

ISSN 0233-7673

КРИОБИОЛОГИЯ

1|85



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

EDITORIAL BOARD

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

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ОТДЕЛЕНИЕ ФИЗИОЛОГИИ

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ
И ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

КРИОБИОЛОГИЯ

1 1985

НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ОСНОВАН В 1985 ГОДУ
ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

КИЕВ НАУКОВА ДУМКА 1985

USSR ACADEMY OF SCIENCES
DEPARTMENT OF PHYSIOLOGY
UKR. SSR ACADEMY OF SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY, PHYSIOLOGY
AND THEORETICAL MEDICINE

CRIOBIOLOGY

SCIENTIFIC THEORETICAL JOURNAL
PUBLISHED SINCE 1985
FOUR ISSUES PER YEAR
KIEV NAUKOVA DUMKA 1985

СОДЕРЖАНИЕ

- Грищенко В.И. Современные тенденции развития криобиологии и криомедицины . . . 3
- Утевский А.М. Криобиология в анализе общепаразитических проблем . . . 8
- Лозина-Лозинский Л.К. Общие вопросы криобиологии . . . 13
- Загубалова Т. Д., Манк В. В. Состояние воды в биологических объектах при криоконсервировании по данным ЯМР . . . 19
- Пушкар Н.С., Гордиенко Е.А., Кулешова Л.Г., Гордиенко О.И., Розанов Л.Ф., Ишков Г. С. Физико-химические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий . . . 23
- Сандомирский Б. П., Волкова Н.А., Журавлев А.С., Коцько Н.И., Писанный О. Е., Сигал Н.С., Козлова В.Ф., Хайкин Р. К. Механизмы криостимуляции регенерации поврежденных тканей . . . 29

CONTENTS

- Grischenko V.I. Current trends in the development of cryobiology and cryomedicine . . . 3
- Utevsky A.M. Cryobiology in the analysis of the general biological problems . . . 8
- Lozina-Lozinsky L. K. General questions of cryobiology . . . 13
- Zagibalova T.D., Mank V. V. The state of water in biological systems under cryopreservation: NMR data . . . 19
- Pushkar N. S., Gordienko E.A., Kuleshova L. G., Gordiyenko O.I., Rozanov L.F., Ishkov G. S. Physico-chemical basis of low temperature preservation of cell suspensions . . . 23
- Sandomirsky B.P., Volkova N.A., Zhuravlev A.S., Kotsko N.I., Pisanny O. E., Sigal N.S., Kozlova V.F., Haikin R.K. Mechanisms of cryostimulation of damaged tissue regeneration . . . 29

This One



Y05Y-SZN-F2W7 авторським правом

<i>Кирпатовский В.И., Артамонов С.Д., Лубяко А.А., Онищенко Н.А. Уменьшение степени ишемического повреждения органов с помощью диметилсульфоксида</i>	<i>Kirpatovsky V.I., Artamonov S. D., Lubyako A.A., Onischenko N.A. Reduction of organ ischemic lesion with dimethyl sulfoxide</i>
36	36
<i>Бразников А. М. О криобиологической технологии</i>	<i>Brazhnikov A.M. On cryobiological technology</i>
41	41
<i>Эмирбеков Э.З., Львова С. П. Изучение биохимии мозга при гипотермии</i>	<i>Emirbekov E.Z., L'vova S.P. The investigation of brain biochemistry under hypothermia</i>
44	44
Хроника	Chronicle
<i>Грищенко В. И., Суббота Н. П. II Всесоюзная конференция «Механизмы криоповреждения и криозащиты биологических объектов»</i>	<i>Grischenko V. I., Subbota N.P. II All-Union conference «Mechanisms of cryoinjury and cryoprotection of biological systems»</i> . . .
49	49

**СОВРЕМЕННЫЕ ТЕНДЕНЦИИ РАЗВИТИЯ
КРИОБИОЛОГИИ И КРИОМЕДИЦИНЫ**

Институт проблем криобиологии и криомедицины АН УССР, г. Харьков

Для криобиологии основной проблемой является сохранение биообъектов в жизнеспособном состоянии в условиях, когда исключена активная жизнедеятельность, сведен к минимуму биологический обмен веществ энергии и информации и в то же время обеспечивается способность вернуться после деконсервации к полифункциональной активности. Глубокий холод — один из наиболее надежных и перспективных факторов консервации жизни. Исследование механизмов криорезистентности и криоповреждений, поиск оптимальных условий криозащиты на разных уровнях биологической организации, помимо своего теоретического и прикладного значения, ставит перед криобиологами глубинные, фундаментальные проблемы общей биологии.

Следует отметить, что в настоящее время как у нас в стране, так и в ряде криобиологических центров за рубежом ведутся интенсивные разработки в области теории и практики криобиологии и криомедицины. Анализ их результатов показывает, что в последние 7 лет намечается отход от эмпирического подхода и усиление фундаментальных исследований, и это одна из ведущих тенденций криобиологии сегодняшнего дня. Работы подобного плана составляют теперь примерно 75 % информации по механизмам криоповреждений клеток.

Приведенный тезис подтверждается и основными данными, полученными в последнее время в Советском Союзе и, в частности, в нашем институте. Например, в результате изучения механизмов криоповреждений изолированных биомолекул установлено, что их реакция на низкую температуру зависит от сложности строения биополимера и вы-

ражается, прежде всего, в структурных (конформационных) перестройках, которые вначале являются обратимыми. Необратимые сдвиги могут быть устранены путем введения в среду замораживания криопротекторов (глицерин, полиэтиленгликоль, 1,2-пропандиол). Методами ЯМР высокого разрешения установлено, что криопротекторы защищают макромолекулы при замораживании в значительной мере путем образования непрерывной сетки водородных связей между молекулами криопротектора и воды, причем резко снижаются осмотические градиенты солей за счет активного образования комплексов с электролитами и другими биологически важными ионами.

Совокупность проведенных исследований по изучению криоповреждений макромолекул позволяет в настоящее время подвести некоторые итоги в этом отношении:

— изолированные биомолекулы с третичной структурой (белки и ДНК) являются устойчивыми к замораживанию-отогреву (вплоть до -196°C) и некоторые из них (например, рибонуклеаза, ДНК, пепсин) можно замораживать даже без криопротекторов;

— биомолекулы с более сложной — четвертичной структурой (например, лактатдегидрогеназа) диссоциируют на составные компоненты под влиянием низких температур (вплоть до -196°C), однако, возможна их самосборка в присутствии криопротекторов, что ведет к восстановлению функционального состояния большинства структурных и каталитических белков.

Биомолекулы с пятиричной структурой, входящие в состав таких надмолекулярных комплексов как био-

мембраны, являются сравнительно мало изученными, о чем свидетельствуют и результаты анализа исследований, проводимых в криобиологических центрах.

Проведенные в ИПКиК АН УССР исследования показали, что при изменении тоничности среды и температуры от $+37^{\circ}\text{C}$ до 0°C — развивается температурный шок клеток, при котором возникают очень быстрые процессы (доли секунд), связанные с увеличением проницаемости мембраны для воды, ионов и, прежде всего, анионов Cl^- (хлора). Молекулярным выражением этих процессов в мембране клеток является транслокация мембранных белков и в первую очередь белков, регулирующих форму клеток.

Очень интересно, что изменяя определенным образом (циклично) температуру и тоничность среды, можно искусственно вызвать «холодовое закаливание» клетки, в основе которого лежит ее обезвоживание и сжатие, что приводит к повышенной устойчивости при последующем замораживании. На этом принципе «холодовой адаптации» мембран клеток сейчас разрабатывается новая методика криоконсервации эритроцитов.

На основании комплекса проводимых исследований на природных и искусственных мембранах с привлечением методов ЯМР, ЭПР-спиновых меток, флуоресцентных зондов, других спектроскопических методов, ультраскоростного центрифугирования установлена важная роль фазово-структурных перестроек липидов и агрегации мембранных белков в развитии криоповреждений клеток. Показано, что эти процессы сопровождаются образованием дискретных зон в мембранах, в которых формируются каналы пассивной утечки ионов и биомолекул, что вполне достаточно для полной гибели клеток после их деконсервации. При этом существенным образом меняется и активный транспорт ионов. Оказалось, что после процесса замораживания-отогрева в мембранах активность ион-транспортных систем повышается. Пассивная утечка Ca^{++} через дефектный липидный бислой интенсифицирует работу активного центра переносчика.

Существенное значение в указанных выше перестройках липидов и белков играет степень обводненности мембраны клеток.

Температурные зависимости интенсивности линии ЯМР воды в растворе оксигемоглобина человека без добавки криопротектора и с добавкой ПЭГ при замораживании-оттаивании показывают, что кривые носят гистерезисный характер, т. е. количество подвижной воды изменяется по разным ветвям при замораживании и отогреве. Криопротектор сглаживает явления гистерезиса. Методом ЯМР установлено, что при замерзании свободного объема воды в мембране и клетках резко возрастает проницаемость мембран для ионов и биомолекул при температурах порядка -17°C ÷ -19°C . При этом в мембранах развиваются параллельно так называемые вторичные (или «латентные» — скрытые) физико-химические процессы, в том числе перекисное окисление липидов.

Новой ветвью в области криобиологии явилось исследование пониженных и низких температур на продукцию гормонов и функции соответствующих рецепторов в клетках. В ИПКиК АН УССР, например, выявлено, что криоконсервированная до -196°C под защитой криопротектора димексида щитовидная железа сохраняет после отогрева способность к регулируемому гормонопозу, т. е. способность к адекватной реакции на сдвиги гомеостаза. Эти исследования позволили разработать рациональный метод криоконсервации щитовидной железы и использовать деконсервированные трансплантаты в клинической практике. Аналогичные данные получены в отношении продукции гормонов пересаженным криоконсервированным яичником как в эксперименте, так и в клинике. Трансплантацию этой ткани женской половой железы мы с успехом применяем у больных с разными формами яичниковой недостаточности. Известны весьма успешные работы при криоконсервации и трансплантации β -клеток поджелудочной железы при диабете.

Не меньшее значение в области фундаментальных исследований в настоящее время придается изучению реакций клеток как целостной физиологической системы на низкотемпературное воздействие, хотя углубленное изучение этих вопросов находится в начальной стадии как у нас, так и за рубежом, учитывая очень сложные функции и структуру клеток.

Для решения этой проблемы характерно (и эта тенденция прогрессирует) все более широкое привлечение методов физико-математического анализа, биофизического моделирования, прижизненных криомикроскопических наблюдений, ультраструктурного анализа с помощью электронной и растровой микроскопии.

В результате электронно-микроскопических исследований, в частности, установлено, что процесс внутриклеточного кристаллообразования инициируется внеклеточным льдом по гидрофильным каналам мембран и он может быть заторможен добавкой в среду замораживания поверхностно-активных веществ.

Данные растровой микроскопии показывают, что при кристаллизации воды очень сильно повреждается поверхность мембран клеток, а также цитоплазматических структур. Однако замораживание клеток под защитой криопротекторов позволяет в существенной мере сохранять морфологические параметры клеток.

С каждым днем становится все более убедительной перспективность использования математического аппарата при исследованиях. Построенная в ИПКиК АН УССР физико-математическая модель процесса рекристаллизации внутриклеточного льда, объясняющая криозащитный эффект быстрого двухступенчатого замораживания, позволила разработать способ низкотемпературной консервации лимфоцитов, сохраняющих жизнеспособность после деконсервации на уровне 70—80 %.

Продолжает оставаться важным и перспективным цитохимический метод исследований клеток крови, костного мозга и других тканей. Все более широкое распространение находят иммунологические методы.

Обнаружена селективная чувствительность различных по своей природе клеток к замораживанию. Поэтому при разработке методов криоконсервации клеток следует учитывать как их природу и исходное состояние, так и взаимосвязанные с этим вопросы подбора сред, криопротекторов и скоростей замораживания-отогрева. Некоторые типы вирусов, бактерий, кроветворных и опухолевых клеток, лимфоцитов в процессе криоконсервации подвергаются так называемым обратимым (нелетальным) повреждениям, заключающимся в снижении их адгезивной, пролиферативной активности и скорости дифференцировки. Выяс-

нено, что обратимость изменений в клетках зависима от степени ингибирования биосинтеза белка и нуклеиновых кислот, биоэнергетики клетки и свойств мембран.

Очень существенным направлением в криобиологии являются изыскания по направленному синтезу криопротекторов (с модифицированной структурой), защитными действиями которых можно управлять. Например, путем оксигилирования глицерина и этиленгликоля в ИПКиК АН УССР создан ряд новых более эффективных криопротекторов для криоконсервации клеток крови. Оказалось, что введение в молекулу спиртов 5 и более оксигильных групп $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ лишает их способности проникать в клетки.

Сейчас разработан новый метод очистки технического продукта ПЭО-400, утверждена Временная фармакопейная статья на этот криопротектор для клеток костного мозга, а МЗ СССР утвердило Методические рекомендации на метод консервации указанных клеток под защитой ПЭО.

В последние годы исследуются и с успехом применяются смеси (коктейли) разных криозащитных веществ, даже для сравнительно однородного биологического материала.

Наряду с криопротекторами все больший интерес привлекают к себе так называемые «регенерирующие соединения», содержащие фосфорилированные нуклеотиды, биоантиоксиданты, ингибиторы метаболизма (пуринол), мембранотропные соединения (гидрокортизон) и др., и некоторые биофизические факторы (ультразвук, магнитные поля) при консервации различных клеток. Установлено, что эффективность указанных выше химических соединений проявляется только в деконсервационном периоде, после отогрева суспензии клеток, они позволяют увеличить срок хранения как замороженных эритроцитов, так и консервируемых при низких положительных температурах.

На основе фундаментальных исследований расширяется диапазон прикладных разработок. Методы криоконсервации отдельных объектов: клеток крови, костного мозга, спермы крупного рогатого скота и других животных, созданные в системе специализированных учреждений и служб, применяются в банках замороженного биологического материала.

Однако следует подчеркнуть, что в отношении ряда биологических объектов, таких как гранулоциты, тромбоциты, простейшие, водоросли, эмбрионы и др., проблема криоконсервации еще далека от практического решения.

На основе фундаментальных исследований в институте в настоящее время разработаны методы криоконсервации различных клеток и тканей иммунокомпетентных клеток, лечебных и профилактических сывороток, а также клеток крови под защитой 1,2-пропандиола и костного мозга под защитой ПЭО-400.

Весьма перспективной областью криобиологии является создание методов криоконсервации репродуктивных клеток — спермиев и зигот различных животных, птиц, рыб, а также человека.

Решение этой проблемы имеет большое народнохозяйственное значение, поскольку позволяет сохранять высокопродуктивные породы сельскохозяйственных животных, увеличить стада промышленных видов рыб и сохранить генофонд исчезающих видов животных. В настоящее время в ИПКиК АН УССР закончен цикл исследований, направленных на разработку метода криоконсервации (-196°C) спермы осетровых рыб в гранулах, спермы лососевых и спермы карпов. Разработан также метод гипотермического хранения ($0-4^{\circ}\text{C}$) спермы осетровых и севрюги. В ряде учреждений успешно разрабатываются методы криоконсервации спермы птиц.

В СССР создана сеть станций, через которые проводится искусственное осеменение сельскохозяйственных животных, главным образом, крупного рогатого скота. Одним из передовых учреждений в этой области в УССР является НИИ животноводства Лесостепи и Полесья Украины Южного Отделения ВАСХНИЛ, занимающийся внедрением методов криоконсервации спермы, получивших название «Харьковской технологии».

Следует с сожалением отметить, что методы криоконсервации половых продуктов других животных только начинают разрабатываться.

Важное значение имеет также и медицинский аспект данной проблемы. Началом новой эры в искусственной репродукции человека считается рождение 25 июня 1978 г. Луизы Джой Браун

как первый случай оплодотворения яйцеклетки человека вне организма с последующей успешной имплантацией в матку. Сейчас в мире функционирует более 20 научных центров по внедрению методов искусственного оплодотворения, включая использование криоконсервированных биоматериалов. Нами совместно с Харьковским медицинским институтом разработан метод (с использованием ацетамида) низкотемпературной консервации спермиев человека, позволяющий сохранять 75 % клеток, способных к оплодотворению. Начаты исследования по криоконсервации эмбрионов человека.

Сложные проблемы предстоит решить при консервации органов, особенно с использованием низких температур. Хотя имеются определенные успехи в консервации почки при низких положительных температурах, разработать эффективную методику низкотемпературного консервирования органов пока не удается как в нашей стране, так и за рубежом.

Очень важной является проблема низкотемпературной консервации культуры клеток растительных тканей и использование их для селекции высокопродуктивных сортов. Работы в этой области требуют расширения и обеспечения необходимой материально-технической базой.

Для целей микробиологической промышленности разработан способ низкотемпературной консервации клеток культур тканей, а также методы длительного хранения микробов, используемых при производстве энтомопатогенных препаратов, и тем самым повышена эффективность борьбы с вредителями сельскохозяйственных растений. Разработаны методы криоконсервации штаммов-продуцентов антибиотиков и биологически-активных веществ, молочнокислых стрептококков, применяемых в пищевой промышленности (сыроварении).

К сравнительно новым, перспективным и практически важным направлениям относится разработка методов сублимационного высушивания различных живых биообъектов. В отношении микроорганизмов уже получены вполне обнадеживающие результаты. Однако изыскания в этом плане тормозятся отсутствием как хорошо обоснованной теории лиофильной сушки, так и надежной лиофильной техники.

Для успешного внедрения результатов фундаментальных исследований и для их развития немаловажное значение следует по-прежнему придавать проводящимся теоретическим исследованиям в области криогенной техники и соответствующим опытно-конструкторским разработкам.

В медицинской практике значительное развитие получила проблема криоконсервации кожи плодных оболочек, роговицы, некоторых других тканей.

В области криомедицины исследования сейчас направлены не только на поиск новых точек приложения для криометода в клинике, но и на обоснование, экспериментальную проверку эффективности холода как терапевтического фактора.

Выявлено положительное влияние криотерапии как метода лечения ожоговых и гнойных ран, язвенных поражений 12-перстной кишки, хронических тонзиллитов, заболеваний полости рта и кожных покровов. Проводятся интенсивные исследования по изучению сочетанного действия низких температур и ультразвука, на базе которых создается соответствующая аппаратура.

Достижения криомедицины 60—80-х годов привели к тому, что криодеструкция патологических, преимущественно опухолевых, образований, в легко доступных областях тела человека (слизистая рта, кожа, шейка матки, анальный отдел толстой кишки) стала методом выбора. Большие успехи достигнуты в области стоматологии, при лечении хронического геморроя, анальных трещин, кондилом, хронических предраковых процессов в области шейки матки.

Применение низких температур в лечении распространенных опухолей желудка, кишечника, печени, поджелудочной железы, мочевого пузыря и других органов не вышло за пределы экспериментальных и клинических апробаций и является перспективой для дальнейших исследований.

В 70—80 годах начало развиваться новое направление криомедицины, базирующееся на том, что дозированные охлаждения патологических образований оказывают нервно-рефлекторный эффект, выраженное стимулирующее влияние на процессы регенерации в очаге острого или хронического воспале-

ния. На этом принципе были разработаны методы криотерапии эрозивных процессов конъюнктивы и роговицы, трофических язв, ожоговых ран, ряда внутренних заболеваний.

Гипотермический уровень охлаждения всего организма человека применяется в кардиохирургических клиниках при операциях у пациентов, преимущественно детского возраста, с врожденными пороками сердца. Местная кранио-церебральная гипотермия находят применение для снижения уровня метаболизма в зоне повреждения или патологического процесса (травмы, отеки мозга, панкреатиты, перитониты и т. п.).

Сейчас в нашей стране интенсифицируются исследования по изучению физиологических процессов в сердечно-сосудистой и центральной нервной системах при программной кранио-церебральной гипотермии.

Исследования гомеостаза организма при умеренной интенсивности кранио-церебральной гипотермии позволили в содружестве с НИИ неврологии и психиатрии в Харькове создать методы лечения больных психозами (шизофрения, белая горячка, неврозы). Выявляется эффективность охлаждения организма при кардиогенном шоке в случаях инфаркта миокарда. По этому вопросу проводятся совместные исследования с Харьковским медицинским институтом.

Большое значение для народного хозяйства будут иметь разработки, направленные на повышение зимостойкости сельскохозяйственных культур.

Анализ приведенных выше результатов фундаментальных исследований и прикладных разработок позволяет сделать несколько выводов, а также наметить основные перспективы, тенденции в развитии криобиологии как науки:

- имеются явные (определенные) успехи в анализе вопросов криобиологии на различных, связанных между собой уровнях биологической организации (молекулярном, надмолекулярном, клеточном, тканевом), что позволило выявить ряд общих закономерностей криоповреждений;

- имеется отставание в развитии фундаментальных исследований на органном и организменном уровне при локальном и общем холодовом воздействии;

- представляется целесообразным интенсифицировать исследования по изучению механизмов криоповреждений и

криозащиты на клеточном, тканевом и органном уровне, для чего следует шире создавать физические и математические модели различных фаз эквilibрации, замораживания и отогрева, а также проводить моделирование на искусственных мембранах; обратить особое внимание на дальнейшее изучение механизмов термального шока клеток;

— необходимо углубить разработки, направленные на использование данных криобиологии для анализа общебиологических проблем, в частности, вопросов холодового анабиоза, включая исследования на природных моделях;

— интенсифицировать дальнейшие исследования по изучению механизмов репаративных проявлений в деконсервированных клетках, разработать и определить эффективность «реставрирующих сред»;

— расширить и углубить исследования по изучению иммунологических механизмов взаимодействия криоконсервированных клеток с организмом реципиента;

— продолжить исследования по выявлению взаимосвязи между химической структурой, физико-химическими свойствами и токсичностью криопротекторов;

текторов; созданию новых типов криопротекторов;

— интенсифицировать исследования по низкотемпературному и сублимационному консервированию биоматериалов, в том числе клеток крови, костного мозга, различных тканей, пищевых продуктов, микроорганизмов и других объектов для их долгосрочного хранения;

— продолжать исследования по изучению механизмов криоповреждений и криозащиты репродуктивных клеток, особенно гамет и зигот животных и человека;

— начать работы по изучению причин и особенностей криоустойчивости некоторых видов эмбриональных тканей и использование выявленных принципов в экспериментальной и прикладной криобиологии.

Объединение и координация усилий ученых, работающих в сфере криобиологии, широкий обмен информацией, в котором немаловажную роль призван сыграть издаваемый специальный журнал, будут содействовать дальнейшему развитию фундаментальных исследований, более быстрому и эффективному внедрению научных разработок в народное хозяйство.

Получено 31.10.84

УДК 57.043

А. М. Утевский

КРИОБИОЛОГИЯ В АНАЛИЗЕ ОБЩЕБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБЛЕМ

Все ускоряющееся развитие биологической науки связано с усиливающейся дифференциацией отдельных ее областей, отпочкованием все новых «дочерних» наук от «материнской». Эти «дочерние» области общей биологии, нередко возникающие путем своеобразной «гибридизации» (методической и концептуальной) с другими науками, в особенности с математикой, физикой и химией — оказывают исключительно большое влияние на концепции и постулаты «материнской» науки, вступая нередко в противоречие с традиционными ее аспектами и стимулируя их пересмотр и модификацию. Рассмотрение некоторых из таких противоречий (частично, кажущихся) между криобиологией и биологией, рассмотрение возможности использования данных и концепций криобиологии в анализе таких общебиологических проблем как харак-

теристика «живого» и взгляды на становление (возникновение, развитие) «живого» из «неживого» составляет предмет данной работы.

Стержневая проблема криобиологии — использование холода для сохранения биологических систем и связанное с этим изучение влияния низких температур на состояние механизмов, лежащих в основе процессов и функций, на разных уровнях организации «живого». Поскольку основным методом сохранения является криоконсервация, при которой применяются температуры значительно более низкие, чем те, с которыми живые организмы могут встретиться и при которых они могут существовать (используя все средства адаптации) в условиях земного обитания, криобиология, уже как термин, включает в себя, как будто, некоторое противоречие. Какая биология возможна при условиях,

при которых невозможна жизнь? Но действительно ли она невозможна? Хорошо известно, что некоторые примитивные организмы могут быть возвращены к жизни даже после экспозиции при «гелиевых» температурах, многие клетки ткани высокоорганизованных животных могут быть возвращены к полноценной функциональной активности после длительного пребывания в жидком азоте. Значит, механизмы, обуславливающие жизнеспособность биологической системы и возможность возвращения ее к жизнедеятельности, могут выдерживать, при определенных условиях, длительное действие криогенных факторов, противостоять их ноцицептивному влиянию и «использовать» их биоконсервирующий эффект.

В то же время при криоконсервации биообъекты теряют, как будто, все неотъемлемые свойства, атрибуты «живого», входящие во все определения этого состояния, принятые в современной биологии. В эти определения обязательно входит понятие «открытая система», макромолекулярная, самовоспроизводящаяся (с помощью комплементарно-матричных механизмов), самоорганизующаяся и саморегулирующаяся. Приставка «само» не совсем точна, так как впереди стоит определение «открытая система», т. е. такая, через которую льется поток вещества энергии и информации, и не только льется, но способствует постоянному «самообновлению» и поддержанию в определенном состоянии уникальной (неравновесной, «негэнтропийной») структуры «живого», уподобляется ей, ее структурам, ее механизмам, становится ее биологическим обменом, угнетение, а тем более прекращение которого неизбежно влечет за собой, согласно общепринятым в биологии представлениям, неизбежный распад и дезорганизацию структур биологической системы.

«Открытая система» не остается такой при низких температурах, хотя некоторые реакции идут, но они являются скорее повреждающим фактором (свободнорадикальные процессы) и не могут стать основой для формирования биологического обмена, который отличается не только определенной упорядоченностью в пространстве и времени, не только цикличностью и сопряженностью этих метаболических циклов, но и функциональными векторами каждого метаболического звена, сопряженностью их со всеми основными функциями «живо-

го». Наконец, биологический обмен всегда является регулирующим и регулируемым. Всеми этими свойствами реакции, наблюдаемые в биообъектах, подвергнутых действию криогенных факторов, не обладают. Если замороженные и охлажденные до температуры жидкого азота биообъекты не могут считаться абсолютно закрытыми системами, то биологический обмен в них фактически исключен. В то же время уникальная (неравновесная, статистически маловероятная) структура «живого» сохраняет или сравнительно легко восстанавливает при отогреве свои процессы и функции и, в первую очередь, регулирующей и регулируемый биологический обмен, индуцирующий самообновление структур и в свою очередь индуцируемый ими (обмен структурируется, структуры обмениваются).

Явления анабиоза, поражавшие исследователей со времен Левенгука и Спаланцани до Клода Бернара, Прейера, Бахметьева и современных криобиологов, отраженные в представлениях от «воскресения» до «скрытой жизни», «потенциальной жизни» и «обратимой остановки жизни», вступают в противоречие с абсолютизацией положения о том, что «живое» всегда «открытая система», существующая только за счет переработки и уподобления себе экзогенного потока вещества, энергии и информации. Развитием криобиологии экспериментально показана возможность длительного сохранения в жизнеспособном состоянии биологических структур в условиях, отрицающих возможность биологического обмена веществ, энергии и информации (анабиоз естественный и искусственный). Изучение искусственного анабиоза клеток и тканей высокоорганизованных животных и человека показало способность их после длительного пребывания при температуре —196 °С и ниже снова проявлять признаки, свойственные нативным биологическим системам (рост в культуре тканей, избирательную проницаемость мембран и процессы, свойственные биоэнергетике «живого», матрично-комплементарный синтез информационных биомacroмолекул, способность к самоорганизации и ауторегуляции).

Развитие криохимии показало ошибочность существовавших ранее представлений о полном торможении всех химических реакций в этих условиях, накладывающее запрет на химические реакции при низких температурах правило Арре-

ниуса, теряет свою силу ниже некоторой температурной границы. Возможны довольно активные процессы, осуществляемые механизмами туннелирования [3, 8—11], «установлено, например, что темновой перенос электронов между соседними компонентами в цепи электронного транспорта в хлоропластах и хромофорах происходит с заметной скоростью даже при гелиевых температурах ...» [7]. Следует помнить также об интенсификации при низких температурах процессов перекисного окисления липидов, появления свободных радикалов и других процессов, оказывающих однако, скорее ноцицептивное, а не стабилизирующее действие.

Возможность течения некоторых химических реакций не означает, разумеется, возможности осуществления в криоконсервированных биообъектах даже минимальных процессов биологического обмена, который как уже указывалось выше, не просто упорядоченная в пространстве и времени сетка химических реакций, но система процессов, регулирующая и регулируемая, формирующая («самообновление») структурно-функциональные параметры системы (компарментализация, мембранные метаболические и ионные градиенты и др.) и в свою очередь формируемая ими.

При низких температурах возможны только экзо- и изотермические реакции, а для «самообновления» необходимы эндотермические процессы. Если предположить, что последние могут происходить за счет освобождения и транспорта некоторой «запасенной» энергии, то такой «запас» был бы израсходован в очень небольшие интервалы времени, а криоконсервированные объекты, как известно, могут сохраняться годами и после подвода энергии (отогрева) проявлять все метаболические и функциональные параметры биологического обмена. Приходится допустить, что «живое» может сохраняться в «закрытой системе», с отсутствующим (или сведенным до минимума) биологическим обменом, сохраняться в жизнеспособном состоянии.

Возникает вопрос — сохраняются ли при криоконсервации все механизмы биологического обмена интактными, в полной готовности «ожидающими» только «толчка» — подвода энергии — для перевода жизнеспособной системы в жизнедеятельную, или сначала должна произойти некоторая реституция этих механизмов, — своеобразная их само-

сборка, диктуемая законами синергетики.

Биология знает много систем, находящихся в определенных условиях в жизнеспособном, но не жизнедеятельном состоянии. Являющиеся началом нового жизненного цикла (семена, споры) или природной сменой жизненных циклов (диапауза), они во многом отличаются от криоконсервируемых объектов.

В криоконсервированных биообъектах биологический обмен искусственно прерван и структура, лишенная его, казалось бы, подлежит разрушению. Однако этого не происходит. Криоконсервированные клетки после отогрева нормально развиваются и размножаются в культуре, кусочки сердца (правда эмбрионального) сохраняют способность к функциональному автоматизму. Паренхима щитовидной железы после криоконсервации и деконсервации сохраняет, согласно нашим исследованиям, способность к гормонопоезу (аккумуляции иода, окислению иодидов и органификации иода, биосинтезу белка, формированию в белке иодированных тиронинов, специфическому протеолизу и освобождению гормонов). Иными словами сохраняется (или восстанавливается) функциональный обмен, свойственный этим эндокринным клеткам. Сохраняется (или восстанавливается) второй основной признак — параметр биологического обмена — способность регулировать и быть регулируемым (рецепторно-лигандные взаимодействия мембран тироцитов, циклазная система передачи в клетку гормонального сигнала, рецепторный энергозависимый нейрональный и экстранейрональный захват адренергических гормонов-медиаторов), иными словами сохраняется способность к регулируемому гормонопоезу, функциональные и регуляторные стороны обмена, то есть основные характеристики обмена биологического [12—15].

Поскольку при этом «следовые» явления, обнаруженные нами в «регулируемом гормонопоезе», не полностью соответствуют параметрам соответствующих процессов (при той же температуре) контрольных (не подвергавшихся действию криогенных факторов) биообъектов (различия в чувствительности рецепторов к стимуляторам гормональной функции и передаче гормонального сигнала), можно сделать вывод о неодинаковой криорезистентности разных механизмов биологического обмена, о неполной рести-

туции некоторых из них при отопреве и необходимости учитывать это при подборе режимов и криопротекторов для криоконсервации. Для биологии же существенно то, что криоконсервация представляет новые доказательства возможности сохранения «живого» в состоянии, не соответствующем постулату о необходимости наличия «открытой системы» с непрерывно функционирующим биологическим обменом для сохранения жизнеспособных структур и механизмов. Вопрос о различных состояниях «живого» все больше привлекает внимание биологов. Систематические исследования в этом направлении проведены А. М. Голдовским [4—6].

Данные и концепции криохимии и криобиологии все больше проникают в последнее время в ту область биологии, которая исследует вопросы происхождения жизни, возникновения первичных ее форм, перехода добиологической эволюции в биологическую, и вносит некоторые новые аспекты.

Общеизвестная теория А. И. Опарина, как и вариант ее, постулированный Дж. Берналом, исходят из того, что возникновение первичных биологических структур произошло при переходе от высоких температур к более умеренным, то есть при остывании планеты, непосредственно в «теплом бульоне» первичного океана (коацерватная теория Опарина) или на отмелях, омываемых этим «бульоном» (литооральная концепция Дж. Бернала) [1, 10]. Одна из наиболее трудных проблем для любой концепции возникновения жизни — это формирование матриц и направленного матричного катализа, невозможного или очень затрудненного в жидких средах («теплый бульон»). В последние годы показана возможность направленных матричных процессов при низких температурах. «В настоящее время в химической кинетике все более четко прослеживается переход от традиционных исследований реакций в газовой и жидкой фазах к изучению реакций в твердых фазах и при низких температурах» [11]. «Матричная криохимия и препаративная криохимия имеют много общего в вопросах, касающихся термодинамики и кинетики, направления реакций» [10].

Возникновение жизни не может рассматриваться без добиологической эволюции — формирования структурных элементов субстрата жизни. Большинство экспериментальных данных ука-

зывает на «пирогенный» характер добиологической эволюции (образование аминокислот, пирролов, пуринов и пиримидинов и других структурных элементов макромолекул при сравнительно высоких температурах и радиационном воздействии). В то же время некоторые процессы полимеризации, необходимые для перехода к образованию макромолекул, возможны при низких температурах [3]. Спектральный анализ межзвездного излучения указывает на наличие в межзвездном пространстве образовавшихся при космическом холоде продуктов полимеризации. Развитие криохимии и криобиологии указывает на возможное участие в добиологической эволюции не только «пирогенного», но и «криогенного» пути и на возможное значение «встречи» этих двух путей на завершающих этапах добиологической эволюции.

Очень интересные взгляды в этом направлении высказаны В. И. Гольданским [3]. «Химические реакции в межзвездном пространстве привлекают широкий интерес астрономов, физиков, химиков и биологов... Постулируемая картина холодной предистории жизни ... в области облаков межзвездной пыли описывается следующим образом. Образование сложных молекул вплоть до биополимеров происходит в шубе «грязного льда»: зерен межзвездных диффузных ... или плотных облаков при $T^{\circ} 10—20$ К. Решающую роль при этом играют экзотермические (особенно цепные) процессы присоединения или полимеризации, идущие по механизму молекулярного туннелирования [3]. При этом инициирующее действие оказывает УФ-излучение, космические длиннопробежные протоны. При коллапсировании облака, когда в его центре образуется новая горячая звезда, возникающий из остатка облака сплюснутый протопланетный пылевой диск остается холодным. Температура не повышается ни при последующем слипании пленок с образованием планетоидальных тел (в том числе и комет), ни при аггломерации в планеты ... Именно поэтому образование сложных полимерных молекул в холодной межзвездной пыли может стать не просто запасанием отрицательной энтропии, но действительно холодной предисторией жизни» [3].

