

ISSN 0233-7673

# КРИОБИОЛОГИЯ

1 | 87



## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

В. И. ГРИЩЕНКО (главный редактор), А. М. БЕЛОУС (зам. гл. редактора), Ю. П. БЛАГОЙ, А. М. БРАЖНИКОВ, Р. Г. БУТЕНКО, Б. Н. ВЕПРИНЦЕВ, В. И. ГОЛДАНСКИЙ, В. И. ЛУГОВОЙ, Ф. И. ОСТАШКО, Е. Я. ПАНКОВ, Л. А. ПИРУЗЯН, Н. С. ПУШКАРЬ, Б. П. САНДОМИРСКИЙ, А. С. СНУРНИКОВ, К. М. СЫТНИК, А. М. УТЕВСКИЙ, А. Г. ФЕДОТЕНКОВ, А. А. ЦУЦАЕВА, В. И. ШУМАКОВ, Т. Н. ЮРЧЕНКО

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

С. И. АКСЕНОВ (МОСКВА), Н. Г. БАКРАДЗЕ (ТБИЛИСИ), М. Е. БЕКЕР (РИГА), П. В. БЕЛОШИЦКИЙ (КИЕВ), Д. М. ГРОДЗИНСКИЙ (КИЕВ), В. Н. ЗАПОРОЖАН (ОДЕССА), Л. В. КАЛАКУЦКИЙ (ПУЩИНО, МОСК ОБЛ.), А. Д. КУРБАТОВ (ЛЕНИНГРАД), В. А. НАЕР (ОДЕССА), В. А. НИКИТИН (ХАРЬКОВ), Г. П. ПИНАЕВ (ЛЕНИНГРАД), Г. Б. СЕРГЕЕВ (МОСКВА), М. А. СОЛОВЬЕВА (КИЕВ), Н. Г. СОЛОМОНОВ (ЯКУТСК), Н. Н. ТИМОФЕЕВ (МОСКВА), В. М. ЧЕРЕДНИЧЕНКО (ХАРЬКОВ), В. В. ШЕНТАЛЬ (МОСКВА), Э. З. ЭМИРБЕКОВ (МАХАЧКАЛА)

## EDITORIAL BOARD

V. I. GRISHCHENKO (Editor-in-Chief), A. M. BELOUS (Associated Editor), Yu. P. BLAGOJ, 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, K. M. SYTNIK, A. M. UTEVSKY, A. G. FEDOTENKOV, A. A. TSUTSAYEVA, V. I. SHUMAKOV, T. N. YURCHENKO

## EDITORIAL COUNCIL

S. I. AKSENOV (MOSCOW), N. G. BAKRADZE (TBILISI), M. E. BEKER (RIGA), P. V. BELOSHITSKY (KIEV), D. M. GRODZINSKY (KIEV), V. N. ZAPOROZHAN (ODESSA), L. V. KALAKUTSKY (PUSHCHINO, MOSCOW REGION), A. D. KURBATOV (LENINGRAD), V. A. NAER (ODESSA), V. A. NIKITIN (KHARKOV), G. P. PINAYEV (LENINGRAD), G. B. SERGEYEV (MOSCOW), M. A. SOLOVYEVA (KIEV), N. G. SOLOMONOV (YAKUTSK), N. N. TIMOFEYEV (MOSCOW), V. M. CHEREDNICHENKO (KHARKOV), V. V. SHENTAL (MOSCOW), E. Z. EMIRBEKOV (MAKHACHKALA)

АКАДЕМИЯ НАУК СССР  
ОТДЕЛЕНИЕ ФИЗИОЛОГИИ

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР  
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ  
И ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

# КРИОБИОЛОГИЯ

1 1987

ВСЕСОЮЗНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ОСНОВАН В 1985 ГОДУ  
ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

КИЕВ НАУКОВА ДУМКА 1987

## СОДЕРЖАНИЕ

|                                                                                                                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Прокопов В. Е. Программа совместной деятельности коллективов и ведомств . . .                                                                                                                     | 3  |
| Шраго М. И., Козлова В. Ф. Токсико-фармакологические исследования в крио биологии . . . . .                                                                                                       | 5  |
| Гольцев А. Н., Цуцаева А. А., Дубрава Т. Г. Сравнительное изучение криоустой чивости КОЕ <sub>с</sub> и КОЕ <sub>к</sub> , находящихся в различном функциональном состоянии .                     | 11 |
| Гулевский А. К., Михалев О. И., Рязанцев В. В., Зинченко А. В., Волков В. Я. О физических состояниях и криозащитных свойствах растворов холинхлорида . .                                          | 17 |
| Чекурова Н. Р., Кислов А. Н., Вепринцев Б. Н. Действие некоторых криопротекторов на ионные каналы мембраны нейронов . . . . .                                                                     | 21 |
| Гурин В. Н., Семененя И. Н. Изменения в липидном составе липопротеидов плазмы крови в условиях развивающейся гипотермии . . . . .                                                                 | 26 |
| Кудогоцева Е. В., Жегунов Г. Ф. Состояние NADH-зависимой цепи переноса электронов мембран эндоплазматического ретикулума печени сусликов и крыс .                                                 | 30 |
| Загоруйко Ю. В., Загоруйко Г. Е., Бабийчук Г. А. Влияние гипоксии и кранио-церебральной гипотермии на ультраструктуру миокарда белых крыс . . . . .                                               | 32 |
| Сандомирский Б. П., Сигал Н. С., Коцько Н. И. Пролиферативная активность клеток печени крыс после криовоздействий . . . . .                                                                       | 38 |
| Рикберг А. Б., Есьман С. С., Голубев Ю. В., Сергиенко В. П. Тест <i>in vitro</i> для криохирургии . . . . .                                                                                       | 41 |
| Унков М. Е., Шпиченецкий Б. Я., Уткин Ю. Н., Колоколова О. Б. Метод и устрой-ство для акустического контроля за процессом насыщения органов криопротек-тором при изолированной перфузии . . . . . | 46 |

## КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

|                                                                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Топорова Н. И., Шенталь В. В., Тихонова Н. А. Современные возможности низкотемпературного лечения первично-множественных опухолей кожи головы и шеи . . . . . | 49 |
| Запорожан В. Н., Хаит О. В., Ислам М. А. Иммунологические аспекты крио-хирургии гнойных ран . . . . .                                                         | 50 |

## ХРОНИКА

|                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------|----|
| II школа-семинар «Механизмы зимней спячки млекопитающих» . . . . . | 52 |
|--------------------------------------------------------------------|----|

|                              |    |
|------------------------------|----|
| ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИЙ . . . . . | 52 |
|------------------------------|----|

|                    |    |
|--------------------|----|
| Рефераты . . . . . | 54 |
|--------------------|----|

© Издательство «Наукова думка», «Криобиология», 1987

This one



ZRSU-LKJ-WHRW

Матеріал, захищений авторським правом

## CONTENTS

|                                                                                                                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Prokopov V. E.</i> Program for joint activities of collectives and departments . . . . .                                                                                                                 | 3  |
| <i>Shrago M. I., Kozlova V. F.</i> Toxicopharmacological studies in cryobiology . . . . .                                                                                                                   | 5  |
| <i>Goltsev A. N., Tsutsayeva A. A., Dubrava T. G.</i> Comparative study of cryostability of CFU <sub>s</sub> and CFU <sub>m</sub> in various functional states . . . . .                                    | 11 |
| <i>Gulevsky A. K., Mikhalev O. I., Ryasantsev V. V., Zinchenko A. V., Volkov V. Ya.</i> On physical states and cryoprotective properties of choline chloride solutions . . . . .                            | 17 |
| <i>Chekurova N. R., Kislov A. N., Veprintsev B. N.</i> The effect of some cryoprotectants on ion channels of neurone membranes . . . . .                                                                    | 21 |
| <i>Gurin V. N., Semeneyva I. N.</i> Changes in the lipid content of blood plasma lipoproteids under conditions of developing hypothermia . . . . .                                                          | 26 |
| <i>Kudokotseva E. V., Zhegunov G. F.</i> The state of NADH-dependent electron transport chain in liver endoplasmic reticulum membranes of ground squirrels and rats . . . . .                               | 30 |
| <i>Zagoruyko Yu. V., Zagoruyko G. E., Babiychuk G. A.</i> The effect of hypoxia and craniocerebral hypothermia on the ultrastructure of white rat myocardium . . . . .                                      | 32 |
| <i>Sandomirsky B. P., Sigal N. S., Kotsko N. I.</i> The proliferative activity of rat hepatocytes after cryoapplication . . . . .                                                                           | 38 |
| <i>Rikberg A. B., Esman S. S., Golubev Yu. V., Sergiyenko V. P.</i> A test <i>in vitro</i> for cryosurgery . . . . .                                                                                        | 41 |
| <i>Unkov M. E., Shpichenetsky B. Ya., Utkin Yu. N., Kolokolova O. B.</i> Method and device for acoustic controlling the process of organ saturation with cryoprotectant during isolated perfusion . . . . . | 46 |
| SHORT COMMUNICATIONS                                                                                                                                                                                        |    |
| <i>Toporova N. I., Shental V. V., Tikhonova N. A.</i> Current possibilities of low temperature treating primary multiple skin tumors of head and neck . . . . .                                             | 49 |
| <i>Zaporozhan V. N., Khait O. V., Islam M. A.</i> Immunologic aspects of purulent wound cryosurgery . . . . .                                                                                               | 50 |
| CHRONICLE                                                                                                                                                                                                   |    |
| II School-Seminar „Mechanisms of Hibernation in Mammals“ . . . . .                                                                                                                                          | 52 |
| DEFENSE OF THESES . . . . .                                                                                                                                                                                 | 52 |
| Abstracts . . . . .                                                                                                                                                                                         | 54 |

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

Научный редактор *Т. Н. Юрченко*  
Ответственный секретарь редакции  
*Ф. А. Приходько*  
Редактор *З. В. Линевиц*  
Технический редактор *В. Н. Волкова*  
Корректор *Н. П. Спичак*

Сдано в набор 08.10.86. Подп. в печ. 22. 12.86. БЦ 22237. Формат 70 × 108/16. Выс. печ. Усл. печ. л. 4,9. Уч. изд. л. 5,43. Усл. кр.-отт. 5,6. Тираж 1000 экз. Заказ № 6-405

Отпечатано с матриц Харьковской книжной фабрики им. М. В. Фрунзе в Харьковской городской типографии № 16. 310003, Харьков, Университетская, 16. Зак. 62.

**В. Е. Прокопов***ученый секретарь координационного  
совета научно-технической программы  
по криобиологии и криомедицине*

## **ПРОГРАММА СОВМЕСТНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ КОЛЛЕКТИВОВ И ВЕДОМСТВ**

Все более широкий размах приобретают поиски в области холодовых воздействий на биологические объекты. Они проводятся в научных учреждениях Академии наук СССР, академий союзных республик, Академии медицинских наук СССР, ВАСХНИЛ, в учреждениях здравоохранения, вузах, на предприятиях пищевой промышленности, других ведомств. Хорошо, что важными вопросами занят столь большой круг научных кадров и практиков. Однако работают они, как правило, разобщенно. Это нередко приводит к дублированию, растягиванию сроков при выполнении заданий и взятых обязательств, наблюдаются факты, когда ограничиваются мелко-темьем. А жизнь требует больших масштабов, коренных изменений в методиках, значительных результатов.

Апрельский Пленум ЦК (1985 г.), XXVII съезд КПСС поставили задачу ускорения экономического и социального развития страны. Партия, народ настойчиво трудятся для осуществления коренного поворота в развитии общества. В обстановке ускорения работает и наука. Выступая на съезде о необходимости преодолеть сложившуюся инерцию, его делегат, президент Академии наук УССР Б. Е. Патон высказался о важности переориентирования подразделений и научных учреждений, быстрого перехода от устаревшего, сложившегося десятилетиями, к подлинно интенсивному развитию науки.

По целому ряду фундаментальных исследований ученые Института проблем криобиологии и криомедицины (ИПККиК) АН УССР совместно с тружениками различных других учреждений достигли заметных результатов. Но это лишь первые шаги. В поисках путей перестройки коллектив института пришел к выводу о необходимости объединения усилий многих научных заведений. Президиум Академии наук УССР поддержал инициативу и Государственному комитету СССР по науке и технике внес конкретные предложения. Комитет рассмотрел их и утвердил научно-техническую программу на 1986—1990 гг. На основе глубокого анализа состояния и перспектив развития фундаментальных и прикладных исследований в области криобиологии и криомедицины выработан согласованный в научных учреждениях союзной, республиканских, медицинской академий, ВАСХНИЛ, в различных министерствах и ведомствах план совместных действий по внедрению достижений науки в народнохозяйственную практику. Для обеспечения организационно-методического руководства и контроля за ходом выполнения заданий программы по обеспечению высокого уровня создаваемой техники и технологии утвержден состав координационного совета (председатель член-корреспондент АН УССР В. И. Грищенко). Головным ведомством по обеспечению комплексного и своевременного выполнения заданий программы является Академия наук УССР, головной организацией — Институт проблем криобиологии и криомедицины.

Программа предусматривает выполнение 17 заданий первого уровня, в решении которых участвует 36 организаций и предприятий, 14 министерств и ведомств. Она состоит из трех основных разделов.

1. Фундаментальные исследования, цель которых дальнейшее изучение механизмов криоповреждения и криозащиты биологических систем разных уровней организации, углубление теоретических разработок низкотемпературного консервирования биологических объектов, создание научных основ направленного синтеза криопротекторов с заданными свойствами.

2. Прикладные исследования, в задачи которых входит создание научно обоснованных технологических процессов криоконсервирования, лиофилизации и долгосрочного хранения биологических объектов, используемых в народном хозяйстве, разработка научных основ организации системы низкотемпературных банков биологических объектов на предприятиях различных министерств и ведомств, разработка и внедрение научно обоснованных методов применения холода в комплексной терапии различных патологических состояний, хирургии злокачественных опухолей, консервации репродуктивных клеток.

3. Разработка и изготовление аппаратуры и оборудования для обеспечения широкомасштабного внедрения технологических процессов криоконсервации и лиофилизации клеток, органов, организмов и методов лечения применением холода.

В результате выполнения программы будут созданы принципиально новые методы криотерапии патологических состояний, в частности с комбинированным использованием различных физических воздействий с целью замены малоэффективных методов лечения, снижения их себестоимости и сокращения сроков восстановления трудоспособности.

Будут разработаны методы низкотемпературного и ультразвукового воздействия при патологии печени и поджелудочной железы, криотерапии заболеваний опорно-двигательного аппарата, эндоскопической криотерапии при патологии желудка, двенадцатиперстной кишки, при гинекологических заболеваниях, краниocereбральной и абдоминальной гипотермии. Многие методы лечения к концу пятилетки пройдут клинические испытания и начнут внедряться в здравоохранение. в результате предусмотрено получить существенный социальный и экономический эффект. Шагом вперед в медицинской и биологической науках должны стать создание и внедрение технологического процесса криоконсервации и трансплантации гонад, гамет и эмбрионов человека.

Значительная часть организаций и предприятий, участвующих в выполнении программы, ставит конечной целью научно-исследовательских и конструкторских работ подготовку технологических процессов криоконсервирования биологических объектов для нужд народного хозяйства. Так, к 1990 году ИПКиК АН УССР, Институт хирургии им. А. В. Вишневского, Научно-исследовательский институт трансплантологии и искусственных органов разработают и введут в лечебную практику технологические процессы криоконсервирования щитовидной железы, роговицы, кожи; Научно-исследовательский институт Лесостепи и Полесья Украинской ССР, Институт проблем криобиологии и криомедицины АН УССР и Институт биологической физики АН СССР разработают и внедрят в сельское хозяйство страны технологические процессы криоконсервации спермы и эмбрионов, что позволит реализовать и ускорить метод крупномасштабной генетической селекции в животноводстве.

Институт проблем криобиологии и криомедицины АН УССР и организации Минмедбиопрома разработают и внедрят технологические процессы криоконсервирования и сублимации микроорганизмов, используемых в производстве биологически активных веществ, кормовых антибиотиков, а также штаммов, применяемых в пищевой и медицинской промышленности.

Для быстрого внедрения новых методов лечения и технологических процессов криоконсервирования биологических объектов рядом заданий программы предусмотрено создание новой, оригинальной аппаратуры. Будут разработаны гипотерм многоцелевого назначения, новые аппараты для оксигенации полости рта, инструменты для эндоскопической криохирургии органов брюшной полости. Поставлена цель создать комплекс аппаратуры

для криоконсервирования биологических объектов (замораживатели, размораживатели, контейнеры, переносные емкости), аппарат для лиофилизации биологических объектов на основе программного замораживателя и приборов для контроля процесса сушки. Предварительные научно-исследовательские и опытно-конструкторские работы, проведенные конструкторами объединений холодильной промышленности, позволяют приступить к выполнению заданий по созданию ряда скоромороозильных аппаратов, к серийному выпуску высокоэффективного оборудования, способного обеспечить нужды предприятий и организаций с учетом их производственной мощности и ассортимента выпускаемой продукции. В первую очередь это позволит расширить возможности использования эндокринно-ферментных препаратов, повысит их качество, а также даст возможность создать более прогрессивный метод сохранения целого ряда пищевых продуктов.

Это большая программа деятельности многих коллективов. Выполнив ее задания на высоком научно-техническом уровне и в установленные сроки, ученые, инженеры и другие специалисты, работающие в области криобиологии и криомедицины, внесут достойный вклад в выполнение решений XXVII съезда КПСС по обеспечению широкого внедрения принципиально новых технологий, позволяющих значительно повысить производительность труда, поднять эффективность использования ресурсов, способствующих значительным качественным изменениям в растениеводстве и животноводстве.

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

Поступила 11.08.86

УДК 57.043.615.9

**М. И. Шраго, В. Ф. Козлова**

## **ТОКСИКО-ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В КРИОБИОЛОГИИ**

В комплексную разработку проблемы криоконсервирования биологических объектов входят исследования их токсико-фармакологических характеристик. Последние относятся к магистральным направлениям современной криобиологии, обязательным при практическом использовании размороженных клеток и тканей в медицине, животноводстве, биологической промышленности и др. Принципиальное отличие указанных токсико-фармакологических исследований от традиционных, принятых при освоении новых медицинских препаратов, заключается в необходимости оценки степени морфологической и функциональной сохранности размороженного биологического материала с учетом влияния на него использованных криопротекторов. Этот этап исследований предпосылается последующему изучению специфического действия размороженных объектов в конкретных условиях их практического использования *in vivo*. Аналогами для сравнения по основным показателям при этом служат такие же клетки, ткани и другие структуры, не подвергавшиеся криоконсервированию. Первая стадия токсико-фармакологических исследований предполагает изучение влияния криозащитных растворов на объекты консервирования еще до воздействия холода.

Криозащитные среды (криоконсерванты) — многокомпонентные водные растворы, основной составной частью которых являются криопротекторы. Концентрация последних в среде может варьировать в значительных пределах — от 1,5—2,0 до 40 %. В настоящее время в качестве криопротекторов практическое применение получило около десяти веществ, представителей различных классов химических соединений: этиленгликоль, пропиленгликоль (1,2-пропандиол — 1,2-ПД), глицерин, диметилсульфок-

сид (ДМСО), диметилацетамид (ДМАЦ), поливинилпирролидон (ПВП), полиэтиленоксид (ПЭО), оксиэтилированный крахмал, декстран. Другие вещества, близкие по структуре и физико-химическим свойствам к вышеперечисленным, оказались токсичными при испытании в условиях биологических экспериментов и повреждали клетки еще до замораживания. В приведенном перечне (табл. 1) представлены соединения различного уровня общей токсичности, оцененной на организменном уровне. К примеру, глицерин относится к соединениям низкой токсичности, входит в состав жидкостей и тканей живых организмов, в то же время этиленгликоль и ацетамид, обладающие криопротекторной активностью при замораживании клеток, включены в рубрику «промышленные яды», а метиловый спирт — в «яды». Подчеркнем, что особенности влияния указанных веществ на изолированные клетки, ткани и органы почти не исследовались, а полученные данные необходимы при создании методов низкотемпературного хранения биологических объектов. В специальной литературе эти разработки также относят к токсико-фармакологическим [1, 2, 6, 7]. Такой подход к изучению защитных соединений в криобиологии стал общепринятым.

Хотя большинство известных в настоящее время криопротекторов является веществами с достаточно хорошо изученными химическими и биологическими свойствами, применение их по новому назначению в составе криозащитных сред обуславливает необходимость расширения объема токсико-фармакологических исследований. Синтез же новых криопротекторов требует всестороннего исследования их свойств, определения параметров токсичности, раскрытия механизма их действия на биологические системы различных уровней организации. Для практики необходимо знание токсико-фармакологических характеристик как криопротекторов, так и принятых прописей криоконсервантов, в состав которых могут входить соли (натрия, калия, магния, кальция и др.), белки (альбумин, сыворотка крови, яичный белок), биологически активные вещества, буферы и др. Следует подчеркнуть, что в настоящее время еще не выработаны общие схемы исследования токсико-фармакологических свойств криопротекторов и криоконсервантов для конкретных биологических объектов. В Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР накоплен определенный опыт изучения токсико-фармакологических характеристик криопротекторов и криозащитных сред, который позволил сформулировать некоторые принципы постановки и решения указанных задач. Этим вопросам посвящено настоящее сообщение.

Собственно токсико-фармакологические исследования начинаются после того, как в биологических экспериментах установлена криопротекторная активность вещества, пропись криоконсерванта при низкотемпературном консервировании конкретного объекта и определена область возможного его применения после восстановления из замороженного состояния (трансфузиология, трансплантология, продукты питания, обработка растений и т. п.). Рассмотрим последовательность этапов токсико-фармакологических исследований криопротекторов — медицинских препаратов для низкотемпературного консервирования клеток и тканей.

Как было отмечено выше, первый этап доклинических испытаний криопротекторов и криоконсервантов предполагает изучение их влияния на морфологические и функциональные характеристики биологических объектов *in vitro* в заданных условиях криоконсервирования (температура, продолжительность контакта до замораживания, концентрация криопротектора и других компонентов в защитной среде, особенности обработки после замораживания и т. д.) с учетом вклада отдельных компонентов и всей криозащитной среды в предполагаемую пропись. Выбор указанных параметров, обеспечивающих лучшие результаты низкотемпературного консервирования заданного биологического объекта, составляет большой объем исследований, ориентирами могут служить данные, полученные в опыте, спланированном по латинскому квадрату с учетом изменчивости двух факторов: концентрации криопротекторов (2—30 %) и скорости охлаждения.

Таблица 1

## Общая характеристика токсичности и криопротекторных свойств веществ

| Вещество                       | Молекулярная масса | Действие на организм, токсичность (ЛД <sub>50</sub> , г/кг; крысы)                                                                                              | Объект и характер криозащиты                                   | Применение в других областях медицины             |
|--------------------------------|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| Метанол                        | 32,04              | Сильный нервный и сосудистый яд с кумулятивным эффектом; ЛД <sub>50</sub> 50—60 мг/кг (мыши)                                                                    | Растительные объекты (эндоцеллюлярно)                          | —                                                 |
| Этиленгликоль                  | 62,07              | Токсичен (5,75). Повреждает клетки нервной системы, крови, почек                                                                                                | Различные клетки и ткани (эндоцеллюлярно)                      | —                                                 |
| Пропиленгликоль                | 76,09              | Низкая токсичность (28,2), включается в метаболизм                                                                                                              | Эритроциты, другие клетки (эндоцеллюлярно)                     | Растворитель лекарств, при парентеральном питании |
| Глицерин                       | 92,07              | Низкая токсичность (7,35), включается в метаболизм, в больших дозах оказывает гемолитический эффект                                                             | Различные клеточные суспензии и ткани (эндоцеллюлярно)         | Основа для лекарственных форм, осмодиуретик       |
| Диметилсульфоксид              | 78,13              | Низкая токсичность (19,07—28,3). Свободно проникает через все биологические барьеры, отмечен эмбриотоксический и тератогенный эффект                            | Различные клетки и ткани (эндоцеллюлярно)                      | Растворитель и проводник лекарств                 |
| Диметил-ацетамид               | 87,12              | Токсичен (3,56). Вызывает судороги, угнетение, галлюцинации, парезы, повреждает клетки нервной системы, крови, печени и др. Может оказать тератогенное действие | Лейкоциты и тромбоциты (эндоцеллюлярно)                        | —                                                 |
| Диметил-формамид               | 73,00              | Токсичен (4,6). Вызывает угнетение, судороги, как диметил-ацетамид                                                                                              | Лейкоциты, тромбоциты (эндоцеллюлярно)                         | —                                                 |
| Поливинилпирролидон            | 9000—25 000        | Низкая токсичность. Детоксикационное действие, концентрируется в клетках макрофагальной системы                                                                 | Клетки костного мозга, крови и др. (экзоцеллюлярно)            | Плазмозамени-<br>тель                             |
| Полиэтиленоксид                | 400; 1500          | Низкая токсичность (13,0; 12,17). Дегидратирующее и осмодиуретическое действие                                                                                  | Различные клетки и ткани (экзоцеллюлярно)                      | Основа для лекарственных форм                     |
| Оксиэтилированный глицерин     | 312; 1412          | Низкая токсичность (17,88; 7,9). Дегидратирующее и осмодиуретическое действие                                                                                   | Ядросодержащие клетки крови, эритроциты и др. (экзоцеллюлярно) | —                                                 |
| Оксиэтилированный пентаэритрит | 480                | Низкая токсичность (20,94). Дегидратирующее действие                                                                                                            | Клетки костного мозга, эритроциты и др. (экзоцеллюлярно)       | —                                                 |
| Оксиэтилированный морфолин     | 400                | Низкая токсичность (9,13)                                                                                                                                       | Культура клеток СПЭВ (экзоцеллюлярно)                          | —                                                 |
| Оксиэтилированный крахмал      | 130 000—500 000    | Низкая токсичность, отмечены гемостатические свойства                                                                                                           | Эритроциты и другие клетки (экзоцеллюлярно)                    | Плазмозамени-<br>тель                             |

В дальнейшем учитывается влияние температуры эквilibрации (37, 20, 4 °C), продолжительности контакта (5—60 мин). Практически при замораживании объектов используются наименьшие концентрации криопротекторов, обеспечивающие сохранность их в жизнеспособном состоянии при самом непродолжительном времени контакта клеток с защитной средой до воздействия холода.

Развившиеся изменения могут быть обратимыми «псевдотоксическими», исчезающими после удаления криопротектора из среды, в отличие от истинных токсических необратимых нарушений. Псевдотоксические эффекты наблюдались в различных биологических объектах (спермиях быка, сердечной мышце млекопитающих, ядродержащих клетках крови, костного мозга и др.) после контакта с глицерином, ДМСО, ПЭО. Они обусловлены взаимодействием криопротекторов с клеточными структурами и обратимым ингибированием ряда ферментов [1, 2, 7]. Одним из путей ослабления возможного повреждающего влияния криопротекторов является введение в состав криоконсерванта дополнительного защитного компонента. Например, обнаруженное угнетение ДМСО дозозависимой сократимости миокарда изолированного сердца вследствие ингибирующего влияния ацетилхолинэстеразы удается устранить путем включения в криоконсервант атропина [7], агрегацию эритроцитов в среде ПЭО-1500 удается ослабить за счет добавок лимоннокислого натра и холина хлорида [3].

В итоге проведенных экспериментов с ПЭО были получены высокие показатели морфологической и функциональной сохранности ядродержащих клеток крови, костного мозга, кожи, роговой оболочки глаза после низкотемпературного консервирования [1]. Была установлена зависимость показателей токсичности от химической структуры и молекулярной массы веществ. Эти закономерности удалось выявить при исследовании соединений одного гомологичного ряда и веществ, отличающихся определенными функциональными группами, например, продуктов направленного синтеза оксиэтилированием многоатомных спиртов этиленгликоля, глицерина, пентаэритрита, обладающих свойствами экзоцеллюлярных криопротекторов с низкой токсичностью [1, 2, 6]. Так, оксиэтилирование этиленгликоля, свободно проникающего в клетки и обладающего высокой криопротекторной активностью, но токсичностью для животных, позволило получить гомологичный ряд малотоксичных полиэтиленоксидов (ПЭО) со степенью полимеризации от 2 до 90 и молекулярной массой от 100 до 4000, обеспечивающих криозащиту биологических систем. Лучшие результаты при замораживании ядродержащих клеток крови, костного мозга и некоторых тканей получены при применении сред, содержащих ПЭО-400 (10—20 %), при низкотемпературном консервировании эритроцитов — ПЭО-1500 (15—30 %). С повышением молекулярной массы токсичность веществ увеличивалась. Растворы ПЭО-4000, ПЭО-6000 в этих же концентрациях оказали явное повреждающее действие на клетки [1, 6]. Подобная зависимость криозащитного и токсического эффектов от молекулярной массы для различных объектов определена в гомологичных рядах оксиэтилированного глицерина (ОЭГ) и оксиэтилированного пентаэритрита (ОЭП) [1, 2].

Оксиэтильные производные многоатомных спиртов (ОПМС), которые могут найти применение при криоконсервировании клеток, явились предметом токсико-фармакологических исследований на втором этапе доклинических испытаний, предполагающем изучение токсических и фармакологических характеристик веществ при введении в организм подопытных животных. С помощью комплекса морфологических, физиологических, биохимических, радиоавтографических, морфометрических и других методов исследования в опытах на белых крысах и мышах, морских свинках, кроликах и кошках при парентеральном введении ОПМС определены показатели острой и хронической токсичности, смертельные и практически безвредные дозы ПЭО, ОЭГ, ОЭП (табл. 1), изучено их влияние на структуру и функцию печени, почек, сердечно-сосудистой системы и органов дыхания, на состав периферической крови, свертывающую систему и другие жизнен-

но важные органы. Показано отсутствие кумулятивного, раздражающего, пирогенного, алергизирующего, эмбриотоксического и тератогенного действия веществ, а также видовой чувствительности животных к криопротекторам [1, 2, 5, 6]. Установлено, что ОПМС относятся к классу малотоксичных веществ (табл. 1), в основе механизма действия которых лежат дегидратирующие и осмотические свойства. В зависимости от применяемой дозы вещества вызывают в различной степени выраженные изменения морфо-функционального состояния жизненно важных органов, особенно печени и почек, а также перераспределение воды в организме с увеличением внутрисосудистой и уменьшением внутриклеточных фаз, обезвоживание тканей и усиленное выведение жидкости почками. В связи с выявленными свойствами представляет научный интерес изучение данной группы соединений в качестве дегидратантов и осмодиуретиков.

Важно отметить также у подопытных животных развитие неспецифической реакции адаптации организма на вводимые ОПМС: от стресс-реакции (в летальных и сублетальных дозах) до реакции активации и тренировки (в средних и малых дозах). В малых дозах ( $1/20$ ,  $1/30$  ЛД<sub>50</sub>) и низких концентрациях (15, 10,5 %) вещества при многократном продолжительном введении в организм не вызывали нарушения структуры и функции печени, почек, сердца, легких, селезенки, надпочечников, головного и костного мозга, желудка и кишечника, а также общего статуса животных, в связи с чем могут считаться практически безвредными, допустимыми для парентерального введения с размороженной взвесью клеток, и служить ориентиром для определения объемов клеточных суспензий на этапе клинических испытаний криопротекторов. Таким образом была обоснована допустимая доза ПЭО-400 для парентерального введения: от 0,5 до 1,0 г/кг массы в виде 15 %-ного раствора, что составляет  $1/20$  ЛД<sub>50</sub>. Аналогичные приемы использовались при установлении допустимых доз ПЭО-1500 для внутривенного введения: до 0,6 г/кг массы в 15 %-ной концентрации, что составляет  $1/20$ — $1/30$  ЛД<sub>50</sub> [1, 6].

