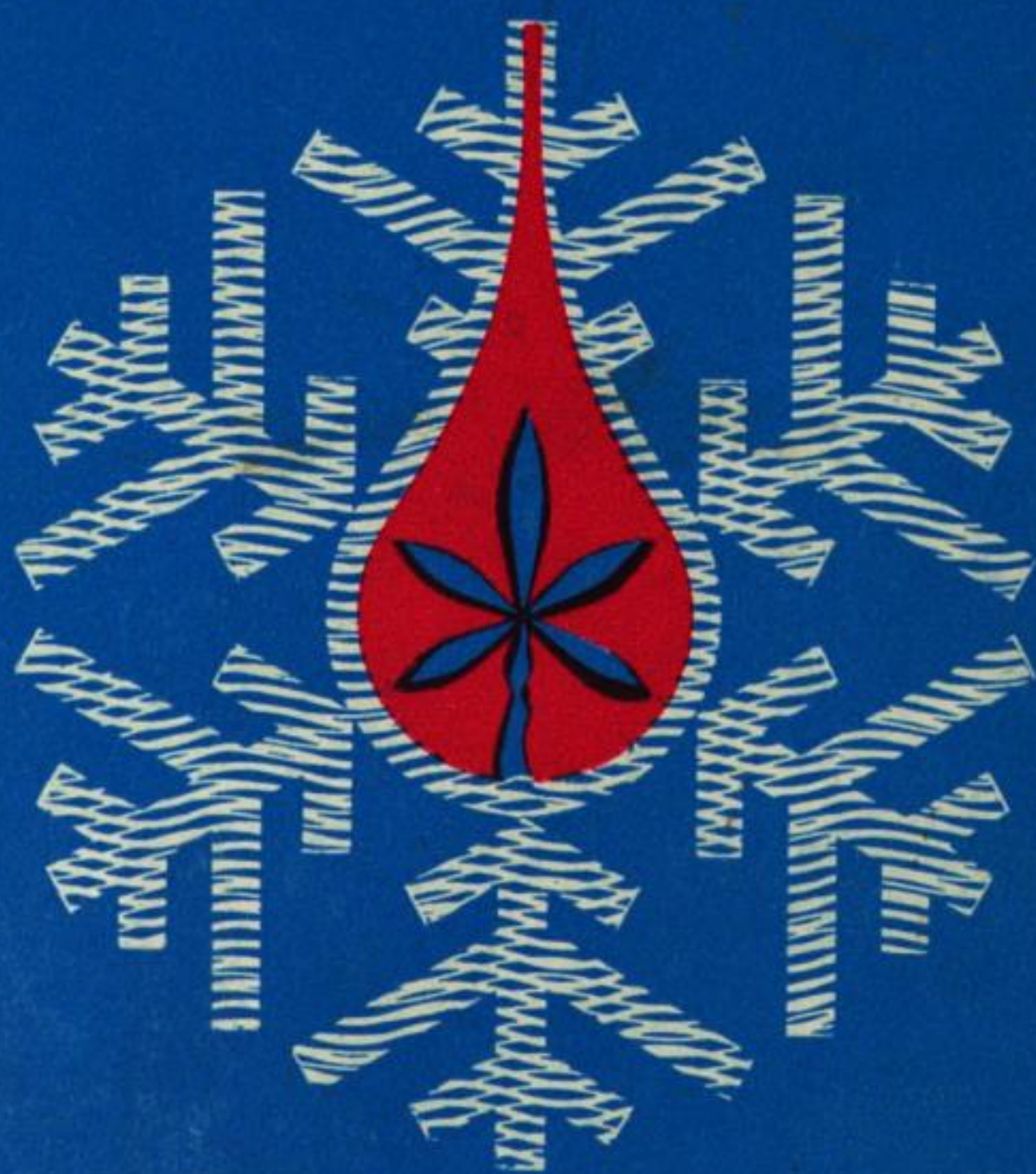
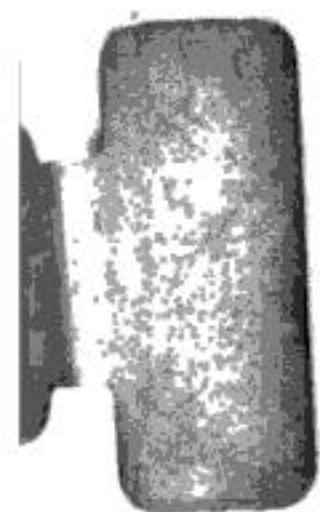


08
КРИОБИОЛОГИЯ
И
КРИОМЕДИЦИНА



4

1978



57.015
K82

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ И КРИОМЕДИЦИНЫ

КРИОБИОЛОГИЯ И КРИОМЕДИЦИНА

РЕСПУБЛИКАНСКИЙ МЕЖВЕДОМСТВЕННЫЙ СБОРНИК

Основан в 1975 г.