Концепция о «холодовой» предистории жизни и об участии в ней межзвездных криогенных факторов представляет исключительный интерес не только в плане

дополнения существующих гипотез, но и в расширении созданного замечательным ученым В. И. Вернадским понятия о биосфере (о планетарной роли явления жизни) [2]. С первыми шагами человека в космосе совпало то, что за пределы земли «шагнули» и наши представления о становлении жизни. И связано это с развитием криохимии и криобиологии.

При анализе вопросов возникновения жизни мы встречаем еще одно явление, которое можно было бы назвать «биохимический Эмпедокл» — раздельное формирование биомакромолекул и даже клеточных органелл с последующей сборкой их в «полноценные» биологические системы. Известно учение греческого философа Эмпедокла, согласно которому вначале возникали отдельно друг от друга части человеческого тела — носы, глаза, уши и рты, руки и ноги, которые затем собирались, путем проб и ошибок, в гармонически построенные тела. Отдельные синтезы белков, нуклеиновых кислот и т. д., а тем более митохондрий, ядер, рибосом с объединением в дальнейшем в биологические системы, отдаленно напоминают наивные взгляды Эмпедокла, но они, очевидно, действительно отражают реальное положение вещей. Вполне заслуживают внимания гипотезы, согласно которым органеллы первоначально существовали как независимые единицы и лишь на последней стадии они объединились, образовав комплекс, который мы называем клеткой [1]. Здесь возникает извечный и может быть не вполне корректно, как говорят физики, поставленный вопрос о том, что возникает раньше — часть или целое, система или ее подсистемы? Нужно полагать, что на разных этапах развития это происходит неоднозначно, что системы и их «подсистемы» сосуществуют одни с другими и одни в других, эволюционируя и модифицируясь во взаимных процессах ассоциации и диссоциации. Формируя друг друга, проходя на разных стадиях развития не только изменения, но и полную смену взаимоотношений и взаимодействий в системной иерархии.

Почему нами затронут этот вопрос, не имеющий, как будто, прямого отношения к теме «криобиология в анализе общеприродных проблем»? Дело в том, что постулируемые существующими гипотезами возникновения жизни процессы «сборки» макромолекул в клетки или макромолекул в органеллы, а орга-

нелл в клетки, осуществляются процессами ассоциации и диссоциации, а последние обусловлены различными типами слабых химических связей, а именно, силами Ван-дер-Ваальса, водородными связями, ионными связями и гидрофобными взаимодействиями. Все эти слабые химические связи играют исключительно важную роль в биологических процессах и чрезвычайно термозависимы. Ими стабилизируются конформации белков, взаимодействие белков с нуклеиновыми кислотами и другими биополимерами, взаимодействие между ДНК и РНК, ферментами и субстратами, рецепторами и гормонами, общая композиционная структура мембран, структура воды и т. д. Слабые химические связи первыми отвечают на температурные сдвиги и ими все больше занимается современная криобиохимия. Известны «два основных класса температурных эффектов: влияние T° на скорость реакций и на структуры, обусловленные слабыми связями» [16].

Некоторые процессы ассоциации и диссоциации макромолекул и надмолекулярных образований могли происходить как в «теплом бульоне» первозданных морей остывающей планеты, так и в твердофазных процессах при пониженных температурах. «Гибридизация» представителей различных фаз созревания молекулярных и надмолекулярных предшественников биологических систем, обусловленных влиянием умеренных и низких температур, эффектами неэкранированной еще радиации и другими факторами, процессы их ассоциации и диссоциации могли стать участниками перехода последних этапов добиологической эволюции в начальные этапы эволюции биологической. Температурные перепады сказывались, очевидно, и на эволюции биологической. В эту эволюцию свой вклад вносили и криогенные факторы, приводящие к «холодовому» анабиозу. Интересные соображения по этому поводу высказывает А. М. Голдовский: «По-видимому, свойство жизнеспособных структур изменять интенсивность их функционирования вплоть до его приостановки, т. е. переходить к анабиозу, и снова возвращаться к функционированию (жизнедеятельности), является их первичным и неотъемлемым свойством еще со времени возникновения этих структур» [5].

Криобиология — наука о влиянии на биологические системы холода, фактора,

оказывающего интенсивное повреждающее и не менее интенсивное оберегающее действие на основные структурно-функциональные механизмы «живого» и на биосистему в целом. При этом, как показывают многочисленные криобиологические наблюдения, соотношение «сберегающих» эффектов и эффектов «повреждения» неодинаково на разных структурных уровнях биологической организации (молекулярном, надмолекулярном, клеточном, тканевом, органном и организменном), неоднозначно и отношение их к разным коррегирующим факторам (криопротекторам, режимам замораживания и отогрева и т. д.). Анализ этих вопросов приводит нас еще к одной общебиологической проблеме — взаимосвязи структурно-функциональных уровней и проекции одного уровня на другой, проблеме, неразрывно связанной с рассмотрением вопросов

общей характеристики «живого». Здесь также могут быть полезны некоторые данные и аспекты криобиологии.

Криобиология одно из самых молодых «дочерних» ответвлений науки о жизни. В то же время применение холода для сохранения того, что может поддерживать жизнь (хранение пищи) старо, как само человечество. Потребовалось многовековое развитие культуры, науки и техники, нужны были тысячелетия, чтобы можно было реально поставить вопрос о сохранении холодом не только пищевого материала для поддержания жизни, но сохранения и самой жизни. Так родилась основная движущая проблема криобиологии, науки, которая в своем развитии вносит новые аспекты во многие области биологии, расширяя наши представления о возможностях жизни, границах ее проявления, механизмах возникновения и развития.

1. Бернал Дж. Возникновение жизни. — М.: Мир, 1969. — 391 с.
2. Вернадский В. И. Биогеохимические очерки. — М.—Л.: Изд-во АН СССР, 1940. — 251 с.
3. Гольданский В. И. Зерна межзвездной пыли как возможные холодные зародыши жизни. — ДАН АН СССР, 1978, 278, № 4, с. 823—826.
4. Голдовский А. М. Основы учения о состоянии организмов. — Л.: Наука, 1977. — 116 с.
5. Голдовский А. М. Анабиоз в системе теоретических представлений эволюционной биохимии и физиологии. — Ж. Эволюц. биохимии и физиол., 1979, 15, № 5, с. 454—456.
6. Голдовский А. М. Анабиоз. — Л.: Наука, 1981. — 136 с.
7. Давыдов А. С. Биология и квантовая механика. — Киев: Наук. думка, 1979. — 296 с.
8. Дузу П. Криобиохимия. — М.: Мир, 1980. — 383 с.
9. Озин Г., Москович М. Предисловие. — В кн.: Криохимия. М.: Мир, 1979. — 594 с.
10. Опарин А. И. История возникновения и развития теории о происхождении

- жизни. — М., Известия АН СССР, сер. Биол., 1972, вып. 6, с. 797—803.
11. Сергеев Б. Г., Батюк В. А. Криохимия. — М.: Химия, 1978. — 295 с.
12. Утевский А. М. Ауторегуляция биологической системы на температурной шкале. — Криобиология и криомедицина. 1977, вып. 3, с. 9—12.
13. Утевский А. М., Губина Н. Ф., Чуйко В. А. Охлаждение биологических структур и аднергические механизмы. — В кн.: Актуальные проблемы криобиологии. — Киев: Наук. думка, 1981, с. 125—156.
14. Утевский А. М. О познании сущности жизни в условиях ее отрицающих. — В кн.: Тез. докл. Областной научн. конф. «Философские и социальные аспекты современной биологии и медицины», Харьков, 1983, с. 10—16.
15. Утевский А. М., Чуйко В. А., Губина Н. Ф., Карпенко Л. Г. Модуляция первичных этапов регуляции метаболизма действием низких температур и диметилсульфоксида. — В кн.: Тез. докл. 16-ой конф. Федерации Европейских биохимических обществ, М., 1984, с. 190.
16. Хочачка П., Сомеро Дж. Стратегия биохимической адаптации. — М.: Мир, 1977. — 398 с.

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

Поступила 29.10.84

УДК 57.043 576.593.17.42

Л. К. Лозина-Лозинский

ОБЩИЕ ВОПРОСЫ КРИОБИОЛОГИИ

Хотя влиянием низких температур на организм начали интересоваться уже давно, криобиология, как наука, сформировалась лишь во второй половине нашего столетия вместе с успехами физики и химии, с развитием методов изучения процессов замораживания — оттаивания, изучением механизмов повреждения и за-

щиты клеток от этих повреждений. Основной целью криобиологии стало использование низких и сверхнизких температур в практике длительного сохранения различных живых систем в состоянии анабиоза. Особенно важное значение это направление приобрело в практике медицины, животноводства и, в последнее время,

для создания банков генетического материала, как фонда ценных пород домашних животных и исчезающих и редких видов диких животных.

Другой задачей криобиологии является изучение холодоустойчивости организмов на всех этапах развития и акклимации к низким температурам. В связи с этим стоит проблема границ жизни: жизнедеятельности, жизнеспособности и особого состояния жизни — анабиоза, на котором основано учение о криоконсервации и продлении жизни. Несмотря на то, что существуют монографии, в которых детально освещены начальные этапы изучения действия низких температур и дальнейшие исследования, определившие возникновение криобиологии [22, 30, 32, 36], следует кратко остановиться на узловых моментах становления этой области науки до ее официального признания.

Как самостоятельная наука криобиология формировалась постепенно благодаря развитию смежных наук. Для изучения действия низких температур на организмы сначала стали применять криогидраты (до температур —40, —50 °C), а для более глубокого охлаждения — твердую углекислоту и жидкие газы, с помощью которых стало возможным изучать состояния клеток и организмов при сверхнизких температурах (до —273 °C) [33]. На основе применения сверхнизких температур стало возможным сохранять на длительное время живые системы и доказать существование истинного анабиоза. Другое важное достижение связано с введением в практику термоэлектрического метода измерения температуры тела животных и их тканей, который был впервые применен в работах П. И. Бахметьева, начиная с 1897 г., и используется в настоящее время [1, 2]. Усовершенствованные термоэлектрические методы измерения температуры тела, клеток и среды позволили контролировать процессы охлаждения — отогревания. Нельзя не указать, что крупным открытием Бахметьева явилось обнаруженное им явление переохлаждения, которое также обязано примененному им способу измерения температуры насекомых. Дальнейшее развитие криобиологических исследований связано с изучением холодоустойчивости преимущественно насекомых и позвоночных животных, а также растений.

После классических исследований Беккереля и Рама [27, 34], получивших полный (или истинный) анабиоз высушенных животных и растительных организмов при температурах жидких газов, и даже при температуре жидкого гелия —273 °C, была установлена возможность криоанабиоза без высушивания и применения криопротекторов у насекомых [8, 10, 24, 25, 39]. Была экспериментально доказана высокая холодоустойчивость у диапаузирующих насекомых, некоторые виды которых сохраняли полную жизнеспособность после —78 ° и временную — после суточного пребывания при —180 и —186 °C. Наиболее успешным оказалось замораживание двухэтапным методом [23], а также непосредственное охлаждение в жидких газах с последующей реактивацией в течение месяца при 0 °C [8, 10].

Другим направлением криобиологических исследований стали работы американского исследователя Лайета и его лаборатории, открывших в конце 30-х годов явление витрификации клеток и микроорганизмов путем сверхбыстрого охлаждения и отогревания [29, 30]. При сверхбыстром замораживании вода превраща-

ется не в кристаллический, а в аморфный или стеклообразный лед, который не изменяет структуру клетки и поэтому сохраняет ее жизнеспособность. Это открытие, вселившее надежду как метод продления жизни организмов независимо от видовых свойств, в дальнейшем сохранило свое значение в теории, но не в практике криобиологии. Витрифицировать с требуемой скоростью более или менее крупные клетки и их популяции оказалось невозможным. Ряд исследователей показал также, что при рентгеноскопическом методе микроскопирования замороженные до аморфного состояния клетки содержат, за редким исключением, мелкие кристаллики льда. Сам этот факт оказался важным тем, что, во-первых, в принципе не всякая кристаллизация в водном растворе разрушает клетку, и, во-вторых, что при замораживании клеток необходимо добиваться уменьшения размеров льда, образующихся внутри и вне клетки. Однако данные работ Лайета и его сотрудников, а в СССР — Э. Я. Граевского [5] не дали путей для возможности криоконсервации тканей и органов животных, поэтому обратились к поискам защитных веществ, с помощью которых было бы возможно предотвратить повреждающее действие кристаллизации. Такие исследования были успешно начаты советским физиологом растений Н. А. Максимовым, который вместе с растворами некоторых солей и сахаров обнаружил защитное действие глицерина, ставшего впоследствии одним из самых распространенных криопротекторов [14]. Впервые защитное свойство глицерина для спермиев сельскохозяйственных животных при их глубоком охлаждении описали и применили английские ученые [36].

Одним из первых объектов для глубокого охлаждения стали спермии кролика, которые в небольшом проценте сохраняли жизнеспособность после витрификации без обработки их криопротекторами [17]. С использованием же криопротекторов процент выживших клеток возрос до 80 — 90 %, этот метод был с успехом внедрен в животноводство для искусственного осеменения. Сначала предполагали, что глицерин способствует витрификации, но это мнение оказалось ошибочным, так как у глицеринизированных клеток при относительно медленном охлаждении наступал анабиоз несмотря на кристаллизацию.

Уже эти факты стали первым подтверждением того, что теория гибели клеток от образования в них кристаллов льда при замораживании не всегда верна и требует уточнения. Высокая устойчивость клеток к внутриклеточной кристаллизации была обнаружена рядом авторов [11, 35]. За этим последовало детальное изучение защитных свойств криопротекторов и поиски наиболее эффективных из них не только среди низкомолекулярных соединений, но и среди полимеров.

Изучение свойств веществ, защищающих клетки от повреждений при замораживании, привели к объяснению причин холодоустойчивости и возможности криоконсервации, что и послужило основой криобиологии. Проблема криоустойчивости и криоповреждения потребовала участия в ней химиков, физиков, цитологов и ученых других специальностей. Как показали исследования, наиболее важное и в большинстве случаев решающее значение в этой проблеме имеет вода, которая участвует во всех проявлениях жизни, ее состояние и все ее необыкновенные свойства. Среди них нужно вы-

делить характер связей воды с гидрофильными и гидрофобными биокolloидами клетки, степень и количество связанной воды, характер роста и размеры кристаллов при кристаллизации и рекристаллизации, осмоларные и термодинамические свойства и многие другие. Именно взаимодействие воды с белками и другими компонентами клетки, а также дегидратация определяет реакцию клетки и организма на охлаждение, замораживание и оттаивание [11, 15, 16, 31, 32]. Однако устойчивость к температурам ниже нуля зависит не только от состояния воды и ее свойств. Для разных клеток и организмов она определяется специфичностью структуры и функции живых систем и в первую очередь — свойствами наружных и внутренних клеточных мембран. Со снижением температуры в связи с увеличением вязкости растворов понижается интенсивность осмотических и диффузионных процессов и соответственно — метаболизма, что повышает холодоустойчивость [3, 4]. С изменением проницаемости клетки для воды и повышением вязкости, особенно при взаимодействии с криопротекторами, уменьшается кристаллизация, изменяются структура и размеры кристаллов. Глицерин, например, проникая в клетку, замещает замерзшую воду, изменяя свойства протоплазматической жидкости [3, 4, 7, 11, 15, 18].

Как ни велики достижения в области криоконсервации с помощью криопротекторов, механизмы действия последних все же недостаточно изучены, кроме того сами криопротекторы могут оказывать токсическое действие на клетку или вообще быть неэффективными [7, 11, 16]. Неудачными оказались попытки повысить холодоустойчивость насекомых инъекцией в них глицерина, тогда как на определенной стадии жизненного цикла, например, в течение диапаузы, у многих видов насекомых происходит накопление глицерина в больших или меньших количествах [11, 18, 26, 38]. Казалось, высокая холодоустойчивость диапазирующих насекомых и некоторых других животных могла бы быть объяснена за счет образования естественным путем глицерина и полисахаридов перед зимовкой. Однако колебания в количестве глицерина у разных видов далеко не пропорциональны их холодоустойчивости. Кроме того, глицерин и другие криопротекторы, например, полисахариды, в теле насекомых не защищали от глубокого охлаждения и практически не снижали точку замерзания жидкостей тела [11, 26, 37, 40]. Тем не менее нельзя отрицать, что холодоустойчивость насекомых, содержащих глицерин и другие естественные криопротекторы выше, чем у несодержащих их. Очевидно, что эффективность криопротекторов связана с некоторыми факторами морфофункционального характера, еще недостаточно известными. Во всяком случае большую роль перед циклом «замораживание-оттаивание» играют физиологическое состояние, стадия развития особи и популяции, состав культуральной среды, скорости охлаждения и отогревания и другие факторы.

Параллельно изучению биомеханизмов холодоустойчивости на клеточном и молекулярном уровнях исследовались экологические вопросы устойчивости организмов к низким температурам. Огромные области нашей планеты подвергаются действию температур ниже нуля вне снеговой линии гор и даже в субтропическом климате. Температура океанов в полярной зоне снижается до $-1,7^{\circ}$ в верхних слоях, а на глубинах почти везде достигает 0° . Основная мас-

са организмов суши и мелких водоемов испытывают порой большие амплитуды колебаний температур, как периодических — суточных, сезонных, так и не ритмических, к которым организмы не всегда могут приспособиться. В течение эволюции сформировалось не менее 6 экологических групп организмов различно адаптированных к субнулевым температурам [11]. Наибольший интерес вызывают явления закаливания к низким и сверхнизким неэкологическим температурам, которые выработались в результате сезонных изменений климата в умеренных зонах, так как при этом происходят сложные морфофизиологические и биохимические перестройки. Закаливание интересно и тем, что его механизм имеет большое сходство у таких разных групп организмов, как некоторые виды растений и насекомые. Закаливание растений протекает тремя этапами: 1) период покоя в осеннее время или достаточно продолжительная стадия яровизации; 2) прохождение первой фазы закаливания при низких положительных температурах; 3) прохождение второй фазы закаливания в условиях медленного охлаждения при отрицательных температурах. После прохождения всех этих этапов растения становятся устойчивыми к сильным морозам [18]. И. И. Туманов обращает внимание также на то, что семена растений, не имеющих стадии покоя, например, озимых, уже набухшие и содержащие до 70 % воды на сухой вес, но до начала ростовых процессов, после медленного охлаждения до -60° выдерживают температуру жидкого азота -196°C . Сходные этапы повышения холодоустойчивости наблюдаются у диапазирующих насекомых, хотя физиологические и биохимические процессы протекают у них по-разному. На первом этапе у насекомых происходит уменьшение веса в результате частичной потери воды, прекращается питание и развитие. Процесс этот протекает при положительных температурах под влиянием фотопериодической реакции на длину светового дня [6]. Второй этап во время которого происходят дальнейшие биохимические перестройки, вызывающие резкое понижение интенсивности дыхания, наступает с понижением температуры среды до близкой к 0° . Третий этап связан с отрицательными температурами -15 , -20°C и характеризуется вымерзанием связанной воды из клеток, прекращением дыхания. В результате повышается устойчивость к глубокому охлаждению. Закаливанием следует называть два последних этапа, но для достижения истинного анабиоза после этого требуется быстрое охлаждение при температурах от -78 до -196°C . Описание процессов, происходящих у насекомых в преддиапаузный и диапаузный периоды развития, можно найти во многих монографиях [6, 11, 20]. Высокой холодоустойчивости насекомые достигают и без диапаузы и замораживания в результате переохлаждения, иногда до -55°C , если зимуют выше снеговой покрова.

В водной среде стадии покоя встречаются, у простейших, в виде цист покоя. Инфузории *Colpoda* для приобретения устойчивости к сверхнизким температурам без высушивания в водной среде должны пройти в течение 2 — 3 недель своеобразное «созревание», во время которого происходит изменение структуры оболочки цисты и изменение ее проницаемости для воды [19]. Эти примеры приведены для того, чтобы показать, что устойчивость к сверхнизким температурам наступает не только после

высушивании, как считалось ранее, но и при значительном содержании воды в клетках, когда клетки сохраняют свой объем или сжимаются очень мало. Для криоанабиоза животных как раз важно сохранение известного количества воды до 40 — 60 % в связанном не замерзшем состоянии и частично — в кристаллическом. Поэтому криоанабиоз нельзя свести к ксероанабиозу [11]. Их совпадение наблюдается лишь у прокариотных организмов при явлениях лиофилизации, где совмещается глубокое охлаждение с вакуумной сушкой [21].

Поскольку в период зарождения жизни на земле столь низкой температуры, как в космическом пространстве, не могло существовать, и скорее всего, она была выше, чем в более позднее время, устойчивость к сверхнизким температурам возникла не в результате адаптации и естественного отбора, а как первичное свойство жизни, то есть способность первичных биополимеров не разрушаться при кристаллизации в достаточно концентрированных растворах. При этом активность процессов в первичных организмах должна была быть пониженной или отсутствовать вовсе. В связи с этим и могли возникнуть первичные формы покоя и анабиоза. Только этой первичной холодоустойчивостью к глубокому охлаждению можно объяснить устойчивость спермиев гомеотермных животных, совершенно не адаптированных даже к температурам близким к 0 °C [17, 35]

Закаливание и переход в состояние покоя — единственные естественные пути к возникновению устойчивости к ультранизким температурам. Другие пути связаны с экспериментальными методами замораживания-оттаивания. Таким образом, холодоустойчивость имеет двойное происхождение. 1. Первичная устойчивость к низким температурам биополимеров, которая формировалась на первичной Земле у протобионтов, протоклеток, микроорганизмов при взаимодействии с водой. Отсюда, вероятно, ведет начало устойчивость подавляющего числа современных организмов, независимо от того, нужна ли она для существования, или не нужна. Эта первичная устойчивость не только к холоду, которую мы называем физической или молекулярной, могла под влиянием внешних условий в течение эволюции изменяться и деградировать у высших организмов, а также в водной среде в связи с небольшими колебаниями температуры внешней среды [11]. 2. У живых активных систем молекулярная первичная устойчивость составляет единое целое со вторичной — физиологической, возникшей под влиянием колебаний температуры внешней среды.

Температурные адаптации чрезвычайно разнообразны и играют большую роль в эволюции. Выше мы привели примеры с такими сложными формами адаптаций, как явления зимнего покоя растений, диапаузы насекомых, закаливания. В книге «Очерки по криобиологии» были выделены группы экологических типов температурных адаптаций, которые можно разделить на две основные: активные и пассивные. Представители пассивных групп адаптаций постоянно живут при низких температурах и устойчивы к ним благодаря закаливанию и конституционной устойчивости; это формы, адаптированные к определенным зонам и экологическим нишам. В основе этих адаптаций лежат такие биофизические свойства, как способность к переохлаждению и выдерживанию замерзания с образованием льда в тканях. Активные

адаптации связаны с поведением, выбором ниш с оптимальной температурой для зимовки или сезонными миграциями.

Очень мало данных о возникновении холодоустойчивости путем мутаций, как в природе, так и в экспериментальных условиях. Об этом говорят наблюдения над насекомыми, которые сохраняют удивительно постоянные температурные границы распространения, но не переносят сильных понижений зимних температур. Зато акклимации, связанные с другими факторами среды, прежде всего — с влажностью атмосферы и фотобиологическими реакциями, следует рассматривать как единый процесс, что необходимо учитывать при изучении действия температурного фактора.

К середине нашего столетия криобиология получила свое название как самостоятельный раздел науки, так как она уже охватила обширную область знаний, касающихся разных сторон участия низких температур в жизни, открыв совершенно новую страницу в биологии, такую как действие сверхнизких температур и внедрение специальных, ранее не применявшихся методов исследования. Поэтому было бы целесообразно криобиологию разделить на ряд разделов: 1) криобиофизика, 2) учение о криоанабиозе, 3) криобиохимия, 4) криоэкология, 5) криофизиология, 6) криоцитология и 7) криомедицина. Такое деление криобиологии не должно означать, что нужна узкая специализация, напротив — для рассмотрения и разрешения криобиологических проблем необходим синтетический, системный подход. Так, главная проблема на современном этапе — создание теории криоповреждения и криоконсервации не может быть разработана без участия всех указанных выше разделов.

В цикле «охлаждение — отогревание» или «замораживание — оттаивание» клетка проходит все этапы повреждения и, отчасти, восстановления и потому они представляют одну цепь, одну систему криогенных процессов [12]. Многими авторами неоднократно делались попытки показать в виде схемы взаимосвязь повреждающих факторов. Здесь представлена наша схема криоповреждений.

В этой схеме показаны последовательность и специфичность альтераций в процессе охлаждения — отогревания и хранения, но не смогли быть учтены те моменты или этапы, которые являются критическими для жизнеспособности, а также явления, вызываемые фактором времени. Можно выделить три основных вида реагирования на длительность охлаждения и замораживания.

Во-первых, некоторые одноклеточные организмы и насекомые переносят сильное охлаждение или замораживание только в течение минут или часов. Очевидно, за этот промежуток времени не заканчиваются те физико-химические и биохимические процессы, которые происходят под влиянием переохлаждения и кристаллизации в системе вода — клетка. Так, при некоторых температурах кристаллизация воды в организме и в тканях и выход воды из клеток могут продолжаться целые сутки. В качестве примеров первого вида реакции можно привести следующие. Бактерии, по данным Хайнеса, погибали не от глубины охлаждения, а после небольшого срока пребывания при отрицательной температуре [28]. После замораживания амёб под защитой криопротектора до температур от —10 до —17 °C выживали только те, которые находились в замерзшем состоянии при внутри-

Схема последовательности криповреждений и альтераций



клеточной кристаллизации не более 10 мин при окончательной температуре -10°C , и 1 мин при более низких температурах [13]. Многие примеры анабиоза Бахметьева также следует отнести к этому виду реакций.

Во-вторых, если мы имеем дело с организмами, адаптированными к зимовке в условиях отрицательных температур, то их пребывание в состоянии глубокого покоя достигает нескольких месяцев до наступления процесса реактивации. В этих случаях также нельзя говорить о криоконсервации.

К третьему типу реагирования следует отнести анабиоз, для которого продолжительность действия низких температур не ограничена, по-видимому, определенными сроками. Мазур в своем обзоре приводит данные о том, что долгосрочное хранение клеток различных животных при -196°C часто ведет к потере жизнеспособности в течение года хранения [31], при этом наблюдаются морфологические изменения. С другой стороны, эмбрионы мышей, спермии многих животных сохраняют жизнеспособность гораздо дольше. Продолжительность жизнеспособности при хранении различных элементов крови сильно варьирует [9]. Эти факты свидетельствуют о том, что в условиях анабиоза, когда биологические процессы сведены к нулю, могут происходить физико-химические изменения, которые приводят к необратимым последствиям в клетках. Таким образом, эта криобио-

логическая проблема очень сложна и, видимо, не скоро будет разрешена.

Одна из сложностей, например, состоит в том, что уже около температуры 0° , во время переохлаждения и тем более — при фазовых переходах и в условиях ультранизких температур скорость реакций, происходящих в биологических системах и химических соединениях, не подчиняется известным математическим уравнениям и формулам, более того — некоторые химические процессы ускоряются с понижением температуры. Эти факты должны учитываться при решении конкретных задач криобиологии.

Заключение. Криобиология как системная наука возникла в послевоенное время, когда роль низких температур стала приобретать во многих отраслях практических знаний большое значение и для использования низких температур потребовалось знание механизмов повреждения и причин устойчивости не только к природным, но и к сверхнизким температурам, создаваемым искусственно. В результате стало необходимо изучить причины различной холодоустойчивости на организменном, клеточном и молекулярном уровнях и ее возникновение. Эти задачи выдвинули строго научную проблему взаимосвязи криоанабиоза с происхождением жизни, и возможностью ее продления в разных экологических системах и позволили поставить вопрос о потенциальном бессмертии, хотя бы в теоретическом плане. В сущности

эти задачи можно рассматривать как основную цель криобиологии, с которой связаны многочисленные современные исследования методического характера. Однако на этом пути для высших организмов, и тем более — для человека, стоят неодолимые препятствия, связанные с ничтожной возможностью достижения у них криоанабиоза. Что касается микроорганизмов, в том числе эукариотов, а также простейших и беспозвоночных животных, как и клеток и органов животных, то прогресс в длительном сохранении их при анабиотических температурах непрерывно растет. Тем не менее это не означает, что нет практического срока

для криоанабиоза, так как «старение» живых систем происходит под влиянием физико-химических факторов (окисление, квантовые процессы) при любых низких температурах. Поэтому нужно с большой осторожностью относиться к нередко появляющимся сообщениям в литературе и о крио- и ксероанабиозе в течение миллионов лет.

Особое и конкретное значение приобретают практически важные экологические вопросы криобиологии и низкотемпературного хранения органов и тканей животных и человека и создания генетического фонда редких животных.

1. Бахметьев П. И. Bachmetiew P.I. Experimentale entomologische Studien.— Leipzig, B. 1, 160 s.
2. Бахметьев П. И. Как я нашел анабиоз у насекомых.— Природа, 1912, 1, № 5, с. 606—622.
3. Белоус А. М., Бондаренко В. А., Бондаренко Т. П. Молекулярные механизмы криоповреждений биомембран.— Итоги науки и техники/ВИНИТИ Сер. Биофизика, 1978, 9, с. 80—114.
4. Белоус А. М., Бондаренко В. А. Криоповреждения биомембран. Структурно-функциональные нарушения митохондрий и лизосом.— В кн.: Актуальные проблемы криобиологии.— Киев: Наук. думка, 1981, с. 41—100.
5. Граевский Э. Я. Стеклообразное состояние протоплазмы в условиях глубокого охлаждения.— Успехи совр. биол., 1948, 25, № 2, с. 188—202.
6. Данилевский А. С. Фотопериодизм и сезонное развитие насекомых.— Л.: Наука, 1961.— 273 с.
7. Пушкарь Н. С., Шраго М. И., Белоус А. М., Калугин Ю. В. Криопротекторы.— Киев: Наук. думка, 1978 — 204 с.
8. Лозина-Лозинский Л. К. Холодоустойчивость и анабиоз у кукурузного мотылька.— Зоол. журн., 1937, 16, № 4, с. 614 — 642.
9. Лозина-Лозинский Л. К. Реакция насекомых на глубокое охлаждение.— В кн.: Реакция клеток на экстремальные воздействия. М.-Л.: Наука, 1963, с. 34—53.
10. Лозина-Лозинский Л. К. Устойчивость насекомых к температуре жидкого гелия (-269°C) при внутриклеточном замерзании в отсутствие антифризов.— Цитология, 1963, 5, № 2, с. 220—231.
11. Лозина-Лозинский Л. К. Очерки по криобиологии.— Л.: Наука, 1972, — 288 с.
12. Лозина-Лозинский Л. К. Действие охлаждения на клетки и организмы как мультифакторный процесс.— Цитология, 1982, 24, № 4, с. 371—390.
13. Лозина-Лозинский Л. К., Николаева Г. В. Устойчивость к замораживанию под защитой полиэтиленоксида-4000.— Цитология, 1980, 22, № 11, с. 1357—1364.
14. Максимов Н. А. О вымерзании и холодоустойчивости растений.— СПб., 1913, — 330 с.
15. Пушкарь Н. С., Белоус А. М., Иткин Ю. А. и др. Низкотемпературная кристаллизация в биологических системах.— Киев: Наук. думка, 1977.— 243 с.
16. Пушкарь Н. С., Белоус А. М. Введение в криобиологию.— Киев: Наук. думка, 1976.— 343 с.
17. Смирнов И. В. Глубокое охлаждение семени сельскохозяйственных животных.— Журн. общей биол., 1950, 11, № 3, с. 180—197.
18. Туманов И. И. Закаливание растений к морозам.— В кн.: Клетка и температура среды. М.—Л., 1964, с. 9—16.
19. Успенская З. И., Лозина-Лозинский Л. К. Устойчивость к замораживанию трофобластов *Colpoda* в присутствии полиэтиленоксида.— Цитология, 1981, 22, № 9, с. 1066—1072.
20. Ушатинская Р. С. Основы холодоустойчивости насекомых.— М.: Изд-во АН СССР, 1957.— 314 с.
21. Цветков Ц. Сублимационное консервирование (лиофилизация) биологических материалов.— В кн.: Актуальные проблемы криобиологии. Киев: Наук. думка, 1981, с. 426—482.
22. Шмидт П. Ю. Анабиоз.— М.—Л.: Изд-во АН СССР, 1955.— 436 с.
23. Asahina E. Prefreezing as a method enabling animals to survive freezing at an extremely low temperature.— Nature, 1959, 184, p. 1003—1004.
24. Asahina E., Aoki K. Survival of intact insect immersed in liquid oxygen without any antifreeze agents.— Nature, 1958, 182, p. 327—328.
25. Asahina E., Takehara J. Supplementary notes on frost resistance of the slug caterpillar *Monema flavescens* L.— Low temp. Sci., Ser. Biol., 1964, 22, p. 79—90.
26. Asahina E., Tanno K. A large amount of trehalose in a frost-resistant insect.— Nature, 1964, 204, p. 1222.
27. Becquerel P. 1094—1939 (Цит. по Шмидт П. Ю. Анабиоз. М.—Л., 1955, — 436 с.)
28. Haines B. B. The effect of freezing on bacteria.— Proc. Roy. Soc., B, 1937—38, 124, p. 451—463.
29. Luyet M. J. The vitrification of organic colloids and of protoplasm. *Biodinamica*, 1937, 1, N 29, p. 1—14.
30. Luyet M. J., Gehenio P. M. Life and death at low temperatures.— *Biodinamica*, 1940. Missouri.
31. Mazur P. Freezing and low temperature storage of living cells.— In: Basic aspects of freeze preservation of mouse strains. Stuttgart, 1976, p. 1—12.
32. Meryman H. T. Review of biological freezing. In: Cryobiology/Ed. by H. T. Meryman. L.—N. Y., Acad. Press, 1966, p. 1—114.
33. Pictet R. De l'emploi methodique des basses temperatures en biologie. *Arch. Sci. Phys. et Nat. Geneve*, 1893, 3, N 30, p. 293—314.
34. Rahm G. Einwirkung Temperaturen auf die Moosfauna.— K. Acad. Wetensch. Amster

- dam, Naturkund. Afdeel., 1920, 25, p. 235—248.
35. Salt R. W. Intracellular freezing in insects.— *Nature*, 1962, 193, p. 1207—1208.
 36. Smith A. U. Biological effects of freeezing anb supercooling.— London, 1961.— 462 p.
 37. Somme L. Change in sorbitol content and supercooling points in overwintering eggs of the European red mice (*Panonychus ulmi* Koch).— *Canada J. Zool.* 1965, 43, p. 881—884.
 38. Takehara J., Asahina E. Glycerol in a slug caterpillar. 1. Glycerol formation, diapause and frost resistance in insect reared at various graded temperatures.— *Low temp. Sci., Ser., Biol.*, 1961, 19, p. 29—36.
 39. Tanno K. Frost resistance in popular sawfly *Trichiocampopus populi* Okamoto. *Low Temp. Sci. Ser. Biol.*, 1964, 22, p. 59—70.
 40. Tanno K. Freezing injury in fat-body cells in the popular sawfly. In: *Cellular injury and resistance in freezing organisms. Proc. Int. Conf. on low temp. Sci., Sapporo, Japan*, 1967, 2, p. 245—257.