Третий этап токсико-фармакологических исследований предполагает изучение эффективности размороженных клеток и тканей при переливании (эритроцитов, тромбоцитов, клеток костного мозга) и пересадке тканей. При этом учитывается количество криопротектора в размороженной суспензии клеток или тканях, возможность переноса их без дополнительной обработки в организм реципиента либо необходимость предварительного максимального удаления защитной среды. В последнем случае в биологическом материале присутствует лишь остаточное количество криопротектора. Ориентиром при этом оказывается градиент между осмотическим давлением криозащитной среды и внутренней среды организма, которая может вызвать необратимые повреждения клеток. Так, при изучении токсико-фармакологических характеристик ПЭО-400, криопротектора для костного мозга, исходили из того, что вещество может вводиться в организм реципиента парентерально в составе размороженной клеточной взвеси. Одноразовая доза препарата в среднем составляет 30 г при переливании 400 мл клеточной суспензии.

Целесообразность принятой последовательности этапов доклинического изучения токсико-фармакологических свойств криопротекторов подтверждена нами при исследовании пропиленгликоля (1,2-пропандиола — 1,2-ПД), входящего в состав криоконсерванта для эритроцитов. В связи с низкой токсичностью и особенностями фармакологического действия 1,2-ПД можно отнести к перспективным криопротекторам (табл. 1). Концентрационный эффект токсичности, установленный при парентеральном введении препарата, позволяет рекомендовать использование эритроцитарной взвеси для клинических целей с остаточным количеством 1,2-ПД не более 1,5—2,0 % при допустимой дозе  $1/20$  ЛД<sub>50</sub> (0,6—0,9 г/кг) в 5 %-ном растворе [4].

Заключительным этапом токсико-фармакологических исследований медицинских препаратов, рекомендуемых в качестве криопротекторов, являются клинические испытания (при соответствующем разрешении Фарма-

кологического комитета МЗ СССР) и последующее их практическое применение. Определенный научный интерес могут представлять данные каждого этапа исследований криопротекторов.

В связи с расширением области использования криопротекторов в различных отраслях народного хозяйства, в частности в сельском хозяйстве для повышения морозостойкости различных растений, в биотехнологии и т. п., возникает необходимость исследования изучаемых веществ на окружающую среду, биоценозы. Эти вопросы заслуживают специальной разработки.

Таким образом, многосторонние комплексные исследования криопротекторов с учетом перспективы их практического применения должны проводиться на различных уровнях организации: изолированного биологического объекта, организма и окружающей среды. Рассмотренные этапы исследований представлены в табл. 2.

Таблица 2

Общая схема исследований токсико-фармакологических свойств криопротекторов и криоконсервантов

| Этап            | Содержание                                                                                                                                                                                                                                        |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Предварительный | Установление криопротекторной активности вещества на биологическом объекте и области использования (клиническая медицина, животноводство, растениеводство, лабораторная техника, биотехнология, пищевая промышленность, сельское хозяйство и др.) |
| I               | Выяснение действия препарата на морфологические и функциональные характеристики объектов <i>in vitro</i> во время эквilibрации до замораживания                                                                                                   |
| II              | Исследование степени сохранности размороженного материала с учетом возможного содержания в нем криопротектора                                                                                                                                     |
| III             | Установление показателей общей токсичности (ЛД <sub>50</sub> ): определение органов-мишеней при введении веществ <i>in vivo</i>                                                                                                                   |
| IV              | Обоснование допустимых и практически безвредных доз при клиническом применении криопротектора; изучение эффектов действия веществ на реципиента, среду и т. д.                                                                                    |
| V               | Выяснение сопутствующих эффектов действия препаратов (лечебных, технических и др.)                                                                                                                                                                |

1. Актуальные проблемы криобиологии / Под общ. ред. Н. С. Пушкаря и А. М. Белоуса. — Киев : Наук. думка, 1981. — 608 с.
2. Белоус А. М., Шраго М. И., Пушкарь Н. С. Криоконсерванты. — Киев : Наук. думка, 1979. — 198 с.
3. Бредихина Л. П. Функциональная сохранность эритроцитов при низкотемпературном консервировании в растворах полиэтиленоксида : Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Харьков, 1983. — 17 с.
4. Гучок В. М., Козлова В. Ф., Карташов В. Ф. и др. О токсичности криопротектора 1,2-пропандиола // Тез. докл. II Всесоюз. конф. по теорет. и прикл. вопр. криобиологии. — Харьков : Б. и., 1984. — С. 26.
5. Карташов В. Ф. Влияние криопротекторов ряда полиэтиленоксидов на эмбриогенез белых крыс: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Харьков, 1984. — 23 с.
6. Пушкарь Н. С., Шраго М. И., Белоус А. М., Калугин Ю. В. Криопротекторы. — Киев : Наук. думка, 1978. — 204 с.
7. Organ preservation for transplantation / Ed. A. M. Karow, D. E. Pegg. — New York, Basel : Marcel Dekker, Inc., 1981. — 705 p.

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

Поступила 17.06.86

А. Н. Гольцев, А. А. Цуцаева, Т. Г. Дубрава

## СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ КРИОУСТОЙЧИВОСТИ КОЕ<sub>c</sub> И КОЕ<sub>к</sub>, НАХОДЯЩИХСЯ В РАЗЛИЧНОМ ФУНКЦИОНАЛЬНОМ СОСТОЯНИИ

Данные литературы свидетельствуют о том, что при различных условиях криоконсервирования клеток костного мозга (КМ) погибает от 10 до 45 % кроветворных клеток разного уровня дифференциации. Основной причиной их гибели является развитие летальных повреждений, вызванных действием физико-химических факторов на различных этапах криоконсервирования [3]. Однако остается неясным, какова степень влияния этих факторов на кроветворные клетки в зависимости от их исходного состояния и уровня дифференциации. Известно, например, что кроветворные клетки по мере дифференциации или же при переходе из состояния покоя в клеточный цикл приобретают новые качественные и количественные характеристики, свидетельствующие об изменении их физико-химических, метаболических свойств, а также функциональной активности [2]. Не исключено, что отмеченные изменения могут влиять на устойчивость клеток к действию внешних факторов, в том числе к криоконсервированию. Высказывается мнение, что кроветворные клетки, находящиеся вне клеточного цикла, более устойчивы к действию замораживания [8], хотя экспериментального подтверждения данного факта нет. Выяснение возможных причин гибели кроветворных клеток под влиянием криоконсервирования, различной их криоустойчивости, является важной теоретической и практической задачей криобиологии.

Целью данного исследования было изучение влияния низкотемпературного консервирования ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) на сохранность кроветворных клеток КМ разного уровня дифференциации (КОЕ<sub>c</sub> и КОЕ<sub>к</sub>) в зависимости от исходного функционального состояния (покой или S-период клеточного цикла).

Донорами и реципиентами КМ были мыши (CBA  $\times$  C57Bl)F<sub>1</sub> в возрасте от 8 до 12 недель. Элиминацию КОЕ<sub>c</sub> и КОЕ<sub>к</sub>, находящихся в S-периоде клеточного цикла, осуществляли с помощью оксимочевина (ОМ) или <sup>3</sup>H-тимидина [1]. Количество КОЕ<sub>c</sub> в суспензии миелокариоцитов до и после обработки ОМ или <sup>3</sup>H-тимидином определяли по методу Till и McCulloch [9] на 8—9 сут при трансплантации нативных миелокариоцитов и на 11 сут — криоконсервированных. Сохранность и пролиферативный статус КОЕ<sub>к</sub> определяли при культивировании КМ в полужидком агаре (0,3 %) [4]. КМ консервировали при  $-196^{\circ}\text{C}$  в полиэтиленовых ампулах объемом 2 мл под защитой криопротектора полиэтиленоксида с молекулярной массой 400 (ПЭО-400), не требующего удаления из суспензии перед введением в организм [3]. В дополнительной серии экспериментов был изучен характер изменений клеточного состава суспензии миелокариоцитов после инкубирования при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 30 мин и 1,5 ч (содержание ядерных элементов, сохранность по окрашиванию трипановым синим, количество мононуклеаров), а также интенсивность биосинтетических процессов в клетках. Полученные данные статистически обработаны; достоверность различий оценивали с помощью *t*-критерия с 5 %-ным уровнем значимости.

Установлено, что после обработки суспензии КМ *in vitro* ОМ или <sup>3</sup>H-тимидином содержание КОЕ<sub>c</sub> снижается на 13—17 %; аналогичные результаты получены и при однократной двухчасовой обработке доноров КМ ОМ (ОМ-2), что согласуется с имеющимися данными о количественном содержании КОЕ<sub>c</sub> в S-периоде клеточного цикла [5, 6]. В то же время в суспензии миелокариоцитов, полученных от доноров через 9 ч после введения ОМ (ОМ-9), содержалось в два раза больше КОЕ<sub>c</sub> (36,2 %), находящихся в S-периоде цикла (табл. 1).

После криоконсервирования количество КОЕ<sub>c</sub> в КМ достоверно снижалось по сравнению с их содержанием в нативном миелотрансплантате

Таблица 1

Влияние криоконсервирования на сохранность КОЕ<sub>с</sub> костного мозга, обработанного *in vitro* оксимочевинной (ОМ)

| Группа | Трансплантируемый костный мозг | Время обработки ОМ, ч | Количество колоний в селезенке |     | Изменение содержания колоний в сравнении с соответствующей группой, % |
|--------|--------------------------------|-----------------------|--------------------------------|-----|-----------------------------------------------------------------------|
|        |                                |                       | X                              | ±Sx |                                                                       |
| I      | Нативный                       | —                     | 15,2                           | 1,1 | —                                                                     |
| II     | »                              | 2                     | 12,9                           | 1,1 | на 15,1, с I                                                          |
| III    | »                              | 9                     | 16,3                           | 1,9 | на 7,2, с I                                                           |
| IV     | »                              | 9 + 2                 | 10,4                           | 1,2 | на 36,2 *, с III                                                      |
| V      | Криоконсервированный           | —                     | 9,8                            | 0,8 | на 35,5 *, с I                                                        |
| VI     | »                              | 2                     | 7,9                            | 0,4 | на 38,2 *, со II                                                      |
| VII    | »                              | 9                     | 9,2                            | 0,8 | на 42,8 *, с III                                                      |
| VIII   | »                              | 9 + 2                 | 6,4                            | 0,9 | на 39,5 *, с IV                                                       |

Примечание. \* Сравнимые результаты имеют достоверные различия.

(контроль), однако независимо от концентрации КОЕ<sub>с</sub> в S-периоде в различных суспензиях (интактный КМ; КМ, полученный от доноров через 2,9 ч или после двукратного введения ОМ (ОМ-9 + 2), количество колоний было соизмеримо с таковым при криоконсервировании интактного КМ. Подобное отмечалось и при криоконсервировании КМ, обработанного *in vitro* <sup>3</sup>H-тимидином (табл. 2). Иной характер изменения содержания

Таблица 2

Влияние криоконсервирования на сохранность КОЕ<sub>с</sub> костного мозга, обработанного *in vitro* <sup>3</sup>H-тимидином

| Группа | Трансплантируемый костный мозг                                                  | Количество колоний в селезенке |     | Изменение содержания колоний в сравнении с соответствующей группой, % |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|-----|-----------------------------------------------------------------------|
|        |                                                                                 | X                              | ±Sx |                                                                       |
| I      | Нативный                                                                        | 15,8                           | 1,2 | —                                                                     |
| II     | Нативный, инкубированный без <sup>3</sup> H-тимидина **                         | 14,9                           | 1,5 | на 1,3, с I                                                           |
| III    | Нативный, инкубированный с <sup>3</sup> H-тимидином                             | 13,1                           | 0,9 | на 17,1, с I                                                          |
| IV     | Криоконсервированный                                                            | 10,8                           | 0,9 | на 31,7 *, с I                                                        |
| V      | Криоконсервированный, предварительно инкубированный без <sup>3</sup> H-тимидина | 9,4                            | 1,0 | на 37,0 *, со II                                                      |
| VI     | Криоконсервированный, предварительно инкубированный с <sup>3</sup> H-тимидином  | 8,4                            | 0,7 | на 35,9 *, с III                                                      |

Примечание. \* Сравнимые результаты имеют достоверные различия; \*\* костный мозг инкубировали в течение 30 мин при температуре 37 °С.

КОЕ<sub>с</sub> наблюдался при криоконсервировании КМ, обработанного *in vitro* ОМ: содержание КОЕ<sub>с</sub> в суспензии миелокариоцитов резко снижалось (на 82,1 %). Выраженное снижение количества колоний в селезенках реципиентов данной группы нельзя объяснить отрицательным влиянием ОМ на КОЕ<sub>с</sub>, так как подобное явление имело место и после температурной обработки суспензии без препарата (снижение на 79,6 %). Не обусловлено такое снижение и гибелью части КОЕ<sub>с</sub> при экспонировании суспензии в указанном режиме, так как колониеобразующая способность такого КМ была даже выше контрольного значения (на 19,7 %). Таким образом, криочувствительность КОЕ<sub>с</sub> не зависит значительно от исходного состояния клеток (покой или S-период клеточного цикла) и существенно повышается после 1,5 ч температурной обработки (37 °С) суспензии КМ *in vitro*. Кроме того, созда-

ется впечатление, что криочувствительность сохранных КОЕ<sub>с</sub> повышается под влиянием ОМ и зависит от схемы ее применения *in vivo*: при пролонгации времени контакта КМ с препаратом данный эффект усиливается.

Для того, чтобы определить, являются ли отмеченные факты особенностью, присущей лишь данной популяции клеток (КОЕ<sub>с</sub>), или же они характерны и для других кроветворных клеток, была проведена оценка сохранности и функциональных свойств коммитированных кроветворных клеток (КОЕ<sub>к</sub>). При культивировании КМ интактных доноров максимальное количество клеточных структур формировалось на 7 сут; к 14 сут их количество снижалось на 10—15 % (табл. 3). Максимальное количество структур

Таблица 3  
Влияние криоконсервирования на сохранность КОЕ<sub>к</sub> костного мозга, обработанного *in vivo* оксимочевинной (ОМ)

| Группа | Культивируемый костный мозг | Предварительная обработка ОМ, ч | Количество клеточных структур, абсолютные единицы |                |                        |                | Изменение содержания клеточных структур в сравнении с соответствующей группой, % |
|--------|-----------------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------|----------------|------------------------|----------------|----------------------------------------------------------------------------------|
|        |                             |                                 | 7 сут культивирования                             |                | 14 сут культивирования |                |                                                                                  |
|        |                             |                                 | X                                                 | $\pm S\bar{x}$ | X                      | $\pm S\bar{x}$ |                                                                                  |
| I      | Нативный                    | —                               | 136,8                                             | 7,0            | 120,1                  | 7,8            | —                                                                                |
| II     | »                           | 2                               | 68,3                                              | 4,2            | 86,8                   | 9,1            | на 36,6 *, с I                                                                   |
| III    | »                           | 9                               | 51,0                                              | 6,3            | 72,4                   | 5,2            | на 48,1 *, с I                                                                   |
| IV     | »                           | 9 + 2                           | 27,4                                              | 3,6            | 60,8                   | 4,2            | на 16,0, с III                                                                   |
| V      | Криоконсервированный        | —                               | 77,7                                              | 6,0            | 94,2                   | 7,1            | на 31,2 *, с I                                                                   |
| VI     | »                           | 2                               | 45,6                                              | 4,3            | 58,8                   | 4,9            | на 32,3 *, со I                                                                  |
| VII    | »                           | 9                               | 30,6                                              | 2,9            | 42,9                   | 6,4            | на 40,7 *, с II                                                                  |

Примечание. \* Сравнимые результаты имеют достоверные различия (сравнивались только те показатели, которые имели максимальные значения на этапах культивирования).

при культивировании КМ доноров, обработанных ОМ, независимо от схемы применения препарата, определялось на 14 сут. Это свидетельствует, по-видимому, об ингибирующем влиянии ОМ на пролиферативную активность КОЕ<sub>к</sub>, находящихся не в S-периоде цикла, что было ранее отмечено [10]. Степень ингибирующего влияния ОМ зависела от схемы применения препарата. Так, при культивировании КМ, полученного через 2 ч после однократного введения ОМ, количество структур на 7 сут было в  $1,3 \pm 0,06$  раза меньше максимального («индекс ингибиции» —  $1,3 \pm 0,06$ ). При увеличении времени обработки доноров КМ до 9 ч «индекс ингибиции» возрастал до  $1,4 \pm 0,04$ . Еще более выраженный эффект ингибиции пролиферации КОЕ<sub>к</sub> наблюдался при двукратной обработке доноров ОМ; в данном случае «индекс ингибиции» увеличивался до  $2,2 \pm 0,08$ .

Интересно отметить, что на 7 сут культивирования КМ, полученного через 2 ч после однократного введения ОМ, отмечалось 50 %-ное снижение количества клеточных структур в сравнении с контролем, что согласуется с результатами других исследований количественного содержания КОЕ<sub>к</sub>, находящихся в S-периоде клеточного цикла [6]. Однако в дальнейшем количество структур продолжало увеличиваться и к 14 сут эти различия составляли 36,6 %, что, очевидно, свидетельствует о таком содержании в интактном КМ КОЕ<sub>к</sub> в S-периоде.

Количество клеточных структур, формируемых КМ, полученным через 9 ч после однократного введения ОМ, было также достоверно меньшим, чем при культивировании необработанного КМ, в котором КОЕ<sub>к</sub> в S-периоде содержалось только 16,0 % (табл. 3). Обращает на себя внимание тот факт, что содержание КОЕ<sub>с</sub> к этому времени было на уровне нормы, а количество клеток в S-периоде даже в два раза больше нормы. Известно,

что ОМ обладает свойством «стимулировать» вхождение покоящихся колониобразующих клеток в клеточный цикл и уже через 8—12 ч после ее введения число КОЕ<sub>с</sub> в S-периоде превосходит их содержание в интактном КМ [6], причем общее число КОЕ<sub>с</sub> в этот период может быть снижено или оставаться на уровне нормы. Следовательно, полученные нами результаты о состоянии популяции КОЕ<sub>с</sub> через 9 ч после введения ОМ полностью подтверждают приведенные данные. Пролиферативный статус КОЕ<sub>к</sub> в данной ситуации существенно отличается от КОЕ<sub>с</sub>. После элиминации КОЕ<sub>к</sub>, находящихся в S-периоде, данная популяция клеток к 9—10 ч ни по количеству ( $72,4 \pm 5,2$  структур), ни по степени пролиферативной активности (16,0 % клеток в S-периоде) не достигла исходного уровня. Выход КОЕ<sub>к</sub> из этого состояния, очевидно, запаздывает во времени по сравнению с КОЕ<sub>с</sub>.

В процессе низкотемпературного консервирования интактного КМ отмечается гибель 31,2 % КОЕ<sub>к</sub>, что соизмеримо с гибелью КОЕ<sub>с</sub> в аналогичной ситуации. Максимальное число клеточных структур определялось на 14 сут, «индекс ингибиции» составлял  $1,2 \pm 0,07$ . Такое же количество КОЕ<sub>к</sub> погибало при криоконсервировании КМ, полученного через 2 ч после введения ОМ, «индекс ингибиции» —  $1,3 \pm 0,06$ . Достоверное снижение сохранности КОЕ<sub>к</sub> отмечалось после криоконсервирования КМ, полученного через 9 ч после введения ОМ (гибель 40,7 % КОЕ<sub>к</sub>); в данном случае отмечалась и более выраженная ингибиция роста структур, «индекс ингибиции» составлял  $1,4 \pm 0,05$ . Установлено, что снижение сохранности кроветворных клеток после криоконсервирования КМ не связано с изменением содержания во всей популяции КОЕ<sub>к</sub>, находящихся в S-периоде. Похоже, что, как и для КОЕ<sub>с</sub>, повышение криочувствительности КОЕ<sub>к</sub> обусловлено пролонгированием времени контакта КМ с ОМ.

При культивировании КМ, обработанного ОМ *in vitro*, ингибиции процессов пролиферации КОЕ<sub>к</sub> не наблюдалось, в результате максимальное число клеточных структур формировалось на 7 сут. Это свидетельствует, очевидно, как о различных механизмах влияния ОМ на пролиферацию КОЕ<sub>к</sub> при применении *in vivo* и *in vitro*, так и о временной зависимости проявления этого эффекта: в системе *in vitro* КМ подвергался воздействию ОМ в течение 1,5 ч, тогда как при обработке мышей-доноров КМ кроветворные клетки контактировали с препаратом более длительное время. Процент снижения количества клеточных структур после обработки суспензии ОМ *in vitro* составлял 31,0 % (табл. 4), что сопоставимо с аналогичными результатами, полученными в экспериментах *in vivo*. Несколько больший процент гибели КОЕ<sub>к</sub> отмечен после 30 мин обработки суспензии миелокарисцитов <sup>3</sup>H-тимидином (табл. 5), это согласуется с данными других авторов [7]. После обработки КМ ОМ при 37 °С в течение 1,5 ч криочувствительность КОЕ<sub>к</sub> значительно повышалась, причем такое повышение не обусловлено действием препарата на КОЕ<sub>к</sub>: при криоконсервировании КМ, экспонированного при тех же условиях без препарата, наблюдался подобный эффект (табл. 4). Это соответствует данным, свидетельствующим о повышении криочувствительности КОЕ<sub>с</sub> после аналогичной обработки КМ. Криочувствительность коммитированных клеток-предшественников после 1,5 ч обработки при 37 °С повышается в меньшей степени, чем КОЕ<sub>с</sub>, что составляет соответственно 49—51 и 79—82 %. После криоконсервирования КМ, экспонированного в течение 30 мин при 37 °С с <sup>3</sup>H-тимидином или без него, достоверного снижения количества КОЕ<sub>с</sub> и КОЕ<sub>к</sub> в сравнении с криоконсервированным интактным костным мозгом не наблюдалось (табл. 2,5). Следовательно, повышение криочувствительности КОЕ<sub>с</sub> и КОЕ<sub>к</sub> после обработки при 37 °С зависит от времени контакта клеток с препаратами. Причины изменения криочувствительности кроветворных клеток после экспонирования суспензии при 37 °С в течение 1,5 ч могут быть связаны с изменением состояния липидов и белков клеточной мембраны и со снижением адаптационной способности клеток к отрицательному действию факторов криоконсервирования. Последнее может быть обусловлено экспонированием клеток в «нефизиологических» условиях на этапах их подготовки к криоконсервированию.

Таблица 4

Влияние криоконсервирования на сохранность КОЕ<sub>к</sub> костного мозга, обработанного *in vitro* оксимочевиной (ОМ)

| Группа | Культивируемый костный мозг                                | Количество клеточных структур, абсолютные единицы |                |                        |                | Изменение содержания клеточных структур в сравнении с соответствующей группой, % |
|--------|------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|----------------|------------------------|----------------|----------------------------------------------------------------------------------|
|        |                                                            | 7 сут культивирования                             |                | 14 сут культивирования |                |                                                                                  |
|        |                                                            | X                                                 | $\pm S\bar{x}$ | X                      | $\pm S\bar{x}$ |                                                                                  |
| I      | Нативный                                                   | 252,2                                             | 10,3           | 214,4                  | 19,3           | —                                                                                |
| II     | Инкубированный без ОМ **                                   | 292,2                                             | 20,7           | 213,3                  | 19,1           | на 15,9, с I                                                                     |
| III    | Инкубированный с ОМ                                        | 201,8                                             | 9,0            | 114,7                  | 10,5           | на 31,0*, со II                                                                  |
| IV     | Криоконсервированный                                       | 134,1                                             | 12,4           | 161,7                  | 13,3           | на 35,9 *, с I                                                                   |
| V      | Криоконсервированный, предварительно инкубированный без ОМ | 85,5                                              | 6,5            | 149,0                  | 12,7           | на 49,1 *, со II                                                                 |
| VI     | Криоконсервированный, предварительно инкубированный с ОМ   | 78,2                                              | 6,7            | 97,6                   | 8,5            | на 51,6 *, с III                                                                 |

Примечание. \* Сравнимые результаты имеют достоверные различия (сравнивались только те показатели, которые имели максимальные значения на этапах культивирования); \*\* костный мозг инкубировали в течение 1,5 ч при температуре 37 °С.

Таблица 5

Влияние криоконсервирования на сохранность КОЕ<sub>к</sub> костного мозга, обработанного *in vitro* <sup>3</sup>H-тимидином

| Группа | Культивируемый костный мозг                                                    | Количество клеточных структур, абсолютные единицы |                |                        |                | Изменение содержания клеточных структур в сравнении с соответствующей группой, % |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|----------------|------------------------|----------------|----------------------------------------------------------------------------------|
|        |                                                                                | 7 сут культивирования                             |                | 14 сут культивирования |                |                                                                                  |
|        |                                                                                | X                                                 | $\pm S\bar{x}$ | X                      | $\pm S\bar{x}$ |                                                                                  |
| I      | Нативный                                                                       | 155,0                                             | 13,6           | 126,2                  | 10,4           | —                                                                                |
| II     | Инкубированный без $^3\text{H}$ -тимидина **                                   | 175,2                                             | 15,8           | 103,6                  | 8,8            | на 13,2, с I,                                                                    |
| III    | Инкубированный с $^3\text{H}$ -тимидином                                       | 96,9                                              | 8,2            | 48,6                   | 5,1            | на 44,6 *, со II                                                                 |
| IV     | Криоконсервированный                                                           | 94,8                                              | 7,9            | 112,8                  | 10,4           | на 37,5 *, с I                                                                   |
| V      | Криоконсервированный, предварительно инкубированный без $^3\text{H}$ -тимидина | 51,0                                              | 4,6            | 107,4                  | 10,8           | на 41,1 *, со II                                                                 |
| VI     | Криоконсервированный, предварительно инкубированный с $^3\text{H}$ -тимидином  | 40,2                                              | 4,2            | 58,8                   | 4,2            | на 39,1 *, с III                                                                 |

Примечание. \* Сравнимые результаты имеют достоверные различия (сравнивались только те показатели, которые имели максимальные значения на этапах культивирования); \*\* костный мозг инкубировали в течение 30 мин при температуре 37 °С.

В качестве компенсаторной реакции на неблагоприятные условия можно рассматривать выраженное повышение синтеза РНК и белка в миелокариocyтах (табл. 6). После термостатирования и выдерживания суспензии при комнатной температуре отмечается резкий спад интенсивности течения указанных реакций, что, по-видимому, можно рассматривать как состояние,

Таблица 6

Интенсивность синтеза ДНК, РНК, белка в клетках костного мозга,  
имп/мин/мг белка

| Синтез | Костный мозг |                |                                    |                |                                                         |                |
|--------|--------------|----------------|------------------------------------|----------------|---------------------------------------------------------|----------------|
|        | интактный    |                | экспонированный<br>1,5 ч при 37 °С |                | экспонированный 1,5 ч<br>при 37 °С + 1,5 ч<br>при 20 °С |                |
|        | X            | $\pm S\bar{x}$ | X                                  | $\pm S\bar{x}$ | X                                                       | $\pm S\bar{x}$ |
| ДНК    | 325 804      | 30 080         | 257 277                            | 19 640         | 41 769 *                                                | 5963           |
| РНК    | 99 649       | 7638           | 161 921 *                          | 18 296         | 24 605 *                                                | 2017           |
| Белка  | 38 224       | 3970           | 61 970 *                           | 6347           | 21 235 *                                                | 2479           |

Примечание. Костный мозг инкубировали в концентрации  $5 \cdot 10^6$  кл/мл; \* достоверные различия в сравнении с интактным костным мозгом.

обусловленные быстрым истощением энергетических ресурсов клеток в условиях активации их метаболизма. Следует при этом отметить ещё раз, что степень развития отмеченных изменений определяется временными параметрами, о чем свидетельствуют данные, полученные через 30 мин и 1,5 ч экспозиции суспензии. Состояние, развивающееся через 1,5 ч обработки, еще не является само по себе губительным для кроветворных клеток, а их способность формировать колонии не отличается от интактных клеток. Тем не менее переход в это состояние уже является пусковым моментом для реализации повреждающего действия физико-химических факторов, приводящих к гибели кроветворных клеток.

Таким образом, полученные данные позволяют сделать следующие выводы. В процессе криоконсервирования КМ кроветворные клетки разного уровня дифференциации ( $\text{КОЕ}_c$  и  $\text{КОЕ}_k$ ) подвергаются воздействию физико-химических факторов, что обуславливает гибель некоторой их части. Содержание кроветворных клеток в процессе криоконсервирования снижается в равной степени независимо от их концентрации в S-периоде клеточного цикла. Обработка доноров КМ ОМ оказывает ингибирующее влияние на пролиферативную активность сохранных  $\text{КОЕ}_k$ ; степень ингибиции обусловлена схемой применения препарата. Увеличение времени контакта кроветворных клеток с ОМ повышает криочувствительность  $\text{КОЕ}_c$  и  $\text{КОЕ}_k$ . Криочувствительность кроветворных клеток также повышается после их экспонирования при 37 °С в течение 1,5 ч, однако, для  $\text{КОЕ}_k$  это повышение менее выражено, чем для  $\text{КОЕ}_c$ .

1. Гольцев А. Н., Цуцаева А. А., Дубрава Т. Г., Останкова Л. В. Функциональная активность  $\text{КОЕ}_c$  консервированного костного мозга, обработанного оксимочевой и  $^3\text{H}$ -тимидином // Криобиология.— 1985.— № 3.— С. 38—43.
2. Козлов В. А., Журавкин И. Н., Цирлова И. Г. Стволовая клетка и иммунный ответ.— Новосибирск : Наука, 1982.— 221 с.
3. Криоконсервирование клеточных суспензий // Под ред. А. А. Цуцаевой.— Киев : Наук. думка, 1983.— 240 с.
4. Цуцаева А. А., Останкова Л. В., Дроздова О. А., Гольцев А. Н. Клеточные структуры, формируемые при культивировании костного мозга в агаре // Цитология.— 1980.— 22, № 10.— С. 1220—1225.
5. Benestad H. B., Warhus K., Roikvam A. Hydroxyurea (HU) in experimental hematology. I. Characterization of *in vitro* and *in vivo* effects on progenitor and transit cells/ Exp. Hematol.— 1977.— 5, N 4.— P. 408—414.
6. Hasthorpe S., Hodgson G. Haematopoietic recovery in spleen and marrow after transplantation of bone marrow from either normal or hydroxyurea treated mice // *Ibid.*— 1977.— 5, N 5.— P. 348—356.
7. Lord B., Cercek L., Cercek B. Inhibitors of hematopoietic cell proliferation: specificity of action within the haematopoietic system // Brit. J. Cancer.— 1974.— 29, N 2.— P. 168—176.
8. Rubinshtein A. S., Trobaugh E. E. Ultrastructure of presumptive hematopoietic stem cells // Blood.— 1973.— 42, N 1.— P. 61—80.
9. Till S., McCulloch E. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells // Rad. Res.— 1961.— 14, N 12.— P. 231—233.

10. Warthington D., Nachtwey D., Wagenaar E. Hydroxyurea : morphological effects on the macromolecules of *Tetrahymena* // Exp. Cell. Res.— 1975.— 92, N 5.— P. 435—443.

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

Поступила 04.04.86

УДК 612.014.9:534.121.2

**А. К. Гулевский, О. И. Михалев, В. В. Рязанцев,  
А. В. Зинченко, В. Я. Волков**

## **О ФИЗИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ И КРИОЗАЩИТНЫХ СВОЙСТВАХ РАСТВОРОВ ХОЛИНХЛОРИДА**

Используемые в настоящее время такие криозащитные вещества, как глицерин, диметилсульфоксид, полиэтиленгликоль, имеют существенные недостатки, среди которых на первый план выступают осмотическая активность и мембранотропный эффект [6,8]. Поэтому одним из актуальных направлений современной криобиологии является поиск новых криопротекторов. Исследования последних лет показали, что криозащитные свойства веществ во многом обусловлены их способностью связывать воду и изменять структуру растворов таким образом, что они замерзают в аморфном состоянии [5]. Это препятствует избыточной дегидратации, которая является одним из важнейших факторов криоповреждения клеточных мембран [1]. Анализ структурной формулы молекулы холинхлорида позволил предположить, что благодаря наличию заряженной группировки и гидроксильной группы это вещество способно связывать воду и обладает описанными выше физико-химическими свойствами криопротектора.

В настоящей работе в диапазоне температур 77—273 К исследовали гидратацию и фазовые переходы в растворах холинхлорида, его криозащитные свойства в отношении мембран эритроцитов и саркоплазматического ретикулума.