ВЫПУСК

4

КИЕВ «НАУКОВА ДУМКА» 1978

57.04
K82

УДК 57:536.48.047

В сборнике изложены результаты экспериментальных и теоретических исследований, посвященных механизмам криозащиты и криоповреждений биологических объектов. Освещены морфологические и биохимические особенности повреждения субклеточных структур, клеток и тканей при замораживании. Представлены работы по применению низких температур в медицине.

Рассчитан на широкий круг биологов и медиков, а также специалистов, разрабатывающих теоретические и прикладные аспекты низкотемпературного консервирования биологических объектов.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Н. С. Пушкарь (ответственный редактор), А. М. Белоус (зам. ответственного редактора), Г. С. Лобынцева (ответственный секретарь), В. И. Луговой, В. И. Митасов, В. А. Моисеев, М. Г. Шенберг, М. И. Шраго, Т. Н. Юрченко



2764

Редакция республиканских межведомственных сборников

К 50500-022 434-78
М221 (04)-78

© Издательство «Наукова думка», 1978

ВОПРОСЫ КРИОПОВРЕЖДЕНИЙ И КРИОЗАЩИТЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

УДК 57:536.48.047:578.088:576.311:612.35

А. М. Белоус, В. А. Бондаренко, Т. П. Бондаренко

БИОХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ЛИПИДОВ БИОМЕМБРАН КАК ПРИЧИНА ГИБЕЛИ КЛЕТОК ПРИ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОМ КОНСЕРВИРОВАНИИ

Известно, что липиды играют весьма значительную роль в интеграции и регуляции мембранных функций [2]. В свою очередь температура играет решающую роль в структурной организации и физико-химическом состоянии липидов мембран. При обычных температурах внутри мембраны осуществляется довольно быстрая диффузия фосфолипидов [7] и других функциональных компонентов, что обеспечивает регуляцию ее проницаемости [4] и, следовательно, метаболических процессов в клетке [10]. Снижение температуры в мембранах чувствительных к холоду клеток сопровождается фазовыми переходами фосфолипидов из жидкокристаллического состояния в кристаллическое [15], что было показано в опытах с использованием спиновых меток [15], метода дифференциальной сканирующей калориметрии [14] и малоугловой рентгеновской дифракции [9].

Одно из важнейших направлений в криобиологии — исследование молекулярной организации и функции фосфолипидов биомембран, так как они, с одной стороны, обеспечивают важнейшие регуляторные и структурные функции в клетке [10], а с другой — являются системами, наиболее чувствительными к повреждающему действию замораживания [1]. Поскольку отдельным классам фосфолипидов принадлежит важнейшая роль в поддержании структурной и функциональной целостности биомембран [8], в настоящей работе представлены в первую очередь данные по изменению фосфолипидного состава мембран митохондрий, подвергнутых низкотемпературному воздействию, а также сделана попытка выяснить причины этих процессов на основе изучения уровня перекисного окисления липидов.

Было установлено, что после быстрого замораживания — отогрева количество лецитина и этаноламинфосфатида в митохондриях снижается лишь незначительно, а при медленном отогреве — существенно и достоверно. Чтобы выяснить причины снижения уровня отдельных фосфолипидов, определяли фосфолипиды в супернатанте. После замораживания и отогрева митохондрий в супернатанте фосфолипиды не были обнаружены, значит, снижение отдельных фракций фосфолипидов скорее всего связано с их биохимическими превращениями в самой мембране. Поскольку митохондрии содержат фосфолипазу A_2 и принципиально доказано, что низкие температуры вызывают активацию фосфолипаз [5], то естественно было предположить, что данные фосфолипиды подвергаются ферментативному гидролизу. Активация фосфолипаз сопровождается накоплением свободных жирных кислот. Поскольку они не были обнаружены на хроматограммах при указанных выше режимах замораживания — отогрева, то было предположено, что деградация фосфолипидов не связана с активацией фосфолипаз.

При фракционировании всех классов липидов методом тонкослойной хроматографии в митохондриях, подвергнутых замораживанию—

отогреву, выявлена более полярная фракция, идентифицированная как моно- и диглицериды. Подобная фракция характерна для процессов деградации, включающих свободнорадикальное перекисное окисление липидов, причем окислению в первую очередь подвергаются фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин [17].

