено, что подвижность спермиев после их инкубации на протяжении первого часа в среде глицерина, ММЭГ и МЭЭГ в 2,5 % концентрации снижалась незначительно и монотонно. В растворах этих соединений высокой концентрации (до 10 %) при последующей экспозиции клеток в течение 3 ч подвижность спермиев достоверно снижалась, причем этот эффект в наибольшей мере проявлялся в нативной сперме, переживаемость клеток в которой достоверно снизилась по сравнению с суспензией, содержащей глицерин и его производные (рис. 1).

Снижение показателя подвижности в этих средах и характер движения клеток не имели существенных различий. К шести часам эквilibрации клеток в указанных условиях снижение подвижности спермиев в среде глицерина и ММЭГ было аналогичным, в то время как в среде МЭЭГ и в нативной сперме она была значительно выражена. Подвижность спермиев в нативных образцах и в среде МЭЭГ достоверно отличалась от показателя для метильного производного глицерина и незамещенного его аналога. Таким образом, в течение 3 ч эквilibрации образцов спермы наиболее интенсивное падение подвижности клеток отмечено в нативной сперме, что закономерно, поскольку в ней отсутствуют компоненты, входящие в криоконсервант, стабилизирующий постоянство во внеклеточной среде и повышающие устойчивость клеточной мембраны. При последующем выдерживании клеток в среде глицерина, ММЭГ и МЭЭГ ингибирующее действие последних ослабевает. Очевидно, смена малоинтенсивного снижения подвижности, отмечаемая в первые 3 ч их эквilibрации в среде глицерина и его производных, более интенсивным при последующем экспонировании в среде МЭЭГ связана с изменением силы гидрофобных взаимодействий этильных группировок в молекулах глицерина с мембраной клеток, по сравнению с метильными группами ММЭГ, либо деградацией молекул МЭЭГ (расщепление, окисление и др.).

Криозащитные свойства ММЭГ и МЭЭГ изучались в условиях многофакторного эксперимента с варьированием концентрации изучаемых соединений от 2 до 7 %, скорости охлаждения на втором этапе от 20 до 110 °С/мин, при температуре перехода с первого этапа охлаждения на второй до 20 °С. На первом этапе охлаждения спермиев осуществлялось со скоростью 1 °С/мин. В качестве упаковки использовали катетеры для подключичных артерий.

Результаты исследований показали (рис. 2,3), что для реализации криозащитной эффективности соединений требуются различные условия. Если в случае МЭЭГ криозащитные свойства максимально проявляются при концентрации 2,5 % и скорости охлаждения на втором этапе 80 °С/мин, то для ММЭГ, с той же целью, концентрация должна быть увеличена до 5 % при той же скорости охлаждения. Однако выживаемость клеток при оптимальном варианте криоконсервации резко отличается в обоих случаях: для метильного производного глицерина она составляет 74 %, для этильного — 34 %. В первом случае выживаемость спермиев соответствует такому же по-

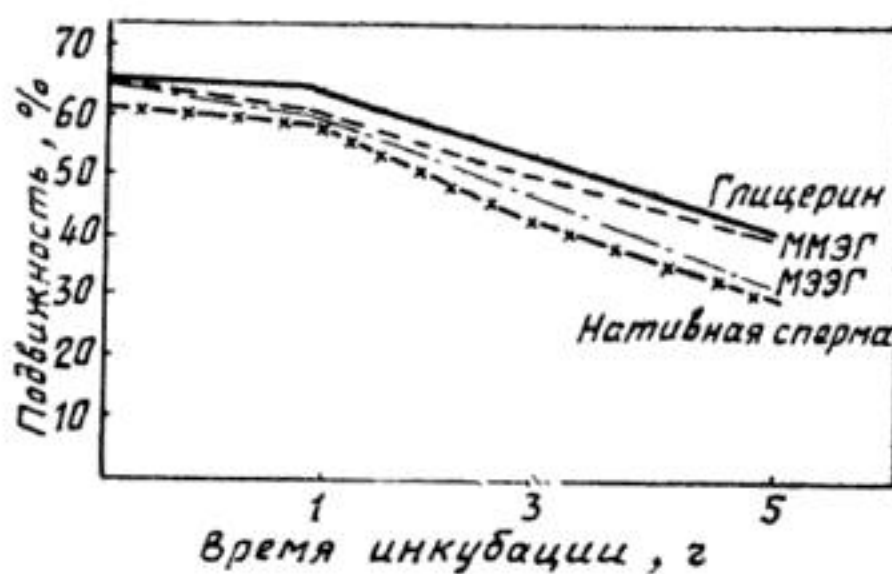


Рис. 1. Сравнительная оценка цитотоксичности глицерина и его алкиловых эфиров

казателю при криоконсервации спермиев под защитой глицерина в 2,5 %-ной концентрации.

Переживаемость спермиев после размораживания, криоконсервация которых осуществлялась под защитой ММЭГ и глицерина, существенно отличалась от результатов, полученных в средах с МЭЭГ. В последнем случае подвижность размороженных клеток прекращалась в течение первого часа инкубации. Основываясь на существующей в криобиологии трактовке понятия «эффективный криопротектор», согласно которой число сохранившихся клеток должно быть не меньше 60 % от исходного количества, МЭЭГ не может быть отнесен к категории криозащитных соединений [6].

Подвижность размороженных клеток в образцах с глицерином и его метильным производным плавно снижалась на протяжении 6 ч инкубации и не имела достоверных различий. Вместе с тем для достижения максимальной криозащитной активности требуется вдвое более высокая концентрация криопротектора (ММЭГ) по сравнению с незамещенным аналогом. Для достижения результатов, получаемых в растворах глицерина, концентрация ММЭГ должна быть повышена в 2 раза (5 % для ММЭГ вместо

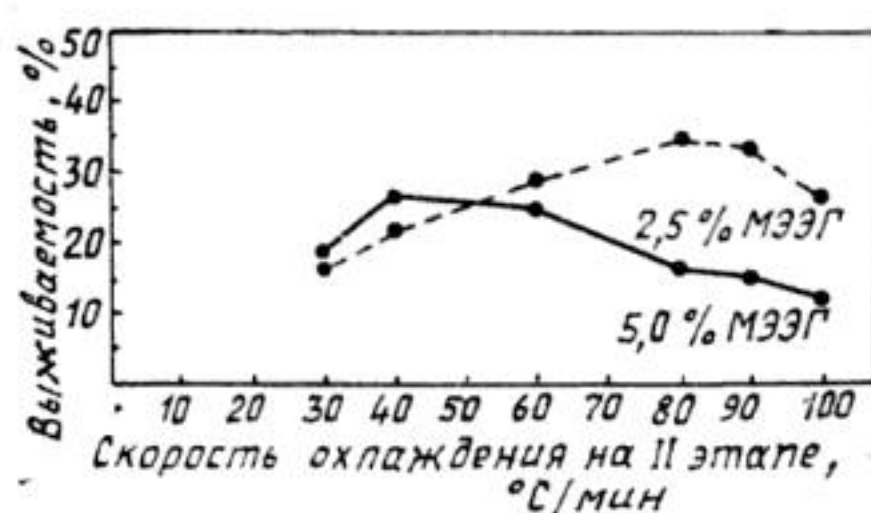


Рис. 2, 3. Сравнительная оценка криозащитной эффективности производных глицерина при замораживании спермиев человека

2,5 % для глицерина) Однако на основании только этого доказательства, без детального его анализа, не представляется возможным прийти к заключению о более высоких криозащитных свойствах глицерина в отношении спермиев человека и механизме криозащиты. Есть основания полагать, что молекулы ММЭГ, ввиду более высокой их гидрофобности, способны комплексоваться с многочисленными компонентами липопротеидной природы данной криобиологической системы. Их наличие обусловлено, с одной стороны, составом эякулята, с другой — составом криоконсерванта, в который включен яичный желток. Если удастся снизить рабочую концентрацию ММЭГ до уровня глицерина и достигнуть выживаемости клеток в пределах 75 %, то необходимо продолжать исследование криопротекторных свойств этого вещества. Проведенное сравнение криопротекторных свойств ММЭГ и МЭЭГ показало, что между химической структурой и криозащитным действием веществ существует зависимость, требующая в дальнейшем более углубленного ее изучения.

1. Грищенко В. И., Паращук Ю. С. Искусственное осеменение спермой донора — показания, методика, перспективы // Репродуктивная функция женщины. — Харьков: Б. и., 1981. — С. 27—28.
2. Кимсанов Б. Х., Ишанова Х. Х. Синтез моноалкиловых эфиров глицерина // Изв. АН Тадж. ССР. — 1981. — № 2. — С. 102—104.
3. Паращук Ю. С. Влияние криоконсервации на метаболизм спермиев человека // Тез. докл. II Всесоюз. конф. «Механизм криоповреждения и криозащиты биологических объектов». — Харьков: Б. и., 1984. — Т. II — С. 247.
4. Паращук Ю. С. Бесплодие в семье и пути его устранения // Медико-технические, фармакологические и научные аспекты медицинской профилактики, диспансеризация и реабилитация. — Харьков: Б. и., 1984. — С. 163—164.

