

ISSN 0233-7673

КРИОБИОЛОГИЯ

1 | 86



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Грищенко В. И. (главный редактор), Белоус А. М. (зам. гл. редактора)
Благой Ю. П., Бражников А. М., Бутенко Р. Г., Вепринцев Б. Н.,
Гольдманский В. И., Луговой В. И., Осташко Ф. И., Панков Е. Я.,
Пирузян Л. А., Пушкарь Н. С., Сandomирский Б. П., Снурников А. С.,
Сытник К. М., Утевский А. М., Федотенков А. Г., Цуцаева А. А.,
Шумаков В. И., Юрченко Т. Н.

EDITORIAL BOARD

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Аксенов С. И. (Москва), Бакрадзе Н. Г. (Тбилиси), Бекер М. Е. (Рига),
Белошицкий П. В. (Киев), Гродзинский Д. М. (Киев), Запорожан В. Н. (Одесса),
Калакуцкий Л. В. (Пушино, Моск. обл.), Курбатов А. Д. (Ленинград),
Наер В. А. (Одесса), Никитин В. А. (Харьков), Пинаев Г. П. (Ленинград),
Сергеев Г. Б. (Москва), Соловьева М. А. (Киев), Соломонов Н. Г. (Якутск),
Тимофеев Н. Н. (Москва), Чередниченко В. М. (Харьков), Шенталь В. В. (Москва),
Эмирбеков Э. З. (Махачкала)

EDITORIAL COUNCIL

Aksenov S. I. (Moscow), Bakradze N. G. (Tbilisi), Beker M. E. (Riga),
Beloshitsky P. V. (Kiev), Grodzinsky D. M. (Kiev), Zaporozhan V. N. (Odessa),
Kalakutsky L. V. (Pushchino, Moscow region), Kurbatov A. D. (Leningrad),
Naer V. A. (Odessa), Nikitin V. A. (Kharkov), Pinayev G. P. (Leningrad),
Sergeyev G. B. (Moscow), Solovyova M. A. (Kiev), Solomonov N. G. (Yakutsk),
Timofeyev N. N. (Moscow), Cherednichenko V. M. (Kharkov), Shental V. V. (Moscow),
Emirbekov E. Z. (Makhachkala).

Адрес редакции:

310015, Харьков, 15,
ул. Переяславская, 23.

Научный редактор А. М. БЕЛОУС

Ответственный секретарь редакции

Ф. А. ПРИХОДЬКО

Редактор З. В. ЛИНЕВИЧ

Технический редактор В. Н. ВОЛКОВА

Корректор С. М. КОЛЕСНИЧЕНКО

Сдано в набор 15.10.85. Подписано в печать 05.12.85. БЦ 17159. Формат 70×108/16. Физ. печ. л. 3,5.
Уч. изд. л. 5,51. Усл. краскоот. 5,6 Усл. печ. л. 4,90. Тираж 1000 экз. Заказ № 5-1441 Цена 65 коп.

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

Отпечатано с матриц Харьковской книжной фабрики им. М. В. Фрунзе в Харьковской городской
типография № 16. 310003, Харьков, Университетская, 16. Зак. 2023.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ОТДЕЛЕНИЕ ФИЗИОЛОГИИ

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ
И ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

КРИОБИОЛОГИЯ

1 1986

ВСЕСОЮЗНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ОСНОВАН В 1985 ГОДУ
ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

КИЕВ НАУКОВА ДУМКА 1986

СОДЕРЖАНИЕ

Задачи криобиологии в ускорении научно-технического прогресса.	3
УТЕВСКИЙ А. М. Биология и криобиология обратимой остановки жизнедеятельности: регуляция и функциональный обмен	5
БЛАГОЙ Ю. П., ЦЫГАНЕНКО А. Я., ЗИМОГЛЯД Б. Н., ЛЕОНТЬЕВ В. С., ВАСИЛЬЧЕНКО В. Н., ШКОРБАТОВ А. Г. Криоустойчивость и структурная организация липосом, содержащих рифампицин и тетрациклин	11
ЕСЬМАН С. С., ЛЫКОВ И. Г., РИКБЕРГ А. Б. Влияние ультразвука на охлаждение воды и некоторых биологических сред.	15
МЕЖЕВИКИНА Л. М., КРАСТС И. В., ВЕПРИНЦЕВ Б. Н. Замораживание спермы морских ежей до температуры — 196° С.	18
СКОРНЯКОВ Б. А., ГОВОРУХА Т. П., КОПЕЙКА Е. Ф. Влияние температурного и осмотического шока на ультраструктуру спермиев карпа <i>Cyprinus carpio</i> L. (<i>Cyprinidae</i>)	21
СИДЯКИНА Т. М., КУЗНЕЦОВА Е. В., ЧУМАКОВА М. Ю. Жизнеспособность и биохимическая активность дрожжей <i>Saccharomyces vini</i> при сублимационном высушивании и криоконсервации	23
ЦЫМБАЛ Л. В., МОИСЕЕВ В. А., МИШНЕВА Л. Г. Исследование температурной зависимости восстановления свободных радикалов в митохондриях	28
ЖЕГУНОВ Г. Ф. Электрофизиологические параметры функционирования сердца сусликов (<i>Cytellus undulatus</i>) в процессе пробуждения от зимней спячки	31
ВАЩЕНКО Т. Н., ВАЩЕНКО В. И., ПЕТРЕНКО Г. И., БАГАУТДИНОВ Ш. М., КАЛЕКО С. П. Влияние криоконсервирования на топологические переходы суперспиральной ДНК «нуклеонидов» клеток костного мозга человека	34
БАБИЙЧУК Г. А., БЕЛОСТОЦКИЙ А. В., АРЦЫБУШЕВ Ю. Н. Насосная функция ишемизированного миокарда при краниocereбральной гипотермии	38
КОЦЬКО Н. И., САНДОМИРСКИЙ Б. П., КОСТЯ П. И., КАПРЕЛЬЯНЦ А. С. Применение низких температур при атипических резекциях печени	43
ЦУЦАЕВА А. А., ЮРЧЕНКО Г. Г., ПОПОВ Н. Н., ВОСКОБОЙНИКОВА Т. Н., ВОДОЛАЖСКАЯ Л. П. Имунный статус больных раком шейки матки, леченных с применением криовоздействия.	46

© Издательство «Наукова думка», «Криобиология», 1986

This One



UG9Z-GBE-RNOK

Матеріал, захищений авторським правом

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

КОНОНОВ Ю. В., ФЕДОРОВА Т. Г. Изучение серологических особенностей криоконсервированных эритроцитов	50
ИСЕРОВИЧ П. Г. Роль гидростатического давления в повреждении клеток при низкотемпературном консервировании	51

ХРОНИКА

Республиканская школа «Криоконсервация биологических объектов» (Харьков, 20—28 сентября 1985 г.)	52
Р е ф е р а т ы	53

CONTENTS

Tasks of cryobiology for acceleration in scientific and technological progress	3
UTEVSKY A. M. Biology and cryobiology of the reversible stoppage of vital activity: regulation and functional metabolism	5
BLAGOY Yu. P., TSYGANENKO A. Ya., ZIMOGLYAD B. N., LEONTYEV V. S., VASILCHENKO V. N., SHKORBATOV A. G. Cryoresistance and structural organization of liposomes containing rifampicine and tetracycline	11
YESMAN S. S., LYKOV I. G., RIKBERG A. B. The effect of ultrasound on supercooling of water and some biological media	15
MEZHEVIKINA L. M., KRASTS I. V., VEPRINTSEV B. N. Freezing of sea urchin sperm to -196°C	18
SKORNYAKOV B. A., GOVORUKHA T. P., KOPEYKA E. F. The effect of thermal and osmotic shock on the ultrastructure of <i>Cyprinos carpio</i> L. (<i>Cyprinidae</i>) sperm	21
SYDYAKINA T. M., KUZNETSOVA E. V., CHUMAKOVA M. Yu. The viability and biochemical activity of <i>Saccharomyces vini</i> subjected to lyophilization and cryopreservation	23
TSYMBAL L. V., MOISEYEV V. A., MISHNEVA L. G. Investigation of the temperature dependence of reduction of free radicals in mitochondria	28
ZHEGUNOV G. F. Electrophysiologic parameters of ground squirrel (<i>Cytellus undulatus</i>) hearts during uptake from hibernation	31
VASHCHENKO T. N., VASHCHENKO V. I., PETRENKO G. I., BAHAUTDINOV SH. M., KALEKO S. P. The influence of cryopreservation on the topological transitions of supercoiled «nucleoid» DNA from human bone marrow cells	34
BABIYCHUK G. A., BELOSTOTSKY A. V., ARTSYBUSHEV YU. N. The cardiac output in ischemic myocardium upon craniocerebral hypothermia	38
KOTSKO N. I., SANDOMIRSKY B. P., KOSTYA P. I., KAPRELYANTS A. S. Application of low temperatures in atypical resection of liver	43
TSUTSAYEVA A. A., YURCHENKO G. G., POPOV N. N., VOSKOBOYNIKOVAT. N., VODOLAZHSKAYA L. P. Immunologic status of cervix uteri cancer patients after cryotreatment	46

SHORT COMMUNICATIONS

KONONOV YU. V., FEDOROVA T. G. The investigation of serologic properties of cryopreserved erythrocytes	51
ISEROVICH P. G. A role of hydrostatic pressure in cellular cryoinjury upon low temperature preservation	51

CHRONICLE

The UkrSSR school «Cryopreservation of biological systems» (Kharkov, September 20—28, 1985)	52
A b s t r a c t s	53



ЗАДАЧИ КРИОБИОЛОГИИ В УСКОРЕНИИ НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКОГО ПРОГРЕССА

25 февраля 1986 года начинает свою работу XXVII съезд КПСС. К очередному форуму коммунистов советские люди подготовили трудовые подарки по обеспечению заданий пятилетнего плана. После апрельского (1985 г.) Пленума ЦК КПСС, принявшего решение о созыве съезда, на завершающий период одиннадцатой пятилетки, трудящиеся взяли повышенные социалистические обязательства. Партия определила пути интенсификации производства, направляет усилия миллионов на ускорение экономического и социального развития для улучшения жизни народа, дальнейшего укрепления обороноспособности Родины. В ходе подготовки к знаменательному событию Центральный Комитет поставил на всенародное обсуждение проекты новой редакции Программы КПСС, изменений в Уставе КПСС, основных направлений экономического и социального развития СССР на 1986 — 1990 годы и на период до 2000 года.

В решении задач неуклонного развития страны партия и правительство важную роль отводят науке. За последнее время все более широкое распространение получают фундаментальные и прикладные науки о применении холода. Изучение действия низких температур на различные биологические объекты позволило выявить новые закономерности, результаты поисков нашли применение в различных областях народного хозяйства.

Установлено, что в искусственных условиях глубокого холода (-196°C и ниже) биологические объекты сохраняются в жизнеспособном состоянии в течение длительного времени. Сейчас низкотемпературное консервирование половых клеток широко используется в товарном и племенном животноводстве, птицеводстве и на рыборазводных предприятиях, обеспечивая интенсификацию работ по выведению продуктивных пород, а также сохранению редких и исчезающих видов животных. Низкотемпературное консервирование микроорганизмов и клеток культур тканей позволяет создавать запасы ценных коллекций и новые виды биотехнологии, получать особо важные и широко используемые в народном хозяйстве препараты. Разработка научных основ применения холода в пищевой промышленности значительно улучшает осуществление мер по долгосрочному хранению продуктов питания. Безусловно необходимыми для криобиологии и криомедицины являются разработка и синтез ряда новых криопротекторов и комбинированных соединений, оказывающих защитное действие на биологические системы в процессе их глубокого замораживания и отогрева, когда возникает потребность активизировать процессы репарации систем синтеза, биоэнергетики и восстановить ионную асимметрию клетки. Низкотемпературное консервирование клеток крови, костного мозга и тканей широко используются в медицине с целью создания запаса необходимых препаратов для переливания, а также тканей и органов для трансплантации. Изучение механизмов повреждающего действия холода легло в основу методов криохирургии и холодового лечения ряда заболеваний в области онкологии, офтальмологии, ларингологии, гинекологии, хирургии и других специальностей. Не менее значительным и важным является направление исследований по изучению влияния холода на организм человека, животных и растений, развитие теоретических принципов и созда-

ние криогенной аппаратуры, позволяющей внедрить методы консервации и холодового воздействия на биологические объекты в практику.

Исследования в области криобиологии и криозащиты интенсифицировались в Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР (ИПКиК АН УССР). Основным содержанием работы института явилось всестороннее изучение механизмов криоповреждения, репарации и криорезистентности биологических структур, а также разработка научных основ их криозащиты; перед коллективом ставилась задача достичь усовершенствования методов применения в клинике холода; усилия сотрудников сосредоточивались на создании технологий, аппаратуры для криоконсервирования, холодового лечения патологических состояний. И определенные результаты за последнее время достигнуты. Выявлены ведущие механизмы криоповреждения и криозащиты биологических структур разных уровней организации, установлена ведущая роль в этих процессах биологических мембран. Впервые описано явление низкотемпературной адаптации клеток под влиянием циклического изменения температуры и тоничности среды, получены новые данные о механизме воздействия криопротекторов на молекулы, клетки, ткани, органы и организмы, достигнуто стабилизирующее действие криопротекторов на специфическую активность иммуноглобулинов, установлен факт снижения иммуногенности криоконсервированного аллотрансплантата, изучены особенности его взаимодействия с организмом реципиента, научно обосновано предпочтительное использование криоконсервированных трансплантатов в практике. Широко развернулись исследования по изучению криорезистентности и криочувствительности эмбриональных клеток и тканей. Совместными усилиями ученых института и коллективов научных учреждений Академии наук СССР (Институты цитологии, биологической физики), Академий наук союзных республик, Институты гематологии и переливания крови, физиологии растений, ряда клинических центров, учреждений ВАСХНИЛ, здравоохранения, министерства пищевой промышленности, других ведомств решен целый комплекс важных задач.

А впереди более объемные решения. Прежде всего надо преодолеть сложившиеся трудности. Самым характерным недостатком в исследованиях нашего и других научных учреждений является разобщенность в деятельности коллективов, нередко мелкомасштабность. Пока еще нет весьма необходимой координации, распыляются силы и средства, а это не способствует интенсивному развитию таких важнейших отраслей, как медицина, сельское хозяйство, пищевая промышленность.

Принципиальное значение для решения данной проблемы имеют широкий обмен научной информацией, оперативная публикация результатов научных поисков, комплексное исследование и координация работ, проводимых в учреждениях различных министерств и ведомств. В связи с этим ИПКиК АН УССР предложил смежным институтам рассмотреть вопрос о совместном внедрении в различные отрасли народного хозяйства ряда методов, технических средств и новых технологических процессов холодового воздействия на биологические объекты. Решающее значение в дальнейшем развитии и интенсификации научных исследований, ускорении внедрения их результатов в практику имеет повышение квалификации и увеличение числа специалистов в области криобиологии и криомедицины. Для этой цели предполагается ввести преподавание криобиологии и криомедицины в высших учебных заведениях, создать кафедры, приступить к подготовке учебника по криобиологии.

В настоящее время назрела необходимость в научных учреждениях, занимающихся изучением влияния холода на биологические объекты, провести оценку полученных результатов с тем, чтобы сконцентрировать усилия ученых на создание общей теории криоповреждений и криозащиты. Для этого целесообразно на протяжении 1986—1990 гг. завершить анализ материалов и представить для широкого обсуждения основные положения теории холодовых повреждений клеточных систем. Имеющиеся данные свидетельствуют, что криоконсервация различных суспензионных клеточных

систем (клетки крови, костного мозга и т. д.) нуждается в дальнейшем совершенствовании. Жизненно важно выработать четкие научно-практические основы дальнейшего развития исследований на двенадцатую пятилетку и последующие годы, т. е. практически решить вопрос о развитии и внедрении в практику народного хозяйства новых прогрессивных отечественных технологий криоконсервации, в первую очередь крови и ее компонентов. Существенные сдвиги нужны в решении проблемы криоконсервации промышленных штаммов микроорганизмов, использование которых в предстоящем пятилетии должно быть внедрено в практику. Есть предпосылки для широкого практического применения результатов научно-исследовательских работ по криоконсервации спермы сельскохозяйственных, редких и исчезающих видов животных, а также рыб и получения значительного экономического эффекта за счет существенного увеличения элитного потомства. Ученые призваны интенсифицировать разработки по криоконсервации и трансплантации зигот животных, человека, эмбриональной печени, кожи, ткани сердца, мышц, а также нервной ткани. Коллектив ИПКиК АН УССР совместно с заинтересованными институтами в ближайшее время разработает практические рекомендации для внедрения результатов исследований в сферу медицины. Все более широкое развитие приобретает новое направление в медицинской практике — использование холода как стимулятора репарации тканей и органов, прежде всего методов комбинированной эндоскопической и поверхностной криотерапии, обеспечивающих как деструкцию патологических очагов, так и более благоприятное, по сравнению с хирургическим методом, заживление. ИПКиК АН УССР, Институт физики АН УССР, медицинские центры, ведущие учреждения готовят рекомендации для апробации и внедрения в практику здравоохранения необходимой криоаппаратуры. В области криобиологии коллектив Института физиологии растений АН УССР усиленно работает над фундаментальными и прикладными разработками для создания низкотемпературного банка клеток и меристемных тканей с целью сохранения генофондов важных промышленных, а также редких и исчезающих видов растений для нужд селекционных разработок.

Эти и другие важные задачи находятся в центре внимания ученых, специалистов в области криобиологии и криомедицины. Для их решения потребуются большая настойчивая работа. Плодотворная деятельность в каждом звене для осуществления намеченных планов будет достойным подарком очередному съезду партии.

УДК 57.043

А. М. Утевский

БИОЛОГИЯ И КРИОБИОЛОГИЯ ОБРАТИМОЙ ОСТАНОВКИ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ: РЕГУЛЯЦИЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ ОБМЕН

В предыдущих работах [3, 4, 5] мы указывали на то, что некоторые данные криобиологии, в частности наблюдаемые при искусственном холодовом анабиозе (ИХА), вступают в противоречие с одним из основных постулатов современной биологии, согласно которому уникальная, неравновесная, негентропийная, статистически маловероятная структура «живого» не может существовать без постоянного «самообновления» за счет потока вещества, энергии и информации, извлекаемых из внешней среды, без биологического обмена (ЕО).

Поколения химиков, основываясь на экстраполяции правила Аррениуса за пределы имеющихся экспериментальных данных, придерживались

мнения, что при низких и сверхнизких температурах химические реакции вообще не идут, наступает абсолютная химическая пауза, положить конец которой может только переход системы в такие температурные границы, при которых снимается *veto* , накладываемое правилом Аррениуса.

В настоящее время известно, что торможение скорости химических реакций с понижением температуры имеет свои пределы, а некоторые реакции (образование свободных радикалов, процессы туннелирования) даже стимулируются при низких температурах, следовательно, вопрос не в том, возможны ли вообще при низких температурах различные молекулярные взаимодействия, т. е. химические процессы, на него убедительно отвечает само возникновение и интенсивное развитие такой науки как «криохимия». Вопрос заключается в том, способна ли подобная низкотемпературная химия быть основой самообновления (хотя бы в минимальных размерах), т. е. выполнить основную функцию БО, необходимую для осуществления любой функциональной активности, любого проявления жизнедеятельности биологической системы.

Данные криохимии и криобиохимии убедительно говорят в пользу того, что при температурах, которые используются при искусственном холодовом анабиозе, могут идти химические реакции, но не может осуществляться та цепь и циклы биохимических процессов, которые образуют БО. Чем же он отличается от сетки «простых» химических актов? Сложностью? Разветвленностью? Прежде всего тем, что биологический обмен всегда функционален. А подвергнутая низкотемпературному охлаждению, замораживанию и консервированию клетка или ткань сохраняет только одну функцию, но функцию решающую, биологически исключительно важную — способность к переходу от состояния жизнеспособности к состоянию жизнедеятельности, способность к реституции функциональной активности, к реституции биологического, функционального обмена. Что же такое биологический функциональный обмен и какие черты и параметры ему свойственны?

Биологический обмен обладает свойствами ауторегуляции, поддерживающей его общую направленность и придающей ему благодаря зависимости этой направленности всего обмена от конечных его звеньев характер целесообразности. Ауторегуляция свойственна каждому отдельному химическому акту (согласно закону действующих масс и принципу Ле-Шателье), но сразу видоизменяется, так как продукты реакции не остаются в одной фазе и системе с исходными веществами, которые или подвергаются дальнейшему превращению (в процессах распада или синтеза), или переходят в иные фазы, которыми богата многофазная цитоплазма, или вовсе отделяются от исходных веществ, попадая в структурные ячейки — компартменты, которыми также изобилует клетка. Все более усложняется ауторегуляция каждого звена и каждого ответвления обмена, в нее включаются аллостерические эффекты, связанные с дистантным действием «отдаленных» продуктов, образующихся в цепи реакций на регуляторные (аллостерические) центры ферментов, участвующих в катализе первых этапов биохимической цепи или цикла реакций.

Ауторегуляция процессов БО — это подвижная, динамическая, гомеостатическая, многоярусная система все время переходящих друг в друга, включающих и отрицающих друг друга ауторегуляций различных уровней биологической организации. При этом ауторегуляции уровней все более сложной организации включаются в ауторегуляцию уровней менее высокой организации, становясь для них уже регулируемыми факторами — ауторегуляция целостного организма и его биологического обмена как бы «протискивается» сквозь многоярусную «толпу» ауторегуляций функциональных систем, органов, тканей, клеток и межклеточных связей, клеток и субклеточных органелл, надмолекулярных и, наконец, молекулярных структур и процессов. Продукты БО (метаболизма), метаболиты, приобретают все новые и новые функции факторов регуляции и ауторегуляции, становясь аутокатализаторами, активаторами и ингибиторами ферментов, коферментами, аутогормонами, гистогормонами, центральными и перифериче-

скими медиаторами нервных процессов, гормонами и нейрогормонами, модуляторами, изменяющими чувствительность рецепторов эффекторных тканей по отношению ко всем этим факторам, порожденным БО и ставшими его регуляторами.

Наши многолетние исследования обмена адренергических гормонов-медиаторов адреналина и норадреналина показали, что пути и продукты превращения этих регуляторов (катехоламинов) в эффекторных клетках принимают наряду с нативными молекулами «химических регуляторов физиологических функций» активное участие в регуляции и ауторегуляции [6] и, следовательно, в становлении и формировании БО как регулируемого и регулирующего фактора.

Дальнейшие работы наши и многих других исследователей показали приложимость нашей концепции о «функциональном обмене гормонов-медиаторов» к половым гормонам и кортикостероидам, иодированным тиронинам, нейропептидам и др. Их обмен — это существенный фактор регуляции. *Обмен регулируется, регуляторы обмениваются* [6].

Таким образом, первая функция «сетки» связанных между собой, сопряженных химических реакций, формирующих БО — это превращение, казалось бы, случайных ауторегуляций в определенную регуляцию, обеспечивающую направленность всего обмена. Эта «направленность» является выражением второй стороны БО — самообновления структур, поддержание их самоорганизации и развития, это важнейшая функция и основной, наряду и в связи с ауторегуляцией, этап становления и активного действия биологического функционального обмена.

Структуры разного уровня организации и сложности являются одновременно локусами, компартментами, ячейками, создающими новые условия ауторегуляции и регуляции БО; ионные и другие градиенты, «каналы» и «насосы», специфические и неспецифические рецепторы и в то же время сами являются обменом, отдавая в его потоки и циклы продукты своего распада, своей жизнедеятельности и снова возрождаются из обмена веществ, энергии и информации. *Структуры обмениваются, обмен структурируется* (см. схему).

Регулируемый и регулирующий, структурированный и структурирующий обмен, как уже указывалось выше, всегда функционален, т. е. обеспечивает различные стороны жизнедеятельности. Функции эти могут быть условно разделены на *первичные*, без которых никакая жизнедеятельность никакой биосистемы не может осуществляться, и *вторичные*, которые могут быть очень важны, даже жизненно необходимы для отдельных видов, популяций и т. д., но не являются универсально облигатными. Биологический обмен, насколько мы знаем, первичен для жизнедеятельности биосистем, но такая грандиозная ветвь этого обмена, как дыхание, первичная для бесконечного числа таксономических групп, не является таковой для не менее внушительного по масштабам мира анаэробов. Перехватывающий и ассимилирующий энергию солнца хлорофилл играет в развитии жизни



Схема формирования функционального обмена. $A \leftrightarrow B$ — в процессах «самообновления» структуры обмениваются, обмен структурируется; $A \leftrightarrow C$ — обмен регулируется, регуляторы обмениваются; $B \leftrightarrow C$ — структурирующий и структурируемый обмен участвует в ауторегуляции, регуляции и формировании функций.

и жизнедеятельности планетарную роль, но немало живых существ неплохо себя чувствуют без хлорофилла. Прогрессивная эволюция без конца множит функциональные разветвления биологического обмена, регрессивная снимает некоторые из них. То и другое — результат адаптивных приспособлений. Эти функциональные «надстройки» не являются в действительности вторым этажом, вторым ярусом биологического обмена, они неразрывно связаны с ним, функционируют, являясь его неотъемлемой частью, его функциональными звеньями. Хорошим примером может служить функциональный обмен мышечного сокращения, нервного возбуждения, его распространения и передачи, биохимическая динамика эндокринной клетки, функциональный обмен которой подробнее мы рассмотрим несколько позже в связи с нашими исследованиями биохимии криоконсервированной щитовидной железы.

Основа функции — специализированные структуры и специализированные звенья БО. Что из них предшествует другому? Возможно, что они генетически синхронны и формируют друг друга. Но раз возникнув, они (специализированные структуры и соответствующие звенья функционального обмена) могут быть на некоторое время разобщены, вернее первые сохраняются при торможении вторых, так же как основные биоструктуры сохраняются при нулевом или почти нулевом «самообновлении». Это, очевидно, и имеет место при искусственном холодовом анабиозе.

В биологии известны различные формы и механизмы значительного снижения жизненной активности и, соответственно, биологического обмена и его специфических функциональных ответвлений как важные адаптивные приспособления выживания в неблагоприятных экологических, в том числе сезонных и экстремальных условиях. Примером могут служить явления гибернации (зимняя спячка), оцепенение, которое характерно для некоторых представителей фауны пустынной (аридной) зоны и т. д. В этих случаях несомненно имеет место сохранение подобными организмами некоторого необходимого обмена и функций жизнедеятельности, хотя и в очень ограниченном масштабе. Это явление запрограммированного развитием угнетения биологического обмена и его функциональных аппаратов, изменение, но неполное выключение их активности. Качественно другие явления мы встречаем в биообъектах, к которым неприменимо понятие «жизнедеятельность», а только понятие и термин «жизнеспособность», то есть способность при совокупности определенных условий становиться «жизнедеятельными». Примером могут служить семена, споры, а также организмы, впадающие в анабиоз. Таким образом, возможны разные формы и степени жизнедеятельности.

Какова же та граница, где тот предел, выйдя за который из зоны жизнеспособности, биообъект переходит в необозримую область неживой природы. Различные формы неживой материи от «квантовожидкостного» состояния так называемых вечных газов до плазмы занимают на абсолютной температурной шкале место от температур, близких к абсолютному нулю, до многих миллионов градусов. Сравнительно неширокий интервал, 253—353 К, занимают сосуществующие с неживыми системами жизнедеятельные и жизнеспособные биосистемы. Более широкий интервал в пределах 2—3 К ÷ 353—373 К занимают сосуществующие с неживыми жизнеспособные структуры.

При более высоких температурах (250—270 К — для одних групп организмов и в иных интервалах для других) биосистемы могут быть в состоянии, характеризующимся очень ослабленным биологическим (функциональным) обменом (гипобиоз, мезабиоз) [1], т. е. такие состояния, при которых минимальная активность БО (функционального) еще остается. Иное дело искусственный холодовый анабиоз при температуре жидкого азота и ниже. Здесь нельзя обнаружить следов биологического (функционального) обмена, но сохраняется то, что способствует реституции этого обмена, сохраняется программа и механизмы его развертывания.

Все виды гибернации — «воспоминание» о земной (наземной) эволюции, о ледниковых периодах, о суточных и сезонных колебаниях температуры и формировании соответствующих механизмов адаптации. Искусственный холододовый (низкотемпературный) анабиоз — это «воспоминание» скорее о космической эре формирования добиологических и биологических структур [2]. Если первое — торможение жизнедеятельности, то второе гораздо более глубокое и радикальное изменение, переход в то афункциональное, аметаболическое состояние, в котором биоструктуры могут сохраняться неопределенное число лет и которое как бы раздвигает временные границы индивидуальной жизни, создавая возможность формирования из непрерывного потока индивидуального существования биоструктур прерывистое их существование; здесь остановка связана с отключением биологического (функционального) обмена, с утратой всех функций «живого», кроме одной, но самой существенной — способности к их восстановлению.

«Нежизнедеятельная» жизнь постоянно встречается как переходная форма в чередовании поколений (семена, споры), но можно ли их назвать афункциональными? С ними связана одна из важнейших биологических функций — распространение жизни в пространстве и времени, требующее временного подавления всех остальных функций.

Каков же функциональный обмен «нефункционирующей» жизни и есть ли он вообще? Перерыв, остановка начавшей функционировать жизни, например проросшего семени, гораздо более чревата возможным необратимым повреждением и гибелью живого. Раз начавшее функционировать «живое» как бы сбрасывает с себя защиту, свойственную анабиозу, и повторное выключение жизнедеятельности оказывается для него роковым.

Клетка-организм и клетка из организма в отношении рассматриваемых нами вопросов далеко не одно и то же, так же как и совокупность (клон) одноклеточных организмов не равнозначен совокупности клеточных элементов какой-либо ткани организма. У первых ауторегуляция БО как бы заканчивается на клеточном уровне и становится регуляцией, динамический гомеостаз которой непосредственно взаимодействует с факторами внешней среды. Вторые при извлечении из организма лишаются гомеостаза внутренней среды, кровеносных (гуморальных) и нервных связей, многочисленных ауторегуляций более высоких уровней, формирующих для клеток и тканей их экстрацеллюлярную регуляцию. Для одноклеточных организмов выход из анабиоза полностью соответствует «возвращению обратно к жизни», понимая под «жизнью» именно деятельную, активную жизнь, проявляющуюся в её неотъемлемых свойствах и, в первую очередь, в биологическом функциональном обмене. Можно ли считать возвращением к жизни (жизнедеятельности) то, что происходит не с клетками-организмами, а с клетками из организма после их криоконсервирования и отогревания. Да, известно, что такие клетки в определенных условиях (режимах) охлаждения, низкотемпературного замораживания, хранения и деконсервирования сохраняют механизмы биологического функционального обмена, проявляют в соответствующих условиях адекватную функциональную активность.

Для современной криобиологии и криомедицины реституция функционального (специализированного) обмена и его регуляции представляет особый теоретический и практический интерес, поскольку основные биообъекты, криоконсервируемые в настоящее время для целей трансплантации и трансфузии, — это не организмы и даже не органы, а клетки и ткани, для которых характерна специфическая функция, обеспечиваемая специфическим функциональным разветвлением биологического обмена. Разумеется, многие клетки и ткани (если не все) полифункциональны, но в первую очередь мы добиваемся сохранности основной функции (дыхательной — эритроцита, обезвреживающей — гепатоцита, гормонообразовательной — эндокринной клетки и т. д.).

Процессы реституции функционального обмена после действия низкотемпературного замораживания и отогрева мы исследовали на криоконсер-

вированных фрагментах щитовидной железы, отдельных тироцитах и их мембранах. Функциональный обмен клеток щитовидной железы (специфическое ответвление БО) выражается в образовании из аминокислоты тирозина и иода своеобразных органических структур — иодированных тиронинов T_3 и T_4 (трийодтиронин и тироксин), их резервировании и секреции. Функцию гормонопоза можно разложить на начальные этапы (аккумуляция и окисление иодидов) и промежуточные (органификация иода, иодирование связывающих его компонентов специфического белка — тиреоглобулина и тирозиновых колец, созревание T_3 и T_4 , освобождение под влиянием катепсина Д иодированных тиронинов). Последнее промежуточное звено процесса переходит в финальное — секрецию гормонов. Наши исследования [7] показали, что способность клеток щитовидной железы осуществлять каждый из этих достаточно сложных биохимических актов и всю совокупность их в той же последовательности, которая диктуется закономерностями развертывания данного функционального обмена в криоконсервированных клетках щитовидной железы после их отогрева, не нарушена. Оказывается ненарушенной и система ауторегуляции этого процесса гормонопоза, рецепторное и нерцепторное связывание лигандов специфических (тиреотропный гормон и адреналин) и неспецифических факторов, влияющих на гормонопоз, циклазная система, ее рецепторная, сопрягающая и каталитическая части, формирование «вторых» медиаторов гормональных стимулов — циклических нуклеотидов. Сохраняется не только способность к гормонопозу, но и способность к его регуляции, «регулируемый гормонопоз», т. е. сохраняется (или восстанавливается) регулируемый и регулирующий биологический функциональный обмен.