В опытах использовали холинхлорид фирмы Calbiochem, *трис*-гидроксиметиламинометан фирмы Serva,  $^{14}\text{C}$ -сахарозу (уд. акт. 340 мКи/мМ, производство ЧССР). Остальные реактивы отечественного производства марки «х. ч.». Исследование фазовых переходов и физических состояний водных растворов холинхлорида проводили методами дифференциальной сканирующей калориметрии, ЯМР и ЭПР. Калориметрические измерения выполнялись на приборе, построенном на базе разработанного ранее устройства [4], снабженного системой программного изменения температуры. Использовали два режима охлаждения: быстрое (со скоростью 16 К/с) и медленное (со скоростью  $3,3 \cdot 10^{-3}$  К/с). Охлажденные от комнатной температуры до 77 К образцы помещали в предварительно охлажденный калориметрический блок и снимали температурные зависимости теплопоглощения в процессе нагрева со скоростью  $6,7 \cdot 10^{-3}$  К/с. Количество жидкой фазы в образцах регистрировали импульсным методом ЯМР по амплитуде спада свободной индукции протонов после  $90^\circ$  импульса на частоте резонанса 90 МГц. Для повышения отношения сигнал/шум использовали стократное накопление сигналов. Замораживание образцов в этих экспериментах осуществляли непосредственно в датчике ЯМР-спектрометра фирмы Bruker путем обдува ампул испаряющимся азотом. Точность установки и поддержания заданной температуры составляла  $\pm 1$  К. Время выдержки образцов объемом 0,4 мл в каждой точке было не менее 15 минут. Долю подвижной воды определяли по отношению амплитуд сигнала ЯМР до и после замораживания до различных температур. При расчетах количества подвижной воды, приходящейся на молекулу холинхлорида, учитывали вклад протонов холинхлорида. Количество молекул воды, связанных с молекулой холинхлорида (незакристаллизовавшаяся вода) в заморожен-

ных до 77 К растворах, оценивали на основе определения локальных концентраций спиновых зондов методом ЭПР [5].

Реконструированные эритроциты, содержащие во внутриклеточном пространстве в качестве маркеров гемоглобин и  $^{14}\text{C}$ -сахарозу, получали из донорской крови 1—3 сут хранения [7], выделяли мембраны саркоплазматического ретикулума и измеряли параметры  $\text{Ca}^{2+}$ -аккумулирующей активности [3]. Медленное замораживание образцов реконструированных эритроцитов (со скоростью  $2 \div 3 \cdot 10^{-2}$  К/с) осуществляли в парах азота. Быстрое замораживание (около 20 К/с) производили погружением ампул, содержащих 1—1,5 мл пробы, в жидкий азот. Отогревали пробы на водяной бане при 310 К. Выход гемоглобина в надосадочную жидкость контролировали спектрофотометрически, выход  $^{14}\text{C}$ -сахарозы — радиоизотопным методом [7]. Радиоактивность измеряли с помощью сцинтиллятора

ЖС-7 на сцинтилляционном счетчике Вексман.

На рис. 1 представлены концентрационные зависимости температуры плавления (линия ликвидуса 4), кристаллизации (линии 2 и 3) и расстеклования (линия 1) растворов холинхлорида. После быстрого охлаждения до температур более низких, чем температура расстеклования (линия 1), в области концентраций до 55 % холинхлорида структуру раствора можно представить в виде кристаллической матрицы с включенными в нее стеклообразными областями, на постоянство состава которых

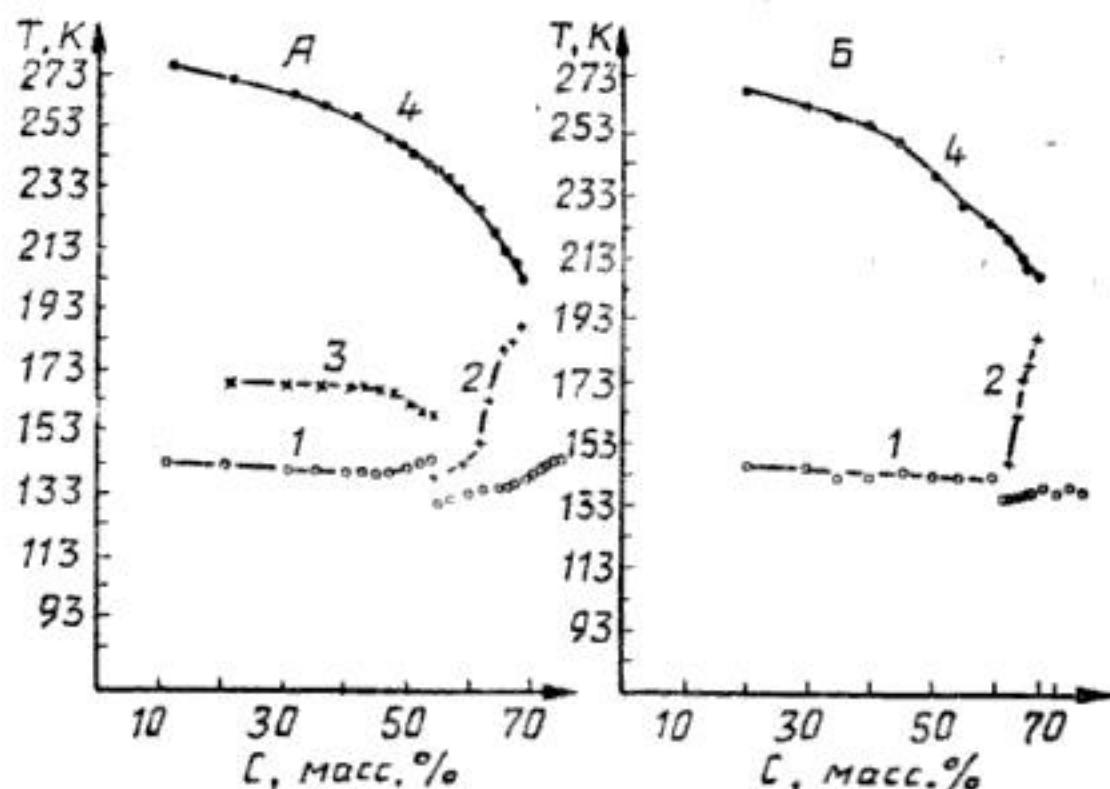


Рис. 1. Диаграммы фазовых переходов и физических состояний системы вода-холинхлорид: А — быстрое охлаждение; Б — медленное охлаждение. На оси абсцисс — концентрация холинхлорида, %; на оси ординат — температура, К

указывает неизменность температуры расстеклования (рис. 1). Начиная с 55 %-ной концентрации, раствор холинхлорида при использованном нами быстром охлаждении полностью переходит в твердоаморфное (стеклообразное) состояние. В процессе повышения температуры в системе происходит расстеклование. С появлением жидкости и возрастанием температуры возникают условия, благоприятные для развития кристаллизации. Линия 3 на рис. 1 соответствует процессу завершения роста кристаллов льда, образовавшихся при охлаждении. Линия 2 соответствует процессу кристаллизации льда из полностью аморфного состояния раствора. Выше линий 2 и 3 система состоит из кристаллов льда и областей в переохлажденном состоянии.

Медленное охлаждение ( $3,3 \cdot 10^{-3}$  К/с) незначительно сказывается на диаграмме фазовых и физических состояний. Температура расстеклования практически не изменяется. Кристаллизация из аморфного состояния наблюдается в более узком, по сравнению со случаем быстрого замораживания, диапазоне концентраций: от 61 до 68 % холинхлорида (рис. 1). Растворы, содержащие более 75 % холинхлорида, не исследовались, так как этот диапазон концентраций не представляет большого интереса для криобиологии.

Полученные данные калориметрии свидетельствуют о том, что независимо от скорости охлаждения часть воды в исследуемой системе всегда находится в стеклообразном состоянии. Подобным образом ведут себя такие криопротекторные системы, как водные растворы глицерина, 1,2-пропандиола. Таким образом, исследованная система вода—холинхлорид обладает общим свойством криопротекторных систем: большой склонностью к

стеклованию [6], что свидетельствует о достаточно прочном связывании молекул воды с холинхлоридом.

О присутствии незакристаллизовавшейся воды при охлаждении растворов холинхлорида вплоть до 77 К свидетельствуют данные ЯМР и ЭПР спектроскопии. Как видно из данных ЯМР (рис. 2), интенсивное вымерзание воды завершается в интервале температур  $243 \div 233$  К. В дальнейшем, несмотря на понижение температуры (до 210 К), на молекулу холинхлорида  $4 \div 7$  молекул воды остаются в подвижном состоянии. При замораживании до 77 К, по данным метода определения локальной концентрации спиновых зондов,  $8 \pm 2$  молекул воды остаются с молекулой холинхлорида. Таким образом, исследование физических состояний растворов холинхлорида и его гидратации при замораживании позволило выявить у этого соединения ряд физико-химических свойств, присущих традиционным криопротекторам. Как и другие криопротекторы, холинхлорид является фармакопейным препаратом.

Учитывая небольшую молекулярную массу и относительную непроницаемость катиона холина для большинства плазматических мембран [9], трудно было бы ожидать эффективного криопротекторного действия этого соединения на уровне целых клеток. При используемых скоростях охлаждения процесс замораживания — оттаивания неизбежно будет сопровождаться осмотическим стрессом клетки, вызванным гиперконцентрированием раствора соли. Чувствительность нативных эритроцитов к гиперконцентрации холинхлорида демонстрируется на рис. 3. Представленные данные показы-

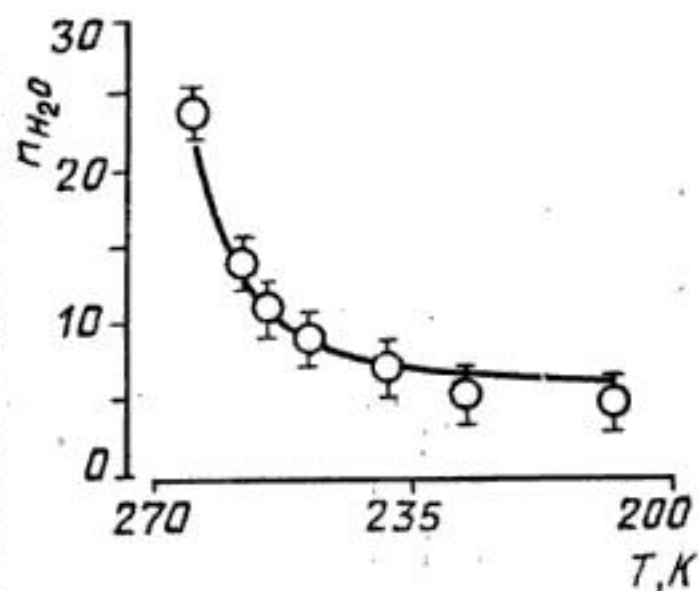


Рис. 2. Содержание незакристаллизовавшейся воды в системе вода-холинхлорид в процессе замораживания. Концентрация холинхлорида 1 М. На оси ординат — количество молекул подвижной воды в расчете на молекулу холинхлорида; на оси абсцисс — температура, К

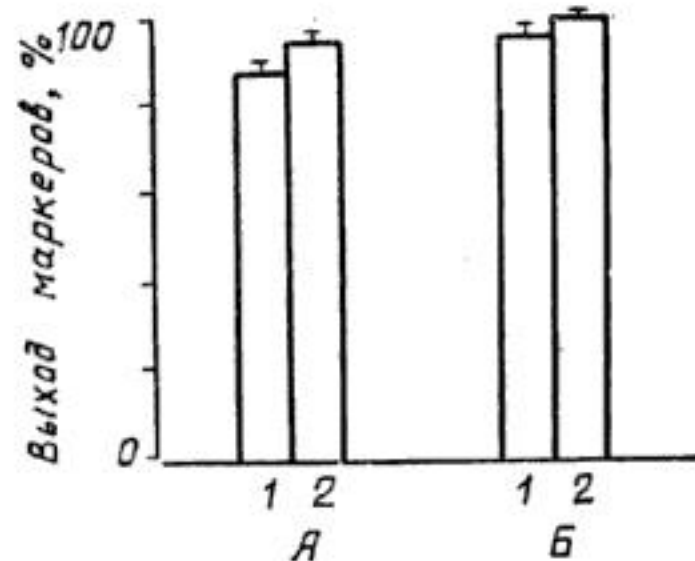
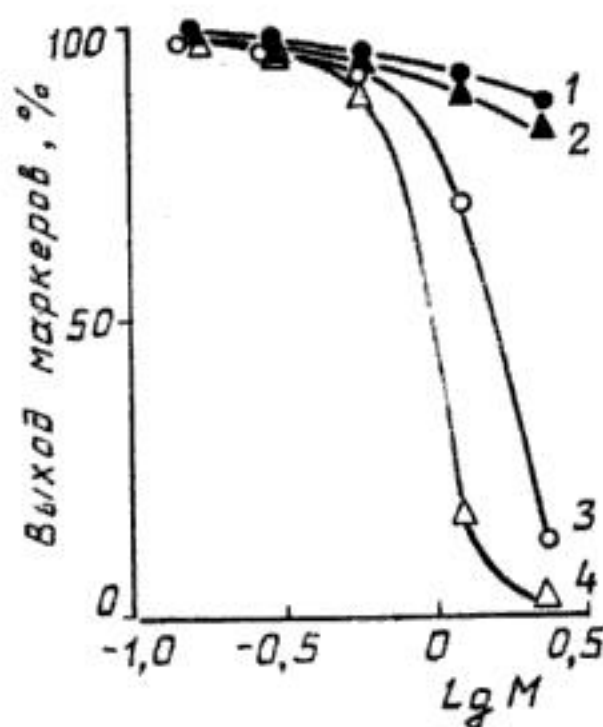


Рис. 3. Выход гемоглобина и  $K^+$  из эритроцитов и реставрированных теней эритроцитов при инкубации в гипертонических растворах холинхлорида: 1 — выход гемоглобина из реставрированных теней эритроцитов; 2 — выход  $K^+$  из реставрированных теней эритроцитов; 3 — выход гемоглобина из нативных эритроцитов; 4 — выход  $K^+$  из нативных эритроцитов. За 100 % принято содержание гемоглобина и  $K^+$  в контрольном образце

Рис. 4. Выход гемоглобина (А) и  $K^+$  (Б) из нативных эритроцитов, подвергнутых быстрому (1) и медленному (2) замораживанию до 77 К в 0,15 М холинхлориде. За 100 % принято содержание гемоглобина и  $K^+$  в контрольном образце

вают, что, как и в других солевых гиперконцентрированных растворах [7], нарушение структурной целостности мембран эритроцитов происходит при 8—10-кратном превышении изотонической концентрации соли. По-видимому, именно этим обстоятельством можно объяснить практически полную деструкцию клеток крови при медленном и быстром замораживании в рас-

творе холинхлорида (рис. 4), хотя в виде небольших добавок к основному криопротектору холинхлорид оказывает положительное действие [1].

В большей мере представляло интерес исследование криозащитных свойств холинхлорида в отношении мембранных препаратов, устойчивых к осмотическому шоку, основным фактором криоповреждения которых, по-видимому, является понижение температуры и дегидратация [7]. Как было показано нами и рядом других авторов, к таким объектам можно

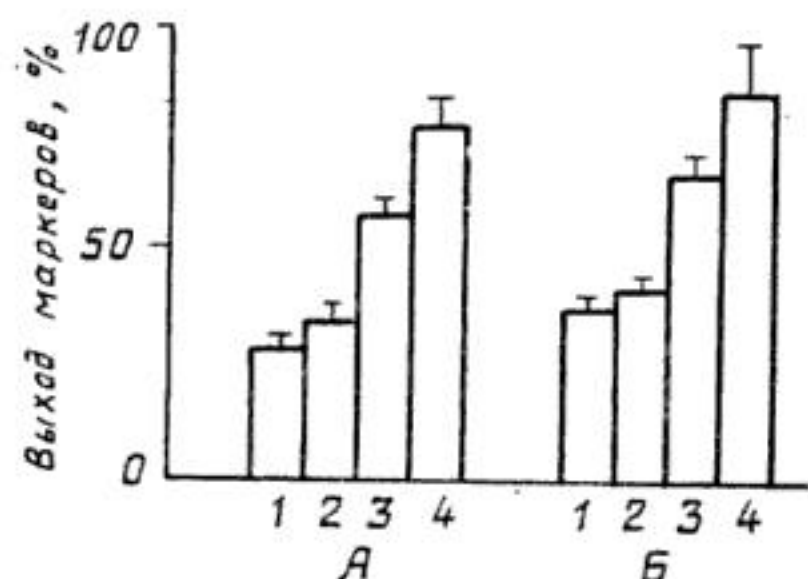


Рис. 5. Выход гемоглобина (А) и  $^{14}\text{C}$ -сахарозы (Б) из реставрированных теней эритроцитов, подвергнутых быстрому и медленному замораживанию в растворах холинхлорида: 1 — быстрое замораживание в 0,15 М холинхлориде; 2 — быстрое замораживание в 1,2 М холинхлориде; 3 — медленное замораживание в 0,15 М холинхлориде; 4 — медленное замораживание в 1,2 М холинхлориде

видно, что по сравнению с замораживанием в растворах KCl эффективность работы  $\text{Ca}^{2+}$ -насоса, оцениваемая по отношению аккумулированного  $\text{Ca}^{2+}$  к гидролизуемой АТФ [3], при замораживании в растворе холинхлорида в среднем выше на 30 %.

Анализируя данные об уровне повреждения мембран в ходе медленного замораживания (рис. 6), можно заметить, что наибольшие изменения происходят в температурном диапазоне  $255 \div 228 \text{ K}$ . Это существенно отличается от параметров повреждения плазматических мембран в растворах KCl, где нарушение барьерных свойств биомембран происходит в узком температурном диапазоне  $257 \div 256 \text{ K}$ , которому соответствует не более чем 2 %-ное содержание подвижной воды [2]. В дальнейшем при охлаждении образца до азотных температур показатели целостности эритроцитарных мембран стабилизируются. С другой стороны, начало деструктивных изменений мембран, как и в растворе KCl, наблюдается при  $255 \div 253 \text{ K}$ . Совокупность этих данных указывает на то, что в механизме криповреждения мембран эритроцитов, по-видимому, существенное значение имеют как термотропные перестройки липид-липидных и липид-белковых комплексов, так и перестройки, инициированные вымерзанием воды. Использование холинхлорида, благодаря изменению физического состояния растворов и, возможно, взаимодействию холинхлорида с компонентами мембран

отнести реконструированные эритроциты, везикулы саркоплазматического ретикулума, липосомы и др. [3, 7]. В частности, устойчивость реконструированных эритроцитов к гипертонии холинхлорида подтверждается результатами, приведенными на рис. 3. Даже после пребывания в 3 М растворе соли сохраняются барьерные свойства мембран эритроцитов для молекул гемоглобина и  $\text{K}^+$ . При медленном и, в еще большей степени, быстром режиме замораживания таких модельных систем в изотоническом растворе холинхлорида, в противоположность экспериментам, где средой замораживания служили растворы хлористого калия [2], наблюдается сохранение барьерных свойств плазматических мембран не только для молекул гемоглобина, но и  $^{14}\text{C}$ -сахарозы (рис. 5). Криозащитное действие холинхлорида наблюдалось в отношении мембран саркоплазматического ретикулума. Из таблицы

$\text{Ca}^{2+}$ -аккумулирующая способность фрагментов саркоплазматического ретикулума после замораживания — оттаивания

| Среда замораживания | $\text{Ca}^{2+}/\text{АТФ}$ |                       |           |                         |
|---------------------|-----------------------------|-----------------------|-----------|-------------------------|
|                     | Конт-роль                   | Быстрое замораживание | Конт-роль | Медленное замораживание |
| 0,15 М KCl          | 1,45                        | 0,63                  | 0,94      | 0,49                    |
| 0,15 М холинхлорид  | 1,50                        | 1,09                  | 0,95      | 0,77                    |

Примечание. Температура в измерительной ячейке составляла  $37^\circ\text{C}$ .

посредством обмена связанной воды, может уменьшать механические напряжения мембран и сглаживать структурные перестройки липид-липидных и липид-белковых комплексов, что способствует сохранению их барьерной функции.

Таким образом, проведенные исследования показывают перспективность использования холинхлорида для низкотемпературного хранения мембранных препаратов различного происхождения и, по-видимому, макромолекул. Его криозащитные свойства могут быть использованы для повышения эффективности традиционных криопротекторов. Наконец, оксигилирование холинхлорида с целью уменьшения его осмотической активности может оказаться перспективным для создания нового вида непроницающего криопротектора.

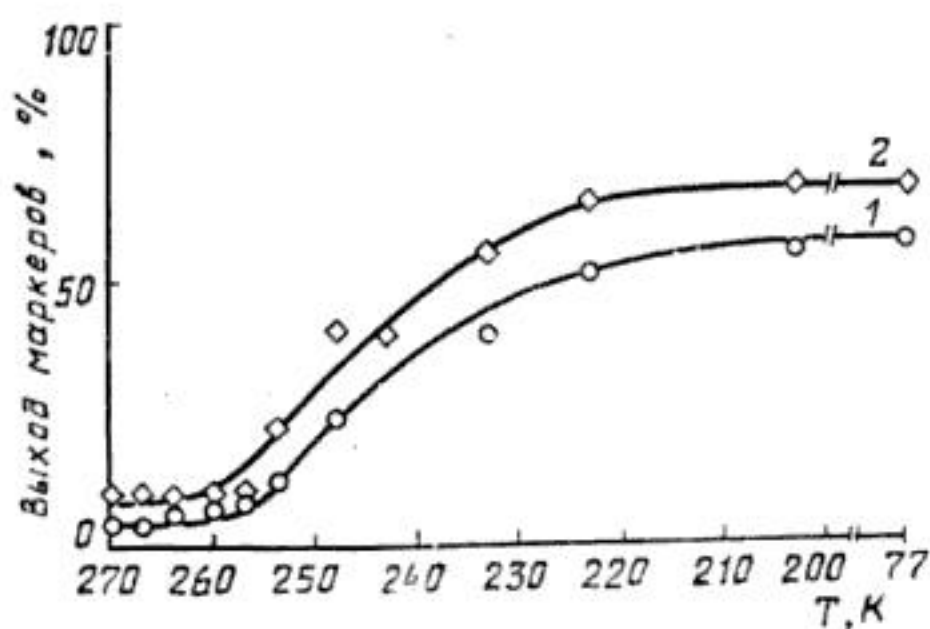


Рис. 6. Динамика выхода гемоглобина (1) и  $^{14}\text{C}$ -сахарозы (2) из реставрированных теней эритроцитов в процессе медленного замораживания. За 100 % принято содержание гемоглобина и  $^{14}\text{C}$ -сахарозы в контрольном образце

1. Бредихина Л. П. Функциональная сохранность эритроцитов при низкотемпературном консервировании в растворах полиэтиленоксида : Дис. ... канд. мед наук. — Харьков, 1983. — 186 с.
2. Гулевский А. К., Сахаров Б. В., Волков В. Я. Низкотемпературное нарушение проницаемости плазматических мембран, связанное с дегидратацией // Докл. АН СССР. — 1982. — 263, № 5. — С. 1250—1257.
3. Жегунов Г. Ф., Белоус А. М. Действие низких температур на проницаемость мембран саркоплазматического ретикулума для  $\text{Ca}^{2+}$  // Укр. биохим. журн. — 1978. — 50, № 5. — С. 600—603.
4. Зинченко А. В., Манк В. В., Моисеев В. А., Овчаренко Ф. Д. О фазовых переходах и физических состояниях системы вода—пропандиол // Докл. АН СССР. — 1983. — 269, № 1. — С. 144—146.
5. Михалев О. И. Изучение структуры и радиационной устойчивости замороженных водно-солевых растворов органических веществ методом спинового зонда : Дис. ... канд. физ.-мат. наук. — М., 1983. — 151 с.
6. Пушкарь Н. С., Шраго М. И., Белоус А. М., Калугин Ю. В. Криопротекторы. — Киев : Наук. думка, 1976. — 287 с.
7. Gulevsky A. K., Sakharov B. V., Volkov V. Ya. Role of dehydration in changing the permeability of erythrocyte plasma membranes by freeze—thawing // Biochim. et biophys. acta. — 1983. — 728, N 3. — P. 371—376.
8. Meryman H. T. Cryoprotective agents // Cryobiology. — 1971. — 8, N 2. — P. 173—183.
9. Whittam R., Ager M. E. Vectorial aspects of adenosine triphosphatase activity in erythrocyte membranes // Biochem. J. — 1964. — 93, N 2. — P. 337—348.

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

Ин-т химической физики АН СССР, г. Москва,

ВНИИ прикладной микробиологии, г. Оболенск

Поступила 08.07.85

УДК 57.043:577.352.53

**Н. Р. Чекурова, А. Н. Кислов, Б. Н. Вепринцев**

## ДЕЙСТВИЕ НЕКОТОРЫХ КРИОПРОТЕКТОРОВ НА ИОННЫЕ КАНАЛЫ МЕМБРАНЫ НЕЙРОНОВ

Существует ряд данных о воздействии различных криопротекторов на структуру и функции клеточных мембран [2, 3]. Исследований влияния криопротекторов на электрические параметры мембран, и в частности на

работу таких важных мембранных структур, как ионные селективные каналы, до сих пор не проводилось.

Целью настоящей работы явилось изучение действия наиболее часто применяемых криопротекторов на ионные каналы мембраны нейронов моллюска.

В качестве объекта исследования были выбраны изолированные нейроны пресноводного моллюска — большого прудовика, поскольку основные электрические параметры этих клеток хорошо изучены. Выделение нейронов проводили по стандартной методике Костенко [4]. Нервные ганглии улиток выдерживали в 0,3 %-ном растворе проназы на физиологической среде при температуре 20 °С и  $pH$  7,5 в течение 30—40 мин, затем после 10—15-минутной отмывки в физиологическом растворе клетки разделяли при помощи вольфрамовых игл. Измерение электрических характеристик мембраны осуществляли с помощью внутриклеточных микроэлектродов, изготовленных из тугоплавких стеклянных капилляров диаметром 1,2—1,4 мм. Микроэлектроды с диаметром кончика 0,5 мкм заполняли 1 М раствором KCl. Их сопротивление находилось в пределах  $50 \div 100$  МОм, а потенциал кончика  $-3 \div -5$  мВ. Микроэлектроды вводили в клетку при помощи микроманипулятора под визуальным контролем с помощью микроскопа. В целях уменьшения влияния временного фактора на электрические параметры мембраны регистрацию производили спустя 30—40 мин после введения микроэлектродов в клетку, когда ее электрофизиологические характеристики стабилизировались. В большинстве экспериментов регистрировали выходящие калиевые токи методом фиксации потенциала, используя два внутриклеточных микроэлектрода. Мембранный потенциал фиксировали на уровне потенциала покоя и, подавая на мембрану различные фиксированные потенциалы, регистрировали токи через калиевые каналы. Отмечая максимальные значения токов при соответствующих потенциалах, получали вольт-амперные характеристики калиевых каналов. В некоторых опытах измеряли мембранный потенциал и потенциал действия с помощью одного микроэлектрода. Измерение мембранного потенциала и потенциала действия проводили с момента добавления криопротектора для того, чтобы изучить динамику этих величин при осмотическом шоке. В опытах с фиксацией потенциала ионные токи измеряли через 10 мин после начала перфузии криопротектором. Такой временной интервал был выбран с учетом изменения клеточного объема и перехода клетки в новое стационарное состояние. Предполагалось, что за это время возможное изменение метаболических процессов не сказывается на параметрах мембраны, поэтому любые сдвиги проводимости потенциалзависимых калиевых каналов отражают только взаимодействие криопротектора с мембраной.

Для выяснения обратимости процессов, вызванных действием криопротекторов, клетки отмывали. Замена криопротектора в камере физиологическим раствором в большинстве случаев приводила к гибели клеток, по-видимому, вследствие повреждений мембраны, о чем судили по образованию большого числа везикул, окружавших клеточную мембрану. Более адекватным способом отмывания криопротектора является ступенчатое изменение осмотического давления раствора.

В опытах были использованы следующие криопротекторы: диметилсульфоксид (ДМСО), глицерин, этиленгликоль, формамид, диметилацетамид (Serva и Sigma). Применяли 1—1,5 М растворы криопротекторов на физиологическом растворе, что соответствовало 5—10 %-ным концентрациям данных криопротекторов, обычно используемых при криоконсервации тканей и клеток.

*Действие криопротекторов на мембранный потенциал (МП) и потенциал действия (ПД) нейронов.* Практически сразу после добавления криопротектора наблюдали гиперполяризацию МП на  $-10 \div -25$  мВ. Одновременно происходило уменьшение объема клетки, причем это изменение объема более всего было выражено в глицерине и ДМСО, а в формамиде объем клетки изменялся незначительно. Точное изменение объема нейрона

было трудно измерить из-за большой складчатости мембраны. Через 5—7 мин после добавления криопротектора объем нейрона возвращался к норме, но МП при этом оставался гиперполяризованным. Если в контрольном растворе клетка генерировала спонтанные ПД, то на фоне криопротектора, в результате гиперполяризации мембранного потенциала, они исчезали, но могли быть искусственно вызваны деполяризующим импульсом тока. Форма и амплитуда ПД при этом существенно не отличались от нормальных.