5. Leo A., Hansh C., Elkins D. Partition coefficients and their uses // Chem. Rev. — 1971. — 71, N 6. — P. 529—616.
6. Karow A., Aboona G., Humphries A. Organ Preservation for Transplantation. — Boston : Little Brown, 1974. — P. 430.

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

Поступила 21.09.87

УДК 611.013.15

Ф. В. Дахно, Л. Г. Каталевская, Л. И. Бульба

ЗНАЧЕНИЕ СТЕПЕНИ ЗРЕЛОСТИ ООЦИТОВ ДЛЯ ОПЛОДОТВОРЕНИЯ IN VITRO И КРИОКОНСЕРВАЦИИ

Возможность наступления беременности после оплодотворения *in vitro* (ОИВ) в настоящее время ограничена, и только небольшое число научных центров имеют положительные результаты, превышающие 30 % от числа попыток эмбриотрансплантации. Это проблема многоплановая и на каждом этапе ее решения имеются трудности.

Успешному ОИВ препятствуют трудности при получении зрелого преовуляторного ооцита во время его естественной овуляции. Аспирация доминантного фолликула в любое время до того момента, когда наступил его естественный разрыв *in vivo*, неизбежно ведет к получению ооцита на более ранней стадии созревания. Тем не менее в редких случаях [4] удается добиться оплодотворения ооцитов, полученных из небольших фолликулов. Трудно также определить, в какой момент культивирования в условиях *in vitro* ооцит приблизится к состоянию, которое он имел бы в момент овуляции. Едва ли не решающую роль в определении полноценности ооцитов, полученных из преовуляторных фолликулов, играет их морфологическая оценка.

Способность ооцитов млекопитающих созревать после изъятия их из фолликула была показана более 50 лет назад [1], а первые сообщения о возможности созревания и оплодотворения яйцеклеток человека вне организма были сделаны только в 1968 году [2]. После рождения в июле 1978 г. первого ребенка, зачатие которого достоверно было проведено в условиях вне организма [4], проблема ОИВ стала развиваться быстро и довольно успешно. В СССР созданы научно-методические центры, один из которых функционирует в г. Харькове.

Ооциты человека способны в процессе культивирования *in vitro* достигать стадии метафазы II, о чем свидетельствует выделение первого полярного тельца, и на этой стадии они могут быть оплодотворены [2, 5]. Как правило, только преовуляторный ооцит, полученный из доминантного фолликула в естественном менструальном цикле, готов к оплодотворению. При аспирации фолликулов по программе ОИВ наряду с преовуляторными ооцитами нередко встречаются и такие, степень зрелости которых определить трудно, поскольку отсутствуют единые критерии ее оценки.

Имеются данные, что при стимуляции овуляции гонадотропинами ооциты, оцененные после аспирации как незрелые, в результате культивирования были доведены до состояния зрелости, успешно оплодотворены *in vitro*, и в результате эмбриотрансплантации родился живой здоровый ребенок [5]. Тот факт, что незрелые ооциты человека, созревшие *in vitro*, способны к нормальному оплодотворению, вселяет надежду на повышение эффективности программы ОИВ.

Вторым препятствием на пути повышения успешности эмбриотрансплантации является десинхронизация дробления оплодотворенной яйцеклетки в условиях *in vivo* и *in vitro*. Кроме того, в большинстве центров стимулируют овуляцию, что приводит к нарушению взаимодействий в цепи гипоталамус — гипофиз — яичники — матка, и это, возможно, вызывает нарушение процессов имплантации и плацентации, а, следовательно, к ранним эмбриональным потерям. Одним из путей преодоления этих трудностей является криоконсервация эмбрионов человека для трансплантации в следующие циклы, когда снимается опасность влияния на беременность вышеперечисленных факторов. Для криоконсервации эмбрионов необходим полноценный ооцит, способный к оплодотворению *in vitro*. Классификация ооцитов по степени зрелости целесообразна, с одной стороны, для выбора времени преинкубации при оплодотворении вне организма, а с другой — для отбора ооцитов, наиболее пригодных для криоконсервации. О классификации ооцитов по степени их зрелости имеются лишь единичные и противоречивые сообщения [3]. В связи с этим в работе поставлена цель систематизировать данные по оценке степени зрелости ооцитов человека, изучить их способность к оплодотворению *in vitro*, наметить подходы к селекции ооцитов человека для криоконсервации.

Исследования проведены на 484 ооцитах, полученных из яичников, удаленных по медицинским показаниям. Ткань яичника, взятая стерильно в условиях операционной, помещалась в среду 199 и немедленно доставлялась в бокс. Если фолликулы визуально определялись, то производилась аспирация фолликулярной жидкости. При отсутствии визуально определяемых фолликулов на корковом слое яичника делали множество насечек скальпелем. Поиск ооцитов производили в фолликулярной жидкости или в среде 199 под стереоскопической лупой МБС-9 при 28-кратном увеличении. После оценки степени зрелости ооциты переносили в среду Хэма Ф-10 и помещали в CO₂ инкубатор. Нами использовалась смесь газов 5 % CO₂, 5 % O₂, 90 % N₂. В зависимости от степени зрелости ооцитов предварительную инкубацию проводили от 5 до 36 ч. После созревания ооциты переносили в среду инсеминации, содержащую, кроме основной среды, 7,5 %-ную инактивированную сыворотку крови пациентки, в которую были добавлены спермии, отмытые этой же средой в конечной концентрации от 50 000 до 1×10^6 /мл. Через 18—22 ч проверялось наличие протонуклеусов, а через 36—48 ч — образование бластомеров.

В результате исследований нами было проведено распределение ооцитов по четырем степеням зрелости, в зависимости от которых подбиралось время предварительной инкубации и инсеминации. Критериями зрелости ооцитов являлись степень диссоциации кумулюса, способность его к растяжению и характеристика блестящей оболочки. Таким образом, степень зрелости ооцитов оценивалась по изменению структуры всего комплекса: ооцит, *corona radiata*, *cumulus oophorus*.

Ооциты I степени зрелости окружены плотным слоем клеток гранулезы с малой дисперсией. При пипетировании всего комплекса не отмечается растяжение клеток, окружающих ооцит. В связи с этим комплекс ооцит I степени зрелости, *corona radiata*, *cumulus oophorus* имеет меньшие размеры, чем комплекс, включающий преовуляторные зрелые ооциты. Ооциты II степени зрелости часто окружены большим числом гранулезных клеток, наблюдается растяжение кумулюса на 1—2 см, блестящая оболочка не выделяется. Созревание таких клеток происходило в течение 18—32 ч. Ооциты III степени зрелости имеют среднее количество клеток кумулюса с хорошей дисперсией, сквозь которые хорошо просматривается блестящая оболочка. Кумулюс растянут на 3—5 см. Выделяется блестящая оболочка. Предварительная инкубация таких ооцитов продолжалась от 10 до 18 ч. Ооциты IV степени зрелости были покрыты большой сетью клеток кумулюса с хорошей дисперсией, которые при пипетировании могли отойти, или совсем не имели клеток кумулюса, прилегающих к ооциту. Вытянутость клеток кумулюса состав-

ляла 3—5 см. Блестящая оболочка была хорошо отграничена. Наблюдалось увеличение блестящей оболочки и дисперсии клеток кумулюса. Предварительная инкубация таких клеток длилась от 5 до 8 ч.

Готовность к оплодотворению определялась по выделению второго полярного тельца, в этой стадии спермий может проникнуть в ооцит. Если полярное тельце не было обнаружено из-за наличия клеток кумулюса, то инсеминацию ооцита проводили через 35 ч после аспирации без использования гиалуронидазы.

В наших исследованиях, в которых были использованы ооциты из удаленных по медицинским показаниям яичников, было получено 484 ооцита, из них 80 — IV степени, 104 — III степени, 170 — II степени, 130 — I степени. Дозревание отсутствовало у 36 % ооцитов I степени и у 23 % ооцитов II степени зрелости. Оплодотворение произошло в 47 случаях. Причем дробление наблюдалось у 75 % ооцитов IV степени, 12 % — III степени, 8 % — II степени и 5 % — I степени.

Оценка ооцитов по степени зрелости, полученные данные о низкой вероятности оплодотворения ооцитов I и II степеней зрелости, более частое оплодотворение ооцитов III и IV степеней зрелости позволяет отобрать клетки, наиболее пригодные для криоконсервации, что будет способствовать уменьшению количества неудачных ОИВ после оттаивания. Таким образом, определение степени зрелости и селекция ооцитов перспективны как для технологического режима получения зигот, так и для их криоконсервации.