Вместе с тем проведенные нами исследования указывают на некоторые сдвиги в процессах регуляции отдельных проявлений той или иной функции и, следовательно, лежащих в ее основе функциональных звеньев биологического обмена. Следует думать, что реституция взаимодействия членов триады структура — обмен — регуляция с взаимопроникновением и воплощением каждого члена триады в два других, а всех вместе в биологический функциональный обмен — основа формирования функций, в свою очередь участвующих в формировании обмена, регуляции и структуры, комплекса, характеризующего жизнедеятельность (см. схему). Эти сложные взаимодействия и взаимосвязи, замороженные в прямом и переносном смысле при криоконсервировании, во время отогрева проходят сложный и во многом еще не исследованный путь от жизнеспособности к жизнедеятельности. Анабиоз — это не абиз, это состояние, причастное к жизни, но это и не биочасы, маятник которых придерживали медленные, почти неподвижные потоки молекул и атомов, материальная основа низких температур, и которые только «ждут» теплового «толчка», чтобы обрести ход в прежнем темпе. Это сравнение может иметь какой-то смысл при анализе зимней спячки и пробуждения гибернантов. Искусственный холододовый анабиоз, сохранение жизнеспособности в жидком азоте или тем более в жидком гелии вблизи абсолютного нуля — это качественно другое явление. Предположение о том, что в этих условиях находятся те же системы и те же процессы регулируемого и регулирующего, структурируемого и структурирующего обмена, с которым связана жизнь в ее наиболее известной нам форме, но находится в преформированном минимальном объеме (остается только расти) или в застывшем (остается только всему задвигаться) состоянии является маловероятным. Не преформация, а сборка заново, развертывание программы перехода не от неживого к живому, а от особого состояния, лишеного основных атрибутов жизни, ее особой формы без функциональной жизнеспособности, к полифункциональной жизнедеятельности.

Какова эта программа, её материальные носители? Те же информационные молекулы? Надмолекулярные комплексы и образовавшие их слабые связи? Каковы первые этапы и переходы? Поиск ответа на эти и смежные вопросы может иметь существенное значение не только для криобиологии, но и для анализа общебиологических проблем, роли обмена в станов-

лении и формировании регуляции и структуры и роли структуры и регуляции в становлении и формировании функционального биологического обмена.

1. Голдовский А. М. Анабиоз.— Л.: Наука, 1981.— 136 с.
2. Гольданский В. И. Зерна межзвездной пыли как возможные холодовые зародыши жизни // Докл. АН СССР.— 1978.— 278, № 4.— С. 823—826.
3. Утевский А. М. О познании сущности жизни в условиях, ее отрицающих // Философские и социальные аспекты современной биологии и медицины: Тез. докл. обл. науч. конф. (Харьков, октябрь, 1983 г.).— Харьков: Б. и., 1983.— С. 10—16.
4. Утевский А. М. Биология и криобиология «обратимой остановки жизни» // Экспериментальный анабиоз: Тез. докл. II Всесоюз. конф. по анабиозу. (Рига, октябрь, 1984 г.).— Рига: Б. и., 1984.— С. 29—31.
5. Утевский А. М. Криобиология в анализе общепрологических проблем // Криобиология.— 1985.— № 1.— С. 8—13.
6. Утевский А. М., Осинская В. А. Функциональный обмен регуляторов обмена в эндокринологии и нейрохимии// Укр. биохим. журн.— 1975.— 47, № 6.— С. 683—695.
7. Чуйко В. А., Утевский А. М. Биохимия криоконсервированной щитовидной железы.— Киев: Наук. думка, 1985.— 350 с.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР, г. Харьков

Получено 10.09.85.

УДК 57.043:577.37

**Ю. П. Благой, А. Я. Цыганенко, Б. Н. Зимогляд,
В. С. Леонтьев, В. Н. Васильченко, А. Г. Шкорбатов**

КРИОУСТОЙЧИВОСТЬ И СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЛИПОСОМ, СОДЕРЖАЩИХ РИФАМПИЦИН И ТЕТРАЦИКЛИН

Липосомы открывают новые возможности в организации целенаправленного и регулируемого транспорта лекарственных веществ в организме, усиливают действие лекарств, перспективы для биотехнологии и биоинженерии. Для криобиологии липосомы привлекательны тем, что являются удобной моделью для изучения физических и физико-химических механизмов криоповреждения и криозащиты клеток. С помощью липосом можно моделировать некоторые малоизученные нелинейные динамические и низкотемпературные механизмы перестройки биомембран [4].

В настоящей работе предпринята попытка исследования криоустойчивости и структурной организации лецитиновых липосом, содержащих антибиотики рифампицин и тетрациклин. Впервые для исследования структуры и устойчивости таких липосом использована методика поляризационного светорассеяния [1,3] и показана ее эффективность в условиях, осложненных неупругим рассеянием, в особенности когда рассеяние сопровождается поглощением света. Последнее обстоятельство весьма характерно для антибиотиков с развитыми системами сопряженных химических связей. Для ряда вспомогательных задач и контроля использованы центрифугирование, колоночная хроматография, оптическая спектроскопия и электронная микроскопия.

Исследование светорассеяния проводилось на фотоэлектрической установке ФПС-2М в поляризованном свете с длиной волны 546 нм. Определение V_v , H_h и H_v — компонент приведенной интенсивности рассеянного света (I_v) выполнялось в интервале углов рассеяния (θ) от 25 до 135°. (Обозначения, как принято, указывают на вертикальную (V , v) или горизонтальную (H , h) ориентацию электрического вектора в световых потоках облучения (v , h) и рассеяния (V , H)). Погрешность определения V_v - и H_h -интенсивности не превышала 20 %, кроме значений для липосом, содержащих тетрациклин, область вблизи минимума $H_h = f(\theta)$ и самые малые величины H_v , где ошибки возрастали до 50 %. Золи липосом изучали при температуре 25 °С, термостатирование было не хуже $\pm 0,05$ °С. Гониофотометр откалиброван по рассеянию криоскопически чистым жидким

бензолом и этанолом. Серией измерений показано, что компоненты интенсивности света, рассеянного этанолом, с хорошей точностью удовлетворяют соотношению

$$H_h = V_v \cos^2 \theta + H_v \sin^2 \theta.$$

Последнее обстоятельство в меру примерного равенства коэффициентов преломления света этанолом и гидрозолю липосом свидетельствует о пренебрежимо малом вкладе в определение индикатрис рассеяния на границе стекло — гидрозоль.

Дисперсию антибиотик-лецитиновых липосом получали из хроматографически чистого лецитина, выделенного из яичных желтков, и фармакопейно чистых препаратов антибиотиков. Весовая доля лецитина в гидрозоле составляла $1-3 \cdot 10^{-4}$, а соотношение молярных концентраций антибиотик: лецитин для рифампицина 1 : 50 и 1 : 75 — для тетрациклина.

Первоначально липосомы, содержащие антибиотики, получали посредством механического встряхивания исходного лецитинового золь и методом «обратимых фаз» в среде инертных газов. Последний метод базируется на замене этилового спирта, являющегося растворителем лецитина, на диэтиловый эфир перед смешением его с водными растворами антибиотиков в процессе формирования липосом. Оказалось, что липосомы, полученные с заменой растворителя, содержат больше антибиотиков, чем при других способах формирования.

Золь очищали от антибиотиков, не вошедших в состав липосом, двукратным ультрацентрифугированием при $150000 g$ в течение 60 мин или посредством колоночной хроматографии на сефарозе 4В. Долю иммобилизованных липосомами антибиотиков рифампицина и тетрациклина определяли по спектрофотометрическим данным об их концентрации в надосадочной фазе и в золе липосом после их лизиса раствором тритон X—100. Низкотемпературное замораживание (78 K), хранение и оттаивание липосом проводили по модифицированному методу Фаранта и сотрудников [2]. В качестве криопротекторов использовали сахарозу и глюкозу в концентрации 10—15 % (весовых), что давало наилучшую, в ряду других испытанных криопротекторов и вариантов их содержания, сохранность антибиотик-лецитиновых липосом. На заключительной стадии подготовки к измерениям характеристик светорассеяния калибровочные и исследуемые среды очищали от микрогетерогенных примесей фильтрованием через мембраны solvinert UNWP с диаметром пор 0,5 мкм; $\bar{z}$ — средний диаметр липосом (в мкм) в области однократного рассеяния определяли как $D_z = 0,52 (R - 1)^{1/2}$, где R — отношение значений V_v для $\theta = 0$ и $\theta = 25^\circ$, θ — угол рассеяния [1]. Электронно-микроскопические снимки делали на JOEL-микроскопе JEM-7A. Каплю гидрозоля липосом наносили на угольную подложку. Затем обрабатывали 2 %-ным раствором молибденово-кислого аммония.

Одна из целей настоящей работы состояла в выяснении возможностей качественного анализа структурной организации липосомальных форм антибиотиков по данным поляризационного светорассеяния. Ввиду этого представлялось целесообразным на ранней стадии исследований использовать, как более простые и надежные, геометрические методы вычисления параметров, характеризующих структуру, по индикатрисам поляризационных компонент интенсивности светорассеяния. Угловая зависимость V_v -, H_h -, H_v -компонент интенсивности рассеянного света приведена на рис. 1—4. На рис. 1 представлены индикатрисы V_v -интенсивности в форме $K/[V_v(\theta) \sin \theta] = f(\sin^2 \theta/2)$, где K — произвольная константа, значение которой выбрано для удобства работы с графиками, а $V_v(\theta)$ — регистрируемая V_v -интенсивность света. На рис. 1 индикатрисы (1,2) относятся к гидрозолю рифампицин-лецитиновых липосом соответственно в 1-й и во 2-й день с момента их формирования. На 3-й день рифампицин-лецитиновые липосомы теряли агрегационную устойчивость. Процессы деградации липосомной структуры и конденсации липосом и их фрагментов

исключали возможность проведения измерений в области однократного рассеяния. Индикатриса (3) характеризует рассеяние деконсервированными рифампицин-лецитиновыми липосомами на ранней стадии их структурной эволюции. Индикатрисы (4 и 5) иллюстрируют угловое распределение интенсивности света, рассеянного тетрациклин-лецитиновыми липосомами на 1—2-й день и их стабильность в этот период. Существенных изменений в V_v -индикатрисах для тетрациклин-лецитиновых липосом, обусловленных низкотемпературным воздействием, не наблюдалось.

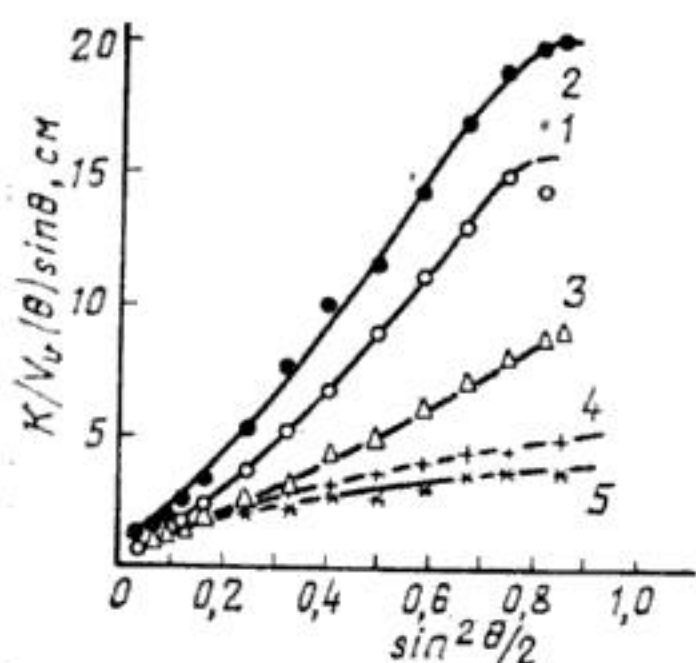


Рис. 1

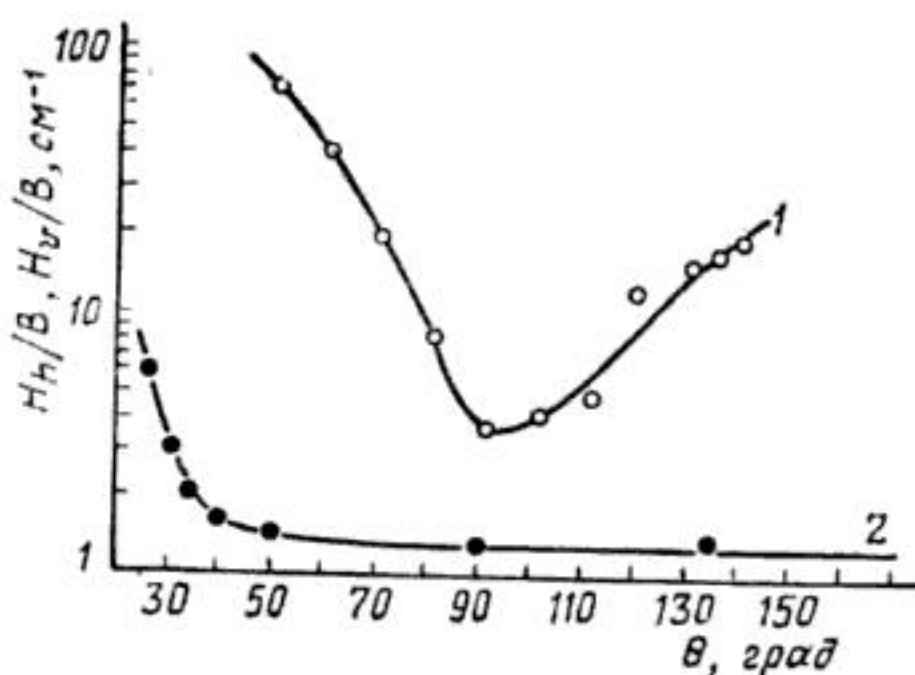


Рис. 2

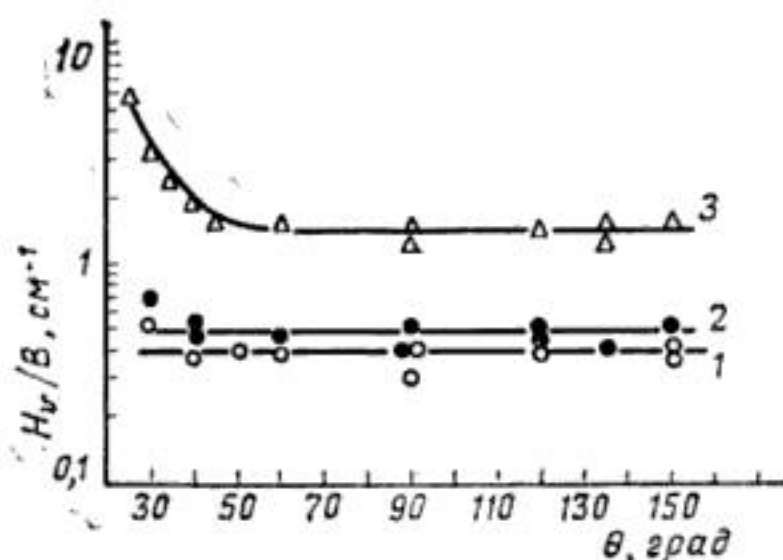


Рис. 3

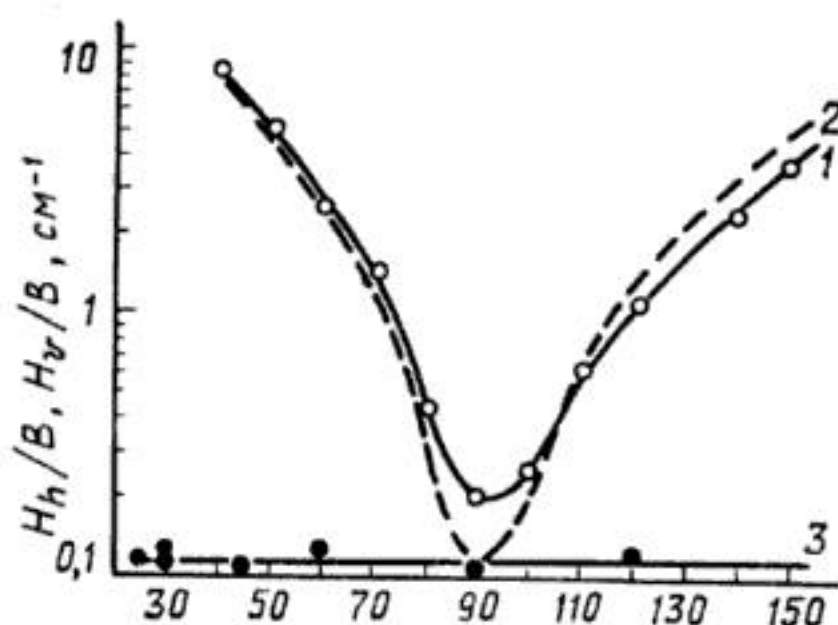


Рис. 4

Рис. 1. Угловая зависимость V_v — интенсивности рассеянного света: 1 — рифампицин-лецитиновые липосомы непосредственно после формирования, $D_z = 1,1$; 2 — тот же золь через сутки; $D_z = 1,0$; 3 — деконсервированные рифампицин-лецитиновые липосомы, $D_z = 0,6$; 4 — тетрациклин-лецитиновые липосомы в первые часы после формирования, $D_z = 1,2$; 5 — тот же золь через сутки, $D_z = 1,3$; $K = 1,4 \cdot 10^{-3}$.

Рис. 2. Угловое распределение H_h и H_v — интенсивности света, рассеянного деконсервированными рифампицин-лецитиновыми липосомами, 1 — H_h/B , 2 — H_v/B . Здесь и далее $B = 22 \cdot 10^{-6}$.

Рис. 3. Угловая зависимость H_v — интенсивности света, рассеянного рифампицин-лецитиновыми липосомами до (1, 2) и после низкотемпературной консервации (3).

Рис. 4. Угловое распределение H_h и H_v — интенсивности света, рассеянного деконсервированными тетрациклин-лецитиновыми липосомами: 1 — H_h/B ; 2 — H_h/B — дипольное приближение; 3 — H_v/B .

При сопоставлении угловой зависимости V_v -компоненты интенсивности света, рассеянного рифампицин-лецитиновыми липосомами, в том числе деконсервированными, с характерной для исходных липосом, видно, что расхождение между ними не принципиально. Во всех случаях сохраняется близкая к сферической форма везикул и их комплексов с рифампицином, а несовпадение V_v -индикатрис обусловлено в основном фракционированием липосом по размеру в процессе подготовки к измерениям характеристик светорассеяния. Отсутствие существенного разрушения рифампицин-лецитиновых липосом в цикле замораживания — оттаивания демонстрируется

данными электронной микроскопии, представленными на рис. 5. Близость формы рифампицин-лецитиновых липосом к сферической непосредственно следует из сопоставления угловой зависимости функции внутрилипосомной интерференции $P(\theta)$, вычисленной по экспериментальным данным как $P(\theta) \approx V_v/cHM_w \equiv Y_\theta/Y_{\theta=0}$ (где c — весовая концентрация лецитина, образующего липосомы, H — оптическая постоянная Дебая липосомного золя, M_w — средневесовая масса липосомы) с предсказаниями теории дифракции в приближении Релея — Ганса. Сферичность (а не шарообразность) формы означает, что рифампицин связывается с липидной фазой, растворяясь в лецитине мембраны. Такое предположение о локализации антибиотика в липосоме учитывает весьма высокую скорость эволюции и агрегационную неустойчивость золя до консервации и существенное повышение стабильности рифампицин-лецитиновых липосом после низкотемпературного воздействия. Для деконсервированных рифампицин-лецитиновых липосом наблюдалась хорошая воспроизводимость угловых зависимо-

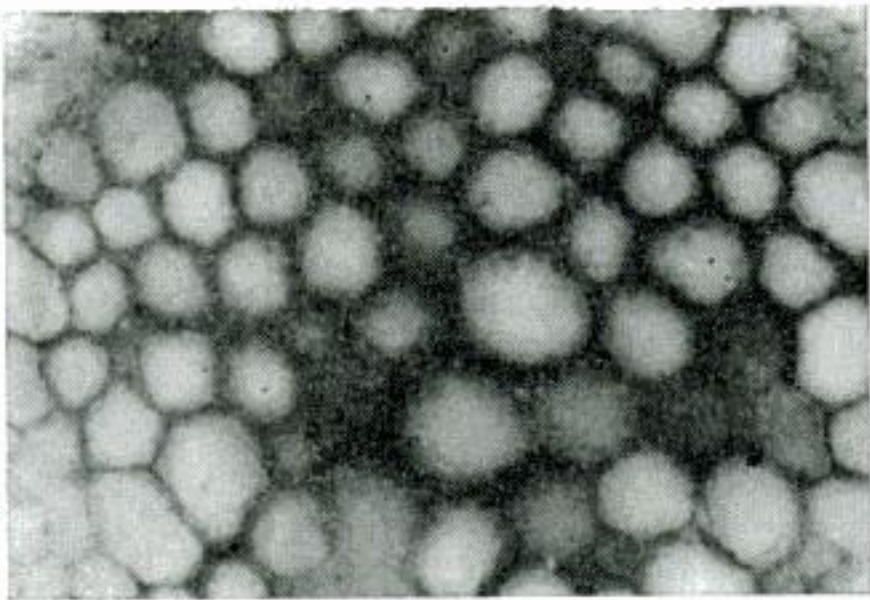


Рис. 5. Деконсервированные рифампицин-лецитиновые липосомы ($\times 20\,000$).

стей V_v и H_v -компонент интенсивности рассеянного света в течение недельного срока. И при дальнейшем более чем месячном визуальном наблюдении изменения не отмечались.

На рис. 3 представлена угловая зависимость H_v -интенсивности света, рассеянного золев рифампицин-лецитиновых липосом до (индикатрисы — 1 и 2) и после низкотемпературной консервации (индикатриса 3). Как видно из рис. 3, H_v -компонента изотропна на ранней стадии эволюции. Такое угловое распределение характерно и для деполяризованной компоненты интенсивности света, рассеян-

ного лецитиновыми липосомами. Отличие индикатрис (1) и (2) отражает изменения за сутки: интенсивность деполяризованной компоненты несколько возрастает, причем изотропность, в основном, сохраняется. Тем самым для рифампицин-лецитиновых и лецитиновых липосом с учетом сохранения углового распределения V_v -интенсивности подтверждается ранее отмеченная [1] особенность структурной эволюции: стадии конденсации липосом в новую макроскопическую фазу предшествует возрастание анизотропии поляризуемости при сохранении средних значений диаметров и функции распределения по размерам, а также формы липосом. Расхождение индикатрис (1), (2) с (3) обусловлено низкотемпературным воздействием. Интенсивность возросла под малыми углами на порядок величины, а при больших углах примерно в 4 раза. Угловая равномерность интенсивности анизотропного рассеяния исходными рифампицин-лецитиновыми липосомами сменилась преимущественной направленностью «вперед» после деконсервации.

Отмеченные особенности деполяризованного рассеяния деконсервированных липосом свидетельствуют о радикальной перестройке мембранного слоя. Существенными чертами этого изменения является значительное расширение зоны локализации неоднородности и увеличение ее полной площади. По примерной оценке относительного изменения площади неоднородности (δS) как $\delta S \sim (\delta H_v)^{1/2}$ оно более чем удваивается. Однако рост латеральной неоднородности при замораживании — оттаивании вовсе не сопровождается, как ожидалось, уменьшением структурной и агрегационной устойчивости золя. Наоборот, низкотемпературное воздействие привело к резкому замедлению скорости эволюции. Стабилизация структуры оказалась настолько значительной, что в течение более чем недельного срока наблюдалась хорошая воспроизводимость полного и анизотропного рассеяния.

1. Благой Ю. П., Васильченко В. Н., Зимогляд Б. Н., Гусева И. С. Структурная и агрегационная устойчивость лецитиновых липосом по данным светорассеяния // Биофизика.— 1980.— 25, вып. 6.— С. 1017—1022.
2. Васильченко В. С., Иванов Э. Н., Леонтьев В. С., Васильченко Н. С. Функциональная активность тимоцитов, подвергнутых низкотемпературной консервации (-196°C) // Криобиология и криомедицина.— 1976.— Вып. 2.— С. 68—71.
3. Зимогляд Б. Н., Васильченко В. Н., Васильченко Н. С. и др. Структурные превращения и агрегационная устойчивость лецитиновых липосом в средах с криопротекторами // Биофизика.— 1984.— 29, вып. 2.— С. 259—263.
4. Иваницкий Г. Р. Биофизический подход к анализу криопроцессов // Криобиология.— 1985.— № 2.— С. 12—18.

Физико-технический институт низких температур АН УССР,
Харьковский медицинский институт, г. Харьков

Получено 08.07.85.

УДК 57.043:532.78:534.29

С. С. Есьман, И. Г. Лыков, А. Б. Рикберг

ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАЗВУКА НА ПЕРЕОХЛАЖДЕНИЕ ВОДЫ И НЕКОТОРЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕД

В поиске путей управления процессами кристаллизации при замораживании биологических объектов важную роль играет изучение нуклеации и роста кристаллов льда под действием различных внешних факторов. Одним из них является ультразвук. За последнее десятилетие появился ряд работ [3, 5, 8], в которых ультразвук в сочетании с низкими температурами использовался для улучшения результатов как криоконсервации, так и криохирургии. Однако механизм его действия на замораживаемые биосистемы остается неясным, возможно, он связан с влиянием на условия и характер льдообразования [4, 7, 8], а также на величину переохлаждения, достигаемого системой при замораживании, что в значительной степени определяет скорость нуклеации и роста кристаллов и образование внутриклеточного льда на начальных этапах кристаллизации [2, 6, 11, 13, 14].

Целью нашей работы являлось изучение влияния ультразвука ($0,5 \text{ Вт/см}^2$) с частотой 880 кГц на переохлаждение воды в условиях, приближенных к реально применимым в криобиологии. Исследовали охлаждаемые в непрерывном режиме образцы бидистиллированной воды объемом 1 см^3 . Наряду с чистой водой изучалось переохлаждение солевого раствора Хэнкса, растворов глицерина, полиэтиленоксида с молекулярной массой 300 и желатинового геля. Специальной дегазации образцов перед замораживанием не проводили.

Охлаждение и озвучивание проб воды и растворов осуществляли в криоультразвуковой камере, схематически показанной на рис. 1. Рабочая ячейка камеры представляет собой стакан из дюралюминия, в верхнюю полость которого (диаметром 20 мм) заливалась проба, а снизу ко дну стакана, имеющему полуволновую толщину (3,7 мм), через кварцевый буфер подводился ультразвук от прибора УТП-1М. Стенки стакана охлаждались парами азота и отогревались электронагревателем. Температура измерялась медь-константановой термопарой, встроенной в дно стакана. Температура ячейки и скорость ее изменения контролировались цифровым вольтметром В7-21 и вычислительным устройством «Электроника ДЗ-28». Все пробы охлаждали от комнатной температуры со скоростью 3°C/мин . При

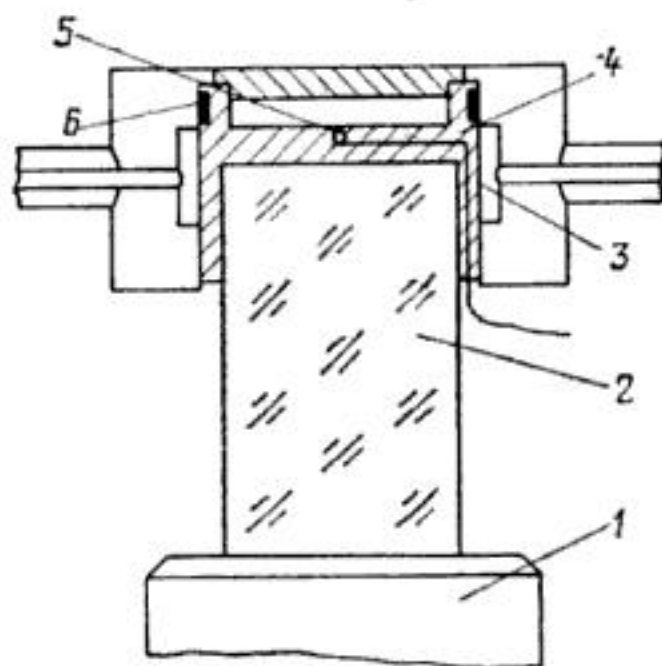


Рис. 1. Криоультразвуковая камера: 1 — излучатель ультразвука; 2 — кварцевый звукопровод; 3 — теплообменник; 4 — дюралюминиевый стакан; 5 — термопара; 6 — нагреватель.

этом градиент температур по дну ячейки практически отсутствовал, максимальная разность температур между дном ячейки и объемом образца при отсутствии ультразвука не превышала $1,8^{\circ}\text{C}$, а под его действием температурный градиент по объему образца существенно уменьшался за счет перемешивания жидкости акустическими потоками. Средняя интенсивность ультразвука в образце определялась с помощью измерителя мощности ИМУ-3. Так как его действие на нуклеацию может иметь пороговый характер, необходимо учитывать неоднородность поля в образце. Максимальная локальная интенсивность, измеренная с помощью миниатюрного датчика, превышала среднее значение приблизительно в 4 раза. Поскольку ультразвуковой преобразователь характеризуется определенной неоднородностью поля, мы в дальнейшем будем указывать средние значения интенсивности. Влияние на точность измерения температуры проверяли по точке

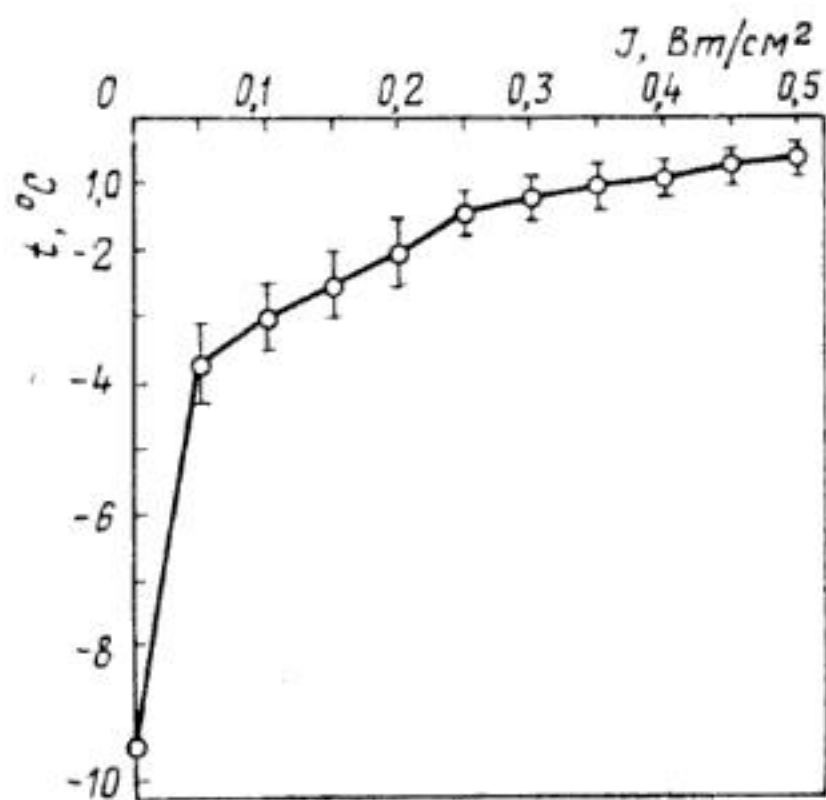


Рис. 2. Зависимость температуры начала кристаллизации воды от интенсивности ультразвука.

плавления воды. Погрешность измерений температуры, вносимая ультразвуком с интенсивностью $0,5 \text{ Вт/см}^2$, не превышала $0,5^{\circ}\text{C}$. Перед достижением 0°C озвучивали образцы в непрерывном режиме до температурного скачка, вызванного выделением скрытой теплоты плавления. Циклы охлаждения с воздействием ультразвука периодически чередовали с циклами охлаждения без него, каждый раз меняя пробу для устранения эффектов, связанных с многократным замораживанием одного и того же образца.