Чтобы изучить эффекты длительного воздействия криопротекторов на мембрану, ганглии выдерживали в 1,3 М растворе ДМСО в течение 12—14 ч

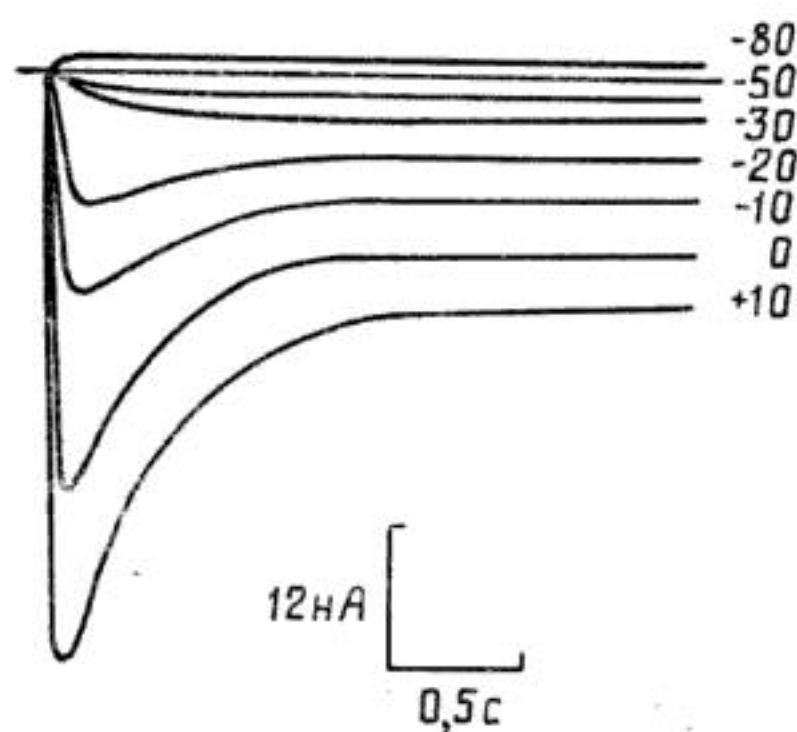


Рис. 1

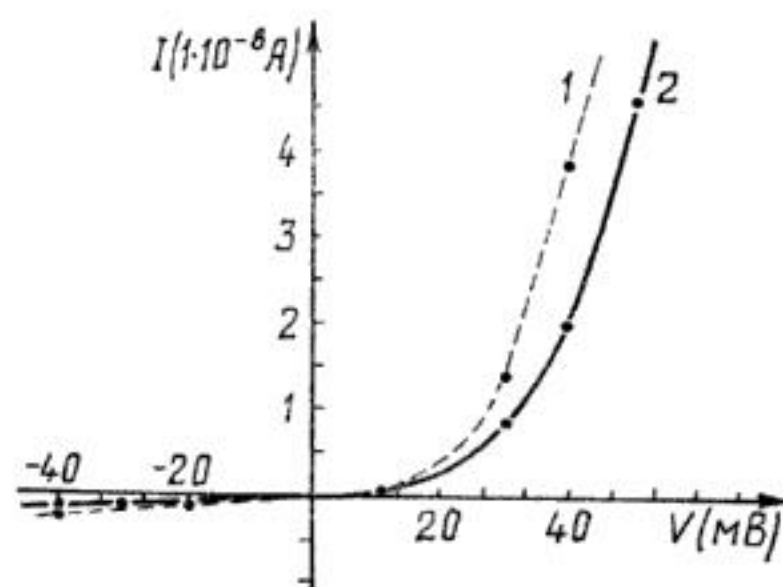


Рис. 2

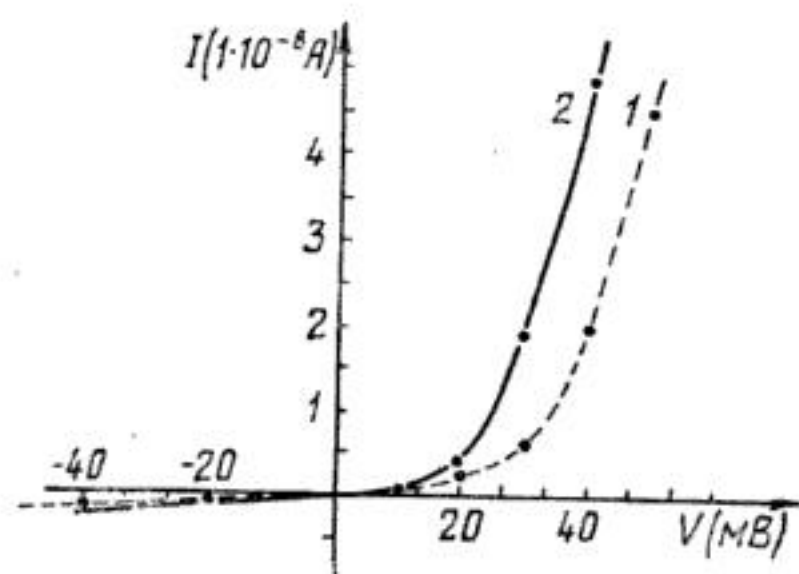


Рис. 3

Рис. 1. Пример регистрации калиевых токов при фиксации мембранного потенциала нейрона на различных уровнях в интервале от  $-80$  мВ до  $+10$  мВ

Рис. 2. Смещение ВАХ для стационарных калиевых каналов при действии ДМСО: кривая 1 — ВАХ для стационарных калиевых каналов в физиологическом растворе; кривая 2 — ВАХ для стационарных калиевых каналов в 1,3 М растворе ДМСО

Рис. 3. Смещение ВАХ для стационарных калиевых каналов при действии формамида: кривая 1 — ВАХ для стационарных калиевых каналов в физиологическом растворе; кривая 2 — ВАХ для стационарных калиевых каналов в 1,3 М растворе формамида

при температуре  $2 \div 4$  °С. Затем при комнатной температуре ганглии отмывали от криопротектора последовательно в растворах со ступенчатым уменьшением концентрации криопротектора в течение 3 ч, и выделение нейронов проводили по обычной методике. МП и ПД у этих клеток по сравнению с контролем существенно не изменялись. Таким образом, все исследованные криопротекторы в концентрациях 1—1,5 М вызывают гиперполяризацию МП с одновременным уменьшением объема нейрона. Через 5—7 мин размеры клетки восстанавливаются, но МП остается гиперполяризованным. На характеристики ПД данные криопротекторы существенного влияния не оказывают.

*Действие криопротекторов на калиевые токи мембраны.* Для более подробного изучения действия криопротекторов на мембрану нейрона в дальнейших опытах был применен метод фиксации мембранного потенциала. Исследовали в основном действие ДМСО, этиленгликоля, формамида на быстрые и стационарные трансмембранные калиевые токи (рис. 1). По полученным для этих токов вольт-амперным характеристикам (ВАХ) оценивали проводимость соответствующих каналов. Проводимость стацио-

нарных калиевых каналов в присутствии криопротектора в большинстве случаев не изменялась. В отдельных опытах при действии ДМСО и этиленгликоля наблюдали уменьшение этой проводимости в 1,2—1,3 раза. ВАХ для обоих типов калиевых каналов в растворах с криопротекторами иногда смещалась вдоль оси потенциалов. Смещение ВАХ по оси потенциалов свидетельствовало об изменении поверхностного потенциала мембраны. При действии этиленгликоля в сдвиге ВАХ не было закономерности: кривая смещалась относительно контрольной как в правую сторону, так и в левую. В ДМСО ВАХ сдвигалась в основном вправо, за исключением нескольких экспериментов, где контрольные и опытные кривые совпадали (рис. 2). Формамид обычно вызывал смещение ВАХ влево (рис. 3). Проводимость быстрых калиевых каналов в растворах, содержащих этиленгликоль или формамид, как правило, не изменялась, в то время как ДМСО обычно уменьшал ее в 1,3—1,5 раза.

Полученные результаты показали, что различные криопротекторы в концентрациях 1—1,5 М имеют свою специфику действия на калиевые токи. Этиленгликоль существенно не влияет на проводимость калиевых каналов мембраны нейронов моллюска. Формамид сдвигает поверхностный потенциал мембраны, но не изменяет заметно кинетику калиевых каналов. ДМСО вызывает смещение поверхностного мембранного потенциала и проводимости в основном быстрых калиевых каналов без изменения их кинетики.

В настоящей работе были выбраны относительно короткие экспозиции клеток в растворах криопротекторов, чтобы исследовать непосредственно взаимодействие мембраны нейронов с молекулами криопротекторов. Исходя из результатов проведенных опытов можно заключить, что примененные криопротекторы (ДМСО, этиленгликоль, формамид, глицерин, диметилацетамид) существенно не изменяют электрические параметры мембраны нейронов. Даже длительное, в течение  $12 \div 14$  часов, действие криопротекторов при температуре  $2 \div 4$  °С не оказывает влияния на величину МП, а также на амплитуду и временные характеристики ПД. Опыты показали также, что добавление в среду криопротектора в концентрации 1—1,5 М (это соответствует 10-кратному увеличению осмотического давления раствора) не повреждает клеточную мембрану. Скорее наоборот, уменьшение объема клетки сопровождается уменьшением поверхностного натяжения мембраны, а это, вероятно, способствует слипанию мембраны в области микроповреждений, вызванных механической изоляцией клеток. Так, если в опытах регистрировали МП нейрона  $-30 \div -35$  мВ вместо нормальных  $-50 \div -60$  мВ, то при добавлении криопротектора мембранный потенциал гиперполяризовался на  $-20 \div -30$  мВ. Вероятнее всего, эта гиперполяризация обусловлена двумя факторами: слипанием мембраны в области микроповреждений, что ведет к увеличению входного сопротивления мембраны и уменьшению шунтирующего действия ранее поврежденных участков мембраны, и временным увеличением градиента концентраций ионов, особенно ионов калия, между клеткой и средой за счет выхода воды из клетки. В основных опытах, где использовали неповрежденные клетки, при перфузии любого криопротектора МП также сдвигался в отрицательную сторону на  $-10 \div -20$  мВ. Такой увеличенный МП остается в большинстве случаев до тех пор, пока в растворе находится криопротектор (10—30 мин), хотя за это время объем клетки возвращается к норме, следовательно, градиент концентраций ионов между клеткой и средой не должен существенно отличаться от нормы.

Есть данные, что криопротекторы ингибируют  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-АТФазу}$ , и вследствие этого должна была бы наблюдаться деполяризация мембраны нейронов. Поэтому наблюдаемую в опыте гиперполяризацию мембраны под действием криопротекторов пока трудно объяснить. Можно предположить, что такое изменение МП нейрона вызвано неодинаковым изменением проницаемости мембраны для различных ионов. Естественно, что такое изменение проницаемости должно иметь место для ионных каналов утечки, ко-

которые и определяют МП мембраны нейрона в покое (без изменения свойств потенциалзависимых каналов).

Эксперименты показали также, что критическим фактором при действии криопротекторов, влияющим на функциональное состояние нейрона, является возвращение клетки в нормальный физиологический раствор. Если уменьшение объема клетки даже способствует залечиванию микроповреждений мембраны, то увеличение объема нейрона, наблюдаемое при отмывании криопротектора, сопровождается повреждением мембраны. Это особенно хорошо заметно по скачкам тока утечки, который время от времени резко возрастает, а затем постепенно, за счет образования новой мембраны на границе внутри- и внеклеточной среды, возвращается к исходному уровню. Такие повреждения мембраны можно свести к минимуму путем постепенного уменьшения осмотического давления экстраклеточного раствора: либо за счет градиентного уменьшения концентрации криопротектора, либо отмывания криопротектора в градиенте сахарозы [1]. В ряде случаев таким образом удавалось исследовать на одном нейроне неоднократное применение криопротекторов.

Опыты с применением фиксации потенциала показали, что потенциалзависимые калиевые каналы мембраны практически не изменяют свои характеристики. Применение ДМСО, однако, несколько снижает интегральную проводимость как быстрых, так и стационарных калиевых каналов. Но этот факт можно объяснить уменьшением подвижности иона калия в среде с данным криопротектором. Такие криопротекторы, как ДМСО и формамид, сдвигают ВАХ стационарных калиевых каналов вдоль оси потенциалов, причем сдвиг в среде с ДМСО наблюдается, как правило, в сторону увеличения поверхностного потенциала, а в среде с формамидом — уменьшения (рис. 3). Изменения поверхностного потенциала мембраны в средах с криопротекторами были также отмечены в исследованиях с применением иных методик [2]. Этот факт позволяет предположить, что часть молекул криопротектора адсорбируется на мембране и взаимодействует с ее заряженными группами, что приводит к изменению поверхностного потенциала мембраны. Как уже отмечалось выше, в зависимости от вида криопротектора поверхностный потенциал может либо уменьшаться, либо увеличиваться, влияя таким образом на пороговый уровень трансмембранного потенциала, который активизирует потенциалзависимые ионные каналы.

В ряде опытов, где временное разрешение метода позволяло регистрировать входящие токи, обусловленные активацией потенциалзависимых натриевых и кальциевых каналов мембраны, также наблюдали практически полное отсутствие действия криопротекторов на эти каналы.

1. Безуглый Н. Д. Осмотическая реакция яйцеклеток и эмбрионов млекопитающих при криоконсервации : Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Харьков, 1984. — 24 с.
2. Бойко Н. М., Бондаренко В. А., Белоус А. М. Влияние криопротекторов на свойства поверхности мембран митохондрий, определяемых по распределению в двухфазных системах // Биохимия. — 1982. — 47, № 5. — С. 773—777.
3. Гулевский А. К., Рязанцев В. В., Белоус А. М. Транспорт одновалентных катионов в эритроцитах при инкубации в защитных средах // Криобиология. — 1985. — № 3. — С. 24—28.
4. Костенко М. А. Выделение одиночных нервных клеток из мозга моллюска *Limnaea stagnalis* для дальнейшего культивирования их *in vitro* // Цитология. — 1972. — 14, № 11. — С. 1392—1398.

Ин-т биологической физики  
АН СССР,  
г. Пущино

Поступила 25.02.86

*В. Н. Гурин, И. Н. Семенова*

## ИЗМЕНЕНИЯ В ЛИПИДНОМ СОСТАВЕ ЛИПОПРОТЕИДОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ В УСЛОВИЯХ РАЗВИВАЮЩЕЙСЯ ГИПОТЕРМИИ

Исследования процессов адаптации на всех уровнях организации биосистем, процессов, лежащих в основе резистентности организма к действию различных факторов внешней среды, находятся на магистральной линии развития современной медицинской науки. Среди наиболее важных экологических факторов, действующих на организм человека в различных регионах земного шара, особое значение имеет холод. Несмотря на большое количество работ, посвященных исследованию различных аспектов адаптации теплокровных организмов к действию низких температур, многие вопросы основ холодовой адаптации остаются неизученными.

Перестройка режима работы систем терморегуляции в условиях действия на организм низких температур предполагает переход биосистемы на качественно иной уровень энергетического и пластического обмена, отличительной особенностью которого является возрастание роли липидного материала в обеспечении растущих энергетических потребностей, а также исключительное важное значение липидов в модификации функциональных характеристик клеточных мембран [3]. Учитывая важнейшее значение липидов в энергетическом и пластическом обеспечении функций при развитии гипотермии, мы поставили перед собой задачу изучить изменения в обмене надмолекулярных комплексов белков и липидов плазмы крови, липопротеидов (ЛП) при непродолжительном охлаждении животных.

В опытах были использованы белые беспородные крысы-самки массой 180—200 г, голодавшие перед началом эксперимента в течение 12 ч (при свободном доступе к воде). Охлаждение животных проводилось путем помещения их в воду с температурой 26 °С на 15, 30, 60 мин. Температуру тела измеряли электротермометром ТПЭМ-1 в прямой кишке на глубине 4 см. Сразу после охлаждения животных декапитировали и собирали кровь в охлажденные пробирки. После центрифугирования пробирок с кровью отбирали сыворотку и проводили разделение ЛП сыворотки на фракцию ЛП высокой плотности (ЛПВП) и суммарную фракцию ЛП очень низкой и низкой плотности (ЛПОНП + ЛПНП) [10]. Из выделенных фракций ЛП экстрагировали липиды по методу М. А. Креховой и М. К. Чехрановой [4] и определяли содержание холестерина (ХС) на фотоэлектроколориметре, используя реакцию Либермана — Бурхардта. Жирнокислотный состав ЛП изучался с помощью метода газожидкостной хроматографии метиловых эфиров жирных кислот (ЖК) [7]. Общее содержание ЖК ЛП изученных фракций определяли с использованием внутреннего стандарта [1]. Процентное соотношение ЖК, входящих в состав липопротеидных комплексов, исследовалось с помощью Sigma-2 фирмы Perkeim—Elmer Corporation с пламенно-ионизационным детектором. Колонка металлическая длиной 1800 мм, имеющая внутренний диаметр 3 мм. В качестве носителя использовался Chromaton N-Super, пропитанный 5 % Reoplex 400. Газохроматографический анализ проводили в изотермическом режиме при температуре колонки 180 °С. Газ-носитель — азот, расход азота и водорода — 30 мл/мин, воздуха — 300 мл/мин. Подсчет площади пиков хроматограмм производился с помощью специализированной вычислительной машины для обработки хроматографических данных Sigma-10 Chromatography Data Station.

В наших исследованиях мы не добивались охлаждения животных до состояния глубокой гипотермии, т. е. снижения ректальной температуры ниже 26 °С [8], когда прекращаются регуляторные нервные влияния на метаболизм, руководствуясь следующим: при температурах ниже 26 °С скорость потребления кислорода резко падает по сравнению с интактными живот-

ными (при более высокой температуре тела она значительно выше, чем у интактных животных) [2]; биоэлектрическая активность коры головного мозга крыс резко понижается при температуре ниже 27 °С [5]; при температуре тела ниже 27 °С прекращаются регулирующие экстракардиальные нервные влияния на деятельность сердца [5]; при температуре тела ниже 26 °С наблюдается подавление активности окислительных ферментов до нуля, т. е. прекращается тканевое дыхание [8].

Результаты опытов показали, что снижение температуры тела приводит к заметным изменениям содержания ХС во фракции ЛПВП и суммарной фракции ЛПОНП + ЛПНП. После 15-минутного пребывания крыс в воде (температура тела снизилась до 29,5 °С) содержание ХС ЛПВП увеличилось на 46,4 %. Более продолжительное охлаждение животных (30 мин), сопровождающееся падением температуры тела до 28,2 °С, почти не отличалось по величине прироста ХС (50,8 %) от 15-минутного охлаждения. Увеличение содержания ХС во фракции ЛПВП после 60-минутного пребывания крыс в воде (температура тела 28,0 °С) было выражено в меньшей степени (прирост на 26,3 %). В суммарной фракции ЛПОНП + ЛПНП уровень ХС при развитии гипотермии достоверно изменялся лишь на 30-й минуте охлаждения животных. Прирост его содержания составил 36,0 %.

Анализ жирнокислотного компонента ЛП исследовался путем определения общего содержания ЖК и жирнокислотного состава изученных фракций ЛП. Охлаждение крыс в течение 15 и 30 мин сопровождалось повышением содержания ЖК ЛПВП соответственно на 34,3 % и 33,1 %. Более длительная (60 мин) гипотермия не сопровождалась достоверным увеличением общего содержания ЖК ЛПВП. Количество ЖК, входящих в суммарную фракцию ЛПОНП + ЛПНП, не отличалось от контроля при охлаждении любой длительности.

Газохроматографический анализ спектра ЖК ЛП показал, что кратковременное (15 мин) охлаждение крыс приводит к существенным перестройкам в процентном соотношении ЖК, входящих в состав ЛПВП. Отмечено увеличение процентного содержания пальмитиновой и олеиновой кислот при одновременном снижении процента стеариновой и арахидоновой кислот. Тридцатиминутное охлаждение животных вызывало более выраженные сдвиги в процентном соотношении отдельных ЖК. Направленность изменений процентного содержания ЖК в структуре ЛПВП после часового охлаждения животных сохранялась той же, а сдвиги в спектре ЖК еще более усилились (табл. 1).

Т а б л и ц а 1

Жирнокислотный состав ЛПВП плазмы крови крыс при развитии гипотермии, %

| Жирные кислоты   | Контроль<br>(интактные):<br>n = 9 | Охлаждение       |                  |                  |
|------------------|-----------------------------------|------------------|------------------|------------------|
|                  |                                   | 15 мин;<br>n = 9 | 30 мин;<br>n = 9 | 60 мин;<br>n = 9 |
| Миристиновая     | 1,65 ± 0,06                       | 1,49 ± 0,08      | 1,63 ± 0,04      | 1,47 ± 0,09      |
| Пентадекановая   | 0,38 ± 0,05                       | 0,27 ± 0,017     | 0,24 ± 0,01 *    | 0,26 ± 0,025 *   |
| Пальмитиновая    | 24,19 ± 0,60                      | 27,11 ± 0,75 *   | 27,22 ± 0,43 *   | 29,15 ± 0,77 **  |
| Пальмитолеиновая | 9,36 ± 0,86                       | 8,84 ± 0,45      | 8,79 ± 0,66      | 8,21 ± 0,41      |
| Стеариновая      | 13,69 ± 0,72                      | 11,52 ± 0,52 *   | 11,34 ± 0,48 *   | 9,55 ± 0,33 **   |
| Олеиновая        | 18,45 ± 0,65                      | 21,68 ± 0,32 *   | 23,89 ± 0,62 **  | 24,40 ± 0,71 *   |
| Линолевая        | 13,86 ± 0,69                      | 13,20 ± 0,74     | 13,75 ± 0,72     | 15,33 ± 0,83     |
| Арахидоновая     | 18,42 ± 0,58                      | 15,90 ± 0,78 *   | 13,13 ± 0,51 **  | 11,63 ± 0,48 **  |

П р и м е ч а н и е. Здесь \* — достоверные различия по отношению к контролю; \*\* — по отношению к предыдущему этапу гипотермии.

Исследование жирнокислотного спектра суммарной фракции ЛПОНП + ЛПНП показало наличие и здесь существенных перестроек в процентном соотношении ЖК в процессе развития гипотермии, 15-минут-

ное охлаждение животных привело к увеличению процента стеариновой и арахидоновой кислот и падению палмитиновой кислоты. После 30-минутного пребывания крыс в воде произошло также снижение процента олеиновой кислоты и еще более значительное увеличение процентного содержания стеариновой кислоты. Охлаждение крыс на протяжении часа, в целом, не привело к более выраженным сдвигам процентного содержания отдельных ЖК в суммарной фракции ЛПОНП + ЛПНП по сравнению с получасовым охлаждением (табл. 2).

Таблица 2

Жирнокислотный состав суммарной фракции ЛПОНП + ЛПНП плазмы крови крыс при развитии гипотермии, %

| Жирные кислоты   | Контроль<br>(интактные);<br>n = 8 | Охлаждение       |                  |                  |
|------------------|-----------------------------------|------------------|------------------|------------------|
|                  |                                   | 15 мин;<br>n = 8 | 30 мин;<br>n = 9 | 60 мин;<br>n = 9 |
| Миристиновая     | 1,04 ± 0,10                       | 1,21 ± 0,11      | 1,10 ± 0,10      | 1,00 ± 0,07      |
| Пентадекановая   | 0,32 ± 0,04                       | 0,41 ± 0,05      | 0,39 ± 0,04      | 0,35 ± 0,025     |
| Пальмитиновая    | 27,65 ± 0,47                      | 25,53 ± 0,58*    | 23,97 ± 0,85*    | 24,81 ± 0,41*    |
| Пальмитолеиновая | 7,40 ± 0,19                       | 7,61 ± 0,41      | 7,23 ± 0,47      | 7,73 ± 0,78      |
| Стеариновая      | 6,95 ± 0,39                       | 9,21 ± 0,69*     | 11,73 ± 0,56**   | 9,96 ± 0,34**    |
| Олеиновая        | 30,21 ± 0,96                      | 28,07 ± 1,16     | 26,22 ± 0,67*    | 26,38 ± 0,75*    |
| Линолевая        | 16,71 ± 0,30                      | 16,19 ± 0,91     | 16,48 ± 0,27     | 15,73 ± 0,85     |
| Арахидоновая     | 9,73 ± 0,40                       | 11,77 ± 0,86*    | 12,87 ± 0,65*    | 14,03 ± 0,58*    |

Примечание. Здесь \* — достоверные различия по отношению к контролю; \*\* — по отношению к предыдущему этапу гипотермии.

При сравнении изменений, происходящих в жирнокислотном спектре ЛП плазмы крови крыс в процессе охлаждения животных, обнаружено, что сдвиги в составе ЖК ЛПВП противоположны изменениям в суммарной фракции ЛПОНП + ЛПНП. Так, если во фракции ЛПВП наблюдалось увеличение процентного содержания пальмитиновой и олеиновой кислот, то во фракции ЛПОНП + ЛПНП происходило снижение уровня этих кислот. Уменьшение процента стеариновой и арахидоновой кислот в ЛПВП сопровождалось нарастанием их содержания в ЛПОНП + ЛПНП. Кроме того, обращает на себя внимание факт однонаправленного изменения процентного содержания пальмитиновой и олеиновой, а также стеариновой и арахидоновой кислот в ЛП изученных фракций. Несомненно, изменения в липидном составе липопротеидных частиц являются одним из звеньев комплексной реакции адаптации, возникающей при действии на организм низких температур, и отражают изменившиеся в качественном и количественном отношении потребности тканей организма в липидных субстратах. Известно, что липопротеидные частицы являются не только объектом системной регуляции, но и средством регуляции метаболических процессов. Связываясь с рецепторами на клеточной мембране и подвергаясь интернализации, комплексы «лиганд — рецептор» (прежде всего «ЛПНП — рецептор») и продукты их лизосомальной деградации оказывают мощное регуляторное влияние на обменные процессы в клетке [6,9]. Известно, что ЛП регулируют тканевое дыхание, обладают способностью разобщать окисление и фосфорилирование, регулируют процессы гликолиза, гликогенолиза, синтеза стероидных гормонов, стимулируют транслокацию лизосом к ядру при стрессе и др. [6].

Изменения липидного состава ЛП, вероятно, характеризуют изменившиеся условия реализации их основных функций. Главная функция, которую, по современным представлениям, выполняют ЛПВП — это поддержание «холестеринового гомеостаза», основной смысл которого сводится к поддержанию определенного физического состояния липидного бислоя мембраны [9]. ЛПВП обладают способностью сорбировать свободный ХС с по-

верхности плазматических мембран и тем самым регулировать такой интегральный физико-химический показатель, как микровязкость биомембран, характеризующий, в определенной степени, функциональную активность клетки [9]. Показано, что уменьшение содержания ХС в плазматических мембранах различных клеток, как и некоторые другие воздействия, приводящие к увеличению текучести липидного бислоя мембран, ведут к повышению активности ряда мембраносвязанных ферментов, увеличению скорости пассивной диффузии ионов натрия, увеличению амплитуды потенциала действия при возбуждении, стимуляции дифференцировки клеток, усилению синаптической передачи и др., т. е. к повышению функциональной активности клеток [9]. Интенсификация обменных процессов, происходящая при действии на организм низких температур и развитии неглубокой гипотермии, сочетается с перестройками липидной матрицы мембран, обуславливающими высокую функциональную активность клеток [6]. Из данной литературы следует, что уменьшить микровязкость мембран можно путем снижения содержания ХС в их структуре. Учитывая способность ЛПВП регулировать содержание ХС в биомембранах, можно предположить, что увеличение его содержания в этой фракции ЛП при развитии гипотермии отражает увеличение оттока ХС из плазматических мембран в ЛПВП. Легко заметить, что существует корреляция между увеличением содержания ХС ЛПВП и ростом общего содержания ЖК ЛПВП. Этот факт может подтверждать предположение о том, что в условиях развивающейся гипотермии происходит усиленный отток ХС с поверхности плазматических мембран клеток различных тканей в ЛПВП. Накопление свободного ХС в поверхностном слое ЛПВП влечет за собой этерификацию его под влиянием лецитинхолестеринацилтрансферазы с последующей транслокацией образовавшихся эфиров в ядро частиц (некоторая часть эфиров ХС с помощью специальных белков переносится к ЛПОНП и ЛПНП) [9]. При снижении глубокой температуры тела могут изменяться и условия взаимодействия этого класса ЛП с мембранами, которое обеспечивает переход ХС в ЛПВП. Важную роль в этом процессе играют фосфолипиды, расположенные в оболочке частиц. Они могут непосредственно участвовать в процессе сорбции ХС, а также являются субстратами реакции этерификации ХС, катализируемой лецитинхолестеринацилтрансферазой [9]. Выявленные изменения жирнокислотного состава ЛПВП, прежде всего, затрагивают жирнокислотные радикалы фосфолипидов и, вероятно, обеспечивают оптимальные условия для реализации всех функций, присущих ЛП этого класса при развитии гипотермии.

1. Гнеушев Е. Т., Шитов И. Н., Утлинская М. Г., Буркашов А. Б. Газохроматографический метод определения спектра свободных жирных кислот в плазме крови // Лаб. дело.— 1982.— № 1.— С. 29—33.
2. Коротков С. В. Роль адренергических механизмов в регуляции содержания холестерина липопротеидов в крови при гипотермии // Физиология и фармакология терморегуляции.— Минск : Наука и техника, 1985.— С. 109—127.
3. Крепс Е. М. Липиды клеточных мембран.— Л. : Наука, 1981.— 340 с.
4. Крехова М. А., Чехранова М. К. Фракционное определение эфиров холестерина в крови и тканях с помощью хроматографии в тонком слое // Вопр. мед. химии.— 1971.— 17, № 1.— С. 93—98.
5. Кубарко А. И., Гурин В. Н. Влияние чрезвычайных раздражителей и температурного фактора на физико-химические свойства липидов мозга // Нервные и гуморальные механизмы регуляции функций в норме и патологии.— Минск : Наука и техника, 1980.— С. 56—61.
6. Панин Л. Е. Биохимические механизмы стресса.— Новосибирск : Наука, 1983.— 234 с.
7. Синяк К. М., Оргель М. Я., Крук В. И. Метод приготовления липидов крови для хроматографического исследования // Лаб. дело.— 1976.— № 1.— С. 37—41.
8. Сумбатов Л. А. Искусственная гипотермия.— М. : Медицина, 1985.— 88 с.
9. Лопухин Ю. М., Арчаков А. И., Владимиров Ю. А., Коган Э. М. Холестериноз.— М. : Медицина, 1983.— 352 с.
10. Burstein M., Samaille I. Sur la clarification du serum lipemique par l'heparine *in vitro* // C. R. Acad. Sci.— 1955.— 241, N 9.— P. 85—136.

Ин-т физиологии АН БССР,  
Мед. ин-т, г. Минск

Поступила 07.04.86

Е. В. Кудокоцева, Г. Ф. Жегунов

## СОСТОЯНИЕ NADH-ЗАВИСИМОЙ ЦЕПИ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ МЕМБРАН ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА ПЕЧЕНИ СУСЛИКОВ И КРЫС

При переходе к зимней спячке в мембранах клеток гибернирующих животных повышается содержание ненасыщенных жирных кислот, что способствует поддержанию их жидкокристаллического состояния при понижении температуры тела [4]. Однако вопросы, касающиеся механизмов указанного изменения жирнокислотного состава мембран гибернирующих животных, остаются неясными. При исследовании механизма «гомеовязкостной адаптации» на *Bacillus megaterium* показано, что понижение температуры среды до 5 °С вызывает активацию десатураз, чего не наблюдается в клетках, культивируемых при 20 °С [6]. При повышении температуры от 20 до 30 ÷ 35 °С десатуразная активность изучаемых клеток снижается вследствие блокирования синтеза фермента [6]. В реакциях десатурации насыщенных жирных кислот участвует NADH-специфичная цепь переноса электронов мембран эндоплазматического ретикулума, состоящая из NADH-специфичного флавопротеида и цитохрома  $b_5$  [3]. Роль цепи переноса электронов в мембранах эндоплазматического ретикулума в процессах гибернации и акклиматизации животных к различным температурным условиям остается практически не изученной. В связи с этим целью данной работы явилось исследование отдельных участков NADH-зависимой цепи переноса электронов микросом и, в частности, скорости потребления кислорода при окислении NADH, а также NADH-феррицианид-редуктазной активности гетеро- и гомойотермных животных.

Мембраны эндоплазматического ретикулума выделяли из печени сусликов *Citellus undulatus* весом 500—550 г и из печени белых беспородных крыс весом 180—200 г [2]. В опытах использовали несколько групп гетеротермных животных: зимоспящих, с температурой тела 1—4 °С, гибернирующих на протяжении 5—7 дней; в летний период — при температуре тела 37; в осенний период — при температуре тела 35 ÷ 36 °С. Скорость потребления кислорода определяли на полярографе со стандартным платиновым электродом типа Кларка. Икубационная смесь объемом 1 мл содержала 100 мМ трис-HCl буфер, pH 7,4, со следующими добавками: микросомальный белок — 4 мг; NADH — 1 мМ; ЭДТА — 0,6 мМ;  $\text{CaCl}_2$  — 1 мМ. Исследовали активность NADH-феррицианид-редуктазы, используя спектрофотометр Unicam SP-8000 [2]. Икубационная смесь объемом 3 мл содержала 100 мМ трис-HCl буфер, pH 7,4, 330 мкМ  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , 20 мкг белка микросом. Реакцию запускали добавлением 100 мкМ NADH. Скорости восстановления феррицианида измеряли при 420 нм. Коэффициент молярной экстинкции окисленного феррицианида равен  $1,02 \cdot 10^3 \text{ см}^{-1} \cdot \text{М}^{-1}$ . Содержание белка в суспензии микросом определяли по методу Лоури в присутствии 0,1 %-ного дезоксихолата натрия [7]. При статистической обработке результатов использовали критерии достоверности Стьюдента—Фишера, на рисунках приведены средние данные четырех экспериментов.