1. Красовская О. В. Оплодотворение яйца кролика // Арх. анат.— 1934.— № 2.— С. 327—342.
2. Петров Г. Н. Оплодотворение и первые стадии дробления яйца человека вне организма // Там же.— 1968.— № 1.— С. 88—93.
3. Marrs R. P., Saito H., Lee B. et al. Effect of variation of *in vitro* culture technique upon oocyte fertilization and embryo development in human *in vitro* fertilization procedures // Fert. Steril.— 1984.— 41, N 4.— P. 519—523.
4. Steptoe P. C., Edwards R. G., Purdy J. M. Clinical aspects of pregnancy established with cleaving embryos grown *in vitro* // Brit. J. Obstet. Gynecol.— 1980.— 87, N 6.— P. 757—768.
5. Veek L. L., Wortman J. W. E., Witmyer J. et al. Maturation and fertilization of morphologically immature human oocytes in a program of *in vitro* fertilization // Fert. Steril.— 1983.— 39, N 5.— P. 594—602.

Ин-т проблем криобиологии и криомедицины АН УССР, Поступила 25.11.86
г. Харьков

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 57.043

С. К. Павлова

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТОЯНИЯ ОЛИГОСАХАРИДОВ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН СПЕРМАТОЗОИДОВ БАРАНА И БЫКА

Известно, что спермии быка сохраняют свою способность к оплодотворению после глубокого замораживания [1], в то время как спермии барана снижают свою способность к оплодотворению, несмотря на применение различных вариантов глубокого замораживания [5,8]. Результаты электронно-микроскопического анализа показали, что плазматическая мембрана сперматозоидов барана при замораживании претерпевает сильные повреждения [2]. Поэтому были сделаны попытки найти различия в молекулярной структуре плазматических мембран сперматозоидов барана и быка, поскольку первые обладают наименьшей, а последние — наибольшей устойчивостью при глубоком замораживании. Полученные результаты свидетельствуют о важной роли холесте-

рина [3] и соотношения насыщенных и ненасыщенных жирных кислот в фосфолипидной фракции плазматической мембраны сперматозоидов [7].

В последнее время проявляется интерес к изучению состояния олигосахаридов, локализованных на поверхности мембран разных видов клеток при помощи лектинов, белков, обладающих химической специфичностью к определенным видам сахаров, которые могут находиться как в свободном состоянии, так и располагаться в различных топологических зонах олигосахаридов [4].

Целью настоящей работы явились сравнительные исследования состояния некоторых компонентов мембранных олигосахаридов, характеризующихся специфическим связыванием с лектином, конканавалином А, в эякулированных сперматозоидах барана и быка.

Для опытов использовали лектин, конканавалин А, в концентрации 1 мг/мл, который, как известно, связывается специфически с α -D-глюкозой и α -D-маннозой, локализованными как в концевых цепях олигосахаридов, так и внутри цепей в форме 2—0-замещенных α -D-глюкопиранозных и 2-0-замещенных α -D-маннопиранозных остатков. В опытах на сперматозоидах установлено [6], что в результате взаимодействия лектина с указанными выше сахарами как компонентами мембранных олигосахаридов наступает агглютинация сперматозоидов разных видов и в различной степени. Степень агглютинации сперматозоидов зависит от концентрации тех сахарных компонентов, которые специфически связываются конканавалином А, а вид агглютинации сперматозоидов (головка с головкой, головка со жгутиком, жгутик со жгутиком) — на локализацию тех же компонентов по поверхности сперматозоидов [6]. Для опытов спермии барана и быка с нормальными показателями спермограммы центрифугировали 5 мин при 750 g. Осадок ресуспендировали в 0,9 % NaCl и отмывали три раза 0,9 % NaCl, центрифугируя по 5 мин при 750 g. Осадок клеток ресуспендировали в 0,9 % NaCl, доводя концентрацию сперматозоидов до 6×10^6 /мл. Сразу после разведения 20 мкл суспензии сперматозоидов (6×10^6 /мл) наносили на предметное стекло и добавляли последовательно 20 мкл 0,9 % NaCl и 20 мкл конканавалина А (1 мг/мл), затем смешивали и на протяжении 20—45 мин наблюдали под микроскопом реакцию агглютинации сперматозоидов. На основании микроскопических наблюдений определяли степень агглютинации сперматозоидов по шкале Никольсона и Янагимачи [5]. В качестве контроля использовали 20 мкл суспензии сперматозоидов (6×10^6 /мл) в 49 мкл 0,9 % NaCl. Все опыты проводили при 24 °C.

При добавлении лектина, конканавалина А, к сперматозоидам барана на протяжении 20 мин наблюдается агглютинация, что проявляется в образовании больших скоплений сперматозоидов. В контрольных образцах в отсутствие конканавалина А агглютинация не появлялась на протяжении указанного времени.

При добавлении конканавалина А к сперматозоидом быка степень агглютинации была очень низкой, скопления сперматозоидов состояли из меньшего числа клеток (6—8), большинство сперматозоидов оставались свободными. Кроме того, процесс агглютинации спермиев быка начинался и оканчивался позднее, чем у спермиев барана. В контрольных пробах, не содержащих конканавалин А, агглютинация сперматозоидов не наступала.

В процессе агглютинации сперматозоидов барана и быка можно выделить три ее вида. Первая: головка соединялась с головкой; вторая: жгутик со жгутиком; третья: головка со жгутиком. Наличие трех видов агглютинации, означает, что молекулы сахаров α -D-глюкозы и α -D-маннозы в цепях мембранных олигосахаридов, которые связываются специфически с конканавалином А, распределены по всей поверхности мембран сперматозоида, то есть в области головки, тела и жгутика.

Полученные результаты показывают, что при одинаковых условиях опытов существует хорошо выраженная разница в степени агглютинации сперматозоидов барана и быка в присутствии лектина, конканавалина А. На основании этих различий можно считать, что состав плазматической мембраны сперматозоидов барана характеризуется высокой концентрацией тех сахарных компонентов, которые связываются специфически с конканавалином А по сравнению с составом таких же компонентов мембран сперматозоидов быка. Таким образом, установлено еще одно различие в составе плазматических мембран сперматозоидов этих видов сельскохозяйствен-

ных животных, которое может быть одной из причин, обуславливающих неустойчивость мембраны сперматозоидов барана при замораживании.

Полученные результаты исследований могут иметь существенное значение для установления различий в тонком строении компонентов плазматических мембран сперматозоидов барана, характеризующихся наименьшей устойчивостью при криоконсервации по сравнению со спермой других сельскохозяйственных животных. На основании этих данных можно проводить дальнейшие работы по оптимизации состава среды для консервации спермиев барана.

1. Братанов К., Радев Г. Биология на размножаването и изкуствено осеменяване при селскостопанските животни. — София: Земиздат, 1977. — С. 151—153.
2. Данов Д., Ковачев К., Попов Д. Изследвания върху ултраструктурните изменения на сперматозонидите на коча при криоконсервация. I. Влияние на спермо-разредителя триадила и захрозния разредител // Криобиология на половите клетки. — София: БАН, 1983. — С. 155—172.
3. Darrin-Bennet A., White I. Influence of cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold shock // Cryobiology. — 1977. — 14, N 5. — P. 466—470.
4. Goldstein J., Hayes C. The lectins: binding proteins of plants and animals // Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry. — New York: Acad. Press, 1978. — P. 128—340.
5. Gustafson B. K. Aspects of fertility with frozen-thawed ram semen // Cryobiology. — 1978. — 15, N 3. — P. 358—361.
6. Nicolson G., Usui N., Yanagimachi R. et al. Lectin binding sites on the plasma membrane of rabbit spermatozoa // J. Cell. Biol. — 1977. — 74, N 6. — P. 950—962.
7. Scott T. W., Voglmayr J. K., Setchell B. P. Lipid composition and metabolism in testicular and ejaculated ram spermatozoa // Cryobiology. — 1967. — 3, N 4. — P. 456—461.
8. Voglmayr J., Chartier D., Sawyer R. Viability of ram testicular spermatozoa following cryopreservation in rat testis fluid // Ibid. — 1983. — 20, N 4. — P. 421—431.

Ин-т биологии и иммунологии размножения
и развития организмов БАН,
г. София

Поступила 04.11.86

УДК 57.043

В. В. Поздняков, В. А. Бондаренко

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ ИСХОДНЫМИ ОСМОТИЧЕСКИМИ УСЛОВИЯМИ СРЕДЫ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ ЭРИТРОЦИТОВ К ГИПЕРТОНИЧЕСКОМУ СТРЕССУ В 4М NaCl

В многочисленных исследованиях, посвященных изучению состояния эритроцитов в условиях низкотемпературного хранения, используются гипертонические среды, включающие электролиты, высокомолекулярные (ПВП, ПЭО-1500, декстран и др.) и низкомолекулярные вещества (глицерин, пропандиол, сахарозу, маннит, ПЭО-400 и др.), оказывающие защитное действие на клетки. В самом цикле замораживания — отогрева на эритроциты действует сложный комплекс повреждающих факторов, среди которых важную роль играет «эффект раствора». Согласно данным Лавлока [2,3], высокие концентрации электролита, образующиеся в процессе кристаллообразования, могут вызвать повреждение клеток, с другой стороны, плазматическая мембрана эритроцитов подвергается стрессу вследствие дегидратации [4]. Мы исследовали вопрос о влиянии исходной тоничности среды на устойчивость эритроцитов к действию «эффекта раствора» в модельных экспериментах, когда клетки подвергаются осмотическому шоку в 4 М NaCl.