В последнее время накапливаются данные о геминном катализе перекисного окисления липидов [6], а также об активации данного процесса низкими температурами [10]. В митохондриях активатором окисления может быть цитохром с. В процессе замораживания и отогрева формируется сложное физико-химическое микроокружение во-

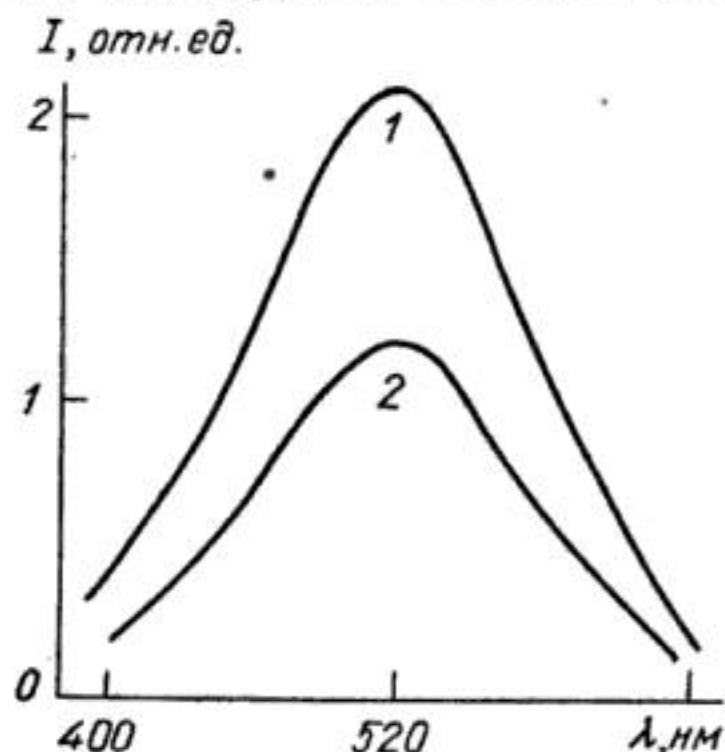


Рис. 1. Спектры флуоресценции ХТЦ в суспензии нормальных (1) и подвергнутых медленному замораживанию до 4-й точки (2) митохондрий в среде, содержащей 1 мМ CaCl_2 и 0,03 мМ ХТЦ.

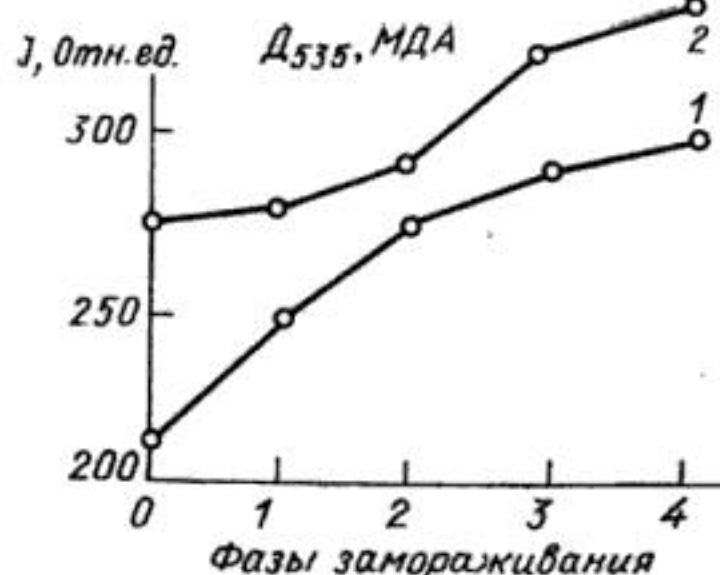


Рис. 2. Накопление ТБК-активных продуктов в суспензии митохондрий при замораживании до различных точек термографической кривой:

1 — медленное замораживание в среде, содержащей 125 мМ KCl , отогрев быстрый, в присутствии 40%-ного ТХУ; 2 — медленное замораживание в среде, содержащей 125 мМ KCl , отогрев быстрый, без ТХУ.

круг мембраны, нарушающее ее структурную упорядоченность и облегчающее контакт липидов с гемопотеидами. Ранее в наших экспериментах было обнаружено, что низкотемпературное воздействие вызывает интенсификацию перекисных процессов в мембранах митохондрий [1, 3], что сопровождается возгоранием хемилюминесценции. Низкотемпературное воздействие приводит к существенному усилению интенсивности свечения, причем наблюдается выраженная корреляция между характером повреждающего действия того или иного режима замораживания — отогрева и интенсивностью свечения.

Изменение фосфолипидного состава мембран митохондрий при медленном замораживании до температуры -28°C

Липид, отн. ед.	Контроль	Исследуемые точки кривой медленного замораживания			
		Точка переохлаждения (метастабильное состояние от -6 до -10°C)	Точка начала кристаллизации (от -2 до -3°C)	Начало кристаллического затвердевания (от -3 до -5°C)	Эвтектическая зона (от -25 до -28°C)
Лецитин	$0,482 \pm 0,011$	$0,451 \pm 0,007$	$0,412 \pm 0,067$	$0,361 \pm 0,014$	$0,327 \pm 0,010$
Этаноламинфосфатид	$0,284 \pm 0,008$	$0,265 \pm 0,002$	$0,257 \pm 0,070$	$0,211 \pm 0,007$	$0,187 \pm 0,007$
Инозитолфосфатид	$0,133 \pm 0,006$	$0,128 \pm 0,014$	$0,124 \pm 0,030$	$0,123 \pm 0,004$	$0,130 \pm 0,005$
Кардиолипид	$0,195 \pm 0,014$	$0,167 \pm 0,008$	$0,157 \pm 0,010$	$0,133 \pm 0,010$	$0,119 \pm 0,009$
Холестерин	$0,179 \pm 0,004$	$0,165 \pm 0,001$	$0,147 \pm 0,002$	$0,105 \pm 0,003$	$0,087 \pm 0,004$