Институт цитологии АН СССР,
г. Ленинград

Получено 18.11.84

УДК 57.043 664.037.1

Т. Д. Загibalова, В. В. Манк

СОСТОЯНИЕ ВОДЫ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ ПРИ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИИ ПО ДАННЫМ ЯМР

Исследования в области криобиохимии, криобиологии, холодильной технологии пищевых продуктов показывают, что для понимания механизма химических и биохимических превращений при низких температурах необходимо изучить фазовое состояние системы. Разработки теоретических основ и новых методов холодильного консервирования требуют исследований на молекулярном уровне состояния и поведения воды и связанных с ней свойств биологических мембран при замораживании и оттаивании биологических объектов.

В последние годы было открыто явление самопроизвольного быстрого протекания некоторых химических реакций при низких температурах и показана особая роль при этом фазовых переходов [9]. Была также открыта возможность осуществления биохимических процессов ниже температуры плавления растворителя [9].

Исследование спектров ЭПР замороженных растворов чистых веществ показало [2], что они неоднородны в структурном и фазовом отношении и представляют собой сложную двухфазную систему, состоящую из твердой матрицы с находящимися в ней микровключениями, в которых обнаруживается высокая молекулярная подвижность, близкая к подвижности в жидкой фазе. Эта подвижность прекращается при затвердевании всей системы. Растворенные вещества практически полностью локализируются в микровключениях, а матрица представляет собой твердый растворитель. Однако метод ЭПР-спектроскопии требует

применения парамагнитной метки и не позволяет определить количественное содержание непарамагнитных компонентов.

Более полную информацию о фазовом состоянии замороженных систем можно получить методом ЯМР. Используя спектроскопию ЯМР высокого разрешения удалось выяснить характер зависимости количества невымороженной воды ω от температуры t , который оказался индивидуальным для каждого вида исследуемых объектов.

Для многокомпонентных структурно неупорядоченных систем, какими являются замороженные биологические объекты, также большое значение имеет фазовая неоднородность образца, которая влияет на биохимические превращения, происходящие в нем.

В ряде работ [5, 6, 10] было установлено изменение некоторых биохимических показателей растительных объектов при замораживании и длительном холодильном хранении.

Значительный интерес для холодильной технологии пищевых продуктов представляет сопоставление фазовых состояний воды с биохимическими изменениями в растительных тканях при их криоконсервировании.

В качестве объекта исследования был выбран перец сладкий сорта «Болгарский 79» технической степени зрелости, широко применяемый на консервных заводах юга Украины и Молдавии для замораживания и последующего длительного холодильного хранения с целью продления сезона работы.

Одну партию исследуемых плодов перца замораживали в холодильной камере «Нема» при температуре -40°C и скорости воздуха 3 м/сек до температуры в объеме образца -20°C . Скорость замораживания в этом случае составляла 0,16 град/мин. Другую партию — душеванием в жидком азоте. При этом скорость замораживания составляла 0,75 град/мин. Хранили образцы в холодильной камере упакованными в полиэтиленовые пакеты при температуре -20°C .

Состояние воды изучали по спектрам ЯМР высокого разрешения образцов растительной ткани на приборе с рабочей частотой 100 МГц для протонов. Температура регулировалась с помощью паров жидкого азота, подаваемых к ампуле с образцом.

Характерные спектры ЯМР плодов перца в процессе замораживания приведены на рис. 1. При понижении температуры происходит уменьшение транс-

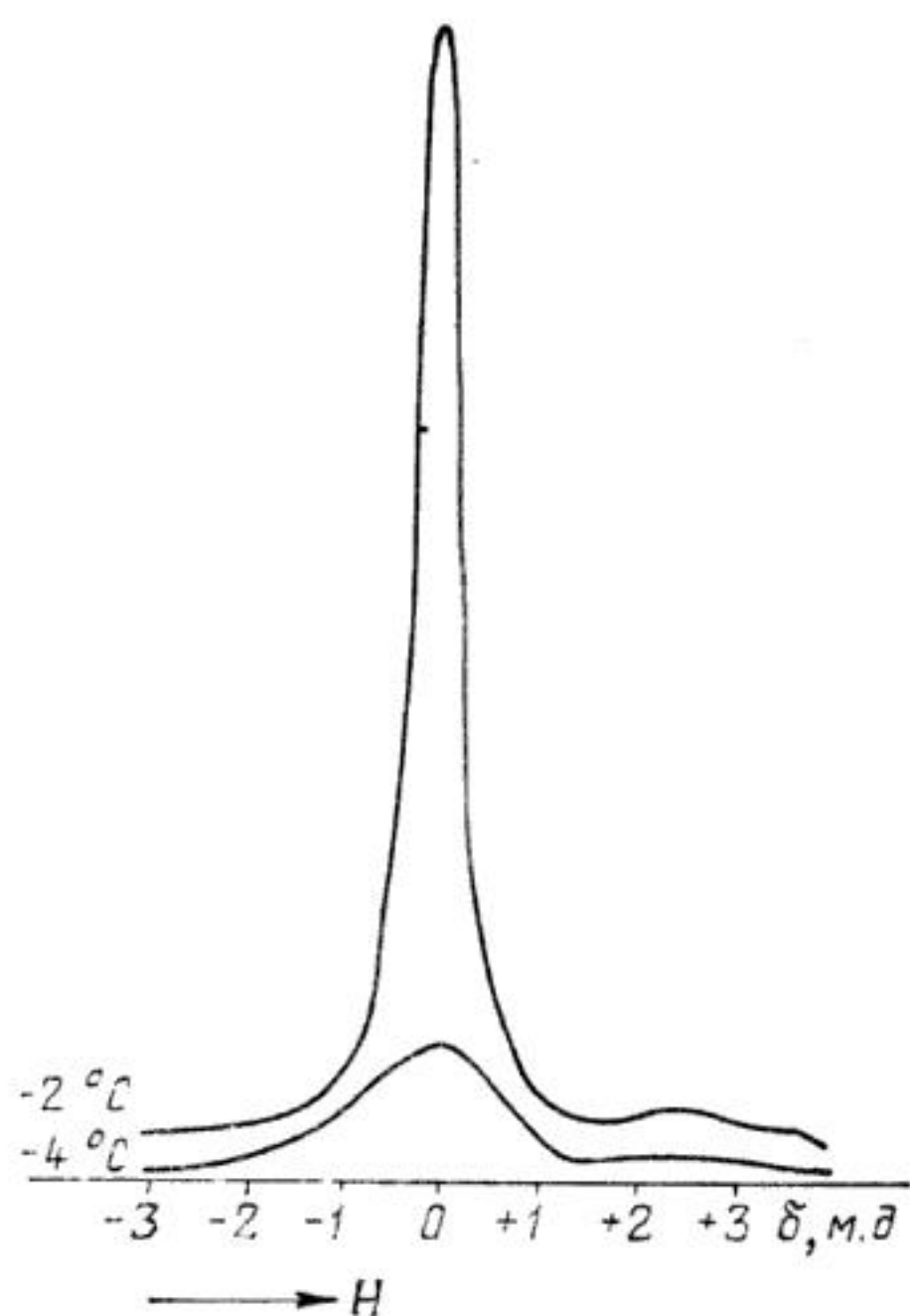


Рис. 1. Пары спектров протонов воды перца, записанные в идентичных условиях.

ляционной подвижности молекул воды. Это явление отражается в постепенном уширении сигнала ЯМР и уменьшении его интенсивности (рис. 1).

Из соотношения интенсивностей полос поглощения вычисляли количество незамороженной (подвижной) воды в исследуемых растительных объектах. Характер зависимости количества невы-

мороженной воды от температуры оказался индивидуальным для различных растительных объектов и обусловленным, вероятно, их биохимическим и минеральным составом.

При изучении процесса замораживания образцов в датчике спектрометра по кривым температурных зависимостей видно, что в определенных интервалах температур происходит немонокотное поглощение энергии образцами растительной ткани.

Для перца (рис. 2) в интервале температур от $+4$ до -4°C происходит уменьшение количества подвижных молекул воды, сопровождающееся ниже 0°C одновременной кристаллизацией воды в лед. Вымерзающую при этом влагу можно назвать свободной. При дальнейшем понижении температуры от -4 до -16°C вымерзает вода, более прочно связанная со структурными элементами и биоконпонентами клетки. Немонокотный характер вымерзания этой влаги обусловлен, вероятно, наличием активных центров на поверхности агрегатов биомакромолекул, способствующих образованию полимолекулярных слоев воды определенной степени упорядоченности. Седлообразные участки на кривой температурной зависимости характеризуют последовательное вымораживание поляризованных и различным образом ориентированных в пространстве полимолекулярных слоев воды, расположенных у поверхностей раздела в растительной ткани. Этот процесс сопровождается экзо- и эндотермическими эффектами и представляет, по сути, фазовые изменения воды, связанной с поверхностью раздела.

Полученные нами экспериментальные данные по вымораживанию вод в растительных тканях согласуются с представлениями Дрост—Хансена [12] о том, что структурная (вицинальная) вода, расположенная у поверхности раздела, имеет свойства, близкие к свойствам жидкой воды и ее структурные изменения происходят под влиянием температурных изменений. Граничной поверхностью в биологических объектах при положительных температурах является поверхность клеточных мембран и, хотя вода является ее важным элементом, роль ее в структурных изменениях мембран изучена недостаточно. При отрицательных температурах поверхностью раздела может служить также и поверхность образовавшейся твердой фазы (льда).

При исследованиях методом ЯМР [4] была обнаружена пленка жидкой воды на поверхности кристаллов льда и определена толщина этой пленки в несколько молекулярных слоев, что соответ-

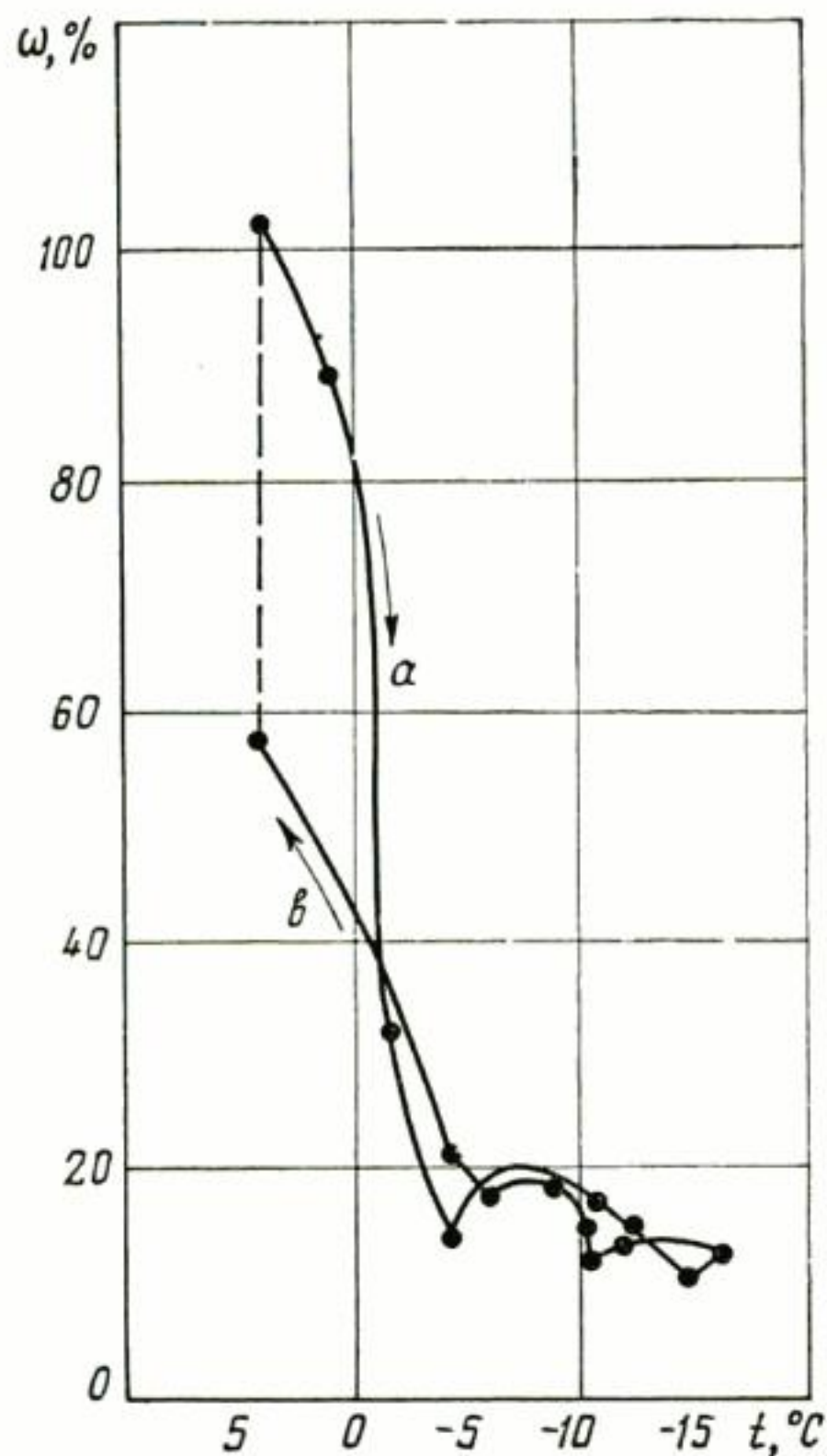


Рис. 2. Температурная зависимость количества невымороженной (подвижной) воды для перца при замораживании (кривая *а*) и оттаивании (кривая *б*).

вует нашим экспериментальным данным, приведенным на рис. 2. Пленка жидкой воды существует при отрицательных температурах как на гидрофобной, так и на гидрофильной поверхностях, однако на последних сохраняется при более низких температурах. Исследуя замороженные системы твердое тело— вода методом ЯМР, авторы эксперимента пришли к выводу, что вымерзание тонких слоев воды представляет собой размытый фазовый переход, растянутый в значительном интервале температур благодаря неоднородности этих слоев, вызванной разбросом частиц по размерам.

Согласно нашим представлениям, размытость фазового перехода граничных слоев воды, наблюдаемая на рис. 2, является результатом степени их структурной упорядоченности и ориентации в пространстве молекул воды.

Три десятилетия назад физическая и коллоидная химия, по свидетельству Н. А. Гусева [3], склонялась к признанию мономолекулярной гидратации, хотя уже были исследования, указывающие на существование полимолекулярной гидратации. Однако экспериментально подтвердить наличие последней оказалось сложно в связи с тем, что сущности связывания воды приписывали только энергетическую природу [8], а энергия связи граничных слоев оказалась ничтожно малой. В настоящее время на первый план выдвигаются структурные свойства воды.

Гипотеза о существовании в адсорбированной воде «фазовых различий», характеризующихся определенной подвижностью молекул воды, была подтверждена экспериментально работами, выполненными методом ЯМР «спиновое эхо», где было обнаружено, что адсорбированная вода имеет не одно, а несколько времен корреляции молекулярной подвижности [7].

Полученные нами экспериментальные данные свидетельствуют в пользу наличия полимолекулярной адсорбции в биологических тканях. Наличие в этих тканях клеточной структуры с ее сложной организацией позволяет им реагировать на внешние и, в частности, температурные воздействия. При этом изменения фазового состояния воды, биоконпонентов цитоплазмы и мембран органелл клетки в процессе действия низких температур могут приводить к изменению ее биохимического состава. Эти изменения могут происходить как в результате криповреждений клеток, так и в результате действия ее защитных механизмов.

Большинство исследователей при изучении фазовых переходов в мембранах обращали основное внимание на изменения их липидных и белковых компонентов, не учитывая фазовые превращения воды. Однако при исследовании суспензии мембран и дисперсии липидов [11] в диапазоне температур от -20 до $+40^\circ\text{C}$ с помощью сканирующей дифференциальной калориметрии не обнаружили фазовых переходов и авторы предположили, что фазовые переходы воды, а не мембранных липидов, определяют фазовое состояние системы.

Многокомпонентный состав растительной клетки не позволяет проконтролировать все возможные варианты фазовых изменений, протекающие одновременно.

Однако модельные исследования, проведенные нами на спектрах ЯМР протонов воды пектиновых студней, приготовленных с добавками сахарозы и лимонной кислоты (рис. 3), показали, что

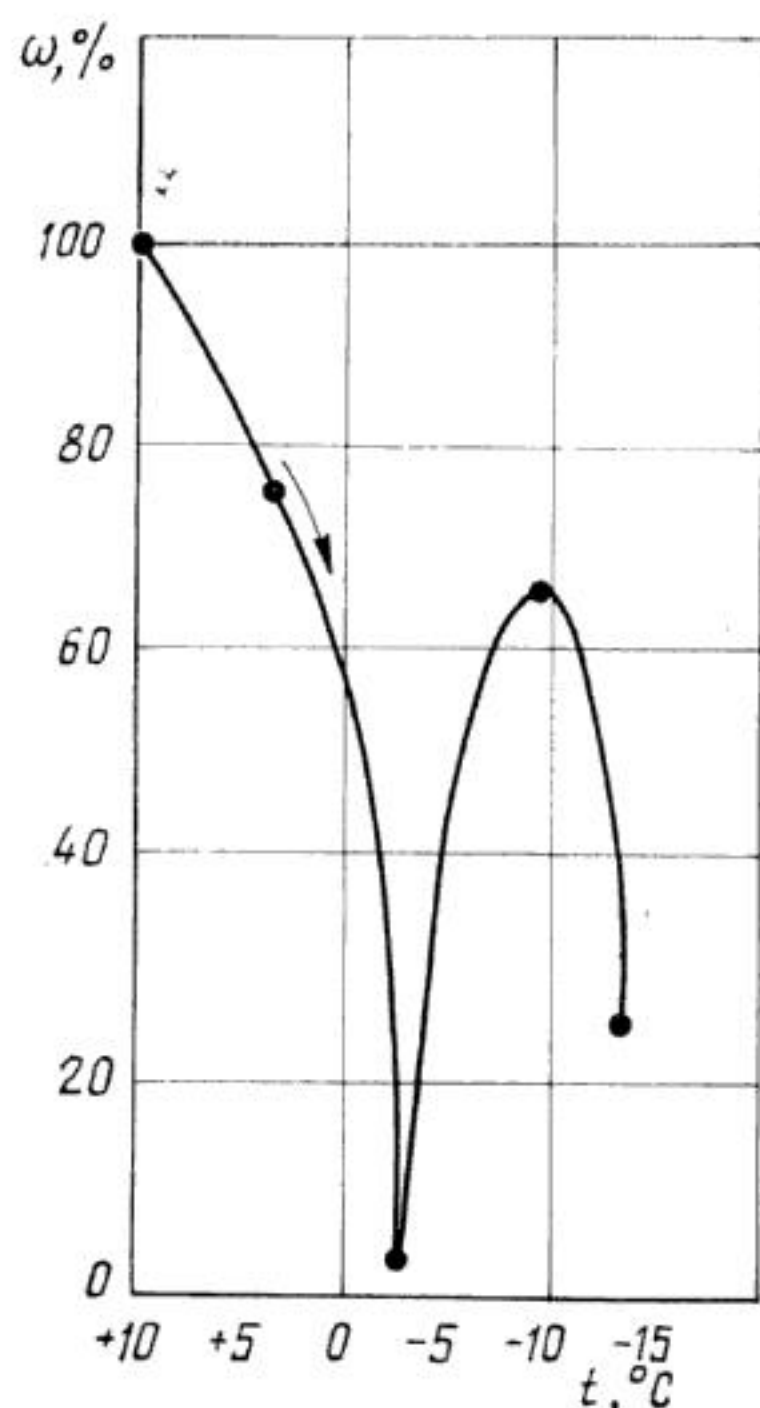


Рис. 3. Температурная зависимость количества невымороженной (подвижной) воды для модельной системы на основе пектина.

поведение воды при понижении температуры достаточно хорошо характеризует общее фазовое состояние системы.

Поскольку биокомпоненты мембран по месту неполярных групп ассоциированы с водой, образуя водородные и гидрофобные связи, в процессе фазового перехода воды в лед при низкотемпературном воздействии происходит нарушение этих связей, которое приводит к конформационной дестабилизации мембранных белков и других макромолекул.

Таким образом, дегидратацию клеточных мембран в процессе замораживания можно считать основной причиной и фоном, на котором происходят дальнейшие этапы криоповреждений: нарушение структурной организации липидного бислоя, агрегирование белков и полисахаридов с последующим освобождением некоторых мембранных ферментов.

Необратимость процесса замораживания растительной ткани характеризуется на кривой температурной зависимости количества подвижной воды смещением кривой размораживания.

Процесс размораживания образца перца осуществляется не плавно, повторяя процесс фазовых переходов, характерных для граничных адсорбционных слоев. После оттаивания свободной влаги, при $+4^\circ\text{C}$ оказывается, что количество выделившейся воды не совпадает с первоначальным и меньше его на 40 %. Эта вода вытекает из поврежденных кристаллами льда тканей, так как замораживание на спектрометре проводили достаточно медленно, со скоростью 0,16 град/мин и должны были образоваться крупные кристаллы льда.

Немонотонный характер оттаивания образца перца свидетельствует о том, что вся связанная вода в исследуемом интервале температур находится в подвижном состоянии. Следовательно, клеточные мембраны не разрушаются полностью в процессе замораживания.

На основании анализа полученных экспериментальных данных можно предположить наличие в растительной клетке трех типов влаги — свободной, слабо-связанной и прочносвязанной, которая характеризуется соответствующими фазами вымерзания, а также подтвердить наличие в растительной клетке трех основных уровней криоповреждений, предлагаемых Белоусом А. М. и Бондаренко В. А. [1]: 1) термодинамического, куда следует отнести и фазовые изменения воды; 2) физико-химического; 3) биохимического.

1. Белоус А. М., Бондаренко В. А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. — Киев: Наук. думка, 1982. — 255 с.
2. Гамильтон К. Л., Макконнел Г. М. Спинные метки. — Успехи химии, 1970, 39, № 3, — с. 531.
3. Гусев Н. А. К вопросу о состоянии воды в растениях. — Физиология растений, 1966, 13, вып. 4, с. 677.
4. Кэливидзе В. И., Курзаев А. Б. Свойства тонких слоев воды по данным метода

- ЯМР. — В кн.: Поверхностные силы в тонких пленках. — М.: Наука, 1979 с. 211.
5. Кротов Е. Г., Загibalова Т. Д. Влияние низких температур на содержание органических кислот в перце и баклажанах. — Изв. вузов СССР, Пищевая технология, 1973, № 2, с. 32.
6. Кротов Е. Г., Загibalова Т. Д. Влияние отрицательных температур на содержание растворимых углеводов в перце, моркови и баклажанах. — В кн.: Холодильная обработка и хранение пищевых продуктов.

Межвуз. сб. науч. тр.— Л.: Изд-во ЛТИ, 1978, с. 8.

7. Манк В. В. Особенности спектров ЯМР молекул в гетерогенных системах. — Укр. хим. журн., 1978, 44, № 9, с. 911.
8. Сент—Дьердьи А. Биоэнергетика. — М.: Физматгиз, 1960. — 155 с.
9. Сергеев Г. В., Батюк В. А. Криохимия. — М.: Химия, 1978. — 296 с.
10. Федюнина Н. А., Бровченко А. А. О влиянии условий замораживания и сортовых особенностей овощей на обратимость

процесса криоконсервирования. — В кн.: Механизмы криоповреждений и криопротекции. — Киев: Наук. думка, 1977, с. 104.

11. Van Stevenink J., Ledebor V. M. Phase transitions in the yeast cell membrane: The influence of temperature on the reconstitution of active dry yeast. — BBA, 1974, 352, N 1, p. 64—70.
12. Drast—Hansen W. Structure and functional aspects in interfacial (vicinal) water as related to membrane and cellular systems. — Colloid int. CNRS, 1976, 246, p. 177—186.

Получена 12.12.83

Одесский технологический институт пищевой промышленности им. М. В. Ломоносова МВССО УССР

УДК 57.043

**Н. С. Пушкарь, Е. А. Гордиенко, Л. Г. Кулешова,
О. И. Гордиенко, Л. Ф. Розанов, Г. С. Ишков**

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО КОНСЕРВИРОВАНИЯ КЛЕТОЧНЫХ СУСПЕНЗИЙ

В настоящее время с помощью глубокого охлаждения осуществляется долгосрочное консервирование клеток крови, костного мозга, микроорганизмов и других клеточных суспензий, а также ряда плотных тканей (например, роговицы). Однако применяемые способы низкотемпературного консервирования разрабатывались эмпирически. Условия консервирования, эффективные для

задач можно считать изучение связи между показателями сохранности биологических объектов и физико-химическими процессами, протекающими в них на различных этапах цикла низкотемпературного консервирования.

Целью настоящего сообщения является краткий обзор некоторых из существующих в настоящее время представлений о физико-химических механизмах повреждения и защиты клеточных суспензий при замораживании. Мы надеемся, что предлагаемый обзор привлечет внимание специалистов смежных с криобиологией областей к постановке и решению задач, представляющих взаимный интерес.

Большинство факторов, вызывающих повреждение клеток при низкотемпературном консервировании, непосредственно или косвенно связано с образованием в клеточной суспензии кристаллов льда. По мере снижения температуры все большая часть растворителя—воды—превращается в лед и концентрация растворенных в жидкой фазе веществ соответственно возрастает. Вследствие увеличения концентрации растворенных во внеклеточной среде веществ, в частности электролитов, на клеточной мембране возникает градиент осмотического давления, вызывающий сравнительно быстрый выход воды из клетки. Проведенный нами [3, 7] анализ физико-математических моделей, основанных на аппарате неравновесной термодинамики, приводит к следующим оценкам. Объем клетки, помещенной в гипертонические условия, вначале быстро уменьшается в течение времени, порядка $\gamma\alpha_p(\varepsilon + \pi)^{-1}$,

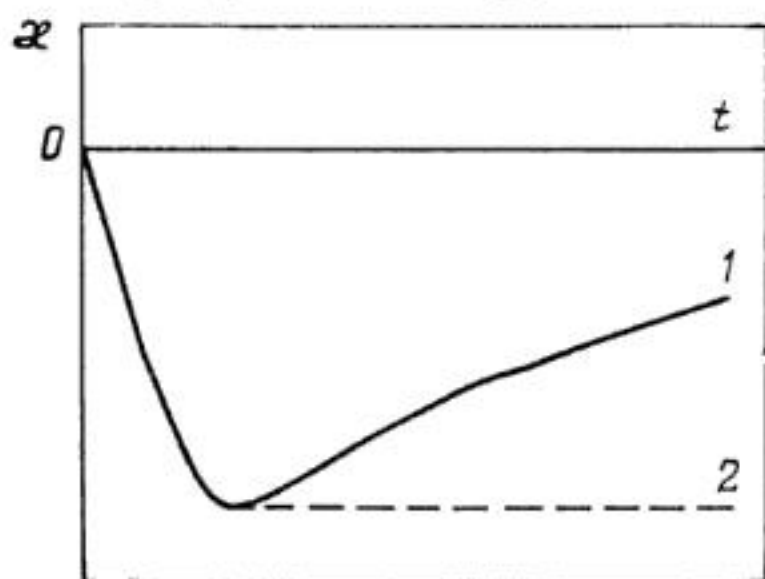


Рис. 1. Теоретическая зависимость относительного объема клеток от времени экспозиции в гипертонической среде:

1 — проникающего криопротектора; 2 — непроникающего криопротектора.

одних объектов, оказывались совершенно неприемлемыми для других. До сих пор отсутствует система представлений, на основе которой можно было бы предсказывать результаты экспериментов по замораживанию — отогреву биологических объектов или предвидеть пути оптимизации условий их консервирования. Поэтому для криобиологов задачей первостепенной важности является раскрытие общих для разных объектов закономерностей и механизмов криоповреждений и криозащиты. Одним из наиболее эффективных подходов к решению этих

где γ — поверхностно-объемное отношение клетки, α_p и ε — коэффициент фильтрации и модуль упругости клеточной мембраны соответственно, а π — осмотическое давление в суспензии. Затем объем медленно восстанавливается до первоначального значения в течение времени $[\gamma P]^{-1}$, где P — коэффициент проницаемости плазматической мембраны для наиболее быстро проникающего через нее растворенного вещества (рис. 1). В растворе непроницающего вещества объем клетки после быстрой

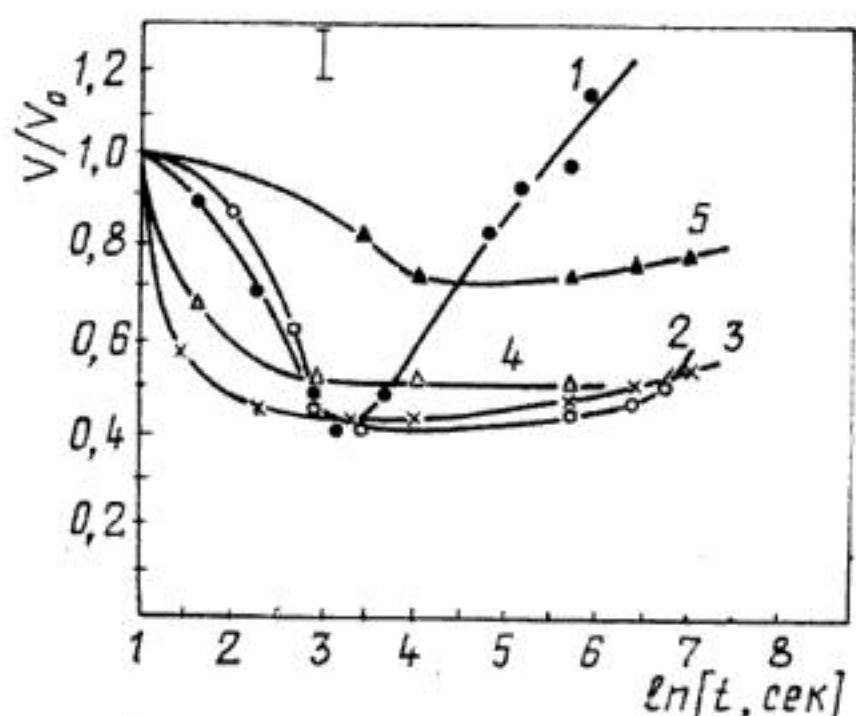


Рис. 2. Зависимость относительного объема клеток перитонеального экссудата мыши от времени экспозиции в гипертонических растворах глицерина: концентрация 1. 40 %; 2. 30 %; 3. 20 %; 4. 10 %; 5. 5%.

фазы, связанной с обезвоживанием, длительное время остается неизменным. Относительное уменьшение объема $\frac{\Delta V}{V} = \frac{\sigma \Delta \pi'}{\varepsilon + \pi}$, где σ — коэффициент избирательности клеточной мембраны для растворенного вещества, а $\Delta \pi$ — начальный перепад осмотического давления на клеточной мембране. Эти теоретические представления удовлетворительно согласуются с экспериментальными данными. На рис. 2 представлена полученная нами [7] зависимость относительного объема клеток перитонеального экссудата мыши от времени экспозиции (в сек.) в гипертонических растворах глицерина. В 5 %-ном растворе глицерина объем клеток в течение быстрой фазы уменьшается незначительно и в дальнейшем полностью восстанавливается. При контакте с 10 и 20 %-ным растворами глицерина клетки, быстро достигнув минимального размера, в течение последующих 15 мин восстанавливают свой объем на 80—90 %. В растворах непроницающего криопротектора ПЭО-1500 после первой фазы обезвоживания объем не восстанавливается (рис. 3).

Изменение объема клеток сопровождается деформацией и перераспределением липидов и белков на поверхности мембран [1]. Существует критическое напряжение, при котором происходит нарушение свойств избирательной проницаемости мембраны как вследствие перераспределения мембранных компонентов и образования доменов, так и в результате концентрации напряжений около физико-химических неоднородностей [6]. Нарушения свойства избирательной проницаемости мембраны могут происходить и

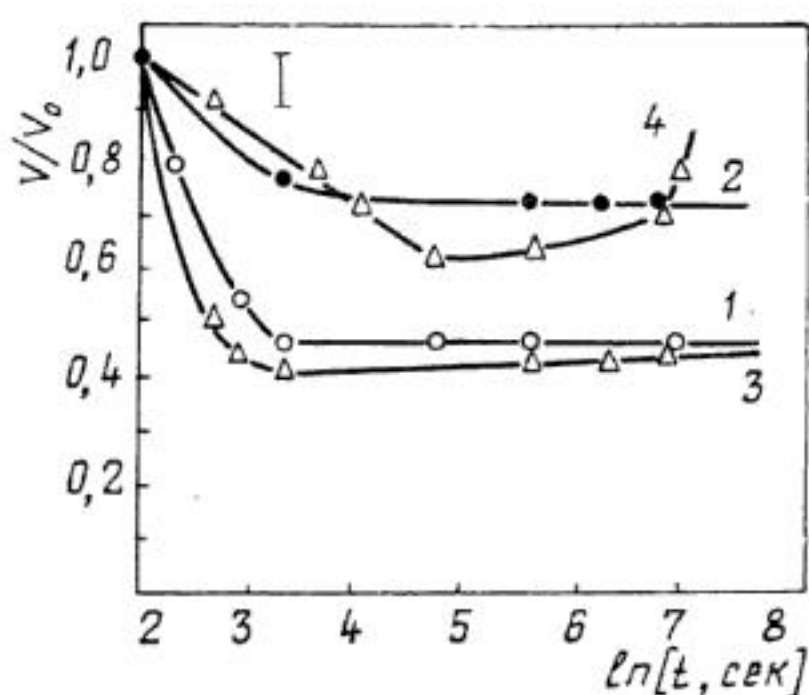


Рис. 3. Зависимость относительного объема клеток от времени экспозиции клеток в растворах непроницающих криопротекторов: 1. 10 % ПЭО-1500; 2. 40 % ПЭО-1500; 3. 10 % ПЭО-400; 4. 40 % ПЭО-400.