С целью установления интервала температур, в котором происходит изменение функциональной активности мембран микросом, исследовали активность NADH-специфичной редокс-цепи при различных температурах инкубации (32, 20, 13 °С). Обнаружено, что антимицин А не влияет на скорость потребления кислорода при окислении NADH, это свидетельствует о том, что препарат микросом не имеет примеси митохондриальных мембран. При температуре инкубации 32 °С самая высокая скорость окисления NADH наблюдается у бодрствующих сусликов в летний период, а самая низкая — у зимоспящих животных (рис. 1). У бодрствующих сусликов в осенний период и у крыс скорость потребления кислорода при окислении

NADH практически одинакова. ЭДТА ингибирует эту реакцию, а ионы  $\text{Ca}^{2+}$  — активируют, возможно, путем увеличения проницаемости мембран эндоплазматического ретикулума для NADH [1]. При температурах инкубации 32 и 20 °C скорость потребления кислорода в процессе окисления NADH практически одинакова во всех группах животных, за исключением крыс, у которых скорость реакции при температуре 20 °C ниже, чем при 32 °C (рис. 2). При температуре 13 °C скорость потребления кислорода при окислении NADH уменьшается во всех трех группах сусликов и у крыс (рис. 3). Активность NADH-феррицианид-редуктазы микросом нами исследована у зимоспящих сусликов при 20 и 13 °C. Добавление 10 мкмоль  $\text{CaCl}_2$  к микросомам при 20 °C вызывает достоверное повышение NADH-феррицианид-редуктазной активности (с  $2446 \pm 110$  до  $4685 \pm 215$  нмоль  $\cdot$  мин $^{-1}$   $\times$   $\text{мг}^{-1}$  белка,  $p < 0,05$ ). При 13 °C обнаружено достоверное уменьшение активности NADH-феррицианид-редуктазы по сравнению с 20 °C (с  $2446 \pm 110$  до  $1413 \pm 100$  нмоль  $\cdot$  мин $^{-1}$   $\times$   $\text{мг}^{-1}$  белка,  $p < 0,05$ ). Таким образом, у сусликов скорость потребления кислорода при окислении NADH снижается при температурах ниже 20 °C, а у крыс при 20 °C она уже ниже, чем при 32 °C.

Известно [4], что в тканях большинства млекопитающих при температурах около 23 °C на кривых Аррениуса наблюдаются перегибы, обусловленные фазовыми переходами в мембранных липидах, что отражается на функционировании ферментов. Показано, что при температуре, близкой к приведенной ( $20 \div 23$  °C), наблюдается резкий излом на кривой температурозависимой активности сукцинатдегидрогеназы митохондрий крыс, а излом этой кривой у зимоспящих млекопитающих определяется при более низких температурах,  $18 \div 20$  °C. Очевидно, в температурном диапазоне  $32 \div 20$  °C происходит фазовый переход аннулярных липидов микросом, выделенных из печени крыс, который приводит к изменению ферментативной активности мембран микросом. Фазовый переход мембранных липидов микросомальной фракции гибернирующих животных наблюдается при температурах ниже 20 °C. Например, Na-K-Mg-АТФазная активность микросомальной фракции мозга европейских ежей в период спячки и у лягушек сохраняется при температурах до 1 °C [5]. Согласно нашим данным, у сусликов при температуре 13 °C происходит снижение скорости потре-

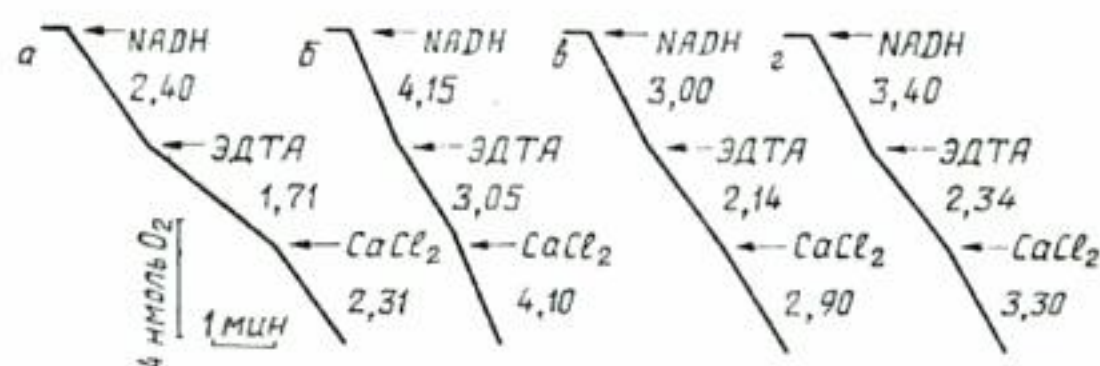


Рис. 1. Скорость потребления кислорода при окислении NADH в микросомах сусликов и крыс при 32 °C (нмоль  $\text{O}_2 \cdot$  мин $^{-1} \cdot$   $\text{мг}^{-1}$  белка): а — суслик зимоспящий; б — суслик, бодрствующий в летний период; в — суслик, бодрствующий в осенний период; з — крыса

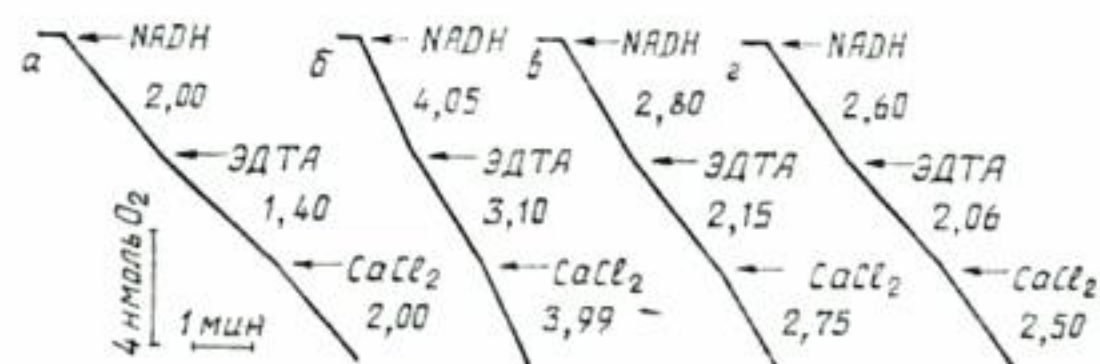


Рис. 2. Скорость потребления кислорода при окислении NADH в микросомах сусликов и крыс при 20 °C (нмоль  $\text{O}_2 \cdot$  мин $^{-1} \cdot$   $\text{мг}^{-1}$  белка): а — суслик зимоспящий; б — суслик, бодрствующий в летний период; в — суслик, бодрствующий в осенний период; з — крыса

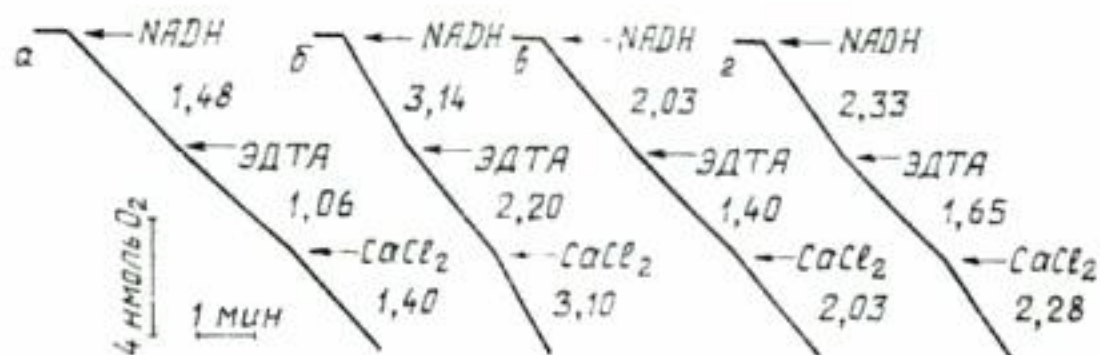


Рис. 3. Скорость потребления кислорода при окислении NADH в микросомах сусликов и крыс при 13 °C (нмоль  $\text{O}_2 \cdot$  мин $^{-1} \cdot$   $\text{мг}^{-1}$  белка): а — суслик зимоспящий; б — суслик, бодрствующий в летний период; в — суслик, бодрствующий в осенний период; з — крыса

ния кислорода при окислении NADH, NADH-феррицианид-редуктазной активности, однако полного ингибирования работы митохондриальной цепи этих животных не наблюдается.

Таким образом, активность ферментов NADH-зависимой цепи переноса электронов мембран митохондрий сохраняется при пониженных температурах, что связано, по-видимому, с адаптационными изменениями в липидах клеточных мембран. При этом нельзя исключить также, что в условиях холодовой адаптации может меняться конформационное состояние ферментов, в результате чего сохраняется их каталитическая активность при пониженных температурах.

1. Арчаков А. И. Митохондриальное окисление. — М. : Наука, 1975. — 327 с.
2. Карузина И. И., Арчаков А. И. Выделение митохондриальной фракции печени и характеристика ее окислительных систем // Современные методы в биохимии. — М. : Медицина, 1977. — С. 49—62.
3. Карякин А. В., Арчаков А. И. Межмембранный перенос электронов // Успехи современной биологии. — 1981. — 91, вып. 1. — С. 74—89.
4. Хочачка П., Сомеро Дж. Стратегия биохимической адаптации. — М. : Мир, 1977. — 398 с.
5. Bowler K., Duncan C. L. The temperature characteristics of brain mitochondrial ATPases of the hedgehog associated with hibernation // Physiol. Zool. — 1968. — 42, N 2. — P. 211—219.
6. Fujii D. K., Fulco A. T. Biosynthesis of unsaturated fatty acids by bacilli : Hyperinduction and modulation of desaturase biosynthesis // J. Biol. Chem. — 1977. — 252, N 2. — P. 3660—3670.
7. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent // J. Biol. Chem. — 1951. — 193, N 1. — P. 265—275.

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

Получена 21.01.86

УДК 611—018.63.832.9

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

## **ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИИ И КРАНИОЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ГИПОТЕРМИИ НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ МИОКАРДА БЕЛЫХ КРЫС**

В последние годы в медико-биологических исследованиях и в клинической практике все шире используют методы искусственной гипотермии, в основе лечебного и защитного действия которой лежат эффекты обратной зависимости скорости химических и биохимических реакций от температурных условий среды. При охлаждении организма происходит замедление процессов тканевого метаболизма и, как следствие, значительное уменьшение потребления кислорода клетками, что повышает устойчивость организма к повреждающему действию экстремальных условий среды, в том числе гипоксии. Как правило, краниоцеребральная гипотермия (КЦГ) проводится на фоне частичного фармакологического выключения центров терморегуляции. В этой связи особую актуальность приобретает изучение морфо-функциональных изменений миокарда под влиянием медикаментозной гипоксии (МГ) и в условиях различных режимов КЦГ.

С помощью методов электронной микроскопии и морфометрии изучены структурные изменения сердечной мышцы крыс при МГ в сочетании с КЦГ. Эксперимент проведен на пяти группах животных по 3—5 особей в каждой. Возраст белых крыс-самцов во всех группах одинаков и составил 2,5 месяца. I группа — контрольная, животным вводился внутримышечно физиологический раствор; II группа — крысы в состоянии МГ в условиях нормотермии со сроком исследования 1 ч; III группа — животные в состоянии МГ, которым проводилась КЦГ в течение 1 ч до температуры тела 33—34 °С; IV группа — крысы в состоянии МГ в условиях нормотермии со сроком

исследования 4 ч; V группа — крысы в состоянии МГ в условиях КЦГ, ректальная температура которых понижалась до  $28 \div 30^\circ\text{C}$ , срок наблюдения 4 ч. МГ осуществляли с помощью тиопентала натрия в дозе 120 мг/кг массы и оксибутирата натрия в дозе 200 мг/кг массы тела. По окончании эксперимента крыс декапитировали. Для электронно-микроскопических исследований из левого желудочка сердца животных иссекали кусочки миокарда и обрабатывали их по общепринятым методикам. Морфометрический анализ серии негативов ультратонких срезов миокарда, полученных при одинаковом увеличении ( $\times 2000$ ), проведен на специальном приборе [2]. С помощью точечной тест-системы ( $t_0 = 384$ ) в негативах определяли: объемные доли мышечного ( $v_V^m$ ) и стромального ( $v_V^{st}$ ) компонентов миокарда, относительный объем капилляров ( $v_V^{kap}$ ); в кардиомиоцитах — объемные доли митохондриальных ( $v_V^{mx}$ ) и миофибриллярных ( $v_V^{mf}$ ) структур, а также относительный объем гиалоплазмы ( $v_V^{gp}$ ). Стабилизированные значе-

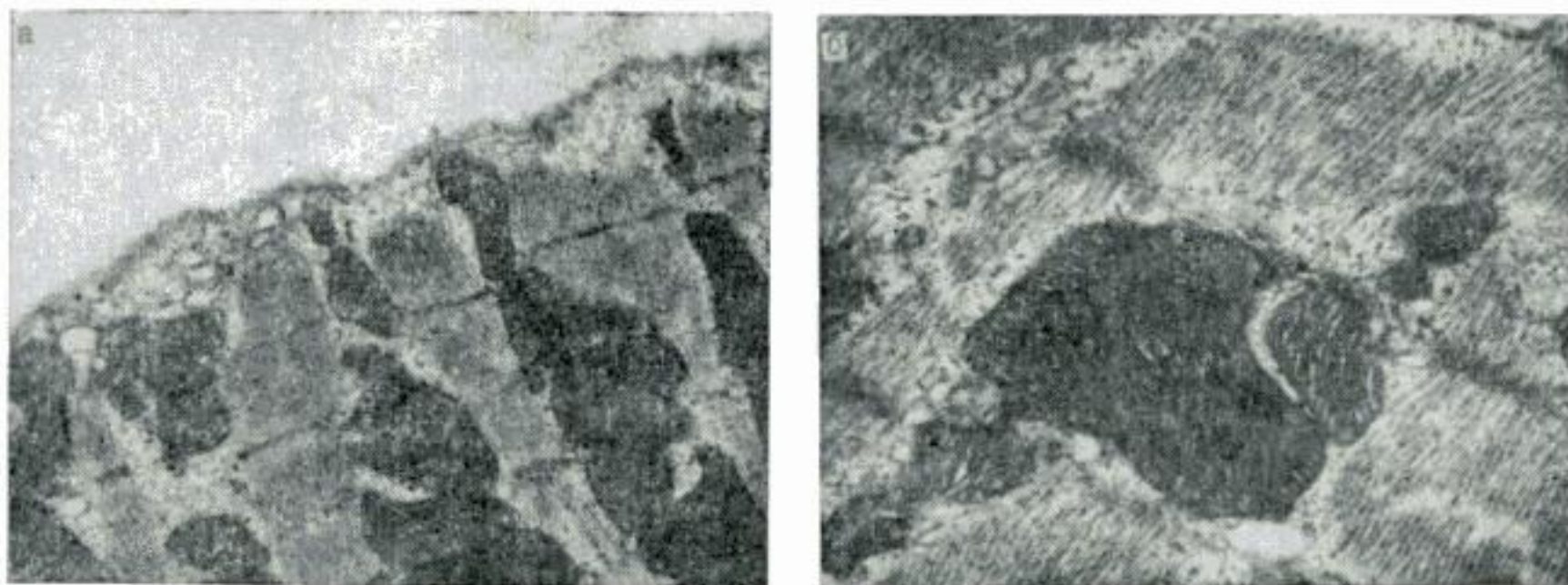


Рис. 1. Ультраструктура кардиомиоцитов крыс в норме: а — послойное расположение миофибрилл и митохондрий в цитоплазме сердечных миоцитов; б — отпочковывание мелких митохондрий от более крупных органелл

ния вышеперечисленных морфометрических показателей и ошибку средней определяли с помощью графико-аналитического метода [1].

В сердечной мышце животных контрольной группы многие транзиторные капилляры полнокровны и ориентированы вдоль и поперек направления мышечных волокон. Мелкие обменные капилляры расположены в непосредственной близости от кардиомиоцитов. В основном веществе интерстиция выявляются отдельные группы коллагеновых волокон и многочисленные мелкозернистые образования. Ядра в кардиомиоцитах часто удлиненной, эллипсоидной формы и ориентированы вдоль направления мышечных волокон. Ядерная мембрана умеренно волнистая, образует единичные инвагинаты. Ядрышки в количестве 1—3 небольших размеров повышенной электронной плотности. Гетерохроматин узкой полоской выявляется вдоль периметра сечения ядра, отдельные его глыбки разной величины и формы хаотично распределены в кариоплазме. Основными структурно-функциональными компонентами мышечных клеток сердца белых крыс являются миофибриллы и митохондрии, которые в сердечных миоцитах располагаются, в основном, послойно (рис. 1, а). Миофибриллы имеют типичное строение. Митохондрии небольших размеров округлой и эллипсоидной формы. Изредка выявляются органеллы более сложной конфигурации. Наблюдается отпочковывание мелких митохондрий от более крупных органелл (рис. 1, б). Для митохондрий кардиомиоцитов молодых животных характерно наличие многочисленных крист, которые, контактируя друг с другом локальными участками боковой поверхности, образуют сетчатые структуры, в ячейках которых просматривается светлый матрикс. В сечениях митохондрий четко контурированные кристы выявляются в том случае, когда угол между направлением боковой поверхности крист и ультратонким срезом приближается к  $90^\circ$ . Если этот угол острый или тупой, контуры сечений крист нечеткие,

расплывчатые, и такие митохондрии представлены в виде органелл с мелкозернистым электронно-плотным содержимым. Пузырьки и каналцы саркоплазматической сети (СС) небольших размеров и часто располагаются вблизи ядра, в скоплениях митохондрий. В сократительном компоненте сердечных миоцитов элементы СС представлены, в основном, мелкими пузырьками и каналцами, которые в виде коротких цепочек выявляются среди пучков миофиламентов. На периферии кардиомиоцитов под плазмалеммой встречаются умеренно набухшие элементы СС (рис. 1, а). Плазмалемма мышечных клеток слегка волнистая, редко образует инвагинаты, в которых располагаются отдельные митохондрии.

В миокарде животных II группы выявляется резкий отек основного вещества интерстиция. В отечной межмышечной соединительной ткани довольно много гиперемизированных капилляров, что свидетельствует об их повышенном тонусе. Наблюдается сладж эритроцитов, диапедез форменных

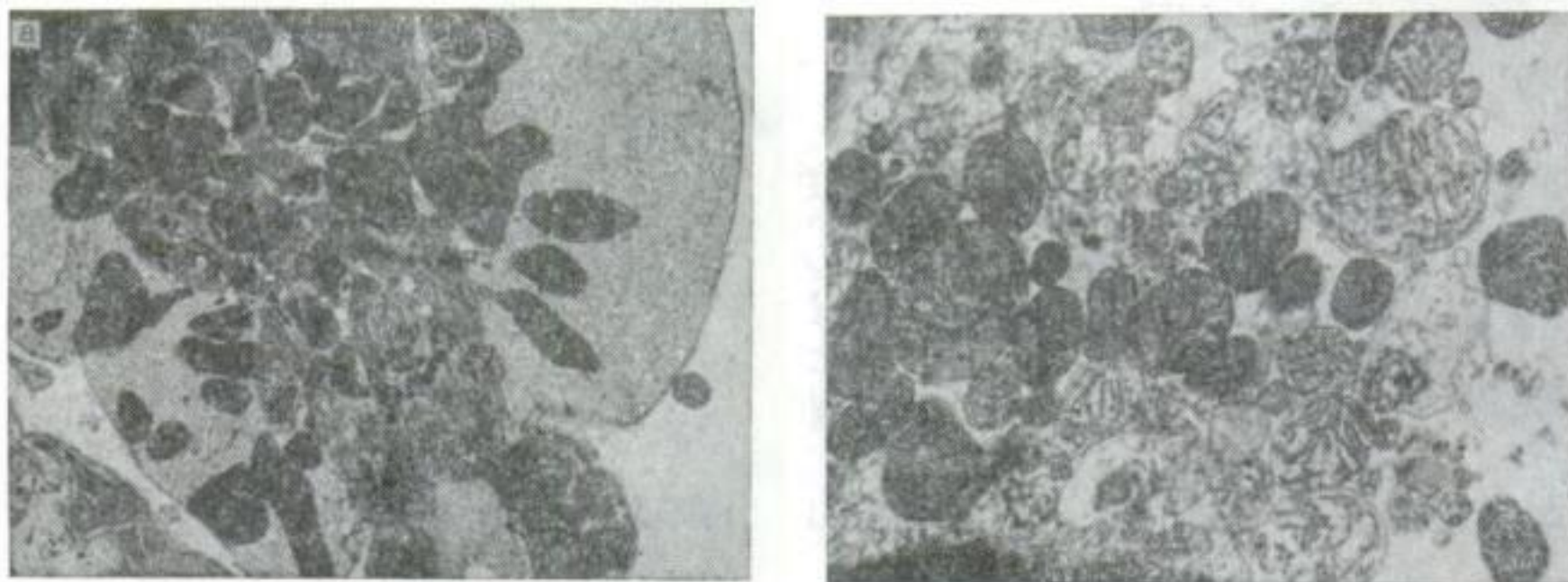


Рис. 2. Фрагмент миокарда крыс в состоянии МГ в течение 1 часа: а — участок колликативного некроза в сочетании с локальным периферическим отеком сердечного миоцита; б — повреждение плазмалеммы кардиомиоцита и выход митохондрий в интерстициальное пространство

элементов крови через стенки капилляров, умеренное набухание эндотелиоцитов. Вследствие отека многие обменные капилляры расположены довольно далеко от кардиомиоцитов. Характерной особенностью морфологических изменений миокарда крыс в состоянии МГ является выраженная дегидратация сердечных миоцитов и контрактура миофибрилл. В поврежденных кардиомиоцитах наблюдаются участки колликативного некроза в сочетании с локальным периферическим отеком (рис. 2, а). Выявляются мышечные клетки с поврежденной плазмалеммой. При этом происходит выход в интерстициальное пространство многочисленных светлых набухших и темных осмиофильных митохондрий (рис. 2, б). В цитоплазме поврежденных кардиомиоцитов наблюдается очаговый лизис миофиламентов. Митохондрии в сердечных миоцитах умеренно набухшие. В этих органеллах выявляется дезорганизация крист, частичное их разрушение, просветление матрикса. В зонах локального периферического отека митохондрии темные, осмиофильны и небольших размеров.

В сердечной мышце крыс, находившихся в состоянии МГ в течение 4 ч, наблюдается значительный отек основного вещества интерстиция. В мышечном компоненте миокарда наркотизированных животных в зависимости от вида и тяжести клеточных повреждений можно выделить четыре группы кардиомиоцитов. Первая группа — мышечные клетки, в которых наблюдается дегидратация цитоплазмы, значительная складчатость плазмалеммы, резкое сжатие ядра, маргинация хроматина, складчатость кариолеммы, тотальная контрактура миофибрилл (рис. 3, а). Митохондрии в этих клетках находятся в умеренно набухом состоянии с четко выраженными извилинами кристами, светлым матриксом. Канальцы и пузырьки СС умеренно расширены, искривлены (рис. 3, б). Вторая группа — сердечные миоциты с характерными морфологическими признаками повреждения по типу ва-

куольной дистрофии. При электронно-микроскопическом исследовании в этих клетках обнаружено значительное расширение (вакуолизация) элементов СС и канальцев Т-системы (рис. 3, в). Многие вакуолизированные цистерны СС соизмеримы с размерами сечений митохондрий. Возможно, что элементы СС являются основными структурами, захватывающими воду из интерстициального пространства внутрь кардиомиоцитов. В сердечных миоцитах отмечается гетерогенность митохондрий. Довольно много темных органелл, встречаются также светлые набухшие митохондрии. Миофибриллярный компонент мышечных клеток находится в состоянии сокращения.

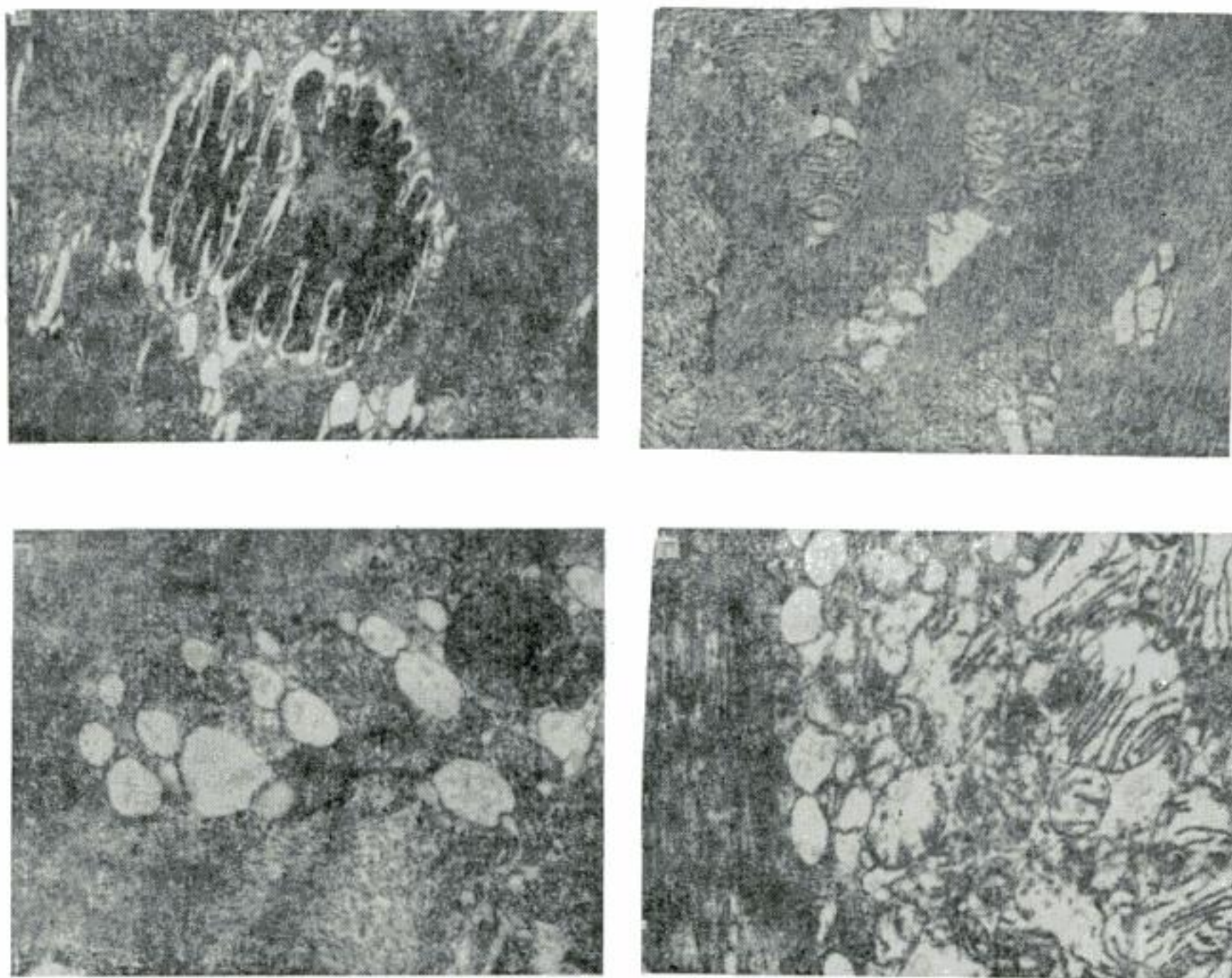


Рис. 3. Ультраструктура кардиомиоцитов крыс, находившихся в состоянии МГ в течение 4 часов: а — сжатие ядра, маргинация хроматина, контрактура миофибрилл, складчатость плазмалеммы; б — контрактура миофибрилл, умеренное набухание митохондрий и элементов саркоплазматической сети; г — тотальная вакуолизация митохондрий и элементов саркоплазматической сети, лизис митохондриальных мембран

Третья группа — сердечные миоциты, в цитоплазме которых в процесс вакуольной дистрофии вовлечены не только элементы СС, но и большинство митохондрий (рис. 3, г). Эти органеллы находятся в вакуолизированном состоянии. Наблюдаются разрывы митохондриальных мембран и цистерн СС, очаговое разрушение миофибрилл, отек гиалоплазмы. Четвертая группа представлена кардиомиоцитами, в которых на значительном протяжении повреждена плазмалемма, что приводит к периферическому отеку и «вымыванию» в межклеточное пространство многочисленных митохондрий. Проведенные исследования позволили установить наличие также и смешанных форм вышеперечисленных повреждений в пределах одной мышечной клетки что создает большое многообразие в цито- и гистоархитектонике миокарда крыс, находящихся в состоянии МГ.

Краниocereбральная гипотермия в течение 1 ч ( $t = 34 \div 33^\circ\text{C}$ ) существенно не влияет на морфологию поврежденного миокарда крыс в состоянии МГ III экспериментальной группы. В сердечной мышце животных наблюдается выраженный отек основного вещества интерстиция. В мышечном компоненте преобладают темные кардиомиоциты, для которых характерны

дегидратация цитоплазмы, контрактура миофибрилл, умеренное набухание митохондрий. Выявляются сердечные миоциты с признаками умеренной вакуольной дистрофии.

В сердечной мышце животных V группы по сравнению с крысами IV группы наблюдаются элементы нормализации структурной организации поврежденного миокарда. Значительно уменьшен отек основного вещества интерстиция, ультраструктура большинства капилляров в пределах нормы (рис. 4, а). Эндотелиоциты уплощены, плазмалемма этих клеток образует многочисленные выпячивания в просвет сосуда. Цитоплазма эндотелиоцитов насыщена органеллами и включениями в виде гранул гликогена. Вдоль

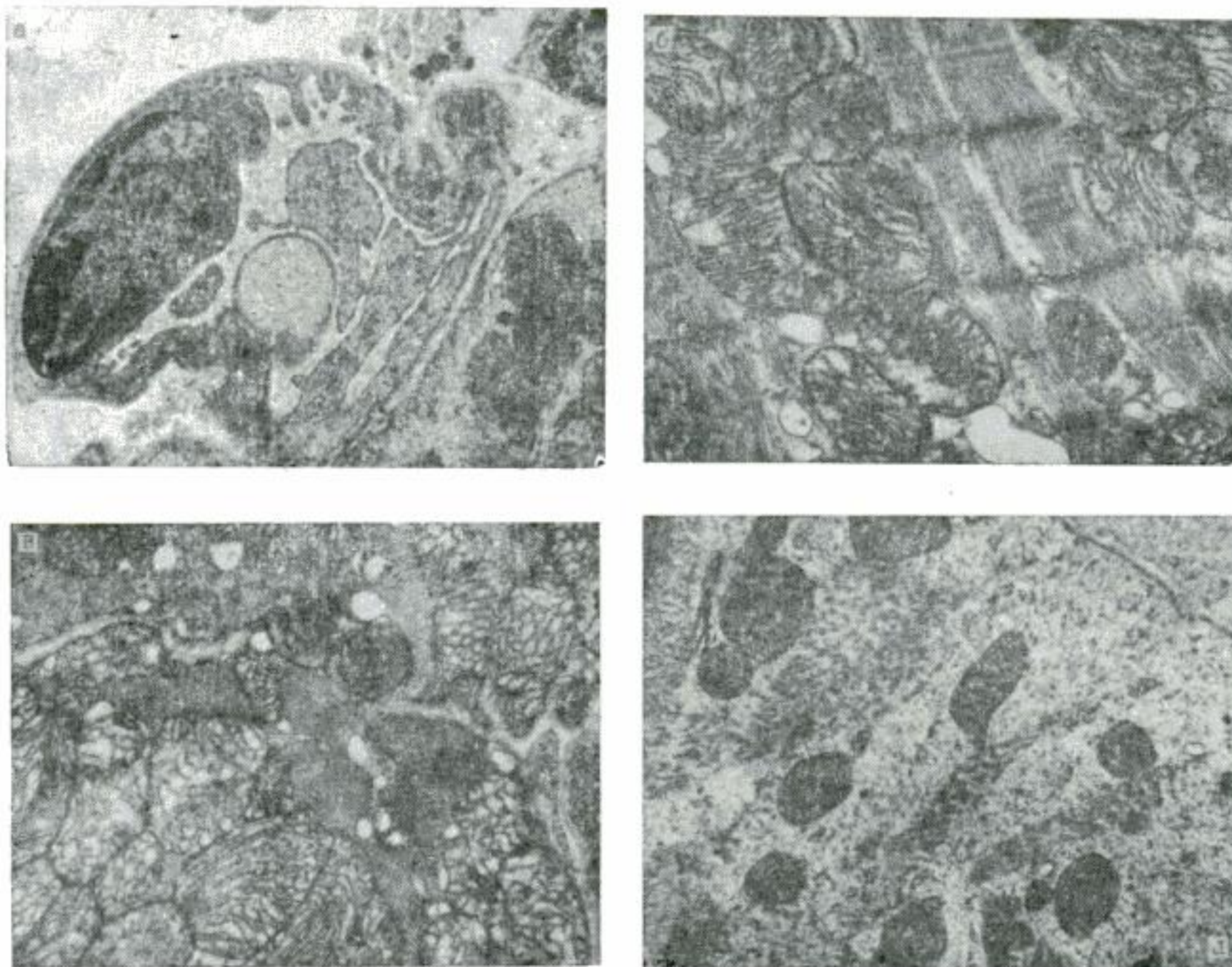


Рис. 4. Фрагмент миокарда крыс в условиях воздействия МГ с краниocereбральной гипотермией ( $t = 30 \div 28^\circ\text{C}$ ): а — ультраструктура капилляра в пределах нормы; б — умеренная контрактура миофибрилл, расширение элементов саркоплазматической сети, неравномерное просветление матрикса митохондрий; в — умеренная вакуольная дистрофия кардиомиоцитов; г — зона колликативного некроза мышечной клетки сердца

боковой поверхности плазмалеммы эндотелиоцитов со стороны цитоплазмы расположено множество мелких пиноцитозных везикул. Значительно реже в миокарде охлажденных до  $30 \div 28^\circ\text{C}$  животных выявляются полнокровные капилляры с умеренно набухшими эндотелиоцитами. В мышечном компоненте миокарда можно выделить две большие группы кардиомиоцитов, существенно различающихся по морфо-функциональному состоянию основных органелл. Первая группа — сердечные миоциты с малоизмененной ультраструктурой (рис. 4, б). Миофибриллы в таких клетках умеренно сокращены и имеют хорошо выраженную поперечную исчерченность. В саркомерах четко контурированы А-, I-, H-полоски. Митохондрии и миофибриллы в цитоплазме мышечных клеток расположены преимущественно послойно. Митохондрии несколько набухшие, содержат многочисленные кристы и светлый матрикс, в котором выявляются мельчайшие пылевидные зерна. Элементы СС заметно расширены. Плазмалемма кардиомиоцитов слегка волнистая и только в местах локализации полос сокращения миофибрилл имеет складчатый вид. Вторая группа — мышечные клетки с характерными морфологическими признаками умеренной вакуольной дистрофии (рис. 4, в).