Кристаллизация образцов всегда начиналась у поверхности дна ячейки. Образцы воды, охлаждаемые без воздействия ультразвука, замерзали при температуре от $-7,2$ до $-11,2^{\circ}\text{C}$. Средняя температура начала кристаллизации составила $-9,5 \pm 1,6^{\circ}\text{C}$. При минимальной интенсивности, равной $0,05 \text{ Вт/см}^2$, во всех случаях происходила нуклеация льда при более высоких температурах. Среднее значение температуры начала кристаллизации в ультразвуковом поле интенсивностью $0,05 \text{ Вт/см}^2$ составило $-3,7 \pm 0,6^{\circ}\text{C}$. При увеличении интенсивности температура начала кристаллизации повышается. При интенсивности $0,4\text{--}0,5 \text{ Вт/см}^2$ почти полностью снимается переохлаждение воды, нуклеация начинается при температуре $-0,9 \div -0,6^{\circ}\text{C}$. Кривая зависимости температуры начала кристаллизации образцов воды объемом 1 см^3 от интенсивности ультразвука приведена на рис. 2.

Средняя температура начала кристаллизации раствора Хэнкса объемом 1 см^3 составила $-10,0 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$. Ультразвук с интенсивностью $0,05 \text{ Вт/см}^2$ вызывает начало льдообразования в растворе Хэнкса при температуре $-1,2 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$. Таким образом, присутствие в воде солей в 1 %-ной концентрации, содержащихся в растворе Хэнкса, практически не влияет на величину уменьшения переохлаждения в ультразвуковом поле по сравнению с чистой водой.

Были проведены также измерения температуры кристаллизации растворов Хэнкса с 12 %-ными добавками глицерина и ПЭО-300. Ультразвук с интенсивностью до $0,2 \text{ Вт/см}^2$ практически не оказывал влияния на нуклеацию льда в растворах глицерина и ПЭО-300. При дальнейшем увеличении интенсивности температура начала кристаллизации повышалась. Для сравнения в таблице приведены данные о температурах кристаллизации воды, раствора Хэнкса и растворов глицерина и ПЭО-300 без и под воздействием ультразвука с интенсивностью $0,35 \text{ Вт/см}^2$. Там же приведены данные о льдообразовании в желатиновом геле. Желатиновый гель полу-

чали непосредственно в рабочей ячейке криоультразвуковой камеры, заливая в нее 1 мл 5 %-ного раствора желатины в дистиллированной воде и выдерживая при температуре около 5 °С до образования студня. В желатиновом геле эффект уменьшения переохлаждения в ультразвуковом поле начинает проявляться при интенсивности около 0,1 Вт/см². При дальнейшем увеличении интенсивности температура кристаллизации в желатиновом геле возрастает быстрее, чем в растворах глицерина и ПЭО-300.

Влияние ультразвука на величину начального переохлаждения

Объект	Температура начала кристаллизации без ультразвука, °С	Температура начала кристаллизации в ультразвуковом поле, °С	Уменьшение переохлаждения, °С
Вода	9,5 ± 1,6	-1,0 ± 0,3	8,5
Раствор Хэнкса	-10,0 ± 1,5	-1,2 ± 0,3	8,8
Раствор Хэнкса с 12 % глицерина	-11,0 ± 1,2	-7,5 ± 0,8	3,7
Раствор Хэнкса с 12 % ПЭО-300	-10,9 ± 1,3	-7,3 ± 1,3	3,1
Желатиновый гель	-8,1 ± 0,7	-2,8 ± 0,5	5,3

Механизм взаимодействия ультразвука с переохлажденной жидкостью может быть связан с кавитацией. При столь малых интенсивностях, как 0,05—0,5 Вт/см² на частоте около 1 мГц, возникновение неустойчивой кавитации с интенсивным захлопыванием паровых полостей маловероятно. Однако в таких условиях возможно существование стабильной кавитации, связанной с нелинейными колебаниями пузырьков газовой фазы. Такие пузырьки могут служить источником значительных локальных неоднородностей ультразвукового поля, излучая волны с давлением, во много раз превосходящим давление в звуковой волне, возбуждающей колебания пузырька [12]. Молекулы переохлажденной воды, взаимодействуя с колеблющимися пузырьками, могут приобрести достаточно энергии для структурной перестройки в зародыш льда размером выше критического [10]. Другим возможным механизмом является изменение поверхностного натяжения на границе жидкость — кристалл в ультразвуковом поле, обусловленное силами вязкого трения [1]. Так как работа образования критического зародыша пропорциональна кубу коэффициента поверхностного натяжения, то даже незначительные его изменения должны повлиять на температуру нуклеации.

Полученные в работе результаты позволяют рассматривать ультразвуковое воздействие как метод уменьшения начального переохлаждения замораживаемых водных систем, которое даже при малой интенсивности позволяет в значительной степени снять переохлаждение при замораживании биологических образцов без криозащитных веществ. Присутствие криопротекторов в замораживаемых образцах снижает влияние ультразвука на величину начального переохлаждения. Результаты работы по снятию переохлаждения в системах без криопротекторов нашли подтверждение в экспериментах по замораживанию клеток в ультразвуковом поле [9].

1. Абрамов О. В., Теумин И. И. Кристаллизация металлов // Физические основы ультразвуковой технологии. — М.: Наука, 1970. — С. 427—514.
2. Бронштейн В. Л., Розанов Л. Ф. Начальное переохлаждение как фактор повреждения при замораживании клеточных суспензий // Криобиология и криомедицина. — 1977. — Вып. 3. — С. 26—29.
3. 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.
4. Вишневский В. И., Марющенко А. В. Влияние ультразвуковых колебаний на кристаллизацию спермы быков // Криобиология и криомедицина. — 1975. — Вып. 1. — С. 48—51.
5. Вишневский В. И., Скорняков Б. А. Низкотемпературное консервирование спермы сельскохозяйственных животных // Актуальные проблемы криобиологии. — Киев: Наук. думка, 1981. — С. 248—280.
6. Данилов В. И. Кристаллизация органических веществ в ультразвуковом поле // Строение и кристаллизация жидкости. — Киев: Изд-во АН УССР, 1956. — С. 284—292.

7. Новиков А. Н., Вишневский В. И., Душейко А. Г. Влияние ультразвуковых колебаний на первичное зародышеобразование льда в биологических растворах // Криобиология и криомедицина.— 1982.— Вып. 10.— С. 19—22.
8. Рикберг А. Б. Усиление криповреждений опухолей с помощью ультразвука малой интенсивности. (Экспериментальное исследование): Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Киев., 1982.— 143 с.
9. Рикберг А. Б., Есьман С. С. Влияние ультразвука на криповреждения клеток.— Киев, 1984.— 90 с. (Препринт / ИФ АН УССР, № 31).
10. Розенталь О. М. Вопросы образования льда в воде и растворах. I. Перестройка структуры воды и льдозарождение под действием внешних факторов // Журн. физ. химии.— 1972.— 46, № 1.— С. 191—192.
11. Соколов И. Т. Воздействие ультразвуков на переохлажденную воду // Журн. техн. физики.— 1938.— 8, вып. 10.— С. 901—902.
12. Эльпинер И. Е. Биофизика ультразвука.— М.: Наука, 1973.— 384 с.
13. Bhadra T. C. Induction of freezing of bulk samples of supercooled water by physical stimuli // Indian J. Phys.— 1968.— 42, N 1.— P. 91—102.
14. Turner C. F., Van Hook A. The effect of ultrasonic irradiation on the formation of colloid sulfur and ice // J. Colloid. Sci.— 1950, 5.— N 3.— P. 315—316.

Институт физики АН УССР,
г. Киев

Получено 11.05.84

УДК 57.043

Л. М. Межевикина, И. В. Крастс, Б. Н. Вепринцев

ЗАМОРАЖИВАНИЕ СПЕРМЫ МОРСКИХ ЕЖЕЙ ДО ТЕМПЕРАТУРЫ — 196 °С

Для создания низкотемпературных банков необходимы эффективные методы криоконсервации половых и соматических клеток животных различных систематических групп. Достижения современной биологии позволяют уже сейчас получить живых животных из клеток, хранившихся многие годы в замороженном состоянии [2,3].

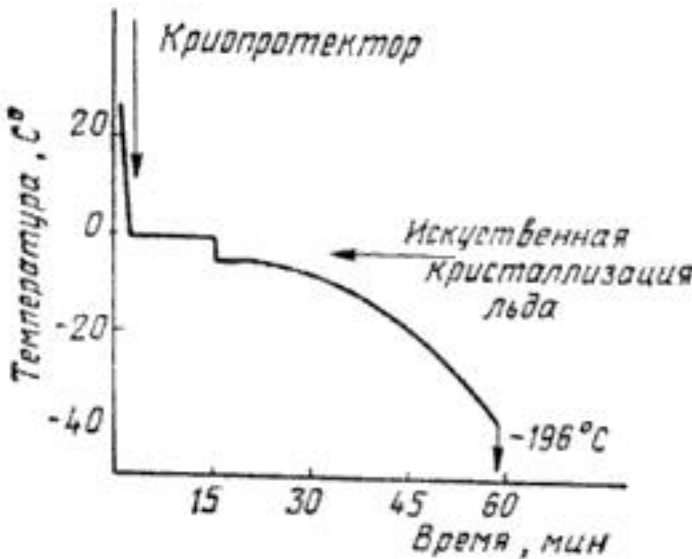
Для разработки метода криоконсервации нам представлялось привлекательным работать на морских ежах. Это классический объект биологических исследований. Процессы оплодотворения и развития зародыша хорошо изучены. В период размножения легко получить в необходимом количестве половые продукты. Развитие оплодотворенной икры проходит буквально на глазах: через 60 с вокруг отдельных клеток начинают формироваться оболочки оплодотворения. Последующее развитие икры также не занимает много времени и легко контролируется до тех пор, пока свободноживущие личинки достигнут стадии плутеуса (48 ч инкубирования в морской воде при 20 °С). Это позволяет быстро оценивать результаты отдельных опытов, выявлять действие криопротекторов и режимов замораживания и отогрева.

Работа проведена на морских ежах *Strongylocentrotus nudus* и *Strongylocentrotus intermedius* в сезон размножения (август — сентябрь 1983 года) на биологической станции «Витязь» ДВНЦ АН СССР.

Самцов и самок морских ежей, не имеющих внешне выраженного полового диморфизма, различали по цвету выделяющихся в воду половых продуктов после раздражения поверхности тела животных током силой 20 мА. Отобранных таким способом самцов вскрывали и из нескольких семенников брали «сухую» сперму [1]. Икру получали не прибегая к вскрытию животных. Для этого самкам в перивисцеральное пространство вводили 0,5—1,0 мл 0,5 М раствора KCl, иницирующего нерест. Икру собирали в стеклянный стаканчик, заполненный морской водой. Для удаления KCl клетки 2—3 раза промывали свежей морской водой. Качество половых продуктов оценивали после искусственного осеменения. Для этого в пластиковые чашки Петри (35 мм) к 2,0 мл суспензии яйцеклеток ($3—5 \times 10^3$ кл/мл) добавляли 0,1 мл спермы, разбавленной 1 : 10 000 морской водой. Через 45—60 с

начали образовываться оболочки оплодотворения. Под бинокулярной лупой для опытов отобрали половые продукты с оплодотворяющей способностью выше 95 % и нормальным типом дробления.

В стеклянные ампулы из предварительно закаленного пирекса (10 × 70 мм) или в специальные пластиковые пробирки с плотно закрывающимися крышками (10 × 35 мм) помещали по 0,02 мл «сухой» спермы. В качестве криопротекторов использовали растворы 1,0 М глицерина, 1,5 М диметилсульфоксида (ДМСО) и 1,5 М этиленгликоля. Для предотвращения осмотического шока криопротекторы добавляли постепенно в пять этапов по 0,1 мл с интервалом 3—5 мин. Эквilibрацию спермы до начала замораживания проводили при 0 °С в течение 15 мин. Для замораживания применяли программную установку конструкции И. В. Крастса, позволяющую изменять температуру охлаждения со скоростью 0,1—10 °С/мин. Режим замораживания спермы морских ежей показан на рисунке. После эквilibрации с криопротектором образцы помещали в камеру для замораживания и при температуре —7 °С инициировали кристаллизацию льда прикосновением охлажденного в жидком азоте пинцета к наружной стенке ампулы. Температуру до —15 °С снижали со скоростью 0,3—0,5 °С/мин, затем скорость охлаждения постепенно повышали до 1—1,5 °С/мин. После охлаждения до —40÷—45 °С образцы переносили в жидкий азот. Отогрев проводили в водяной бане при 20 °С со скоростью 20—25 °С/мин. Криопротектор удаляли путем постепенного разбавления размороженной спермы свежей морской водой (1 ч при 20 °С). Конечная концентрация криопротектора в среде составляла менее 10⁻⁶ М. Инкубирование оплодотворенных яйцеклеток проводили при температуре 20 °С. Количество развившихся зародышей подсчитывали через 1,5—2,0 ч после оплодотворения на стадии 2—4 бластомеров и через 6—7 ч на стадии бластулы. Более поздние стадии развития учитывали через 48 ч, когда личинки достигали стадии плутеуса. Число опытов в каждой серии экспериментов равнялось 5—6. Полученные результаты статистически обрабатывали по методу Стьюдента.



Режим замораживания спермы морских ежей.

Результаты исследования оплодотворяющей способности «сухой» спермы *St. nudus* при 4 °С представлены в табл. 1. Видно, что сперма морских ежей в течение 3-х дней имела высокую способность к оплодотворению (более 90 %). Снижение активности до 60 и 30 % наблюдали соответственно на 4-й и 5-й день. Более длительное хранение приводило к потере способности к оплодотворению.

Таблица 1. Оплодотворяющая способность «сухой» спермы *Strongylocentrotus nudus*, хранившейся при 4 °С

Время, ч	Количество оплодотворенных яйцеклеток	Количество яйцеклеток, развившихся до стадии бластулы	%
24	480	466	97 ± 3
48	614	567	91 ± 4
72	520	480	91 ± 2
96	588	340	62 ± 1
120	334	95	29 ± 15
144	522	42	8 ± 4

При медленном замораживании спермы *St. intermedius* и *St. nudus* выявились небольшие видовые различия по степени устойчивости к холоду. Сперма *St. intermedius* без криопротектора выдерживала снижение температуры до —30 °С, а *St. nudus* при тех же условиях — всего до —20 °С. После отогрева у обоих видов восстанавливалось менее 10 % сперматозоидов, способных к оплодотворению. Применение криопротекторов позволило значительно повысить сохранность клеток.

Таблица 2. Действие криопротекторов на оплодотворяющую способность спермы *Strongylocentrotus nudus* (количество зародышей, развившихся до стадии бластулы, %)

Продолжительность эквilibрации, мин	Криопротектор					
	1,5 М ДМСО		1,5 М этиленгликоль		1,0 М глицерин	
	0 °C	20 °C	0 °C	20 °C	0 °C	20 °C
15	86 ± 6	75 ± 7	92 ± 6	93 ± 1	61 ± 7	45 ± 2
30	90 ± 2	84 ± 6	93 ± 4	92 ± 3	—	—
60	91 ± 4	64 ± 6	91 ± 1	93 ± 0,5	—	—

Результаты замораживания спермы с различными криопротекторами представлены в табл. 3. Оплодотворяющую способность размороженной спермы оценивали на всех этапах замораживания: после эквilibрации при 0 °C, медленного охлаждения до —20 и —40 °C и быстрого охлаждения до —196 °C. Лучшими криозащитными свойствами обладали 1,5 М растворы этиленгликоля и ДМСО. После отогрева от —196 °C криоконсервированная с этиленгликолем сперма сохраняла весьма высокую способность к оплодотворению (более 90 %). Яйцеклетки, оплодотворенные отмытой от криопротектора спермой, нормально развивались и через 48 ч достигали, как и в контроле, стадии плутеуса.

Сперма другого ежа *St. intermedius* также хорошо выдерживала замораживание до температуры жидкого азота в присутствии 1,5 М этиленгликоля. Результаты замораживания с 1,5 М ДМСО были несколько хуже, однако около 50 % яйцеклеток после оплодотворения развивалось до стадии плутеуса. Замораживание с 1 М глицерином дало отрицательные результаты. После отогрева от —20 °C и —40 °C и удаления криопротекторов сохранялось всего 14 % клеток, а после охлаждения до —196 °C наступала их гибель. Медленное снижение температуры до —40 °C и последующее быстрое охлаждение до —196 °C оказалось благоприятным для изученных видов морских ежей. После отогрева довольно быстро восстанавливалась их способность к оплодотворению. Сперматозоиды оставались биологически полноценными и обеспечивали нормальное развитие икры до стадии плутеуса.

1. Бузников Г. А., Подмарев В. К. Морские ежи *Strongylocentrotus dröbachiensis*, *St. nudus*, *St. intermedius* // Объекты биологии развития. — М.: Наука, 1975. — С. 188—216.
2. Вепринцев Б. Н., Ротт Н. Н. Проблема сохранения генофонда. — М.: Знание, 1985. — 57 с.
3. Veprintsev B. N., Rott N. N. Conserving genetic resources of animal species // Nature. — 1979. — 280, N 5724, P. 633—634.

Институт биологической физики АН СССР,
г. Пущино

Получено 18.04.85

личению аномалий развития. ДМСО был более токсичным при комнатной температуре, чем при 0 °C. Глицерин оказался абсолютно непригодным для защиты этих клеток. После 15 мин эквilibрации при 0 °C и при 20 °C способность к оплодотворению снижалась соответственно до 60 и 45 %. При оплодотворении отмытой от глицерина спермой большинство яйцеклеток развивалось до стадии 2—4-х бластомеров, после чего дробление останавливалось или шло аномально.

Таблица 3. Оплодотворяющая способность спермы *Strongylocentrotus nudus* после охлаждения в присутствии криопротекторов (количество зародышей, развившихся до стадии бластулы, %)

Криопротектор	Температура охлаждения			
	0 °C	—20 °C	—40 °C	—196 °C
1,5 М этиленгликоль	93 ± 4	87 ± 4	89 ± 10	92 ± 6
1,5 М ДМСО	86 ± 6	54 ± 3	49 ± 2	47 ± 8
1,0 М глицерин	60 ± 7	14 ± 2	1 ± 0,9	0

Б. А. Скорняков, Т. П. Говоруха, Е. Ф. Конейка

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРНОГО И ОСМОТИЧЕСКОГО ШОКА НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ СПЕРМИЕВ КАРПА *CYPRINUS CARPIO L. (CYPRINIDAE)*

Решение проблемы дальнейшего совершенствования методов низкотемпературного консервирования спермиев рыб, в частности карпа, предусматривает изучение их осмотической и холодовой устойчивости. Эти характеристики определяются прежде всего проницаемостью клеточных мембран для воды и ионов, которая играет ведущую роль во внутриклеточном кристаллообразовании и сохранности клеток при замораживании. Следовательно, информация об осмотической и холодовой резистентности позволит целенаправленно оптимизировать состав криоконсервирующей среды и режима охлаждения.

Известно, что изолированные клетки растительных и животных организмов, а также одноклеточные организмы, повреждаются или гибнут после резкого охлаждения на 17—40 °С, тогда как медленное снижение температуры в этих же пределах является для них относительно безвредным [3, 4, 8, 11, 12]. Установлено, что быстрое охлаждение спермиев млекопитающих от температуры тела до 5 °С вызывает их повреждение и гибель значительного количества, а медленное действует значительно слабее [2, 7]. Показано также, что спермии чувствительны к осмотическим колебаниям. Так, резкое изменение концентрации осмотически активных веществ в суспензии при постоянной температуре на 220 мосм снижает выживаемость в 2 и более раза [5]. Под действием температурного и осмотического шока изменяются физико-химические свойства спермиев сельскохозяйственных животных и нарушается их ультраструктура, что проявляется в просветлении органелл, отслоении мембран и в разрушении клеточных структур [9].

Целью настоящей работы явилось изучение изменений ультраструктуры спермиев карпа *Cyprinus carpio L. (Cyprinidae)*, подвергнутых действию температурного и осмотического шока.

Исследовали сперму карпа *Cyprinus carpio L.* В качестве криоконсерванта использовали среду (4,05 мл 0,2М *трис*-HCl буфера, 150 мг липида, 150 мг маннита, мл H₂O, 0,95 мл этиленгликоля), которую в объеме 0,55 мл добавляли к 0,45 мл спермы. Для достижения эффекта температурного шока суспензию спермиев в объеме 1 мл в тонкостенном стакане быстро охлаждали от 25—30 °С погружением в воду со льдом на 20 мин при непрерывном встряхивании. Осмотический шок вызывали добавлением к 0,9 мл суспензии спермиев 1,1 мл консервирующей среды и энергичным встряхиванием. Образцы для электронно-микроскопического исследования готовили по следующей методике: суспензию интактных спермиев центрифугировали при 3000 об/мин в течение 5 мин, затем сливали надосадочную жидкость и осадок фиксировали при 4 °С сначала в 5 %-ном глутаральдегиде в течение 2 ч, затем 1 ч в 2 %-ном растворе OsO₄. Обезвоживание проводили в ряду растворов этанола возрастающей концентрации (от 50° до абсолютного). Образцы заключали в эпон-аралдитовую смесь. Полимеризацию блоков проводили при 60 °С в течение 24 ч. Срезы, изготовленные на ультрамикротоме УМТП-3М, контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца по Рейнольдсу и изучали в микроскопе ЭМВ-100А ультраструктуру головки, шейки и хвоста). Результаты выражали количественно — числом поврежденных элементов на 100 изученных срезов. Анализ полученных данных проводили с оценкой критерия доверительного интервала [10].

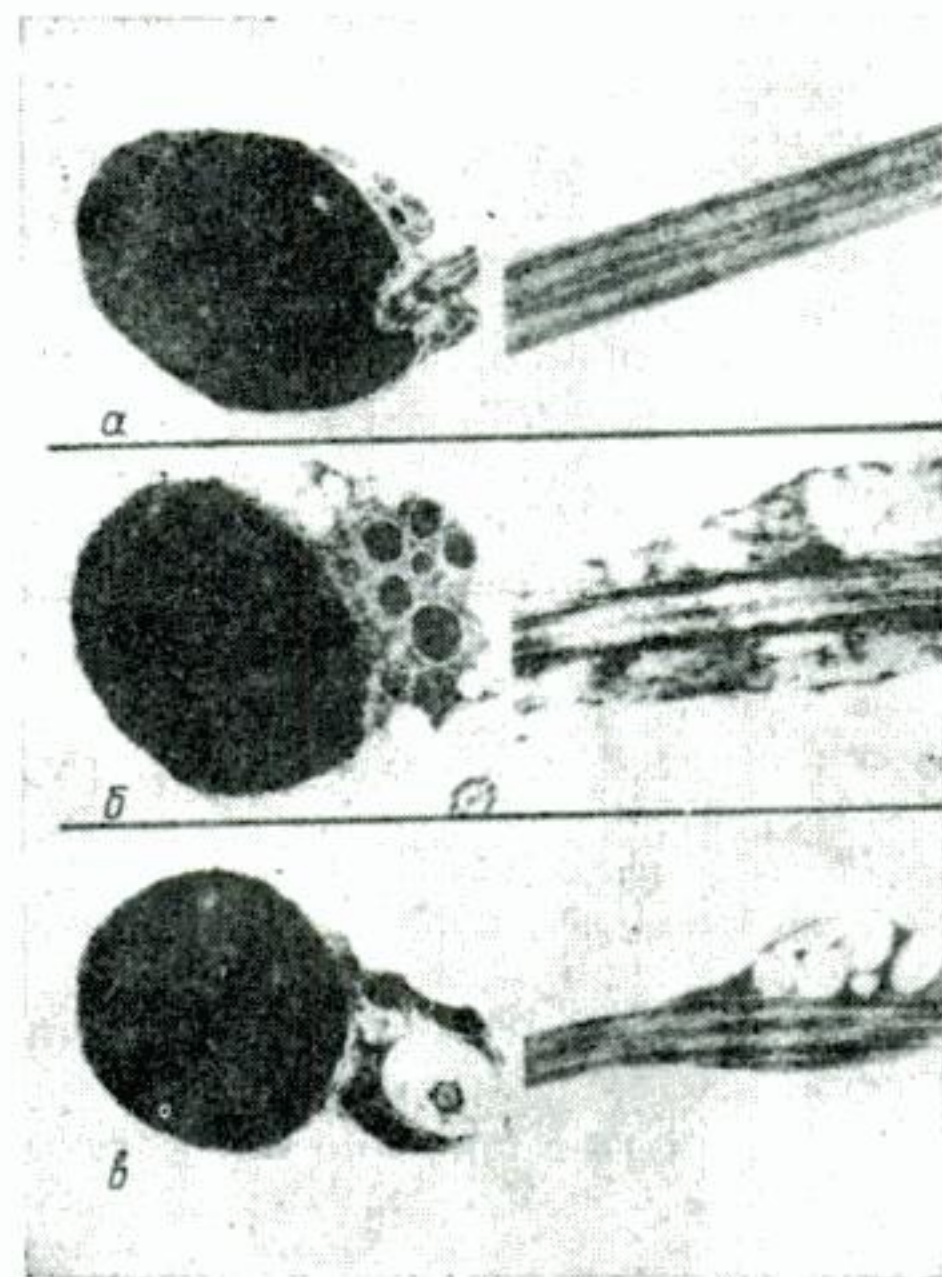
Спермии, разбавленные криоконсервантом (рисунок, а), имеют округлую головку с равномерной плотностью мелкозернистого хроматина. Непрерывная цитолемма покрывает головку, среднюю часть и хвостовой отдел спермия. Митохондрии располагаются в области шейки, образуя структуру

в виде воротничка. Они имеют овальную форму и содержат электронноплотный, гомогенный матрикс. Проксимальная центриоль в виде сферического комплекса субъединиц погружена в углубление в основании ядра, дистальная центриоль в виде кольца располагается в средней части спермия. Из проксимальной центриоли выходит осевой комплекс фибрилл средней части

и хвоста спермия. Осевой комплекс состоит из двух тонких центральных фибрилл и девяти пар фибрилл, расположенных по кругу в периферийном слое. Следовательно, в проведенных экспериментах ультраструктура активизированных разбавлением спермиев соответствует ультраструктуре intactных клеток.

После температурного шока наблюдались изменения цитолеммы головки, которая стала набухшей и потеряла четкость контуров. Область шейки приобрела неправильную форму, в которой беспорядочно располагались набухшие митохондрии, плотность содержимого некоторых из них была неоднородной. В разных местах шейки обнаруживались многочисленные пузырьковидные образования, которые встречались и под цитолеммой головки. Цитоплазма приобрела грубую зернистость. Наблюдались отслоения мембран хвоста с образованием вакуолей. В некоторых клетках обнаруживались набухание и просветление содержимого хвоста (рисунк, б).

После осмотического шока изменения были почти такими же,



Ультраструктура спермиев карпа: а — после разбавления криоконсервантом: головка ($\times 53\,300$), фрагмент жгутика ($\times 86\,600$), б — после температурного шока: головка ($\times 53\,300$), фрагмент жгутика ($\times 86\,600$), в — после осмотического шока: головка ($\times 53\,300$), фрагмент жгутика ($\times 86\,600$).

как после температурного шока. В большей части спермиев нарушалась четкость изображения цитолеммы головки, в некоторых местах наблюдалась ее деструкция. На протяжении головки, шейки и хвоста обнаруживались новообразования в виде вакуолей и пузырьков. У части клеток полости образовались вокруг проксимальной центриоли. В области шейки отмечалась неравномерная зернистость цитоплазмы. Плотность содержимого митохондрий была разной, разрушались мембраны хвоста, набухал цитоплазматический чехол (рисунк, в).

Таким образом, действие температурного и осмотического шока на ультраструктурном уровне характеризуется сходными проявлениями, а именно разрушением цитолеммы, образованием неоднородной структуры цитоплазмы в шейке спермия, появлением пузырьковидных полостей. Нарушения в области тела и хвоста обнаруживались в виде отслоения и набу-

Сравнительная характеристика количества поврежденных спермиев карпа при температурном и осмотическом шоке, %

Элементы морфологии спермия	В исходном состоянии	После температурного шока	После осмотического шока	R		
				I—II	I—III	II—III
Головка	6	29	66	0,05	0,05	0,05
Шейка	32	36	96	0,05	0,05	0,05
Жгутик	21	26	95	0,05	0,05	0,05

хания цитолеммы. Как следует из таблицы, в трёх группах клеток (интактных, после температурного и осмотического шока) количество повреждений головки, шейки и хвоста в норме значимо отличается от повреждений, обусловленных температурным и осмотическим шоком. Частота повреждений структуры спермиев при температурном и осмотическом шоке не имеет значимых различий ($P > 0,05$). По характеру и частоте повреждений температурный и осмотический шок имеют сходный механизм действия. Изменения в цитолемме, вероятно, осмотически обусловлены.

1. Белоус А. М., Бондаренко В. А., Бондаренко Т. П. Молекулярные механизмы криоповреждения биомембран // Итоги науки и техники. Сер. Биофизика.— 1978.— № 9.— С. 80—113.
2. Кузнецова Н. А., Милованов В. К., Нейман О. Ф. и др. Искусственное осеменение рогатого скота.— М.: Сельхозгиз, 1932.— 528 с.
3. Милованов В. К., Соколовская И. П. Теория холодового удара живчиков млекопитающих // Докл. ВАСХНИЛ.— 1959.— № 8.— С. 93—105.
4. Осташко Ф. И. О природе холодового удара живчиков // Искусственное осеменение сельскохозяйственных животных.— Харьков: Прапор, 1963.— С. 22—40.
5. Осташко Ф. И. Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей.— Киев: Урожай, 1978.— 251 с.
6. Пушкарь Н. С., Белоус А. М. Актуальные проблемы криобиологии.— Киев: Наук. думка, 1981.— 607.
7. Смирнов И. В. К вопросу о холодовом ударе спермиев // Повышение продуктивности сельскохозяйственных животных.— Киев: Урожай.— 1961.— С. 61—70.
8. Смит О. Биологическое действие замораживания и переохлаждения.— М.: Изд-во иностр. литература, 1963.— 253 с.
9. Скорняков Б. А. Биофизические и ультраструктурные изменения в спермиях производителей сельскохозяйственных животных при воздействии температурного шока // Материалы IV Всесоюз. конф. молодых ученых по генетике и разведению сельскохозяйственных животных.— Л.: Б. и., 1973.— С. 93—97.
10. Сепетлиев Д. Статистические методы в научных медицинских исследованиях М.: Медицина, 1968.— 414 с.
11. Keilin D. The lecuwehock lecture. The problem of anabiosis or latent life: current concept // Proc. Roy. Soc. B.—1959.— 11, N 4.— P. 149—191.
12. Sherman J. M., Cameron G. M. Lethal environmental factors within natural range of growth // J. Bacteriol.— 1934.— 27, N 7.— P. 221—223.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР,
г. Харьков

Получено 25.06.85

УДК 576.8.093:576.8.095

Т. М. Сидякина, Е. В. Кузнецова, М. Ю. Чумакова

ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И БИОХИМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES VINI* ПРИ СУБЛИМАЦИОННОМ ВЫСУШИВАНИИ И КРИОКОНСЕРВАЦИИ

Методы консервации дрожжей разнообразны и подробно описаны [3, 8, 9]. Однако задача разработки оптимальных режимов консервации, обеспечивающих высокую жизнеспособность и стабильность исходных свойств при длительном хранении различных видов дрожжей, обладающих ценными технологическими свойствами, по-прежнему остается актуальной. Наиболее изучены дрожжи вида *Saccharomyces cerevisiae*, исследованию свойств которых при сублимационном высушивании, *L*-высушивании и криоконсервации посвящено значительное число работ [4, 10, 11]. Практически не изучены при консервации этими методами дрожжи вида *Saccharomyces vini*, в особенности производственные штаммы.

Целью настоящей работы являлось исследование влияния режимов сублимационного высушивания и криоконсервации на жизнеспособность и технологические свойства культур винных дрожжей в процессе хранения.