в результате фазовых переходов, имеющих место в плазматической мембране при снижении температуры. Методом ЯМР-спинового эха нами изучена температурная зависимость проницаемости эритроцитарной мембраны для воды в гипертонических растворах NaCl, а также в растворе с нормальной тоничностью [4]. Показано, что Аррениусовы зависимости процесса переноса молекул воды через эритроцитарную мембрану претерпевают разрыв с резким изменением наклона. Температура, при которой происходит разрыв и наблюдается изменение наклона Аррениусовой зависимости, несколько варьирует для эритроцитов разных доноров и находится в области 8—12 °С. Энергия активации для температур выше 12 °С составляет $17,5 \pm 0,6$ кДж · Моль⁻¹ и совпадает с энергией активации воды в объемной фазе. Энергия активации в низкотемпературной области (ниже 8 °С) составляет $44,8 \pm 5,0$ кДж · Моль⁻¹, что соответствует величине энергии активации диффузии воды через липидные бислои. В связи с полученными значениями энергии активации диффузионного

обмена воды через эритроцитарную мембрану можно предположить, что в области температур ниже 8°C диффузия воды происходит только по липидному пути, а белковые пути блокируются. Это может быть обусловлено тем, что граничащие с белками липиды претерпевают фазовые превращения при температуре $8\text{--}12^{\circ}\text{C}$, в результате которого изменяется проводимость взаимодействующих с ними белковых каналов. При увеличении концентрации NaCl во внеклеточной среде до $0,5 \text{ Моль} \cdot \text{л}^{-1}$ наблюдается существенное уменьшение энергии активации диффузии воды через эритроцитарную мембрану, что является признаком ее повреждения. При тех же условиях энергия активации пассивной утечки калия из эритроцитов уменьшается вдвое по сравнению с таковой в изотонической среде, а в $0,8 \text{ М}$ солевом растворе приближается к значению энергии активации диффузии в объемном растворе и составляет $17 \pm 1 \text{ кДж} \cdot \text{Моль}^{-1}$. Полученный результат свидетельствует о нарушении свойств избирательной проницаемости эритроцитарной мембраны в области концентраций выше $0,5 \text{ Моль} \cdot \text{л}^{-1}$.

На основании экспериментов, в которых гемолиз эритроцитов наблюдался, когда концентрация NaCl вне клеток достигала значения $0,8 \text{ Моль} \cdot \text{л}^{-1}$, Лавлок [10] пришел к выводу, что повреждение клеток связано с увеличением концентрации электролитов до этого значения. В дальнейшем, однако, было установлено, что клетки повреждаются также и несолевыми растворами, осмолярность которых эквивалентна осмолярности раствора NaCl с концентрацией $0,8 \text{ Моль} \cdot \text{л}^{-1}$. Так, например, гемолиз эритроцита всегда начинается при одной и той же осмолярности (порядка $1800 \text{ мОсм} \cdot \text{л}^{-1}$) в разных растворах, хотя в некоторых из них содержание электролитов в момент повреждения было небольшим. Тот факт, что эритроциты, в которых клеточная вода на 50% замещена глицерином, повреждаются при таком же объеме, как и незащищенные, свидетельствует о том, что к повреждению приводит не удаление воды из клеток как таковое, а уменьшение клеточного объема до критического значения [11]. Значение критической осмолярности внеклеточного раствора широко варьирует для разных клеток. Для оварнальных клеток культуры китайского хомячка и клеток мышинных

эмбрионов оно составляет примерно $7750 \text{ мОсм} \cdot \text{л}^{-1}$, а для мышинных клеток $L-929$ — около $2600 \text{ мОсм} \cdot \text{л}^{-1}$. С точки зрения гипотезы минимального объема [11] одним из наиболее очевидных механизмов криопротекции клеток при замораживании является механизм, основанный на способности хорошо проникающих в клетку криопротекторов увеличивать неводный объем клетки, так что в результате больше воды должно быть удалено из клетки прежде, чем общий объем ее уменьшится до критического значения. Проведенный нами [6] анализ напряжений, возникающих в тонкой оболочке с круговым отверстием, показывает, что вследствие концентрации напряжений около отверстия даже при небольшом растяжении оболочки площадь сечения отверстия увеличивается во много раз больше, чем площадь самой мембраны в целом. Полагая, что избирательная проницаемость клеточной мембраны может быть связана с наличием в ней пор, уменьшение значений коэффициентов избирательности мембраны для различных растворенных веществ возможно объяснить ростом сечения мембранных пор при чрезмерной деформации. В первую очередь мембрана окажется проницаемой для молекул, имеющих небольшие размеры. Дальнейшее увеличение диаметра пор может привести к полной утрате клеткой свойства избирательной проницаемости, так что все растворенные вещества будут проникать через мембрану так же, как и растворитель, т. е. вода. В этом случае должно произойти полное выравнивание состава внеклеточной и внутриклеточной сред, перепад осмотического давления исчезнет и размер пор окажется близким к первоначальному. С этими представлениями согласуются результаты экспериментов, в которых эритроциты после значительного обезвоживания теряли калий и гемоглобин, а затем быстро восстанавливали свой объем до первоначального значения. Осмотические свойства эритроцитов после этого сохранялись.

Такие явления, как денатурация белков, латеральное разделение мембранных липидов, сопутствующие обезвоживанию, являются процессами, требующими значительной активации, и поэтому протекают достаточно медленно. Так, исходя из экспериментальных данных о значении коэффициентов латеральной диффузии белков, время релаксации,

соответствующее образованию белковых доменов в клеточной мембране, составляет около 6 мин [11]. В связи с этим увеличение скорости охлаждения и сокращение вследствие этого времени воздействия гиперконцентрированных растворов на клетки приводит к уменьшению вероятности повреждения клеток за счет факторов, связанных с обезвоживанием.

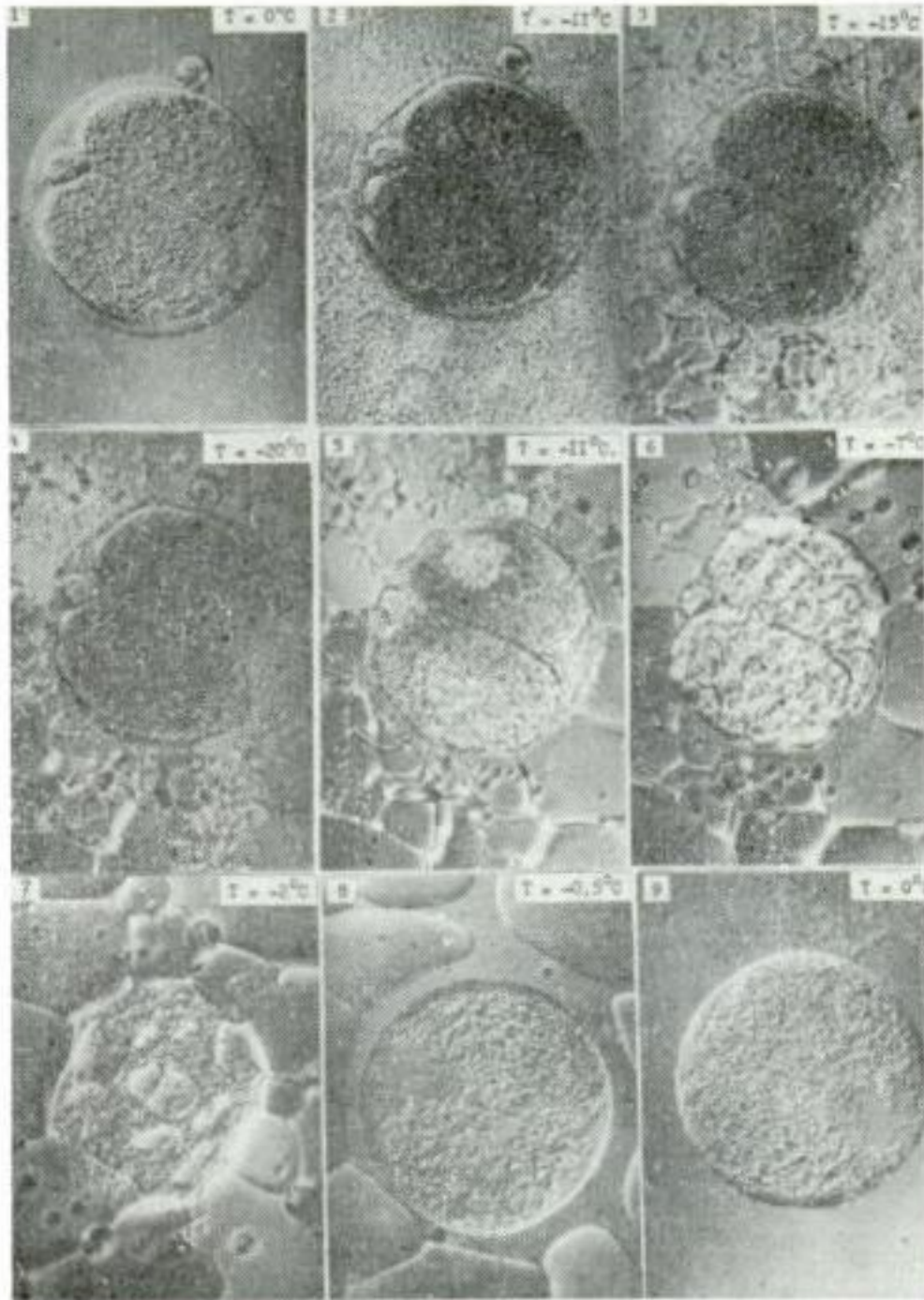


Рис. 4. Кинетика процесса замораживания-отогрева оплодотворенной яйцеклетки мыши. Повреждение внутриклеточных мембран.

Однако, по мере увеличения скорости охлаждения растет переохлаждение протоплазмы, поскольку вода не успевает выходить из клеток в количестве, достаточном для выравнивания значений химических потенциалов вне и внутри клеток. С ростом переохлаждения увеличивается и вероятность образования внутриклеточных кристаллов льда. Если размер кристаллов льда внутри клеток превышает определенный для данного типа клеток размер, гибель клетки становится неизбежной. На основании электронно-микроскопических исследований критический радиус кристаллов льда для клеток культуры китайского хомячка оценивается в 0,05 мкм. Считается, что механизм повреждения клеток при образовании, росте и рекристаллизации внутриклеточных кристаллов связан с

механическим взаимодействием движущейся границы фаз с мембранными структурами, хотя окончательно он не выяснен. Рис. 4 и 5 иллюстрируют повреждение мембран оплодотворенных яйцеклеток мыши в результате формирования внутриклеточного льда [9]. Следует отметить, что повреждение указанного типа проявляется на этапе отогрева. Таким образом, повреждение клеток при замораживании условно можно разделить на два класса. Первый из них реализуется при медленных скоростях охлаждения и связан с эффектами, вызванными обезвоживанием, а второй класс обусловлен образованием внутриклеточных кристаллов льда и проявляется при высоких скоростях охлаждения. В связи с этим максимальная сохранность клеток может быть обеспечена выбором определенной оптимальной скорости охлаждения, при которой повреждающее действие, связанное с обезвоживанием клеток, не успевает проявиться в значительной степени, а переохлаждение в клетках настолько мало, что внутриклеточная кристаллизация не возникает.

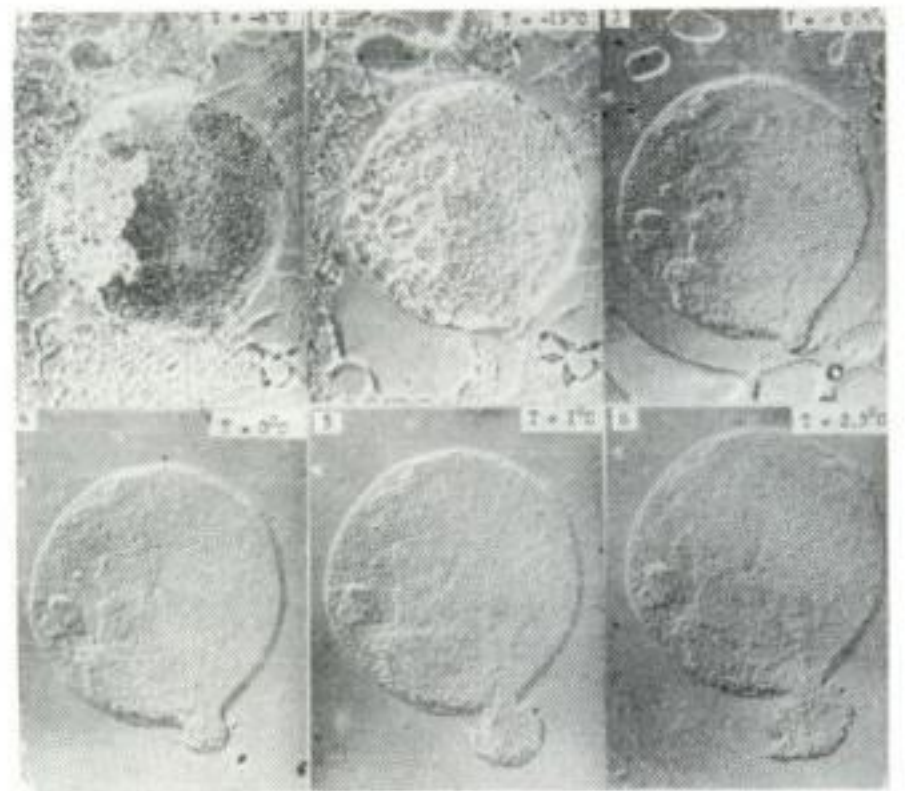


Рис. 5. Кинетика процесса замораживания-отогрева оплодотворенной яйцеклетки мыши. Формирование локального разрыва плазматической мембраны.

Критическая величина переохлаждения протоплазмы, при которой наступает внутриклеточная кристаллизация, зависит от степени обезвоживания клеток и количества криопротектора в протоплазме. Оптимальная скорость охлаждения определяется выражением:

$$\dot{T}_{\text{опт}} = \delta T / \tau, \quad (1)$$

$$\tau = [\gamma \alpha_p (\varepsilon + \pi)]^{-1}$$

и зависит от поверхностно-объемного отношения клеток (γ), коэффициента

фильтрации (α_p) и модуля упругости плазматической мембраны (ϵ), осмотического давления растворенных внутриклеточных веществ (π) и критической величины переохлаждения протоплазмы (δT). Для эритроцитов оптимальная скорость охлаждения по порядку величины составляет 1000 °C/мин, для культуры клеток китайского хомячка — 100 °C/мин, для дрожжей — около 10 °C/мин, для клеток костного мозга и ядерных

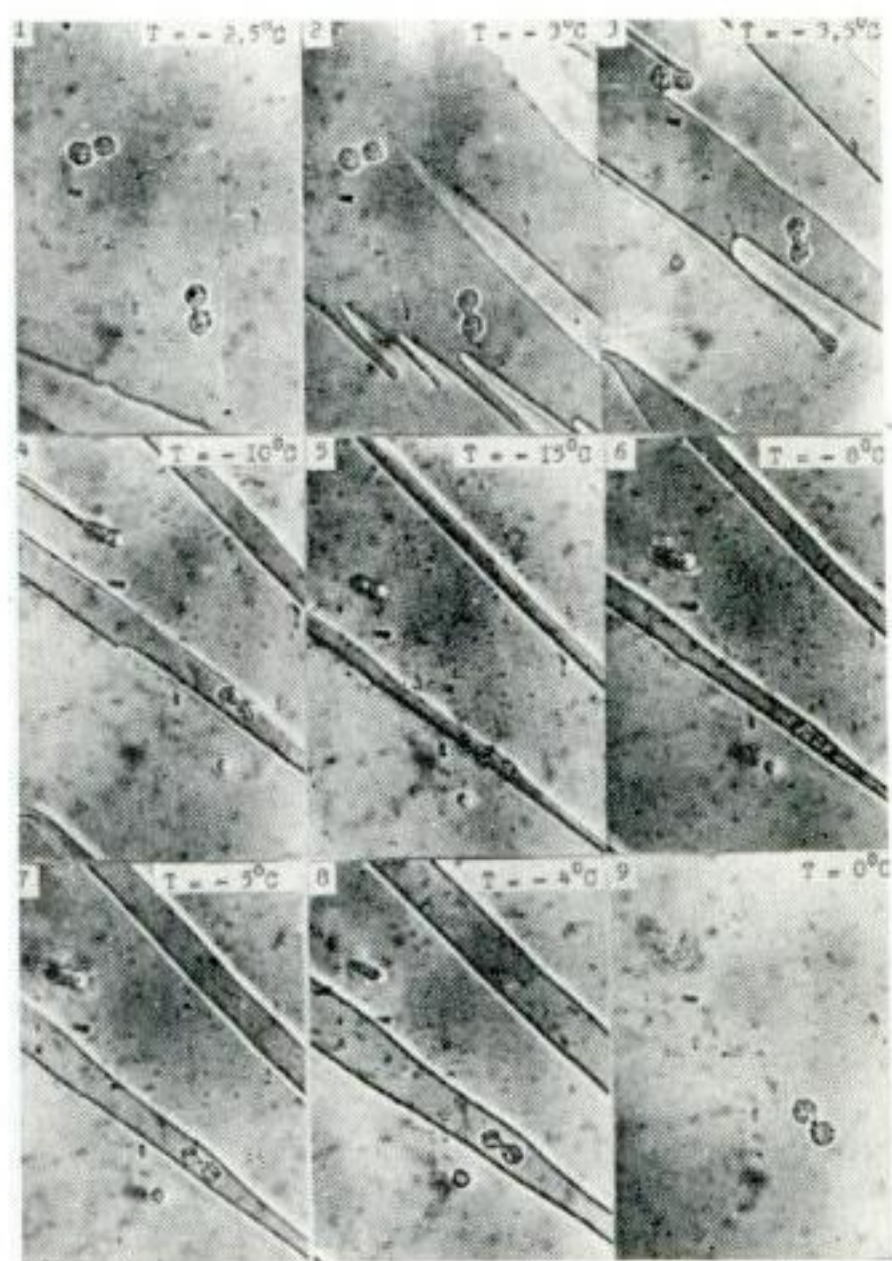


Рис. 6. Зависимость исхода цикла замораживания-отогрева клеток почек сирийского хомячка от местонахождения их в кристаллической структуре.

клеток периферической крови человека оптимум находится в области 1—10 °C/мин. Высокая оптимальная скорость для эритроцитов объясняется аномально высокой проницаемостью эритроцитарной мембраны для воды и большим поверхностно-объемным отношением.

Одной из причин криповреждения может быть механическое давление растущих кристаллов льда на клетки. К этому выводу пришел Ней [12] на основе следующих экспериментальных данных. Изучая повреждение эритроцитов при замораживании методом криомикроскопии, он заметил, что клетки, сгруппированные в канальцах между кристаллами льда, повреждались больше клеток, которые оставались в состоянии свободной взвеси. Им установлено, что увеличение гемолиза коррелирует с уве-

личением количества клеток в единице объема замораживаемой суспензии. Существование механического феномена раздавливания клеток растущими кристаллами внутриклеточного льда косвенно подтверждается тем фактом, что рекристаллизационное укрупнение структуры льда при отогреве положительно коррелирует с гемолизом в эритроцитарной суспензии. Результаты экспериментов свидетельствуют о сильном влиянии относительного размера каналов на сохранность клеток культуры ткани почки сирийского хомячка при замораживании суспензии со скоростью 1 °C/мин в присутствии глицерина, что указывает на наличие механического взаимодействия кристаллов льда с клетками, ведущего к их разрушению [8].

Проявлением кристаллизационного давления является способность растущих кристаллов льда отодвигать взвешенные в растворе макроскопические частицы и клетки. Так, кристаллы льда при скоростях движения границы раздела фаз 4 мкм/сек и меньше способны отодвигать красные кровяные клетки человека [2]. Удалось выделить критический диапазон скоростей роста кристаллического фронта, в котором происходит переход от устойчивого отодвижения основной массы клеток к полному захвату всех клеток. В случае незащищенных клеток захват эритроцитов в лед приводит к частичному или полному их разрушению. Визуально это проявляется в потере контраста клеток, обусловленного выходом гемоглобина. В случае отодвижения эритроцитов кристаллическим фронтом гемолиз не наблюдается, что указывает на возможный путь повышения сохранности клеток при условии отсутствия явления их захвата в лед. Аналогичное явление отмечается и при замораживании клеток культуры почек сирийского хомячка (рис. 6), что позволяет говорить об общности вышеприведенного заключения [8]. В то время как в солевых растворах отодвижение клеток наблюдается при скорости движения кристаллического фронта порядка нескольких микрон в секунду, в растворах таких криопротекторов, как глицерин и ПЭГ-300, клетки практически не отодвигались льдом в области концентраций выше 0,2 Моль л⁻¹. В частности, добавление криопротектора в изотонический раствор NaCl в концентрации 5 % исключает

отодвижение клеток льдом при указанных скоростях продвижения кристаллического фронта. Возможно, одной из сторон защитного действия криопротекторов при замораживании клеточных суспензий является их способность значительно ослаблять величину структурной составляющей расклинивающего давления при механическом взаимодействии кристаллов льда с биологическими структурами [2].

В последние годы для низкотемпературного консервирования биологических суспензий успешно применяются быстрые двухступенчатые программы замораживания. Они заключаются в следующем: первоначально консервируемые образцы замораживаются до умеренно низкой температуры (от -15 до -45°C), затем выдерживаются при этой температуре определенный промежуток времени, а после этого быстро охлаждаются погружением в азот. Хотя при двухступенчатом замораживании внутриклеточные кристаллы могут зарождаться уже на протяжении первого этапа охлаждения при определенном образом подобранной температуре остановки их размер еще не достигает критического значения [5]. Образовавшиеся внутриклеточные кристаллы не повреждают клетки, но являются потенциально опасными для нее. Более глубокое охлаждение на первом этапе при отсутствии температурной остановки привело бы к дальнейшему росту внутриклеточных кристаллов и, следовательно, к гибели клеток. Температурная остановка влечет за собой качественные изменения в процессе диффузионного обмена водой между клетками и окружающей их жидкой фазой [5]. За счет образования внутриклеточных кристаллов исчезает концентрационное переохлаждение внутриклеточной среды по отношению ко внеклеточной, так что клетки почти не обезвоживаются и не деформируются. Внутриклеточные кристаллы, как и внеклеточные, в период адаптации при промежуточной температуре находятся в термодинамическом равновесии с окружающей их средой. Поэтому разность химических потенциалов воды вне и внутри клетки, которая является движущей силой ее обезвоживания, определяется только разностью кривизн внеклеточных и внутриклеточных кристаллов. Под влиянием указанной термодинамической силы происходит перенос внутриклеточной воды через клеточную

мембрану наружу, сопровождающийся растворением кристаллов в клетке, ибо кристаллы вне клеток, как правило, велики по сравнению с внутриклеточными. Характерное время растворения внутриклеточных кристаллов в период температурной остановки совпадает со временем релаксации клеточного объема к квазиравновесному значению в гипертонической среде. Если продолжительность периода адаптации при умеренно низкой температуре составляет время, необходимое для «поедания» мелких внутриклеточных кристаллов более крупным внеклеточным льдом по такому механизму, то внутриклеточные кристаллы, образовавшиеся в период охлаждения до температурной остановки, так и не достигнув критических размеров, растворяются, а на последующем этапе охлаждения, хотя оно также является быстрым, внутриклеточные кристаллы вновь не зарождаются вплоть до эвтектической температуры, где внутриклеточный раствор стеклует. Явление стеклования внутриканальцевого раствора, в котором сосредоточено большинство клеток, вытесненных в каналы кристаллами льда, по-видимому, имеет решающее значение для сохранения клеток в жизнеспособном состоянии в режиме замораживания с холодовой адаптацией.

При отогреве, особенно при температурах, близких к температуре плавления, когда время преобразования формы и размеров кристаллов становится сравнимым с характерным временем изменения температуры при отогреве, вероятность повреждения клеток из-за рекристаллизации резко возрастает. Целесообразность быстрого отогрева замороженной суспензии определяется, в частности, стремлением избежать этих повреждений. Важным обстоятельством в пользу быстрого двухэтапного замораживания по сравнению с замораживанием по оптимальной в свете двухфакторной гипотезы программе, является значительно более высокая в первом случае, чем во втором, устойчивость клеток к постгипертоническому лизису. Это вызвано тем, что при быстром двухступенчатом замораживании с остановкой для адаптации процессы массопереноса через клеточные мембраны происходят в течение промежутка времени, сравнимого со временем проникновения воды через клеточные мембраны. Обмен между клеткой и окружающей ее жидкой

фазой в этом случае осуществляется только за счет растворителя — воды, но не растворенных веществ, в связи с чем клетки, замороженные по двухступенчатой программе, оказываются устойчивыми к постгипертоническому лизису при отогреве, отмывке и трансфузии [5].

Таким образом, изучение физико-химических аспектов низкотемпературного

консервирования и раскрытие механизмов криоповреждений служат методологической основой при разработке эффективных методов длительного консервирования клеточных суспензий в жизнеспособном состоянии. Дальнейший прогресс на этом пути может быть достигнут благодаря объединению усилий специалистов различных областей естествознания.

1. Белоус А. М., Бондаренко В. А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. — Киев: Наук. думка, 1982, — 255 с.
2. Бронштейн В. Л., Иткин Ю. А., Ишков Г. С. Движение и захват клеток кристаллами льда при замораживании расплава с примесями. — В кн.: Рост из расплава и раствора в расплаве (процессы кристаллизации и образования дефектов). Тез. докл. 6 Международной конф. по росту кристаллов. М., 1980, с. 132—133.
3. Гордиенко Е. А., Гордиенко О. И., Иткин Ю. А. Термодинамическая модель пассивного переноса многокомпонентной жидкости через замкнутую избирательно проницаемую мембрану. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 9, с. 29—36.
4. Емец Б. Г., Гордиенко О. И., Желякова Т. А., Шейкин В. И. Температурная зависимость водной диффузионной проницаемости мембран эритроцитов. — В кн.: Вторая Всесоюзная конференция по теоретическим и прикладным вопросам криобиологии. Харьков, 9—11 окт. 1984 г. Тез. докл. Харьков, 1984, с. 30.
5. Иткин Ю. А., Бронштейн В. Л., Гордиенко Е. А., Марценюк Ф. В. Замораживание, факторы, механизмы и гипотезы криоповреждения биологических объектов. — В кн.: Криоконсервирование клеточных суспензий. Киев: Наук. думка, 1983, с. 26—44.
6. Иткин Ю. А., Гордиенко Е. А., Бронштейн В. Л. Физико-математический анализ механизмов криоповреждений и криозащиты клеток. — В кн.: Актуальные проблемы криобиологии. Киев: Наук. думка, 1981, с. 300—343.
7. Кулешова Л. Г., Гордиенко Е. А., Розанов Л. Ф. Реакция клеток на гипертонические воздействия при криопротекции. — Биофизика, 1982, 27, № 4, с. 660—664.
8. Кулешова Л. Г., Худяков Г. А. Повреждение клеток почек сирийского хомячка при замораживании. — Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 12, с. 24—28.
9. Kuleshova L. G., Levchenko E. N. Cryomicroscopic observation of intracellular crystallization in frozen fertilized mouse ova and infusoria. — Cryo-Letters, 1982, 3, N 4, p. 213—220.
10. Lovelock J. E. The haemolysis of human red blood cells by freezing and thawing. — Biochim. Biophys. Acta, 1953, 10, p. 414—426.
11. Meryman H. T. Freezing injury and its prevention in living cells. — Ann. Rev. Biophys. and Bioeng., Palo Alto, Calif., 1974, 3, p. 341—363.
12. Nei T. Mechanism of haemolysis of erythrocytes by freezing at nearzero temperature. — In: Frozen Cell, London, 1970, p. 131—147.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР, Харьков

Получено 22.10.84

УДК57.043 615.832.9:616—003.93

**Б. П. Сандомирский, Н. А. Волкова, А. С. Журавлев, Н. И. Коцько,
О. Е. Писанный, Н. С. Сигал, В. Ф. Козлова, Р. К. Хайкин**

МЕХАНИЗМЫ КРИОСТИМУЛЯЦИИ РЕГЕНЕРАЦИИ ПОВРЕЖДЕННЫХ ТКАНЕЙ

Применение холода в качестве лечебного фактора обусловлено деструкцией тканевых элементов или стимуляцией репаративных процессов.

При изучении охлаждения изолированной и функционирующей в условиях организма кожи была установлена значимость не только параметров криовоздействия, но и исходного состояния ткани [12]. Положительное влияние охлаждения на процессы заживления ожоговых и гнойных ран связано со снятием гипертермии, улучшением сосудисто-тканевой циркуляции, снижением инфицированности, увеличением темпа обра-

зования грануляций и восстановлением функции фибробластических клеточных элементов [3, 14].

С целью изучения стимулирующего процессы регенерации влияния низких температур на другие виды тканей, в том числе и при выполнении повторяющихся криовоздействий, были проведены исследования печени животных с экспериментальным циррозом, стенки желудка и 12-перстной кишки подопытных животных, а также больных при криотерапии дуоденальных пептических язв и хронического тонзиллита.

Состояние печени с экспериментальным циррозом после криовоздействий

Материал и методы. Исследование выполнено на 50 кроликах породы Шиншилла массой 2,5—3,0 кг и 70 крысах-самцах линии Вистар массой 200—250 г, у которых вызывали деструктивно-дистрофический процесс—экспериментальный цирроз печени — в результате введения 40 %-ного раствора четырех-

цесса регенерации после хронической нитоксикации CCl₄ (4 серия).
Процессы посттравматической регенерации изучали в сроки 1, 3, 7, 10, 14, 30 и 60 сут после различных вариантов воздействия на орган с помощью таких показателей как динамика массы тела, макроскопическое состояние органов брюшной полости и зоны воздействия, количество и вид осложнений, величина внутрипортального давления, изменения

Характеристика экспериментальных исследований на печени при экспериментальном циррозе

№№ серий	Вид воздействия	Количество операций		Вид исследования, количество и вид животных											
				Дебита-метрия		Макроскопическая оценка состояния органов брюшной полости		% осложнений		Летальность (%)		Органное культивирование, к-во эксплантаций	Гистологическое исследование		
		1*	2**	1	2	1	2	1	2	1	2	2	1	2	
1.	Резекция левой доли печени в объеме 10—12 % массы органа с наложением П-образных швов	9	16	3	9	8	14	44 ± 18	6 ± 6	11 ± 11	12 ± 8	1	9	6	
2.	Замораживание левой доли печени в объеме 10—12 % массы органа при эксплуатации криовоздействия 2 мин	12	16	9	10	12	11	42 ± 15	25 ± 11		6 ± 6	6	12	6	
3.	Точечное замораживание 5—8 % массы органа при экспозиции криовоздействия 1 мин	11	5	4	5	11	5	0	0	0	0	1	11	5	
4.	Контроль	14	11	5	8	14	11	—	—	14 ± 10	16 ± 4	7	14	9	
Итого		32	48	21	32	45	41					15	46	26	

Примечание: 1* — кролики, 2** — крысы.

хлористого углерода (кроликам — по методике [10], крысам — из расчета 0,2 мл/100 г массы животного 2 раза в неделю на протяжении 2 мес.) На 5—20 сут после окончания введения гепатотропного яда в соответствии с поставленной целью проведены следующие серии экспериментов: резекция левой доли печени в объеме 10—12 % массы органа с наложением П-образных швов (1), замораживание левой доли печени в таком же объеме (2), точечные криовоздействия с последовательным замораживанием нескольких долей печени с суммарным объемом 5—8 % массы органа (3). Криовоздействия производили при помощи аппликаторов с температурой на воздухе —180 °С, диаметром 10 мм (у кроликов) и 4 мм (у крыс), в течение 1 или 2 мин в каждой точке. Контрольную группу составили животные со спонтанным течением про-

строения ткани печени (на гистологических срезах из парафиновых блоков, окрашивание гематоксилином и эозином). Кроме того, для выявления способности к регенерации клеточных элементов печени подопытных животных применяли метод органного культивирования фрагментов печени белых крыс (таблица).
Результаты исследования и их обсуждение. После окончания затравки CCl₄ наблюдали различной степени выраженности цирротические изменения печени и окружающих органов: почти у всех животных печень уменьшена в размерах, глссонова капсула утолщена, края долей печени округлены, с усиленным дольчатым рисунком; у значительной части животных увеличена селезенка; внутрипортальное давление повышено до 200—250 мм вод. ст., асцит.
Динамика массы тела животных в исследуемых группах очень сходна. После-

операционные осложнения во всех сериях опытов, кроме третьей, проявлялись в виде абсцессов в зоне вмешательства, обширного спаечного процесса, отторжения некротизированных участков печени после наложения швов и криодеструкции (см. таблицу).

Следовательно, точечное промораживание ткани органа является менее травматичным способом стимуляции регенерации паренхимы печени, о чем также свидетельствуют данные световой микроскопии и органного культивирования.

При гистологическом изучении у животных выявлена картина развитого цирроза печени. При этом наблюдается выраженная перестройка печеночной паренхимы, мощное разрастание соединительной ткани по периферии долек, диффузное прорастание органа фиброзными тяжами с образованием ложных долек. В формирующихся соединительнотканых прослойках встречаются лимфоидные клетки, гистиоциты, изредка сегментоядерные лейкоциты. Радиальность печеночных пластинок в некоторых участках нарушена. Гепатоциты дистрофически изменены, полиморфны. Имеются зоны диффузного некроза клеток, а также дегенерация и пикноз отдельных ядер (рис. 1).