Исследование митохондрий, отогретых при различных точках кривой медленного замораживания (см. таблицу), показало, что в период переохлаждения в составе мембран происходят существенные изменения фосфолипидов — снижение лецитина, этаноламинфосфатида, кардиолипина, холестерина и его эфиров. В опытах с хлортетрациклином (ХТЦ) обнаружен выход Ca^{2+} в окружающую среду, что может привести к активации фосфолипазы. На рис. 1 показана интенсивность флуоресценции зонда в опыте и контроле. Видно, что замороженные и отогретые митохондрии имеют гораздо меньшую интенсивность флуоресценции, что свидетельствует о выходе Ca^{2+} из митохондрий.

Замораживание до различных точек кривой медленного замораживания сопровождается интенсификацией сверхслабого свечения митохондрий, особенно после замораживания до эвтектических температур, что свидетельствует об активации процессов перекисного окисления липидов. Это подтверждается данными по изучению динамики накопления малонового диальдегида (МДА). С целью выяснения вклада в развитие цепных перекисных процессов различных факторов, формирующихся при замораживании — отогреве, последнюю процедуру проводили в 40%-ной ТХУ, что позволяет уменьшить накопление МДА при отогреве и выяснить влияние собственно замораживания на развитие перекисного окисления (рис. 2). Наиболее высокий уровень МДА наблюдается после замораживания до 3-й и 4-й точек, что совпадает с данными по регистрации хемилюминесценции митохондрий.

С целью выяснения роли эндогенных катализаторов в развитии перекисного окисления липидов при замораживании—отогреве митохондрий в среду замораживания добавляли ЭДТА (1 мМ). Помимо этого перед замораживанием цепь транспорта электронов восстанавливали дитионитом. Наконец, в опытах определяли роль наиболее активного из гемопротеидов — цитохрома с — в развитии перекисных процессов. Для этого перед замораживанием митохондрии подвергали осмотическому шоку, вызывающему выход цитохрома с из мембраны. В присутствии ЭДТА не происходило полного ингибирования процессов перекисного окисления липидов при замораживании—отогреве. Предварительное восстановление дитионитом и удаление цитохрома с полностью угнетали образование МДА в суспензии митохондрий (рис. 3).

В экспериментах на эритроцитах [6] также было показано, что при медленном замораживании до -25°C в их мембране снижается количество лецитина и этаноламинфосфатида. Лавлок [13] считает, что низкотемпературное повреждение эритроцитарных мембран обусловлено потерей холестерина и фосфолипидов. Известно, что лецитины являются одним из факторов, определяющих физиологическую стабильность и проницаемость биомембран, и находятся в ней в комплексе с холестерином [8]. Нарушение этого соотношения увеличивает проницаемость и уменьшает стабильность мембран [12]. Медленное замораживание, особенно до эвтектических температур, когда изменяются рН и ионная сила растворов, повышается концентрация солей и электролитов, способствует нарушению белок-липидных и липид-

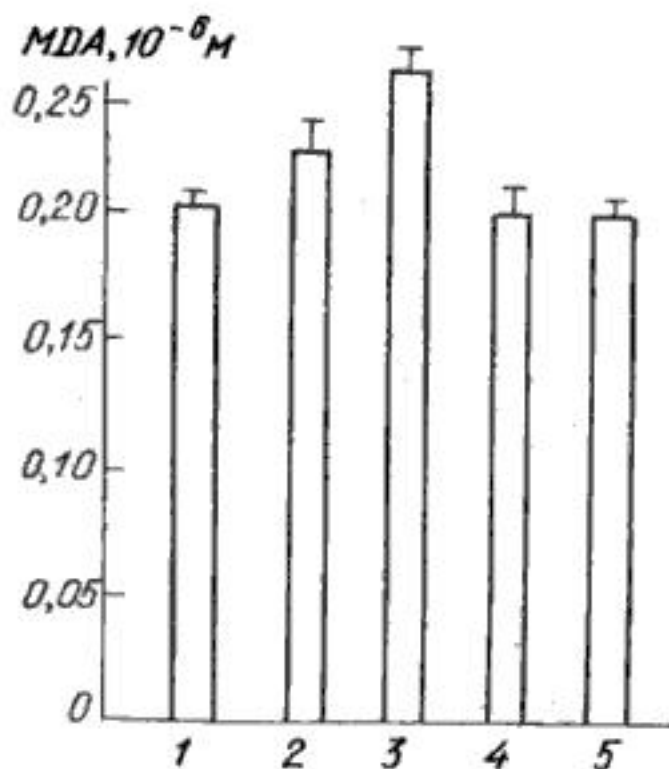


Рис. 3. Накопление ТБК-активных продуктов при замораживании митохондрий до 4-й точки:

1 — контроль; 2 — в присутствии 1 мМ ЭДТА; 3 — опыт; 4 — в присутствии 0,05 М дитионита; 5 — после удаления цитохрома с.