Сублимационное высушивание, или лиофилизацию, успешно применяют для консервации дрожжей уже в течение трех десятилетий. Однако многие неспорообразующие культуры плохо переносят режимы лиофилизации и имеют низкую жизнеспособность, которая падает при хранении даже при 4 °С [2, 8]. Известно, что падение жизнеспособности высушенных препаратов зависит от температуры хранения и подчиняется уравнению Аррениуса [5, 7]:

$$y_t = y_0 \cdot e^{-kt}, \quad (1)$$

где y_t — титр жизнеспособных клеток в момент времени t , y_0 — исходный титр жизнеспособных клеток (при $t = 0$), t — время наблюдений, $K = f(T)$ — коэффициент Аррениуса, являющийся линейной функцией температуры хранения. Для любой температуры хранения коэффициент K может быть определен по формуле:

$$K_T = \frac{\log_{10} y_0 - \log_{10} y_t}{t}. \quad (2)$$

Зная коэффициент для 3-х различных температур хранения и построив зависимость $K = f(T)$, можно определить для любой температуры возможное время хранения, в течение которого титр жизнеспособных клеток упадет до низшего порогового значения. Это послужило основой для использования «теста на ускоренное хранение» при повышенных температурах для определения возможного времени хранения [5, 7].

Криоконсервацию, или хранение при температуре жидкого азота —196 °С, начали использовать для консервации микроорганизмов, в том числе и дрожжей, сравнительно недавно [9, 10, 11]. При криоконсервации сохраняется значительно большее число жизнеспособных клеток, чем при сублимационном высушивании. Для успешной криоконсервации большинства неспорообразующих культур необходимо использовать программное замораживание с подбором наиболее эффективных криопротекторов и оптимальных скоростей охлаждения [3].

Исследования проводились с четырьмя штаммами дрожжей вида *Saccharomyces vini*, утратившими способность к спорообразованию: В-41 (хересная раса), ВР-76-12 (беспенная раса), 21 (шампанская), ВКМ У-562 и Массандра III ВКМ У-1842. Перед консервацией культуры выращивали на 7 °Б сусло-агаре при температуре 25 °С в течение трех суток. Суспензию дрожжей с концентрацией клеток 10^9 — 10^{10} кл/мл приготавливали путем смыва клеток с поверхности агара защитными средами и криопротекторами, разливали по 0,2 мл в стеклянные ампулы из нейтрального стекла и подвергали лиофилизации и криоконсервации.

Ллиофилизацию осуществляли на центробежно-сублимационной установке фирмы «Эдвардс» (Англия) на трех защитных средах: СЖА (10 % сахарозы, 1,5 % желатины, 0,1 % агар-агара), ГДИ (2 % глютамата натрия; 5 % декстрина, 7,5 % инозита, рН = 7) и 12 %-ном растворе сахарозы. Высушивание проводили в течение 4 ч на первичной сушке 30Р1 при остаточном вакууме 0,1 мм рт. ст., температуре рефрижератора — 45 °С и температуре сублиматора +22 °С. На вторичной сушке 30S1 культуры досушивались при комнатной температуре и в остаточном вакууме 0,04 мм рт. ст. в течение 18 ч, затем ампулы с культурами запаивались. Ллиофилизированные препараты с остаточной влажностью около 3 % хранили при температуре 4 °С без доступа света.

Криоконсервация дрожжей проводилась как ультрабыстрым способом, путем непосредственного погружения в жидкий азот, так и с использованием предварительного программного замораживания на замораживателе R 200/201R фирмы «Планер» (Англия) и замораживателе ЭПБ производства Института проблем криобиологии и криомедицины АН УССР. Для получения максимального титра жизнеспособных клеток дрожжей при криоконсервации были проведены исследования оптимальных скоростей охлаждения и концентраций криопротекторов. Замораживание дрожжей на замо-

раживателе R200/201R осуществляли со скоростью 0,1 °C/мин, 1 °C/мин, 20 °C/мин и 39 °C/мин до температуры —100 °C, после чего культуры погружали в жидкий азот (программа 2). В качестве криопротекторов использовали 10 %, 20 % и 40 %-ные растворы глицерина в дистиллированной воде. На замораживателе ЗПБ использовали двухступенчатое охлаждение по двум программам: 1) программа 1 — охлаждение от комнатной температуры до 10 °C со скоростью $v_1 = 1$ °C/мин, от —10 °C до —140 °C со скоростью $v_2 = 10$ °C/мин; 2) программа 9 — охлаждение от комнатной температуры до —10 °C со скоростью $v_1 = 10$ °C/мин, от —10 °C до —140 °C со скоростью $v_2 = 30$ °C/мин. После достижения температуры —140 °C ампулы с замороженными культурами дрожжей опускали в жидкий азот и хранили при —196 °C. Для восстановления дрожжей после криоконсервации использовали быстрое оттаивание в теплообменном размораживателе РТ при температуре +37 °C с покачиванием в течение 1 мин для улучшения теплообмена.

Таблица 1. Жизнеспособность дрожжей после лиофилизации

Штаммы дрожжей	Защитные среды			
	СЖА	ГДИ	12 % сахара-роза	Винное сусло
Массандра III	13,3	33,5	—	0,3
21	4,0	12,4	—	0,06
BR-76-12	11,5	4,0	19,8	—
B-41	9,0	22,1	17,0	—

Жизнеспособность дрожжей после консервации и при хранении контролировали методом разведения и посева на чашки Петри с последующим подсчетом числа выросших колоний. Для контроля ставили по 3 опыта в каждой серии экспериментов. Жизнеспособность дрожжей до консервации принималась за 100 %. Титры жизнеспособных клеток в процентах к контролю были получены как средние значения трех опытов.

Для лиофилизированных культур дрожжей проводили «тесты на ускоренное хранение» при температурах 26 °C и 37 °C [5, 7] с целью определения возможного времени хранения при 4 °C.

После хранения дрожжей в течение 6 мес методами сублимационного высушивания и криоконсервации по общепринятым в виноделии методам [1] изучалась сбраживающая способность культур дрожжей. Были исследованы три варианта культуры Массандра III, замороженной по программе 1 в дистиллированной воде и в 20 %-ном растворе глицерина и по программе 9 в 10 %-ном растворе глицерина, а также один вариант культуры, сохраняющейся в лиофилизированном состоянии на среде ГДИ. Сбраживающая способность исследуемых вариантов культуры Массандра III определялась по сбраживанию виноградного сусла сахаристостью 18,5 % в колбах с бродильными затворами. По окончании брожения определяли основные продукты брожения: спирт, летучие кислоты, остаточный сахар, глицерин, альдегиды, эфиры.

Результаты исследования сохранности штаммов винных дрожжей после лиофилизации (табл. 1) свидетельствуют о том, что их жизнеспособность сильно варьирует и составляет от 4 до 33 %, что обусловлено различной чувствительностью штаммов к сублимационному высушиванию. На рис. 1 представлены данные о влиянии различных защитных сред на жизнеспособность высушенной культуры BR-76-12 при хранении в течение 5 мес при температуре 4 °C. Несмотря на то, что 12 %-ный раствор сахарозы

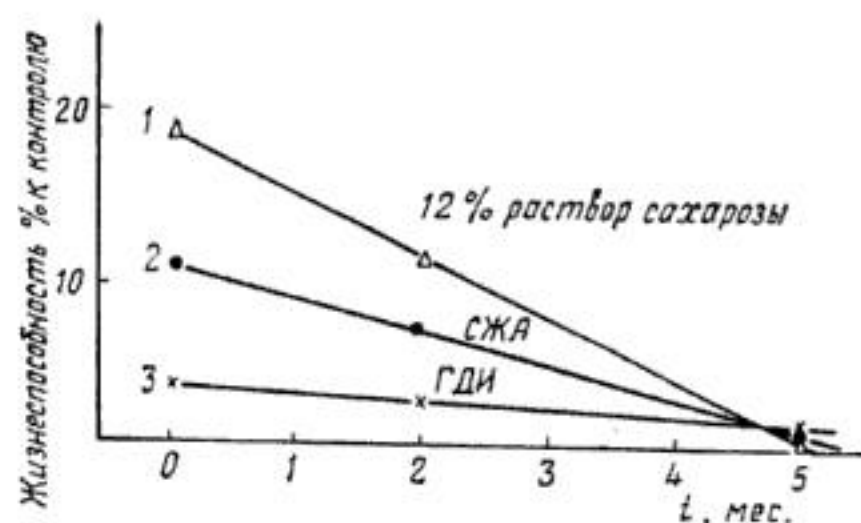


Рис. 1. Влияние защитных сред на жизнеспособность лиофилизированной культуры BR-76-12 при хранении в течение 5 мес при 4 °C (СЖА: 10 % сахарозы; 1,5 % желатины; 0,1 % агар-агара. ГДИ: 2 % глютамата натрия, 5 % декстрина, 7,5 % инозита, $pH=7$).

обеспечивает максимальную жизнеспособность культуры после лиофилизации, при длительном хранении в ней происходит сильное падение титра жизнеспособных клеток дрожжей.

На рис. 2а, б, в, г в виде графиков зависимости жизнеспособности от времени $\log_{10} y = f(t)$ представлены результаты «теста на ускоренное хра-

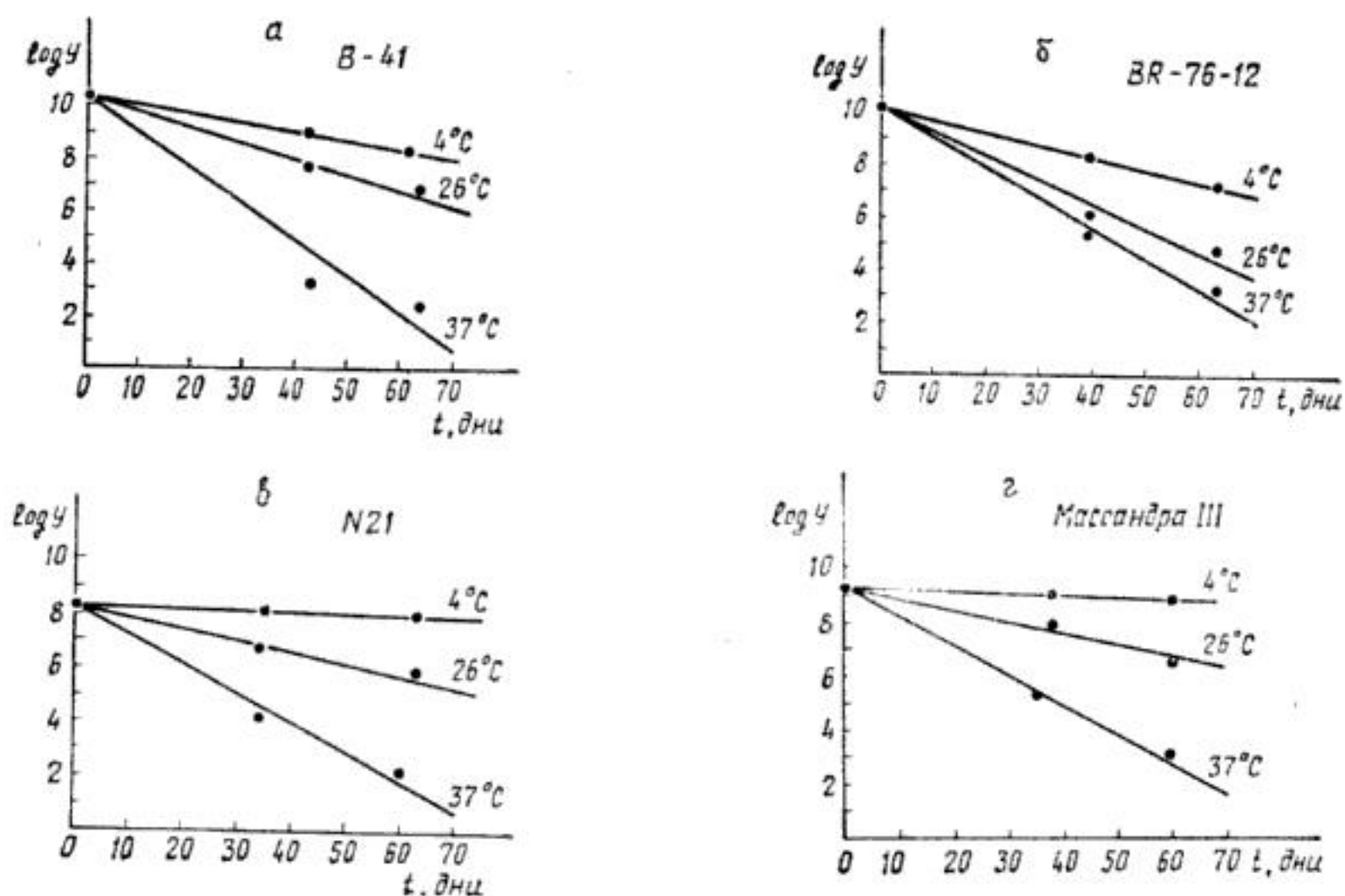


Рис. 2. Результаты «теста на ускоренное хранение» культур: а — В-41; б — BR-76-12 в — 21 (шампанская) ВКМУ-562; г — Массандра III.

нение» для четырех штаммов винных дрожжей, хранившихся при температурах 4, 26 и 37 °C в течение 2-х мес. Из анализа данных о падении жизнеспособности высушенных дрожжей при повышенных температурах следует что для всех четырех штаммов гарантированное время хранения при 4 °C не

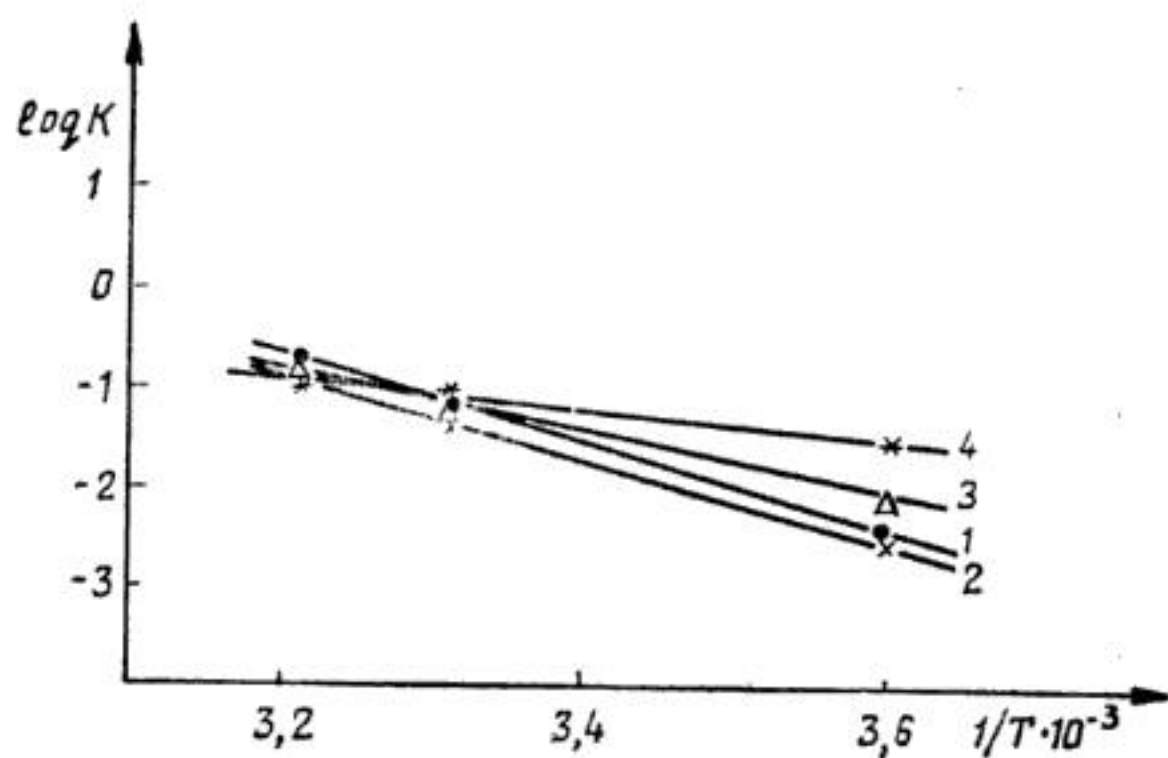


Рис. 3. Зависимость коэффициента K уравнения Аррениуса от температуры: 1 — Массандра III; 2 — 21; 3 — BR-76-12; 4 — В-41.

превышает 3-х лет (титр жизнеспособных клеток упадет до 10^2 кл/мл, что еще гарантирует восстановление культур). На рис. 3 представлены результаты расчетов коэффициента K уравнения Аррениуса. Экспериментальные значения $\log K = f(1/T \cdot 10^3)$, соответствующие использованным температурам 4, 26 и 37 °C, легли на одну прямую, что подтверждает возможность применения теста для прогнозирования времени хранения исследо-

ванных штаммов дрожжей [5, 7]. По этому графику можно оценить коэффициент K для любой температуры хранения.

На рис. 4 в виде графиков представлены данные о влиянии различных концентраций криопротектора (глицерина) и скоростей охлаждения на жизнеспособность культуры В-41 при криоконсервации, полученные после хранения при -196 °C в течение 6 мес в 10 %- , 20 %- и 40 %-ных растворах глицерина. Для сравнения на рис. 4 показаны также данные, которые были получены при замораживании клеток дрожжей в дистиллированной воде.

Таблица 2. Жизнеспособность дрожжей (раса В-41) после криоконсервации и лиофилизации, %

Хранение при —196 °С					Лيوфилизация с последующим хранением при —40 °С			
Криопротектор	Скорость охлаждения до —100 °С				Защитная среда	Режим лيوфилизации: —45 °С, вакуум 0,04 мм рт. ст., время сушки 22 ч		
	1 °С/мин		10 °С/мин			остаточная влажность, %	5 сут	6 сут
	5 сут	6 мес	5 сут	6 мес				
10 %-ный глицерин	80	76	103	100	ГДИ	3,8	22	0,07
20 %-ный глицерин	106	102	91	90	СЖА	3,1	9	0,03
					12 % сахара	3,3	17	0,001

Оптимальным режимом криоконсервации клеток винных дрожжей является медленное замораживание со скоростью 1 $^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ в 20 %-ном растворе глицерина. Жизнеспособность дрожжей при криоконсервации в этих условиях близка к 100 % и сохраняется на исходном уровне при длительном хранении в жидком азоте. При использовании в качестве криопротектора 10 %-ного раствора глицерина оптимальная скорость охлаждения дрожжей составляет 10 $^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Полученные данные хорошо согласуются с современными теоретическими представлениями [6] о том, что оптимальные скорость охлаждения и концентрация криопротектора являются параметрами взаимосвязанными: увеличение концентрации проникающего в клетки криопротектора позволяет получить более высокую жизнеспособность при уменьшении скорости охлаждения.

В табл. 2 представлены данные о жизнеспособности культуры В-41 при хранении методами лиофилизации и криоконсервации, свидетельствующие о преимуществе метода криоконсервации для длительного хранения винных дрожжей.

Данные о жизнеспособности всех четырех исследованных штаммов винных дрожжей при хранении методами сублимационного высушивания и криоконсервации позволяют сделать вывод о том, что устойчивость культур к режимам высушивания и замораживания различна и зависит от особенностей строения штаммов микроорганизмов. Жизнеспособность исследованных культур дрожжей после лиофилизации составляла от 4 до 33 % и падала при хранении, а при криоконсервации — от 55 до 100 % и оставалась на этом уровне в течение 2-х лет (максимальное время наблюдений).

Результаты биохимических исследований основных продуктов брожения культуры Массандра III представлены в табл. 3. Как видно, различий по основным продуктам брожения у дрожжей, подвергнутых лиофилизации и криоконсервации, по сравнению с контролем (культурой, поддерживаемой методом периодических пересевов) не наблюдалось. Таким образом, проведенные биохимические исследования основных продуктов брожения подтвердили сохранность технологических свойств винных дрожжей при консервации обоими методами. Криоконсервация может быть рекомендована в качестве наиболее эффективного способа хранения культур винных дрожжей, обеспечивающего стабильность их технологических свойств, максимальную жизнеспособность и длительность хранения.

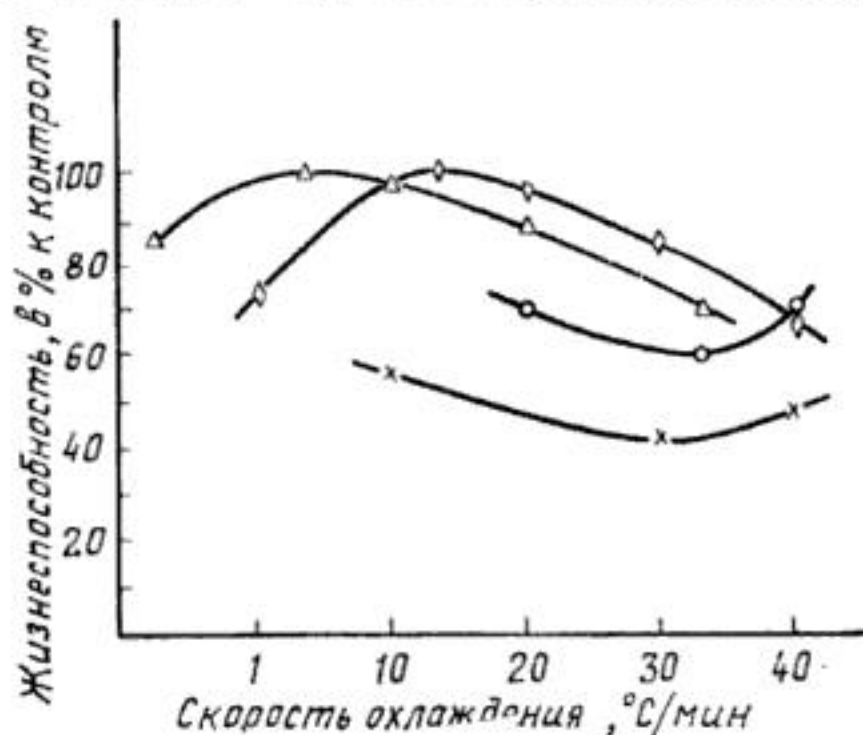


Рис. 4. Зависимость жизнеспособности винных дрожжей В-41 от скорости охлаждения: $\circ$ — дистиллированная вода; $\diamond$ — 10 % глицерин; $\triangle$ — 20 % глицерин; $\times$ — 40 % глицерин.

Таблица 3. Сбраживающая способность дрожжевых клеток после криоконсервации и лиофилизации

Способ консервации культуры Массандра III		Основные продукты брожения					
		Спирт, % об.	Остаточный сахар, г/100 мл	Летучие кислоты, г/100 мл	Титруемая кислотность, г/л	Глицерин, г/100 мл	Альдегиды, мг/л
Криоконсервация	Контроль	10,5	0,34	0,81	4,2	0,66	64,3
	Программа 2, дистиллированная вода	10,2	0,26	0,75	4,8	0,68	54,0
	Программа 9, 10 %-ный глицерин	10,6	0,36	0,75	4,8	0,63	69,9
	Программа 1, 20 %-ный глицерин	10,5	0,37	0,73	4,1	0,63	57,4
	Ллиофилизация в ГДИ	10,8	0,37	0,75	4,3	0,71	59,2

1. Нудель Л. Ш., Короткевич А. В. Микробиология и биохимия вина.— М.: Пищевая промышленность, 1980.— 152 с.
2. Фатеева М. В., Никитина Т. Н., Шерман Ф. Б. Выживаемость и диагностические свойства дрожжей после лиофилизации и хранения // Изв. АН СССР. Сер. Б.— 1976.— № 4.— С. 611—617.
3. Ashwood-Smith M. J. Preservation of microorganisms by freezing, freeze-drying and dessication // Low Temperature Preservation in Medicine and Biology.— London: Pitman Press.— 1980.— P. 219—252.
4. Banno I., Mikata K., Sakane T. Viability of various yeasts after L-drying // I. F. O. Res. Commun.— 1979.— 9, N 1.— P. 27—34.
5. Banno I., Sakane T. Prediction of prospective viability of L-dried cultures of bacteria after long-term preservation // I. F. O. Res. Commun.— 1981.— 10, N 1.— P. 33—38.
6. Farrant J. General observation of cell preservation // Low Temperature Preservation in Medicine and Biology.— London: Pitman Press.— 1980.— P. 1—19.
7. Griffin C. N., Cook E. C., Mehaffey M. A. Predicting the stability of freeze-dried *Fucobacterium mortiferum* proficiency testing samples by accelerated storage tests // Cryobiology.— 1981.— 18, N 4.— P. 420—425.
8. Heckly R. J. Preservation of microorganisms // Adv. Appl. Microbiol.— 1978.— 24, N 1.— P. 1—53.
9. Hubalek Z., Kockova -Kratochvilova A. Lipid nitrogen storage of yeasts cultures. I. Survival and literature review of the preservation of fungi at ultralow temperatures // Antonie van Leeuwenhoek.— 1978.— 44, N 2.— P. 229—241.
10. Mazur P., Smidt J. J. Interaction of cooling velocity, temperature and warming velocity on the survival of frozen and thawed yeasts // Cryobiology.— 1968.— 5, N 1.— P. 1—17.
11. Srivastava K. C., Smith D. G. Effect of cryoprotective agents on the growth and ultrastructure of *Saccharomyces cerevisiae* // Cytobios.— 1980.— 29, N 113.— P. 29—36.

Всесоюзная коллекция микроорганизмов,
Институт биохимии и физиологии
микроорганизмов АН СССР,
г. Москва

Получено 25.06.85.

УДК 57.043:576.347

Л. В. Цымбал, В. А. Моисеев, Л. Г. Мишнёва

ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕМПЕРАТУРНОЙ ЗАВИСИМОСТИ ВОССТАНОВЛЕНИЯ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ В МИТОХОНДРИЯХ

В настоящее время накоплен большой экспериментальный материал по влиянию замораживания на структурно-функциональные характеристики мембран [1]. Однако ряд специальных вопросов требует дальнейшего исследования. К их числу относится выяснение роли различных этапов замораживания в развитии криоповреждений, в частности возможности активации некоторых ферментов как следствие глубокой структурной модификации мембран при определенных отрицательных температурах [2, 3].

Широко применяемый в настоящее время метод спиновых зондов позволяет исследовать биологические объекты в зоне отрицательных температур. Данные о восстановлении стабильных иминоксильных радикалов дают информацию о структурно-функциональных характеристиках мембран при понижении температуры. Нитроксильные радикалы, весьма стабильные по своей природе, в биологических системах могут терять парамагнетизм и восстанавливаться до пространственно затрудненных гидроксиламинов [4]. В частности, эффективной восстанавливающей способностью обладают мембраны митохондрий. Ферменты, восстанавливающие нитроксильные радикалы, расположены в области флавинового и цитохромного участков дыхательной цепи. Показана высокая относительная скорость восстановления радикалов, локализующихся на поверхности раздела липид — полярная фаза [7]. Одним из таких радикалов является 2, 2, 6, 6-тетраметилпиперидин-1-оксил (ТЕМРО).

Для изучения изменения структурных характеристик митохондрий сердца крысы при понижении температуры в диапазоне $20 \div -30^\circ\text{C}$ было

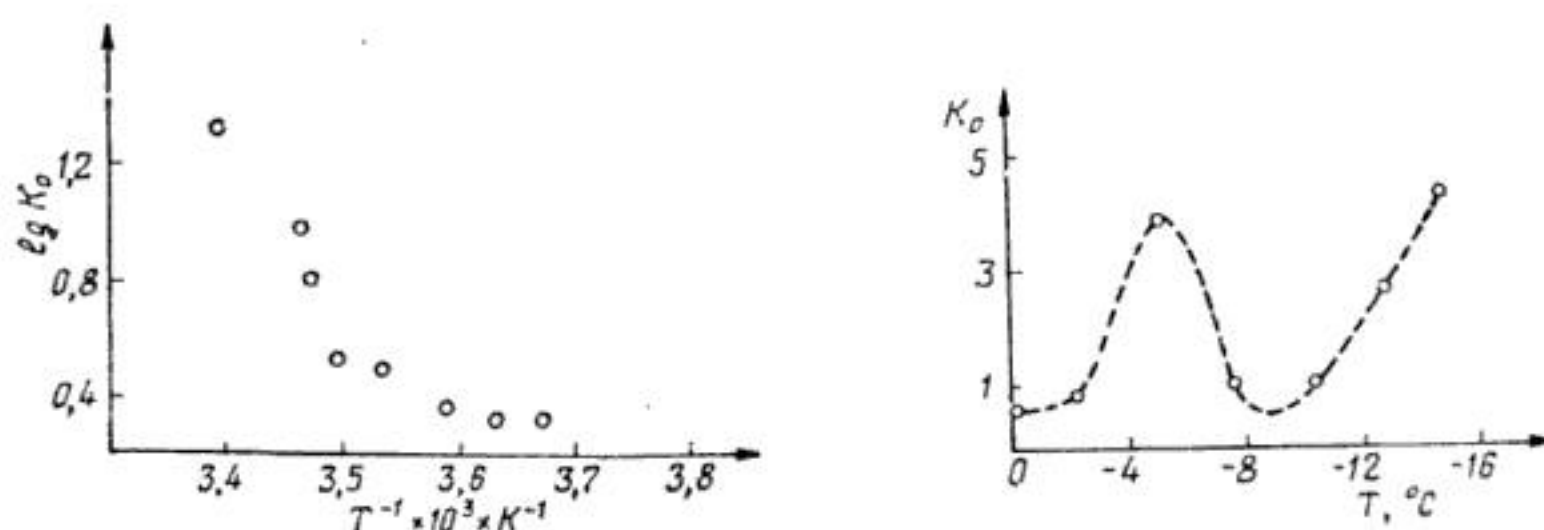


Рис. 1. Аррениусова зависимость для скорости восстановления зонда ТЕМРО в митохондриях сердца крысы.

Рис. 2. Температурная зависимость скорости восстановления зонда при внеклеточной кристаллизации.

исследовано восстановление ими радикала ТЕМРО. В образцах митохондрий, приготовленных на солевой среде (105 мМ КСl, 20 мМ *трис*-НСl, рН 7,4), содержалось 30—40 мг/мл белка. Зонд вводили в суспензию митохондрий в водном растворе до конечной концентрации 10^{-3} М. Спектры ЭПР регистрировали на спектрометре РЭ 1301, скорость охлаждения $1\text{—}2^\circ\text{C}/\text{мин}$, точность термостатирования $\pm 1^\circ\text{C}$. В качестве параметра восстановления радикала принимали начальную скорость K_0 (мин^{-1}) уменьшения интенсивности центральной компоненты спектра ЭПР при данной стабилизированной температуре [6]. Центральную компоненту спектра записывали с интервалом 3 мин (время сканирования—2 мин) три раза, скорость реакции определяли по наклону графика зависимости амплитуды сигнала от времени. Выбранная концентрация зонда в образце достаточна для регистрации сигнала ЭПР в интервале температур $20 \div -30^\circ\text{C}$.

Аррениусова зависимость для скорости реакции свидетельствует о резком уменьшении скорости восстановления зонда при температурах около 6°C . При более высоких температурах отмечается излом кривой зависимости в области 12°C (рис. 1), что согласуется с данными о термоиндуцированных переходах в липидных компонентах мембран [5], в которых выявлена корреляция между температурами структурной перестройки мембраны митохондрий (24 и 8°C) и изменением активности сукцинатоксидазы [9]. Дальнейшее охлаждение образцов усложняет процесс восстановления радикала. Скорость реакции остается минимальной вплоть до температуры начала внеклеточной кристаллизации около -4°C . При кристаллизации она заметно возрастает, а затем вновь снижается (рис. 2). Резкое изменение параметра вращательной подвижности зонда после внеклеточной кристаллизации (рис. 3) указывает на значительное обезвоживание клеток, что подтверждается также увеличением параметра сольобилизации зонда мембра-

ной (рис. 4). Дальнейшее изменение скорости реакции нельзя объяснить только концентрированием молекул зонда, так как уменьшение объема жидкой фазы в интервале температур $-6 \div -10^\circ\text{C}$ сопровождается снижением скорости восстановления зонда. По-видимому, вследствие вымораживания воды комплекс факторов действует на уже модифицированную мембрану. По нашим данным, структурный переход в мембранах митохондрий завершается в районе -12°C , что приводит к уменьшению сольубилизации зонда (рис. 4). Увеличение полярности микроокружения нитроксила ниже температуры структурного перехода сопровождается увеличением скорости реакции восстановления, которая продолжается и после вымерзания эвтектики (-25°C). Быстрая потеря парамагнетизма липидными метками наблюдается в результате взаимодействия липидов с гем-содержащими белками [6]. Поэтому восстановление радикала после завершения латерального разделения фаз в мембране митохондрий [8] и вымерзания свободной воды может свидетельствовать о новом механизме восстановления стабильных радикалов продуктами перекисного окисления липидов.