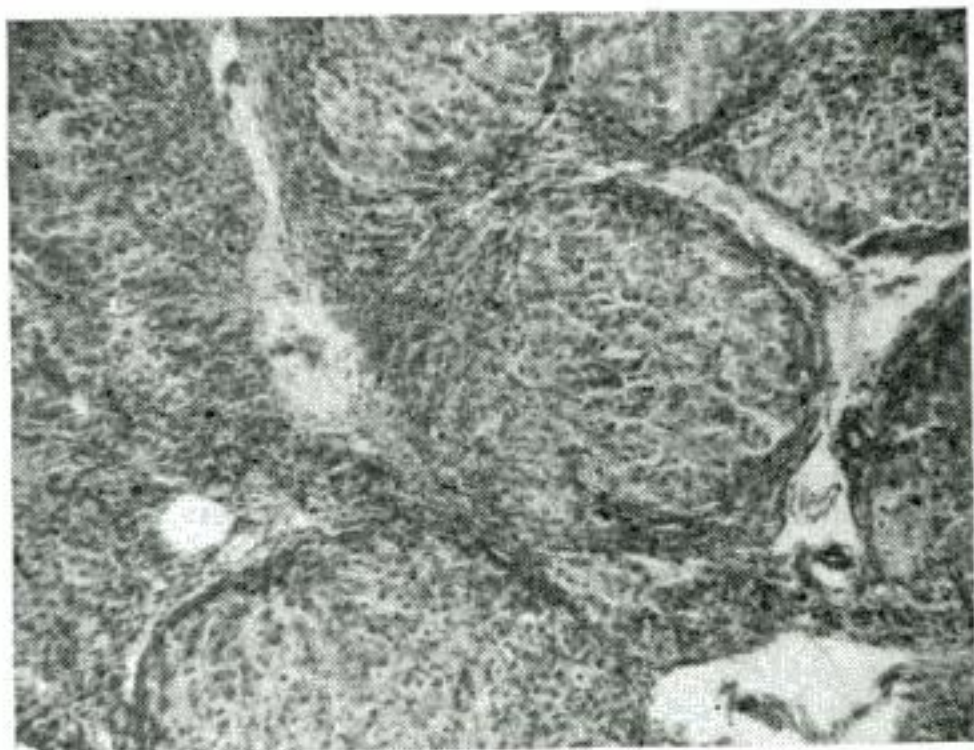


Рис. 1. Цирротически измененная печень кролика после окончания введения четыреххлористого углерода. Гематоксилин и эозин, ув. 85.

После криовоздействия на ткань левой доли печени у животных 2 и 3 серий через 30 сут отмечается по сравнению с контролем значительное уменьшение соединительнотканых прослоек, окружающих ложные дольки, менее выражены дистрофические изменения в гепатоцитах, встречаются крупные печеночные клетки с заметно увеличенным ядром, содержащим большее, чем в норме,

количество ядрышек и хроматина. К 60 сут после тех же воздействий наблюдается дальнейшее, более выраженное восстановление структуры патологически измененного органа. Появляется большое количество молодых гепатоцитов, ведущее к увеличению размеров ложных долек и истончению соединительнотканых тяжей вплоть до исчезновения. Архитектоника органа местами изменена, но в основном дольчатое строение паренхимы просматривается

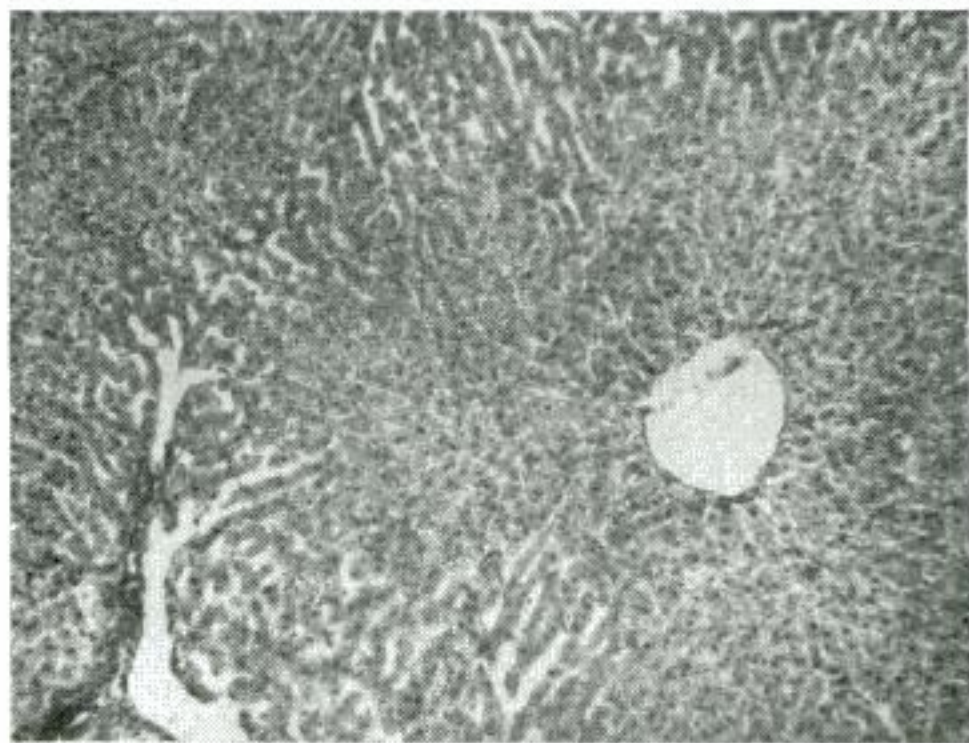


Рис. 2. Печень кролика на 60-е сут. после криодеструкции 10 % паренхимы органа. Уменьшение соединительнотканых прослоек между печеночными дольками. Гематоксилин и эозин, ув. 85.

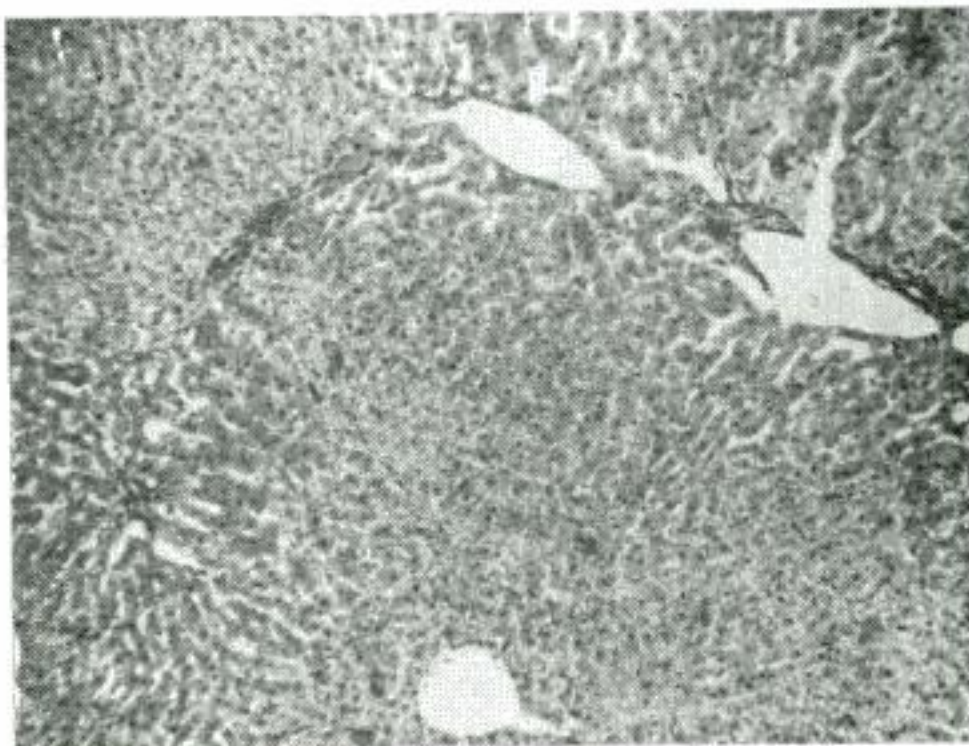


Рис. 3. Структура печени кролика на 60-е сут после резекции органа с наложением П-образных швов. Уменьшение фиброза. Гематоксилин и эозин, ув. 85.

(рис. 2). Процессы регенерации после криодеструкции 5—8 % массы органа (3 серия) выражены сильнее, чем в случае криоповреждения 10—12 % его и сходны с состоянием печени подопытных животных 1 серии (рис. 3).

Определенный интерес представляют данные органного культивирования экспериментального материала. Эксплантаты печени интактных животных прояв-

ляли слабые признаки роста: форма их мало изменялась в течение срока наблюдения, за пределы кусочка мигрировали единичные клетки (рис. 4) и



Рис. 4. Эксплантат нормальной печени крысы, 10 сут культивирования. Единичные клетки на периферии эксплантата. Гематоксилин и эозин, ув. 100.

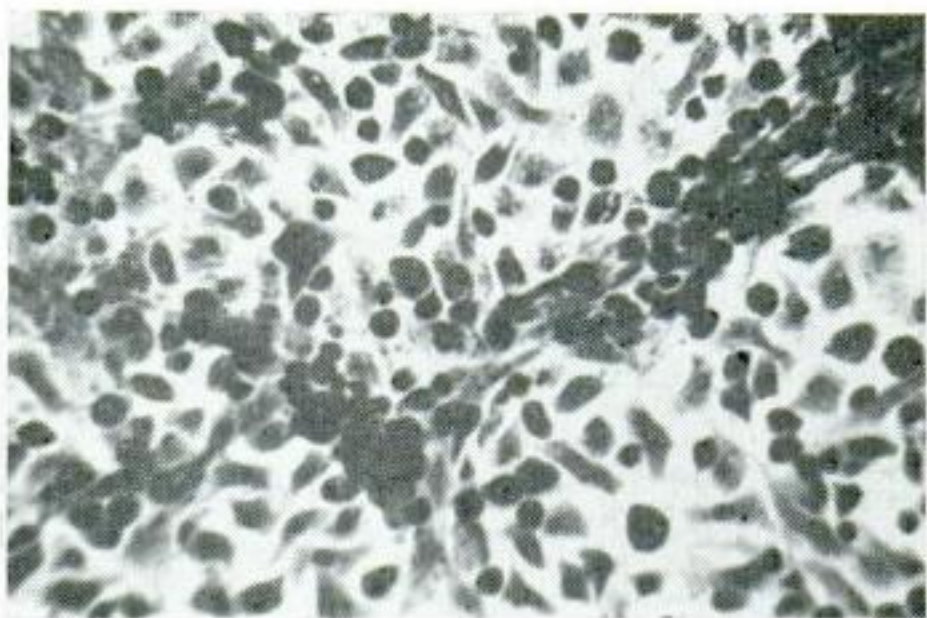
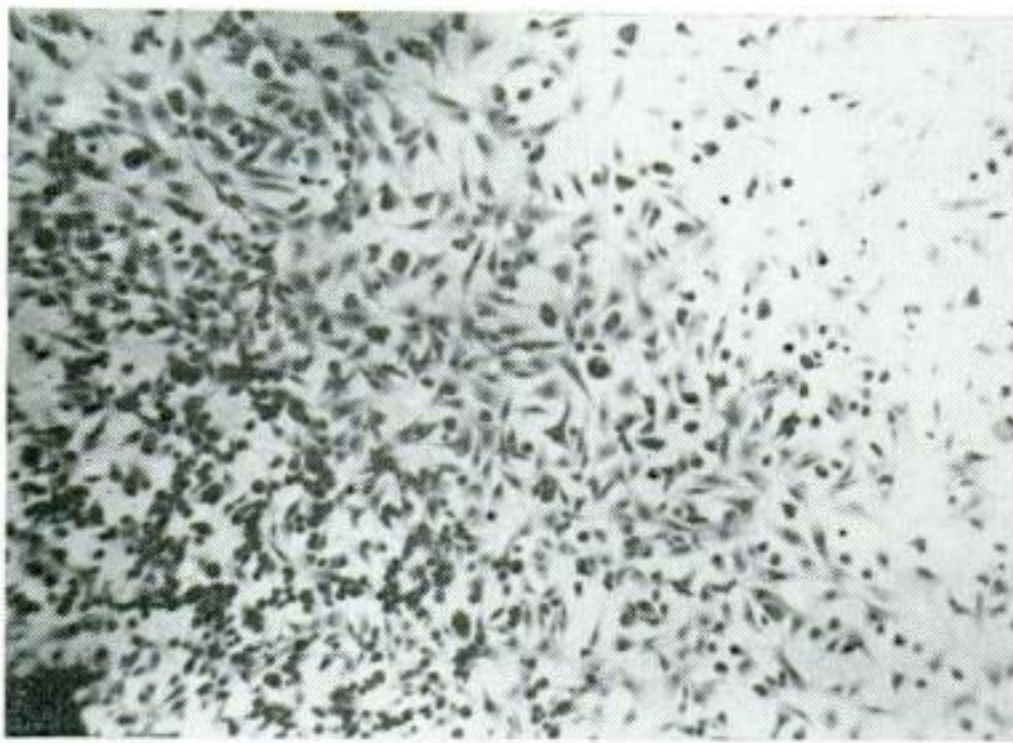


Рис. 5. Фрагмент зоны роста вокруг 10-дневного эксплантата печени крысы после затравки CCl_4 : а) общий вид, ув. 100; б) «структурирование» зоны роста. Гематоксилин, ув. 400.

даже к 14 сут зона роста была незначительна и представлена отдельными клеточными элементами различного генеза.

Иное состояние обнаруживала в условиях культуры ткань печени крыс, перенесших инъекции CCl_4 . Уже при

макроскопическом наблюдении отмечена тенденция эксплантата к быстрому округлению и образованию правильной сферы. Зона роста на 3—5 сут насчитывала 1—3 слоя клеток вблизи эксплантата и 1 — на периферии, причем уже в этот срок она достигала ширины, превышавшей диаметр эксплантата. Основа зоны роста — фибробласты, образующие на фильтре сеть, в ячейках которой прикреплялись и распластывались гепатоциты; в последних отмечены единичные митозы; тут же наблюдались лимфоциты (рис. 5). Периферия зоны роста представлена преимущественно фибробластами. С 7-х сут в зоне роста выявлялись делящиеся и двуядерные клеточные элементы, а также структуры, напоминающие гистологический срез печеночной дольки. На 10—14 сут ширина зоны роста превышала диаметр эксплантата в несколько раз.

Далее было установлено, что воздействия на пораженную CCl_4 печень отражаются на ее состоянии в культуре. Так, при резекции 10—12 % массы органа с наложением П-образных швов (1 серия) в культуре отмечено слабое округление эксплантата, по периметру кусочка наблюдалось незначительное



Рис. 6. Зона роста эксплантата печени после резекции 10 % ее массы с наложением П-образных швов на фоне цирротических изменений. Гематоксилин и эозин, ув. 100.

количество клеточных элементов и лишь к концу недели выявлялась зона роста смешанного типа с преобладанием гепатоцитов. Впрочем, эта зона роста несплошная и размеров, сравнимых с зоной роста патологически измененной в результате действия CCl_4 печени, не достигает даже к концу срока наблюдения (рис. 6).

Культивирование образцов печени крыс, подвергающихся локальной крио-

деструкции на фоне морфологически выявляемого фиброза этого органа, показало, что холодное воздействие влияет на состояние экспериментального материала в культуре. Эксплантат фиброзной печени, леченной холодом, теряет выраженную способность округляться и макроскопически выглядит распластанным на фильтре, лишь к 10—14 сут отмечается некоторое его округление.

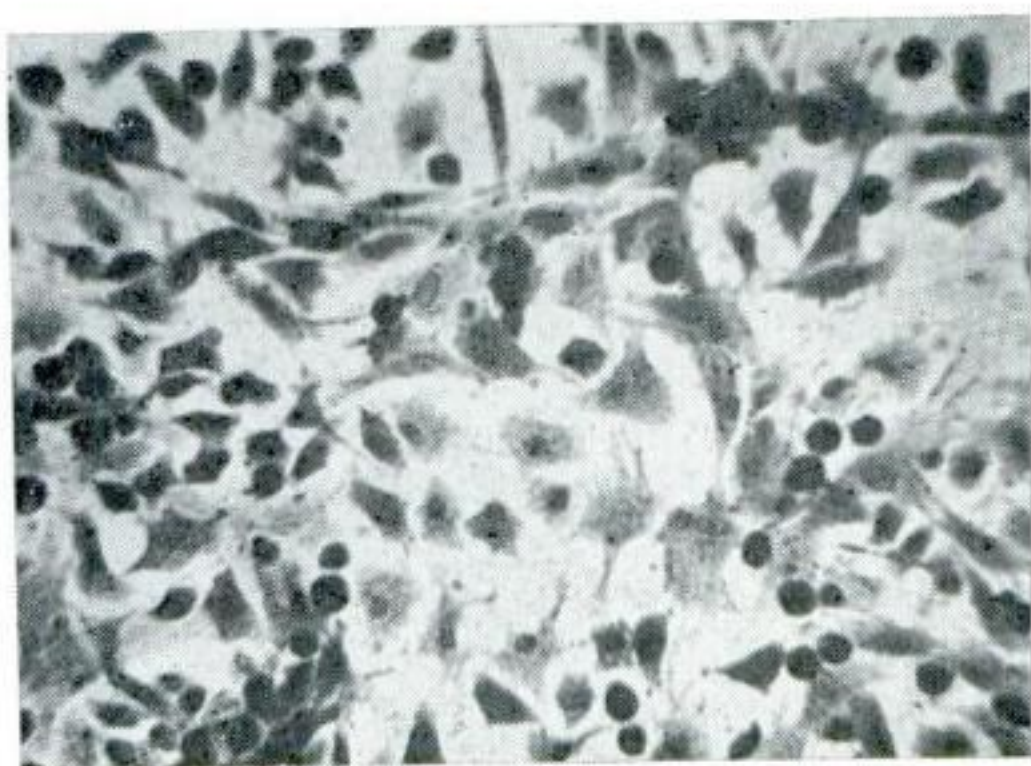
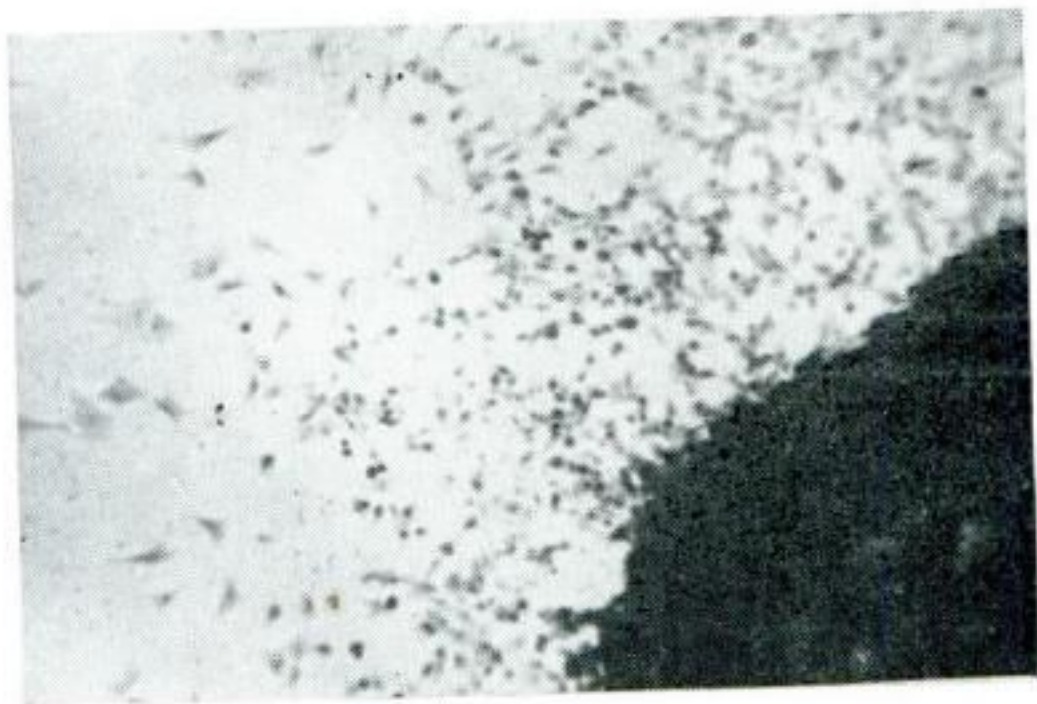


Рис. 7. Зона роста эксплантата печени, подвергшейся криодеструкции 10 % массы органа на фоне экспериментального цирроза:

а) общий вид, ув. 100; б) участок, прилежащий к эксплантату. Гематоксиллин и эозин, ув. 400.

Миграция клеточных элементов в зону роста из эксплантата отмечена буквально с первых сроков наблюдения, однако количественно она незначительна. Характер зоны роста смешанный, на фильтре располагается разреженная сеть фиброобластов, в ячейках которой имеются распластанные гепатоциты, а узлы окружены лимфоцитами и не прикрепившимися гепатоцитами (рис. 7). Встречаются митотически делящиеся клеточные элементы. Ширина такой несплошной зоны роста к концу срока наблюдения, 14 сут, может в отдельных случаях достигать величины диаметра эксплантата.

На гистологических срезах эксплантатов культивированной печени во всех сериях уже с 3 сут выявлен центральный некроз, захватывающий к 14 сут практически весь кусочек. Более устойчивы, по сравнению с паренхимой, элементы желчных ходов и соединительной ткани, дольше сохраняющие нормальные тинкториальные свойства и строение.

Как видно, нам не удалось выявить принципиальных различий в характере роста в культуре патологически измененной хроническим влиянием CCl_4 печени белых крыс без и после различных вариантов лечения (см. таблицу). Однако, проведенные эксперименты позволяют считать, что применявшиеся воздействия оказывают влияние на функциональное и структурное состояние этого органа, что проявляется в уменьшении репаративной регенераторной способности печени, пораженной CCl_4 , отражением чего явилось снижение активности клеточных элементов при помещении в условия органного культивирования.

Криотерапия пептических язв 12-перстной кишки

Материал и методы. В опытах на 105 белых беспородных крысах-самцах было проведено гистологическое, гистохимическое, радиоавтографическое и морфометрическое исследование стенки желуд-

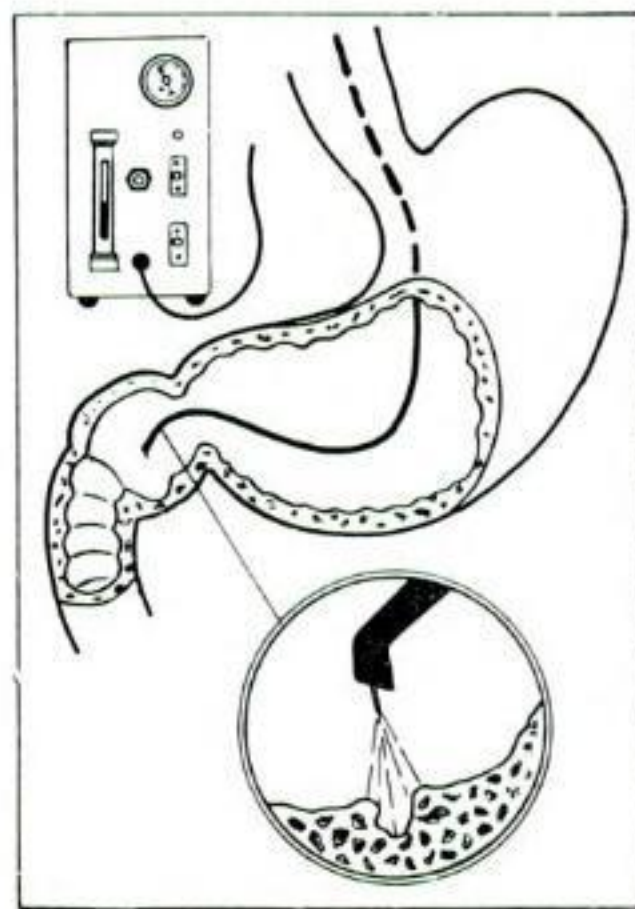


Рис. 8. Схема криовоздействия распылением хладагента на язву 12-перстной кишки. Криозонд введен в биопсийный канал гастроскопа.

ка и 12-перстной кишки после дозированного холодного воздействия азотом и хладоном-12. На основании полученных результатов 387 больным в возрасте от 20 до 60 лет, страдающим несложной язвенной болезнью 12-пер-

стной кишки, были проведены криовоздействия на язвенный дефект (диаметр до 12 мм) с помощью гастроинтестинального эндоскопа, в биопсийный канал которого вводили разработанный нами криозонд [11] (рис. 8). Изучение секреторной функции желудка при воздействии низких температур на патологический очаг выполнено методом пристеночной рН-метрии [6]; моторная функция желудка оценивалась путем электрогастрографии [13]. Кроме того, проводили термометрию различных точек тела и антрального отдела желудка и луковицы 12-перстной кишки до и непосредственно после криовоздействия, а также через 5 мин после него [1, 7] (рис. 9).

Результаты исследования и их обсуждение. При изучении экспериментального материала установлено, что низкие температуры в диапазоне $-7,7 \pm 2,3^\circ\text{C}$ вызывают обратимые изменения структур стенки желудка и стимулируют процессы регенерации, обеспечивающие восстановление тканей. Источником репаративной регенерации эпителиальной

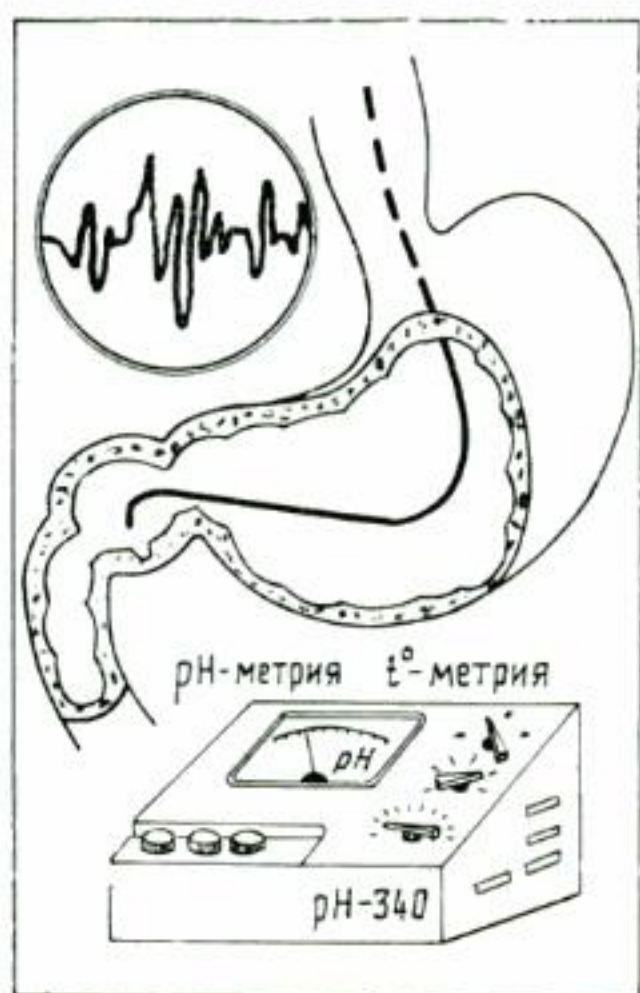


Рис. 9. Схема пристеночной рН-метрии и термометрии через эндоскоп.

ткани слизистой оболочки желудка в месте изъязвления являются клетки перешейка и шейки фундальных желез прилежащей зоны. Структуры этой зоны в течение месяца после криовоздействия характеризуются более интенсивными биосинтетическими и пролиферативными процессами, в том числе ДНК-синтезирующей способностью клеток и усиленной функцией железистой ткани.

Определено опосредованное стимулирующее влияние низких температур на

морфофункциональное состояние слизистой оболочки желудка и 12-перстной кишки, что явилось обоснованием для применения криотерапии пептических язв 12-перстной кишки человека в клинике.

Криовоздействие на язвенный дефект у больных вызывало усиление гиперемии вокруг язвы. Субъективно пациенты отмечали на 2—4 сут улучшение общего состояния, уменьшение болевого синдрома, нормализацию аппетита; эндоскопически в эти сроки наблюдались признаки усиления перифокального воспаления. На 6—10 сут определялось уплощение язвенного дна, выраженная краевая эпителизация, уменьшение размеров язв, очищение язвенного дна от некротических налетов и уменьшение его глубины.

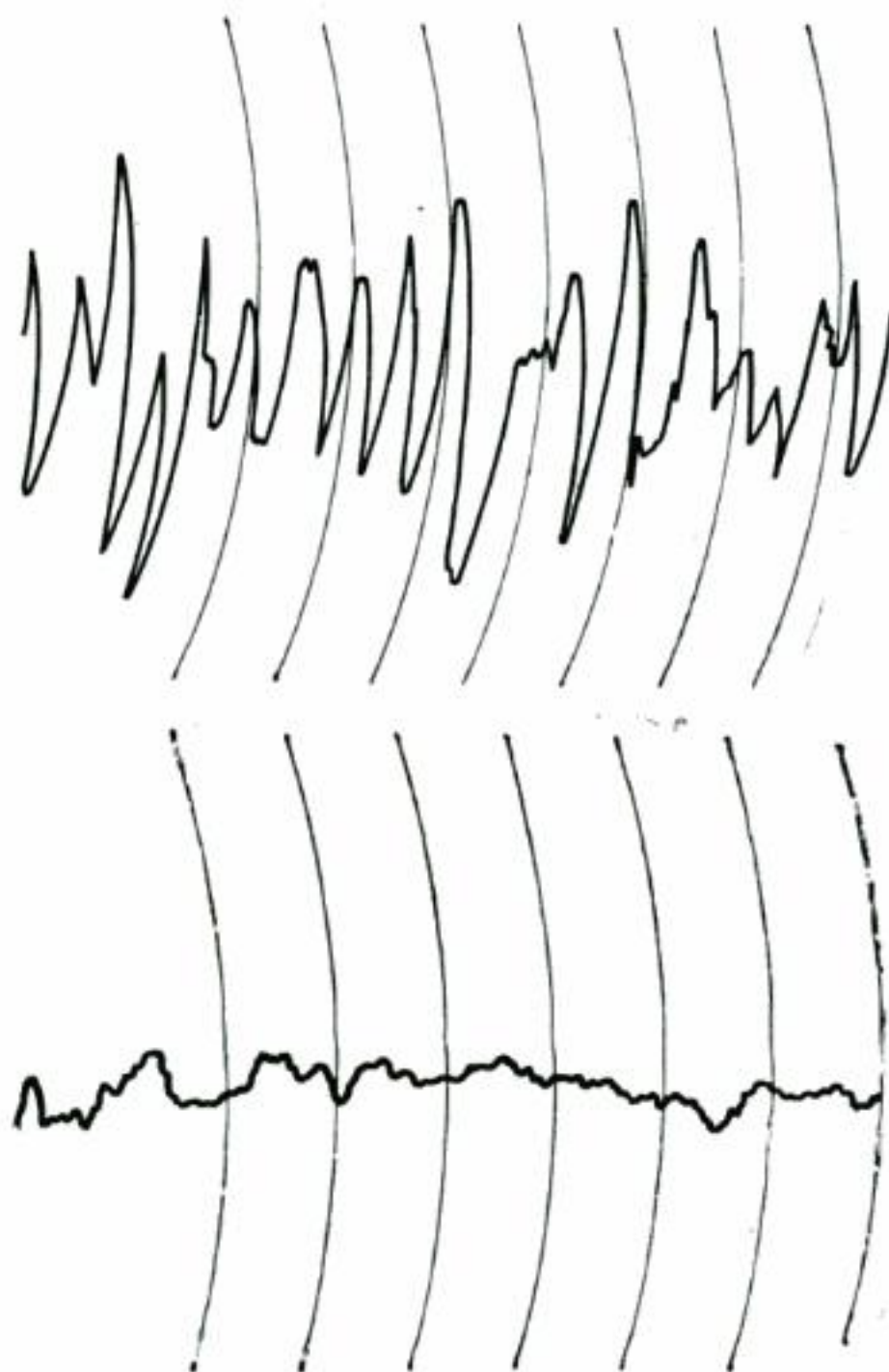


Рис. 10. Электрогастрограмма больного Н:

а) гиперкинетический тип моторики до криовоздействия, б) нормализация желудочных сокращений через 30 мин после криовоздействия на язву 12-перстной кишки.

Изучение показателей пристеночной базальной кислотности в ходе лечения выявило сдвиг показателей рН антрального отдела желудка в щелочную сторону. Точечная термометрия желудка и луковицы 12-перстной кишки обнаружила достоверное снижение температуры с $36,9 \pm 0,12^\circ\text{C}$ до $36,4 \pm 0,17^\circ\text{C}$ только в зоне криовоздействия сразу после его проведения, причем этот показатель уже через 5 мин возвращался к исходному уровню.

При изучении моторной функции желудка до и через 30 мин после криовоздействий установлено, что холодное лечение нормализует ее у больных и с гипо-, и с гиперкинетическим типом моторики (рис. 10).

Сравнение средних значений сроков эпителизации язвы у больных, леченных холодом в сочетании с амбулаторным или стационарным лечением, либо только холодом, не выявило зависимости сроков заживления от метода лечения при одинаковом числе криовоздействий. Видимо, криотерапия является ведущей составляющей комплексного лечения, влияющей на сроки заживления язвы. Чтобы определить интервал между двумя криовоздействиями, был выполнен

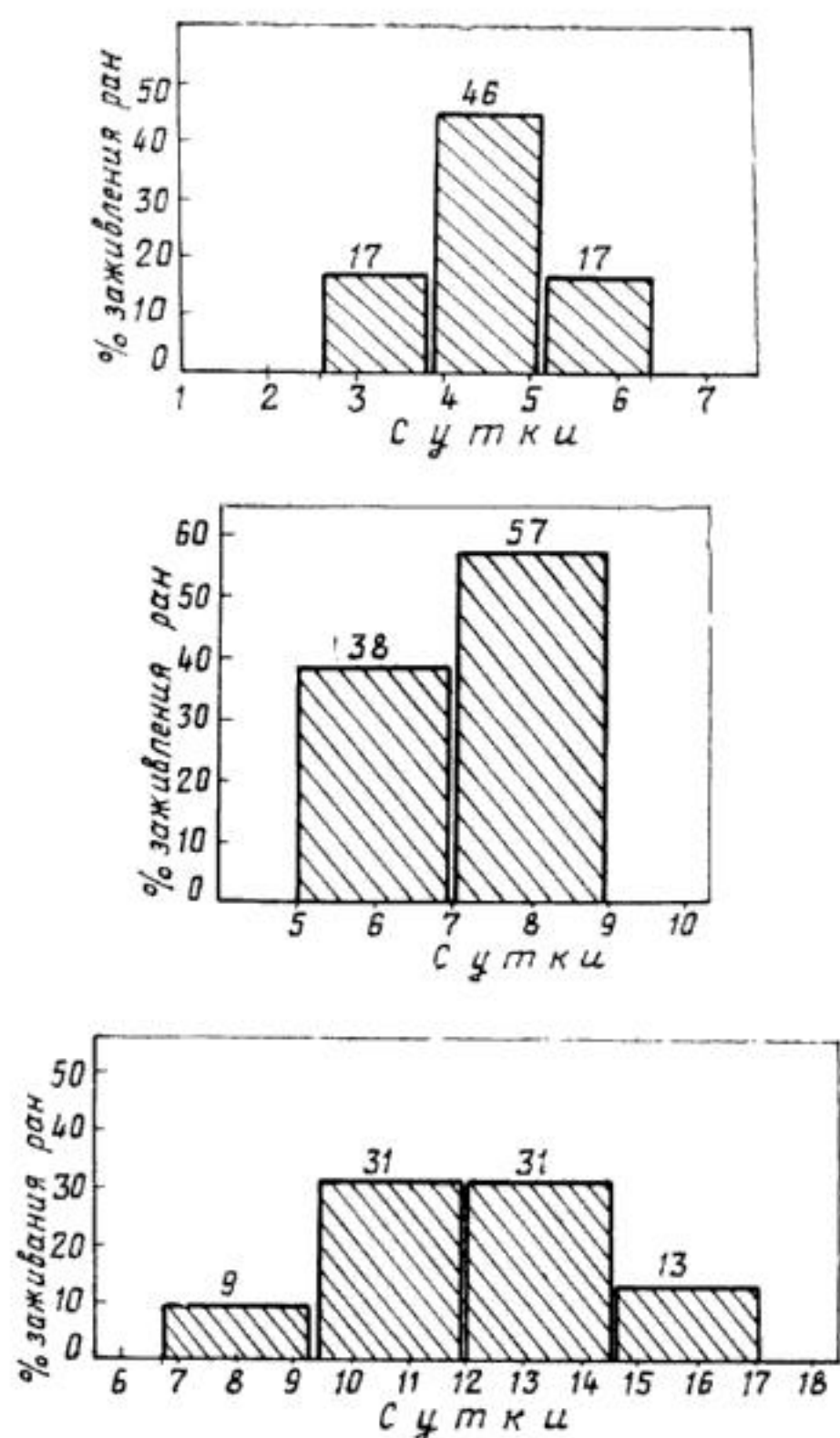


Рис. 11. Гистограммы распределения сроков заживления дуоденальных язв после одно-(а), дву-(б) и трехкратных (в) криовоздействий.