Эритроциты трижды отмывали физиологическим раствором (150 мМ NaCl, 5 мМ Na-фосфатный буфер, pH 7,4) и хранили в виде плотного осадка не более двух часов при комнатной температуре. По 0,15 мл осадка эритроцитов переносили в 1,35 мл растворов NaCl с различной тоничностью в диапазоне 0,15—0,7 М при 0 °С, инкубировали 2 мин и из каждой пробы по 0,15 мл переносили в 1,35 мл 4 М раствора NaCl

при 0 °С на 5 мин, затем центрифугировали на центрифуге ОПН-3 4 мин при 3000 об/мин и измеряли выход гемоглобина спектрофотометрически при 543 нм. Контролем служили пробы, в которые был добавлен детергент тритон-Х — 100 (0,1 %). Осмотическое давление растворов определяли на осмометре ОМКА 1Ц-01. Гематокрит суспензии эритроцитов измеряли микрогематокритным методом на центрифуге МГЦ-8. Устойчивость цитоскелета эритроцитов к механическому воздействию оценивали по методу [1], в котором суспензию клеток пропускали 10 раз при 0 °С через иглу диаметром 0,3 мм.

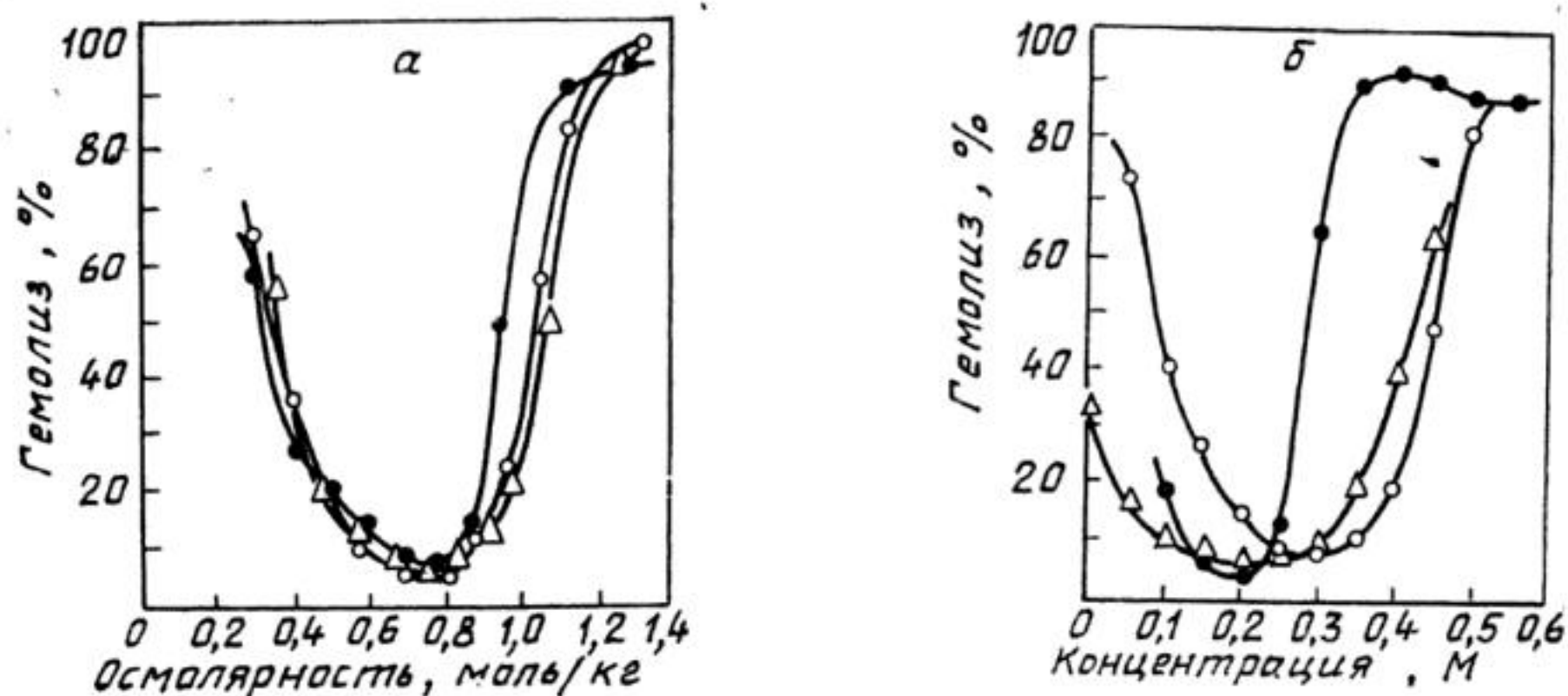


Рис. 1. Влияние исходной тоничности среды на устойчивость эритроцитов к гипертоническому шоку в 4 М NaCl при 0 °С: ○ — NaCl, △ — сахароза + 50 мМ NaCl, ● — NaNO₃ + 50 мМ NaCl (а); ○ — NaCl + 0,2 М инозита, △ — 15% ПЭГ-1500 + 50 мМ NaCl + сахароза, ● — Na-цитрат + 50 мМ NaCl (б)

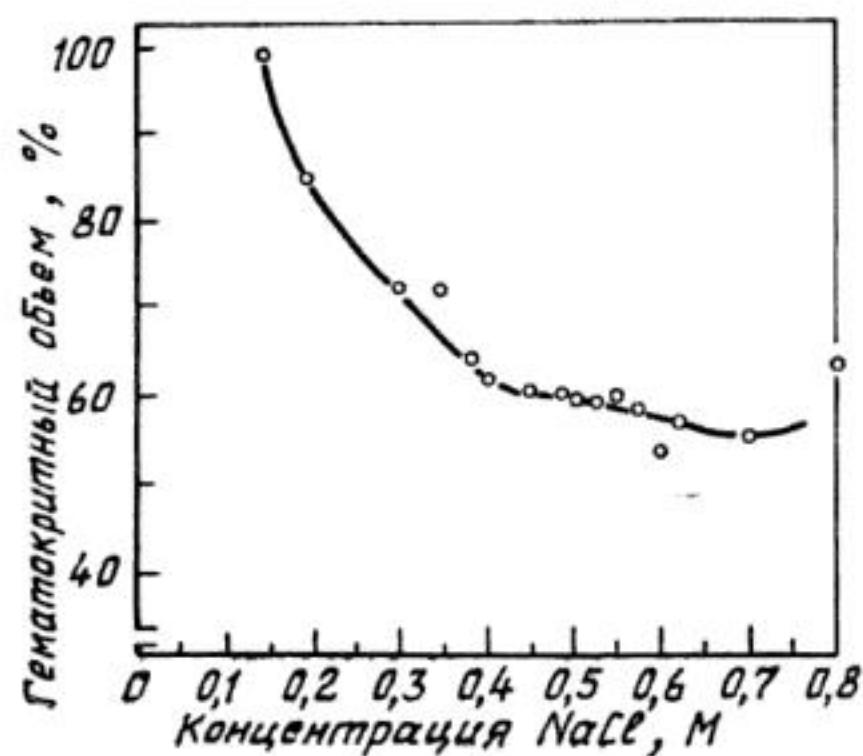


Рис. 2.

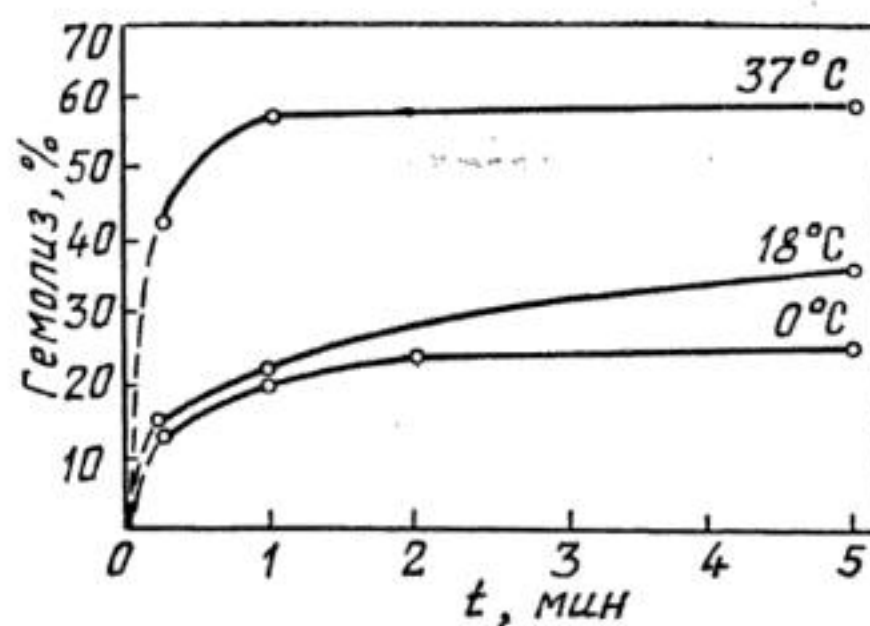


Рис. 3.