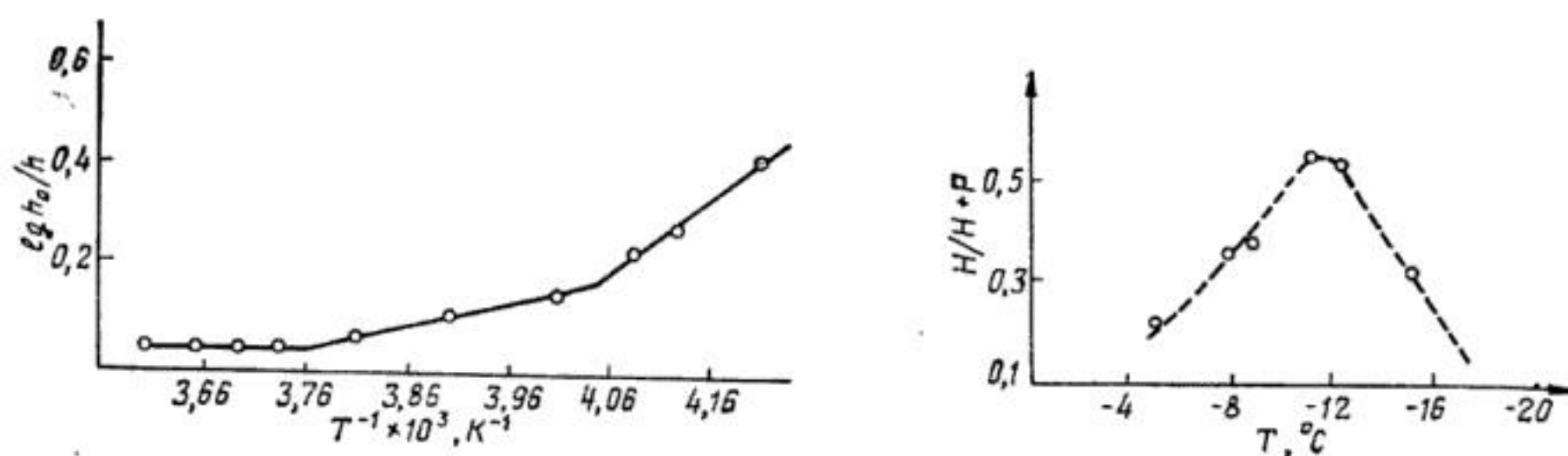


Рис. 3. Изменение параметра вращательной подвижности зонда в зависимости от температуры (h_0 и h_- — интенсивности центральной и высокополевой компонент спектра ЭПР).

Рис. 4. Температурная зависимость параметра сольубилизации зонда в мембране (H — величина расщепления спектра в высоком поле за счет растворимости зонда в мембране, P — вклад в сигнал ЭПР от зондов, локализованных в полярной фазе).

Таким образом, использованный в работе зонд ТЕМРО позволяет контролировать изменения структурных характеристик мембран митохондрий в процессе медленного охлаждения. Сложный характер зависимости восстановления от температуры может свидетельствовать о двух последовательно развивающихся при отрицательных температурах процессах, приводящих к криповреждению мембран: структурной лабильности и инициации перекисного окисления липидов митохондрий.

1. Белоус А. М., Бондаренко В. А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении // Киев: Наук. думка, 1982. — 254 с.
2. Бондаренко В. А., Бондаренко Т. П., Белоус А. М. Окисление липидов митохондрий после замораживания до эвтектических температур // Укр. биохим. журн. — 1979. — 51, № 5. — С. 487—489.
3. Бондаренко Т. П., Бойко Н. М., Бондаренко В. А., Белоус А. М. Влияние низких температур на активность фосфолипазы A_2 митохондрий печени крыс // Укр. биохим. журн. — 1979. — 51, № 6. — С. 606—608.
4. Жданов Р. И. Парамагнитные модели биологически активных соединений // М.: Наука, 1981. — 279 с.
5. Пучков Е. О., Путвинский А. В., Рошупкин Д. М., Владимиров Ю. А. Влияние температуры на структурное состояние липидов в мембранах митохондрий // Биофизика. — 1976. — 21, № 2. — С. 287—288.
6. Butterfield D. A., Crumbiss A. L., Chesnut D. B. Radical decay kinetics in ferrocyanochrome *c* model membranes. A spin label study // J. Amer. Chem. Soc. — 1975. — 97, N 6. — P. 1388—1392.
7. Guintanilha A. T., Packer L. Surface localization of sites of reduction of nitroxide spin — labeled molecules in mitochondria // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1977. — 74, N 2. — P. 570—574.

8. Hackenbrock C. R., Hochli M., Chan R. M. Calorimetric and freeze-fracture analysis of lipid phase transitions and lateral translational motion of intramembrane particles in mitochondrial membranes // Biochim. Biophys. Acta.— 1976.— 455, N 2.— P. 466—484.
9. Raison J. K., McMurchue E. J. Two temperature induced changes in mitochondrial membranes detected by spin labelling and enzyme kinetics / Biochim. Biophys. Acta.— 1974.— 363, N 2.— P. 135—140.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР,
г. Харьков

Получено 6.10.84

УДК 57.022

Г. Ф. Жегунов

ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ СЕРДЦА СУСЛИКОВ *CYTELLUS UNDULATUS* В ПРОЦЕССЕ ПРОБУЖДЕНИЯ ОТ ЗИМНЕЙ СПЯЧКИ

Известно, что при гипотермии животных нарушается деятельность миокарда, а при температуре тела от 15 до 20 °С происходит остановка сердца [2]. У гетеротермных млекопитающих, способных в период зимней спячки снижать температуру тела до 1—2 °С, сердечная мышца продолжает функционировать, хотя изменяет свои сократительные свойства [6]. В литературе описано физиологическое состояние сердца гетеротермов в период зимней спячки [5, 6]. Показано, что в этот период у животных сокращается число сердечных сокращений (ЧСС), меняется вид кривой ЭКГ, замедляются процессы сокращения и расслабления миокарда [6, 7]. Гибернаторы способны впасть в спячку и пробуждаться за довольно короткий промежуток времени [5, 6]. При этом температура тела животных повышается за 1—3 ч от 2 до 36 °С. В связи с этим целью настоящей работы являлось выяснение динамики электрофизиологических процессов миокарда при гибернации и во время пробуждения сусликов.

Опыты проводились зимой (декабрь — февраль) на длиннохвостых сусликах (*Cytellus undulatus*) в состоянии зимней спячки, а также на активных животных. Было использовано по 5 животных в каждой группе. Электрокардиограммы регистрировали в трех стандартных отведениях. У просыпающихся сусликов ЭКГ регистрировали через каждые 15—20 мин при постоянном контроле за температурой тела. Одновременно определяли температуру в пищеводе и прямой кишке сусликов. Анализируя кривые ЭКГ, рассчитывали: длительность интервалов кривой ЭКГ от начала волны *P* до начала зубца *Q* (время проведения возбуждения от предсердия до желудочков) [3, 4], от начала сегмента *P* до его окончания (время распространения возбуждения по предсердию, а также время деполяризации предсердия) [3, 4], интервал *R — R* (длительность сердечного цикла) [3, 4], от начала зубца *Q* до конца волны *S* (время деполяризации желудочков) [3], от начала зубца *Q* до конца волны *T* (длительность электрической систолы желудочков) [3, 4], от начала зубца *S* до конца волны *T* (время реполяризации миоцитов желудочка) [3, 4], от начала зубца *Q* до начала волны *P* следующего цикла (электрическая диастола предсердий), от конца волны *T* до начала зубца *Q* следующего цикла. На рис. 1 представлена динамика повышения температуры тела суслика в зависимости от времени при пробуждении от зимней спячки. Видно, что с большей скоростью происходит разогрев передней части тела животного. На графике имеется три участка, характеризующиеся разной скоростью повышения температуры. В течение первых 1—2 ч температура тела животного плавно повышается с небольшой скоростью (~0,07 °С/мин), затем происходит значительное увеличение теплопродукции и температура повышается со скоростью ~0,50 °С/мин. В этот период у животных наблю-

дается довольно сильная дрожь. После достижения температуры тела $32-34^{\circ}\text{C}$ происходит замедление скорости ее повышения до $0,05^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Температура в задней части тела повышается значительно медленнее, со скоростью $\sim 0,033^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ в течение первых 2,5 ч, после чего этот процесс несколько ускоряется до $0,075^{\circ}\text{C}/\text{мин}$.

На рис. 2 показано изменение частоты сердечных сокращений в зависимости от температуры тела просыпающегося суслика. Обращает на себя внимание тот факт, что на фоне низкой начальной скорости повышения температуры тела животного происходит значительное увеличение ЧСС за довольно короткий промежуток времени и уже при температуре $10-15^{\circ}\text{C}$ ЧСС составляет 160—250 ударов в мин. Это свидетельствует о способности «холодного» сердца функционировать на уровне нормотермного органа.

На рис. 3 представлены электрокардиограммы, полученные у контрольных животных, а также у сусликов в процессе их пробуждения. Видны значительные изменения электрофизиологических параметров работы сердечной мышцы сусликов, находя

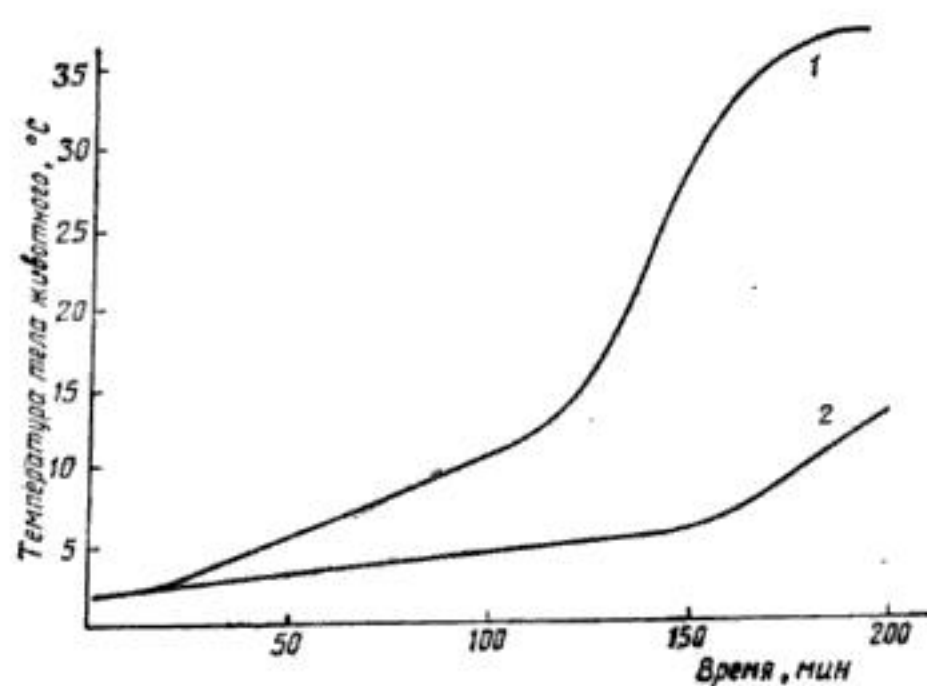


Рис. 1. Изменение температуры тела суслика при пробуждении от зимней спячки 1 — температура в пищеводе; 2 — температура в прямой кишке.

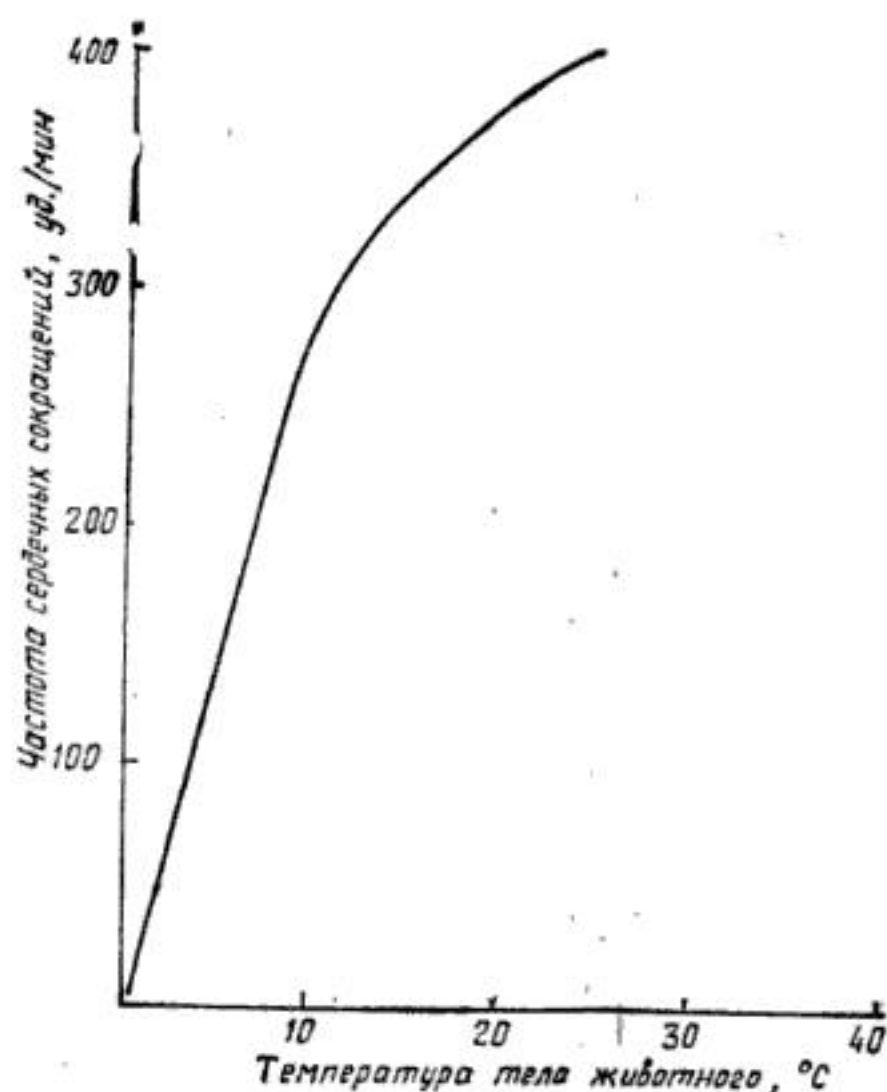


Рис. 2. Динамика повышения частоты сердечных сокращений при пробуждении суслика.

щихся в состоянии гибернации и пробуждения, по сравнению с контрольными значениями.

Результаты обработки ЭКГ, представленные на рис. 4 и 5, свидетельствуют о том, что несмотря на низкую температуру органа время сердечного цикла значительно сокращается за короткий промежуток и при температуре 10°C уже составляет 0,38 с, т. е. в 13 раз меньше, чем при 2°C . Из рис. 4 видно, что учащение пульса связано со значительным сокращением времени электрической диастолы как предсердий, так и желудочков. Эти параметры сокращаются соответственно в 12 и 26 раз. Следует отметить, что и другие электрофизиологические характеристики сердца животных (время проведения и распространения возбуждения, длительность процессов деполяризации и реполяризации предсердий и желудочков) резко изменяются в интервале температур от 2 до 10°C (рис. 4, 5).

На основании данных, полученных при обработке кривых ЭКГ, можно косвенно судить об электрических явлениях, протекающих на мембранах кардиомиоцитов [3,4]. Можно предположить, что в диапазоне температур $2-10^{\circ}\text{C}$ за короткий промежуток времени существенно ускоряются процессы деполяризации и реполяризации мембран миоцитов, увеличивается скорость проведения импульсов по проводящей системе сердца несмотря на еще очень низкую температуру тела сусликов. В дальнейшем в течение

1—3 ч при повышении температуры тела животных до 36 °С исследуемые параметры изменяются в меньшей степени.

Результаты исследований свидетельствуют о значительных функциональных возможностях сердца гетеротермных животных. В то время как сердце теплокровных не выдерживает даже незначительное охлаждение и останавливается в результате фибрилляции и (или) атриовентрикулярной

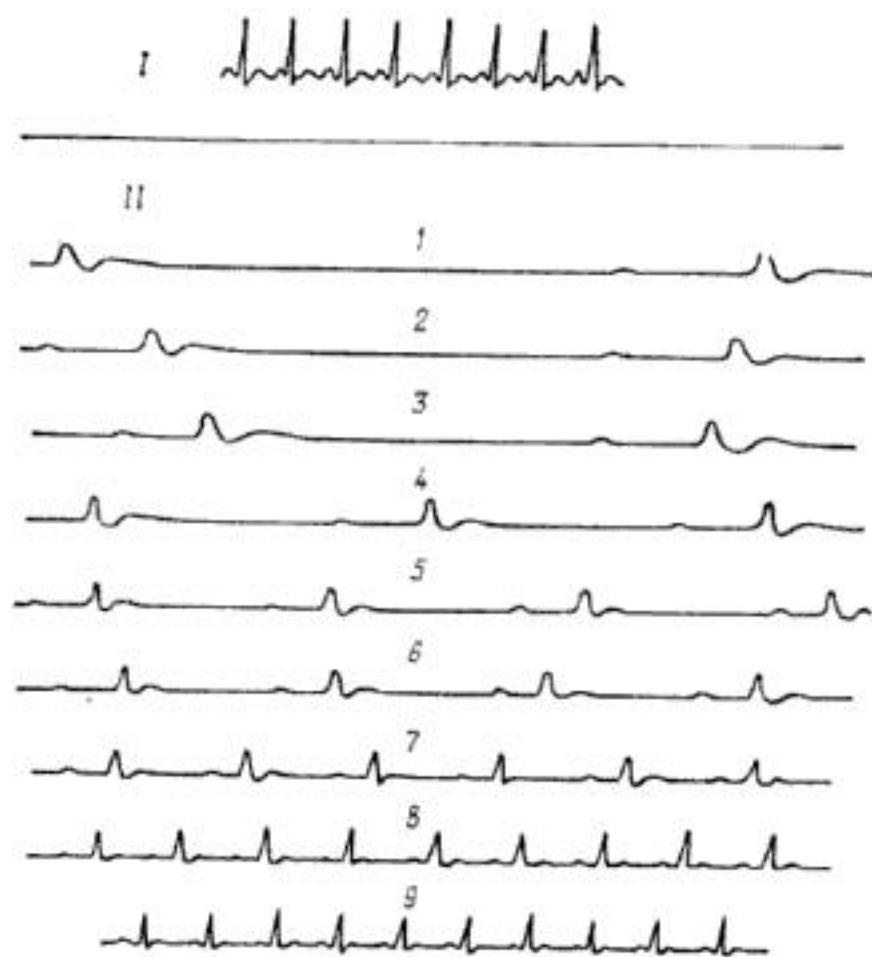


Рис. 3

Рис. 3. Электрокардиограммы активного и просыпающегося животного: I — ЭКГ активного суслика, температура тела — 36 °С; II — ЭКГ просыпающегося суслика. Температура тела: 1 — 2,0 °С; 2 — 2,5 °С; 3 — 2,8 °С; 4 — 3,3 °С; 5 — 3,6 °С; 6 — 5,0 °С; 7 — 8,0 °С; 8 — 9,0 °С; 9 — 10,3 °С.

Рис. 4. Динамика сердечного цикла пробуждающегося суслика. Время: 1 — сердечного цикла; 2 — электрической диастолы предсердий; 3 — электрической диастолы желудочков; 4 — проведения возбуждения от предсердия до желудочков (время электрической систолы предсердий); 5 — электрической систолы желудочков.

Рис. 5. Динамика электрофизиологических характеристик сердца пробуждающихся сусликов. Время: 1 — проведения возбуждения от предсердий до желудочков; 2 — деполяризации предсердий; 3 — реполяризации миоцитов желудочка; 4 — деполяризации желудочков.

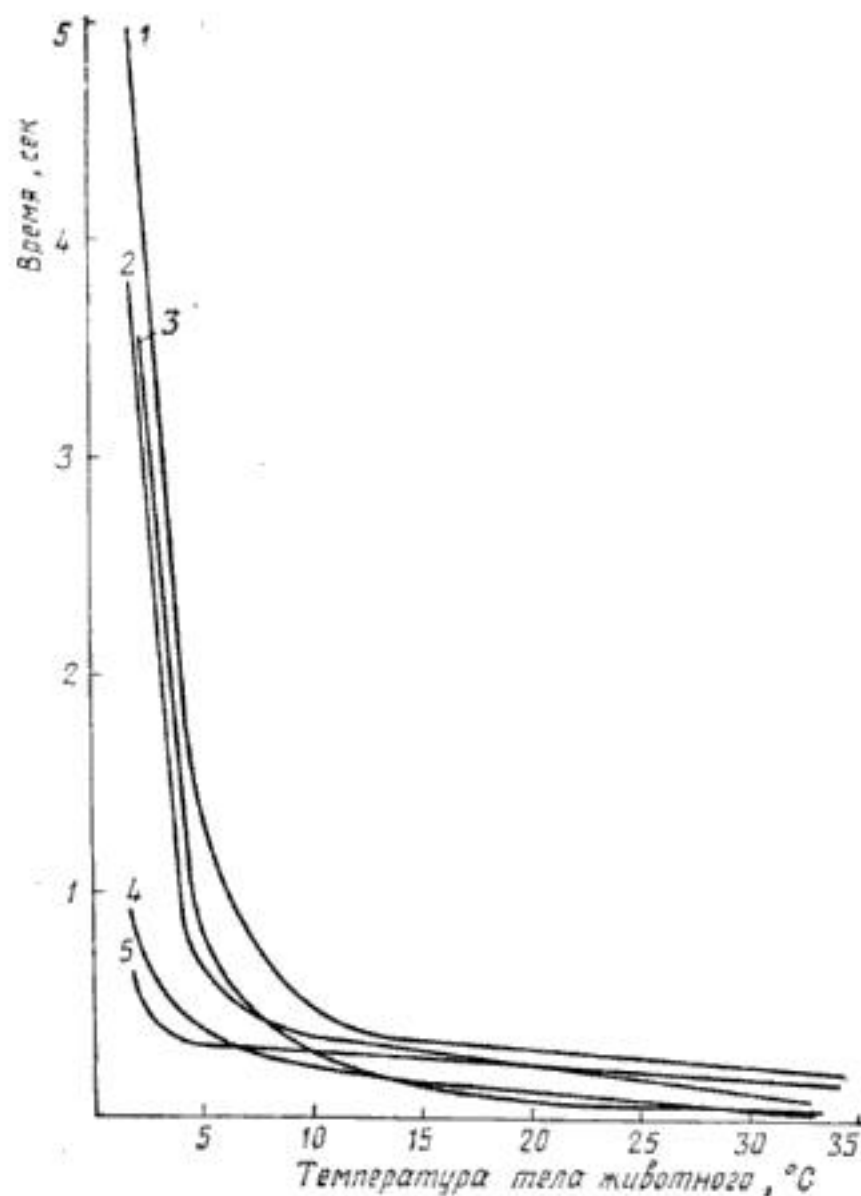


Рис. 4.

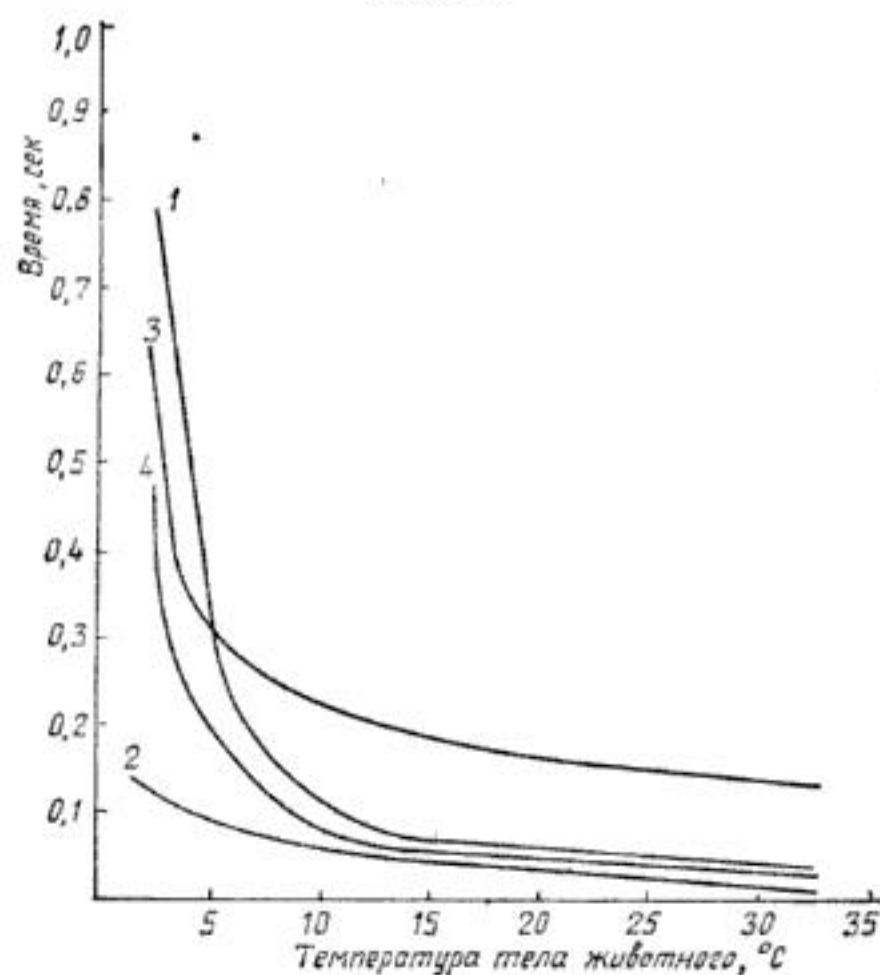


Рис. 5

блокады органа при температурах 15—20 °С [2], зимоспящие животные способны координировать работу своего миокарда на протяжении всего цикла спячки при температурах около 0 °С. Считается, что в процессе гибернации у сусликов сохраняется контроль за деятельностью миокарда через вегетативную нервную систему [5]. Предполагают, что значительное повышение функциональной активности сердечной мышцы в процессе пробуждения, в первую очередь, связано с кардиостимулирующим действием симпатической нервной системы [5]. Функция сердца при этом обеспечивается способностью кардиомиоцитов зимоспящих животных активно работать при очень низких температурах. В этих условиях полностью сохра-

няется регуляция и координация процессов сокращения и расслабления миоцитов. Интересным, на наш взгляд, является способность клеток миокарда сусликов при околонулевых температурах генерировать электрический импульс, проводить его вглубь органа, возбуждать внутриклеточные структуры, выбрасывать и вновь аккумулировать ионы Na^+ , K^+ , Ca^{2+} со скоростью, характерной для контрольной группы животных. Указанные электрические процессы протекают на мембранах миоцитов с большой скоростью, при этом активно функционируют ионные каналы и транспортные АТФазы несмотря на то, что по закону Аррениуса снижение температуры должно замедлять скорость любого биохимического процесса [1]. По-видимому, мембранные системы кардиомиоцитов гибернирующих животных, а также связанные с ними ион-переносящие системы приобретают во время спячки новые свойства или же в клетке создаются специфические условия, дающие возможность обеспечивать функцию клеток при низких температурах. Таким образом, клетки миокарда гетеротермных животных способны за короткий промежуток времени перестроить свой метаболизм, а миокард — функцию и обеспечить работу органа в широком диапазоне температур. Столь широкие приспособительные возможности клеток миокарда зимоспящих млекопитающих требуют детального изучения на субклеточном уровне для выяснения механизмов быстрой адаптации клеток к пониженным температурам.

1. Курский М. Д., Костерин С. А., Рыбальченко В. К. Биохимическая кинетика. — Киев: Высшая школа, 1977. — 264 с.
2. Майстрах Е. В. Гипотермия и анабиоз. — М.; Л.: Наука, 1964. — 226 с.
3. Рашмер Р. Динамика сердечно-сосудистой системы. — М.: Медицина, 1981. — 600 с.
4. Цукерман Б. М., Титомир Л. И. Электрокардиография // Руководство по физиологии. — Л.: Наука, 1980. — С. 288—317.
5. Dawe A. R., Landau B. R. The hibernating mammalian heart // Am. Heart J. — 1960. — 59, N 1. — P. 78—89.
6. Kayser Ch. Effect de la temperature sur la duree des differents accidents de l'electrocardiogramme chez quelques mammiferes homeothermes et deux hibernants refroidis // Arch. des sciences physiol. — 1957. — XI, N 1. — P. 7—27.
7. Jimmy M. L., Sherman M., Romano C. C. Ultrastructural modifications of the intercalated disc during hypothermia in the rat and ground squirrel // Cryobiology. — 1968. — 4, N 6. — P. 317—328.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР,
г. Харьков

Получено 05.10.84

УДК 547.963:576.3+612.419

**Т. Н. Ващенко, В. И. Ващенко, Г. И. Петренко,
Ш. М. Багаутдинов, С. П. Калеко**

ВЛИЯНИЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ НА ТОПОЛОГИЧЕСКИЕ ПЕРЕХОДЫ СУПЕРСПИРАЛЬНОЙ ДНК «НУКЛЕОИДОВ» КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

История обратимого замораживания ядродержащих клеток под защитой криопротекторов насчитывает более пятидесяти лет. Однако проблема оценки их функциональной полноценности после воздействия сверхнизких температур с помощью биохимических и иммунохимических методов полностью не решена [8].

Открытие суперспиральной организации ДНК в клетках млекопитающих позволило приблизиться к более глубокому пониманию сложной взаимосвязи жизнеспособности клетки с функционированием ее ядерного аппарата. В последние годы было показано, что изменение суперспирализации ДНК можно вызвать, воздействуя на клетку различными физическими

и химическими факторами [9, 11]. Это сопровождается целым рядом функциональных нарушений в ее ядре. Особый интерес вызывают вещества, активирующие или ингибирующие пролиферативный процесс. Так, в экспериментах Глазера и Лучника [4] было установлено, что актиномицин Д и ДМСО, оказывая стимулирующее воздействие на клетки эритролейкемии Френда, модифицируют топологическую структуру полученных из них «нуклеонидов», в которых при этом изменяется плотность суперспирализации ДНК.

Целью настоящей работы являлось изучение топологических переходов суперспиральной ДНК (ссДНК) клеток костного мозга человека до и после криоконсервирования под защитой диметилацетамида (ДМАЦ) и полиэтиленоксида (ПЭО-400).

Взятие костного мозга у доноров и его криоконсервирование под защитой ПЭО-400 осуществляли общепринятым методом [5]. Использование для этих целей криопротектора ДМАЦ показано нами ранее [7].