анализ гистограмм распределения сроков заживления язвенного дефекта [2], заключавшийся в определении отрезков времени, в пределах которых успех лечения наблюдался в 80 % случаев (рис. 11). Такой анализ позволил определить приемлемую и обоснованную периодичность контроля эффективности проводимого холодного лечения, а также сро-

ки повторения процедуры эндоскопического вмешательства.

Таким образом, анализ полученных данных показывает, что местные холодные воздействия на язвенный дефект 12-перстной кишки являются эффективным методом лечения, позволяющим значительно сократить сроки заживления язв. Терапевтическое влияние криовоздействий направлено на нейтрализующую функцию антрального отдела желудка и нормализацию моторики желудка.

Показатели гуморального иммунитета при криотерапии больных хроническим тонзиллитом

Материал и методы. Криодеструкция небных миндалин проведена 50 больным с хроническим тонзиллитом аппликатором КАО-02 [4]. Точечные криовоздействия с целью некротизации части небной миндалины выполняли криоинструментом КМ-22[8] с интервалом 1 сут общим числом до 5 за курс лечения.

Состояние гуморального иммунитета оценивали по реакции агглютинации аутоштаммов стафилококка с сывороткой крови и слюной пациентов [5, 9]. Полученные результаты сравнивали с показателями при традиционных методах лечения в виде тонзиллэктомий (45 человек) и консервативной терапии (39 человек).

Результаты исследования и их обсуждение. После проведения курса криовоздействий на небные миндалины у больных с хроническим декомпенсированным тонзиллитом в слюне происходит статистически значимое нарастание показателя титра антител во все сроки наблюдения до 6 мес. В крови больных этой клинической группы нарастание титров антител отмечено только через 1 мес после окончания лечения. У больных с хроническим компенсированным тонзиллитом также установлено нарастание средних значений титров антител в слюне во все сроки обследования после курса лечения, но в крови этих же пациентов значимое изменение их не выявлено.

Таким образом, при использовании точечных криовоздействий в качестве лечебного фактора у больных с хроническим тонзиллитом в большинстве наблюдений происходит стимуляция изучаемых показателей местного иммунитета. У больных с хроническим декомпенсированным тонзиллитом отмеченная стимуляция иммунных реакций происходит в более поздние сроки.

После проведения криодеструкции небных миндалин также отмечена стимуляция гуморального иммунитета, однако достоверное повышение средних величин титров антител в слюне и сыворотке крови установлено только у больных с хроническим декомпенсированным тонзиллитом.

Хирургическое удаление небных миндалин и консервативное лечение не сопровождаются значимым нарастанием средних величин титров антител как у больных с декомпенсированной, так и с компенсированной формами заболеваний.

Следовательно, холодовые методы лечения, используемые у больных с хроническим тонзиллитом, сопровождаются выраженной стимуляцией показателей

гуморального иммунитета, что является одним из факторов благотворного действия низких температур на ткани, вовлеченные в воспалительный процесс.

Заключение. Криовоздействие оказывает стимулирующее влияние на процессы восстановления тканей печени, слизистой 12-перстной кишки, небных миндалин, вовлеченных в воспалительно-дегенеративный процесс. Вид ткани и ее исходное состояние определяют методику и параметры охлаждения. Реализация лечебного действия обусловлена стимуляцией восстановительных процессов в клеточных элементах зоны патологического процесса и всего органа, а также влияниями на патогенетические звенья заболевания.

1. Васильев Ю. В. О прицельной термометрии слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки. — В кн.: Актуальные вопросы гастроэнтерологии. М., 1972, вып. 5, с. 74—77.
2. Закс Л. Статистическое оценивание: Пер. с немецкого. — М.: Статистика, 1976. — 598 с.
3. Исаев Ю. И. Дозированное местное охлаждение в лечении термических ожогов: Автореф. дис.... канд. мед. наук. — Харьков, 1980. — 25 с.
4. Криохирургическое лечение хронического тонзиллита: Метод. рекомендации (Сост. В. Д. Драгомирецкий, А. В. Кабанов, Н. Г. Мартынов и др.) МЗ УССР — Одесса, 1977. — 11 с.
5. Лебедев К. А., Турчанинова Г. Д., Кострова И. Н. Исследования антител стафилококка на основе реакций агглютинации с контролем специфичности на протейн А. — Лаб. дело, 1981, № 1, с. 103—106.
6. Меликова М. Ю., Кованова Л. А., Дорофеев В. К. О методике пристеночной рН-метрии с использованием эндоскопов. — В кн.: Актуальные вопросы гастроэнтерологии. М., 1972, вып. 5, с. 64—67.
7. Меликова М. Ю., Майоров В. М., Фрумкин В. Д. Прицельная контактная внутрижелудочная термометрия с использованием гастротомоскопа. — В кн.: Актуальные вопросы гастроэнтерологии. М., 1972, вып. 5, с. 70—74.
8. Московченко Н. А., Муринец-Маркевич Б. Н., Журавлев А. С. и др. Криогенный ЛОР-аппликатор. — Мед. техника, 1981, № 5, с. 58—59.
9. Понякина И. Д., Турчанинова Г. Д. Характеристика регрессионных взаимосвязей между иммунными реакциями к разным штаммам стафилококка при хронических воспалительных заболеваниях верхних дыхательных путей. — Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии, 1984, № 5, с. 92—95.
10. Рубецкой Л. С., Короткина Р. Н. Методика создания экспериментального цирроза печени у кроликов. — Бюлл. эксперим. биологии и медицины, 1960, № 7, с. 122—124.
11. Сандомирский Б. П., Мхитарьянц А. М., Писанный О. Е. Криоэлектрокоагулятор. А. с. № 825057 (СССР). — Оpubл. в Б.И., 1981, № 16, с. 27.
12. Сандомирский Б. П. Деструктивное и защитное действие низких температур на кожу: Автореф. дис.... докт. мед. наук. — Харьков, 1982. — 42 с.
13. Собакин М. А. Физические поля желудка. Новосибирск: Наука, 1978. — 112 с.
14. Чеканов В. П. Применение холода для лечения гнойных ран: Автореф. дис.... канд. мед. наук. — Харьков, 1984. — 15 с.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР, г. Харьков

Получено 02.10.84

УДК 57.043

**В. И. Кирпатовский, С. Д. Артамонов,
А. А. Лубяко, Н. А. Онищенко**

УМЕНЬШЕНИЕ СТЕПЕНИ ИШЕМИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ОРГАНОВ С ПОМОЩЬЮ ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДА

Недостаточная эффективность защиты от криоповреждения пока не позволяет гарантированно сохранить функцию органов после их низкотемпературной консервации. К развитию необратимого по-

вреждения приводит суммация неблагоприятных факторов, характерных для каждого этапа криоконсервации. Взятые по отдельности, эти факторы могут не играть решающей роли, но, действуя

последовательно, один за другим, являются основной причиной гибели органа.

Первым фактором, отрицательно влияющим на переносимость изолированным органом замораживания, является, на наш взгляд, его ишемическое повреждение в процессе подготовки к криоконсервации, которая, по данным [29], может продолжаться до 24 ч.

Наиболее эффективным методом предотвращения ишемических расстройств функции органа является предварительная фармакологическая подготовка. Известно много препаратов, обладающих противоишемическим действием. Однако применительно к криоконсервации органов более целесообразно использовать препарат, обладающий одновременно защитным действием и от ишемии, и от низкотемпературного повреждения. Таким препаратом может быть диметилсульфоксид (ДМСО), широко применяющийся в криобиологии [2, 9, 16, 17]. В то же время имеются данные [18], показывающие, что добавление ДМСО в раствор при гипоксической перфузии изолированного сердца уменьшает степень нарушения его сократимости при реоксигенации. В связи с этим целью данной работы явилось выявление противоишемических свойств ДМСО.

Материалы и методы исследования. Опыты были проведены на почках и сердце 96 белых беспородных крыс массой 200—250 г. На почках исследовали влияние предварительного введения ДМСО на устойчивость органа к тепловой ишемии, которую вызывали наложением турникета на почечную ножку сроком на 90 мин. После периода ишемии восстанавливали кровоток снятием турникета и удаляли контрлатеральную почку. Животных наблюдали в течение 7 дней, после чего выживших крыс забивали для определения кренинина плазмы и величины клубочковой фильтрации [13]. Для характеристики энергетических процессов в период ишемии исследовали содержание молочной кислоты в ткани почек через 40 и 90 мин тепловой ишемии по методу [7], динамику окислительно-восстановительного потенциала (ОВП) ткани почек по методу [10], и суммарное тепловыделение органа за период ишемии при помощи дифференциального микрокалориметра фирмы «Сетарам» (Франция) (эти опыты проводили на почках и сердце). Методика регистрации

изложена нами ранее [8]. Осмолярность плазмы и ткани почек измеряли с помощью осмометра «Эдванст инструментс инж.» (США). Из почки готовили гомогенат в дистиллированной воде в отношении 1:10, осмолярность которого и измеряли.

В исследованиях на сердцах крыс изучали влияние предварительного введения ДМСО на сохранность функциональной полноценности миокарда в условиях хранения изолированного сердца при 16—18 °С. После иссечения сердце помещали в камеру, заполненную физиологическим раствором при 16—18 °С. В части опытов его предварительно отмывали кардиopleгическим раствором следующего ионного состава: K^+ — 45 мМ, Na^+ — 10 мМ, Ca^{++} — 10^{-3} мМ, Mg^{++} — 10 мМ; анионы — аспарагинат, ацетат, фосфат, сукцинат, бикарбонат [6]. В качестве теста на сохранность функциональной полноценности сердечных клеток использовали их способность поддерживать внутриклеточную концентрацию Ca^{++} на минимальном уровне. Увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{++} вследствие структурных и метаболических нарушений, вызванных ишемией, приводило к немедленному повышению напряжения покоя, сохраняемого миокардом, которое мы регистрировали с помощью датчика давления фирмы «Элема—Шонандер» (Швеция). Резкое повышение напряжения покоя миокарда и его стабилизация на повышенных значениях рассматривались нами как свидетельство наступления необратимого ишемического повреждения.

Поскольку известно, что противоишемическое действие различных фармакологических препаратов наиболее эффективно в условиях предварительного их введения в организм животного [3, 19, 21, 22], введение ДМСО осуществляли заблаговременно (за 20 мин, 1 ч и 24 ч до опыта) в дозе 1 г/кг путем внутрибрюшной инъекции. Использовали ДМСО фирмы «Серва».

Полученный цифровой материал обрабатывали статистически по методу Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. Предварительное введение ДМСО животному существенно уменьшало степень ишемического повреждения органов. В контрольных опытах после 90 мин ишемии единственной почки выжило лишь 25 % оперированных крыс, в то время как

Таблица 1. Влияние предварительного введения ДМСО на функциональное состояние почек крыс, подвергнутых 90 мин. тепловой ишемии

Серия опытов	Количество животных	% выживших крыс	Креатинин плазмы (мкмоль/л)	Клубочковая фильтрация (мл/мин)	Суточная экскреция креатинина с мочой (мкмоль/24ч)
Без введения ДМСО (контроль)	12	25	$180,3 \pm 46,6$	$0,088 \pm 0,052$	$0,012 \pm 0,009$
Введение ДМСО за 20 мин . . .	5	60*	$100,7 \pm 12,9$	$0,282 \pm 0,066^*$	$0,036 \pm 0,003^*$
Введение ДМСО за 1 ч	12	83**	$91,9 \pm 6,2$	$0,355 \pm 0,041^{***}$	$0,041 \pm 0,003^{**}$
Введение ДМСО за 24 ч	8	88**	$197,1 \pm 30,9$	$0,263 \pm 0,019^{**}$	$0,067 \pm 0,009^{***}$
Интактные крысы	10	100***	$108,7 \pm 18,5$	$0,405 \pm 0,048^{***}$	$0,053 \pm 0,006^{**}$

Вероятность случайности различий с контролем: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$

среди животных, «защищенных» ДМСО, выживаемость составила 60—87,5 % ($p < 0,01$) в зависимости от срока введения препарата (табл. 1). Улучшалось и функциональное состояние почек выживших крыс. В контрольной серии экспериментов клубочковая фильтрация у этих животных составляла $0,088 \pm 0,052$ мл/мин, а в опытных группах она увеличивалась до $0,263 \pm 0,019$ — $0,355 \pm 0,041$ мл/мин ($p < 0,01$). Наибольшее защитное действие от повреждающего влияния тепловой ишемии выявлялось при введении препарата за 1 и 24 ч до начала эксперимента. Уменьшение этого срока до 20 мин, когда наблюдалось максимальное осмотическое действие введенного препарата (рис. 1) значительно снижало эффект от применения ДМСО по сравнению с более длительными сроками введения: снижалась выживаемость крыс после ишемии и функциональная полноценность ишемизированных почек выживших животных. При введении ДМСО за 24 ч, как и при его введении за 1 ч, отмечался максимальный процент выживания крыс. Однако величина клубочковой фильтрации у выживших крыс была несколько хуже, чем у крыс с введением препарата за 1 ч до ишемии.

Предварительная подготовка крыс ДМСО увеличивала также сроки допустимого сохранения изолированного сердца как в условиях кардиopleгии, так и без нее. При сохранении сердца в условиях «простой» гипотермии начальные изменения напряжения покоя миокарда начинали развиваться уже через 50 ± 2 мин, а максимальное увеличение и стабилизация этого показателя отмечались к 111 ± 5 мин. Предварительное введение крысам ДМСО за 24 ч до опыта отодвигало начало ишемического по-

вреждения до 64 ± 3 мин, а время максимального его развития — до 135 ± 4 мин ($p < 0,05$). При кардиopleгии и дальнейшем гипотермическом хранении сердца крыс, которым не вводили ДМСО, начало повышения напряжения покоя миокарда отмечали на 68 ± 2 мин, а максимальное его повышение и стабилизацию — на 119 ± 2 мин. В условиях предварительной подготовки крыс ДМСО, эти цифры возрастали до 81 ± 4 и 152 ± 5 мин соответственно

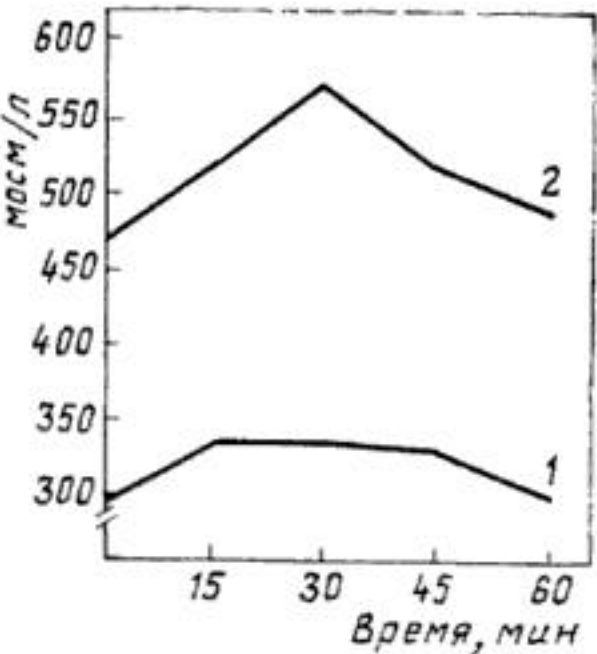


Рис. 1. Изменение осмолярности плазмы (1) и ткани почки (2) после внутрибрюшинного введения ДМСО крысе в дозе 1 г/кг.

($p < 0,05$). При других сроках введения ДМСО животным защитный эффект препарата уменьшался.

Для выявления путей реализации противоишемического действия предварительно введенного ДМСО исследовали активность гликолитических процессов в ишемизированных почках как показатель состояния системы энергоснабжения клеток. Было установлено, что активация гликолиза в ишемизированных почках крыс, «защищенных» предварительным введением ДМСО, проис-

ходит менее интенсивно, чем в контроле, о чем свидетельствовало меньшее накопление молочной кислоты в ткани почек через 40 и 90 мин тепловой ишемии (табл. 2). В то же время длительность снижения ОВП в ишемизированной почке достоверно увеличивалась.

Таблица 2. Влияние предварительного введения ДМСО на интенсивность гликолитических процессов в ткани ишемизированных почек крысы

Показатели	Без введения ДМСО (контроль) $n = 12$	С введением ДМСО $n = 8$
Концентрация молочной кислоты (мкмоль/г)		
до ишемии	$18,3 \pm 2,0$	$35,1 \pm 3,8^*$
через 40 мин ишемии	$45,1 \pm 1,9$	$47 \pm 2,6$
через 90 мин ишемии	$80,7 \pm 3,2$	$73,0 \pm 2,6$
Прирост молочной кислоты (мкмоль/г)		
за 40 мин ишемии	$26,8 \pm 2,0$	$12,3 \pm 3,2^*$
за 90 мин ишемии	$62,4 \pm 2,6$	$37,9 \pm 3,2^{**}$
Длительность снижения ОВП (мин)	136 ± 7	$175 \pm 12^*$

* Достоверно вероятность случайности различий по сравнению с контролем: как в таблице 1

Интенсивность тепловыделения ишемизированной почкой и сердцем также была замедлена по сравнению с контрольными опытами в первые 20 (для сердца) — 40 (для почки) мин, тогда как в дальнейшем выделение тепла органами крыс, предварительно подвергнутых действию ДМСО, было достоверно выше (рис. 2). Длительность тепловыделения также достоверно пролонгировалась (с 65 до 83 мин для сердца и с 140 до 165 мин для почки, защищенных предварительным введением ДМСО). Большее тепловыделение контрольных почек и сердец и более высокая скорость накопления лактата в почках в начальный период ишемии свидетельствуют о более интенсивном гликолизе, и в то же время меньшей эффективности использования АТФ, поскольку усиленные энерготраты в этот период ишемии не сопровождаются улучшением функционального состояния органов, а, наоборот, приводят к более быстрому прекращению энергообразования и полной потери функциональной полноценности.

Эти данные свидетельствуют, что увеличение устойчивости органов к ишемическому воздействию под влиянием введенного ДМСО происходит не за счет

улучшения энергоснабжения клеток, а, по-видимому, за счет повышения стабильности клеточных структур и уменьшения потребности клетки во вновь образованной энергии (перестройка клеточного метаболизма).

Ранее нами было показано, что наиболее эффективные противоишемические препараты обладают мембранотропным действием и оказывают свой защитный эффект как в результате прямой «стабилизации» клеточных мембран, так и за

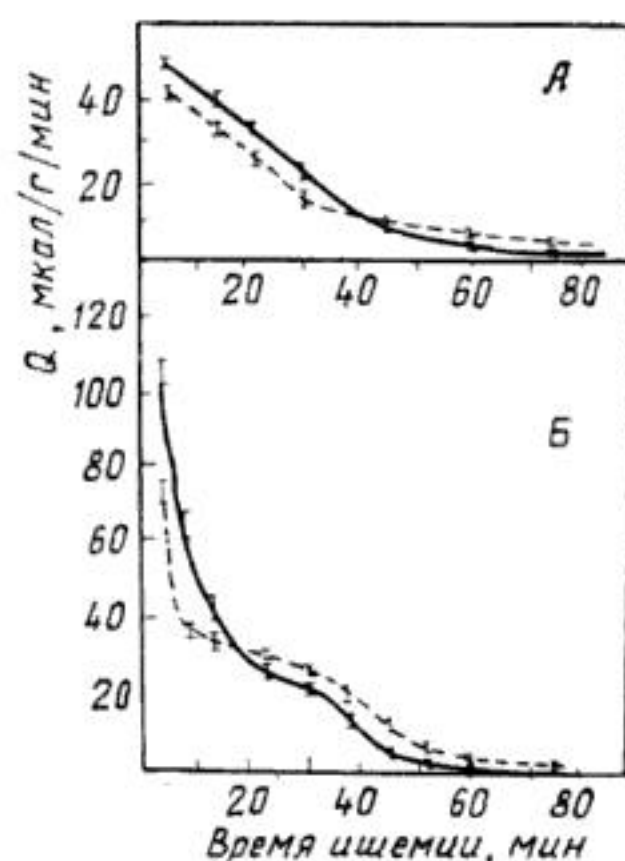


Рис. 2. Влияние предварительного введения ДМСО в дозе 1 кг/кг за 24 ч до эксперимента на динамику тепловыделения ишемизированной почки (А) и сердца (Б).

Условные обозначения:

1 — контроль, 2 — предварительное введение ДМСО.

счет неспецифической активации клеточных адаптационных реакций, заключающихся в активировании процессов синтеза белка и связанного с этим усиления гликолитической энергопродукции [4, 8, 11]. Эти процессы сопряжены с фосфорилированием белков клеточных мембран, субстратов, участвующих в синтезе белка и т. д. Это ведет, в свою очередь, к усилению белково-липидных взаимодействий в клеточной мембране, т. е. к ее дальнейшей «стабилизации», а также к накоплению фосфорилированных соединений, которые могут легко (с меньшими энергетическими затратами) утилизироваться в период ишемии. Повышение стабильности клеточных мембран замедляет развитие таких процессов, как перекисное окисление мембранных фосфолипидов, и активация мембранных фосфолипаз, которые, как известно, являются основными факторами развития необратимости ишемического повреждения [1, 12].

Подтверждением того, что ДМСО действует именно через модификацию кле-

точных мембран, служат данные о свойстве препарата стабилизировать жидкокристаллическую структуру липидного слоя [5], которое достигается за счет взаимодействия метильных группировок молекулы ДМСО с углеводородными цепочками фосфолипидов. За счет этого меняются свойства мембранных липидов, в частности, повышается их текучесть и снижается температура фазового перехода. Эти изменения влекут за собой сдвиги в белково-липидных взаимодействиях, меняя, в частности, активность мембранно-связанных ферментов. Так, показано уменьшение активности К- Na- и Са-АТФаз после введения ДМСО [14, 20].

Имеющиеся литературные данные и полученные нами результаты позволяют обоснованно предполагать общность пути реализации защитного действия ДМСО и других мембранотропных противоишемических средств.

Выводы. 1. Предварительное введение ДМСО крысам в дозе 1 г/кг за 1—24 ч до опыта существенно увеличивает резистентность органов (почки, сердце) к действию тепловой ишемии. 2. В реализации противоишемического действия ДМСО важную роль играет снижение интенсивности клеточных энергозатрат в период тепловой ишемии, что связано, по-видимому, с модификацией структуры клеточных мембран.

1. Биленко М.В. Роль перекисного окисления липидов клеточных и субклеточных мембран в патогенезе ишемических и постишемических расстройств в органах и перспективы применения антиоксидантной терапии.—В кн.: Острая ишемия органов и ранние постишемические расстройства: Тез. докл. II Всесоюз. симпозиум. М., 1978. — 51 с.
2. Даниленко М. В., Туркевич И. М. Клиническое применение димексиды. — Киев: Здоровье, 1976. — 88 с.
3. Кирпатовский В. И. Противоишемическая защита донорских почек: Автореф. дисс... канд. мед. наук.— М., 1979. — 26 с.
4. Кирпатовский В. И., Онищенко Н.А., Петросова В. Н., Козырева Т. А. Фармакологическая защита почек от ишемического повреждения. О механизме реализации противоишемической защиты донорских почек препаратами различных фармакологических групп.— Вестник АМН СССР, 1982, № 1, с. 73—78.
5. Кононенко Е. В., Варшавская О. А. Дефектные структуры липотропных фаз фосфолипидов.— Биофизика, 1982, 27, вып. 3, с. 399—403.
6. Лубяко А. А., Бодров С. С. Оптимизация ионных концентраций изотонических кардиоплегических растворов на плоские миокарды.—В кн.: Актуальные проблемы трансплантологии и искусственных органов. М., 1980, с. 107—110.
7. Мешков Н.П., Северин С.Е. Практикум по биохимии животных.— М., 1950. — 290 с.
8. Онищенко Н. А., Кирпатовский В. И., Артамонов С. Д. и др. О механизме противоишемической защиты почек препаратами различных фармакологических групп.— Пат. физиол., 1980, № 6, с. 43—47.
9. Пушкарь Н. С., Белоус А. М. Введение в криобиологию.— Киев: Наук. думка, 1975, — 342 с.
10. Райскина М. Е., Шаргородский Б. М., Онищенко Н. А. и др. Методы прижизненного исследования метаболизма сердца. — М.: Медицина, 1970, с. 9—65.
11. Сейфулла Р. Д., Онищенко Н. А., Хлоповская Е. И. Некоторые молекулярные ме-

ханизмы противоишемического действия— токоферола, селенита и трентала на миокард.— Фармакол. и токсикол., 1980, № 4, с. 3—10.

12. Сороковой В. И., Владимиров Ю. А. Повреждение митохондрий при аноксии.— В кн.: Биофизика. Итоги науки и техники. М., ВИНТИ, 1975, вып. 5, с. 11—55.
13. Шюк О. Функциональное исследование почек.— Прага, 1975. — 344 с.
14. Barnett R.E. The effects of dimethylsulfoxide and glycerol on $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ and membrane structure.— Cryobiology, 1978, 15, p. 227—229.
15. Dietsman R. H., Rebelo E. A., Graham E. F. et al. Long-term functional success following freezing of canine kidney.— Surgery 1973, 74, N 2, p. 181—189.
16. Mazur P., Raiotte R. V. Permeability of 17-days fetal rat pancreas to glycerol and dimethylsulfoxide.— Cryobiology, 1981, 18, p. 1—16.
17. Matheny J. L., Northup C. M., Karow A. M. Myocardial function during hypoxia: effects of dimethylsulfoxide (DMSO) and different buffers.— Cryobiology, 1976, 13, p. 616—624.
18. Miller H. C., Alexander J. W., Smith E. J.; Fidler J. P. Salutory effect of phentolamin (Regitine) on renal vasoconstriction in donor kidneys.— Transplantation, 1974, 17, N 2, p. 201—219.
19. Shigekawa M., Akowitz A. A., Katz A. M. Stimulatory and inhibitory effects of dimethylsulfoxide, propranolol and chlorpromazine on the partial reactions of ATP-ase of sarcoplasmic reticulum. — Biochim. biophys. Acta, 1979, 548, p. 433—447.
20. Smith G. W., Lomet E. J., Rogers J. Protection of the transplantable kidney by alpha-adrenergic blockade.— Ann. Surg. 1971, 73, p. 225—229.
21. Toledo—Pereyra L. H., Moberg A. W., Najarian J. S. Optimal management of warm ischemic kidneys prior to hypothermic-preservation.— Transplant. proc., 1974, 6, N 3, p. 279—282.
22. Toledo—Pereyra L. H. Organ cryopreservation. Current research review.— J. Surg. Res., 1982, 32, p. 75—84.

Научно-исследовательский институт трансплантологии и искусственных органов МЗ СССР, г. Москва

Получено 19.09.83

О КРИОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ

В структуре технологий криобиологическая, как и холодильная технология, должна занимать одно из ведущих мест. Она производит своеобразные биологические продукты потребления, которые в своей конечной цели удовлетворяют чисто физиологические потребности человека. При управляемом развитии технологий как холодильная, так и криобиологическая имеют вполне четкие и ясные перспективы [2].

Рассмотрим состояние некоторых научных проблем, стоящих перед холодильной и криобиологической технологиями.

Проблема количественной оценки степени обратимости восстановленного объекта

Затронутый вопрос имеет исключительно важное значение не только для принятия оптимальных решений, но и для исследовательских целей. В настоящее время некоторое развитие при количественной оценке обратимости получил метод квалиметрии [1]. Квалиметрия — относительно новое направление, изучающее основные принципы численной оценки качеств при функции отдельных свойств. Процедура численной оценки обратимости методами квалиметрии включает в себя следующие операции: во-первых, выделение конкретных свойств биообъектов, изменение которых в процессе консервирования оказывается существенным; во-вторых, классификацию выделенных свойств в соответствии с весомостью каждого, которая может влиять на комплексную оценку качества объекта и является главным признаком в классификации свойств. Свойства биообъектов определяются методами экспертных оценок; в-третьих, приведение отдельных свойств к безразмерному виду, которое осуществляется соотношением свойств объекта после восстановления с соответствующими свойствами до консервирования; в-четвертых, составление безразмерного выражения для определения численной характеристики обратимости. Как правило, зависимость комплексного показателя обратимости

от безразмерных свойств может быть выражена аддитивной функцией, то есть:

R = \sum_{i=1}^n m_i P_i \tag{1}

где: R — комплексный показатель обратимости

m_i — коэффициент весомости i-того

свойства \sum_{i=1}^n m_i = 1

n — количество свойств

P_i — безразмерное значение i-того свойства

P_i = f \left(\frac{\Pi_i^b}{\Pi_i^n} \right) \tag{2}

где \Pi_i^b \Pi_i^n — численная характеристика i-того свойства, в восстановленном и нативном состояниях.

Показатель обратимости R, вычисленный по выражению (1), может меняться от 0 до 1.

Изложенная процедура применялась при разработке режимов низкотемпературного консервирования спленоцитов, тимоцитов и лимфоцитов. Величина критерия R составила для спленоцитов 0,688, для лимфоцитов 0,982 и для тимоцитов 0,8225 [3]. В таблице приведены результаты исследований по определению показателя обратимости в зависимости от скорости замораживания.

Т а б л и ц а. Показатели обратимости (R) в зависимости от скорости замораживания биопродуктов до температуры -22 °С

Скорость замораживания м/с	$1,4 \cdot 10^{-6}$	$7,8 \cdot 10^{-6}$	$9,8 \cdot 10^{-6}$	$12,0 \cdot 10^{-6}$	$14,4 \cdot 10^{-6}$	$18,5 \cdot 10^{-6}$
R	0,89	а) мяса 0,96 0,95		0,93	0,92	0,90
		б) других продуктов				
R	огурцы 0,105	картофель 0,071	яблоки 0,114	грибы 0,808	мясо 0,866	

Примечание: под скоростью замораживания понимается скорость движения фронта кристаллизации

Приведенные примеры демонстрируют как сильные, так и слабые стороны

метода квалиметрии. Достоинством метода является возможность интегральной оценки способа консервирования. К числу недостатков могут быть отнесены следующие: во-первых, не ясен принцип выделения существенных свойств и не исследован вопрос о степени возможной корреляции отдельных свойств друг с другом; во-вторых, величина R не имеет ясного физико-химического смысла.

Этих недостатков в известной мере лишены методы, основанные на рассмотрении отдельных сторон физической природы явлений в процессе консервирования. Один из таких методов [3] базируется на допущениях того, что изменение свойств биообъекта при замораживании проходит, главным образом, в период между началом кристаллизации на поверхности и достижением «фронтом кристаллизации» термического центра объекта и влагосодержание является основной характеристикой, определяющей особенности реакции объекта на процесс кристаллообразования. Тогда количественный показатель степени обратимости (2) можно представить в виде:

$$r = \frac{\omega}{F_0} \quad (3)$$

где: ω — относительное количество вымороженной влаги

F_0 — критерий Фурье, характеризующий безразмерное время кристаллизации.

Критерий F_0 можно представить в виде:

$$F_0 = \frac{\lambda \cdot \tau}{C \gamma L^2}$$

где: λ — коэффициент температуропроводности Вт/м · К

τ — время кристаллизации С

c — удельная теплоемкость Дж/кг · К

γ — плотность объекта кг/м³

L — характерный размер м

Выражая удельную теплоемкость C как отношение теплоты, отводимой от единицы массы биообъекта, к изменению его температуры от криоскопической ($t_{кр}$) до температуры, которую принимает поверхность продукта к моменту достижения в центре объекта криоскопической температуры (t_n) и определив количество отводимой теплоты с помощью известных формул теплопередачи, получим F_0 в виде:

$$F_0 = \frac{1}{B_i} \cdot \frac{t_{кр} - t_n}{t_n - t_{ср}} \quad (4)$$

где B_i — критерий Био

$$B_i = \frac{\alpha}{\lambda} L$$

α — коэффициент теплоотдачи Вт/м² · К
 $t_{ср}$ — температура среды °К

Предоставим количество вымороженной влаги, как отношение массы льда в объекте ($m_{л}$) к массе влаги ($m_{в}$), то есть

$$\omega = \frac{m_{л}}{m_{в}}$$

Если m — масса объекта, то, обозначив количество влаги в объекте через ω как долю его массы $\omega = \frac{m_{в}}{m}$, можем записать:

$$m_{в} = \omega \cdot m = \omega \cdot \gamma \cdot V$$

где: V — объем объекта м³

$$\text{Тогда: } \omega = \frac{m_{л}}{V \cdot \gamma \cdot m}$$

Пусть $\frac{m_{л}}{V} = g_{л}$ — масса льда в единице объема кг.льда/м³

Тогда выражение (3), определяющее обратимость, примет вид:

$$r = g_{л} \cdot \frac{B_i}{m \gamma} \cdot \frac{t_n - t_{ср}}{t_{кр} - t_{ср}} \quad (5)$$

Последняя запись позволяет дать физическое толкование реакции влагосодержащих биологических материалов на холодильное воздействие и термодинамическую обстановку, в которой это воздействие осуществляется.

$g_{л}$ — определяется активностью воды
 $\frac{B_i}{\omega \cdot \gamma}$ — комплекс, характеризующий теплофизические свойства объекта и условия внешнего теплообмена

$\frac{t_n - t_{ср}}{t_{кр} - t_n}$ — отношение температурных напоров в пограничном и замороженном слоях.