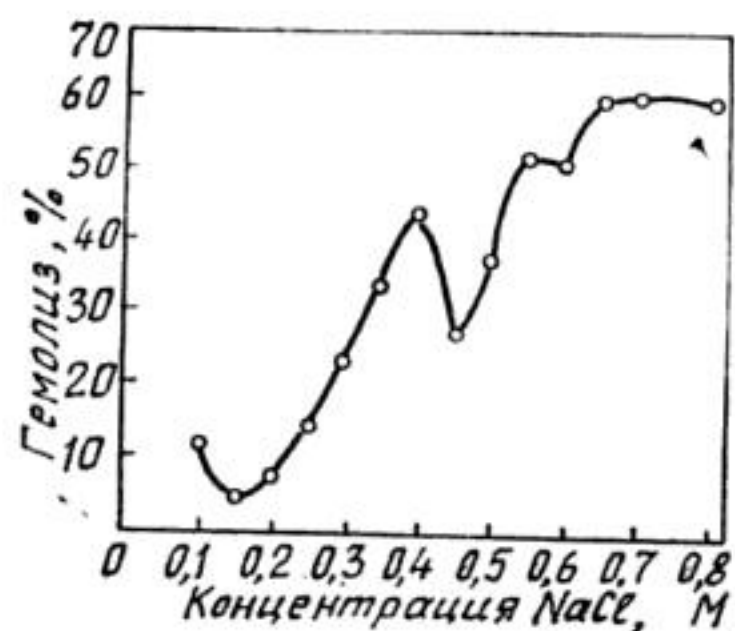


Рис. 4.

Рис. 2. Гематокритный объем эритроцитов в растворах NaCl различной тоничности

Рис. 3. Влияние температуры и времени начальной инкубации эритроцитов в растворе NaCl (800 ммоль/кг) на устойчивость к последующему гипертоническому стрессу в 4 М NaCl

Рис. 4. Устойчивость цитоскелета к механическому воздействию в растворах NaCl различной тоничности

Нами обнаружено, что по мере увеличения исходной тоничности растворов до 800 ммоль/кг возрастает устойчивость эритроцитов к последующему гипертоническому шоку в 4 М NaCl и минимальный уровень лизиса наблюдается в интервале осмолярности 750—800 ммоль/кг (рис. 1), гематокрит клеток при этом составляет 61—63 % от изотонического объема (рис. 2).

Повышение тоничности среды выше 800 ммоль/кг приводит к резкому повышению чувствительности клеток к гипертоническому шоку. При этом температура среды и время инкубации оказывают существенное влияние на устойчивость клеток к последующему изменению осмотических условий среды. Чем меньше время начальной инкубации, тем ниже процент лизиса клеток, а снижение температуры уменьшает уровень повреждения клеток и ослабляет проявление временного фактора (рис. 3). Обнаруженный нами эффект проявляется в средах с различным составом (рис. 1). Можно предположить, что основную роль в рассматриваемом явлении играет изменение структурного состояния комплекса мембрана — цитоскелет при уменьшении объема, так как при этом возрастает плотность распределения структурных элементов цитоскелета, что может повлиять на степень взаимодействия их с мембраной. Это подтверждают и результаты экспериментов, в которых клетки подвергались механическому стрессу при продавливании через канал медицинской иглы диаметром 0,3 мм в растворах NaCl различной тоничности в диапазоне 0,15—0,7 М при 0 °С (рис. 4). Локальный минимум лизиса эритроцитов в районе 750—800 ммоль/кг, возможно, отражает структурную реорганизацию белкового цитоскелета и изменение характера его взаимодействия с мембраной и совпадает с областью максимальной устойчивости клеток к гипертоническому шоку. На основании изложенных результатов мы делаем вывод об увеличении устойчивости эритроцитов к гипертоническому шоку в условиях, когда их исходный объем уменьшается до 61—63 % от изотонического. Обнаруженный нами эффект проявляется в средах различного состава и становится более выраженным при снижении температуры. Очевидно, учет данной особенности поведения клеток может играть важную роль в подборе сред для замораживания и окажется полезным в практической криобиологии.

1. *Leibo S. P.* Freezing damage of bovine erythrocytes: simulation using glycerol concentration changes at subzero temperatures // *Cryobiology*.— 1976.— 13, N 6.— P. 587—598.
2. *Lovelock J. E.* The haemolysis of human red blood cells by freezing and thawing // *Biochim. et biophys. acta*.— 1953.— 10, N 4.— P. 414—420.
3. *Lovelock J. E.* The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing // *Biochim. et biophys. acta*.— 1953.— 11, N 1.— P. 28—36.
4. *Meryman H. T.* Modified model for the mechanism of freezing injury in erythrocytes // *Nature*.— 1968.— 218, N 5141.— P. 333—336.

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

Поступила 13.01.88

УДК 57.043

М. З. Бейгель, О. И. Ковалев, Н. Н. Соболева, В. И. Трофимов

ВЛИЯНИЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СУСПЕНЗИОННЫХ ПРЕПАРАТОВ ИНСУЛИНА

В работе изучено влияние условий замораживания на дисперсность, физико-химические и биологические свойства суспензий цинк-инсулина. Поскольку большую роль для исходов замораживания играет степень дисперсности препарата, для определения размеров частиц суспензии цинк-инсулина была использована модификация известного метода спектра мутности [1]. Спектры снимали в видимой области. Дисперсный состав суспензии цинк-инсулина кристаллического с размером частиц по ФС 649 от 10 до 40 мкм, замороженного с различными скоростями, оценивали как по данным измерения мутности, так и с помощью счетчика частиц PC-420 HIAS (США).

Замораживание до -80 или -196°C осуществляли со скоростью от $0,17$ до $500^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ в стандартных 5 мл флаконах в специальном криостате, охлаждаемом парами жидкого азота. Скорость охлаждения контролировалась при помощи термopары. Скорость отогрева составляла $100^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Установлено существование зависимости величины образующихся агрегатов от скорости охлаждения. Размер образующихся агрегатов уменьшается с увеличением скорости охлаждения, однако при реально достижимых для объемов 1—2 мл скоростях порядка $500^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ образуются частицы крупнее исходных.

Оценка изменения дисперсного состава кристаллической суспензии при замораживании с различными скоростями охлаждения была проведена по измерению мутности и с использованием счетчика частиц.

При замораживании кристаллической суспензии изменение дисперсного состава определяется как агрегацией мелких частиц, которая возникает в основном при медленных режимах, так и разрушением крупных при быстрых режимах замораживания.

Образцы суспензии цинк-инсулина аморфного, замороженные со скоростями охлаждения $0,3$ и $120^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, были проанализированы в аспекте их пролонгированного действия. Определено, что достоверных отличий в пролонгированном действии этих образцов от исходных значений не имеется. Полученные результаты свидетельствуют, что тест на пролонгированность действия не выявляет изменений среднего размера частиц в суспензии цинк-инсулина (до среднего радиуса порядка $2,2$ мкм). Дисперсный состав твердой фазы аморфной суспензии, подвергнутой многократному замораживанию, практически мало изменяется по сравнению с контрольным.

Таким образом, полученные результаты показывают, что замораживание в изученных вариантах не вызывает каких-либо изменений в структуре молекулы инсулина, хотя изменяет дисперсный состав суспензий. Эти изменения могут влиять на пролонгированность действия препарата. Выявлен диапазон скоростей охлаждения, при которых замораживание лишь незначительно влияет на физико-химические характеристики и биологическую активность препарата, в том числе на пролонгированность его действия.

1. Бейгель М. З., Соболева Н. Н., Трофимов В. И. Применение физико-химических методов для контроля и изменения дисперсного состава суспензий цинк-инсулина // Тез. докл. I Всесоюз. конф. «Основные направления работ по улучшению качества лекарств». — Харьков, Б. и., 1983. — С. 10—11.
2. Soboleva N. N., Ivanova A. I., Talroze V. L. et al. Radiation resistivity of frozen insulin solutions and suspensions // Int. J. Appl. Radiat. Isotopes. — 1981. — 32, N 10. — P. 753—756.