липидных компонентов за счет потери мембраной фосфолипидов и холестерина. Потеря холестерина при действии низких температур может привести к дестабилизации мембраны, что приведет к изменению проницаемости для катионов и анионов.

Хотя структура мембран митохондрий и их фосфолипидный состав имеют некоторые отличия, мы, однако, полагаем, что общие закономерности биохимической модификации липидного компонента, обнаруженные в митохондриях, могут иметь место и в других мембранных структурах клетки при замораживании и отогреве. Перекисному окислению способны подвергаться клетки печени [11], эритроциты [6], лимфоциты [16] и т. д., что свидетельствует о важном значении перекисной патологии в повреждении мембран этих структур.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белоус А. М., Лемешко В. В., Грек А. М., Бондаренко В. А. Исследование молекулярной организации и функции биологических мембран при воздействии низких температур. — В кн.: Механизмы криповреждения и криопротекции биологических структур. К., 1976, с. 30—35.
2. Бергельсон Л. Д. Биологические мембраны. М., «Наука», 1975. 183 с.
3. Бондаренко В. А., Лемешко В. В., Белоус А. М. Влияние различных режимов замораживания—оттаивания на хемилюминесценцию печени крыс. — Укр. біохім. журн., 1975, 47, № 6, с. 743—746.
4. Ташмухамедов Б. А., Газельганс А. И. Активный транспорт ионов через биологические мембраны. Ташкент «Фан», 1973. 352 с.
5. Ansell G. B., Hawthorne J. N., Dawson R. M. C. Form and function of phospholipids. Amsterdam, Elsevier, 1973. 152 p.
6. Broekhuysse R. N. Long-term storage of erythrocytes for quantitative analysis of lipids. — Clin. Chim. acta, 1974, 52, N 1, p. 53—58.
7. Chapman D., Dodd G. H. Physicochemical probes of membrane structure. — In: Structure and function of biological membranes. N.Y., 1972, p. 13—81.
8. Darke A., Finer E. G., Flook A. G., Phillips M. C. Nuclear magnetic resonance study of lecithin-cholesterol interactions. — J. Mol. Biol., 1972, 63, N 1, p. 265—270.
9. Esfahanni M., Limbrick A. R., Rhutton S. E. a. The molecular organization of lipids in the membrane of *Escherichia coli*: Phase transitions. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1971, 68, N 6, p. 3180—3187.
10. Green D. E. Membrane proteins: A perspective. Membrane structure and its biological application. — Ann. N.Y. Acad. Sci., 1969, 195, N 1, p. 150—172.
11. Högborg J., Orrenius S., Larson R. E. Lipid peroxidation in isolated hepatocytes. — Eur. J. Biochem., 1975, 50, N 3, p. 595—602.
12. Horton A. W., Schuff A. R., McClure D. W. Ionic transport through model membranes. II. Function of cholesterol and steroid hormones. — Biochim. et biophys. acta, 1973, 318, № 1, p. 225—234.
13. Lovelock J. E. Denaturation of lipid-protein complexes as a cause of damage by freezing. — Proc. Roy. Soc. London. Ser. B, 1957, 147, N 1, p. 427—433.
14. Melchior D. Z., Morowitz H. J., Sturtevant J. M., Tsong T. G. Characterization of plasma membrane of mycoplasma *caidlawii*. VII. Phase transition of membrane lipids. — Biochim. et biophys. acta, 1970, 219, N 1, p. 114—122.
15. Raison G. K., Lyons G. M., Mehlhorn R. G., Keith A. D. Temperature-induced phase changes in mitochondrial membranes detected by spin labeling. — J. Biol. Chem., 1971, 246, № 3, p. 4036—4040.
16. Romeo D., Zabucchi G., Miani N., Rossi F. Ion movement across leucocyte plasma membrane and excitation of their metabolism. — Nature, 1975, 253, N 5492, p. 542—544.
17. Santiago E., Curra F., Macarulla J. H. Effect of ascorbate on phospholipids during mitochondria swelling. — Rev. fisiol., 1968, 24, N 1, p. 25.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
22. XII 1976 г.