Выражение (5) было использовано при расчете номограмм, позволяющих определить относительную обратимость замораживания в зависимости от режима и характерного размера объекта [5].

Определенным недостатком численной оценки обратимости по выражению (5) следует считать то обстоятельство, что шкала оценок является не абсолютной, а относительной.

Интересен подход к численной оценке обратимости, основанный на фиксировании способности объекта проводить теплоту в нативном и восстановленном состояниях [6].

В целом проблема численной оценки обратимости, оценки качества консервирования биологических объектов находится на начальном этапе разработки. В технологических дисциплинах существует система объективных критериев, определяющих качество изделия, разработки других параметров.

Криобиологическая технология занимает в этом смысле промежуточное положение; критерии оценки качества консервирования биообъектов содержат как объективные, так и субъективные элементы. Неполнота критериев оценки обратимости затрудняет формулирование методологии технологического поиска.

Специальные методы описания процессов распространения теплоты в биообъектах

В классическом уравнении теплопроводности скорость распространения теплоты предполагается бесконечно большой. Для реальных тел величина, имеющая размерность скорости и трактуемая как скорость распространения тепловой субстанции, всегда конечна. Описание перераспределения температуры в объекте с «малым» значением скорости тепловой субстанции можно осуществить на основании решения следующего уравнения (одномерный случай)

$$\frac{1}{V^2} \cdot \frac{\partial^2 t}{\partial \tau^2} + \frac{1}{a} \cdot \frac{\partial t}{\partial \tau} = \frac{\partial^2 t}{\partial x^2} \quad (6)$$

где: v — скорость распространения тепловой субстанции м/с

a — коэффициент температуропроводности м²/с

x — координата м

В предельных случаях: при $v \rightarrow \infty$ уравнение (6) переходит в классическое уравнение Фурье, на основании которого и осуществляется аналитическое описание перераспределения температуры при отводе теплоты от биообъектов.

Как известно [7], скорость теплоты определяется выражением:

$$v = \sqrt{\frac{\lambda}{c \cdot \gamma \cdot \tau^2}} \quad (7)$$

где: τ_2 — период релаксации (с)

Период релаксации характеризует скорость перехода системы из неравновесного термодинамического состояния, вызванного внешними воздействиями, в равновесное. Полученные в последнее время экспериментальные данные по реологическим характеристикам мышечной ткани [8] дают возможность оценить значение скорости распространения тепловой субстанции в биообъектах, которая имеет порядок 10^{-4} м/с (для металлов скорость распространения тепловой субстанции имеет порядок 10^3 м/с).

Отмеченные обстоятельства позволяют ставить вопрос о возможности описания перераспределения температуры в биообъектах с помощью специальных примеров, учитывающих малое значение величины V [10, 8].

Один из возможных вариантов приближенного описания характера перераспределения температуры, основанный на гипотезе о наличии «температурного фронта», распространяющегося с конечной скоростью, был предложен нами [4], однако возможности создания специального аналитического аппарата этим не исчерпываются.

Продолжает оставаться трудной задача нахождения предпочтительных режимов отвода теплоты при консервировании биологических объектов.

Практически найденные программы консервирования получены, в основном, методом «проб и ошибок» с привлечением аппарата планирования эксперимента [7].

Фактически не исследована реодинамика перемещения клеточных суспензий при заполнении и опорожнении контейнеров, перемещении суспензий в технологических трубопроводах и другие процессы.

Следует полагать, что исследования в области криобиологической технологии являются существенным толчком к внедрению достижений криобиологии в различные сферы народного хозяйства и созданию криогенной техники.

1. Бражников А. М. Формализация понятия качества в мясной технологии. — Мясная индустрия СССР, 1983, № 2, с. 31—34.
2. Бражников А. М., Иткин Ю. А. Научные основы технологии криоконсервирования клеточных суспензий. — Криобиология и криомедицина, 1982, вып. 11, с. 17—24.
3. Бражников А. М., Камовников Б. П., Каухчешвили Н. Э. Количественная оценка

качества процесса замораживания. — Холодильная техника, 1984, № 6, с. 29—51.

4. Бражников А. М., Карпычев В. А., Лыков А. В. Об одном инженерном методе расчета процессов теплопроводности. — Инженерно-физический журн., 1975, № 4, с. 677—680.

5. Горбатов А. В. Реология мясных и молочных продуктов.— М.: Пищевая промышленность, 1979.— 384 с.
6. Дворников Б. П. Исследование сортов по комплексному показателю качества с целью оптимизации технологического процесса замораживания томатов: Автореф. дис.... канд. техн. наук, Л., 1983.— 21 с.
7. Иткин Ю. А. Теоретическое обоснование и разработка основных этапов процесса криоконсервирования клеточных суспензий:—Автореф. дисс.... д-ра биол. наук.— Харьков, 1985.— 48 с.
8. Лыков А. В. Теория теплопроводности.— М.: Высшая школа., 1967, — 499 с.
9. Попов Н. Н., Бражников А. М., Цуцаева А. А., Юрченко Г. Г. К оценке величины восстановления клеток лимфатических узлов, спленоцитов, тимоцитов после низкотемпературного консервирования.— В кн.: Криоконсервирование иммунокомпетентной ткани. Киев: Наук. думка, 1979, с. 161—165.
10. Чижов Г. Б. Теплофизические процессы в холодильной технологии пищевых продуктов.— М.: Пищевая промышленность, 1979.— 342 с.

Московский ордена Трудового Красного Знамени Технологический институт мясной и молочной промышленности МВССО СССР

Получено 29.10.84

УДК 57.043

Э. З. Эмирбеков, С. П. Львова

ИЗУЧЕНИЕ БИОХИМИИ МОЗГА ПРИ ГИПОТЕРМИИ

Проникновение человека в глубокие воды и полярные районы, освоение природных ресурсов Сибири и Дальнего Востока, прилегающих районов БАМ сделали необходимым решение ряда медико-биологических проблем по изучению влияния низкой температуры на организм. Усиленный интерес к изучению гипотермии объясняется и возросшими темпами практического использования метода общего охлаждения организма как в медицине [7], так и в экспериментальной биологии [20, 25, 35].

Низкая температура влияет на все биологические функции. Поэтому реакция организма на гипотермию и приспособление к ней носят многосторонний характер. У теплокровных животных в определенном диапазоне температур сохраняется координация функций различных систем организма. У животных, не впадающих в зимнюю спячку, при температуре тела ниже 25 °С жизнь оказывается в опасности вследствие нарушения функций ЦНС. Специалисты признают, что успех клинического применения гипотермии во многом зависит от разработки приемов борьбы с нарушениями деятельности ЦНС, которые имеют и постгипотермические последствия. Охлаждение организма приводит к снижению скорости обменных процессов и минимализации функций. Это лежит в основе защитного эффекта гипотермии. Однако при этом не происходит адекватного замедления всех биохимических реакций, следствием чего является дискоординация метаболизма, приводящая к гипотермической патологии. Все физиологические и биохимические изменения в органах и тканях организма теснейшим образом связаны с функциональными и метаболическими сдвигами в ЦНС.

Следовательно, в актуальной проблеме биологии и медицины — влиянии гипотермии на организм человека и животных — одним из главных направлений является изучение биохимических изменений в мозгу.

Учитывая специфику структуры, химического состава и метаболизма тканей мозга, очень важным фактором для изучения влияния гипотермии является объект исследования — вид животного.

Академик Е.М. Крепс [14] пишет: «Исследование млекопитающих животных, впадающих в состояние холодовой спячки (гибернации) — клад для биохимиков, ... изучающих неблагоприятное влияние низких температур». Регулирующая деятельность ЦНС у зимоспящих млекопитающих при искусственной гипотермии сохраняется при более низких температурах, чем у незимоспящих животных, обеспечивая планомерную перестройку обменных процессов.

Следовательно, изучение метаболизма мозга при искусственном охлаждении незимоспящих и зимоспящих животных в сравнительном аспекте может приблизить нас к пониманию общих закономерностей механизмов резистентности гомойотермных животных к низкой температуре тела.

В связи с вышесказанным, мы изучили и проанализировали некоторые стороны метаболизма мозга незимоспящих (крысы) и зимоспящих (суслики) животных в динамике гипотермии и попытались выдвинуть несколько проблем, которые могли бы послужить основой для планомерного исследования мозга в условиях гипотермии.

Начальной реакцией ненаркотизированного теплокровного организма на снижение температуры тела до 30—27 °С является возбуждение ЦНС, активизация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, следствием чего является усиленная мобилизация депонированных липидов и гликогена [26]. При этом в крови заметно увеличивается концентрация глюкозы и жирных кислот [8, 19, 29]. Так, в наших экспериментах было показано, что при охлаждении крыс и сусликов до 30—28 °С концентрация глюкозы в крови повышается соответственно на 53 и 23 %, а жирных кислот — в 2,1 и 4,2 раза [19]. В результате рефлекторного включения механизмов терморегуляции на начальных этапах охлаждения резко усиливается термогенез, складывающийся из энергии окислительных процессов и энергии макроэргических связей. Одновременно ограничивается теплоотдача. Усиление окислительных процессов при умеренной гипотермии наблюдается прежде всего в скелетных мышцах (особенно в мыш-

цах головы и шеи), в меньшей мере — в печени, а у адаптированных к холоду и гибернирующих животных — также и в буром жире [26]. В отличие от мышц и печени, в мозгу уже при умеренной гипотермии происходит заметное (в 1,6—2,3 раза) понижение потребления кислорода [2, 4]. Одновременно снижается мозговой кровоток [11]. По-видимому, снижение потребления кислорода мозгом уже на начальных этапах гипотермии носит приспособительный характер, так как снижает возможность возникновения выраженного кислородного дефицита в тканях мозга. Вопрос о наличии или отсутствии при умеренной гипотермии адекватности между доставкой кислорода в мозг и его утилизацией остается не совсем ясным. В нашей лаборатории найдено, что в мозгу охлажденных до температуры тела 30—28 °С ненаркотизированных крыс достоверно понижается содержание АТФ, креатинфосфата, глюкозы, пирувата, увеличивается содержание неорганического фосфора, лактата, активность лактатдегидрогеназы, общей фосфоорилазы и ее А формы, растет отношение лактат/пируват [16—18, 33]. Это позволяет сделать заключение об усилении анаэробных процессов в мозгу крыс на начальных этапах охлаждения. У сусликов при умеренной гипотермии (30—28 °С), в отличие от крыс, отсутствует снижение уровня макроэргических фосфатов. Потребление кислорода мозгом сусликов в этих условиях понижается на 41,7 %, концентрация лактата, интенсивность анаэробного и аэробного гликолиза существенно не изменяется, количество глюкозы увеличивается на 23,5 % [33].

Полученные результаты позволяют предположить, что на этапе умеренной гипотермии в мозгу крыс, но не сусликов, наступает несоответствие между поступлением кислорода в мозг и потребностями в нем, что ведет к интенсификации анаэробных процессов.

Глубокая гипотермия (20—19 °С), характеризующаяся как состояние «холодового наркоза», сопровождается резким снижением обменных процессов. Потребности тканей, в том числе нервной, в энергии существенно понижаются. Это позволяет значительно продлить время реанимации и имеет огромное практическое значение.

Дыхание в головном мозгу, особенно в коре больших полушарий, при глубокой гипотермии понижается до 1/2—1/5 от уровня интактных животных [2, 16]. Существенно снижается при этом активность ферментов цикла Кребса и электроннотранспортной цепи [6, 10, 27]. Причем, активность цитохромоксидазы в разных регионах мозга снижается в большей мере (на 40—53 %), чем сукцинатдегидрогеназы (на 14—17 %). Таким образом, при глубокой гипотермии сильнее повреждаются филогенетически молодые участки электроннотранспортной цепи.

Глубокая гипотермия ведет к увеличению концентрации макроэргических фосфатов, глюкозы и ослаблению интенсивности дыхания, анаэробного и аэробного гликолиза в мозгу как крыс, так и сусликов [15—18, 33]. Однако, если потребление кислорода срезами коры больших полушарий мозга у крыс понижалось на 84 %, то у сусликов — только на 50 %. Кроме того, снижение дыхания мозга сусликов, в отличие от крыс, легко обратимо. Высокая концентрация макроэргических фосфатов в мозгу при глубокой гипо-

термии является следствием значительного снижения их распада, при сохранении или усилении синтеза. Так, коэффициент R/O при охлаждении ненаркотизированных крыс до 20—18 °С увеличивается в опытах на срезах мозга в 3,5—4 раза, а на митохондриях — в 1,35 раза [2].

Приведенные данные позволяют заключить, что при глубокой гипотермии головной мозг животных не испытывает недостатка в энергии. К.П. Иванов [11], анализируя литературные материалы и на основании собственных данных, приходит к выводу о том, что при глубокой гипотермии в мозгу кислород находится в избытке и резкое уменьшение его потребления связано не с уменьшением доставки, а с понижением потребности мозга в энергии.

При понижении температуры тела, в соответствии с правилом Вант-Гоффа и уравнением Аррениуса, биохимические реакции замедляются в зависимости от глубины гипотермии. Повреждения на молекулярном уровне, характерные для критической низкой температуры, как правило, приводили бы (и приводят) к гибели животного, если бы не функционировали компенсаторные молекулярные механизмы, использующие адаптационную функцию белков, липидов, их комплексов, других макромолекул.

В компенсации температурно-зависимых сдвигов на первое место выступает изменение каталитической активности ферментов. В клетках теплокровных животных существуют эволюционно выработанные механизмы температурной компенсации активности ферментов. У строгих гомойотермов температура тела постоянно удерживается на определенном уровне. При этом физико-химические свойства ферментов соответствуют этому температурному уровню (38 ± 4 °С). Существенным признаком адаптивности изменений активности является такое изменение, которое способствует поддержанию функциональной активности данной метаболической реакции при более низких температурах. В связи с этим при определении ферментативной активности, помимо общей для всех животных температуры инкубирования 37 °С, мы сочли необходимым исследовать ферментативную активность при температурах инкубации, соответствующих температуре тела гипотермических животных (30, 25, 20, 10 °С). Эти условия дают представление об истинной динамике процесса в тканях охлажденного животного, тогда как определение при оптимальной температуре позволяет судить о потенциальной активности, о глубине и стойкости наблюдаемых изменений.

Нами обнаружено, что охлаждение крыс (до 30 и 20 °С) приводит к появлению отрицательной температурной активности глутаминазы мозга в том диапазоне температур, в котором и осуществляется гипотермия [12]. У гипотермических сусликов участок с отрицательной температурной зависимостью активности глутаминазы мозга лежит на 10 °С ниже, чем у крыс. Чтобы понять природу наблюдаемых явлений, мы исследовали частично очищенные фракции глутаминазы [38]. При очистке удаляется значительная часть липидов. Можно предположить, что обработка ацетоном должна «стирать» изменения на мембранном уровне. Кроме того, очистка фермента удаляет низкомолекуляр-

ные соединения, которые могли бы повлиять на активность глутаминазы. Реакции, катализируемые очищенной в 5 и 60 раз глутаминазой фракцией из мозга гипотермических крыс (20 °C) проявляли более высокую активность при температурах инкубации 20 и 10°, чем при 30 °C. На очищенной глутаминазе мозга интактных крыс отрицательной температурной зависимости не наблюдалось. Следует отметить, что в целом вся температурная кривая для высокоочищенной (в 60 раз) фракции фермента при гипотермии лежит выше, чем в норме. Таким образом, можно предположить, что изменения в температурной зависимости глутаминазы мозга при гипотермии вызваны изменениями физико-химических свойств самой молекулы фермента.

Отрицательная температурная зависимость для АТФ-азы, сукцинатдегидрогеназы в мозгу у гипотермических крыс и сусликов при низких температурах инкубации получена Л. Стеварт и сотрудниками [41], для аспартат- и аланинаминотрансфераз — в нашей лаборатории [9]. Таким образом, нами впервые обнаружено индуцированное снижением температуры тела включение температурной компенсации на уровне ферментных молекул.

Уменьшение скорости ферментативных реакций низкой температурой может компенсироваться проявлением «холодовых» изоферментов. В нашей лаборатории обнаружено, что в активности изоформ глутаминазы (активируемой и неактивируемой фосфатом) из мозга охлажденных крыс и сусликов отрицательная температурная зависимость не наблюдается [12]. Глубокая гипотермия (20 °C) оказывает влияние на электрофоретическую подвижность изоформ аспаратаминотрансферазы мозга крыс: в гомогенате и цитоплазматической фракциях электрофоретическая подвижность фермента увеличивается, а в митохондриальной не изменяется [9]. К сожалению, изоферментный спектр мозга при гипотермии исследуется неактивно.

Одним из ключевых компонентов в действии гипотермии на организм является изменение мембранных липидов [3, 14, 28], что существенно сказывается на активности мембранных ферментов, проницаемости мембран, взаимодействии рецепторных белков мембраны с гормонами. У неадаптированных к холоду млекопитающих активность большинства ферментов начинает резко уменьшаться после снижения температуры ниже 23 °C, что хорошо видно на кривых Аррениуса. Это связано с фазовым переходом липидов мембран, ослаблением гидрофобных взаимодействий в мембране, переходом иммобилизованных вокруг фермента липидов в гель-фазу. В фосфолипидах головного мозга крыс, подвергнутых однократному глубокому охлаждению, выявляется некоторая тенденция к увеличению количества ненасыщенных жирных кислот [23, 29]. Вероятно, это может служить одной из причин их довольно высокой резистентности к действию низких температур, поскольку снижает температуру фазового перехода липидов. Высокая степень ненасыщенности мембранных липидов характерна для адаптированных к холоду животных, гибернаторов и эктотермных, благодаря чему клеточные мембраны этих животных сохраняют жидко-жесткое состояние при низких (+5—0 °C)

температурах тела [3, 14, 28]. Повышение ненасыщенности жирных кислот создает более благоприятные условия для перекисного окисления липидов (ПОЛ), так как свободно-радикальному окислению подвергаются в основном ненасыщенные жирные кислоты, входящие в структуру фосфолипидов. Структуры мозга обладают выраженной способностью к ПОЛ [3]. Накопление полярных продуктов ПОЛ способствует разрыхлению липидного микроокружения мембранных белков-ферментов, оказывая существенное влияние на их активность. Начальные этапы усиления ПОЛ в мозгу ведут к активации ряда мембранных ферментов, в частности, Na-K-АТФ-азы [22], в то время как углубление процесса ПОЛ в мембране может сопровождаться ингибированием мембраносвязанных ферментных комплексов, что, вероятно, связано с появлением межмолекулярных сшивок между продуктами окисления липидов и мембранами [3].

Проведенное в нашей лаборатории определение активности Na-K-АТФ-азы в отделах мозга крыс показало, что при охлаждении животных до 20—19 °C активность фермента, замеренная при температуре инкубации 37 °C, увеличивается в больших полушариях и среднем + промежуточном мозгу соответственно на 21 и 10 % [13]. В случае замеров активности при 20 °C Na—K—АТФ-азная активность мозга не претерпевала существенных изменений. Сохранение высокой активности Na—K—АТФ-азы в мозгу при глубокой гипотермии (20 °C) связано с изменениями мембран нервных клеток крыс, в частности, с отмеченным выше [23, 29] некоторым повышением содержания ненасыщенных жирных кислот, что способствует сохранению жидкокристаллической структуры мембран при данной температуре. Еще лучше функционирует Na—K—АТФ-аза в мозгу зимоспящих животных как при искусственной гипотермии, так, особенно, при зимней спячке [39, 40]. Поддержание высокой Na—K—АТФ-азной активности является важным показателем холодовой адаптации ткани [3].

Сохранение высокой активности при низких температурах тела характерно и для другого мембранного фермента — сукцинатдегидрогеназы мозга. Так, результаты исследования сукцинатдегидрогеназной активности митохондрий мозга нормотермических и охлажденных до 15 и 3 °C сусликов показывают, что у охлажденных до 3 °C зверьков активность фермента выше при всех температурах инкубации (38, 15, 3 °C), чем у других групп [41]. Самая же высокая активность наблюдалась в случае инкубации при 3 °C. Таким образом, и здесь выявлена отрицательная температурная зависимость. Авторы полагают, что такая высокая активность сукцинатдегидрогеназы может свести к минимуму гипоксию.

Сохранение жидкокристаллического состояния мембран является одним из механизмов адаптации организмов к низким температурам тела. Возможно, что состав мембранных липидов опосредованно через мембранные ферменты (например, аденилатциклазу) может оказывать влияние и на активность цитоплазматических ферментов. Сохранение жидкокристаллического состояния мембраны играет также важную роль в поддержании рецепции гормонов и, следовательно, в гормональной регуляции обменных процессов в тканях при низких температурах тела.

Значительная активация ПОЛ при действии холода на клетки ведет к повышению проницаемости мембран лизосом и выходу в цитоплазму лизосомальных гидролаз [3]. В экспериментах, проведенных в нашей лаборатории [34], было показано, что гипотермия 20 °С приводит к увеличению (в 1,5 раза) удельной активности кислой пептидгидролазы в мозгу крыс. При дальнейшем пролонгировании гипотермии значительных изменений не наблюдалось. Повышение активности протеолитических ферментов хотя и отражает состояние гипотермической патологии, видимо, имеет в какой-то степени компенсаторный характер, поскольку устраняет появляющиеся в условиях глубокой гипотермии «дефектные» молекулы белков. Значительно изменяется при глубокой гипотермии изоферментный спектр кислой пептидгидролазы мозга [21]. Гель-хроматографическим способом было обнаружено две молекулярные формы катепсина Д (кислой пептидгидролазы): высокомолекулярная и низкомолекулярная. Оказалось, что в цитозольной фракции ткани мозга охлажденных крыс (20 °С) появляется минорный пик катепсина Д с молекулярной массой около 110 000, который отсутствовал у контрольных животных. Этот факт, видимо, свидетельствует о солиubilизации катепсина Д в условиях низкой температуры, вследствие нарушения целостности лизосомальных мембран. Влияние гипотермии на активность кислой пептид-гидролазы осуществляется, таким образом, как путем изменения мембранной проницаемости лизосом, так и активацией изоферментной системы.

Определенное значение в интенсификации протеолиза в мозгу при гипотермии имеют конформационные изменения белковой молекулы, связанные с изменением реактивности ряда функциональных групп, особое место среди которых занимают сульфгидрильные группы, обладающие высокой реакционной способностью, а также амидные группы. Изменение содержания сульфгидрильных, лабильных и прочносвязанных амидных групп и их соотношения наступает в мозгу уже на начальных этапах гипотермии [35, 37]. Наблюдаемые при глубокой гипотермии изменения функциональных групп белков, видимо, связаны с денатурационными изменениями, что увеличивает атакуемость белков протеолитическими ферментами.

Анализ результатов по определению количества и аминокислотного состава белков различных фракций мозга свидетельствует о том, что при гипотермии, по-видимому, происходит переход белков из одной фракции в другую вследствие изменения их физико-химических свойств и проницаемости клеточных мембран [37]. Об изменении физико-химических свойств белков мозга при гипотермии свидетельствует также определение их электрофоретической подвижности [32]. Глубина и продолжительность гипотермии влияют на соотношение количества белка с разной электрофоретической подвижностью, причем, наибольшие колебания в белковых фракциях характерны для крайних позиций электрофо-реграммы.

Следствием глубоких изменений свойств белков-ферментов в условиях гипотермии является изменение концентрации ряда низкомолекулярных азотистых метаболитов и аминокислот, что вторично сказывается на функ-

ционировании белков и регуляции метаболизма в целом. Такие компоненты мозга, как аммиак, дикарбоновые аминокислоты, гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) метаболически тесно связаны между собой и играют важную роль в обменных процессах и функции мозга. При охлаждении крыс до 20—19 °С содержание аммиака в мозгу увеличивается в 5 раз по сравнению с контрольными животными [31, 35]. Концентрация глутамина, ГАМК, аспарагиновой кислоты при этом снижается на 23—52 %, а количество глутаминовой кислоты несколько повышается. Глубокая (20—19 °С) гипотермия крыс, адаптированных к пониженным температурам тела (12—13-кратно), а также к внешнему холоду (3-кратно с содержанием в холодильной камере), вызывая дальнейшее накопление аммиака в мозгу, вместе с тем не снижает вместимость глутамин и не изменяет концентрацию глутаминовой, гамма-аминомасляной и аспарагиновой кислот [31]. Полученные результаты позволяют предположить, что повышение содержания аммиака в мозгу является благоприятным фактором, способствующим приспособлению теплокровного организма к перенесению им низкой температуры тела. Видимо, накопившийся в мозгу при гипотермии аммиак играет роль положительного или отрицательного модулятора ферментов. Нашими работами [31, 35] установлено, что система освобождения и связывания аммиака в мозгу у зимоспящих животных более лабильна и очевидно причастна к эволюционно сложившейся биохимической адаптации к низким температурам тела. Лабильность процессов освобождения и связывания аммиака — один из механизмов, обеспечивающих пластичность мозга при экстремальных состояниях, вызванных охлаждением организма. Экспериментальные данные о нарушении азотистого обмена мозга при гипотермии со значительным накоплением аммиака послужили основанием для испытания в качестве защитных средств при гипотермической патологии глутаминовой кислоты, аргинина, мочевины и ГАМК. Результаты показывают, что все эти соединения обладают протекторными свойствами при гипотермии [5, 30] и нормализуют азотистый метаболизм мозга [24].

Значительным изменениям при гипотермии подвергаются биогенные амины, которые, кроме нейромедиаторной роли, участвуют в сохранении температурного гомеостаза. Обнаружено, что при гипотермии 20° С у крыс содержание дофамина, адреналина, норадреналина и серотонина в таламусе и гипоталамусе увеличивается, соотношение катехоламинов и серотонина остается без изменений [36]. При пролонгировании гипотермии в течение 1 и 2 часов в отделах мозга продолжает увеличиваться только содержание серотонина, в таламусе — адреналина.

Анализ данных по динамике содержания нейромедиаторных аминокислот, биоаминов, а также активности ферментов, участвующих в их метаболизме, при различных гипотермических состояниях позволяет заключить, что механизм молекулярных процессов направлен для обеспечения тканей охлажденного мозга необходимой концентрацией нейромедиаторов в соответствии с их индивидуальными функциями. Положение о том, что как компоненты азотистого обмена мозга, так и нейромедиаторы, играют важнейшую роль в нервной

клетке в процессе адаптации к пониженной температуре тела подтверждается данными по изучению гипобиоза у крыс при температуре тела 20—18 °C [15].

Таким образом, имеющиеся в настоящее время фактические материалы по нейрохимическим изменениям, вызванным гипотермией, не позволяют сформулировать строгую теорию влияния охлаждения на метаболизм мозга. Особенно много пробелов в области изучения нейроспецифических компонентов и их роли, таких как циклические нуклеотиды, специфические белки и пептиды, пептиды сна и памяти и других полифункциональных соединений. Вместе с тем сегодняшний этап исследования биохимии мозга позволяет выдвинуть вполне определенную концепцию влияния охлаждения на молекулярные процессы в мозгу: нарушение микроциркуляции, снижение использования высокоэнергетических веществ, необходимых для поддержания ион-

ной, транспортной и биосинтетической интеграции, блокирование низкой температурой полисинаптических нейрональных путей, расстройство мембранно-синаптической трансмиссии, модификация и нарушение мембран перекисным окислением липидов и взаимоотношения липопротеиновых комплексов, дискоординация активности ферментов, неравномерное затухание скорости отдельных реакций, изменение концентрации низкомолекулярных соединений — модуляторов ферментов, изменение соотношения углеводно-фосфорного и азотистого метаболизма.

Приведенный материал по биохимии мозга при гипотермии отражает резервные возможности регуляторных процессов в ЦНС и открывает перспективы расширения устойчивости теплокровного организма к гипотермии путем использования адаптивных функций при низких температурах тела, а также введением проекторных веществ.

1. Алюхин Ю. С., Калинина М. К. Тканевое дыхание мозга при гипотермии. — Физиол. журн. СССР, 1970, 56, № 1, с. 19—25.
2. Атабегова Н. Г. Энергетический обмен мозга при переохлаждении и согревании: Автореф. ... канд. биол. наук. — Ростов н/Д., 1966. — 22 с.
3. Белоус А. М., Бондаренко В. А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. — Киев: Наук. думка, 1982. — 255 с.
4. Бернштейн В. А. Гипотермия и мозг. — Успехи физиол. наук, 1971, 2, № 2, с. 49—67.
5. Векслер Я. И., Тананакина Г. П. Различные режимы адаптации к холодовому стрессу, возможности оценки и прогнозирования их эффективности и повышения стрессоустойчивости. — В кн.: Стресс, адаптация и функциональные нарушения (Кишинев, 13—14 июня, 1984 г.): Тез. докл. Кишинев: Штиинца, 1984, с. 300.
6. Волжина Н. Г. Активность окислительных ферментов цикла Кребса в головном мозге адаптированных к переохлаждению животных. — Укр. биохим. журн., 1982, 54, № 3, с. 270—273.
7. Волколаков Я. В., Лацис А. Т. Глубокая гипотермия в кардиохирургии детского возраста. — Л.: Медицина, 1977. — 152 с.
8. Данилова Л. Я. Роль надпочечников в регуляции углеводного обмена при снижении температуры тела у животных с различным уровнем развития терморегуляции: Автореф. ... д-ра мед. наук. — Киев, 1967. — 27 с.
9. Даудова Т. Н. Исследование активности ключевых ферментов азотистого обмена мозга при гипотермии: Автореф. ... канд. биол. наук. — М., 1981. — 29 с.
10. Елисеев В. А. Активность сукцинатдегидрогеназы мозга и печени крыс при гипотермии. — Бюл. экспер. биол. и мед., 1969, № 10, с. 43—44.
11. Иванов К. П. Биоэнергетика и температурный гомеостаз. — Л.: Наука, 1972. — 172 с.
12. Исмаилов И. А., Эмирбеков Э. З. Глутаминовая и глутаматдекарбоксилазная активность ткани мозга при гипотермии и зимней спячке. — Укр. биохим. журн., 1980, 52, с. 683—688.
13. Кличханов Н. К. Адаптивная роль АТФ-азной и ацетилхолинэстеразной активности в мозге и при гипотермии. — В кн.: Стресс, адаптация и функциональные нарушения (Кишинев, 13—14 июня 1984 г.): Тез. докл. Кишинев: Штиинца, 1984, с. 99—100.
14. Крепс Е. М. Липиды клеточных мембран. — Л.: Наука, 1981. — 339 с.
15. Львова С. П. Сравнительное исследование углеводно-фосфорного обмена в мозге сусликов и крыс в норме и при глубокой гипотермии. — Укр. биохим. журн., 1971, 43, № 2, с. 198—201.
16. Львова С. П. Влияние гипотермии на дыхание мозга сусликов и крыс различных возрастов. — Укр. биохим. журн., 1972, 44, № 2, с. 169—172.
17. Львова С. П. Анаэробный и аэробный гликолиз в ткани мозга сусликов и крыс различного возраста при гипотермии. — Укр. биохим. журн., 1972, 44, № 5, с. 619—623.
18. Львова С. П. Энергетический обмен тканей при гипотермической патологии в онто- и филогенезе. — В кн.: Актуальные вопросы патологии. Баку, 1982, с. 251—253.
19. Львова С. П., Чубуркова С. С. Содержание гликогена и фосфоорилазная активность в различных мышцах крыс и сусликов при гипотермии, самосогревании и зимней спячке. — Укр. биохим. журн., 1983, 55, № 1, с. 39—44.
20. Майстрах Е. В. Патологическая физиология охлаждения человека. — М.—Л.: Медицина, 1975. — 214 с.
21. Нурмагомедова П. М., Березин В. А., Эмирбеков Э. З., Рева А. Д. Субклеточное распределение и некоторые физико-химические свойства катепсина Д. — Укр. биохим. журн., 1983, 55, № 2, с. 175—178.
22. Сазонова Т. Г., Архипенко Ю. В., Меерсон В. З. Увеличение активности Na, K — АТФ-азы мозга крыс при стрессе. — Бюл. экспер. биол. и мед., 1984, № 5, с. 556—558.
23. Серебренникова Э. Г., Векслер Я. И., Гусейнов И. Г. Изменение жирнокислотного состава фосфолипидов головного и спинного мозга крыс при однократном охлаждении и адаптации к нему. — Вопр. мед. химии, 1981, вып. 5, с. 640—643.
24. Тананакина Г. П. Азотистый обмен мозга при различных режимах адаптации теплокровного организма к холоду: Автореф.

- дис. ... канд. биол. наук.— Челябинск, 1983.—23 с.
25. Тимофеев Н. Н. Искусственный гипобиоз.— М.: Медицина, 1983.— 192 с.
 26. Хаскин В. В. Энергетика теплообразования и адаптации к холоду.— Новосибирск: Наука, 1975.—119 с.
 27. Хлебутина Т. А. О функциональном состоянии надпочечников и активности дыхательных ферментов в головном мозге животных, адаптированных к холоду, в условиях экспериментальной гипотермии.— В кн.: Биохимия и патология обмена веществ. Алма-Ата: Наука, 1975, с. 199—202.
 28. Хочачка П., Сомеро Д. Стратегия биохимической адаптации.— М.: Мир, 1977.— 398 с.
 29. Шепелев А. П. Роль липидов в патологии общих термических травм: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук.— Ростов-на-Дону.— 1979.— 35 с.
 30. Шугалей В. С., Лукши А. И., Кричевская А. А. Универсальная роль кислорода в развитии пусковых неспецифических реакций организма на экстремальные воздействия.— В кн.: Цитохимические и биохимические исследования в эксперименте и клинике. Нальчик, 1979, с. 84—95.
 31. Эмирбеков Э. З. Азотистый метаболизм мозга при гипотермии и зимней спячке.— Махачкала: Дагучпедгиз, 1969.— 136 с.
 32. Эмирбеков Э. З., Грачева Л. И. Электрофоретическая подвижность белков мозга при гипотермическом стрессе.— В кн.: Стресс и адаптация: Тез. докл. Кишинев: Штиинца, 1978, с. 403.
 33. Эмирбеков Э. З., Львова С. П. Транспорт и утилизация кислорода в мозгу при гипотермических состояниях.— В кн.: Клиническая физиология гипоксических состояний.— Киев: Наук. думка, 1979, т.1 с. 178—182.
 34. Эмирбеков Э. З., Нурмагомедова П. М. Пептидгидролазная активность тканей мозга при гипотермии.— Укр. биохим. журн., 1979, 51, № 6, с. 644—646.
 35. Эмирбеков Э. З. Функциональная нейрохимия.— Махачкала: ДГУ, 1980.— 126 с.
 36. Эмирбеков Э. З., Абдуллаев Р. А., Ибрагимов И. И. Содержание биогенных аминов в головном мозге при искусственном и естественном охлаждении животных.— Укр. биохим. журн., 1980, 52, № 4, с. 418—422.
 37. Эмирбеков Э. З., Абдуллаев Р. А., Исмаилов И. А. Белки мозга теплокровного организма при пониженных температурах тела.— В кн.: Биохимия животных и человека. Киев: Наук. думка, вып. 3, с. 84—90.
 38. Эмирбеков Э. З., Мейланов И. С. Температурная зависимость активности глутаминазы из мозга крысы при гипотермии.— Биохимия, 1982, 47, вып. 9, с. 1466—1469.
 39. Bowler K., Duncan C. J. The temperature characteristics of brain microsomal ATPases of the hedgehog changes associated with hibernation.— *Physiol. Zool.*, 1969, 42, N 2, p. 211—219.
 40. Charnock J. S., Simonson L. P. Variations in Na-K-ATP-ase and Mg^{+2} -ATP-ase activity of the ground squirrel brain during hibernation.— *Comp. Biochem. and Physiol.*, 1978, B 59, N 3, p. 223—229.
 41. Stewart L. S., Zimny M. L., West H. Mg-ATP-ase and succinate dehydrogenase in brains from hypothermic ground squirrel and rats.— *J. Neurochem.*, 1970, 17, N 2, p. 285—287.