Миофибриллы резко сокращены. Митохондрии и многочисленные элементы СС увеличенных размеров, отечные. Кристы в митохондриях сетчатой формы, матрикс неравномерно просветлен. На периферии некоторых кардиомиоцитов выявляются зоны локального отека и колликовационного некроза (рис. 4, з).

Проведенный морфометрический анализ подтвердил наличие сложной динамики структурных изменений в миокарде крыс в состоянии МГ и в условиях сочетанного воздействия МГ с гипотермией (таблица). Как оказалось, продолжительная МГ вызывает значительное увеличение объемной доли стромального компонента в сердечной мышце животных вследствие интерстициального отека. По сравнению с контролем в миокарде крыс II и IV групп значения показателя  $v_V^{ст}$  возрастают почти в 1,3 раза.

Результаты проведенных исследований позволяют предположить, что приток жидкости в интерстициальное пространство миокарда происходит в большей мере из кровеносного русла и из цитоплазмы сердечных миоцитов вследствие ее дегидратации. Подтверждением этому является значительное уменьшение объемной доли гиалоплазмы в мышечных клетках. Увеличение проницаемости эндотелиоцитов капилляров для плазмы крови, диапедез клеток крови через стенки микрососудов в отечный интерстиций миокарда животных в состоянии МГ происходят в условиях незначительного изменения относительного объема микроциркуляторного русла:  $v_V^{кап} \in (6,00 — 7,40) \%$ . В состоянии гипоксии в мышечном компоненте миокарда крыс уменьшается объемная доля миофибрилл и возрастает относительный объем митохондрий. Эти морфо-функциональные изменения обусловлены набуханием и вакуолизацией части митохондрий, контрактурой миофибрилл. Известно, что в норме функционирование сердечной мышцы половозрелых животных происходит в условиях сохранения и поддержания на высоком уровне регуляции структурного гомеостаза [3]. Так, соотношение объемных долей мышечного и стромального компонентов в миокарде животных в условиях физиологической нормы близко к величине 80 : 20. В сердечной мышце крыс в состоянии МГ это соотношение изменяется — 75 : 25. В кардиомиоцитах контрольных крыс соотношение объемных долей комплекса «миофибриллы + митохондрии» и гиалоплазмы близко к 80 : 10; при гипоксии — 85,30 : 4,50. Приведенные данные свидетельствуют, что в состоянии МГ функционирование миокарда крыс происходит в условиях существенного нарушения структурного гомеостаза, что, по-видимому, и является одной из причин гибели части животных в эксперименте. Краниocereбральная гипотермия длительностью 1 ч в диапазоне температур 34 ÷ 33 °С обладает незначительными кардиопротекторными свойствами. В кардиомиоцитах достоверно возрастает лишь объемная доля гиалоплазмы. Остальные морфометрические показатели без существенных изменений. Умеренная краниocereбральная гипотермия (30 ÷ 28 °С) длительностью 4 ч эффективно защищает миокард от негативного воздействия гипоксии. Мышечные клетки сердца функцио-

Динамика структурных изменений миокарда левого желудочка белых крыс при воздействии гипоксии и краниocereбральной гипотермии, ( $M \pm m$ ) %

| $v_V^м$                                          | $v_V^{ст}$    | $v_V^{кап}$  | $v_V^{мх}$    | $v_V^{мф}$    | $v_V^{vx} + v_V^{мф}$ | $v_V^{гп}$    |
|--------------------------------------------------|---------------|--------------|---------------|---------------|-----------------------|---------------|
| Н о р м а                                        |               |              |               |               |                       |               |
| 80,00<br>0,50                                    | 20,00<br>0,50 | 7,40<br>0,50 | 33,90<br>0,30 | 47,40<br>0,30 | 81,30<br>0,60         | 10,00<br>0,50 |
| Г и п о к с и я (1 ч)                            |               |              |               |               |                       |               |
| 74,60<br>0,50                                    | 25,40<br>0,50 | 6,00<br>0,50 | 40,70<br>0,30 | 44,60<br>0,30 | 85,30<br>0,60         | 4,50<br>0,50  |
| Г и п о к с и я + КЦГ (1 ч, $t = 34 \div 33$ °С) |               |              |               |               |                       |               |
| 75,30<br>0,50                                    | 24,70<br>0,50 | 6,80<br>0,50 | 40,00<br>0,30 | 43,20<br>0,30 | 83,20<br>0,60         | 5,70<br>0,50  |
| Г и п о к с и я (4 ч)                            |               |              |               |               |                       |               |
| 75,30<br>0,50                                    | 24,70<br>0,50 | 6,85<br>0,50 | 39,60<br>0,30 | 42,90<br>0,30 | 82,50<br>0,60         | 6,00<br>0,50  |
| Г и п о к с и я + КЦГ (4 ч, $t = 30 \div 28$ °С) |               |              |               |               |                       |               |
| 79,50<br>0,50                                    | 20,50<br>0,50 | 7,20<br>0,50 | 36,50<br>0,30 | 44,50<br>0,30 | 81,00<br>0,60         | 8,00<br>0,50  |

нируют в более благоприятных условиях. Параметры структурной организации сердечной мышцы и кардиомиоцитов приближаются к характерным для состояния физиологической нормы. Однако относительный объем митохондрий довольно высок (36,50 %, в норме — 33,90 %), что свидетельствует о состоянии функционального напряжения миокарда.

Таким образом, в результате воздействия МГ (тиопентал натрия в дозе 120 мг/кг) в сердечной мышце животных выявляются следующие морфологические проявления повреждения клеток и неклеточных элементов: интерстициальный отек, нарушение проницаемости капилляров, набухание эндотелиоцитов, микрокровоизлияния, дегидратация кардиомиоцитов, контрактура миофибрилл, набухание и вакуолизация митохондрий и элементов СС, очаговый миоцитоллиз. Краниocereбральная гипотермия в диапазоне температур (30 ÷ 28 °С) значительно снижает повреждающее действие МГ на миокард животных, что проявляется в нормализации структурной организации сердечной мышцы.

1. Загоруйко Г. Е., Загоруйко Ю. В. Графико-аналитический метод в морфометрическом анализе ультраструктур мышечных клеток сердца // Научно-технический прогресс в кардиологии.— Харьков : Б. и., 1985.— С. 11—14.
2. Загоруйко Г. Е., Офицеров В. Н. Механическое устройство для морфометрического и ориентационного анализа биологических структур // Бюлл. эксперим. биологии и медицины.— 1979.— № 11.— С. 625—626.
3. Офицеров В. Н., Загоруйко Г. Е. Некоторые закономерности структурного гомеостаза кардиомиоцитов // Там же.— 1977.— № 11.— С. 613—615.

Филиал Киевского НИИ кардиологии  
им. акад. Н. Д. Стражеско,

Поступила 26.03.86

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

УДК 612.35.043—044 86

**Б. П. Сандомирский, Н. С. Сигал, Н. И. Коцько**

## **ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ПЕЧЕНИ КРЫС ПОСЛЕ КРИОВОЗДЕЙСТВИЙ**

Низкотемпературные воздействия становятся надежным элементом хирургической гепатологии и используются как с целью деструкции патологически измененных тканей [1], так и для стимуляции процессов регенерации [4]. Однако динамика пролиферативных процессов клеточных элементов печени после локальных холодовых воздействий освещена фрагментарно [5].

Целью настоящей работы явилось изучение митотической активности и ДНК-синтезирующей способности гепатоцитов и купферовских клеток после различных по локализации и объему криоповреждений печени.

Работа выполнена на 108 интактных половозрелых крысах-самцах линии Вистар массой 250—300 г, которые были разделены на 3 группы по 36 животных в каждой. К 1-й группе были отнесены крысы с локализованным крионекрозом в левой доле печени объемом 10—12 % массы органа, ко 2-й группе — животные с очагами крионекроза, рассеянными по печени в разных ее долях, общим объемом 5—8 %, 3-ю группу составили контрольные крысы. Оперативные вмешательства осуществляли под ингаляционным эфирным наркозом. После верхнесрединной лапаротомии одну или две левых долей печени выводили в рану и подвергали замораживанию. Криовоздействие выполняли азотным криоаппликатором диаметром 4 мм с температурой на воздухе —180 °С и экспозицией 1—2 мин в каждой точке. Объем замороженной ткани печени определяли путем ее выделения и взвешивания непосредственно после окснчания криовоздействия.

Регенерационную потенцию печени определяли методом радиавтографического исследования ДНК-синтезирующей способности клеток Купфера и гепатоцитов, для чего за 2 ч до забоя однократно парентерально вводили  $^3\text{H}$ -тимидин в количестве 1 мКи на 1 г массы тела (37 МБК) молекулярной активности 48 кКи/моль (1790 ТБК/моль). Кроме того, подсчитывали митотический индекс (МИ) гепатоцитов. Забой животных осуществляли под эфирным наркозом путем декапитации через 24,36 ч и 3, 7, 30, 60 сут после операций, так что на каждый срок исследования было по 18 крыс. Определение митотической активности проводили у всех экспериментальных животных, а ДНК-синтезирующей способности — у 18 крыс каждой группы, т. е. у 54 крыс. Фрагменты печени для исследования брали на расстоянии 0,5—0,8 см от границы крионекроза, т. е. в пределах интактной ткани. Образцы фиксировали в смеси Карнуа, целлоидин-парафиновые срезы для приготовления радиоавтографов покрывали жидкой фотоэмульсией типа «М» с последующей экспозицией в течение трех недель. На окрашенных гематоксилином и эозином препаратах печени определяли уровень митотической активности гепатоцитов, подсчитывая 4000—5000 клеток в каждом гистологическом препарате, и выражали в промилле. Индекс меченых ядер (ИМЯ) гепатоцитов и купферовских клеток подсчитывали в 50 полях зрения каждого образца и выражали в процентах. Результаты исследования подвергали статистической обработке по Фишеру—Стьюденту, уровень достоверности 95 %.

Оценку ДНК-синтезирующей способности гепатоцитов и печеночных макрофагов производили в каждом сроке наблюдения в опытных группах относительно контроля (таблица). В 1-й группе животных с локализованным

**Индекс меченых  $^3\text{H}$ -тимидином гепатоцитов и клеток Купфера у крыс после криовоздействия на печень, %**

| Индекс меченых ядер | Срок наблюдения после криовоздействия |                   |                   |                   |                   |                   |
|---------------------|---------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                     | 24 ч                                  | 36 ч              | 3 сут             | 7 сут             | 30 сут            | 60 сут            |
| Гепатоциты          |                                       |                   |                   |                   |                   |                   |
| группа 1            | $7,01 \pm 1,43^*$                     | $2,95 \pm 1,05^*$ | $2,75 \pm 0,40^*$ | $0,88 \pm 0,07^*$ | $0,37 \pm 0,07$   | $0,37 \pm 0,01$   |
| группа 2            | $14,77 \pm 1,55^*$                    | $5,75 \pm 0,07^*$ | $4,35 \pm 0,07^*$ | $0,63 \pm 0,03^*$ | $0,77 \pm 0,17^*$ | $0,41 \pm 0,18$   |
| контроль            | $0,17 \pm 0,03$                       | $0,24 \pm 0,03$   | $0,32 \pm 0,03$   | $0,35 \pm 0,03$   | $0,40 \pm 0,04$   | $0,28 \pm 0,06$   |
| Клетки Купфера      |                                       |                   |                   |                   |                   |                   |
| группа 1            | $0,05 \pm 0,01^*$                     | $0,20 \pm 0,14^*$ | $1,15 \pm 0,21^*$ | $0,28 \pm 0,13^*$ | $0,27 \pm 0,05^*$ | $0,08 \pm 0,02^*$ |
| группа 2            | $0,25 \pm 0,07^*$                     | $0,35 \pm 0,16^*$ | $1,20 \pm 0,16^*$ | $0,11 \pm 0,02^*$ | $0,31 \pm 0,03^*$ | $0,13 \pm 0,03^*$ |
| контроль            | $0,01 \pm 0,00$                       | $0,02 \pm 0,01$   | $0,01 \pm 0,00$   | $0,02 \pm 0,01$   | $0,02 \pm 0,00$   | $0,01 \pm 0,00$   |

Примечание. Здесь \* различия статистически достоверны по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ).

в левой доле печени крионекрозом объемом 10—12 % массы органа через 24 ч ИМЯ гепатоцитов резко возрастает, достигая уровня  $(7,01 \pm 1,43)\%$ . Показатель ДНК-синтезирующей способности гепатоцитов, выявленный в этом сроке наблюдения, был наиболее высоким по сравнению с показателями всех последующих этапов исследования. В дальнейшем наблюдалось постепенное снижение количества гепатоцитов, включивших радиоактивную метку. Так, через 36 ч после криовоздействия ИМЯ снизился до  $(2,95 \pm 1,05)\%$ , через 3 сут составил  $(2,75 \pm 0,40)\%$ , а на 7 сут —  $(0,88 \pm 0,07)\%$ . В сроки наблюдения 30 и 60 сут после операции способность гепатоцитов к синтезу ДНК была наименее выраженной, что определялось более низкими показателями ИМЯ, соответственно  $(0,37 \pm 0,07)\%$  и  $(0,37 \pm 0,01)\%$ . Эти значения не имели достоверного статистического различия с контрольными. Топография распределения гепатоцитов с  $^3\text{H}$ -тимидиновой меткой характеризовалась в ранние сроки наблюдения (24 и 36 ч) локализацией этих клеток по периферии печеночных долек ближе к зонам триад (рис. 1), позднее меченные радиоактивным предшественником гепатоциты встречались и в центральных отделах печеночных долек.

У животных 2-й группы с несколькими очагами крионекроза общим объемом 5—8 % массы органа через 24 ч после операции ИМЯ гепатоцитов повысился до  $(14,77 \pm 1,55)\%$ . Через 36 ч показатель метки снижался почти втрое и был равен  $(5,75 \pm 0,07)\%$ . Дальнейшее снижение количества меченых гепатоцитов было не столь резким. К 3 сут ИМЯ составил  $(4,35 \pm 0,07)\%$ , а на 7 сут вновь происходило существенное снижение этого показателя до  $(0,63 \pm 0,03)\%$ . В сроки наблюдения 30 и 60 сут отмечались незначительные колебания ИМЯ гепатоцитов, значения которого оставались выше контрольных. Характер распределения меченных  $^3\text{H}$ -тимидином гепатоцитов был подобен распределению этих клеток в гисторадиоавтографах печени животных 1-й группы. На ранних этапах наиболее активными ДНК-синтезирующими зонами были также периферические отделы печеночной доли (рис. 2), но в дальнейшем наблюдалась активация и других ее отделов.

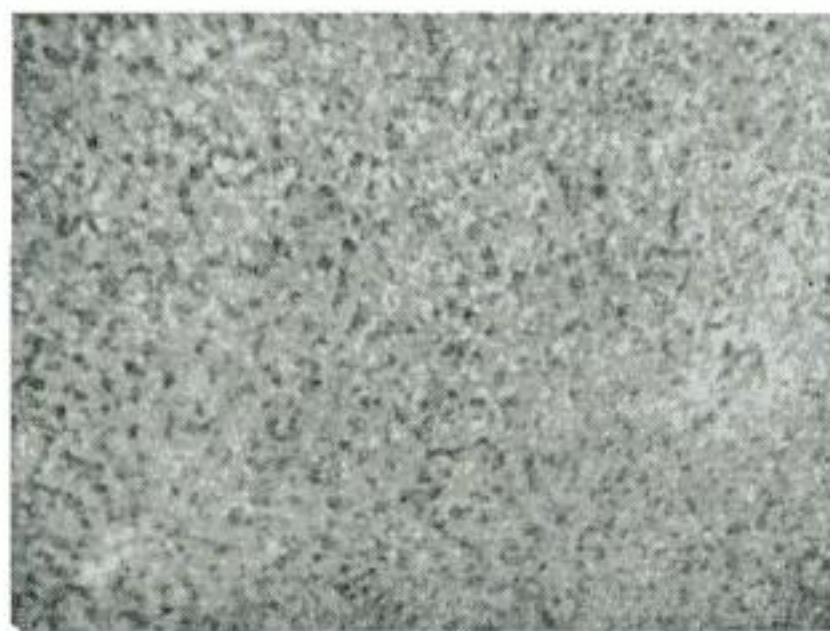
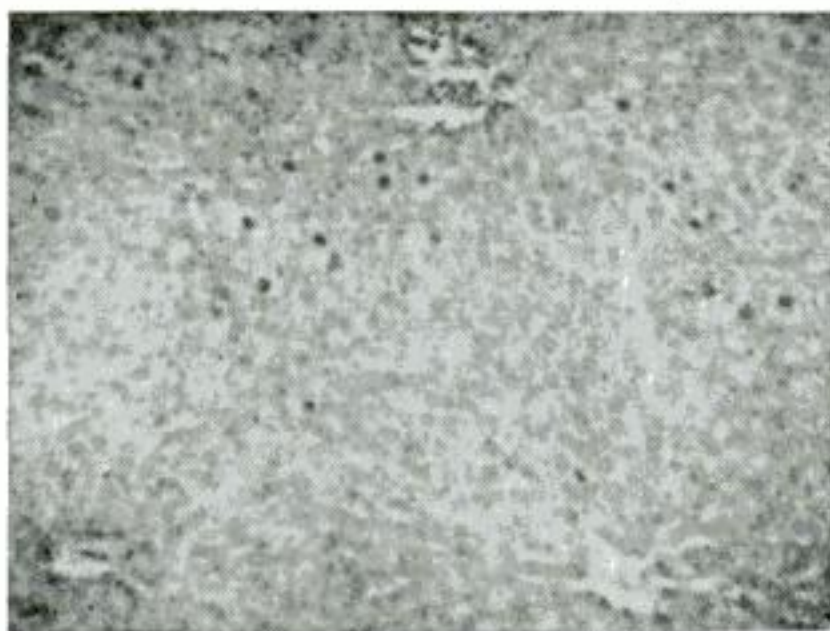


Рис. 1. Автограф печени крысы с локализованным крионекрозом в левой доле органа. Меченные  $^3\text{H}$ -тимидином гепатоциты локализованы в зонах триад. Гематоксилин и эозин.  $\times 100$

Рис. 2. Автограф печени крысы с очаговыми крионекрозами, рассеянными по поверхности органа. Локализация ДНК-синтезирующих гепатоцитов в периферических отделах печеночной доли. Гематоксилин и эозин.  $\times 100$

Сравнительное изучение показателей индекса меченых ядер гепатоцитов в 1-й и 2-й опытных группах показали одинаковую направленность ДНК-синтезирующих процессов в ответ на криовоздействия. Однако у животных 2-й группы количество гепатоцитов, включивших радиоактивную метку, в ранние сроки наблюдения выше, чем в 1-й группе. Так, через 24 ч у крыс с несколькими зонами крионекроза в печени ИМЯ был в два раза выше, чем в 1-й группе. Подобная разница в количественных показателях отмечалась до 3 сут после криовоздействий. В последующие сроки восстановительного процесса различия между показателями 1-й и 2-й групп животных были менее выраженными.

Полученные результаты свидетельствуют о зависимости пролиферативной активности гепатоцитов от характера криовоздействия на ранних этапах репарации. Криовоздействие, рассеянное по поверхности печени в разных ее долях, оказывало более выраженный стимулирующий пролиферацию эффект. Можно предположить, что такое воздействие способствует активации нейрогуморальных и тканевых факторов регуляции репаративного процесса [3]. При оценке состояния купферовских клеток спустя 24—36 ч после различных по характеру криовоздействий на печень во всех сериях экспериментов отмечена их повышенная реактивность по сравнению с контролем (таблица). На 3 сут после операции ИМЯ печеночных макрофагов увеличивался и достигал максимальных значений. Так, при анализе радиоавтографов печени крыс после криовоздействия на одну долю органа ИМЯ купферовских клеток определялся  $(1,15 \pm 0,21)\%$ , а у животных с рассеянными крионекрозами печени —  $(1,20 \pm 0,16)\%$ . К 7 сут регистрировалось уменьшение количества меченых купферовских клеток до значений  $(0,28 \pm 0,13)\%$  в 1-й группе и  $(0,11 \pm 0,02)\%$  во 2-й группе животных.

На 60 сут наблюдалось дальнейшее уменьшение ИМЯ печеночных макрофагов у всех подопытных групп, но значимые различия между опытными и контрольными данными сохранялись.

Полученные данные показали слабую пролиферацию клеток Купфера в интактной печени и накопление  $^3\text{H}$ -тимидина в печеночных макрофагах после криоповреждения органа. Более высокий по сравнению с контрольным уровень макрофагальной реакции поддерживался в течение всего периода наблюдения, даже тогда, когда синтез ДНК в гепатоцитах снижался. Учитывая современные представления о том, что дифференцированные формы макрофагов, в том числе и купферовские клетки, не синтезируют ДНК, увеличение их количества в регенерирующей печени крыс после криоповреждения происходит, по всей вероятности, за счет притока дополнительной популяции этих клеток в виде ДНК-синтезирующих прекурсоров из костного мозга [2]. Митотический индекс гепатоцитов, отражающий пролиферативную активность печени, в первые 24 ч после различных криовоздействий на этот орган был выше контрольных значений. Максимальное количество делящихся гепатоцитов отмечалось к 36 ч. В препаратах печени крыс 1-й группы МИ составил  $3,34\%$ , а 2-й группы —  $4,20\%$ . На 3 сут эти показатели снижались и достигали значений  $0,92\%$  и  $1,42\%$ . К 7 сут наблюдалось постепенное уменьшение МИ —  $0,20\%$  и  $0,11\%$ , а на 30 сут в препаратах встречались лишь единичные фигуры митозов. На протяжении срока наблюдения делящиеся гепатоциты регистрировались во всех отделах печеночной доли с максимальным количеством в области порталных прослоек через 24—36 ч, в центральных отделах — через 3—7 сут.

Результаты исследования показали, что использованные нами криовоздействия на печень стимулируют пролиферативные потенции гепатоцитов и клеток Купфера. В динамике восстановительного процесса выявлены определенные закономерности. Так, на фоне активации купферовских клеток в гепатоцитах происходит интенсивный синтез ДНК с максимумом через 24 ч. Активация синтеза ДНК предшествует усилению митотической активности гепатоцитов, в дальнейшем на пике митозов через 36 ч ДНК-синтезирующая способность гепатоцитов значительно падает. На этапе последующего снижения пролиферации печеночных клеток резко увеличивается количество клеток Купфера, которое к 7 сут уменьшается, но остается на 30—60 сут выше контрольных значений.

1. Альперович Б. И., Парамонова Л. М., Тюльков Г. И. Криохирurgia очаговых поражений печени // Хирургия. — 1980. — № 1. — С. 70—72.
2. Маянский Д. Н. Клетка Купфера и система мононуклеарных фагоцитов. — Новосибирск : Наука, 1981. — 168 с.
3. Романова Л. К. Регуляция восстановительных процессов. — М.: Изд-во Московского ун-та, 1984. — 209 с.
4. Сандомирский Б. П., Волкова Н. А., Журавлев А. С. и др. Механизмы криостимуляции регенерации поврежденных тканей // Криобиология. — 1985. — № 1. — С. 29—36.
5. Helpap B., Grouls V., Yamashita K., Breining H. The proliferative response of the spleen in cryosurgery // Cryobiology. — 1976. — 13, N 1. — P. 54—60.

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

Поступила 21.05.86

УДК 57.043:615.832.9

**А. Б. Рикберг, С. С. Есьман, Ю. В. Голубев, В. П. Сергиенко**

## **ТЕСТ IN VITRO ДЛЯ КРИОХИРУРГИИ**

Закономерности распределения прямых повреждений клеток при замораживании — отогреве в зонах криодеструкции различных тканей до сих пор остаются малоизученными. Прямая количественная оценка такого

распределения в реальных тканях на экспериментальных животных и, тем более, в клинике связана с трудностями фиксации координат клеток, обеспечения достаточно точной термометрии и определения жизнеспособности клеток непосредственно после криовоздействия. Теоретические оценки предполагаемого распределения выживаемости в зоне замораживания, приведенные в работах Мейзура [4] и Фарранта [2], имеют в основном лишь качественный характер. Поэтому важное значение в изучении повреждений при криовоздействии на ткани приобретает экспериментальное моделирование на клетках *in vitro*. В работах Стоуна и др. [6] и Джекоба и др. [3] для изучения зависимости повреждений от параметров криовоздействия клетки замораживали во взвеси по режимам, характерным для отдельных участков зон замораживания при криохирургии. Получен ряд интересных результатов, однако приведенные данные не позволяют воссоздать распределение выживаемости в зонах замораживания, получаемых на практике.

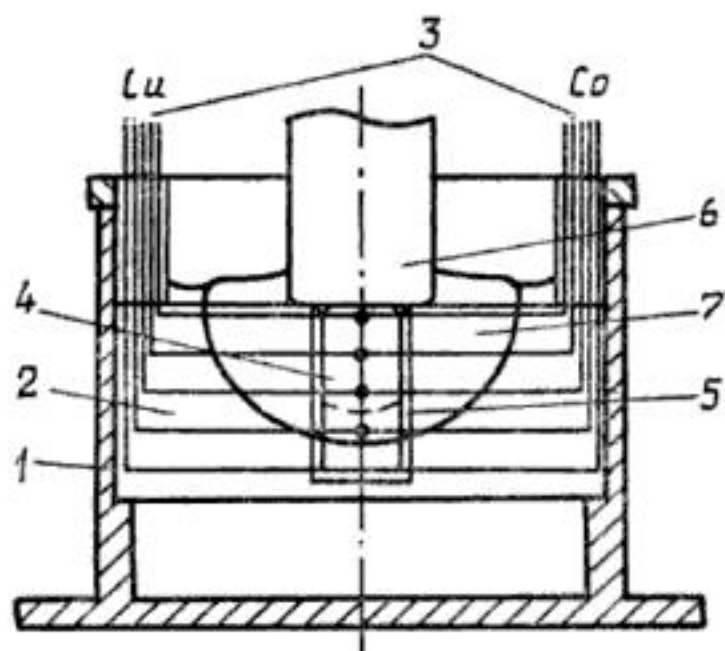


Рис. 1 Ячейка для замораживания клеточных монослоев. Пояснения в тексте

В предлагаемой работе выживаемость клеток изучалась не при последовательном воспроизведении различных режимов, а непосредственно в зоне замораживания, создаваемой реальным криоинструментом. В качестве экспериментальной модели были использованы монослойные клеточные культуры. В отличие от изолированных сферических клеток во взвеси, клетки в монослойной культуре прикреплены к субстрату, делятся и образуют межклеточные контакты, что приближает их к реальным тканям. Поскольку клетки, прикрепленные к субстрату, при движении фронта льда не вытесняются в жидкую фазу, в таких системах возможно изучение направленной кристаллизации, имеющей место при заморажива-

нии тканей и органов как с целью криодеструкции, так и криоконсервации. Использование клеточного монослоя в сочетании с контрастным люминесцентным тестом на выживаемость позволило получить в пределах одного образца наглядную картину распределения повреждений в сечении зоны замораживания с одновременным описанием температурно-временных условий криовоздействия.

Исследование выполнено на монослойных культурах клеток линий *L* (трансформированные фибробласты мыши) и *FBT* (клетки эпителия трахеи быка). Клетки (полученные в ВОИЦ АМН СССР) выращивали на стеклянных пластинках размером  $17 \times 8$  мм<sup>2</sup> и толщиной 0,2 мм в среде, содержащей 10 % сыворотки крови крупного рогатого скота, 45 % гидролизата лактальбумина и 45 % среды 199. Сплошной монослой клеток линии *L* получали на 4-е, а *FBT* — на 7-е сутки после посева.

В работе были использованы два криоинструмента. Инструмент № 1 имел минимальную температуру рабочей поверхности около  $(-95 \pm 3)^\circ\text{C}$ , инструмент № 2, большей хладопроизводительности, — около  $(-185 \pm 4)^\circ\text{C}$ . Оба инструмента имели наконечники с круглыми плоскими торцами, первый диаметром 20 мм, а второй — 15 мм.

Для механической фиксации стекол с клетками и измерений температуры была сконструирована специальная ячейка (рис. 1). В цилиндрический стакан из оргстекла 1 в диаметральной плоскости вставлялась пластина 2 из того же материала толщиной 0,5 мм с 5-ю медь-константановыми термопарами 3. Спаи термопар расположены по оси цилиндра на расстоянии 4 мм друг от друга, причем верхняя термопара — на расстоянии 1 мм от края пластины. Стекло с клетками 4 вставлялось в рамку 5, наклеенную на пластину с термопарами с той стороны, на которую выведены их спаи. В стакан заливался раствор Хенкса так, чтобы криоинструмент 6, подведенный вплотную к верхнему краю стекла с клетками, оказывался погру-

женным на  $1 \div 2$  мм. В качестве хладагента использовался жидкий азот, циркуляция которого обеспечивалась отсасывателем. Время охлаждения подбирали таким образом, чтобы конечная глубина зоны замораживания 7 для обоих криоинструментов была одинаковой. При замораживании инструментом № 1 подачу азота прекращали через 4 мин, а инструментом № 2 — через 1 мин 45 с после начала охлаждения. После этого еще около минуты зона нарастала, достигая в среднем глубины 14.2 мм. Глубину зоны

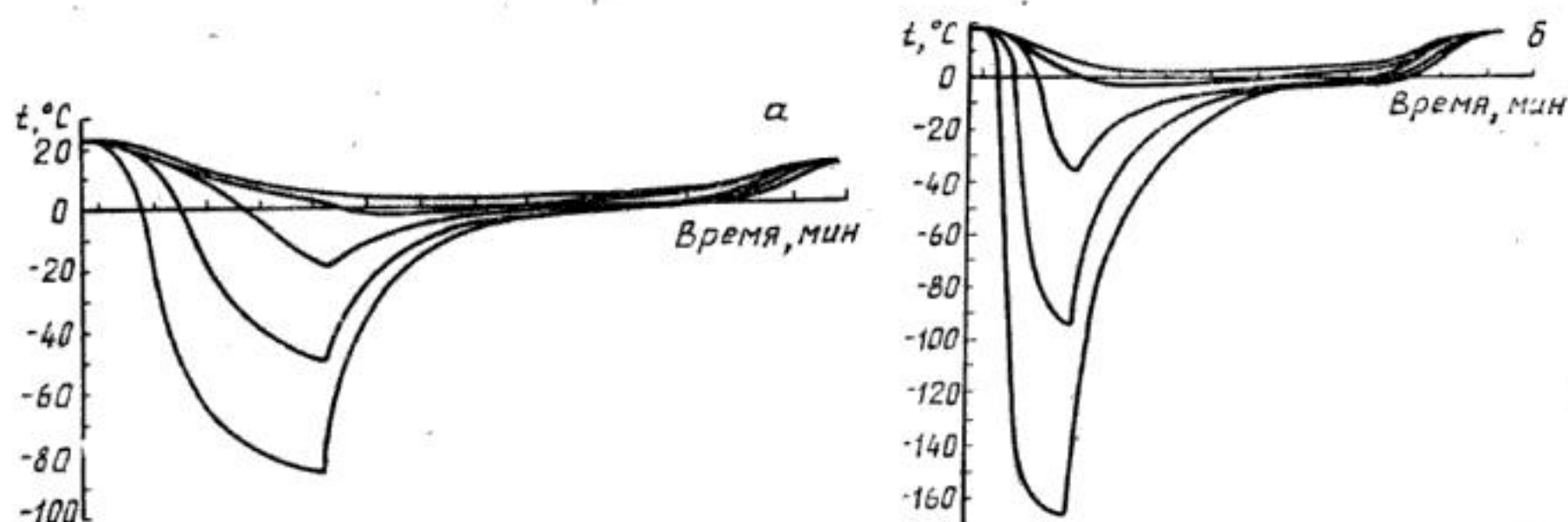


Рис. 2. Термограммы охлаждения—отогрева на расстояниях 1, 5, 9, 13 и 17 мм от наконечников криоинструментов № 1 (а) и № 2 (б). Последовательность кривых снизу вверх соответствует увеличению расстояния

замораживания контролировали с помощью катетометра КМ-6. Температурный контроль осуществляли с помощью измерительно-вычислительного комплекса на базе «Электроники ДЗ-28». Данные в виде зависимостей температуры (в °C) от времени выводились на двухкоординатный самописец.