В. А. Бондаренко, Т. П. Бондаренко, А. М. Белоус

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПОЛИЭТИЛЕНОКСИДОВ С ИСКУССТВЕННЫМИ ФОСФОЛИПИДНЫМИ И МИТОХОНДРИАЛЬНЫМИ МЕМБРАНАМИ

Биологические мембраны отличаются высокой чувствительностью к действию замораживания—отогрева. Присутствие в среде замораживания криопротекторов в значительной степени уменьшает неблагоприятное влияние различных физико-химических факторов, действующих на биоструктуры в зоне низких температур. Выраженным криопротекторным действием обладают полимерные соединения — полиэтиленоксиды (ПЭО) [6]. При замораживании некоторых биоматериалов до -196°C ПЭО существенно влияют на процессы кристаллизации, способствуя образованию мелкокристаллических и аморфных структур льда [6]. ПЭО с молекулярным весом 400 и выше характеризуются довольно выраженной способностью обратимо хелатировать некоторые биологически важные катионы, что может существенно повысить их криопротекторные свойства [9]. Однако механизм действия ПЭО на биологические структуры остается во многом неясным и требует более глубокого изучения характера взаимодействия ПЭО с биоструктурами, в частности с биомембранами. Целью настоящей работы явилось изучение некоторых особенностей взаимодействия полиэтиленоксидов с искусственными (лецитиновыми) и митохондриальными мембранами.

Материалы и методика. Лецитиновые суспензии готовили из лецитина куриных яиц, экстрагированного по Фолчу [7], а также из окисленного коммерческого препарата. Для получения липосом лецитин вдували в буферный раствор (трис- HCl , 100 мМ, рН 7,4). Митохондрии печени крыс получали по описанному методу [8]. Осадок суспендировали в растворе KCl (105 мМ, рН 7,4). Хроматографический анализ липидов митохондрий, экстрагированных по разработанному методу [5], проводили в тонком слое силикагеля, отдельные фракции определяли спектрофотометрически [4]. Регистрацию хемилюминесценции суспензии митохондрий и липосом проводили, как описано ранее [2]. Липосомы и митохондрии преинкубировали с ПЭО в течение 10 мин. Для изучения характера взаимодействия ПЭО с липосомами и мембранами митохондрий в качестве зонда использовали ионы Fe^{2+} , что обусловлено способностью ПЭО хелатировать железо [3], а ионов Fe^{2+} при контакте с липидной фазой мембран индуцировать вспышку свечения [1, 2]. При этом амплитуда вспышки во многом зависит от глубины внедрения молекул ПЭО в гидрофобную область мембраны и от способности взаимодействовать с липидами.

Результаты и их обсуждение. Динамику изменения параметров хемилюминесценции суспензии митохондрий, подвергнутых инкубации (37°C) в присутствии 15%-ных растворов ПЭО различных молекулярных весов, иллюстрирует рис. 1. Особенно выражено изменяются при этом интенсивность свечения в фазах «медленной» и «быстрой» вспышки свечения после повторного введения ионов Fe^{2+} через 8 мин инкубации в присутствии ионов Fe . Как видно, интенсивность Fe^{2+} -активируемой хемилюминесценции при инкубации митохондрий в присутствии ПЭО-100 и ПЭО-300 возрастает, однако наиболее значительно процесс развивается в присутствии ПЭО-400, причем возрастает также уровень собственного свечения митохондрий (кривая 4 рис. 1), что, возможно, свидетельствует о способности ПЭО-400 катализировать процесс даже при следовых количествах железа. На рис. 2 представ-

лены данные об интенсивности вспышки свечения суспензии лецитина в присутствии различных концентраций ПЭО-400 и при введении в систему разных количеств ионов Fe^{2+} . Видно, что по мере возрастания концентрации ПЭО-400 амплитуда вспышки свечения растет. Резкое возрастание интенсивности свечения наблюдается при инкубации липосом в присутствии 25%-ного ПЭО-400. Однако следует учесть, что