Филиал НИИ по БИХС
Минмедпрома, г. Москва

Поступила 01.10.87

УДК 615.47

В. Ю. Василевский, А. М. Мхитарьянц

ТЕРМОРЕГУЛИРУЕМАЯ НАСАДКА КРИОАППЛИКАТОРА

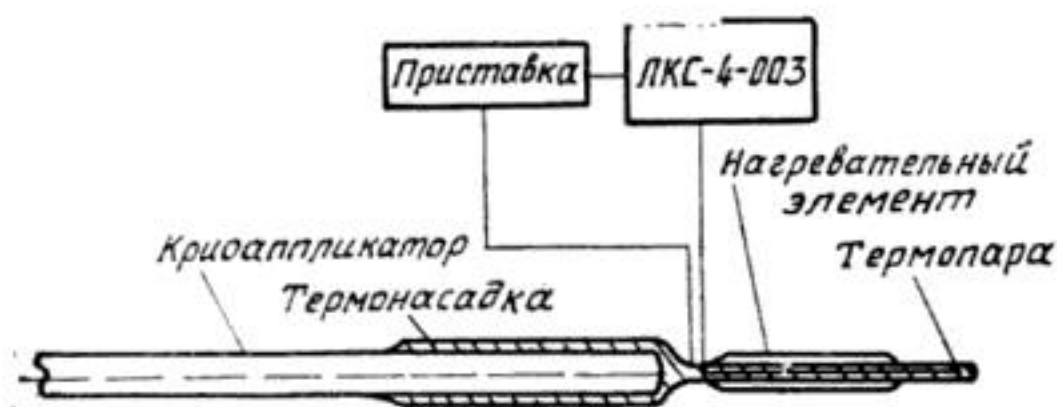
Для исследования процессов, протекающих в органах лабораторных животных, нужны небольшие термоаппликаторы. Они должны обладать необходимой мощностью, иметь малую инерционность в процессе изменения или поддержания заданной температуры и позволять выполнять биомикроскопию. Желательно, чтобы диаметр термоаппликатора был не более 2 мм, длина — не менее 50 мм.

Техническое решение термоаппликатора с указанными размерами осуществлено на базе выпускаемого серийного аппарата КАУ-1. Насадка (рисунок) изготовлена из меди М1. Рабочая часть насадки, охлаждаемая при постоянном расходе хладагента через наконечник криоаппликатора КАУ-1, снабжена нагревательным элементом, подключенным к блоку питания с упрощенной электронной схемой. Для стабилизации необходимой холодопроизводительности криоинструмента в конструкцию резервуара с хладагентом введен клапан регулировки давления. Контроль темпера-

туры и подача сигнала на блок питания через самопишущий прибор ЛКС 4-003 обеспечивается с помощью установленной в термонасадке медь-копелевой термопары.

Порядок работы термонасадки следующий. После закрытия клапана регулирования давления жидкий азот поступает в рабочую часть КАУ-1, охлаждение органа осуществляется при достижении на термонасадке стабильной температуры. Блок питания нагревательного элемента насадки, в схеме которого имеется переменное сопротивление, регулирующее выходное напряжение на нагревательный элемент, включается при необходимости понижения температуры рабочей части.

Для обеспечения фиксированной температуры на длительное время в любом промежутке диапазона от -150 до 100°C ее значение устанавливается и автоматически поддерживается с точностью $\pm 2^{\circ}\text{C}$.



Терморегулируемая насадка криоаппликатора

Термонасадка проста в изготовлении и надежна в работе. Ее использование позволяет выполнить исследования взаимосвязи между процессами в охлаждаемых жизнедействующих тканях.

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

Поступило 16.01.88

ХРОНИКА

60-летие ЧЛЕНА-КОРРЕСПОНДЕНТА АН УССР А. М. БЕЛОУСА

27 января 1989 года исполняется 60 лет известному ученому в области криобиологии члену-корреспонденту АН УССР Аполлону Максимовичу Белоусу.

После окончания Киевского медицинского института А. М. Белоус работал врачом в г. Коммунарске, с 1957 по 1972 г.— в Харьковском НИИ ортопедии и травматологии им. М. И. Ситенко. В 1962 г. А. М. Белоус защитил кандидатскую, а в 1969 г.— докторскую диссертации, которые были посвящены новому направлению: стимуляции репаративных процессов с помощью экзогенных информационных РНК как тканеспецифических биорегуляторов. В Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР А. М. Белоус работает с момента его создания. Он является ведущим ученым в области фундаментальной криобиологии, его научные работы хорошо известны в нашей стране и за рубежом. Им создана школа по молекулярной криобиологии мембран, воспитанники которой проводят глубокие фундаментальные исследования.

Изучение механизмов холодового повреждения мембран на уровне клеток позволило А. М. Белоусу и его сотрудникам создать единую молекулярно-клеточную концепцию криоповреждений, материалы которой были опубликованы в серии работ 1985—1987 гг. В ее основе лежат исследования, позволяющие выяснить роль трансмембранных дефектов, фазовых переходов компонентов мембран и перекисного окисления липидов, особенности функционирования ион-транспортующих АТФаз при низких температурах. Эти данные были детально освещены в серии монографий: «Низкотемпературная кристаллизация в биологических системах», «Структурные изменения биологических мембран при охлаждении», «Теория и практика криогенного и сублимационного криоконсервирования». А. М. Белоус является одним из инициаторов и организаторов создания

общесоюзной научно-технической программы по криобиологии 0.69.14. В настоящее время он руководит крупным разделом программы по фундаментальным исследованиям и разработке технологических процессов криоконсервирования клеточных суспензий. А. М. Белоус автор 270 научных работ, в том числе 15 монографий и изобретений. Под его руководством защищено 26 кандидатских диссертаций. А. М. Белоус — лауреат премии имени А. А. Богомольца АН УССР, является заместителем главного редактора всесоюзного научно-теоретического журнала «Криобиология», членом редколлегии зарубежного журнала «Криолеттерс», заместителем председателя координационного совета Государственной комиссии СССР по науке и технике по общесоюзной программе 0.69.14.

За научные достижения и успешную подготовку кадров награжден медалью «За доблестный труд», в ознаменование 100-летия со дня рождения В. И. Ленина — Почетной грамотой Президиума Верховного Совета УССР. Научная общественность поздравляет А. М. Белоуса с 60-летием и желает ему новых творческих успехов и крепкого здоровья.

25-я ЕЖЕГОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ ОБЩЕСТВА КРИОБИОЛОГОВ

В г. Аахене (ФРГ) с 11 по 15 июля 1988 г. состоялась 25-я ежегодная конференция Общества криобиологов. На пленарном симпозиуме «Применение криоконсервации в медицине: наука и обоснование» А. Роу (США) дал историческую справку о развитии криобанков клеток и тканей, Г. Мериман (США) осветил работу банка крови, Р. Клен (ЧССР) рассказал о развитии тканевых банков крови, других клеток и тканей. Обсуждалась работа банков как социальной службы и службы индустрии. На сессии «Кровяные клетки и низкая температура» речь шла о токсичности криопротекторов, возможностях использования различных смесей протекторов и других компонентов, сохраняющих кровяные клетки. Отдельная сессия была посвящена холодовому охлаждению почек для трансплантации. Признано, что оптимальным криопротектором является ДМСО. В ряде сообщений речь шла о фазовых переходах в мембранах и белковых системах. Особое внимание уделено вопросам естественной криопротекции, значению и свойствам гликопептидов у антарктических рыб. Обсуждались вопросы криоконсервации крови и стволовых клеток. Подтверждено, что для кровяных пластинок оптимальным криопротектором является глицерин. Для витрификации эритроцитов с успехом использован поливинилпирролидон. Об изменениях метаболизма под влиянием охлаждения сообщалось в докладах, посвященных роли свободных радикалов в повреждении органов при консервации, а также роли свободной воды в криоповреждении. Рассматривались проблемы криоповреждения и криозащиты изолированных клеток и тканей печени, сердца и роговицы. Отдельная сессия была посвящена исследованиям криобиологии растений. Сделаны доклады о криоконсервации и трансплантации островков Лангерганса, их хранении в криобанке.

Большой интерес вызвали сообщения по технике и аппаратуре для контролируемого охлаждения и отогрева, витрификации клеточных суспензий. Ф. Франкс (Великобритания) посвятил свой доклад физико-химическому анализу процессов выживаемости, акклиматизации и адаптации. На сессии «Техника для сохранения сперматозоидов и эмбрионов» В. И. Грищенко (СССР) в докладе привел данные о подборе ряда новых криопротекторов, в том числе о применении холинхлорида в сложном консервирующем растворе. Одно из сообщений касалось влияния повреждающих факторов охлаждения на эмбрионы рыб. Заседания в виде рабочих групп были посвящены улучшению методов лиофилизации для живых клеток, фундаментальным вопросам физики в области криобиологии, способам определения жизнеспособности биологических объектов, морфологическим и иммунологическим аспектам криохирургии, проблемам дестабилизации мембран при низких температурах, консервации гамет.

ВСЕСОЮЗНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ «СТВОЛОВАЯ КРОВЕТВОРНАЯ КЛЕТКА В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ»

С 9 по 11 августа 1988 г. в г. Новосибирске проходила Всесоюзная конференция с международным участием «Стволовая кроветворная клетка в норме и при патологии». Конференция была организована АМН СССР совместно с Институтом фармакологии Томского научного центра и Институтом клинической иммунологии Сибирского отделения.

Основная тематика конференции была посвящена вопросам изучения функциональной активности кроветворных клеток разного уровня коммитированности в норме и при различных патологических состояниях организма, регуляции процессов их пролиферации и дифференцировки.

В ряде докладов была подчеркнута важность полученных в последнее время результатов, свидетельствующих о гетерогенности популяций КОЕ_с в общем отделе стволовых клеток, различном их распределении в гемопоэтических тканях и значении в восстановлении гемопоэза. Подчеркнута важная роль в регуляции функционального состояния КОЕ_с и гемопоэза в целом различных субпопуляций *T*-лимфоцитов, селезеночных и костномозговых *B*-клеток, макрофагально-моноцитарных элементов.

Большое внимание на конференции было уделено вопросам регуляции стволовой клетки (КОЕ_с) физиологическими циркулирующими факторами. Показано, что один из факторов макрофагального происхождения, простагландин E_2 , оказывает стимулирующее влияние на рост эндогенных КОЕ_с и обуславливает уменьшение числа экзогенных КОЕ_с в костном мозге мышей. Простагландин также вызывает увеличение количества КОЕ_с в *S*-периоде клеточного цикла. Показано, что самые ранние этапы процесса дифференцировки КОЕ_с не являются стохастическим явлением и что на этом этапе возможна регуляция выбора направления их дифференцировки. Рассмотрены новые аспекты нейрогуморальной регуляции гемопоэза в норме и в условиях стресса.

А. Н. Гольцев

ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИЙ

В специализированном совете при Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР защищены диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

В работе Н. М. Шпаковой «Действие криопротекторов и амфипатических соединений на состояние эритроцитов, подвергнутых холодовому и осмотическому шоку» показано, что действие криопротекторов диметилсульфоксида (ДМСО) и полиэтиленгликоля-1500 (ПЭГ-1500) на чувствительность эритроцитов к холодовому шоку зависит от концентрации криозащитных веществ, а также от присутствия в среде двухвалентных ионов (Ca^{2+}). Характер влияния криопротекторов зависит от состава и тоничности среды. Обнаружена корреляция между морфологическими изменениями эритроцитов, модифицированных амфипатическими соединениями, и их чувствительностью к последующему охлаждению.

А. В. Дегтярев в работе «Исследование особенностей холодового шока фосфолипидных везикул и эритроцитов» установил, что лизис везикул при снижении температуры среды развивается только в том случае, когда равновесие между входящими внутрь везикул и выходящими потоками осмотически активного вещества сдвигается в сторону преимущественного его поглощения. Разработан способ измерения кинетики изменения формы и объема эритроцитов методом малоуглового светорассеяния.

РЕФЕРАТЫ

УДК 541.49+547.379.5:615.31

Механизм криозащитной эффективности и фармакологические свойства ДМСО / Чуйко В. А. // Криобиология. — 1989. — № 1. — С. 3—10.

На основании данных литературы о фармакологических свойствах ДМСО проведен анализ возможного механизма криозащитной эффективности данного соединения. Высказана точка зрения о значении противоишемических, антиоксидантных и других эффектов ДМСО в защите клеток от криоповреждений, в стимуляции восстановительных процессов. Библиогр.: 42 назв.

УДК 57.043

Осмотическая реакция эритроцитов на контакт с гипертоническими растворами непроникающего криопротектора / Гордиенко Е. А., Некоз И. А. // Криобиология. — 1989. — № 1. — С. 11—13.

На основании экспериментов и теоретических расчетов установлено, что сохранность эритроцитов на этапе экспозиции с криопротектором ПЭО-1500 не коррелирует с объемом обезвоженных клеток и скоростью их обезвоживания. Определены оптимальные для этого этапа значения гематокрита, концентрации криопротектора и разведения. Ил. 2. Табл. 1. Библиогр.: 6 назв.

УДК 57.043: 611—018.63.832.9

Влияние краниocereбральной гипотермии на кинетику паренхиматозно-стромальных отношений в миокарде белых крыс при тканевой гипоксии / Загоруйко Г. Е., Загоруйко Ю. В., Бабийчук Г. А. // Криобиология. — 1989. — № 1. — С. 14—19.

Установлено, что при однократном введении в организм крыс токсических доз компонентов неингаляционного наркоза в миокарде животных наблюдаются три стадии развития тканевой гипоксии (ТГ): стадия мобилизации структурно-функциональных резервов миокарда, стадия преимущественного накопления дистрофических изменений, стадия восстановления первоначально поврежденных ультраструктур миокарда. Показано, что краниocereбральная гипотермия в диапазоне температур $29 \div 28^\circ\text{C}$ значительно сокращает время развития второй стадии ТГ и способствует более быстрому восстановлению первоначально поврежденных ультраструктур миокарда животных. Ил. 6. Библиогр.: 16 назв.

УДК 57.043:577.352.53

Гигантские нейроны сохраняют жизнеспособность после глубокого замораживания мозга пресноводного моллюска *Lymnaea stagnalis* L. / Гахова Э. Н., Чекурова Н. Р., Кислов А. Н., Вепринцев Б. Н. // Криобиология. — 1989. — № 1. — С. 19—23.

Изолированный мозг моллюска *Lymnaea stagnalis* L. охлаждали в парах жидкого азота в 1,5 М растворе диметилсульфоксида, этиленгликоля или формамида со скоростью $500^\circ\text{C}/\text{мин}$. Замороженные образцы переносили в жидкий азот, где хранили до 2-х месяцев. Оттаивание проводили в водяной бане при $23\text{—}25^\circ\text{C}$. Через 2—3 ч после оттаивания и инкубирования ганглиев в физиологическом растворе электрические параметры изолированных гигантских нейронов, размером до 150—200 мкм, практически не отличались от контрольных. Табл. 1. Библиогр.: 10 назв.

УДК 577.95; 575; 592/599

Влияние глубокого замораживания семян на рост и развитие растений (на примере гвоздики Фишера) / Тихонова В. Л., Яшина С. Г., Полевая В. С., Крафтс И. В. // Криобиология. — 1989. — № 1. — С. 23—28.

Изучали влияние различных режимов замораживания семян до сверхнизких температур (-196°C) на их лабораторную всхожесть и на рост и развитие растений, выращиваемых из семян после криоконсервации. Предложенная методика исследования влияния глубокого замораживания семян, апробированная на гвоздике Фишера, показала, что изученные режимы замораживания и отогревания семян этого вида оказывают незначительное влияние на лабораторную всхожесть, но достоверно изменяют ход онтогенеза. По мере увеличения возраста различия между контрольными и опытными растениями сглаживаются. Табл. 2. Библиогр.: 11 назв.

УДК 57.043:615.832.9

Усиление криодеструкции ультразвуком. Моделирование на клеточном монослое / Есьман С. С., Рикберг А. Б., Сергиенко В. П. // Криобиология. — 1989. — № 1. — С. 28—32.

Изучалось влияние ультразвука малой мощности на криповреждения *L*-клеток в монослойной культуре, рассматриваемой в качестве модели ткани. Замораживание проводили до -15°C с внесением ледяной заправки, т. е. близко к условиям, реализующимся на периферии зоны замораживания при криохирургическом воздействии. На всех этапах охлаждения — отогрева ультразвук уменьшал выживаемость клеток после отогрева. Отмечается существенная роль начального переохлаждения внеклеточной среды. Ил. 2. Табл. 1. Библиогр.: 6 назв.

УДК 616—001.4—002.3—089:615.832.97

Активное хирургическое лечение с криовоздействием при гнойно-некротических поражениях мягких тканей / Лупальцев В. И., Цупров Ю. В. // Криобиология. — 1989. — № 1. — С. 33—36.

Приведены результаты лечения 92-х больных с гнойно-некротическими поражениями мягких тканей, которым активное хирургическое лечение дополнялось дозированным охлаждением стенок гнойной полости. Установлено, что проведение криовоздействия во время хирургической обработки способствует снижению уровня бактериальной обсемененности ран, сокращает сроки очищения ран от гнойно-некротических тканей, создает благоприятные условия для течения репаративных процессов. Библиогр.: 8 назв.

УДК 574.24:577.125

Особенности липидного обмена у сусликов при периодических пробуждениях от зимней спячки / Жегунов Г. Ф., Кудокоцева Е. В. // Криобиология. — 1989. — № 1. — С. 36—39.

Изучали липидный состав и интенсивность обмена липидов мембран клеток сердца и печени гибернирующих, пробуждающихся и активных сусликов. Установлено, что состав общих липидов мембран клеток не претерпевает существенных изменений при периодических пробуждениях зимоспящих, несмотря на активацию обмена некоторых фракций. Табл. 3 Библиогр.: 8 назв.