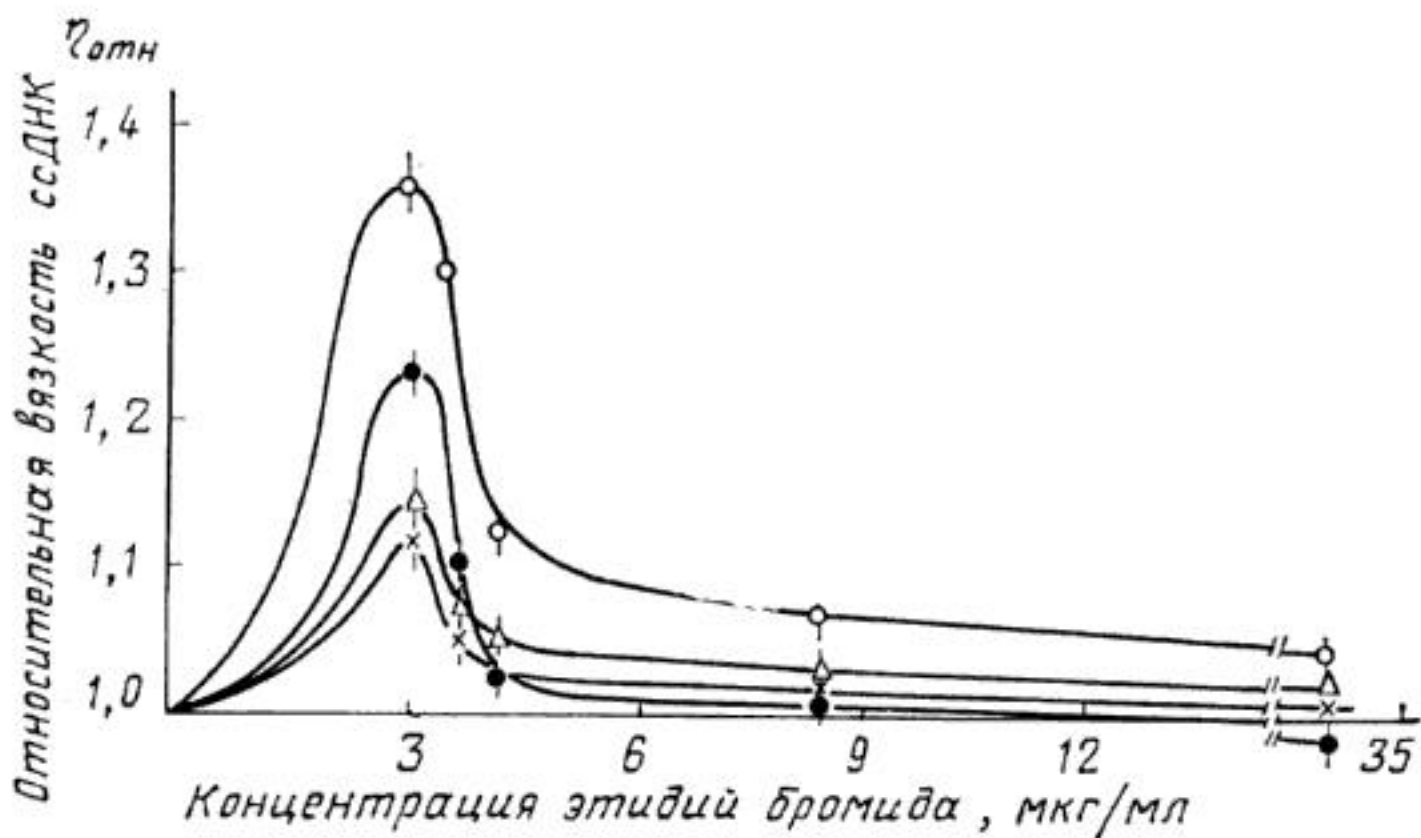


Рис. 1. Изменение относительной вязкости ($\eta_{отн}$) ссДНК «нуклеонидов» клеток костного мозга при наличии интеркалятора в лизирующей смеси. Δ — $\eta_{отн}$ ссДНК «нуклеонидов» «клеток», взвешенных в растворе Хенкса; $\times$ — в растворе ЦОЛИПК-3, $\circ$ — в растворе Хенкса после инкубации (20 мин) с ПЭО-400, $\bullet$ — в растворе Хенкса после инкубации с ДМАЦ.

Подготовку суспензий клеток костного мозга проводили по двум вариантам. В одном из них взвешенные в среде ЦОЛИПК-3 клетки разбавляли этим же раствором до конечной концентрации $3,5 \times 10^6$ кл/мл. Во втором варианте, клетки, находящиеся в растворе ЦОЛИПК-3, осаждали центрифугированием (400 g, 5 мин) и затем ресуспендировали в растворе Хенкса с гепарином («Рихтер», ВНР; 25 ед/мл). Таким же образом, т. е. по второму варианту, осуществлялась подготовка клеток, во взвеси которых имелись криопротекторы ДМАЦ или ПЭО-400. Во всех случаях как до замораживания, так и после оттаивания замороженных образцов в пробах перед проведением вискозиметрии подсчитывалось число мегакариоцитов и расчет концентрации клеток проводили по жизнеспособным клеткам, оцениваемым по эозиновой пробе.

Оценка топологических переходов ссДНК «нуклеонидов» клеток костного мозга. Вискозиметрия «нуклеонидов» проводилась согласно модифицированному методу Ващенко и Рещикова [2] на специально изготовленном вискозиметре Оствальда (диаметр капилляра 0,50 мм, длина 100 мм). Для их получения к 1 мл клеточной суспензии ($3,5 \times 10^6$ клеток) прибавляли по 4 мл лизирующей смеси (рН 8,0), содержащей 1,95 М NaCl, 0,1 М ЭДТА, 0,01 М трис — HCl и 0,5 % тритона X-100. Топологические переходы ссДНК оценивали по релаксационным кривым, полученным при титровании этидий бромидом «нуклеонидов»; интеркалятор предварительно растворяли в лизирующей смеси, калибруя его концентрации спектрофотометри-

чески ($\epsilon_{480}^{\text{ЭБ}} = 5680$). Лизис клеток костного мозга осуществляли в течение 20 мин при $+20^\circ\text{C}$, после чего определяли относительную вязкость при этой же температуре.

Статистическую обработку данных проводили общепринятыми методами вариационной статистики [1].

На рис. 1 представлены типичные релаксационные кривые, которые характеризуют особое свойство ссДНК, а именно демонстрировать топологические переходы в зависимости от содержания интеркалятора (этидий бромида) в изучаемой системе. Топологические переходы сопровождаются изменением относительной вязкости клеточных лизатов, содержащих «нуклеоиды» с ДНК в сверхспирализованном состоянии. Видно, что максимальная вязкость наблюдается при переходе от отрицательных до положительных значений суперспирализации при увеличении концентрации этидий бромида в лизирующей смеси. Как известно, в точке перехода плотность суперспирализации равняется нулю. Для ссДНК клеток костного мозга указанный переход отмечается при наличии в лизирующей смеси 3 мкг/мл этидий бромида. Эта величина близка к максимально релаксирующей, установленной для ряда других объектов [6,9].

Изменение относительной вязкости* «нуклеоидов» клеток костного мозга в зависимости от состава инкубационной среды

№ серии опытов	Условия инкубации (20 мин при 20°C)					
	р-р Хенкса	р-р Хенкса + ДМАЦ	р-р Хенкса + ПЭО-400	р-р ЦОЛИПК-3	р-р ЦОЛИПК-3 + ДМАЦ	р-р ЦОЛИПК-3 + ПЭО-400
I	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
II	1,24	1,59	2,01	1,14	1,33	1,47

* — величина относительной вязкости «нуклеоидов», представленная в таблице, определялась как отношение вязкости, измеренной при 3 мкг/мл этидий бромида в лизирующей смеси (II) к ее значениям, когда в лизирующей смеси не содержалось интеркалятора (I). В таблице приведены средние значения трех—четырёх измерений.

В последующей серии опытов, результаты которых представлены в таблице, показана взаимосвязь изменений топологических переходов с наличием в системе различных компонентов. Так, использование растворов Хенкса или ЦОЛИПК-3 выявляет неадекватные топологические переходы в ссДНК при криоконсервировании под защитой ДМАЦ и ПЭО-400. При этом можно отметить две характерные особенности. Во-первых, во всех вариантах экспериментов точка топологических переходов, т. е. максимальные значения относительной вязкости регистрируются при одинаковой концентрации интеркалятора в лизирующей смеси. Во-вторых, абсолютные значения относительной вязкости в этой точке различны. Последнее нельзя объяснить изменением числа супервитков в ссДНК, так как колебания относительной вязкости наблюдаются при одной и той же релаксирующей концентрации этидий бромида, где по определению число сверхвитков равно нулю. Следовательно, этот феномен целесообразно трактовать с других позиций. По нашему мнению, можно предположить, что под влиянием температурных изменений в ходе замораживания и оттаивания нарушаются химические связи (природа их пока не установлена) различных структурных компонентов, которыми осуществляется компактная укладка ссДНК в «нуклеоиде» [3]. Вероятным результатом таких нарушений будет локальная релаксация супервитков в доменах ссДНК, что, как известно, сопровождается изменениями транскрипционной активности генома клетки [13]. Таким образом, по абсолютным значениям относительной вязкости «нуклеоидов» в точке топологического перехода можно судить о функциональной активности ядерного аппарата клеток костного мозга.

В ряде экспериментов нами было установлено при оценке топологических переходов ссДНК клеток, находящихся под защитой криопротекторов ДМАЦ и ПЭО-400, что использование в качестве среды ЦОЛИПК-3 приводит к смещению точки перехода на релаксационной кривой. Этот феномен отсутствует, если исследования проводили в среде Хенкса. Полученные различия пока трудно интерпретировать, хотя известно, что сохранность биообъектов несколько лучше в среде Хенкса по сравнению с ЦОЛИПК-3 [5, 7, 8]. Поэтому в последующих экспериментах нами использовалась только среда Хенкса. И поскольку, как уже отмечалось, в этой системе в точке топологического перехода изменяются только значения относительной вязкости, то релаксационные кривые строились по двум точкам. Базовой являлась относительная вязкость «нуклеоидов» без добавления в лизирующую смесь интеркалятора, а второй являлись ее значения при наличии в лизирующей смеси 3 мкг/мл этидий бромида, по изменению последних судили об эффекте. Данные этих опытов представлены на рис. 2. Из рисунка видно, что до замораживания показатели вязкости «нуклеоидов» выше, чем у размороженных клеток. Следует также указать на вариабельность регистрируемых показателей относительной вязкости ссДНК у «нуклеоидов», получаемых из клеток костного мозга от разных доноров. Кроме того, можно отметить, что ПЭО-400 значительно сильнее модифицирует ссДНК, чем ДМАЦ, причем при использовании последнего в размороженных клетках наблюдается понижение относительной вязкости «нуклеоидов» по сравнению с контрольными образцами, не содержащими криопротекторы.

При анализе результатов проведенных экспериментов в целом мы остановимся на двух моментах. Во-первых, попытаемся объяснить повышение вязкости ссДНК «нуклеоидов» при использовании криопротекторов.

Уже отмечалось, что в опытах Глазера и Лучника [4], которые использовали актиномицин Д и, что особенно важно, ДМСО, было показано изменение плотности суперспирализации. Сам же эффект ДМСО трактовался на уровне клетки как стимулирующий. Однако выбранные нами для работы криопротекторы ПЭО-400 и ДМАЦ не вызывали изменения плотности суперспирализации. Следовательно, в данном случае существует иной механизм конформационных перестроек. Известно, что стабилизация суперспиральной структуры ДНК в нативных условиях осуществляется сложным комплексом, в который входят и топоизомеразы [10]. Мы допускаем, что наряду с топологическими перестройками эти ферменты выполняют и структурную роль [2]. Таким образом, оказывая общее модифицирующее действие на клетку, температурные колебания нарушают правильное функционирование топоизомераз. Их связи с ссДНК изменяются, это сопровождается освобождением участков, закрепляющих ее домены в «нуклеоиде», что в эксперименте регистрируется как увеличение его относительной вязкости.

Во-вторых, важным моментом в трактовке данных является правильная оценка результатов по уменьшению вязкости «нуклеоидов» разморо-

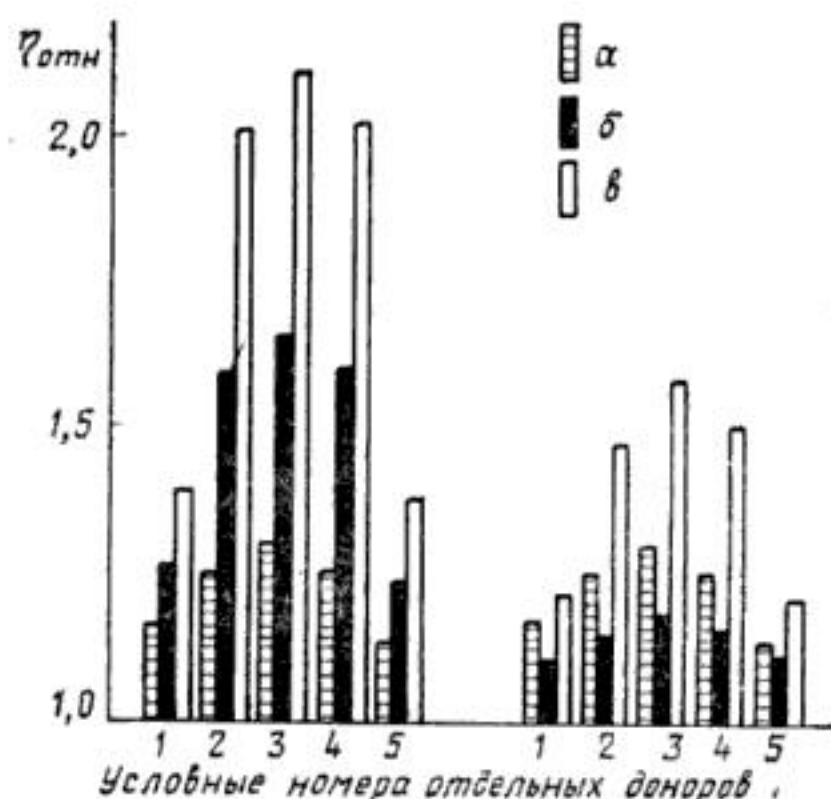


Рис. 2. Влияние криоконсервирования на ссДНК «нуклеоидов» клеток костного мозга перед замораживанием (А) и после оттаивания (Б). а — $\eta_{отн}$ ссДНК «нуклеоидов» клеток до замораживания и без криопротекторов; б — до замораживания под защитой ДМАЦ и после оттаивания; в — до замораживания под защитой ПЭО-400 и после оттаивания. $\eta_{отн}$ численно определялось как отношение вязкости ссДНК «нуклеоидов» с 3 мкг/мл этидий бромида к вязкости ссДНК в лизирующей смеси без интеркалятора, принятой за 1.

женных клеток по сравнению с нативными образцами. В наших предыдущих работах и в исследованиях других авторов [2, 6] отмечалось, что нуклеоидная структура регистрируется только в жизнеспособных клетках. Следовательно, возможно, что снижение вязкости обусловлено убылью числа жизнеспособных клеток, не регистрируемых по эозиновой пробе. Известно также, что в условиях гипертермии наблюдаются значительные вариации в седиментационных характеристиках нуклеоидов [12]. Правоммерно поэтому считать, что колебания температур в ходе криоконсервирования (от положительных до сверхнизких) даже в условиях защиты криопротекторами действуют неблагоприятно на ссДНК в «нуклеоидах» клеток костного мозга.

Таким образом, анализ выполненных экспериментов свидетельствует о дальнейших перспективах метода вискозиметрической оценки топологических переходов ссДНК «нуклеоидов» для выяснения механизмов взаимосвязи жизнедеятельности клетки со степенью суперспирализации ее ДНК в процессе криоконсервирования.

1. Бейли Н. Статистические методы в биологии.— М.: Иностранная литература, 1962.— 260 с.
2. Ващенко В. И., Решиков А. М. Определение радиочувствительности субпопуляций тимоцитов методом вискозиметрии нуклеоида // Радиобиология.— 1982.— 22, № 5.— С. 690—693.
3. Ващенко В. И., Щедрин Л. В., Комар В. Е. Топоизомераза II — ее роль в конформационных изменениях суперспиральной ядерной ДНК лимфоцитов после γ -облучения // Биополимеры и клетка.— 1985.— 1, № 4.— С. 203—207.
4. Глазер В. М., Лучник А. Н. Изменение топологического числа сцепления замкнутых петель ДНК при дифференцировке клеток мышинной эритролейкемии // Докл. АН СССР.— 1980.— 250, № 5.— С. 1247—1250.
5. Пушкарь Н. С., Даценко Б. М., Иткин Ю. А. и др. Применение консервированного глубоким охлаждением (-196°C) костного мозга при лучевом и химиотерапевтическом лечении онкологических больных // Врач. дело.— 1969, № 2.— С. 71—75.
6. Филиппович И. В., Сорокина Н. И. Суперспиральная ДНК клеточного ядра // Успехи современной биологии.— 1983.— 95, вып. 2.— С. 163—180.
7. Холодный А. Я., Петренко Г. И., Турбина И. Л. и др. Длительное хранение костномозговых клеток, криоконсервированных с диметилацетамидом (ДМАЦ) для клинических целей // Восстановительные и компенсаторные процессы при лучевых поражениях.— Л.: Б. и., 1979.— С. 164—165.
8. Цуцаева А. А. Проблемы криоконсервирования клеточных суспензий // Криоконсервирование клеточных суспензий.— Киев: Наук. думка, 1983.— С. 3—11.
9. Cook P. R., Brazell I. A., Jost E. Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA // J. Cell Sci.— 1976.— 22, N 2.— P. 303—324.
10. Gellert M. DNA topoisomerases // Ann. Rev. Biochem.— 1981.— 50.— P. 879—910.
11. Mattern M. R., Paone R. F., Day R. S. Human tumor strains defective in the repair of alkylated DNA fail to regenerate rapidly sedimenting nucleoids after N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine treatment // Carcinogenesis.— 1981.— 2, N 11.— P. 1215—1218.
12. Roti-Roti J. L., Painter R. B. Effects of hypertermia on the sedimentation of nucleoids from Hela cells in sucrose gradients // Rad. Res.— 1982.— 89, N 1.— P. 166—175.
13. Smith G. R. DNA supercoiling: another level for regulating gene expression // Cell.— 1981.— 24, N 3.— P. 599—600.

Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова,
г. Ленинград

Получено 12.06.85

УДК 615.832.9:616.127—005.8

Г. А. Бабийчук, А. В. Белостоцкий, Ю. Н. Арцыбушев

НАСОСНАЯ ФУНКЦИЯ ИШЕМИЗИРОВАННОГО МИОКАРДА ПРИ КРАНИОЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ГИПОТЕРМИИ

Многими исследователями отмечено повышение сердечного выброса при инфаркте миокарда (ИМ) в условиях гипотермии [4, 5]. Однако физиологические механизмы этого эффекта во многом остаются неясными. В настоя-

щей работе предпринята попытка выявить наиболее существенные черты действия краниocereбральной гипотермии (КЦГ) на функцию сердца, обуславливающие полноценную работу органа при ишемии. Проведено 2 серии экспериментов на беспородных собаках. Первой группе животных (5 собак) моделировался ИМ. У второй группы (5 собак) также воспроизводился острый экспериментальный инфаркт, через 2 ч после развития которого была начата краниocereбральная гипотермия аппаратом ПГ-01 до температуры 26—24 °С в наружном слуховом проходе и 32—30 °С в прямой кишке. Состояние гипотермии поддерживалось в течение 6 ч, после чего производилось активное согревание животных аппаратом ПСТ-01 до ректальной температуры 34 °С. В дальнейшем происходило самосогревание собак до 37—38 °С. Инфаркт моделировался в 2 этапа: на первом этапе в условиях торакотомии под переднюю нисходящую ветвь левой коронарной артерии на границе ее верхней и средней третей подводилась лигатура, на втором — после заживления операционной раны лигатура затягивалась, после чего формировался обширный трансмуральный ИМ, подтверждаемый электрокардиографически. Оперативное вмешательство проводилось под общей анестезией (барбитураты, нейролептанальгезия) на фоне искусственной вентиляции легких. Нейро-вегетативная блокада во время проведения КЦГ обеспечивалась фракционным введением оксибутирата натрия (100 мг/кг/час) и дроперидола (0,15—0,2 мг/кг/час). Регистрация гемодинамических параметров проводилась в исходном состоянии, через 10 мин, 1 ч, 3 ч и 6 ч после развития ИМ с помощью хирургического полиграфа «Салют» и реоплетизмографа РПГ 2—02. Синхронно записывались электрокардиограмма (ЭКГ), кривые давления из восходящей аорты и левого желудочка, тетраполярная грудная реограмма и ее первая производная [8]. Оценка площади повреждения миокарда проводилась путем записи биопотенциалов сердца с поверхности грудной клетки в 49 отведениях методом прекардиального картирования [9]. Изучались следующие показатели: AST — общая площадь с информативными отведениями, т.е. отведениями, в которых регистрировалась элевация сегмента ST электрокардиограммы (одно информативное отведение принималось за 1 см²). Отдельно изучалась площадь отведений с минимальным подъемом сегмента ST — AST_{min} (0,05—0,15 мВ), элевацией средней выраженности — AST_{med} (0,2—0,35 мВ) и максимальной элевацией — AST_{max} (0,4 мВ и выше). Изучалась также динамика зоны трансмурального некроза миокарда AQS (см²). Концентрация циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) в плазме крови (нмоль/л) определялась радиометрическим методом с помощью наборов реактивов фирмы «Amersham» (Англия) по стандартной методике, предложенной фирмой.

Ударный объем сердца (УО) рассчитывался на основании реографической кривой по формуле Кубичека [8]. Входящее в формулу удельное сопротивление крови ρ собак принималось равным 180 Ом · см при температуре 37 °С. Для животных в состоянии гипотермии производился перерасчет ρ , так как с понижением температуры на 1 °С ρ возрастает на 1,5 %. Индекс ударной работы левого желудочка сердца (г · м) находился по формуле: $УИ \cdot (СДД - ЛЖКДД)/69,7$, где УИ — ударный индекс (мл/м²), СДД — среднединамическое давление крови в аорте (мм Hg), ЛЖКДД — левожелудочковое конечно-диастолическое давление (мм Hg). По кривым давления в левом желудочке рассчитывались индексы сократимости левой камеры сердца: $+dp/dt_{max}$ (максимальная скорость подъема давления в левом желудочке, мм Hg/с), индекс Зонненблика (ИЗ) определялся по формуле $+dp/dt_{max}/IIT$ (с⁻²), где IIT — интегральное изометрическое напряжение левого желудочка. Вычислялись — dp/dt_{max} (максимальная скорость снижения давления крови в левой камере сердца, мм Hg/с) и индекс расслабления (ИР) [2]. Определялась также диастолическая жесткость левого желудочка (ДЖЛЖ) по формуле $ЛЖКДД - ЛЖДД_{min}/УО$, где $ЛЖДД_{min}$ — минимальное левожелудочковое диастолическое давление [5] в мм Hg/мл. Данные обработаны методом вариационной статистики по Стьюденту — Фи-

шеру, производился расчет коэффициентов линейной корреляции (r) между отдельными показателями.

Сравнивая сдвиги гемодинамики при инфаркте с течением этой патологии на фоне охлаждения можно отметить, что КЦГ значительно повышает сниженный сердечный выброс. Так, на 3-м ч ишемии показатели дебита и работы сердца возросли в 2 раза ($p < 0,05$); при ИМ УИ — $17,2 \pm 2,8$ мл/м², ИУР — $24,4 \pm 3,1$ г · м, а при ИМ с применением КЦГ, соответственно, $30,4 \pm 0,9$ мл/м² и $55,6 \pm 1$ г · м. На 6-м часу инфаркта это различие еще более выражено, так как ударный выброс при ИМ резко снизился, а при инфаркте, леченном КЦГ, возрос ($p < 0,05$): ИМ — $9 \pm 1,2$ м/м² и $11,7 \pm 3,2$ г · м, а ИМ с применением КЦГ — $37,8 \pm 8$ мл/м² и $40,6 \pm 6,9$ г · м.

Одним из факторов, определяющих величину УО сердца, является сократимость миокарда. При сравнении состояния сократимости на 3-м ч ИМ различия между 2-я группами животных отсутствуют ($p > 0,1$): при ИМ $+ dp/dt_{\max}$ — 5062 ± 300 мм Hg/с, ИЗ — 3545 ± 900 с⁻², а при ИМ с применением КЦГ — 5845 ± 396 мм Hg/с и 3684 ± 240 с⁻², соответственно. На 6-м ч инфаркта сократимость миокарда умеренно снизилась у животных обеих групп, но более выражено в группе, подвергнутой охлаждению: при ИМ $+ dp/dt_{\max}$ — 3938 ± 214 мм Hg/с, ИЗ — 3344 ± 432 с⁻², при инфаркте с применением КЦГ, соответственно, 3875 ± 725 мм Hg/с и 2608 ± 760 с⁻². Эти факты свидетельствуют о том, что сократимость миокарда, по-видимому, не является фактором, обуславливающим рост сердечного выброса или ишемии, леченной с помощью охлаждения.

Другим фактором, повышающим дебит сердца, может быть уровень конечно-диастолического объема желудочка, который тесно коррелирует с ЛЖКДД при условии нормальной ДЖЛЖ. Однако в течение всего периода ишемии ЛЖКДД практически идентично в обеих сериях: при ИМ — 10 ± 2 мм Hg на 3-м ч, $8,4 \pm 4,4$ мм Hg — на 6-м ч, а при ИМ с КЦГ, соответственно, $10,9 \pm 0,6$ мм Hg и 11 ± 1 мм Hg. Таким образом, изменения конечно-диастолического давления в левом желудочке также не могут быть ответственными за рост ударного объема при гипотермии.

Необходимо отметить, что ишемия миокарда резко изменяет механические свойства сердечной мышцы в фазе диастолы, в частности повышая ДЖЛЖ [3,6]. Это означает, что при инфаркте ЛЖКДД уже не может быть критерием изменения конечно-диастического объема (а значит и УО), так как изменения жесткости сердечной стенки выходят за физиологические пределы и определяются реакцией кардиомиоцитов на ишемию, в частности накоплением внутриклеточного Ca²⁺. Очевидно, этим можно объяснить отсутствие достоверных различий ЛЖКДД между животными с ИМ и инфарктом в условиях гипотермии. В наших экспериментах ДЖЛЖ резко возрастала при ИМ: на 10-й мин после затягивания лигатуры ДЖЛЖ увеличивается в 3,5 раза ($p < 0,1$), с $0,618 \pm 0,1$ мм Hg/мл до $2,16 \pm 0,766$ мм Hg/мл, оставаясь выше исходной и на 1-м ч ИМ — $1,114 \pm 0,279$ мм Hg/мл. В течение всего времени исследования наблюдалось достоверное различие ($p < 0,05$) между группами собак, заключающееся в четырехкратном повышении ДЖЛЖ при нормотермической ишемии и нормализации ДЖЛЖ при ишемии в условиях КЦГ: при ИМ ДЖЛЖ равна $1,395 \pm 0,441$ мм Hg/мл на 3-м ч и $2,431 \pm 0,661$ мм Hg/мл на 6-м ч, а при инфаркте с применением КЦГ — $0,364 \pm 0,05$ мм Hg/мл, соответственно, и $0,429$ мм Hg/мл. Исследование связи показателей ДЖЛЖ и УИ продемонстрировало довольно тесную отрицательную корреляцию между ними: на 1-м ч $r = 0,53$, на 3-м—6-м часах от $-0,5$ до $-0,9$ как в нормо- так и гипотермической группах животных, т. е. с увеличением жесткости ударный объем понижается, а с ее понижением (при КЦГ) возрастает.

Нами были проанализированы параметры кардиодинамики, которые наиболее тесно связаны с величиной диастолической жесткости миокарда. Известно, что торможение расслабления миокарда в условиях ишемии, сочетающейся с тахикардией, может приводить к «дефекту диастолы», т. е.

к повышению ЛЖКДД, связанном с увеличением ДЖЛЖ [2]. К 6-й ч нормотермической ишемии максимальная скорость расслабления желудочка уменьшается ($p < 0,05$) до 3227 ± 167 мм Нг/с (исходная $-dp/dt_{\max} = 4504 \pm 216$ мм Нг/с), индекс расслабления снижен ($p < 0,1$) на 10 мин ишемии с $20,2 \pm 2,1$ до $16,1 \pm 1,3$. В гипотермической серии опытов также происходит снижение скорости расслабления, даже более выраженное ($p < 0,05$): на 3-м ч ИМ с КЦГ $-dp/dt_{\max}$ равнялось 3420 ± 980 мм Нг/с, на 6-м ч — 2128 ± 219 мм Нг/с. Однако по другому важному параметру, интервалу времени, в течение которого происходит расслабление желудочка (т. е. длительности диастолы), между группами животных имеется большое различие. На 6-м ч инфаркта диастола максимально укорочена до $0,142 \pm 0,005$ с (исходная — $0,176 \pm 0,014$ с), а на 6-м ч инфаркта, леченого гипотермией, величина диастолы в 2,5 раза больше — $0,374 \pm 0,01$ с ($p < 0,05$). Очевидно, этим и объясняется то, что несмотря на выраженное снижение скорости расслабления при гипотермии ригидность миокарда не нарастает, поскольку стенка желудочка успевает расслабиться в такую длинную диастолу.

Большой вклад в повышение диастолической жесткости могут внести аномальные механические свойства зоны повреждения миокарда, включающей массу пересокращенных саркомеров. Прекордиальное картирование позволило выявить зоны, характеризующиеся подъемом сегмента ST , в значительной мере определяющие диастолическую жесткость пораженного желудочка. Ими оказались $AST_{\min}$, AST_{med} и в наибольшей степени $AST_{\min} + AST_{\text{med}}$ (суммарная площадь зон $AST_{\min}$ и AST_{med} , их коэффициенты корреляции с ДЖЛЖ колебались от $+0,33$ до $+0,76$, максимально возрастая к 6-у ч инфаркта. Так, при ИМ суммарная зона $AST_{\min} + AST_{\text{med}}$ возрастает с $25,5 \pm 2,5$ см² на 10-й мин до $36,8 \pm 2,4$ см² на 6-м ч ишемии, что хорошо коррелирует ($r = +0,76$, $p < 0,05$) с повышением диастолической жесткости миокарда на данном этапе. При инфаркте с проведением КЦГ отмечается тенденция к уменьшению $AST_{\min} + AST_{\text{med}}$ с $32 \pm 3,3$ см² на 10-й мин ишемии до $24,5 \pm 1,7$ см² на 6-м ч ИМ, что также коррелирует ($r = 0,45$, $p < 0,1$) со снижением ДЖЛЖ при гипотермии. То есть, судя по приведенным данным, происходит ограничение зоны повреждения миокарда левого желудочка, которое достаточно тесно коррелирует с увеличением диастолической податливости сердца.

При исследовании гуморальных факторов, связанных с феноменом сохранения большого ударного объема и низкой диастолической жесткости при ишемии миокарда в условиях гипотермии, было обращено внимание на уровень цАМФ в плазме. Широко известна роль катехоламинов, реализующих свой эффект через постсинаптические β -адренорецепторы миокарда и циклический аденозинмонофосфат, «вторичный посредник», запускающий каскад биохимических реакций, обеспечивающих высокую функциональную активность клетки в развитии ишемического повреждения сердечной мышцы. Уровень цАМФ в нормо- и гипотермической сериях разный: если при ИМ вчетверо повышенный относительно нормы уровень ($42,3 \pm 3,8$ нмоль/л), то при ИМ в условиях гипотермии концентрация аденин-нуклеотида уменьшается до нормы ($p < 0,05$) — $15,3 \pm 2,8$ нмоль/л на 3-м ч и $11,2 \pm 1,6$ нмоль/л на 6-м ч. Корреляционный анализ выявил сильную связь между уровнем цАМФ и ДЖЛЖ: $r = 0,76 - 0,96$, $p < 0,05$, максимальную на 6-м ч ишемии как при чистом инфаркте, так и при инфаркте в условиях гипотермии. Выявлена также корреляция средней степени $r = 0,4 - 0,66$ между уровнем цАМФ и $AST_{\min} + AST_{\text{med}}$ с максимальной выраженностью на 6-м ч инфаркта.

Уменьшение ударного объема и ударной работы левого желудочка при ишемии является установленным фактом [1]. В настоящее время известны два механизма регуляции ударного выброса: гетерометрический и геометрический. Гетерометрический механизм Франка — Старлинга обуславливает зависимость дебита от диастолического растяжения (конечно-диастолического объема), которое зависит, во-первых, от венозного притока и,

во-вторых, от степени диастолической жесткости миокарда. Гомеометрический механизм регуляции обуславливает зависимость ударного объема от уровня сократимости миокарда.

Установлено, что при инфаркте миокарда не происходит значительного снижения сократимости миокарда. В противоположность этому гетерометрический механизм повышения выброса значительно угнетен в связи с резким повышением диастолической жесткости миокарда, обусловленным задержкой Ca^{2+} в саркоплазме в условиях ишемии и дефицита макроэргов [7]. Наблюдаемые при КЦГ сохранение и рост выброса связаны не с повышением сократимости (хотя и она сохраняется на достаточно высоком уровне), а со снижением патологически повышенной при ишемии жесткости миокарда. Это приводит к росту конечно-диастолического объема желудочка и позволяет реализовать закон Старлинга.

Механизм вызываемого гипотермией снижения диастолической жесткости не совсем ясен. Исходя из наших данных, анатомическим субстратом, ответственным за нормализацию жесткости при гипотермии, является уменьшение (за счет перехода пораженных кардиомиоцитов в нормальное физиологическое состояние) массы поврежденного миокарда, электрофизиологическим аналогом которой является зона $AST_{\min} + AST_{\text{med}}$. За счет уменьшения зоны повреждения снижается также распространенность области дискинезии миокарда, возникающей на границе между ишемизированным и неишемизированным участками сердечной мышцы [1], вносящей определенный вклад в нарастание жесткости левого желудочка при его ишемии.

Таким образом, гипотермия повышает сниженный при ишемии ударный выброс за счет уменьшения диастолической жесткости миокарда. Снижение диастолической жесткости обусловлено: 1) уменьшением катехоламиновой стимуляции (отражаемой уровнем цАМФ), в результате которой в условиях ишемии увеличивается вход Ca^{2+} в кардиомиоциты, повышающего процент сохраняющихся в диастолу актомиозиновых мостиков и, следовательно, диастолическую ригидность миокарда; 2) уменьшением величины зоны повреждения миокарда, очевидно, вследствие ингибирования холодом процессов потребления энергии в клетках сердца; 3) увеличением длительности диастолы, которая обеспечивает резерв времени для полного расслабления сердца.