Дагестанский государственный университет, г. Махачкала

Получено 12.10.84

Хроника

II ВСЕСОЮЗНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ «МЕХАНИЗМЫ КРИОПОВРЕЖДЕНИЯ И КРИОЗАЩИТЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ»

С 9 по 11 октября 1984 года в Харькове проходила II Всесоюзная конференция «Механизмы криоповреждения и криозащиты биологических объектов». Конференцию проводили АН СССР, АН УССР, научный совет по проблеме «Криобиология и криомедицина», Институт проблем криобиологии и криомедицины АН УССР. В работе конференции приняли участие из 33 городов страны более 350 научных сотрудников, работающих в учреждениях АН СССР и ее филиалах, АН союзных республик, МЗ СССР и МЗ союзных республик, Минпищепрома, Минвуза. Специалисты в области биофизики, физики низких температур, биохимии, молекулярной биоло-

гии, медицины и др. обсуждали вопросы и обменивались информацией о новейших достижениях в области теоретической и практической криобиологии и криомедицины.

Период, прошедший после I-й конференции (1977 г.), характеризуется дальнейшим развитием исследований по изучению механизма действия холода на биологические объекты, применением низких температур с целью создания новых эффективных методов криоконсервирования клеток и тканей, использования холода в медицине.

Большой объем фундаментальных и прикладных исследований проведен в Институте проблем криобиологии и криомедицины АН

УССР. Установлены новые закономерности в процессах криповреждения и криозащиты биологических объектов различного уровня организации, разработаны эффективные методы лечения на основе применения холодových воздействий.

В настоящее время исследования в области криобиологии и криомедицины проводятся также в учреждениях АН СССР (Институты: цитологии, физиологии растений, биофизики и др.), АН УССР (Институты: проблем криобиологии и криомедицины, проблем онкологии им. Кавецкого, ботаники им. Холодного, Физико-технический институт низких температур), АН БССР (Институт физики, Институт тепломассообмена), АН МССР (Институт прикладной физики, Институт физиологии, отдел генетики растений и микробиологии), АМН СССР (Институты: онкологии, медрадиологии (г. Обнинск)), в учреждениях МЗ СССР и ряда союзных республик (Институт гематологии и переливания крови, Институты: онкологии, глазных болезней и тканевой терапии, нейрохирургии), учреждениях ВАСХНИЛ, пищевой промышленности (Московский, Одесский, Кишиневский технологические институты и др.), что подтверждает актуальность и значимость проблемы криобиологии и криомедицины для различных областей естествознания.

С целью концентрации усилий ученых различных специальностей, направленных на успешное развитие фундаментальных и прикладных исследований в области криобиологии и криомедицины, в Харькове в 1972 году создан Институт проблем криобиологии и криомедицины АН УССР. Учитывая все возрастающую потребность в подготовке кадров высокой квалификации, в 1980 году в номенклатуру специальностей научных работников введена рубрика «Криобиология», при Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР создан специализированный совет по защите докторских диссертаций по специальности «Криобиология», организован выпуск всесоюзного журнала «Криобиология».

Назрела необходимость создать единую программу исследований, посредством которой можно осуществить координацию основных результатов исследований, выполненных в различных учреждениях.

На пленарном заседании заслушан доклад чл.-кор. АН УССР В. И. Грищенко (Институт проблем криобиологии и криомедицины АН УССР, г. Харьков) о современных проблемах и тенденциях развития криобиологии и криомедицины. Докладчик проанализировал состояние развития экспериментально-теоретических и прикладных разработок в стране, отметил, что наряду с достижениями есть и отставание по фундаментальным и прикладным разработкам, главным образом, в области криобиологической биотехнологии и технического обеспечения процесса криоконсервации и криозащиты. В связи с этим, подчеркивалось в докладе, возникла необходимость более детально исследовать процессы, протекающие в биоматериалах при воздействии низких температур на различных уровнях биологической организации (молекулярном, надмолекулярном, клеточном, тканевом, органном и организменном).

Чл.-кор. АН СССР Г. Р. Иваницкий (Институт биофизики АН СССР, Пущино) посвятил свой доклад современным проблемам био-

физики и криобиологии, отметив важность и необходимость проведения фундаментальных разработок в области криобиологии и криомедицины, необходимость быстро и широко развивать их, поскольку они открывают возможность внедрения в практику биологии, медицины и других отраслей промышленности криоконсервированных и лиофилизированных биоматериалов. Эти вопросы могут быть успешно разработаны при объединении усилий специалистов различных отраслей знаний в наиболее перспективных и экономически целесообразных направлениях.

Вопрос о механизмах криповреждений и криозащиты биологических объектов обсуждался в 8 секциях.

На секции «Теоретические вопросы криобиологии» в докладе проф. А. М. Белоуса (Институт проблем криобиологии и криомедицины АН УССР, Харьков) рассмотрена молекулярно-клеточная концепция криповреждений биообъектов, подчеркнуто, что в ее основе лежат представления о ведущей роли в механизме криповреждений биоматериалов различного уровня организации плазматической мембраны, разделяющей наружную и внутреннюю среду, в которой появление иницирующих повреждение процессов, развивающихся на молекулярном уровне, зависит от изменений физико-химических свойств среды и от микроскопических изменений самой клетки как трехмерной структуры. Рассмотрены физико-химические процессы, связанные со снижением температуры до 0°C и в посленулевой зоне. В докладе к. х. н. Б. М. Сергеева (Москва) на основании экспериментальных данных были сформулированы некоторые общие положения, связывающие криоэнзимологию, исследование кинетики модельных ферментных реакций в замороженных растворах с проблемой низкотемпературного хранения биообъектов. Обсуждению проблемы молекулярных механизмов криозащиты биологических систем, а также использования биофизических методов в криобиологии был посвящен доклад к. ф.-м. н. В. А. Моисеева (ИПКиК АН УССР, Харьков). В докладе чл.-кор. АН УССР А. М. Утевского (ИПКиК АН УССР, Харьков) «Биология и криобиология регуляции и ауторегуляции» отмечены некоторые общие принципы биологии и криобиологии, систем ауторегуляции и регуляции на разных структурно-функциональных уровнях биологической организации.

В работе секции «Криоконсервирование биологических объектов» приняли участие 137 специалистов. С докладами и сообщениями выступили: члены-корреспонденты АН УССР С. С. Лаврик (Институт гематологии и переливания крови МЗ УССР, Киев), Н. С. Пушкар (ИПКиК АН УССР, Харьков), чл.-кор. Гр. ССР Т. Г. Чанишвили (Институт биофизики АН Гр. ССР, Тбилиси), д. м. н. А. А. Цуцаева, д. б. н. М. И. Шраго, д. м. н. Т. Н. Юрченко (ИПКиК АН УССР, Харьков). Они отметили, что проблемы криоконсервирования и долгосрочного хранения биологических объектов (кровь, костный мозг, лимфоциты, роговица, кожные трансплантаты, эндокринные органы, микроорганизмы) являются одной из актуальных задач криобиологии, результаты которых представляют интерес, имеют большое народнохозяйственное значение. Было подчеркнуто, что существующие способы долгосрочного хранения целого ряда

биообъектов (эритроцитов, кожи, роговицы, костного мозга, лимфоцитов и др.), требуют усовершенствования, а проблема криоконсервирования целых органов еще далека от решения.

Секция «Криобиология репродуктивных клеток и эмбриональных тканей» обсудила вопросы, связанные как с теоретическими, так и с экспериментальными проблемами криоконсервации репродуктивных клеток.

С докладом «Экспериментально-теоретические основы сохранения генетических ресурсов» выступил профессор Б. И. Вепринцев (Институт биофизики АН СССР, Пущино), который обосновал необходимость создания низкотемпературного банка геномов, рассказал об основных направлениях в решении задачи, в которой интересы науки, практики и будущего слиты в единое целое. В выступлении к. м. н. Парашука Ю. С. (ХМИ, Харьков) проанализированы тенденции дальнейшего развития криоконсервирования спермы человека, отмечены пути его реализации в клиническую практику. Проблема криобиологии гамет и зародышей млекопитающих была рассмотрена в докладах проф. Осташко Ф. И. (НИИ животноводства Южного Отделения ВАСХНИЛ, Харьков) и к. б. н. Наука В. А. (Институт зоологии и физиологии АН МССР, Кишинев). В выступлениях проф. Нейфаха А. А. (Институт физиологии растений АН СССР, Москва) и к. б. н. Копейки Е. Ф. (ИПКиК АН УССР, Харьков) были рассмотрены вопросы криоконсервации спермиев рыб. Проблемы криоконсервации спермы птиц осветил профессор Курбатов А. Д. (Институт разведения и генетики с/х животных, Ленинград). Наряду с глубоким анализом рассматриваемых на заседании секции вопросов намечены пути дальнейшего развития криобиологии репродуктивных тканей и клеток.

В заседании секции «Гипотермия» приняли участие ученые из Москвы, Ленинграда, Минска, Киева, Петрозаводска и других городов. Среди них — Герой Социалистического Труда, директор филиала Киевского института кардиологии им. Стражеско академик АМН СССР Малая Л. Т. (Харьков), чл. кор. АН УССР Пушкарь Н. С. (ИПКиК АН УССР), директор Института физиологии АН БССР проф. Гуринов В. Н. (Минск), руководитель лаборатории гипобиоза проф. Тимофеев Н. Н. (Москва), профессора Малыгин А. Н. (Петропавловск), Эмирбеков Э. З. (Махачкала), Белошицкий П. В. (Киев) и др. В докладах Малой Л. Т., Бабийчука Г. А., Тимофеева Н. Н., Малыгина А. М. большое внимание уделено перспективам применения охлаждения организма для ограничения зоны некроза при инфаркте миокарда, при лечении заболеваний центральной нервной системы. Доложенные на конференции результаты исследований определяют перспективу поиска более эффективных подходов к управлению свойствами реактивности теплокровных организмов, повышению их резистентности к экстремальным условиям, что, в свою очередь, позволит более направленно использовать и расширить области применения гипотермии и, возможно, искусственного гипобиоза в лечебных целях.

Работа секции «Криомедицина» была связана с освещением последних достижений по применению холода в качестве лечебного фактора и раскрытию механизмов его действия.

Специалисты Москвы, Киева, Харькова, Одессы (проф. С. А. Шалимов, Институт клинической и экспериментальной хирургии МЗ УССР, Киев; д. м. н. Б. П. Сандомирский, ИПКиК АН УССР, Харьков; д. м. н. В. Н. Запорожан, Одесский медицинский институт МЗ УССР; проф. Б. А. Задорожный, Харьковский медицинский институт МЗ СССР; проф. В. А. Никитин, УИУВ МЗ СССР, Харьков) сообщили о результатах клинической и экспериментальной работы в 28 докладах, где были затронуты проблемы, связанные с применением низких температур для лечения заболеваний головного мозга, поджелудочной железы, печени, кожи, слизистых рта, а также других органов и систем.

Работа секции «Технические средства криоконсервирования и криомедицины» была посвящена перспективам развития криохирургической техники, оценке опыта использования различной криоаппаратуры (в том числе, для криодеструкции и локальной гипотермии) в медицине и животноводстве, техническим и программным средствам ввода в ЭВМ и обработки электрофизиологической информации, математическому моделированию системы автоматического управления программным замораживанием биоматериалов.

На заседании секции «Криофитобиология» рассмотрены особенности процессов, протекающих в тканях растений при охлаждении, механизмы адаптации и криоустойчивости растений, а также пути повышения устойчивости растений к ранним морозам.

Специалисты из Киева, Москвы, Фрунзе, Ялты, Риги, Петропавловска, Тбилиси обсудили вопросы использования криопротекторов в растениеводстве и наметили пути повышения зимостойкости растений.

На секции «Холодильная обработка и сублимационная сушка пищевых продуктов» заслушаны теоретические доклады, касающиеся проблем тепло-массопереноса и кинетики сублимационных процессов в биоматериалах. Рассмотрены физико-математические модели процессов низкотемпературного и сублимационного консервирования пищевых продуктов, микроорганизмов и клеток животных, а также обсуждены эффективные модели сублимационной и криогенной техники.

Основными вопросами при обсуждении морфологических аспектов действия низких температур за «Круглым столом» явились кардинальные проблемы криобиологии и криомедицины. Большое внимание было уделено рассмотрению характера структурно-функциональных перестроек при действии пониженных и низких температур в биологических объектах различного уровня организации, а также особенностям действия экстремального фактора и латентности развивающихся повреждений.

Вопросам диагностики и прогнозирования состояния тканей после криовоздействий, а также использования с лечебной целью сочетанного влияния низких температур и других физических факторов была посвящена работа «круглого стола» секции «Криомедицина».

После работы секций состоялось объединенное заседание оргкомитета конференции и научного совета по проблеме «Криобиология и криомедицина», в котором приняли участие все присутствующие на конференции специалисты.

Профессор А. М. Белоус информировал собравшихся о создании всесоюзного журнала «Криобиология».

Конференция, объединив и скоординировав исследования в области криобиологии и криомедицины, определила направление исследований по расшифровке механизмов криорезистентности и криолабильности, криоповреждений и криозащиты биоматериалов, поиск на их основе оптимальных условий длительного сохранения биоматериалов в жизнеспособном состоянии путем создания методов криоконсервации для трансплантации замороженного материала, а также внедрения новых методов

лечения холодом в практическое здравоохранение.

II Всесоюзная конференция по проблеме «Механизмы криоповреждений и криозащиты биологических объектов» наметила перспективные направления исследований в области теоретических и прикладных разработок криобиологии. В числе основных мероприятий — подготовительная работа по созданию Всесоюзного общества криобиологов. Начата подготовка программы по внедрению в различные отрасли народного хозяйства методов, технических средств и новых технологических процессов холодового воздействия на биологические объекты.

В. И. Грищенко, Н. П. Суббота

ГОТОВЯТСЯ К ПЕЧАТИ

Издательство «Наукова думка»
(Киев) выпускает в 1985 году книги:

БЕЛОУС А. М., ЦВЕТКОВ Ц. Д. **Научные основы технологии сублимационного консервирования.** В монографии освещаются научные основы технологического процесса низкотемпературного и сублимационного консервирования различных биоматериалов на базе анализа узловых этапов их замораживания и сублимационной сушки.

САНДОМИРСКИЙ Б. П., ВОЛКОВА Н. А. **Жизнеспособность кожи при криоконсервировании.** В исследовании приведены данные по ультраструктурному анализу, результатам трансплантаций и эксплантаций кожи человека при низкотемпературном консервировании.

ЧУЙКО В. А., УТЕВСКИЙ А. М. **Биохимия криоконсервированной щитовидной железы.** В научном труде освещены биохимические процессы в криоконсервированной щитовидной железе, определяющие этапы биосинтеза и секреции тиреоидных гормонов, механизмы их нейрогуморальной регуляции.

РЕФЕРАТЫ

УДК 57.043

Современные проблемы и тенденции развития криобиологии и криомедицины/Грищенко В.И.—Криобиология, 1985, № 1, с. 3—8.

Анализируется состояние развития теоретических и практических разработок в области криобиологии и криомедицины. Описаны результаты фундаментальных исследований в области механизмов криоповреждений биомакромолекул, мембран и клеток, принципов их криозащиты в цикле замораживания — отогрева. Представлены последние данные о криоконсервации различных клеток (эритроциты, иммунокомпетентные клетки, репродуктивные, эмбриональные и клетки культуры, микроорганизмы), тканей (роговица, эндокринные ткани и др.) и перспективы разработок в этой области криобиологии.

УДК 57.043

Криобиология в анализе общебиологических проблем/Утевский А.М. — Криобиология, 1985, № 1, с. 8—13.

Рассматривается вопрос о возможности и значении использования данных и концепций криобиологии в анализе таких общебиологических проблем, как характеристика «живого» и теории возникновения «живого» из «неживого». Указывается, что результаты искусственного низкотемпературного анабиоза — криоконсервации — находятся в некотором противоречии с постулатом биологии о необходимости непрерывного биологического обмена и состояния «открытой системы» для сохранения уникальной структуры «живого». Приводятся литературные данные о возможной роли криогенных факторов в возникновении биологических систем («холодовая» предыстория жизни).

Библиогр.: 16 назв.

УДК 576.593.17.42

Общие вопросы криобиологии /Лозина-Лозинский Л.К. — Криобиология, 1985, № 1, с. 13—19.

Статья посвящена вопросу изучения холодоустойчивости организмов на всех этапах развития и акклимации к низким температурам. Изложены основные этапы развития криобиологии, ее становление как самостоятельной науки благодаря развитию смежных дисциплин.

Рассмотрен вопрос о происхождении холодоустойчивости и подчеркивается ее двойное происхождение. Автор предлагает разделить криобиологию на ряд разделов, но указывает, что для успешного решения ряда задач необходим синтетический, системный подход. Приводится схема последовательности криоповреждений в процессе «замораживания-оттаивания» и хранения при низких температурах.

Библиогр.: 40 назв.

УДК 57.043:664.8.037.1

Состояние воды в биологических объектах при криоконсервировании по данным ЯМР /Загibalова Т.Д., Манк В.В. — Криобиология, 1985, № 1, с. 19—23.

Поведение воды при замораживании перца сладкого изучено по спектрам ядерного магнитного резонанса высокого разрешения. Полученные кривые замораживания и оттаивания, которые позволяют сделать вывод о наличии в тканях перца полимолекулярной адсорбции воды и трех типов влаги, также подтверждают предположение о наличии трех уровней криоповреждений в биологических объектах.

Ил. 3. Библиогр.: 12 назв.

УДК 57.043

Физико-химические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий/Пушкар Н.С., Гордиенко Е.А., Кулешова Л.Г., Гордиенко О.И., Розанов Л.Ф., Ишков Г. С. — Криобиология, 1985, № 1, с. 23—29.

В работе рассмотрены результаты анализа физико-математических моделей, основанных на аппарате неравновесной термодинамики, описывающие поведение объема клеток в гипертонических растворах проникающих и непроникающих криопротекторов. Обсуждено влияние таких повреждающих факторов, как обезвоживание и внутриклеточная кристаллизация, и их вклад в повреждение при различных режимах замораживания клеточных суспензий. Описаны процессы, протекающие при двухступенчатом замораживании с температурной остановкой при умеренно низких температурах, и отмечены определенные преимущества этого режима замораживания по сравнению с замораживанием по оптимальной в свете двухфакторной гипотезы программе.

Ил. 6, Табл. 1., Библиогр.: 12 назв.

УДК 57.043:615.832.9:616—003.93

Механизмы криостимуляции регенерации поврежденных тканей/Сандомирский Б.П., Волкова Н.А., Журавлев А.С., Коцько Н.И., Писанный О.Е., Сигал Н.С., Козлова В.Ф., Хайкин Р.К. — Криобиология, 1985, № 1, с. 29—36.

На основании экспериментальных и клинических данных на репрезентативных группах анализируются результаты применения холода в виде лечебного фактора при циррозах печени, дуоденальных язвах, хронических тонзиллитах.

Исследование различных видов тканей, находящихся в патологически измененном состоянии и подвергнутых криовоздействию, позволило сделать вывод об эффективности холодовых методов лечения. Фактический материал подвергнут математическому анализу.

Раскрыты некоторые стороны реализации лечебного действия низких температур: усиление клеточной пролиферации, изменение показателей иммунитета, воздействие на определенные звенья патогенеза.

Ил. 11. Табл. 1. Библиогр.: 14 назв.

Уменьшение степени ишемического повреждения органов с помощью диметилсульфоксида/Кирпатовский В. И., Артамонов С.Д., Лубяко А.А., Онищенко Н.А. — Криобиология, 1985, № 1, с. 36—40.

В опытах на почках и сердцах 96 крыс показано, что предварительное введение диметилсульфоксида (ДМСО) за 1—24 ч. до опыта в дозе 1 г/кг увеличивает резистентность органов к повреждающему действию тепловой ишемии: происходили меньшие нарушения энергетического баланса клеток и повышалась стабильность клеточных мембран; функция органов в постишемическом периоде сохранялась на более высоком уровне. Изучение энергетического состояния ишемизированных органов, «защищенных» предварительным введением ДМСО, выявило замедление энергозатрат в первые 20—40 мин ишемии и более длительную энергопродукцию по сравнению с контролем. Авторы делают вывод, что ДМСО, как и другие противоишемические препараты с мембранотропным действием, может не только «стабилизировать» клеточные мембраны, но и вызывать перестройку клеточного метаболизма в предишемическом периоде, направленную на активирование неспецифических адаптационных процессов в клетке.

Ил. 2. Табл. 2. Библиогр.: 22 назв.

О криобиологической технологии/Бражников А.М. — Криобиология, 1985, № 1, с. 41—44.

Обосновывается целесообразность использования методов калиметрии при количественной оценке обратимости восстановленного биообъекта после его криоконсервации. Приведены данные математического анализа зависимости комплексного показателя обратимости от безразмерных свойств биообъекта. Полученные данные могут быть использованы при рассмотрении физической природы явлений в процессе криоконсервации биообъектов и, в частности, описании характера перераспределения температуры и других теплофизических показателей в цикле замораживания—отогрева.

Табл. 1. Библиогр.: 10 назв.

Актуальные проблемы исследования биохимии мозга при гипотермии/Эмирбеков Э.З., Львова С. П. — Криобиология, 1985, № 1, с. 44—49.

Приводятся и анализируются материалы по биохимическим изменениям, состоянию мембран, активности ферментов, по физико-химическим характеристикам белков мозга незимоспящих и зимоспящих животных в динамике гипотермии. Выдвигается концепция влияния гипотермии на молекулярные процессы в мозгу и некоторые проблемы, которые могли бы послужить основой для дальнейшего планомерного исследования биохимии мозга в условиях гипотермии.

Библиогр.: 41 назв.

Current problems and trends in the development of cryobiology and cryomedicine/Grischenko V.I. — Criobiology, 1985, № 1, p. 3—8.

The state of development of theoretical and applied research in cryobiology and cryomedicine is discussed. The results of fundamental investigations in the field of mechanisms of cryoinjury to biomacromolecules, membranes and cells, principles of their cryoprotection in the freezing and thawing cycle are described. The latest data on cryopreservation of various cells (erythrocytes, immunocompetent cells, reproductive, embryonic and culture cells, microorganisms), tissues (cornea, endocrine tissue, etc.) and perspectives of development in this branch of cryobiology is presented.

Cryobiology in the analysis of the general biological problems/Utevsky A.M. — Criobiology, 1985, № 1, p. 8—13.

The article discusses the problem about the possibility and significance of the usage of cryobiological data and concepts during the analysis of general biological problems, such as characteristics of «animated» and the theory of origin of «animated» from «inanimated». It is pointed out, that the results of the artificial low temperature anabiosis—cryopreservation — are in some contradiction with the biological postulate about the necessity of continuous biological exchange and the presence of the state of the «open system» for the preservation of the unique «animated» structure. References are given about the possible role of cryogenic factors in the origin of biological systems (the «cold prehistory» of the life).

16 refs.

General Questions of cryobiology/Lozina-Lozinsky L. K. — Criobiology, 1985, № 1, p. 13—19.

Low temperature acclimation of organisms and their resistance to cold at all stages of development are reviewed. The main stages on the history of cryobiology are described; its independization as a new branch of biology is a consequence of the progress of the progress of other disciplines. It is supposed that the resistance to cold may have two original ways of development. The author suggests to divide cryobiology into some sub-branches, although in order to visualize and resolve general problems a synthetic systematic approach is needed. The sequence of cryoinjuries in the process of freezing and thawing and storage at low temperatures is schematically presented.

40 refs.

The state of water in biological systems under cryopreservation: NMR data/Zagibalova T.D., Mank V.V. — Criobiology, 1985, № 1, p. 19—23.

Water behaviour during freezing of sweet bell red pepper has been studied according to high resolution NMR spectra. Freezing and thawing curves has been obtained enabling to conclude about the presence of water polymole-

cular adsorption and three types of water in pepper tissues. These curves confirm the suggestion about the presence of three levels of cryoinjuries in biological systems.

3 figs. 12 refs.

UDC 57.043

Physico-chemical basis of low temperature preservation of cell suspensions/Pushkar N.S., Gordiyenko E.A., Kuleshova L.G., Gordiyenko O.I., Rozanov L.F., Ishkov G.S.—*Criobiology*, 1985, № 1, p. 23—29.

Results of analysis of physico-mathematical models employing the techniques of non-equilibrium thermodynamics and describing the behaviour of a volume of cells in hypertonic solutions of permeating and non-permeating cryoprotectants are considered. The effect of such damaging factors as dehydration and intracellular crystallization and their contribution to injury observed at various regimens of freezing of cell suspension is discussed. The processes occurring during two-step freezing with temperature holding at moderately low temperatures have been described and some advantages of this freezing regime in comparison with freezing at optimal (according to a two-factor hypothesis) programme are pointed out.

6 ills, 1 table. 12 refs.

UDC 57.043.615.832.9:616—003.93

Mechanisms of cryostimulation of damaged tissue regeneration/Sandomirsky B.P., Volkova N.A., Shuravlev A.S., Kotsko N.I., Pisanyn O.E., Sigal N.S., Kozlova V.F., Haikin R.K.—*Criobiology*, 1985, № 1, p. 29—36.

The results of cold treatment as a medicinal factor in the cases of cirrhosis, duodenal ulcers, chronic tonsillitis have been analysed basing on experimental and clinical data on the representative groups.

The investigation of different types of tissues being in pathologically changed state and exposed to cryoapplication allowed us to draw a conclusion about the efficiency of cold methods of treatment. The factual material was mathematically analysed.

Several aspects of realizing the medicinal effect of low temperatures have been elucidated: an increase in cell proliferation, changing immunity indices, the effect on definite chains of pathogenesis.

1 table, 11 ill. 14 refs.

UDC 57.043

Reduction of organ ischemic lesion with dimethyl sulfoxide. /Kirpatovsky V.I., Artamonov S.D., Lubyako A.A., Onishchenko N.A.—*Criobiology*, 1985, № 1, p. 36—40.

Antiischemic effect of dimethyl sulfoxide (1g/kg, 1—24hr prior to ischemia development) was demonstrated in experiments in 96 rats. It was shown that the mechanism of DMSO protective effect is similar to the effect of known antiischemic drugs of membranotropic action, and consists in both cell membrane stabilization and stimulation of nonspecific adaptive cell responses.

2 ill. 2 tables. 22 refs.

UDC 57.043

On cryobiological technology/Brazhnikov A.M.—*Criobiology*, 1985, № 1, p. 41—44.

The expediency of using qualimetric methods for quantitative evaluation of the reversibility of restored biological system after its cryopreservation has been grounded. The data of mathematical analysis of the dependence of complex index of reversibility on dimensionless properties of biological system has been given.

The data obtained can be used for examining the physical nature of phenomena during cryopreservation of bioobjects, and, in particular, for describing the character of redistribution of temperature and other thermophysical indices during freezing and thawing.

1 table. 10 refs.

UDC 57.043.612.822.1:612.57

The actual problems of the investigation brain biochemistry at hypothermia/Emirbekov E.Z., L'vova S. P.—*Criobiology*, 1985, № 1, p. 44—49.

The materials of biochemical changes and the state of the membranes, enzyme activity, on physico-chemical characteristics of proteins in the brain nonhibernated and hibernated animals during hypothermia is given and analysed in this article. The conception is proposed on the influence of hypothermia on molecular processes in brain and some problems which could be basic for further planned investigation of brain biochemistry during hypothermia.

41 refs.

КРИОБИОЛОГИЯ № 1 1985

Адрес редакции:
310015. Харьков, 15
ул. Переяславская, 23.

Ответственный секретарь редакции
Ф. А. Приходько

Редактор Л. В. Смык
Технический редактор В. Я. Козинченко

Сдано в набор 23.11.84. Подписано в печать 29.01.85
БЦ 16520. Формат 70×108/16. Физ. печ. л. 3,5. Уч.-
изд. л. 6,20. Усл. краскоот. 5,60. Усл. печ. л. 4,90.
Тираж 1000 экз. Заказ № 4-950. Цена 65 коп.

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

Отпечатано с матриц Харьковской книжной фабрики
им. М. В. Фрунзе в Харьковской городской типогра-
фии № 16 Областного управления по делам издательств
полиграфии и книжной торговли 310003.
Харьков, Университетская, 16. Зак. 219.

К СВЕДЕНИЮ АВТОРОВ ЖУРНАЛА «КРИОБИОЛОГИЯ»

Статья представляется в 2 экз. с сопроводительным письмом, актом экспертизы (2 экз.) и авторской справкой. Объем оригинальной статьи — не более 10, обзорной — 12 стр. машинописи, включая текст, список литературы, таблицы, иллюстрации и подписи под рисунками. Объем краткого сообщения — 3 стр. Оба экземпляра статьи подписываются авторами с указанием учреждения, фамилии, имени и отчества, домашнего адреса и номера телефона.

Статья печатается на машинке черной лентой, через 2 интервала на белой бумаге форматом А₄ (210 × 297 мм). На странице не более 30 строк, в строке не более 60—62 знаков. Абзацный отступ равен 5 знакам. Левое поле страницы — не менее 25, правое — 10, верхнее — 20, нижнее — 20 мм.

В левом верхнем углу проставляется УДК, затем инициалы и фамилия автора (авторов), название статьи. Название учреждения указывается под списком литературы, слева.

Оригинальная статья должна содержать разделы: введение, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, выводы.

В тексте ссылки на номера статей по списку литературы даются в квадратных скобках.

Иностранные фамилии даются в русской транскрипции.

Таблицы печатают на отдельных страницах, помещают в рукописи вслед за страницей, содержащей первую ссылку на эту таблицу. Слово «Таблица» с указанием ее порядкового номера печатается в одну строку с ее названием. Примечания к таблице даются непосредственно под ней. Листы с таблицами включают в общую нумерацию страниц рукописи. На полях проставляют номера таблиц и рисунков против тех мест текста, где они должны быть заверстаны.

Формулы и буквенные обозначения должны быть выполнены четко, крупно, черными чернилами. Индексы и показатели степени вписываются так, чтобы они были в два раза меньше основных обозначений, к которым относятся. Прописные и строчные буквы в формулах, одинаковые по начертанию и отличающиеся только размером (C—c, K—k, O—o, P—p, S—s, H—h, X—x, V—v, W—w, Z—z), подчеркиваются: прописные буквы — двумя черточками снизу, строчные — двумя черточками сверху. Следует особенно четко вписывать сходные по написанию буквы: e и l, I и J, h и n.

Курсивные буквы подчеркиваются волнистой линией, прямые буквы, а также нуль, sin, cos, exp и т. д. размечаются на прямой пробор знаком 11. Нумерация формул должна быть сквозной в пределах статьи (арабскими цифрами в круглых скобках). Разметка формул производится синей или фиолетовой пастой, греческие буквы подчеркиваются или обводятся красным карандашом, готические — синим. Нестандартные знаки (математические, физические, химические) вписываются на поле (один раз) с указанием их значения. Разметка формул производится в обоих экземплярах рукописи статьи, а также в дубликate формул, который прилагается к статье.

Рисунки в количестве не более 5 выполняются черной тушью на кальке, чертежной бумаге (или в виде фотографии). На них наносятся только необходимые условные обозначения. Расшифровка их необходима в тексте или в подписи к рисунку.

Иллюстрации должны быть пронумерованы в последовательности, соответствующей упоминанию их в статье и номерами привязаны к подрисуночным подписям. На обороте рисунка указывается его порядковый номер, фамилия автора, название статьи и журнала. Рисунки подаются к каждому экземпляру статьи в конверте, на котором указываются те же сведения, что и на обороте рисунка.

Список литературы печатается на отдельной странице через 2 интервала и составляется в алфавитном порядке авторов, русский, затем латинский алфавит. В списке необходимо привести следующие сведения: фамилия и инициалы автора в оригинальной транскрипции, название статьи, журнала или книги и далее: для периодических изданий 1) год издания, 2) том, 3) номер, 4) номера страниц; для монографий — место издания, название издательства, год издания, общее количество страниц. Фамилия редактора книги (при отсутствии фамилии авторов на титульном листе) помещается после заглавия; в списке литературы такие издания располагаются по алфавиту заглавия.

Названия периодических и продолжающихся изданий на иностранных языках сокращаются в соответствии с правилами, принятыми в изданиях ВИНТИ.

Ссылки на неопубликованные работы не допускаются.

Объем списка литературы не должен превышать 5% общего объема рукописи статьи (на 10 стр. — 0,5 стр. списка литературы).

Реферат к статье подается на русском и английском языках объемом до 0,5 стр.

Не принятые к печати статьи не возвращаются.

Материалы направлять по адресу: 310015, Харьков-15, ул. Переяславская, 23, Институт проблем криобиологии и криомедицины АН УССР, редакции журнала «Криобиология».

В ЖУРНАЛЕ «КРИОБИОЛОГИЯ»

Публикуются научные обзоры, статьи о теоретических аспектах действия на криобиологические объекты, о механизмах криоповреждений, проблемах искусственной криозащиты и анабиоза, низкотемпературном консервировании и сублимационной сушке культур, тканей и других биоматериалов, о криопротекторных соединениях, во вопросах криомедицины, криофитобиологии, зимостойкости растений, о технических средствах для биологических исследований, технической консервации. Печатаются рецензии на издания по вопросам криобиологии, хроника.

Журнал выходит четыре раза в год. Подписная цена: на 12 месяцев — 2 руб. 60 коп., на 9 мес.—1 руб. 95 коп., на 6 мес.— 1 руб. 30 коп., цена одного номера 65 коп.

Подписку принимают все отделения связи и общественные распространители печати.