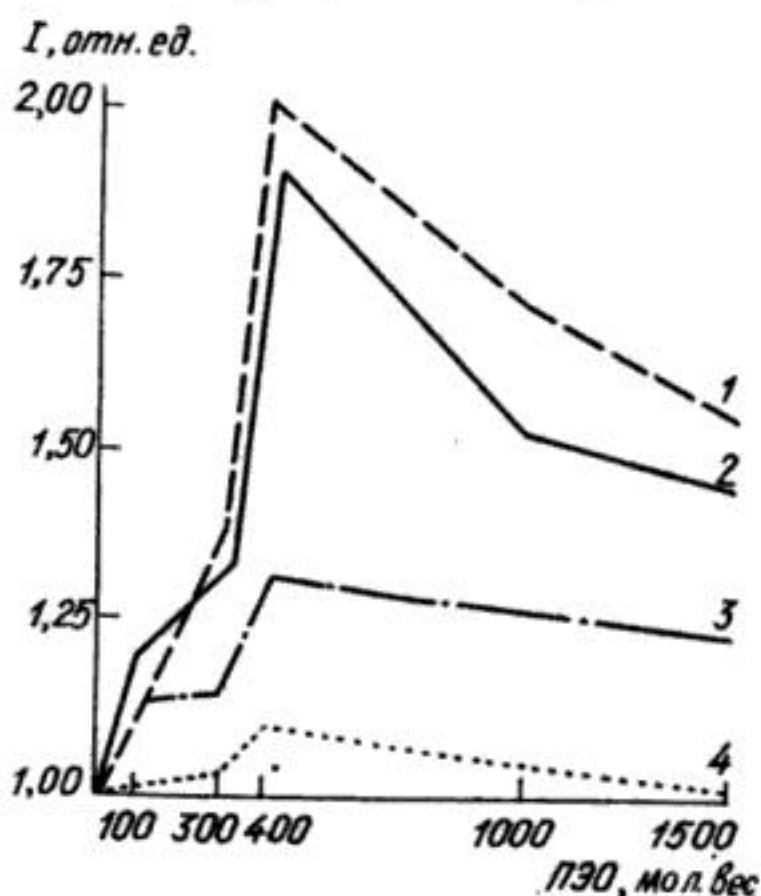


Рис. 1. Динамика накопления параметров Fe^{2+} -активируемой хемилюминесценции при $+37^\circ\text{C}$ в присутствии 15%-ных ПЭО различных молекулярных весов (за относительную единицу принята интенсивность хемилюминесценции в присутствии этиленгликоля):

1 — «медленная» вспышка свечения после добавления 1×10^{-4} М FeSO_4 ; 2 — «быстрая» вспышка свечения после добавления 1×10^{-3} М FeSO_4 через 8 мин инкубации в присутствии 5×10^{-4} М FeSO_4 ; 3 — светосумма свечения за 8 мин инкубации в присутствии 5×10^{-4} М FeSO_4 ; 4 — собственная хемилюминесценция за 10 мин инкубации.

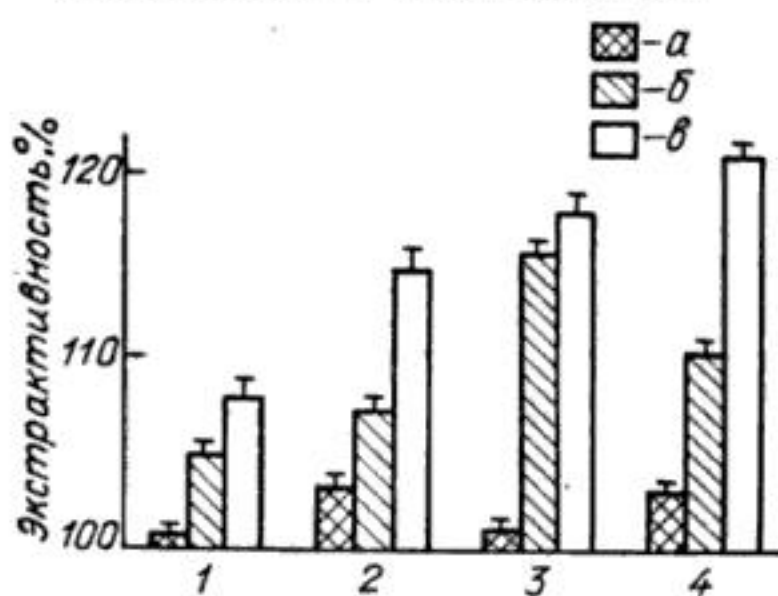


Рис. 3. Динамика изменения экстрактивности фосфолипидов после 20 мин инкубации (4°C) митохондрий в присутствии различных концентраций ПЭО-400 (экстрактивность выражена в процентах, за 100% принято количество липидов, экстрагируемых сразу после добавления ПЭО-400):

1 — лецитин; 2 — этаноламинфосфатид; 3 — инозитолфосфатид; 4 — кардиолипин; а — инкубация в присутствии 1%-ного ПЭО-400; б — 5%-ного ПЭО-400; в — 10%-ного ПЭО-400.