На рис. 2, а, б приведены типичные кривые зависимости температуры от времени в точках, расположенных вдоль оси криоинструмента на различных расстояниях от его рабочей поверхности (соответственно для инструментов № 1 и № 2). На рис. 3 построены соответствующие зависимости минимальных температур, достигавшихся при замораживании, от расстояния до поверхности инструмента. Дополнительные точки на кривых получены сдвигом пластины с термопарами в ряде опытов на 2 мм.

Для определения выживаемости клеток в монослое мы применили контрастный люминесцентный тест на целостность мембран, обычно используемый для клеток во взвеси (см., например, [1]). Сразу после криовоздействия стекла с клетками помещали в раствор диацетата флуоресцеина и бромида этидия. При выдержке в растворе живые клетки накапливают чистый флуоресцеин, дающий ярко-зеленую люминесценцию цитоплазмы, а погибшие быстро утрачивают флуоресцеин, но пропускают бромид этидия, вызывающий при ультрафиолетовом возбуждении красное свечение ядер. После обработки реактивами стекла просматривали в люминесцентном микроскопе при возбуждении в области 365 нм.

При просмотре стекол были хорошо различимы зона сплошных повреждений (красная зона), начинавшаяся от края стекла, примыкавшего к инструменту, затем переходная зона (зеленые клетки смешаны с красными) и зона полной сохранности (зеленая зона). Зона повреждений в большинстве случаев состояла полностью из погибших клеток. В монослоях L-клеток иногда на красном фоне зоны повреждений отмечались одиночные выжив-

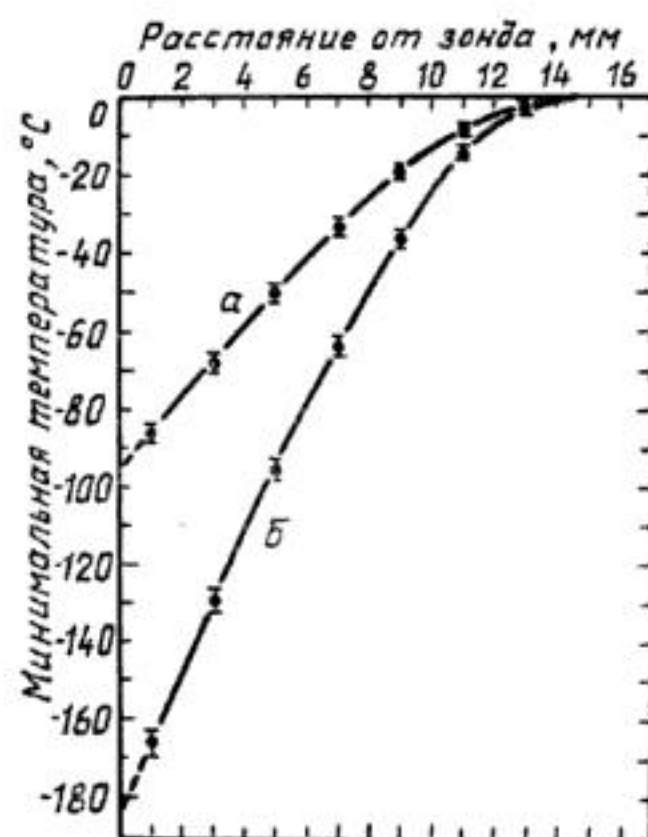


Рис. 3. Распределение минимальных температур по оси замораживания для инструментов № 1 (а) и № 2 (б)

шие клетки с зеленым свечением. В переходной зоне выживаемость с увеличением расстояния от инструмента нарастала от 0 до 100 %. В ряде случаев внутри переходной зоны наблюдались некоторые неоднородности повреждений в виде клиньев живых и погибших клеток, ориентированных в направлении роста льда. На рис. 4 приведена микрофотография переходной зоны в монослое *L*-клеток после криовоздействия.

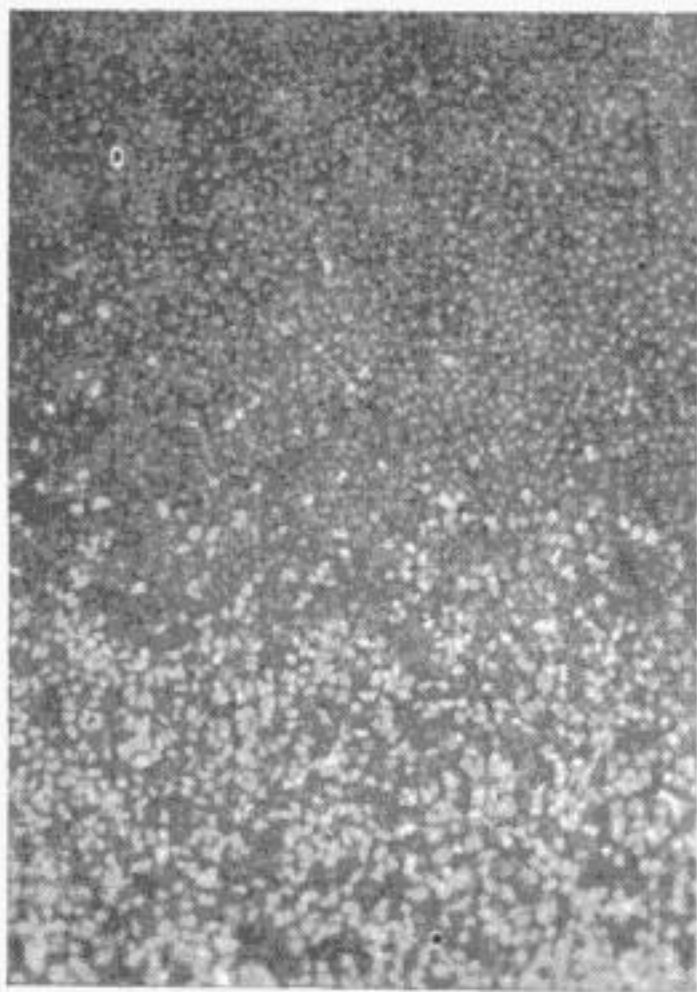


Рис. 4. Переходная зона в монослое *L*-клеток. Светлыми выглядят выжившие клетки с зеленым свечением цитоплазмы, темными — ядра погибших с красным свечением.  $\times 70$

Для всех образцов были определены глубина зоны повреждений (вдоль оси инструмента) и ширина переходной зоны. Граница между зоной повреждений и переходной зоной определялась на уровне выживаемости порядка 0,1 %. Соответствующие данные о размерах зон приведены в таблице. В таблице указаны средние значения и доверительные интервалы с надежностью 0,95.

Как уже отмечалось, в зоне повреждений *L*-клеток встречались одиночные выжившие клетки. Это было характерным в основном для замораживания инструментом № 1. После криовоздействия инструментом № 2 лишь один раз в 10 опытах была зарегистрирована выжившая клетка в зоне повреждений (на расстоянии 9,2 мм от наконечника инструмента). После замораживания инструментом № 1 одиночные выжившие клетки наблюдались в 7 образцах из 12:

|                                         |         |           |           |           |
|-----------------------------------------|---------|-----------|-----------|-----------|
| Расстояние от инструмента, мм . . . . . | 0 ÷ 2,2 | 2,2 ÷ 4,4 | 4,4 ÷ 6,6 | 6,6 ÷ 8,8 |
| Число выживших клеток . . . . .         | 8       | 5         | 6         | 11        |

Клетки подсчитывались по участкам  $2,2 \times 2,2 \text{ мм}^2$  вдоль оси инструмента. В монослоях клеток *FBT* выживших клеток в зоне повреждений не наблюдалось.

Размеры характерных зон при воздействии различными криоинструментами на монослой клеток линий *L* и *FBT*, мм

| Параметр                   | L-клетки   |            | Клетки FBT |            |
|----------------------------|------------|------------|------------|------------|
|                            | Инструмент |            |            |            |
|                            | № 1        | № 2        | № 1        | № 2        |
| Число опытов               | 12         | 10         | 6          | 6          |
| Глубина зоны замораживания | 14,2 ± 0,3 | 14,2 ± 0,2 | 14,2 ± 0,5 | 14,2 ± 0,3 |
| Глубина зоны повреждений   | 9,3 ± 0,3  | 11,0 ± 0,3 | 10,2 ± 0,3 | 11,9 ± 0,2 |
| Ширина переходной зоны     | 3,8 ± 0,4  | 2,3 ± 0,2  | 2,8 ± 0,5  | 1,8 ± 0,2  |

Для нескольких образцов *L*-клеток (по 5 для каждого инструмента) был произведен прямой подсчет живых и погибших клеток по полям зрения в переходной зоне вдоль оси криоинструмента. В поле зрения диаметром 0,5 мм находилось в среднем около 400 клеток. На рис. 5 представлены кривые распределения выживаемости *L*-клеток в переходной зоне. Распределение выживаемости клеток *FBT* в переходной зоне имеет вид, аналогичный приведенному для *L*-клеток.

Как видно из таблицы, зона повреждений во всех случаях была существенно меньше зоны замораживания. Так, после криовоздействия инструмен-

том меньшей холодопроизводительности глубина зоны повреждений *L*-клеток почти на 5 мм меньше глубины зоны замораживания, а объем соответствующей трехмерной зоны равной глубины составил бы лишь около 30 % объема зоны замораживания. На краю зоны замораживания в слое толщиной около 1 мм во всех случаях наблюдалась полная сохранность. Из полученных данных были определены значения минимальных температур, достигавшихся на границах зон повреждений. Для *L*-клеток после воздействия инструментами № 1 и № 2 соответствующие значения равны  $(-17 \pm 2)$  и  $(-14 \pm 2)$  °C, а для клеток *FBT* — соответственно  $(-12 \pm 2)$  и  $(-8 \pm 1)$  °C. Клетки линии *FBT* оказались более чувствительными к замораживанию по сравнению с клетками линии *L*. При одинаковых режимах криовоздействия зоны повреждений клеток *FBT* больше, чем клеток линии *L*, а соответствующие температуры, достигавшиеся на границах этих зон, выше. Для одних и тех же клеток значения минимальной температуры на границе зоны повреждений могут зависеть от режима замораживания. Эти значения несколько выше при криовоздействии инструментом, обеспечивающим быстрое охлаждение. Скорость охлаждения на границах зон повреждений в области температур около  $-5$  °C при замораживании инструментом № 1 составляла  $10 \div 15$ , а при замораживании инструментом № 2 —  $25 \div 30$  °C/мин.

Полученные в работе значения минимальных температур на границах зон повреждений, т. е. таких температур, которые обеспечивают близкую к нулю выживаемость клеток в монослое, относительно высоки, если сопоставлять их с данными, приводимыми для ряда ядро-содержащих клеток млекопитающих и человека, замораживаемых без криопротекторов во взвеси. Так, в работах [3, 5, 6] отмечалась значительная выживаемость клеток, замороженных со скоростью от 1 до 100 °C/мин до  $-20$  °C и ниже. Мы полагаем, что одна из причин подобного отличия может заключаться в следующем. Клетки в монослое расположены вплотную друг к другу и образуют многочисленные межклеточные контакты. В такой системе появление внутриклеточного льда в одной из контактирующих клеток может инициировать его образование и в соседних, вызвав «цепную реакцию» промерзания клеток при незначительном их переохлаждении. То есть наличие межклеточных контактов может быть дополнительным фактором, наряду с кинетикой обезвоживания клеток, определяющим вероятность внутриклеточного образования, повышая ее по сравнению с изолированными клетками во взвеси. При направленной кристаллизации, имеющей место в зоне замораживания, это должно способствовать распространению области практически сплошного внутриклеточного льда, образующегося в области достаточно низких температур и высоких скоростей охлаждения вблизи криоинструмента, до сравнительно высоких температур. В связи с этим следует ожидать большей степени повреждений в клеточном монослое, чем аналогичных клеток во взвеси. Полученные нами значения минимальных температур на границах зон повреждений по величине ближе к значениям, приводимым во многих работах по криохирургии в качестве температур, реализующихся при замораживании на границах зон последующего некроза в большинстве изученных тканей.

Следует отметить, что в ряде случаев даже замораживание до температур, значительно более низких, чем минимальные температуры на границах зон повреждений, не обеспечивает гибели абсолютно всех клеток в соответствующей зоне, о чем свидетельствуют результаты, полученные на монослоях *L*-клеток, особенно после криовоздействия инструментом меньшей холо-

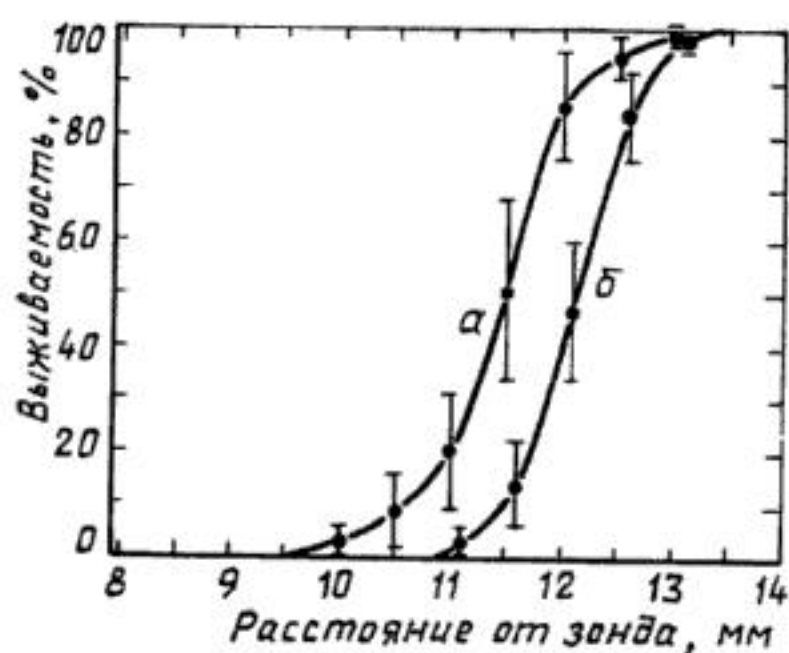


Рис. 5. Распределение выживаемости *L*-клеток в переходной зоне, создаваемое инструментом № 1 (а) и № 2 (б)

производительности. Одиночные выжившие клетки могут сохраняться после замораживания вплоть до температуры около  $-100^{\circ}\text{C}$ . В данной работе не отмечено каких-либо особенностей в их распределении, в частности локальных максимумов выживаемости между наконечником инструмента и периферией зоны замораживания, подобных предсказанным Фаррантом [2]. Если полученные на клеточных монослоях результаты использовать для грубой количественной оценки первичных повреждений при криовоздействии на реальные ткани, то наличие одной выжившей клетки среди нескольких тысяч погибших в зоне повреждений означает, что среди миллиардов клеток в объеме ткани порядка  $1\text{ см}^3$  могут остаться сотни тысяч выживших. Такое количество клеток несомненно следует учитывать с точки зрения возможностей продолжения опухолевого роста или рецидивирования.

Естественно, в реальных тканях картина усложняется наличием кровеносных сосудов, факторами вторичных повреждений и пр. Вблизи сосудов, искажающих тепловое поле в зоне замораживания, может выживать повышенное количество клеток. Число выживших клеток может увеличиваться и за счет репарации первичных повреждений. С другой стороны, тромбоз сосудов и ишемизация ткани вносят дополнительный вклад в криоповреждения. Тем не менее изучение первичных повреждений как фактора, определяющего все последующие изменения в зоне криодеструкции, представляет особый интерес.

Предложенная в работе методика может рассматриваться как удобный количественный тест *in vitro* для предварительной проверки эффективности криовоздействия на клетки различного, в том числе и человеческого, происхождения и поиска путей его оптимизации, например, с помощью физических и химических факторов. Данная методика может быть также использована для изучения механизмов первичных криоповреждений.

1. Dankberg F., Persidsky M. D. A test of granulocyte membrane integrity and phagocytic function // *Cryobiology*.— 1976.— 13, N 5.— P. 430—432.
2. Farrant J. Cryobiology: the basis for cryosurgery // *Cryogenics in surgery*.— Flushing., N. Y. : Medical Examination Publishing, 1971.— P. 15—42.
3. Jacob G., Kurzer M. N., Fuller B. J. An assessment of tumor cell viability after *in vitro* freezing // *Cryobiology*.— 1985.— 22, N 5.— P. 417—426.
4. Mazur P. Physical-chemical factors underlying cell injury in cryosurgical freezing // *Cryosurgery*.— Springfield : C. C. Thomas Publisher, 1968.— P. 32—51.
5. McGrath J. J., Cravalho E. G., Huggins C. E. An experimental comparison of intracellular ice formation and freeze—thaw survival of HeLa S-3 cells // *Cryobiology*.— 1975.— 12, N 6.— P. 540—550.
6. Stone D., Zacarian S. A., DiPeri C. Comparative studies of mammalian normal and cancer cells subjected to cryogenic temperatures *in vitro* // *J. Cryosurgery*.— 1969.— 2, N 1.— P. 43—52.

Ин-т физики АН УССР,  
г. Киев

Получена 07.05.86

УДК 53.082.4:664.8.037.1

**М. Е. Унксов, Б. Я. Шпиченецкий, Ю. Н. Уткин, О. Б. Колоколова**

## **МЕТОД И УСТРОЙСТВО ДЛЯ АКУСТИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ ЗА ПРОЦЕССОМ НАСЫЩЕНИЯ ОРГАНОВ КРИОПРОТЕКТОРОМ ПРИ ИЗОЛИРОВАННОЙ ПЕРФУЗИИ**

Для контроля насыщения органов криопротектором применяются методы ЯМР, радиоизотопный и др. [1]. Недостатком этих методов является их травматичность. При использовании метода ЯМР, основанного на сравнении концентраций притекающей и оттекающей из органа жидкости, орган может быть использован для последующей криоконсервации. Однако большое время измерения, порядка 8 мин, сопоставимое с временем насыщения органа, ведет к неточному определению момента насыщения.

Целью настоящей работы является разработка метода и устройства, позволяющего вести непрерывный контроль насыщения, причем с высокой точностью.

**Метод контроля.** Акустический метод контроля насыщения органов криопротектором при изолированной перфузии основан на том, что скорость звука в водных растворах аддитивна, т. е. линейна относительно концентраций каждого компонента раствора. Таким образом, измеряя скорость звука в притоке и оттоке перфузата, можно судить о насыщении органа криопротектором. Момент выравнивания скоростей ультразвука в притоке и оттоке свидетельствует о том, что орган перестал поглощать криопротектор из раствора, т. е. о насыщении.

Метод реализуется следующим образом: раствор перфузата перед перфузией подается в измерительную кювету 1 (рис. 1), содержащую передающий и принимающий пьезоэлементы, затем из кюветы 1 в перфузируемый орган 2. После прохождения сосудистого русла органа раствор подается в измерительную кювету 3, в которой также установлены пьезопреобразователи, и затем в сборный сосуд 4. Скорость ультразвука измеряется с помощью соответствующего прибора 5. Кюветы 1 и 3 имеют общую термостатирующую рубашку, поэтому скорость звука измеряется в притоке и оттоке при заведомо одинаковой температуре.

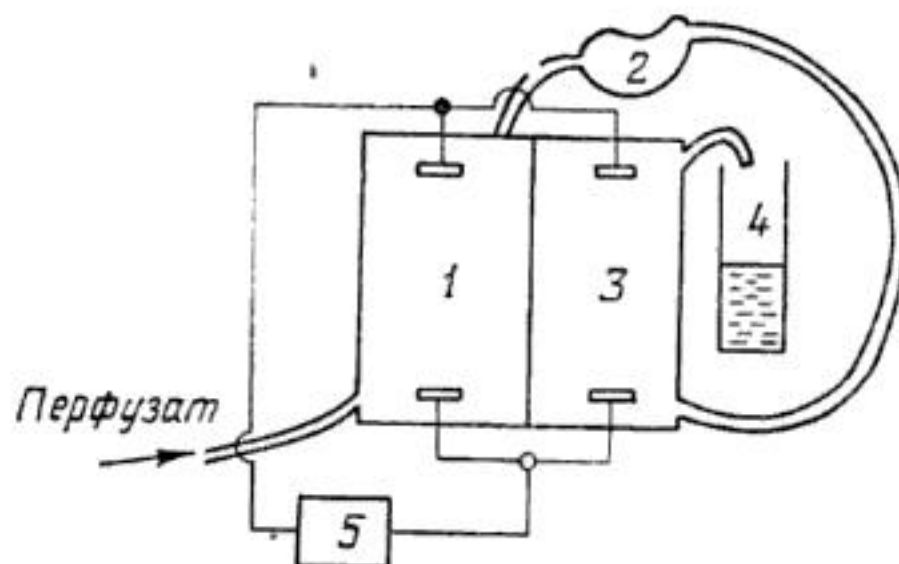


Рис. 1. Схема установки для акустического контроля за процессом насыщения органа криопротектором при изолированной перфузии

**Устройство и общая методика работы с ним.** Авторами разработано автоматическое устройство для измерения скорости ультразвука. Была усовершенствована известная схема автоциркуляционных колебаний [2]. Блок-схема автоматического устройства для измерения скорости ультразвука в растворах приведена на рис. 2.

Устройство работает следующим образом. Генератор 1 формирует короткий импульс, подаваемый на передающий пьезоэлектрический преобразователь, находящийся в измерительной кювете 2. Пройдя через среду, акустический импульс принимается приемным пьезоэлектрическим преобразователем, в котором он преобразуется

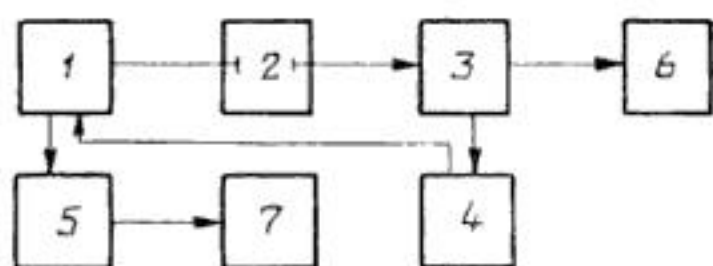


Рис. 2. Структурная схема автоматического устройства для измерения скорости ультразвука в растворах

в электрический сигнал. Этот сигнал усиливается усилителем 3 и подается на вход генератора задержки 4. Задержанный импульс поступает на запуск генератора 1, после чего формируется новый импульс. В такой цепи устанавливаются автоциркуляционные колебания с периодом  $T = \tau_{\text{сл}} + \tau_{\text{эл}} + \tau_{\text{гз}}$ , который регистрируется частотомером 5. Здесь  $\tau_{\text{сл}}$  — время следования акустического импульса,  $\tau_{\text{эл}}$  — задержка

в электронных цепях,  $\tau_{\text{гз}}$  — задержка, вводимая генератором задержки.

Новым в данной схеме является применение генератора задержки 4, позволяющее существенно повысить точность метода. На рис. 3 приведена временная развертка электрических импульсов, получаемых на осциллографе 7.

При небольших ( $\sim 15$  мм) расстояниях между пьезодатчиками сигнал затухает слабо, поэтому для того, чтобы исключить запуск схемы дважды отраженным от датчиков сигналом  $b$  или сигналами  $c$  и  $d$ , отраженными от стенок, необходимо устанавливать уровень запуска, близкий к амплитудному значению сигнала  $a$ , что ведет к частым срывам режима и к погрешностям измерения  $\sim 1/10$  периода колебаний пьезоэлемента, что при частоте

20 МГц составляет  $\sim 5$  нс. Введение генератора задержки позволяет исключить запуск схемы отраженными сигналами, задержав запуск на время, достаточное для полного затухания всех отраженных сигналов, что позволяет уменьшить уровень запуска. Погрешность измерений определяется временем запуска.

$$\tau_{\text{зап}} = \frac{T}{2\pi} \arcsin \frac{\Delta U_3}{U_a},$$

где  $\tau_{\text{зап}}$  — время запаздывания запуска относительно начала колебаний,  $\frac{\Delta U_3}{U_a}$  — отношение уровня запуска к амплитуде сигнала. Для сокращения времени запуска целесообразно уменьшить  $\frac{\Delta U_3}{U_a}$ , однако уменьшение огра-

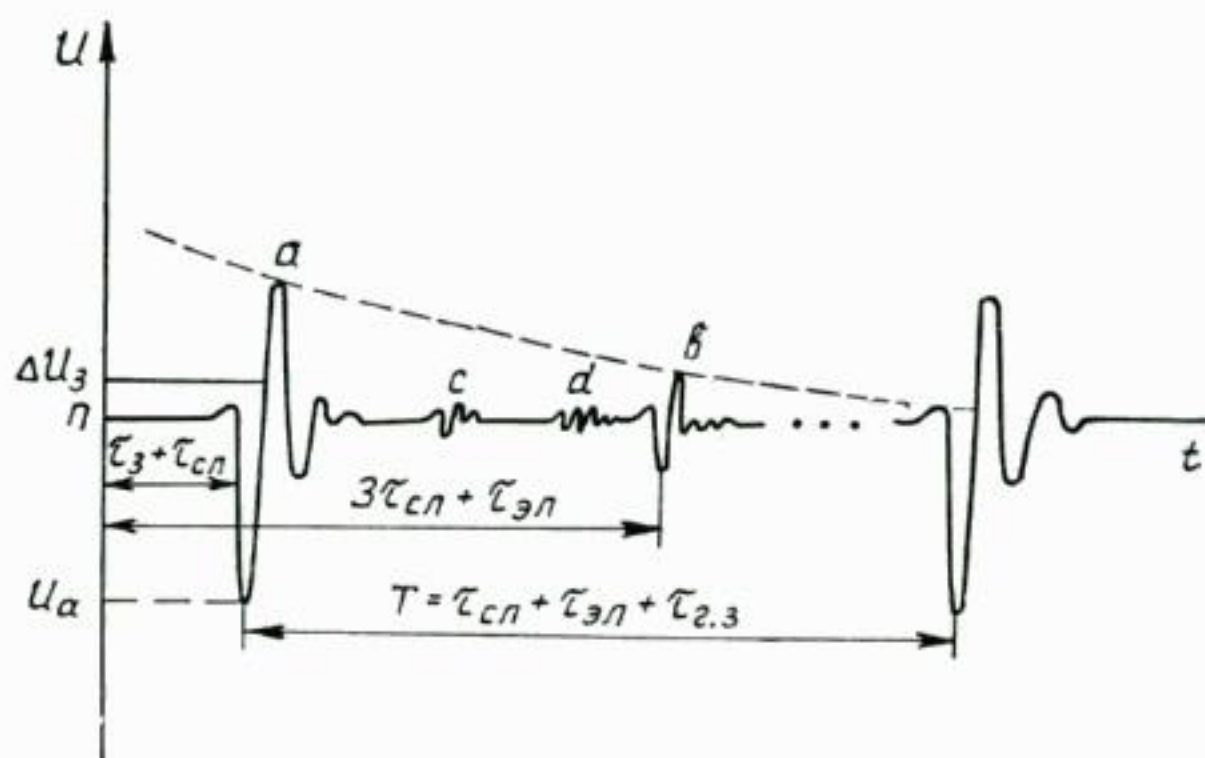


Рис. 3. Временная развертка электрических импульсов, получаемых в осциллографе

ничено соотношением шум-сигнал. При соотношении шум-сигнал  $\sim -20$  Дб можно брать  $\frac{\Delta U_3}{U_a} \sim 0,1$ , тогда

$$\arcsin \frac{\Delta U_3}{U_a} \simeq \frac{\Delta U_3}{U_a} \text{ и } \tau_{\text{зап}} \simeq \frac{T}{2\pi} \cdot \frac{\Delta U_3}{U_a} \pm \Delta \tau_{\text{зап}},$$

в этом случае погрешность запуска  $\Delta \tau_{\text{зап}} = \tau_{\text{зап}} \cdot \frac{\delta U}{U}$ , где  $\delta U$  — погрешность установки амплитуды сигнала, которая задается генератором 1 и контролируется осциллографом 6.

При уровне запуска 0,1 амплитуды, погрешности установки амплитуды 0,05 и резонансной частоте пьезодатчиков 20 МГц ( $T = 50$  нс)  $\Delta \tau \simeq 5 \times 10^{-2}$  нс, т. е. точность повышается в 100 раз. При использовании в качестве генератора задержанных импульсов серийного прибора И1-8, выдающего калиброванный задержанный импульс, погрешность запуска генератора еще меньше, таким образом, все погрешности, связанные с дрейфом электроники, не превосходят 0,1 нс, что при расстояниях между датчиками 15 мм позволяет получать относительную погрешность измерения скорости звука:  $\frac{\Delta C}{C} \sim 10^{-5}$  и соответственно погрешность измерения раз-

ности концентраций:  $\sim 10^{-3}$  кг/м<sup>3</sup> или  $10^{-4}$  %. Для измерения концентраций нет необходимости каждый раз пересчитывать время следования сигнала в скорость звука, достаточно произвести калибровку. Применение дифференциального контейнера, в котором время следования импульса измеряется одновременно в двух кюветах, исключает влияние температуры.

Таким образом, разработанный акустический метод контроля насыщения органов криопротектором при изолированной перфузии позволяет с высокой точностью определить время насыщения. Это достигается за счет

непрерывного сравнения концентраций криопротектора в притекающей и оттекающей жидкости до момента наступления их равенства. Описанное устройство для акустического контроля позволяет проводить процесс сравнения концентраций в автоматическом режиме.

1. *Segal N. B., Guttman F. M.* Kinetics of permeation and intracellular events associated with  $\text{Me}_2\text{SO}$  permeation of rabbit kidneys during perfusion at 10 °C // *Cryobiology*. — 1982. — 19, N 1. — P. 41—49.
2. *Sarvazyan A. P.* Development of methods of precise ultrasonic measurements in small volumes of liquids // *Ultrasonics*. — 1982. — 20, N 4. — P. 151—154.