УДК 57.043:547.426.1:616.69.8

Сравнительная характеристика цитотоксичности и криозащитной эффективности глицерина и его производных при замораживании спермиев человека / Паращук Ю. С., Шраго М. И., Калугин Ю. В., Ханина Л. А., Кощий С. В., Черныш Е. Н. / Криобиология. — 1989. — № 1. — С. 40—43.

Исследованы показатели цитотоксичности и криозащитные свойства простых эфиров глицерина (1-монометилового, 1-моноэтилового) при замораживании спермиев человека. При соблюдении благоприятных условий криоконсервации (концентрация в среде, соответствующий температурный режим охлаждения) выживаемость спермиев в случае монометилового эфира глицерина достигает 74 %, моноэтилового — 34 %. Авторы относят монометиловый эфир глицерина к эффективным криопротекторам. Ил. 3. Библиогр.: 6 назв.

УДК 611.013.15

Значение степени зрелости ооцитов для оплодотворения *in vitro* и криоконсервации / Дахно Ф. В., Каталевская Л. Г., Бульба Л. И. // Криобиология. — 1989. — № 1. — С. 43—45.

Работа посвящена морфологической оценке зрелости ооцитов по состоянию системы ооцит — клетки кумулюса. Приведенная классификация ооцитов по степени зрелости и способности к оплодотворению позволит наметить подходы к селекции ооцитов для криоконсервации. Библиогр.: 5 назв.

UDC 541.4 9+547.379.5:615.31

The mechanism of cryoprotective efficiency and pharmacologic properties of DMSO / Chuyko V. A. // Kriobiologiya.— 1989.— 1.— P. 3—10.

Basing on the literature data on pharmacologic properties of DMSO, an analysis of possible mechanism of the cryoprotective action of the compound was carried out. The importance of anti-ischemic, anti-oxidative and other effects of DMSO in protecting cells against cryoinjury and in stimulating reparative processes is discussed. Refs.: 42 titles

UDC 57.043

The osmotic response of erythrocytes to hypertonic solutions of non-penetrating cryoprotectants / Gordiyenko E. A., Nekoz I. I. // Kriobiologiya.— 1989.— N 1.— P. 11—13.

Experiments and theoretical calculations showed that erythrocyte preservation at the stage of exposition with PEO-1500 does not correlate with the volume of dehydrated cells and with the dehydration rate. Optimal values of hematocrit, cryoprotectant concentration and dilution were determined for this stage. 2 figs. 1 table. Refs.: 6 titles

UDC 57.043 : 611—0.18.63.832.9

The influence of craniocerebral hypothermia on the kinetics of parenchyma — stroma relations in white rat myocardium during tissue hypoxia / Zagoruyko G. E., Zagoruyko Yu. V., Babiychuk G. A. // Kriobiologiya.— 1989.— N 1.— P. 14—19.

Three stages of tissue hypoxia were observed in rat myocardium after single injection of toxic doses of non-inhalation narcotic components, namely the stage of mobilization of structure-functional reserves of myocardium, the stage of preferential accumulation of dystrophic changes, and the stage of restoration of initially damaged myocardial ultrastructures. It has been shown that craniocerebral hypothermia in a range of 29 to 28 °C reduces markedly the development of the second stage of tissue hypoxia and promotes the restoration of initially damaged myocardial ultrastructures. 6 figs. Refs.: 16 titles

UDC 57.043:577.352.53

***Lymnaea stagnalis* L. brain giant neurones preserve their viability after deep freezing** / Gakhova E. N., Chekurova N. R., Kislov A. N., Veprintsev B. N. // Kriobiologiya.— 1989.— N 1.— P. 19—23.

Samples of isolated brain of snail *Lymnaea stagnalis* L. were frozen in liquid nitrogen vapor at a rate of 500 °C/min in the presence of 1.5 M dimethyl sulfoxide, ethylene glycol or formamide. The samples were then plunged into liquid nitrogen and stored up to 2 months. Thawing was performed in a water bath at 23 to 25 °C. Two — three hours after thawing and subsequent incubation in physiological solution, the electrical parameters for isolated giant neurons (150 to 200 μm in size) were similar to those of control ones. 1 table. Refs.: 10 titles

UDC 577.95; 575; 592/599

The effect of freezing of seeds on plant ontogenesis (Fischer's pink) / Tikhonova V. A., Yashina S. G., Polevaya V. S., Krasts I. V. // Kriobiologiya.— 1989.— N 1.— P. 23—28.

The effect of various regimes of seed freezing (up to —196 °C) on the laboratory germination of seeds and ontogenesis of plants obtained from them was studied. The suggested technique of investigating the effect of seed deep freezing tested on Fischer's pink showed that the studied regimes of freezing and thawing of seeds of the species have an insignificant effect on the laboratory germination but undoubtedly affect the ontogenesis; practically no difference was observed between control and experimental plants to the end of the vegetation period. 2 tables. Refs.: 11 titles

UDC 57.043:615.832.9

The intensification of cryodestruction with ultrasound. Modelling on a cell monolayer / Yesman S. S., Rikberg A. B., Sergiyenko V. P. // *Kriobiologiya*. — 1989. — N 1. — P. 28—32.

The effect of low power ultrasound on cryodestructured *L*-cells in a monolayer culture considered as a tissue model was studied. The samples were frozen to -15°C using ice seeding, thus approaching to the conditions observed at the periphery of the frozen zone induced by cryoapplication. The post-thaw survival of cells decreased due to ultrasound on freeze — thawing. The role of initial extracellular supercooling is noted to be important. 2 figs. 1 table. Refs.: 6 titles

UDC 616—001.4—002.3—089:615.832.97

Active surgical treatment with cryoapplication of suppurative and necrotic lesions of soft tissues / Lupaltsev V. I., Tsuprov Yu. V. // *Kriobiologiya*. — 1989. — N 1. — P. 33—36.

The results of treatment of 92 patients with suppurative and necrotic lesions of soft tissues by surgery combined with cryoapplication of the suppurative cavity walls are presented. It has been found that cryoapplication during surgery reduces wound microflora and periods of removal of necrotic tissues as well as accelerates the reparative processes. Refs.: 8 titles

UDC 574.24:577.125

Peculiarities of lipid metabolism in ground squirrels on awakening from hibernation / Zhegunov G. F., Kudokotseva E. V. // *Kriobiologiya*. — 1989. — N 1. — P. 36—39.

The lipid composition and metabolic rate have been studied in cardiac and liver cell membranes of hibernating, awakening, and active ground squirrels. It has been found that the composition of membrane lipids does not significantly change upon periodic awakenings of hibernators in spite of metabolic activation of some fractions. 3 tables. Refs.: 8 titles

UDC 57.043:547.426.1.616.69.8

The comparative estimation of cytotoxicity and cryoprotective efficiency of glycerol and its derivatives upon freezing of human sperm / Parashchuk Yu. S., Shrago M. I., Kalugin Yu. V., Khanina L. A., Koshchiy S. V., Chernysh E. N. // *Kriobiologiya*. — 1989. — N 1. — P. 40—43.

Cytotoxicity indices and cryoprotective properties of glycerol esters such as 1-monomethyl and 1-monoethyl esters were studied upon freezing of human sperm. Under optimal conditions of cryopreservation (optimal medium concentration and cooling regimen), sperm survival reached 74 % with monomethyl ester, and 34 % when used monoethyl ester. 3 figs. Refs.: 6 titles

UDC 611.013

The importance of the extent of oocyte maturation for in vitro fertilization and cryopreservation / Dakhno F. V., Katalevskaya L. G., Bulba L. I. // *Kriobiologiya*. — 1989. — N 1. — P. 43—45.

The morphological estimation of oocyte maturation has been carried out by the state of oocyte—cumulus cells system. The suggested classification of oocytes according to their extent of maturation and fertilization capacity allowed to select oocytes for cryopreservation. Refs.: 5 titles

IV Международная школа «Криобиология и лиофилизация»

будет проведена Центральной проблемной лабораторией криобиологии и лиофилизации Сельскохозяйственной академии НРБ и Институтом проблем криобиологии и криомедицины АН УССР под эгидой Международного института холода с 29 июля по 6 августа 1989 г. на курорте «Боровец» (Болгария). В работе школы примут участие ученые из Болгарии, СССР, Венгрии, ЧССР, ГДР, США, Англии, Франции, Японии и других стран. Официальные языки школы: английский и русский. Заявку на участие необходимо выслать до 10 марта 1989 г. по адресу: Централна проблемна лаборатория по криобиология и лиофилизация, вул. «Черни връх», 65, 1407 София, НРБ.

Организационный взнос (300 рублей) должен быть выслан до 1 мая 1989 г. на банковский счет Центральной проблемной лаборатории криобиологии и лиофилизации 420 174-5, Болгарский внешне-торговый банк, ул. Софийска комуна, 2, София, НРБ.

ISSN 0233 — 7673. Криобиология. 1989. № 1. 1 — 56

Наукова думка