1. *Инфаркт миокарда* / Под ред. Э. Кордэя, Х. Дж. К. Свона.— М.: Медицина, 1977.— 213 с.
2. *Меерсон Ф. З., Капелько В. И.* Роль взаимосвязи между силой сокращения и скоростью расслабления миокарда в приспособлении сердца к возрастающей нагрузке // *Кардиология*.— 1973.— 13, № 2.— С. 19—30.
3. *Меерсон Ф. З.* Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца.— М.: Медицина, 1984.— 284 с.
4. *Мурский Л. И.* Краниocereбральная гипотермия (в эксперименте).— М.: Медицина, 1975.— 24 с.
5. *Boyer N. H., Gerstein M. M.* Induced hypothermia in dogs with acute myocardial infarction and shock // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*— 1977.— 74, N 2.— P. 286—296.
6. *Forrester J. S.* Early increase in left ventricular compliance after myocardial infarction // *J. Clin. Invest.*— 1972.— 51, N 6.— P. 598—564.
7. *Henry P. D.* Myocardial contracture and accumulation of mitochondrial calcium in ischemic rabbit heart // *Am. J. Physiol.*— 1977.— 233, N 8.— P. 667—672.
8. *Kubicek W. G., Karnegis S. V.* Development and evaluation of an impedance cardiac output system // *Aerospace Med.*— 1967.— 37, N 10.— P. 1208—1212.
9. *Maroco P. R., Libby P., Braunwald E. et al.* Precordial ST-segment elevating mapping: an atraumatic method for assessing alterations in extent of myocardial ischemic injury // *Amer. J. Cardiol.*— 1972.— 29, N 2.— P. 223—230.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР,
г. Харьков

Получено 29.05.85.

*Н. И. Коцько, Б. П. Сандомирский, П. И. Костя,
А. С. Капрельяни*

ПРИМЕНЕНИЕ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР ПРИ АТИПИЧЕСКИХ РЕЗЕКЦИЯХ ПЕЧЕНИ

Оперативные вмешательства на печени относятся к одному из наиболее трудных разделов хирургии, что обусловлено опасностью массивных кровопотерь, возникновением обширных некрозов паренхимы, истечением желчи в брюшную полость, приводящим к тяжелейшим перитонитам и нарушению дезинтоксикационной функции этого органа. Большинство исследователей, располагая сравнительно небольшим личным опытом операций на печени, используют различные технические приемы гемо- и холестаза [1, 6, 8].

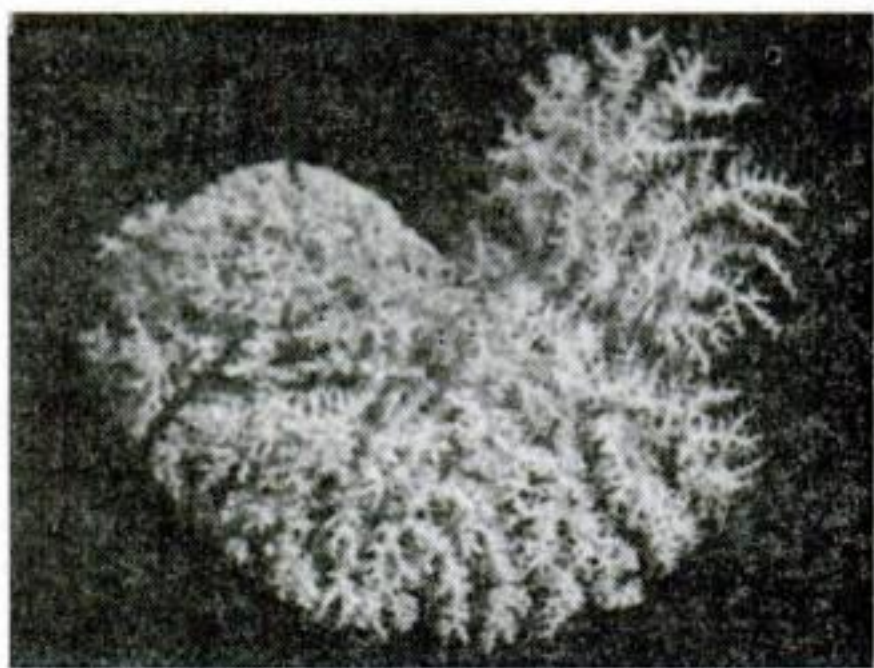
Наряду с традиционными методами остановки кровотечений во время вмешательств на печени в последнее время стали применять низкие температуры, гемостатический эффект которых показан при проведении операций в нейрохирургии, офтальмологии, дерматологии, урологии [2,3,12]. При сравнении различных способов гемостаза из паренхиматозных органов у экспериментальных животных и в клинике [4, 5, 10, 14] отмечается высокая эффективность действия низких температур. В то же время имеются сообщения об отсутствии гемостатического эффекта в мелких сосудах, образовании трещин в паренхиме органа и кровотечении из них после оттаивания [7, 11, 13].

Целью настоящей работы явилась разработка метода низкотемпературного воздействия при криоультразвуковой резекции печени.

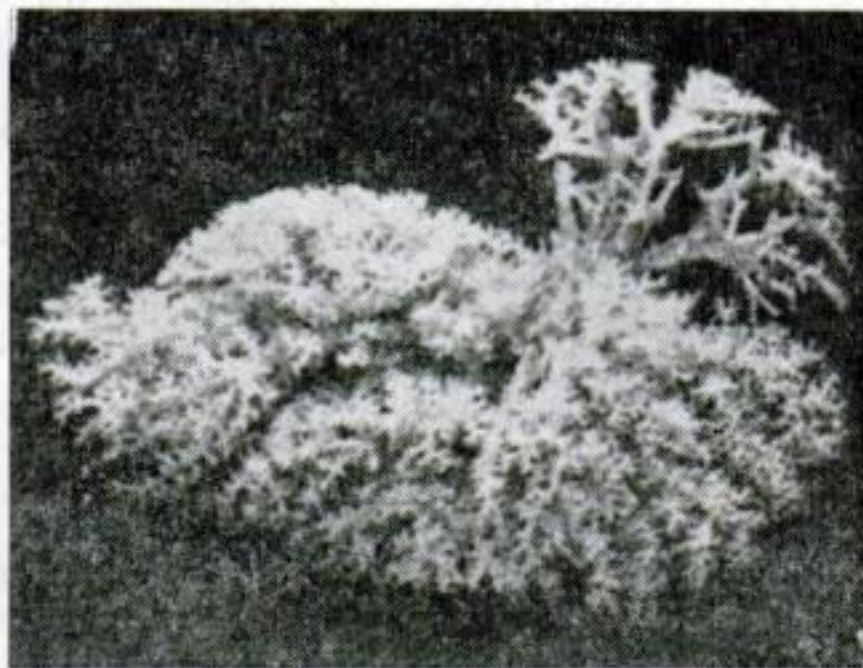
Экспериментальные исследования проведены на 170 кроликах массой 2,5—3 кг и 150 белых крысах массой 140—160 г. Выполнено 63 резекции с использованием традиционных П-образных швов и 257 криорезекций печени. Обезболивание у кроликов достигалось введением тиопентала натрия (50 мг/кг массы), у крыс — эфирным наркозом. После верхнесрединной лапаротомии левая медиальная доля печени выводилась в рану, предполагаемая линия резекции в случае наложения П-образных швов прошивалась и дистальная часть печени отсекалась. Криорезекция осуществлялась следующим образом: предполагаемая линия резекции промораживалась аппликатором диаметром 4 мм (у крыс) и 10 мм (у кроликов), температура рабочей части инструмента была $-180 \div -196^\circ\text{C}$, экспозиция в каждой точке — 2—3 мин, что давало промерзание ткани печени на всю глубину со скоростью охлаждения порядка $60\text{—}70^\circ\text{C}/\text{мин}$. В дальнейшем дистальная часть печени отсекалась ультразвуковым скальпелем типа УРСК-7Н, крупные кровеносные сосуды прошивались одиночными капроновыми лигатурами или электрокоагулировались.

Сосудистое русло воротной вены и желчных ходов изучалось с помощью коррозионных препаратов печени, тушь-желатиновой наливки, портогепатограмм, холангиограмм. Для приготовления коррозионных препаратов сосудов и желчных ходов печени использовали протакрил (в соотношении 1 часть порошка и 6 частей растворителя), который вводили через канюлированную воротную вену и общий печеночный проток под давлением 25—30 мм рт. ст. После полимеризации пластмассы орган извлекали и на 2—3 дня погружали в концентрированный раствор соляной кислоты. На полученных препаратах изучали количество и диаметр кровеносных и желчных сосудов. Для оценки проходимости сосудов замораживаемой зоны печени непосредственно во время операции внутриорганные сосудистое русло и желчные ходы заполняли 10 %-ным раствором медицинской желатины, окрашенного казеиновой тушью в соотношении 9 : 1, что позволяло исследовать количество и диаметр сосудов на разрезе. Портогепатограммы и холангиограммы выполнялись с применением кардиотраста. Вышеуказанные вещества вводили через 10—15 мин после полного оттаивания замороженной зоны под давлением 25—30 мм рт. ст.

Для проведения электронно-микроскопических исследований клинического материала (ткани печени больных после криорезекции) использовали фиксаторы 2 %-ный раствор глutarальдегида в какодилатном буфере и 1 %-ный осмиевый фиксатор. Обезвоживали образцы в ацетонах (50, 70, 90 и 100 %) с последующей заливкой в смесь эпон-аралдит. Ультратонкие срезы делали на ультрамикротоме УМТП-4 и исследовали с помощью электронного микроскопа ЭМВ-100БР.



а



б

Рис. 1. Коррозионные препараты кровеносных и желчных сосудов печени в норме (а) и после криовоздействия на левую долю (б).

На коррозионных препаратах печеночной системы воротной вены обнаружено отсутствие проходимости сосудов диаметром 1—1,5 мм в зоне замораживания (рис. 1 а, б). Аналогичные результаты получены при выполнении тушь-желатиновой наливки воротной вены и желчных ходов. При ангио- и холангиографии отмечался выход контрастного вещества из

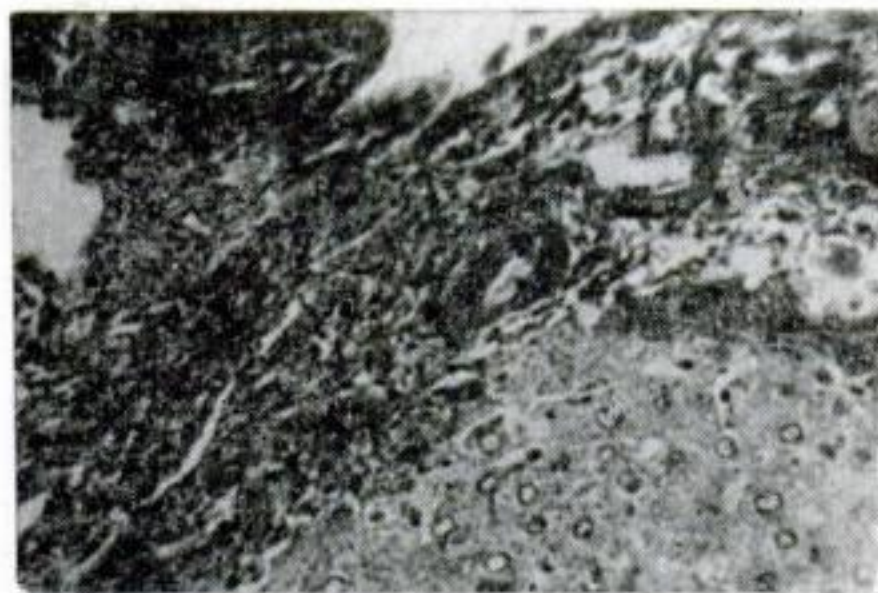
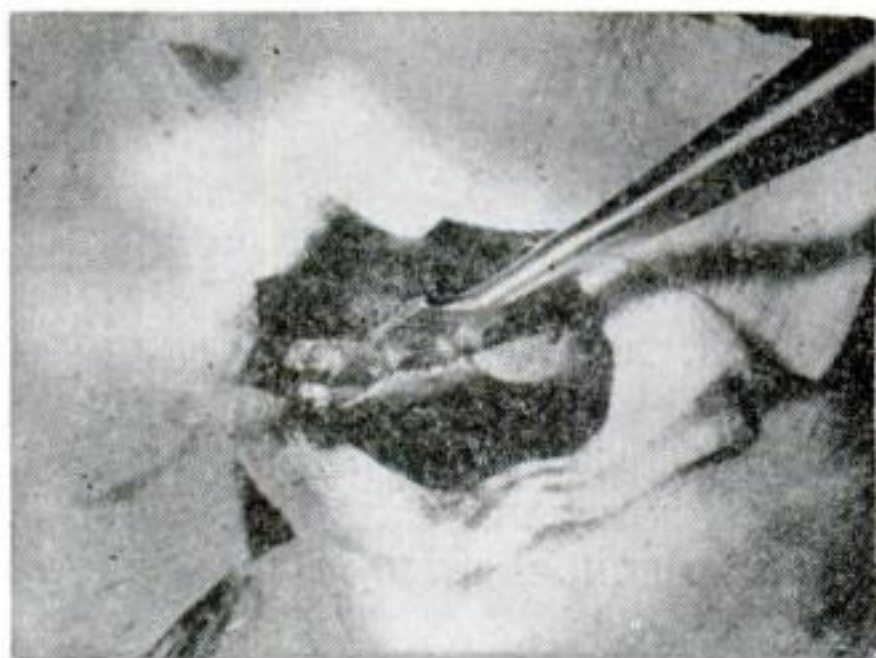


Рис. 2. Криорезекция части левой доли печени ультразвуковым скальпелем.

Рис. 3. Микроструктура опухоли печени человека после криорезекции (полутонкие срезы). Участок опухоли с капсулой, содержащей измененные микрососуды и паренхиматозный компонент опухоли (правый нижний угол снимка). $\times 570$.

мелких сосудов при наложении традиционных П-образных швов. Предварительное замораживание линии резекции и наложение единичных капроновых лигатур на сосуды и желчные ходы среднего и крупного диаметра обеспечивали надежный гемо- и холестаза раны печени.

Полученные экспериментальные данные показали эффективность применения криорезекции печени в клинике. Криорезекция печени при опухолевом поражении проводилась в Харьковском областном онкодиспансере у 8 больных в возрасте от 36 до 57 лет как при единичных метастазах, так и при прорастании опухоли в печень из соседних органов. Общая площадь криовоздействия на ткань печени равнялась 10—75 см² с глубиной промо-

раживания 4—6 см, экспозиция — 7—10 мин, после чего часть органа в пределах здоровых тканей отсекалась ультразвуковым скальпелем (рис. 2), а на крупные кровеносные сосуды накладывались единичные капроновые лигатуры. Кровотечение во время операции было минимальным. Дополнительные способы гемо- и холестаза не применялись, операции заканчивались дренированием подпеченочного пространства перчаточнo-трубочным дренажом. Осложнений, связанных с применением криохирургического метода, не наблюдалось. Продолжительность жизни 4-х больных после этих операций составляет более 4,5 лет.

При микроскопическом и электронно-микроскопическом исследовании ткани печени после криорезекции обнаружены деструктивно-дистрофические изменения, выражающиеся в нарушении нормальной цитоархитектоники, наличии пикнотически измененных ядер и лизисе части цитоплазмы гепатоцитов (рис. 3).

Таким образом, предварительное замораживание ткани печени по линии резекции, выполняемой ультразвуковым скальпелем, надежно блокирует кровеносные сосуды и желчные ходы диаметром 1—1,5 мм. Криорезекция печени с использованием ультразвукового скальпеля при комбинированном хирургическом лечении рака желудочно-кишечного тракта неотягчает ближайший послеоперационный период и не дает специфических осложнений. Применение этого метода позволяет расширить показания к комбинированным операциям при раке желудочно-кишечного тракта в случаях метастатического поражения печени.

1. Альперович Б. И. Спорные вопросы резекции печени // Хирургия.—1978.— № 7.— С. 46—51.
2. Криогенный метод лечения опухолей головы и шеи /А. И. Пачес, Т. П. Птуха, В. В. Шенталь и др.— М.: Медицина, 1987.— 167 с.
3. Криохирургия / Под ред. Э. И. Канделя — М.: Медицина, 1974.— 303 с.
4. Милонов О. Б., Князева Г. Д., Колос О. Е. и др. Криовоздействие в комплексном лечении альвеококкоза и эхинококкоза печени // Хирургия.— 1977.— № 7.— С. 66—70.
5. Писаревский А. А., Войтына С. В. Криогенный метод операций и остановки кровотечения на паренхиматозных органах // Эксперим. хирургия и анестезиол.— 1973.— № 6.— С. 49—52.
6. Сандомирский Б. П., Коцько Н. И., Золочевская Л. И. Эффективность криовоздействия при резекции печени в эксперименте // Вестн. хирургии.— 1979 — № 4.— С. 24—26.
7. Шалимов С. А., Муськин Ю. Н., Рустамов И. Р. и др. Криовоздействие в хирургии печени // Клинич. хирургия.— 1979.— № 9.— С. 37—39.
8. Шапкин В. С. Спорные и неясные вопросы резекции печени // Хирургия.— 1977.— № 2.— С. 85—91.
9. Bengmark S., Hafström L. The natural history of primary and secondary malignant tumors of the liver // Cancer.— 1969.— 23, N 3.— P. 198—202.
10. Breining H., Helpap B., Lumberopoulos S. Gewebsvereisung und ihre Abheilung und Leber und Niere // Dtsch. med. Wochr.— 1972.— 97, N 40.— S. 1519—1520.
11. Dutta P., Montes M., Gage A. A. Experimental hepatic cryosurgery society for cryobiology // Cryobiology.— 1978.— 15, N 6.— P. 711.
12. Green N. A. Cryosurgery of the prostate gland in the unfit subject // Brit. J. Urol.— 1970.— 1, N 1.— P. 10—20.
13. Healey W. V., Priebe C. J., Farren S. M., et al. Hepatic cryosurgery. Acute and long-term effects // Arch. Surg.— 1971.— 103, N 3.— P. 384—392.
14. Helpap B., Grouls V., Lange O., et al. Morphologic and cell kinetic investigations of the spleen after repeated in situ freezing of liver and kidney // Pathology Res. Pract.— 1979.— 164, N 2.— P. 167—177.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР,
г. Харьков

А. А. Цуцаева, Г. Г. Юрченко, Н. Н. Попов, Т. Н. Воскобойникова, Л. П. Водолажская

ИММУННЫЙ СТАТУС БОЛЬНЫХ РАКОМ ШЕЙКИ МАТКИ, ЛЕЧЕННЫХ С ПРИМЕНЕНИЕМ КРИОВОЗДЕЙСТВИЯ

С целью повышения эффективности лечения больным раком шейки матки проводят предоперационное криовоздействие. Криодеструкция опухоли перед операцией приводит к значительному уменьшению ее размеров и девитализации опухолевых клеток. Однако до настоящего времени недостаточно изучена возможность использования криокоагуляции в комплексе с другими методами специального лечения. Не сформулированы четкие показания и противопоказания для применения криовоздействия при лечении ранних стадий рака шейки матки. Мало изучено влияние криовоздействия на защитные силы организма.

Мы поставили перед собой задачу изучить иммунный статус больных раком шейки матки, в комплексном лечении которых применялся криометод.

Под наблюдением находились 35 больных раком шейки матки I-й стадии ($T_{1a}N_0M_0$ и $T_{1b}N_0M_0$) в возрасте от 21 года до 46 лет. В зависимости от вида проведенного лечения больные были разделены на 3 группы. I-й группе (14 больным) было проведено комплексное лечение, включающее криодеструкцию опухоли перед операцией и расширенную экстирпацию матки по методу Вертгейма-Губарева. В комплексном лечении II-й группы больных (11 человек), кроме указанного, был применен курс дистанционной гамма-терапии в дозе по 4000 рад на точки А и В. III-я группа — 10 больных, которым было проведено комбинированное лечение с пред- или послеоперационным курсом лучевой терапии без криовоздействия.

Криовоздействие проводили контактным способом и методом распыления. Если опухоль располагалась у наружного зева, применялся контактный метод криотерапии, при расположении опухоли ближе к сводам влагалища более эффективным оказался метод криораспыления. Криотерапию применяли в случае незначительных микроскопических изменений на слизистой шейки матки и глубине инвазии не более 3 мм. При этом, если в удаленном препарате после криовоздействия опухолевые клетки не обнаруживались, в послеоперационном периоде от лучевой терапии воздерживались. В зависимости от размеров опухоли производилось одно-, двух- или трехкратное воздействие на нее жидким азотом. Время воздействия — от трех до восьми минут.

Иммунологический статус больных исследовали до лечения, в процессе (II-я и III-я группы) и сразу после окончания его, затем спустя 1, 3, 6 и 12 мес. В периферической крови определяли количество (абсолютное в мкл) лейкоцитов, лимфоцитов, содержание среди них Т-, В-, Д-лимфоцитов и О-клеток [1], М-РОК [2], функциональную активность Т-лимфоцитов изучали в реакции бласттрансформации (РБТ), а также определяли уровень иммуноглобулинов А, М, G в сыворотке крови методом радиальной иммунодиффузии [3]. Результаты исследований обработаны статистически и представлены в таблицах 1, 2 и 3. Как видно из табл. 1, у больных I-й группы в процессе лечения повысилось количество лейкоцитов. В последующие сроки наблюдения содержание их было таким же, как до лечения. Существенных изменений в содержании лимфоцитов отмечено не было. Количество Т-лимфоцитов в течение месяца после лечения оставалось в пределах исходных показателей, затем достоверно повысилось; спустя полгода после лечения вновь оказалось в пределах показателей, отмеченных до лечения, а к концу наблюдения существенно возросло. Достоверных количественных изменений В- и Д-лимфоцитов в течение всего периода наблюдения отмечено не было. Содержание О-клеток оказалось повышенным по

окончании лечения и спустя год после него, в остальные сроки исследования достоверных различий с исходными данными не было.

Колебания в содержании иммуноглобулинов в сыворотке крови не выходили за пределы исходных. Лишь к концу наблюдения достоверно повысилась продукция иммуноглобулинов класса М.

При обследовании больных II-й группы, в лечении которых кроме криохирургического метода применялся лучевой, установлено следующее. Наблюдавшийся в процессе лечения лейкоцитоз сменился лейкопенией к концу месяца после лечения. В последующем количество лейкоцитов в периферической крови больных не отличалось от исходного. В течение 1-го мес после окончания лечения наблюдалась лимфопения, после чего количественных различий в содержании лимфоцитов по сравнению с исходными показателями не было. Содержание Т-лимфоцитов оставалось сниженным в течение 3-х мес, тенденция к достоверному различию с исходным показателем прослеживалось и в следующий срок исследования — спустя 6 мес после лечения; уменьшение количества В- и Д-лимфоцитов отмечалось лишь по окончании лечения, в остальные периоды наблюдения оно было таким же, как до лечения. Содержание О-клеток оказалось сниженным при исследовании спустя месяц после лечения и оставалось таковым до конца срока наблюдения. В сыворотке крови больных этой группы после окончания лечения повысилось содержание иммуноглобулинов класса А и оставалось на достигнутом уровне до конца срока наблюдения (за исключением данных, полученных при обследовании через 6 мес после лечения, которые не превышали исходных показателей). Концентрация иммуноглобулинов, достоверно повысившись с 1-го мес, оставалась на достигнутом уровне до конца наблюдения. Содержание иммуноглобулинов класса М оказалось выше исходных показателей при определении спустя 3 мес после лечения, в остальные периоды наблюдения оно было в пределах исходных показателей.

В крови больных III-й группы во все сроки исследования, начиная с 1-го мес после лечения, количество лейкоцитов было достоверно ниже исходного. Содержание лимфоцитов снизилось сразу после окончания лечения и оставалось сниженным в течение полугода, лишь к концу срока наблюдения достигнув исходного показателя. Количество Т- и В-лимфоцитов было ниже, чем до лечения, на протяжении 6-и мес, Д-лимфоцитов — в течение 1-го мес после окончания лечения. Наиболее выраженно снизилось содержание О-клеток: оно было достоверно ниже исходного в течение всего периода наблюдения. В динамике продукции иммуноглобулинов существенных сдвигов не отмечалось. По окончании лечения оказалось повышенным содержание иммуноглобулинов класса А. При обследовании больных через полгода после лечения количество иммуноглобулинов класса М в сыворотке крови было несколько снижено ($0,1 > p > 0,05$). Содержание иммуноглобулинов G было повышенным через 3 и 12 мес. Существенных сдвигов в содержании лимфоцитов, имеющих рецепторы к эритроцитам мыши (М-РОК), не было у всех наблюдаемых больных.

При анализе функциональной активности Т-лимфоцитов в реакции бласттрансформации на ФГА было установлено, что у больных I-й группы после лечения увеличение индекса стимуляции в 4—10 раз происходит чаще ($p < 0,001$), чем у больных II-й и III-й групп. При клиническом наблюдении за больными отмечено, что в послеоперационном периоде состояние больных I-й группы было лучшим, чем больных II-й и III-й группы, т. е. больные легче переносили сочетание операции с криообработкой шейки матки, чем операцию в сочетании с лучевым фактором, причем пребывание в стационаре больных, леченных криохирургическим методом без лучевого компонента, сокращалось на 3—4 недели. К концу срока наблюдения состояние всех наблюдаемых больных оставалось хорошим, данных о наличии метастазов не было.

Таким образом, полученные результаты исследований позволяют заключить, что при лечении ранних стадий рака шейки матки $T_{1a}N_0M_0$ и

Примечание. P — здесь и в последующих таблицах получен при сравнении с исходным (до лечения) показателем.

Таблица 2. Содержание Т-, В-, О- и Д-лимфоцитов в периферической крови больных (абсолютное количество в 1 мкл, $(X \pm S\bar{x})$)

Группа больных	Число бол.ых	Популяция лимфоцитов	Сроки исследования						
			До лечения	В процессе лечения	По окончании лечения	После лечения (мес)			
						1	3	6	12
I	14	T	504,0 ± 105,2	не определяли	556,0 ± 66,7 $p > 0,1$	580,0 ± 55,5 $p > 0,1$	942,0 ± 86,3 $p < 0,1$	627,2 ± 108,8 $p > 0,1$	810,0 ± 97,2 $p < 0,02$
		B	100,6 ± 22,4	»	139,0 ± 22,2 $p > 0,1$	133,1 ± 37,5 $p > 0,1$	141,3 ± 34,5 $p > 0,1$	128,0 ± 28,2 $p > 0,1$	129,6 ± 22,7 $p > 0,1$
		Д	32,5 ± 7,8	»	40,3 ± 7,3 $p > 0,1$	39,3 ± 7,2 $p > 0,1$	50,6 ± 13,2 $p > 0,1$	35,8 ± 14,1 $p > 0,1$	45,4 ± 8,1 $p > 0,1$
		О	482,9 ± 45,1	»	654,7 ± 32,4 $p < 0,02$	456,8 ± 33,4 $p > 0,1$	436,2 ± 44,6 $p > 0,1$	489,0 ± 50,3 $p > 0,1$	635,0 ± 42,6 $p < 0,05$
II	11	T	687,3 ± 55,8	708,9 ± 80,6 $p > 0,1$	339,3 ± 31,3 $p < 0,001$	407,0 ± 31,8 $p < 0,001$	513,6 ± 42,8 $p < 0,02$	483,6 ± 81,8 $p > 0,1 > 0,05$	656,0 ± 72,0 $p > 0,1$
		B	119,7 ± 21,3	139,0 ± 41,7 $p > 0,1$	60,9 ± 6,1 $p < 0,01$	96,2 ± 19,9 $p > 0,1$	96,3 ± 23,5 $p > 0,1$	142,0 ± 24,0 $p > 0,1$	163,6 ± 19,8 $p > 0,1$

																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															</
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----

Таблица 3. Содержание иммуноглобулинов А, М и G в сыворотке крови больных, мг % ($\bar{X} \pm S\bar{X}$)

Группа больных	Число больных	Иммуногло- булины	Сроки исследования						
			До лечения	В процессе лечения	По окончании лечения	После лечения (мес)			
						1	3	6	12
I	14	A	184,0 ± 30,1	не определяли	214,0 ± 31,4 $p > 0,1$	187,0 ± 52,4 $p > 0,1$	268,0 ± 68,5 $p > 0,1$	238,0 ± 37,9 $p > 0,1$	199,0 ± 18,0 $p > 0,1$
		M	166,0 ± 20,9	не определяли	206,0 ± 27,0 $p > 0,1$	138,0 ± 9,8 $p > 0,1$	218,0 ± 44,4 $p > 0,1$	247,0 ± 60,8 $p > 0,1$	280,0 ± 27,3 $p < 0,01$
		G	1162,0 ± 243,5	не определяли	1324,0 ± 223,9 $p > 0,1$	1056,0 ± 148,5 $p > 0,1$	1532 ± 148,5 $p > 0,1$	1370,0 ± 130,9 $p > 0,1$	1075,0 ± 134,2 $p > 0,1$
II	11	A	145,0 ± 14,3	207,0 ± 30,5 $p > 0,1$	234,0 ± 22,4 $p < 0,01$	280,0 ± 62,4 $p < 0,05$	292,0 ± 64,5 $p < 0,05$	175,0 ± 29,0 $p > 0,1$	294,0 ± 12,8 $p < 0,001$
		M	158,0 ± 31,0	225,0 ± 40,8 $p > 0,1$	137,0 ± 14,0 $p > 0,1$	178,0 ± 29,2 $p > 0,1$	289,0 ± 55,6 $p < 0,02$	218,0 ± 68,4 $p > 0,1$	290,0 ± 58,0 $p < 0,1 > 0,05$
		G	807,0 ± 60,0	990,0 ± 232,5 $p > 0,1$	1099,0 ± 153,5 $p > 0,1$	1681,0 ± 219,4 $p < 0,05$	1498,0 ± 161,4 $p < 0,01$	132,0 ± 170,8 $p < 0,02$	1850,0 ± 356,0 $p < 0,02$
II	10	A	190,0 ± 31,6	216,0 ± 48,8 $p > 0,1$	280,0 ± 24,0 $p < 0,05$	217,0 ± 18,2 $p > 0,1$	192,0 ± 17,8 $p > 0,1$	192,0 ± 54,4 $p > 0,1$	162,0 ± 10,0 $p > 0,1$
		M	130,0 ± 5,6	150,0 ± 18,2 $p > 0,1$	206,0 ± 46,5 $p > 0,1$	166,0 ± 41,8 $p > 0,1$	249,0 ± 70,8 $p > 0,1$	109,0 ± 9,2 $p < 0,1 > 0,05$	125,0 ± 21,6 $p > 0,1$
		G	885,0 ± 124,4	1110,0 ± 213,3 $p > 0,1$	1283,0 ± 248,0 $p > 0,1$	1426,0 ± 389,6 $p < 0,1$	1397,0 ± 109,4 $p < 0,01$	1276,0 ± 265,8 $p > 0,1$	1313,0 ± 121,4 $p < 0,05$

и $T_{1b}N_0M_0$ ценным лечебным фактором в дополнение к оперативному является криодеструкция опухоли. Этот метод прост и не осуждает технику последующей радикальной операции. В отличие от лучевого он не только не угнетает защитные силы организма, но, как следует из полученных данных, оказывает некоторое стимулирующее действие на них. В частности, если у больных, леченных рентгенхирургическим методом без криокомпонента, лимфопения и снижено количество Т- и В-лимфоцитов в периферической крови в течение 6 мес после лечения, то у больных, леченных тем же методом, но с включением в комплекс терапии предоперационного криовоздействия, с 3-го мес после лечения количество лимфоцитов повышалось до исходного уровня, содержание В-лимфоцитов было сниженным только в первый срок исследования (по окончании лечения); содержание Т-лимфоцитов, снизившись под влиянием облучения, достигло исходного уровня у этой группы на 3 мес раньше, чем у больных III-й группы, а в сыворотке крови повышалось содержание иммуноглобулинов, в частности, IgM. У больных, леченных криохирургическим методом без лучевого компонента, после лечения лимфопении не было, повышалось содержание Т-лимфоцитов и их бласттрансформирующая активность, увеличивалась концентрация иммуноглобулинов класса М в периферической крови, что может свидетельствовать о положительном влиянии криовоздействия на иммунный статус организма больного.