Всесоюзный заочный машиностроительный ин-т,  
г. Москва

Поступила 06.01.86

## КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 616.5—006:615.832.9

*Н. И. Топорова, В. В. Шенталь, Н. А. Тихонова*

### СОВРЕМЕННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО ЛЕЧЕНИЯ ПЕРВИЧНО-МНОЖЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ КОЖИ ГОЛОВЫ И ШЕИ

Среди всех злокачественных новообразований опухоли кожи занимают третье место. Особенно часто поражается кожа волосистой части головы и лица, нередко опухоли локализируются на коже век, носа, ушной раковины. Первично-множественные опухоли кожи наблюдаются в 7,4 % случаев [1]. В отечественной и зарубежной литературе есть сообщения, посвященные изучению этой патологии, однако нет единого мнения о выборе оптимального метода лечения. Применение традиционных методов лечения, к которым относятся хирургический, лучевой и комбинированный, при множественных опухолевых узлах кожи и волосистой части головы не всегда возможно. Кроме того, в некоторых случаях их использование вызывает развитие тяжелых функциональных и косметических осложнений. Так, при опухолях кожи, возникающих на фоне красной волчанки, пигментной ксеродермы, ожоговых рубцов и некоторых других заболеваний, имеется резистентность к лучевой терапии, а хирургическое лечение требует сложных и часто многоэтапных пластических операций. Большие трудности для лечения представляют опухоли, локализирующиеся в области кожи носа, век, ушной раковины, так как лучевая терапия технически трудноосуществима, требует особой защиты глаз и иногда осложняется длительно текущим перихондритом, а сложные пластические операции часто приводят к неудовлетворительным результатам.

За период с 1952 г. по 1984 г. в отделении опухолей ВОИЦ АМН СССР по поводу первично-множественных опухолей головы и шеи находилось на лечении 62 больных, которым применялся метод низкотемпературной деструкции новообразований. Для лечения первично-множественных опухолей использовался контактный способ и криораспыление, выбор метода определялся размерами и локализацией новообразования. Деструкция производилась в пределах здоровых тканей на расстоянии 1—2 см от границы опухоли. Для лечения использовались аппараты КА-02 и КПК-01. Температура наконечника варьирована от —100 до —190 °C в зависимости от программы лечения, которая базировалась на результатах томографии. Показатели эффективности лечения определяли путем построения таблиц, включавших данные о продолжительности жизни больных. Достоверность различий рассчитывали с помощью непараметрического критерия Вилконсона.

Криодеструкция синхронно возникших опухолей проведена 29 больным. В некоторых случаях первично-множественные опухоли кожи головы и шеи сочетались с новообразованиями другой локализации. При этом нами осуществлялось криовоздействие и одновременное лечение этих опухолей (4 наблюдения) или холодовый метод применялся через 3—4 недели после завершения курса лечения новообразований легкого, желудка, матки и т. д. (16 наблюдений). Число больных с продолжительностью жизни 5 лет после лечения составляло 31,5 %, что объясняется опухолевым

поражением жизненно важных органов. Продолжения роста или рецидивов заболевания после проведенного низкотемпературного лечения мы не наблюдали. Лечение метакронно возникших множественных опухолей кожи головы и шеи проведено 17 больным, из них у 10 осуществлена лучевая терапия в сочетании с криовоздействием. В третьей группе больных (16 чел) были объединены лица с синхронно и метакронно возникшими первично-множественными опухолями, число которых колебалось от 4 до 120. Как правило, развитию их предшествовали такие заболевания, как пигментная ксеродерма, красная волчанка, ожоговые рубцы.

Анализ проведенных исследований показывает, что низкотемпературное воздействие достаточно эффективно и незаменимо при лечении опухолей, развившихся на фоне лучевых повреждений кожи, пигментной ксеродермы, красной волчанки и ожоговых рубцов. По эффективности низкотемпературный метод превосходит традиционные виды лечения. В результате клинических исследований выработана тактика лечения больных с синхронными и метакронными множественными злокачественными опухолями головы и шеи, доказана целесообразность широкого использования метода криодеструкции в клинической практике.

1. Бебякин В. Г. Первично-множественные опухоли по материалам Башкирского республиканского онкологического диспансера: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Уфа, 1974. — 10 с.

ВОНЦ АМН СССР,  
г. Москва

Поступило 10.08.85

УДК 615.37+615.832.97:616—002.3

В. Н. Запорожан, О. В. Хаит, М. А. Ислам

#### ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КРИОХИРУРГИИ ГНОЙНЫХ РАН

Восстановление нарушенной иммунной функции организма является важным компонентом комплексного лечения гнойных ран [2]. Изменение показателей иммунного ответа может быть критерием эффективности применяемого лечения и течения послеоперационного периода. Цель настоящей работы — изучение влияния комплексного лечения гнойных ран с применением криовоздействия на иммунную систему организма.

Состояние иммунитета изучено у 60 человек, из них 30 здоровых доноров и 30 больных с острыми гнойными процессами мягких тканей (гнойный мастит — 20, абсцесс ягодичной области — 7, нагноение операционной раны — 3). Обследованы больные в возрасте от 19 до 45 лет. Исследование проводилось до лечения и на 3, 7, 14 и 30-е сутки после криовоздействия. С целью определения общей реакции организма на криовоздействие изучали функциональную активность Т- и В-лимфоцитов периферической крови. Лимфоциты выделяли по Бойму [4]. Общее количество и число активных Т-лимфоцитов определяли по Йонделю [5] и методом розеткообразования с эритроцитами барана [7].  $T_{крол}$  (предположительные активные Т-супрессоры) выявляли реакцией розеткообразования с эритроцитами кролика [1]. Т-лимфоциты, имеющие рецепторы для Ig M— $T_H$  (хелперы) и IgG —  $T_T$  (супрессоры), исследовали способом розеткообразования с эритроцитами быка, нагруженными соответственно IgM или IgG [3]. Общее количество В-лимфоцитов определяли по А. С. Павлюку и соавт. [3], активированные В-клетки ( $B_{мыш}$ ) — по модифицированной методике С. М. Белоцкого и соавт. [1], иммуноглобулины — по Манчини и соавт. [6]. Лимфоциты, имеющие рецепторы для стафилококка, изучали по усовершенствованному способу С. М. Белоцкого и соавт. [1].

В результате применения криовоздействия в комплексном лечении больных с гнойными ранами улучшилось их общее состояние, почти в два раза ускорилось развитие грануляции и очищение раны от некротических масс, заметно сократились сроки заживления ран с конечным хорошим косметическим эффектом.

При изучении состояния Т-лимфоцитов у больных с местной гнойной инфекцией до криовоздействия выявлено повышение абсолютного (4,2 и 2,1) и относительного (76,0 и 66,4 %) показателей  $T_{общ}$  ( $P < 0,001$  и  $P < 0,01$ ), абсолютного числа  $T_{акт}$

(2,8 и 1,5,  $P < 0,01$ ), абсолютного (1,1 и 0,3) и относительного чисел  $T_{\text{крол}}$  (19,8 и 10,5 %;  $P < 0,001$  и  $P < 0,01$ ), а также абсолютного количества Т-супрессоров (0,96 и 0,5). В то же время снизилось процентное содержание Т-хелперов с  $(25,28 \pm 1,37)$  до  $(12,8 \pm 3,0)$  % ( $P < 0,01$ ). Обращает на себя внимание повышение процентного (41,3 и 22,1 %) и абсолютного (2,3 и 0,7) количества Т-клеток с рецепторами для стафилококка ( $P < 0,001$  и  $P < 0,01$  соответственно). Определение количества и функциональной активности В-лимфоцитов у больных с гнойными ранами не выявило существенных изменений общей популяции В-лимфоцитов, но наблюдалась тенденция к повышению относительного (11,2 и 17,0 %) и абсолютного количества  $V_{\text{мыш}}$  ( $0,4 \pm 0,004$  и  $0,94 \pm 0,52$ ). Уровень иммуноглобулинов классов М (1,5 и 1,2) и G (12,9 и 12,5) не изменялся, а уровень IgA повысился (3,48 и 1,81).

Применение криовоздействия в комплексном лечении больных с гнойными ранами вызывало существенное изменение показателей иммунной системы. Сразу после оперативного вмешательства и криовоздействия уровень общей популяции Т-лимфоцитов снизился (54 %), но уже на 7 сут процентное содержание их достигло уровня здоровых людей и сохранялось таким до 14 сут. Абсолютное количество  $T_{\text{общ}}$  в процессе лечения оставалось ниже нормы (на 30 сут  $1,2 \pm 0,1$  и  $2,1 \pm 0,07$ ). Уровень  $T_{\text{акт}}$  снизился на 3 сут, процентное их содержание нормализовалось на 14 сут. Абсолютное количество этих лимфоцитов нормализовалось на 7 сут. Повышенное абсолютное количество  $T_{\text{крол}}$  резко снизилось на 3 сут после криовоздействия по сравнению с исходным (0,4 и 1,1;  $P < 0,001$ ) и сохранялось на этом уровне до 30 сут. Процентное содержание  $T_{\text{крол}}$  изменялось несущественно. Аналогично изменялось абсолютное и процентное содержание  $T_{\text{г}}$ . Количество  $T_{\text{м}}$  снизилось в процессе лечения ниже нормы (0,2 и 0,8;  $P < 0,05$ ). Достоверно изменялось также количество лимфоцитов, несущих рецепторы для патогенного стафилококка ( $POK_{\text{стаф}}$ ). Уже на 3 сут после криовоздействия процентное и абсолютное количество  $POK_{\text{стаф}}$  снизилось до контрольных значений и оставалось таким на протяжении всего послеоперационного периода. В результате криовоздействия происходила нормализация общего числа В-лимфоцитов (контроль — 0,8, 30 сут — 0,5), что является хорошим прогностическим признаком. Уменьшалось число  $V_{\text{мыш}}$ , причем наблюдалась тенденция к снижению этого вида клеток ниже нормы (0,2 и 0,4). Количество иммуноглобулинов класса А нормализовалось, а классов М и G снизилось ниже нормы (0,5 и 1,2; 8,6 и 12,5 соответственно).

Таким образом, анализ приведенных данных позволяет сделать вывод о том, что применение криовоздействия в комплексном лечении больных с гнойными ранами оказывает благоприятное влияние на иммунологическое состояние, которое коррелирует с клиническим статусом больных и проявляется в нормализации уровня  $T_{\text{крол}}$ , Т-супрессоров и снижении  $POK_{\text{стаф}}$ .

1. Белоцкий С. М., Арутюнова И. А., Чуриков А. Н., Светухин А. М. Розеткообразующая активность лимфоцитов периферической крови при острых гнойных хирургических заболеваниях // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. — 1980. — № 7. — С. 72—74.
2. Белоцкий С. М., Карлов В. А. Иммунотерапия раневой инфекции. — М.: ВНИИМИ, 1982. — 76 с.
3. Павлюк А. С., Крюков Б. В., Петров Р. В. и др. Оценка субпопуляций Т-лимфоцитов у человека: Т-супрессоры и Т-помощники: Метод. рекомендации. — М., 1982. — 29 с.
4. Boyum A. Выделение лимфоцитов, гранулоцитов и макрофагов // Лимфоциты: выделение, фракционирование и характеристика. — М.: Медицина, 1980. — С. 9—19.
5. Jondal I. Использование теста розеткообразования с эритроцитами барана в качестве маркера человеческих Т-лимфоцитов // Там же. — С. 100—111.
6. Mancini G., Carbonara A. O., Hermans J. F. Immunological quantitation of antigens by single radial immunodiffusion // Immunochemistry. — 1965. — 2, N 3. — P. 235—254.
7. Wybran J., Dupont E. The active T-rosette: an early marker for T-cell activation // Ann. Immunol. (Inst. Pasteur). — 1982. — 1330, N 2. — P. 211—218.

Одесский мед. ин-т

Поступило 10.06.85

## ХРОНИКА

### II ШКОЛА-СЕМИНАР «МЕХАНИЗМЫ ЗИМНЕЙ СПЯЧКИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ»

В июле 1986 г. на базе Института биологической физики АН СССР в г. Пущино состоялась школа-семинар «Механизмы зимней спячки млекопитающих». В научную программу были включены доклады, посвященные роли пептидов и биологически активных соединений из тканей зимоспящих в механизмах торпидности и в индукции подобных состояний у теплокровных, терморегуляции, биоэнергетике, метаболизму, эволюционным аспектам проблемы естественного сна, зимней спячки и сноподобных состояний, экологическим проблемам торпидности в природе, новым аспектам исследования состояния зимней спячки, структурно-функциональным изменениям у зимоспящих, зимней спячке и гипотермии.

В докладе С. Г. Колаевой рассмотрена роль низкомолекулярных фракций тканей зимоспящих в индукции проявлений торпидности у теплокровных. Подчеркнуто, что за последние годы чрезвычайно возрос интерес к проблеме индукции состояния торпидности, и в разных лабораториях мира получена важная информация о существовании в тканях животных биологически активных веществ, обладающих антиметаболическим и гипотермическим действием.

Подробная характеристика структуры и функции гипногенов из различных групп регуляторных пептидов представлена в лекции И. П. Ашмарина. В докладах Н. К. Поповой, Р. У. Островской, М. С. Виноградовой, Г. Ф. Жегунова, Н. Н. Брустовецкого, Д. А. Игнатьева, И. И. Круман освещены экспериментальные работы, посвященные исследованию механизмов зимней спячки млекопитающих на молекулярном, клеточном и организменном уровнях. Показано, что на фоне резко сниженной активности ряда физиологических систем при зимней спячке имеет место выраженная избирательность в активировании одних процессов и ингибировании других.

В сообщении И. Г. Кармановой дана характеристика естественных форм покоя рыб и амфибий, гипобиоза и зимней спячки. Механизмы сна, гипобиоза и зимней спячки в свете эволюционных представлений обсуждались в докладе О. Е. Хомутецкой. К. П. Иванова осветила современное состояние проблемы терморегуляции и естественной гибернации. Отмечено, что зимняя спячка, искусственная гибернация, гипотермия тесно связаны с особенностями или нарушениями терморегуляции. В докладе Н. Т. Соломонова рассмотрены экологические условия спячки млекопитающих в природе, подробно изложены изменения, происходящие в организме животных, находящихся в состоянии анабиоза.

В. И. Загнойко

### ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИЙ

В специализированном совете при Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР в 1986 г. защищены диссертации. В работе А. К. Гулевского на соискание ученой степени доктора биологических наук «Барьерно-транспортные свойства плазматических мембран на различных этапах криоконсервирования» проведено систематическое исследование первичных механизмов изменения структурно-функциональных свойств плазматических мембран на различных этапах криоконсервирования. Установлено, что криопротекторы, нарушая взаимодействие транспортируемых веществ и АТФ с переносчиками и замедляя диффузию веществ в клетки, вызывают обратимое торможение транспортных процессов. Доказано значение концентрирования растворов солей, понижения температуры и вымерзания воды в формировании трансмембранных микро-и макродефектов, нарушении работы  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$  насосов, пассивной проницаемости плазматических мембран для катионов. Выявлена взаимосвязь указанных криоповреждений с изменениями клеточного метаболизма. В докторской диссертации В. А. Чуйко «Биохимические процессы в криоконсервированной ( $-196^\circ\text{C}$ ) щитовидной железе и ее функция» выявлены особенности изменений, происходящих в процессах тиреоидного гормонообразования, секреции и регуляции под влиянием замораживания щитовидной железы, показана обратимость наблюдаемых изменений и намечены пути их химической коррекции. Установлена зависимость между эффек-

тами, оказываемыми на щитовидную железу димексидом, и изменением устойчивости биохимических процессов в ней к замораживанию. Определены условия криоконсервирования щитовидной железы. Исследована эффективность восстановления содержания тиреоидных и тиреотропного гормонов в крови у тиреоэктомированных животных, что послужило основанием для создания нового метода лечения гипотериоза.

Защищены диссертации на соискание степени кандидата биологических наук. В работе В. А. Коптелова «Влияние замораживания — оттаивания на структурно-функциональное состояние аденилатциклазной системы изолированных гепатоцитов» установлено, что аденилатциклаза является криолабильным мембраносвязанным ферментным комплексом, что выражается в снижении стимулирующего влияния изопротеренола, адреналина, норадреналина и ионов фтора. При этом базальная активность аденилатциклазы в присутствии как ионов магния, так и ионов марганца не изменяется. Выявлено, что механизм нарушения функционирования аденилатциклазной системы при замораживании — оттаивании является многофакторным процессом. Повреждающее действие замораживания — оттаивания обусловлено повышением концентрации солей, изменением  $pH$  среды и нарушением структурной организации плазматической мембраны. В. А. Македонская в диссертации «Клиническая и функциональная оценка трансплантации ткани щитовидной железы, подвергнутой низкотемпературной консервации и хранению при  $-196^{\circ}\text{C}$ » установила, что после низкотемпературной консервации и хранения при  $-196^{\circ}\text{C}$  до года в тиреотоксически измененной щитовидной железе человека развиваются изменения, не оказывающие повреждающего действия на основные этапы тиреоидного гормонообразования. Функционально-структурная полноценность тиреоидной паренхимы не зависит от длительности хранения. Тиреотоксически измененная тиреоидная ткань при ауто трансплантации больным послеоперационным гипотиреозом приживлялась и функционировала в организме реципиента в течение трех лет наблюдения. Е. Л. Воловельская в исследовании «Действие замораживания — оттаивания на структурно-функциональные свойства ферментов с четвертичной структурой (лактатдегидрогеназа и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа)» показала, что нарушение активности и молекулярной организации изученных ферментов сопряжено с повреждающим влиянием на их молекулы физико-химических факторов, возникающих при вымораживании из системы свободной воды в доэвтектической зоне температур. Доказано, что важную роль в механизме криоповреждения каталитических белков играют концентрационные эффекты ионов.

УДК 57.043.615.9

**Токсико-фармакологические исследования в криобиологии / Шраго М. И., Козлова В. Ф. // Криобиология. — 1987. — № 1. — С. 5—10.**

В работе дан анализ одному из магистральных направлений криобиологии. На основании опыта Института проблем криобиологии и криомедицины АН УССР сформулированы принципы постановки задач и особенности изучения токсико-фармакологических характеристик криопротекторов и криозащитных сред, предложена общая схема их исследований. Табл. 2. Библиогр.: 7 назв.

УДК 51.043.615.387 : 547

**Сравнительное изучение криоустойчивости КОЕ<sub>с</sub> и КОЕ<sub>к</sub>, находящихся в различном функциональном состоянии / Гольцев А. Н., Цуцаева А. А., Дубрава Т. Г. // Криобиология. — 1987. — № 1. — С. 11—17.**

В работе проведена оценка сохранности и функциональной активности кроветворных клеток (КОЕ<sub>с</sub> и КОЕ<sub>к</sub>), находящихся в разных фазах клеточного цикла, после низкотемпературного консервирования (—196 °С). Установлено, что криоконсервирование в равной степени оказывает отрицательное действие на кроветворные клетки, независимо от степени их дифференциации, а также нахождения в состоянии покоя или S-периоде клеточного цикла. Табл. 6. Библиогр.: 10 назв.

УДК 612.014.9:534.121.2

**О физических состояниях и криозащитных свойствах растворов холинхлорида / Гулевский А. К., Михалев О. И., Рязанцев В. В., Зинченко А. В., Волков В. Я. // Криобиология. — 1987. — № 1. — С. 17—21.**

Гидратацию, фазовые переходы, стеклование растворов холинхлорида и их криозащитные свойства в отношении мембран эритроцитов и саркоплазматического ретикулума исследовали в диапазоне температур 77—273 К. Методами дифференциальной калориметрии, ЯМР и ЭПР спектроскопии выявлены физико-химические свойства холинхлорида, присущие традиционным криопротекторам: устойчивую низкотемпературную сольватацию (4—8 молекул воды на молекулу холинхлорида) и склонность к стеклованию его растворов. Проведенные исследования показывают перспективность использования холинхлорида для низкотемпературного хранения мембранных препаратов различного происхождения. Ил. 6. Табл. 1. Библиогр.: 9 назв.

УДК 57.043:577.352.53

**Действие некоторых криопротекторов на ионные каналы мембраны нейронов / Чекурова Н. Р., Кислов А. Н., Вепринцев Б. Н. // Криобиология. — 1987. — № 1. — С. 21—25.**

В экспериментах использовали 1—1,5 М концентрации криопротекторов (ДМСО, глицерин, этиленгликоль, формамид, диметилацетамид) при комнатной температуре и относительно кратковременной экспозиции клеток в этих растворах. Существенной модификации потенциалзависимых ионных каналов мембраны нейронов не выявлено. Показано, что сохранение нормальных электрофизиологических характеристик зависит от способа отмывания криопротекторов. В опытах обнаружено изменение поверхностного потенциала мембраны, которое может быть следствием адсорбции молекул некоторых криопротекторов (ДМСО, формамид) на поверхности мембраны нейрона и взаимодействия с ее заряженными группами. Ил. 3. Библиогр.: 5 назв.

УДК 616.151—008.939.155—001.18

**Изменения в липидном составе липопротеидов плазмы крови в условиях развивающейся гипотермии / Гурия В. Н., Семененя И. Н. // Криобиология. — 1987. — № 1. — С. 26—29.**

В статье рассмотрены изменения, происходящие в липидном составе липопротеидов плазмы крови при охлаждении животных. Анализируются сдвиги уровня холестерина, общего содержания жирных кислот, жирнокислотного состава липопротеидов высокой плотности и суммарной фракции липопротеидов очень низкой и низкой плотности. Табл. 2. Библиогр.: 10 назв.

УДК 577.352.334:612.36.014.43

**Состояние NADH-зависимой цепи переноса электронов мембран эндоплазматического ретикула печени сусликов и крыс / Кудокоцева Е. В., Жегунов Г. Ф. // Криобиология. — 1987. — № 1. — С. 30—32.**

Изучена активность NADH-специфичной редокс-цепи микросом, выделенных из печени сусликов разных групп и крыс. Показано, что при температурах 32 и 20 °С скорость потребления кислорода при окислении NADH практически одинакова во всех группах животных, за исключением крыс, скорость реакции у которых при температуре 20 °С снижается. При 13 °С скорость этой реакции уменьшается в трех группах сусликов и у крыс, а у зимоспящих сусликов обнаружено уменьшение активности NADH-феррицианид-редуктазы. Активность ферментов микросомальной цепи зимоспящих животных сохраняется при пониженных температурах, что связано, по-видимому, с адаптационными изменениями липидов клеточных мембран. Ил. 3. Библиогр.: 7 назв.

УДК 611—018.63.832.9

**Влияние гипоксии и краниocereбральной гипотермии на ультраструктуру миокарда белых крыс / Загоруйко Ю. В., Загоруйко Г. Е., Бабийчук Г. А. // Криобиология. — 1987. — № 1. — С. 32—38.**

Проведено электронно-микроскопическое и морфометрическое исследование миокарда левого желудочка сердца животных. В результате медикаментозной гипоксии в сердечной мышце крыс выявлены повреждения клеток и неклеточных элементов. Краниocereбральная гипотермия в диапазоне температур 30 ÷ 28 °С существенно снижает повреждающее воздействие медикаментозной гипоксии на миокард животных, что проявляется в нормализации структурной организации мышечного и стромального компонентов сердца. Ил. 4. Табл. 1. Библиогр.: 3 назв.

УДК 612.35.043—044.86

**Пролиферативная активность клеток печени крыс после криовоздействий / Сандомирский Б. П., Сигал Н. С., Коцько Н. И. // Криобиология. — 1987. — № 1. — С. 38—41.**

В настоящей работе методом гисторадиоавтографии с <sup>3</sup>H-гимидином изучалась ДНК-синтезирующая способность клеток Купфера и гепатоцитов с определением митотического индекса последних после различных по характеру криовоздействий на нормальную печень крыс. Показано, что криодеструкция части органа приводит к усилению пролиферативной реакции печеночных клеток на ранних этапах репаративного процесса. Ил. 2. Табл. 1. Библиогр.: 5 назв.

УДК 57.043:615.832.9

**Тест in vitro для криохирургии / Рикберг А. Б., Есьман С. С., Голубев Ю. В., Сергиенко В. П. // Криобиология. — 1987. — № 1. — С. 41—46.**

Предложен метод изучения распределения выживаемости клеток в зоне замораживания, создаваемой криохирургическим инструментом in vitro. Получены распределения выживаемости для монослоев двух клеточных линий (L и FBT) при различных температурно-временных режимах криовоздействия. Результаты обсуждаются в плане моделирования первичных повреждений при криохирургии. Ил. 5. Табл. 1. Библиогр.: 6 назв.

УДК 53.082.4 : 664.8.037.1

**Метод и устройство для акустического контроля за процессом насыщения органов криопротектором при изолированной перфузии / Унков М. Е., Шпиченецкий Б. Я., Уткин Ю. Н., Колоколова О. Б. // Криобиология. — 1987. — № 1. — С. 46—49.**

Описан метод, позволяющий определить насыщение органа криопротектором при изолированной перфузии. Метод основан на сравнении значений скорости ультразвука в притекающей и оттекающей от органа жидкости до момента наступления их равенства. Приведено описание устройства, разработанного для реализации этого метода. Ил. 3. Библиогр.: 2 назв.

UDC 57.043.615.9

**Toxico-pharmacological studies in cryobiology / Shrago M. I., Kozlova V. F. // Kriobiologiya.**— 1987.— N 1.— P. 5—10.

A main tendency in cryobiology has been analysed. Principles of setting tasks and peculiarities of the investigation of toxico-pharmacological characteristics of cryoprotectants and cryoprotective media have been formulated basing on the experience obtained at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the UkrSSR Academy of Sciences. A general scheme for the investigation has been suggested. 2 tables. Refs.: 7 titles

UDC 57.043.615.387:547

**Comparative study of cryostability of CFU<sub>s</sub> and CFU<sub>m</sub> in various functional states / Goltsev A. N., Tsutsayeva A. A., Dubrava T. G. // Kriobiologiya.**— 1987.— N 1.— P. 11—17.

The viability and functional activity of haemopoietic cells (CFU<sub>s</sub> and CFU<sub>m</sub>) being in different phases of the cell cycle were estimated after low temperature preservation (—196 °C). It has been found that cryopreservation affects negatively haemopoietic cells irrespectively of their differentiation level or being in rest or in the S-period of the cell cycle. 6 tables. Refs.: 10 titles

UDC 612.014.9:534.121.2

**On physical states and cryoprotective properties of choline chloride solutions / Gulevsky A. K., Mikhalev O. I., Rysantsev V. V., Zinchenko A. V., Volkov V. Ya. // Kriobiologiya.**— 1987.— N 1.— P. 17—21.

Hydration, phase transitions and vitrification of choline chloride solutions as well as their cryoprotective efficiency with respect to membranes of erythrocytes and sarcoplasmic reticulum were studied in a range of 77 to 273 K. Differential calorimetry, NMR and EPR spectroscopy methods allowed to found those physico-chemical properties of choline chloride which are usual for traditional cryoprotectants such as stable low temperature solvation (4 to 8 water molecules per choline chloride molecule) and inclination to vitrification of its solutions. The perspectivity of using choline chloride for low temperature preservation of different membrane preparations is shown. 6 figs. 1 table. Refs.: 9 titles

UDC 57.043:577.352.53

**The effect of some cryoprotectants on ion channels of neurone membranes / Chekurova N. R., Kislov A. N., Veprintsev B. N. // Kriobiologiya.**— 1987.— N 1.— P. 21—25.

Cryoprotectants DMSO, glycerol, ethylene glycol, formamide, dimethylacetamide in 1 to 1.5 M concentrations were used in the experiment at room temperature and relatively short exposition of cells in the solutions. Potential dependent ion channels of neurone membranes changed but insignificantly. Preservation of normal electrophysiological parameters has been shown to depend on the method of cryoprotectant removal. The surfacial membrane potential changed due to adsorption of cryoprotectant molecules such as DMSO and formamide on the surface of neurone membrane and interaction with charged groups. 3 figs. Refs.: 5 titles

UDC 616.151—008.939.155—001.18

**Changes in the lipid content of blood plasma lipoproteids under conditions of developing hypothermia / Gurin V. N., Semenenya I. N. // Kriobiologiya.**— 1987.— N 1.— P. 26—29.

Changes in the lipid content of blood plasma lipoproteids were considered in cooled animals. Shifts in the level of cholesterol, total fatty acids and in the content of fatty acids in lipoproteids of high density and in the total lipoprotein fraction of very low and low density have been analysed. 2 tables. Refs.: 10 titles

UDC 577.352.334:612.36.014.43

**The state of NADH-dependent electron transport chain in liver endoplasmic reticulum membranes of ground squirrels and rats / Kudokotseva E. V., Zhegunov G. F. // Kriobiologiya.— 1987.— N 1.— P. 30—32.**

The rate of oxygen consumption during NADH oxidation at 32 and 20 °C has been shown to be similar in all studied groups of animals other than rats whose rate of the reaction decreased at 20 °C. At 13 °C the rate of reaction decreased in three groups of ground squirrels and in rats. Reducing the activity of NADH-ferricianid-reductase was observed in hibernating ground squirrels. The activity of microsomal chain enzymes of hibernating animals remained unchanged at low temperatures, probably due to adaptive changes in lipids of cell membranes. 3 figs. Refs.: 7 titles

UDC 611—018.63.832.9

**The effect of hypoxia and craniocerebral hypothermia on the ultrastructure of white rat myocardium / Zagoruyko Yu. V., Zagoruyko G. E., Babiychuk G. A. // Kriobiologiya.— 1987.— N 1.— P. 32—38.**

The electron microscopy and morphometry studies of animal left ventricle myocardium have been performed. Damage of myocardial cells and non-cellular elements due to medicamental hypoxia were found. Craniocerebral hypothermia in a range of 30 to 28 °C appeared to decrease significantly the harmful effect of medicamental hypoxia on animal myocardium, i. e. the structural organization of muscular and stromal heart components were normal. 4 figs. 1 table. Refs.: 3 titles

UDC 612.35.043—044.86

**The proliferative activity of rat hepatocytes after cryoapplication / Sandomirsky B. P., Sigal N. S., Kotsko N. I. // Kriobiologiya.— 1987.— N 1.— P. 38—41.**

The ability of Kupfer's cells and hepatocytes to synthesize DNA was studied using histography with <sup>3</sup>H-thymidine. The mitotic index was determined after different cryoapplications on normal rat liver. Cryodestruction of a part of the organ was shown to result in intensification of the proliferative reaction of hepatocytes at early stages of the reparative process.— 2 figs. 1 table. Refs.: 5 titles

UDC 57.043:615.832.9

**A test *in vitro* for cryosurgery / Rikberg A. B., Esman S. S., Golubev Yu. V., Sergiyenko V. P. // Kriobiologiya.— 1987.— N 1.— P. 41—46.**

A method of testing *in vitro* the distribution of cell survival in the frozen zone created with a cryosurgical instrument is proposed. Distributions of survival for monolayers of two cell lines (L and FBT) are obtained for different temperature — time freezing regimens. The results are discussed in a plane of modelling primary damages in cryosurgery. 5 figs. 1 table. Refs.: 6 titles

UDC 53.082.4:664.8.037.1

**Method and device for acoustic controlling the process of organ saturation with cryoprotectant during isolated perfusion / Unksov M. E., Shpihenetsky B. Ya., Utkin Yu. N., Kolokolova O. B. // Kriobiologiya.— 1987.— N 1.— P. 46—49.**

A method which allow to determine organ saturation with cryoprotectant during isolated perfusion is described. The method is based on the comparison between values of ultrasound velocity in inflow and outflow liquids up to their equilibrium. A device for performing the method is proposed. 3 figs. Refs.: 2 titles

Продолжается подписка на 1987 год на всесоюзный научно-теоретический журнал «Криобиология». В журнале публикуются научные работы по всем аспектам действия охлаждения и замораживания в биологии, медицине и пищевой промышленности, по проблемам гипотермии, низкотемпературному консервированию клеток и тканей, криохирургии, по сублимационному высушиванию, о криопротекторных веществах и их фармакологическом действии. Освещаются вопросы гибернации, зимостойкости растений, конструирования приборов и оборудования для низкотемпературного консервирования биологических объектов и криомедицины.

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

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

Выписывайте журнал «Криобиология»!

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

Издательство «НАУКОВА ДУМКА»

Управление «СОЮЗПЕЧАТЬ» Министерства связи УССР