1. Гришина Т. И., Мюллер С. Одновременное выявление Т-, В, и Д-розеткообразующих лимфоцитов и нулевых клеток человека // Бюлл. exper. биол. и мед. — 1978, № 4. — С. 503—506.
2. Чередыев А. Н., Грунов Р., Ковальчук Л. В. Значение теста спонтанного розеткообразования с эритроцитами мышей в комплексном количественном анализе В-лимфоцитов человека // Бюлл. exper. биол. и мед. — 1980. — № 7. — С. 70—73.
3. Mancini G., Carbonara A. O., Heremans J. F. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion // Immunochemistry. — 1965. — 2, N 3. — P. 235—254.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР,
г. Харьков

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 57.043:612.111.014.41

Ю. В. Кононов, Т. Г. Федорова

ИЗУЧЕНИЕ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ЭРИТРОЦИТОВ

Целью настоящего исследования явилось изучение серологических особенностей эритроцитов при хранении их в замороженном состоянии для дальнейшего применения в клинической практике. Были изучены серологические особенности эритроцитов крови 27 доноров. Антиген А содержало 16 образцов, В — 8 образцов, А и В — 1 образец, М — 8 образцов, N — 9 образцов, М и N — 9 образцов. Среди них 22 образца положительных по антигену Rh_0 (D), 22 — по антигену rh' (C).

Способность к агглютинации антигенов А, В, D, С, М и N изучалась нами в свежезаготовленной эритроцитарной массе после смешивания с криопротекторами: глицерином (ЦОЛИПК 11₄), 1,2-пропандиолом и полиэтиленоксидом молекулярной массы 1500 (ПЭО-1500), а также после размораживания эритроцитов, хранившихся в этих растворах при температуре -196°C в течение 1 сут, 1 мес, 6 мес и 1 года. Исследование активности антигенов А, В, D, С проводилось по специально подобранным двум сетям стандартных сывороток высокого титра (1 : 64), изготовленных в лабораториях Харьковской областной станции переливания крови. Активность антигенов М и N определялась гетероиммунными сыворотками анти-М и анти-N, изготовленными в Ленинградском НИИ вакцин и сывороток. Определение активности антигенов А, В, М и N проводилось на глазурованных белых плитках при комнатной температуре, антигенов системы резус — методом конглоутинации с применением желатинны при температуре $+46^\circ\text{C}$.

Как правило, после смешивания эритроцитов с защитными растворами до замораживания активность антигенов *A* и *B* не изменялась. Лишь в 2-х образцах из 16 активность антигена *A* оказалась несколько сниженной — наступала на 18—19 секундах. После замораживания и последующего оттаивания эритроцитов под защитой различных криопротекторов, независимо от сроков хранения (от 1 сут до 1 года), агглютинация антигенов *A* и *B* хотя и была несколько менее выраженной, чем в свежезаготовленных клетках, но оставалась достаточно интенсивной даже через 12 мес хранения их в замороженном состоянии. Таким образом, в течение всего периода наблюдения (от 1 сут до 1 года) агглютинация антигенов *A* и *B* сохранялась достаточно четкой и никаких сомнений при определении группы крови мы не отмечали.

Антигены системы резус уже после добавления к эритромассе защитных растворов ЦОЛИПК 11₄ и 1,2-пропандиола несколько снижали свою агглютинационную активность. Это снижение продолжалось в течение всего времени хранения взвеси в замороженном состоянии и к концу срока, т. е. к 12 мес агглютинабельность антигенов резус значительно снизилась по сравнению с исходной. Более того, в некоторых случаях (в 10 из 22) антиген *rh'* (*C*) не определялся вовсе, в некоторых (6 случаев) — агглютинабельность антигена *rh'* (*C*) определялась как сомнительная. Агглютинация антигенов *M* и *N* не снижалась от добавления защитного раствора ПЭО-1500 и снижалась на 1 ступень при добавлении криопротекторов ЦОЛИПК 11₄ и 1,2-пропандиола. В течение всего периода наблюдения (от 1 дня до 12 мес) агглютинационная активность антигенов *M* и *N* оставалась на том же уровне. При переливании крови длительных сроков хранения следует учитывать отмеченные особенности замороженной и хранившейся в замороженном состоянии крови. Особенно тщательной должна быть паспортизация крови, предназначенной для длительного хранения, с обязательным указанием группы, резус-принадлежности и типа крови по системе *MNS_s*.

Харьковская областная станция переливания
крови МЗ УССР

Получено 17.05.85

УДК 57.043

П. Г. Исерович

РОЛЬ ГИДРОСТАТИЧЕСКОГО ДАВЛЕНИЯ В ПОВРЕЖДЕНИИ КЛЕТОК ПРИ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОМ КОНСЕРВИРОВАНИИ

При замораживании клеточных суспензий растущие кристаллы льда либо оттесняют клетки в каналы с концентрированным раствором, либо захватывают их, образуя жидкие включения. Поскольку плотность образующегося льда меньше плотности расплава, вымерзание воды приводит к возрастанию давления. Если рассмотреть задачу о затвердевании маленького включения радиусом R_0 внутри большого идеально упругого кристалла льда, то легко получить оценку величины давления при сокращении радиуса включения до R :

$$P_1 \sim \frac{\left(\frac{\rho - \rho_L}{\rho}\right) \left(\frac{R_0}{R^3} - 1\right) + \frac{(4 - 3\sigma)}{2E} P_2}{\frac{K}{3} + \frac{1 + \sigma}{2E}}, \quad (1)$$

где ρ — плотность расплава, ρ_L — плотность льда, K — модуль сжимаемости воды, E — модуль Юнга для льда, σ — коэффициент Пуассона для льда, P_1 — давление во включении, P_2 — внешнее давление. Предполагая $P_1 \gg P_2$, $\frac{\rho - \rho_L}{\rho} \approx 0,1$, $E \sim 2,76 \times 10^4$ атм, $K \sim 4,5 \cdot 10^{-5}$ атм⁻¹

$$P_1 \sim 2,6 \cdot 10^3 \left(\frac{R_0^3}{R^3} - 1\right) \text{ атм.} \quad (2)$$

Согласно этой оценке, достаточно замерзнуть 1/6 части внутриклеточной воды для достижения давления порядка 500 атм и 1/2 части — для 2000 атм. Однако под нагрузкой лед ведет себя как упруговязкопластичное тело [1]. Для оценки максимально достигаемых напряжений $\sigma_{\max}$ в макроскопическом случае в опытах на монокристаллах льда применяют соотношение [7]

$$\sigma_{\max} = A \dot{\epsilon}^{1/n} \exp(E/kT), \quad (3)$$

где $\dot{\epsilon}$ — скорость деформации, E — энергия активации, A — константа, зависящая от исходной дефектности льда. Ее значение уменьшается, если во льду увеличивается исходная плотность дислокаций, как это бывает в опытах с предварительно деформированным льдом [5]. В микроскопическом случае все обстоит несколько сложнее, так как в уравнении (3) следует использовать локальные значения параметров. Однако качественно можно сделать вывод об уменьшении максимального давления, достигае-

мого при замерзании включений с увеличением их плотности в единице объема, поскольку существуют экспериментальные данные о прямой связи плотности дислокаций в кристалле с числом захваченных включений [2]. Биологические материалы обладают различной чувствительностью к высоким давлениям, которые могут вызывать гибель вегетативных бактериальных клеток [3]. Приведенные выше оценки позволяют объяснить явление повышения выживаемости этих клеток после криоконсервирования при увеличении их плотности в единице объема снижением максимального давления, развивающимся при замерзании замкнутых включений, содержащих клетки [4].

1. Зарецкий Ю. К., Чумичев Б. Д. Кратковременная ползучесть льда. — Новосибирск: Наука, 1982. — 177 с.
 2. Цинкобер А. И., Ходжи В. Е., Гордиенко А. А., Самойлович М. И. Природа дефектов в синтетическом α -кварце // Рост кристаллов. — 1965. — Вып. 4. — С. 22—36.
 3. Крисс А. Е. Жизненные процессы и гидростатическое давление. — М.: Наука, 1973. — 271 с.
 4. Kouzou Tanno. An explanation for the cell concentration dependent survival of *E. coli* after freeze — thawing // Society of Cryobiology: Fifteenth Annual Meeting Program and Abstracts. — Tokyo. — 1978. — Abstract 30.
 5. Higashi A. Mechanical properties of ice single crystals // Physics of Ice: Proc. Intern Symp. of Physics of Ice. — Munich (Sept. 1968). — 1968. — P. 9—14.
- Институт проблем криобиологии и криомедицины
АН УССР, г. Харьков

Получено 16.04.85

ХРОНИКА

РЕСПУБЛИКАНСКАЯ ШКОЛА «КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ»

(Харьков, 20—28 сентября 1985 г.)

Научный совет по криобиологии и Институт проблем криобиологии и криомедицины АН УССР провели занятия республиканской школы. Приняли участие 120 молодых специалистов из Москвы, Харькова, Киева, Пущино, Оболенска, Ленинграда, Минска, Тбилиси и др. городов. Перед ними выступили ведущие ученые страны. В докладе директора института В. И. Грищенко были освещены задачи и перспективы развития криобиологии и криомедицины, основные направления фундаментальных и прикладных разработок в нашей стране и за рубежом. Лекция А. М. Утевского посвящена философским проблемам криобиологии и значению этой дисциплины в системе общей биологии. Проблемы развития методов криоконсервации биологических объектов обобщены в докладе Н. С. Пушкаря. Методические подходы для изучения внутримолекулярных перестроек мембран и клеток при замораживании — отогреве изложены в лекциях В. Л. Боровягина, В. Я. Волкова и А. С. Капрельянца. Подчеркнуто значение и целесообразность дальнейшего совершенствования расчетов научных данных методами специального планирования экспериментов математической статистики (А. Н. Лисенков). Существенное значение для развития фундаментальных исследований в области криобиологии имеют разработки, касающиеся термодинамики процессов, протекающих в биообъектах ниже 0 °С и роли воды, как фактора, обеспечивающего поддержание нативной конформации биополимеров и их репарацию в цикле замораживания — отогрева (С. И. Аксенов, Н. Г. Бакрадзе), а также данные о молекулярных механизмах их криозащиты (В. А. Монсеев). Значение проблем криозащиты биообъектов на основе многокомпонентных сред освещено в сообщении М. И. Шраго. Изучению механизмов криоповреждений биологических объектов на молекулярно-клеточном уровне посвящены лекции А. М. Белоуса, Е. И. Слобожаниной, В. А. Бондаренко и В. Л. Бронштейна, которые показали значение термального шока клеток, развитие внутримолекулярных перестроек липид-белковых комплексов мембран и роли физико-математических моделей для обобщения и анализа названных процессов. В лекции Г. Б. Сергеева излагались данные о кинетических особенностях биохимических реакций при низких температурах. А. И. Осецкий доложил об особенностях кинетики биологических реакций в присутствии вязких криопротекторов. В докладе Т. Н. Юрченко и Н. Н. Попова изложены задачи развития морфологических и криоиммунологических исследований при криоконсервации клеточных суспензий, тканей и органов. Современное состояние проблемы криоконсервации крови, ее значение для медицинской практики, а также связанные с этим вопросы размораживания биологических объектов были изложены в докладах Л. И. Федоровой и Г. С. Лобынцевой. Медицинские аспекты низких температур затронуты в лекциях Г. А. Бабийчука, В. И. Запорожана, Б. П. Сандомирского и А. Б. Рикберга, в которых освещались теоретические разработки и прикладные данные по использованию в медицинской практике гипотермии и комбинированных методов криотерапии и криохирургии в аспекте развития и совершенствования способов управления криодеструкцией тканей и криостимуляцией восстановительных процессов. Актуальные проблемы криофитобиологии были освещены в сообщениях

О. А. Красавцева, В. Д. Мануильского и М. А. Соловьевой. Математический прогноз температуры для размеров замороженной области рассмотрен в лекции А. А. Березовского. Вопросы молекулярной криобиологии, посвященные проблемам трансмембранных дефектов и роли воды в криоповреждении клеток, а также биохимической кинетике при низких температурах обсуждались на семинаре «Механизмы холодовых повреждений клеток». Важная роль в процессах низкотемпературной перестройки мембран принадлежит фракциям воды, локализованной в клетке и на поверхности биополимеров (В. Я. Волков, С. И. Аксенов), которая регулирует жидкокристаллическое состояние липидов и конформационное состояние белков.

На заседании семинара «Холод как лечебный фактор» были обсуждены вопросы влияния краниocereбральной гипотермии на нейро-медиаторные механизмы терморегуляции, результаты криотерапии при ожогах, гнойных ранах и послеожоговых рубцах. Н. И. Коцько сообщил о результатах криотерапии при атипических резекциях печени в эксперименте.

На семинаре «Калориметрические методы в изучении процессов, происходящих в криозащитных средах при низких температурах», обсуждено сообщение Е. А. Гордиенко о термодинамическом подходе к описанию криобиологических процессов.

На семинаре «Ультраструктурные исследования в криобиологии» подчеркнута возможность и эффективность электронно-микроскопического подхода в изучении таких важных вопросов, как закономерности кристаллообразования в клетках и их окружении, характере близкого взаимодействия льда с клетками, а также структурные изменения мембран (А. М. Белоус, В. Л. Бронштейн, А. Б. Рикберг, П. Г. Исерович, И. П. Катков, А. С. Капрельянц).

А. М. Белоус, А. С. Снурников, В. И. Загнойко

РЕФЕРАТЫ

Задачи криобиологии в ускорении научно-технического прогресса. — Криобиология, 1986, № 1, с. 3—5.

В статье сообщается о достижениях в области криобиологии и криомедицины, о предложениях по составлению программы координации действий ученых в этой области науки.

УДК 57.043

Биология и криобиология обратимой остановки жизнедеятельности: регуляция и функциональный обмен / Утевский А. М. — Криобиология, 1986, № 1, с. 5—11.

Работа содержит теоретический анализ вопросов становления биологического обмена (БО) и его специализированных функциональных звеньев. Изложена концепция автора о роли в формировании БО факторов ауторегуляции, трансформирующихся в общую регуляцию («регулируемый и регулирующий обмен»), и процессов «самообновления» биоструктур и структуризации обмена («структурируемый и структурирующий обмен»). Приложение этих представлений к вопросам жизнедеятельного и жизнеспособного состояний биообъектов в условиях погружения в искусственный холодный (низкотемпературный) анабиоз и выхода из него заставляет предполагать участие в этом не просто торможения и растормаживания все время сохраняющегося БО, а сложные его перестройки и своеобразную «самосборку» в процессе релаксации, от реализации которой в значительной мере зависит эффективность криоконсервирования биообъектов.

Ил. 1. Библиогр.: 7 назв.

УДК 57.043:577.37

Криоустойчивость и структурная организация липосом, содержащих рифампицин и тетрациклин / Благой Ю. П., Цыганенко А. Я., Зимогляд Б. Н., Леонтьев В. С., Васильченко В. Н., Шкорбатов А. Г. — Криобиология, 1986, № 1, с. 11—15.

Методами поляризационного светорассеяния изучены в состоянии гидрозоля лецитиновые липосомы, содержащие рифампицин и тетрациклин. Показана возможность определения значения z-среднего диаметра липосом в условиях неупругого светорассеяния, осложненных кинетикой некоторых фотохимических и структурных превращений. По экспериментальным индикатрисам дана оценка относительного расширения площади зоны структурной неустойчивости оболочки, которое, по-видимому, представляет один из основных вкладов в латеральную неоднородность липосом. Найдено, что в лецитиновых липосомах рифампицин связан, главным образом, с липидной мембраной, а тетрациклин — с внутрилипосомной водной фазой. Обнаружено существенное возрастание структурной и агрегационной устойчивости деконсервированных липосом, обусловленное, по-видимому, изменением при криовоздействии взаимодействия молекулы рифампицина со структурой лецитиновых слоев.

Ил. 5. Библиогр.: 4 назв.

Влияние ультразвука на переохлаждение воды и некоторых биологических сред / Есьман С. С., Лыков И. Г., Рикберг А. Б. — Криобиология, 1986, № 1, с. 15—18.

Изучали влияние ультразвука малой интенсивности (от 0,05 до 0,5 Вт/см²) на величину переохлаждения воды и некоторых водных систем. Получена зависимость температуры начала кристаллизации образцов воды объемом 1 см³ от интенсивности ультразвука с частотой 880 кГц. Приведены сравнительные данные о температурах начала кристаллизации в растворах Хэнкса, глицерина, ПЭО-300 и желатиновом геле в ультразвуковом поле. Обсуждаются возможные механизмы взаимодействия ультразвука с переохлажденными водными системами.

Ил. 2. Табл. 1. Библиогр.: 14 назв.

УДК 57.043

Замораживание спермы морских ежей до температуры —196° С / Межевикина Л. М., Красте И. В., Вепринцев Б. Н. — Криобиология, 1986, № 1, с. 18—20.

Сперму морских ежей *Strongylocentrotus intermedius* и *Strongylocentrotus nudus* замораживали до —196 °С в морской воде с криопротекторами (1 М глицерин, 1,5 М ДМСО, 1,5 М этиленгликоль). Эквilibрацию с криопротектором проводили в течение 15 мин при 0 °С. При —7 °С искусственно инициировали кристаллизацию льда. До —40 °С сперму замораживали с постепенно возрастающей скоростью от 0,3 до 1,5 °С/мин, затем переносили в жидкий азот. Отогрев проводили в водяной бане при 20 °С. Этиленгликоль обладает лучшими криозащитными свойствами для спермы двух видов морских ежей. Почти все оплодотворенные яйцеклетки нормально развивались до стадии плутеуса.

Ил. 1. Табл. 3. Библиогр.: 3 назв.

УДК 597.554:576.3

Влияние температурного и осмотического шока на ультраструктуру спермиев карпа *Syrpinus carpio* L. (Cyprinidae) / Скорняков Б. А., Говоруха Т. П., Копейка Е. Ф. — Криобиология, 1986, № 1, с. 21—23.

Установлено, что действие температурного и осмотического шока характеризуется сходными проявлениями, а именно разрушением цитолеммы, образованием неоднородной структуры цитоплазмы в шейке спермия, появлением пузырьковидных полостей, отслоением и набуханием цитолеммы хвоста. Выявленные нарушения ультраструктуры спермиев могут быть определены как осмотически обусловленные.

Ил. 1. Табл. 1. Библиогр. 12 назв.

УДК 576.8.093:576.8.095

Жизнеспособность и биохимическая активность дрожжей *Saccharomyces vini* при сублимационном высушивании и криоконсервации / Сидякина Т. М., Кузнецова Е. В., Чумакова М. Ю. — Криобиология, 1986, № 1, с. 23—28.

Наилучшим режимом консервации культур винных дрожжей является медленное замораживание со скоростью 1 °С/мин в 20 %-ном растворе глицерина. Жизнеспособность дрожжей при криоконсервации в этих условиях близка к 100 %, технологические свойства дрожжей стабильны при длительном хранении в жидком азоте.

Ил. 4. Табл. 3. Библиогр.: 11 назв.

УДК 57.043:576.347

Исследование температурной зависимости восстановления свободных радикалов в митохондриях / Цымбал Л. В., Монсеев В. А., Мишнева Л. Г. — Криобиология, 1985, № 16, с. 28—31.

Работа посвящена исследованию структурных характеристик мембран в зоне положительных и отрицательных температур. Применение метода ЭПР спиновых зондов позволяет получать информацию о состоянии электрон-транспортной цепи митохондриальных мембран при понижении температуры. Показаны структурные изменения мембран около 12, 6, —12 °С и увеличение скорости восстановления стабильных радикалов после внеклеточной кристаллизации.

Ил. 4. Библиогр.: 9 назв.

УДК 57.022

Электрофизиологические параметры функционирования сердца сусликов (*Cytellus undulatus*) в процессе пробуждения от зимней спячки / Жегунов Г. Ф. — Криобиология, 1986, № 1, с. 31—34.

Методом ЭКГ изучали динамику электрофизиологических процессов миокарда сусликов при гибернации, а также во время пробуждения их от зимней спячки. Установлены существенные изменения в деятельности сердца гетеротермных животных. Показана способность «холодного» миокарда при пробуждении функционировать на уровне органа активных животных.

Ил. 5. Библиогр.: 7 назв.

УДК 547.963:576.3+612.419

Влияние криоконсервирования на топологические переходы суперспиральной ДНК «нуклеонидов» клеток костного мозга человека / Ващенко Т. Н., Ващенко В. И., Петренко Г. И., Багаутдинов Ш. М., Калеко С. П.— Криобиология, 1986, № 1, с. 34—38.

Изучалось состояние суперспиральной ДНК (ссДНК) «нуклеонидов» клеток костного мозга человека до и после криоконсервирования под защитой диметилацетамида (ДМАЦ) и полиэтиленоксида (ПЭО-400). Показано, что ДМАЦ и ПЭО-400 вызывают значительное увеличение вязкости «нуклеонидов» при максимально релаксирующей концентрации этидий бромид в лизирующей смеси.

Ил. 2. Табл. 1, Библиогр.: 12 назв.

УДК 615.832.9:616.127—005.8

Насосная функция ишемизированного миокарда при краниocereбральной гипотермии / Бабийчук Г. А., Белостоцкий А. В., Арцыбушев Ю. Н.— Криобиология, 1986, № 1, с. 38—48.

Собакам с острым экспериментальным инфарктом миокарда проводилась краниocereбральная гипотермия до температуры 26—24 °С в мозге и 32—30 °С в прямой кишке в течение 6 ч. Установлено, что величина ударного выброса сердца на 6-м ч инфаркта миокарда у животных, которым проводилась гипотермия, в 4 раза превышает таковую в условиях нормотермии и обусловлена сохранением нормальной диастолической жесткости левого желудочка в отличие от пятикратного увеличения жесткости желудочка в условиях нормотермического инфаркта

Библиогр.: 9 назв.

УДК 616.36—089.87:615.832.9

Применение низких температур при атипических резекциях печени / Коцько Н. И., Сандомирский Б. П., Костя П. И., Капрельянц А. С.— Криобиология, 1986, № 1 с. 43—45.

Криовоздействие на ткань печени выполнено у 8 больных с вторичными неопластическими поражениями печени. Проведено микроскопическое и электронно-микроскопическое исследование клинического материала. Показано, что криорезекция печени вызывает менее выраженные клинко-морфологические и функциональные изменения, чем традиционные способы резекции печени. Продолжительность жизни 4-х больных после криорезекции печени составляет более 4,5 лет.

Ил. 3. Библиогр.: 14 назв.

УДК 57.043:618.146—006.6

Иммунный статус больных раком шейки матки, леченных с применением криовоздействия / Цуцаева А. А., Юрченко Г. Г., Попов Н. Н., Воскобойникова Т. Н., Водолажская Л. П.— Криобиология, 1986, № 1, с. 46—50.

Под наблюдением находились 3 группы больных раком шейки матки I-й стадии. I-й и II-й группе была проведена криодеструкция опухоли и затем расширенная экстирпация матки. II-й группе, кроме того, применен курс дистанционной гамма-терапии. Лечение III-й группы включало курс лучевой терапии и операцию. Иммунологический статус изучали в динамике на протяжении года с помощью методов Е-, ЕАС-, М- и смешанного розеткообразования, реакции иммунодиффузии в геле и реакции бласттрансформации на фитогемагглютинин. Установлено, что криовоздействие не только не угнетает иммунные реакции организма, но даже оказывает некоторое стимулирующее действие на них.

Табл. 3. Библиогр.: 3 назв.

ABSTRACTS

Tasks of cryobiology for acceleration in scientific and technological progress.— Kriobiologiya, 1986, N 1, p. 3—5.

The achievements in cryobiology and cryomedicine are reported. Under discussion are the proposals of working out a program for coordinating the activity of scholars in this field of science.

UDC 57.043

Biology and cryobiology of the reversible stoppage of vital activity: regulation and functional metabolism / Utevsky A. M.— Kriobiologiya, 1986, N 1, p. 5—11.

The paper contains a theoretical analysis of problems on the formation of biological metabolism and its special functional elements. The author presents a conception about the role of autoregulation factors involved in the general regulation («regulated and regulating metabolism») as well as about the processes of self-renovation of biostructures and metabolic structurization («structured and structuring metabolism»). The application of these ideas to problems of active and viable states of biological systems under conditions of induced anabiosis and leaving this state suggests involving not only inhibition and activation of biological metabolism being continuously preserved but also its complex reorganization and peculiar «self-assembling» during restitution on which the efficiency of cryopreservation of biological systems depends to a great extent.

1 fig. Refs.: 7 titles

UDC 57.043:577.37

Cryoresistance and structural organization of liposomes containing rifampicine and tetracycline / Blagoy Yu. P., Tsyganenko A. Ya., Zimoglyad B. N., Leontyev V. S., Vasilchenko V. N., Shkorbatov A. G.— *Kriobiologiya*, 1986, N 1, p. 11—15.

Lecithin liposomal hydrozols containing rifampicine and tetracycline were studied by polarization light scattering. Values of the z-averaged diameter of liposomes can be determined under conditions of inelastic light scattering complicated with the kinetics of some photochemical and structural transformations. By using experimental indicatrices, a relative expansion of the area of membrane structural instability zone is estimated that seems to make a main contribution into the lateral heterogeneity of liposomes. It has been found that rifampicine is bound mainly to the lipid membrane and tetracycline is associated with the aqueous phase inside liposomes. It is likely that an increased structural and aggregation stability of thawed liposomes is due to changes in the interaction between the rifampicine molecule and lecithin layers on freezing.

5 figs. Refs.: 4 titles

UDC 57.043:532.78:534.29

The effect of ultrasound on supercooling of water and some biological media / Yesman S. S., Lykov I. G., Rikberg A. B.— *Kriobiologiya*, 1986, N 1, p. 15—18.

A decrease in supercooling of water and some biological media was found in the low intensity ultrasound field (0.05 to 0.5 W/cm³, 880 kHz). The dependence of the nucleation temperature on the ultrasound intensity was obtained for 1 cm³ bulk water samples. Comparative data on the nucleation temperatures of Hank's, glycerol, PEO-300 solutions and gelatin gel in the ultrasonic field are presented.

2 figs. 1 table. Refs.: 14 titles

UDC 57.043

Freezing of sea urchin sperm to —196 °C / Mezhevnikina L. M., Krasts I. V., Verprintsev, B. N.— *Kriobiologiya*, 1986, N 1, p. 18—20.

Sperm of sea urchins *Strongylocentrotus nudus* and *Strongylocentrotus intermedius* was cooled to —196 °C in sea water with cryoprotective additives (1 M glycerol, 1.5 M DMSO and 1.5 M ethylene glycol). The equilibration of the sperm with the cryoprotectants was performed for 15 min at 0 °C. Ice crystallization was artificially initiated at —7 °C. Up to —40 °C, the sperm was cooled at a gradually increasing rate from 0.3 to 1.5 °C/min. Then the samples were transferred into liquid nitrogen. Thawing was performed in water bath at 20 °C. Ethylene glycol and DMSO proved to be the best cryoprotectant for the sperm of the both species. The fertilizability of the sperm cryopreserved with ethylene glycol was more than 90 %. Nearly all the eggs fertilized with cryopreserved sperm developed to normal plutei. With DMSO, the results were worse (about 50 %). Glycerol was found unsuitable for sea urchin sperm conservation.

UDC 597.554:576.3

The effect of thermal and osmotic shock on the ultrastructure of *Cyprinus carpio* L. (Cyprinidae) sperm / Skorniyakov B. A., Govorukha T. P., Kopeyka E. F.— *Kriobiologiya*, 1986, N 1, p. 21—23.

The effects of thermal and osmotic shock have similar manifestations, i. e. the disruption of cytolemma, the formation of heterogeneous structures in the spermatozoa neck, the appearance of vesicle-like cavities, the exfoliation and swelling of the tail cytolemma. These changes seem to be osmotically specified.

1 fig. 1 table. Refs.: 12 titles

UDC 576.8.093:576.8.095

The viability and biochemical activity of *Saccharomyces vini* subjected to lyophilization and cryopreservation / Sydyakina T. M., Kuznetsova E. V., Chumakova M. Yu.— *Kriobiologiya*, 1986, N 1, p. 23—28.

Slow freezing at a rate of 1 °C/min in the presence of 20 % glycerol has been found to be the best regimen of cryopreservation. The viability of yeasts approached 100 %, their technological properties remained stable upon long-term storage in liquid nitrogen.

3 figs. 3 tables. Refs.: 18 titles

UDC 57.043:576.347

Investigation of the temperature dependence of reduction of free radicals in mitochondria / Tsymbal L. V., Moiseyev V. A., Mishneva L. G.— *Kriobiologiya*, 1986, N 1, p. 28—31.

Structural characteristics of membranes were studied at temperatures above and below zero. The method of EPR spin probes allows to obtain information about the state of electron transport chain of mitochondrial membranes at low temperatures. Structural changes in membranes near 12, 6 and —12 °C as well as increasing the rate of stable radicals after extracellular crystallization are shown.

4 figs. Refs.: 9 titles

UDC 57.022

Electrophysiologic parameters of ground squirrel (*Cytellus undulatus*) heart's during uptake from hybernation / Zhegunov G. F.— Kriobiologiya, 1986, N 1, p. 31—34.

The dynamics of electrophysiologic processes in ground squirrel myocardium upon hibernation and uptake was studied by the method of ECG. Significant changes in the heart activity of heterothermal animals have been found. «Cold» myocardium appeared to be able to function during uptake at a level of heart of active animals.

5 figs. Refs.: 7 titles

UDC 547.963:576.3+612.419

The influence of cryopreservation on topological transitions of supercoiled «nucleoid» DNA from human bone marrow cells / Vashchenko T. N., Vashchenko V. I., Petrenko G. I., Bahautdinov Sh. M., Kaleko S. P.— Kriobiologiya, 1986, N 1, p. 34—38.

The state of supercoiled «nucleoids» (scDNA) in human bone marrow cells was studied before and after cryopreservation with dimethylacetamide (DMAA) or polyethylene oxide (PEO-400). It was shown that DMAA and PEO-400 both a significant increase in the «nucleoid» viscosity at maximally relaxing ethidium bromide concentrations in a lysing solution.

2 figs. 1 table. Refs.: 12 titles

UDC 615.832.9:616.127—005.8

The cardiac output in ischemic myocardium upon craniocerebral hypothermia / Babiychuk G. A., Belostotsky A. V., Artsybushev Yu. N.— Kriobiologiya, 1986, N 1, p. 38—42.

Dogs with acute experimental myocardial infarction were subjected to craniocerebral hypothermia (the brain temperature was in the range 26 to 24 °C, the rectal temperature varied from 32 to 30 °C) for 6 hr. It has been found that the stroke volume on the 6th hr of infarction in hypothermic dogs was 4-fold greater than in animals under conditions of normal temperature seems due to the maintenance of normal diastolic stiffness of left ventricle in contrast to a 5-fold increase in stiffness at normal temperature.

Refs.: 9 titles

UDC 616.36—089.87:615.832.9

Application of low temperatures in atypical resection of liver / Kotsko N. I., Sandomirsky B. P., Kostya P. I., Kaprelyants A. S.— Kriobiologiya, 1986, N 1, p. 43—45.

Cryoapplication to liver tissue was performed in 8 patients with secondary neoplastic lesions of liver. Microscopic and electron microscopic study showed that hepatic cryosurgery induced lesser clinical, morphological and functional changes than the traditional methods of liver resection. The life duration of 4 patients after liver cryosurgery is more than 4.5 years.

3 figs. Refs.: 14 titles

UDC 57.043:618.146—006.6

Immunologic status of cervix uteri cancer patients after cryotreatment / Tsutsayeva A. A., Yurchenko G. G., Popov N. N., Voskoboynikova T. N., Vodolazhskaya L. P.— Kriobiologiya, 1986, N 1, p. 46—50.

Three groups of cervix uteri cancer patients at the first stage of the disease were under observation. Tumor cryodestruction followed by extensive uterus extirpation was performed in the 1st and 2nd groups. In addition the 2nd group received a course of distant γ -therapy. Treatment in the 3rd group included a radiation therapy and operation. The immunologic status of the patients was studied for a year using methods of E-, EAC-M- and mixed rosette formation. It has been found that cryotreatment does not inhibit immunological reactions of the body and has a stimulating effect on them.

3 tables. Refs.: 3 titles

Цена 65 коп

Индекс 70474

**Журнал «Криобиология», № 1, 1986 г.
Издательство «Наукова думка», г. Киев**