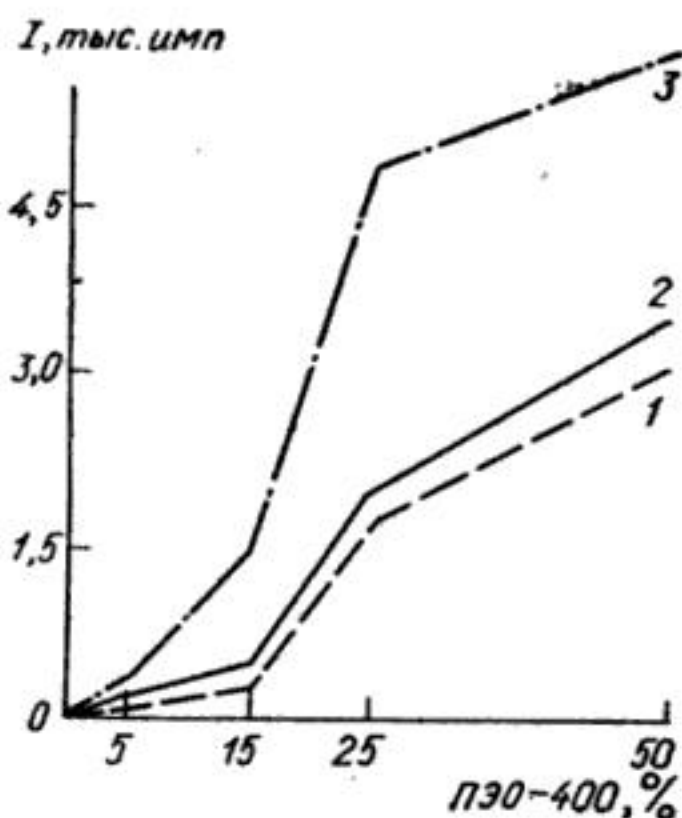


Рис. 2. Изменение амплитуды вспышки свечения липосом при повышении концентрации ПЭО-400 после добавления FeSO_4 в следующих концентрациях:

1 — $5,5 \times 10^{-4}$ М; 2 — $1,1 \times 10^{-3}$ М; 3 — $1,65 \times 10^{-3}$ М.

в модельных условиях развитие процесса во многом зависит от соотношения концентраций компонентов реакции, в частности интенсивность свечения будет лимитироваться количеством ионов Fe^{2+} , хелатируемых ПЭО в растворе, что может заметно понизить способность ионов Fe^{2+} контактировать с липидной фазой. Поэтому воздействие ПЭО-400 на хемилюминесценцию может заметно проявиться при наличии в системе избытка ионов Fe^{2+} . Действительно, при повышении концентрации ионов Fe^{2+} в системе (кривая 3 рис. 2) свечение активируется даже в присутствии 15%-ного ПЭО-400.

Результаты анализа экстрактивности липидов из митохондрий в зависимости от времени инкубации органелл с различными концентрациями ПЭО-400 представлены на рис. 3. Видно, что с увеличением продолжительности инкубации в присутствии ПЭО экстрактивность

основных фракций митохондриальных липидов растет. Наиболее высокая экстрактивность наблюдается в присутствии 10%-ного ПЭО-400. С уменьшением концентрации ПЭО экстрактивность липидов снижается. Наиболее существенно изменяется экстрактивность кардиолипина — специфического митохондриального фосфолипида. Следует отметить, что для наиболее ненасыщенных фосфолипидов — этаноламинфосфатида и кардиолипина — повышение экстрактивности наблюдается уже в присутствии 1%-ного ПЭО-400.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что ПЭО с молекулярным весом 400 и выше способны изменять состояние липидной фазы мембран. Данные о существенном возрастании интенсивности свечения в присутствии ПЭО-400 позволяют предположить, что хелатирование части добавленного железа происходит в липидной фазе мембран. Помимо этого ПЭО-400 существенно лабилизирует мембрану, о чем свидетельствует изменение экстрактивности липидов в процессе инкубации митохондрий в присутствии криопротектора. Повышение концентрации ПЭО-400 в среде приводит к более выраженному взаимодействию ПЭО с гидрофобной фазой мембран, о чем свидетельствует возрастание амплитуды вспышки свечения при добавлении ионов Fe^{2+} в суспензию лецитина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Білоус А. М., Луговий В. І., Лемешко В. В., Бондаренко В. А., Грек А. М., Гулезський А. К. Проблеми кріобіохімії. — Вісн. АН УРСР, 1976, № 2, с. 38—47.
2. Бондаренко В. А., Лемешко В. В., Білоус А. М. Вплив різних режимів заморожування—відтавання на хемілюмінесценцію мітохондрії печінки щурів. — Укр. біохім. журн., 1975, 47, № 6, с. 743—747.
3. Веркин Б. И., Моисеев В. А., Нардид О. А., Пушкарь Н. С. Комплексообразование ионов группы железа в водных растворах полиэтиленоксидов. — Докл. АН СССР, 1975, 224, № 6, с. 1341.
4. Грибанов Г. А., Сергеев С. А. Экспресс-микроанализ общих липидов сыворотки крови и их фракций. — Вопр. мед. химии, 1975, 21, № 6, с. 652—655.
5. Кейтс М. Техника липидологии. М., «Мир», 1975. 322 с.
6. Пушкарь Н. С., Белоус А. М. Введение в криобиологию. К., «Наук. думка», 1975. 344 с.
7. Folch J., Lees N., Stanley G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. — J. Biol. Chem., 1957, 226, N 1, p. 497—499.
8. Hunter F. E., Mollison I. R., Bridges W. F. Reincorporation of diphosphopyridine nucleotide into mitochondrial enzyme systems. — J. Biol. Chem., 1959, 234, N 3, p. 693—696.
9. Lohman W., Fowler C. F., Moss A. I., Perkins W. H. Some remarks on cells during freezing and thawing: Electrospin resonance investigations concerning this effect. — Experientia, 1964, 20, N 5, p. 290—297.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
22. XII 1976 г.

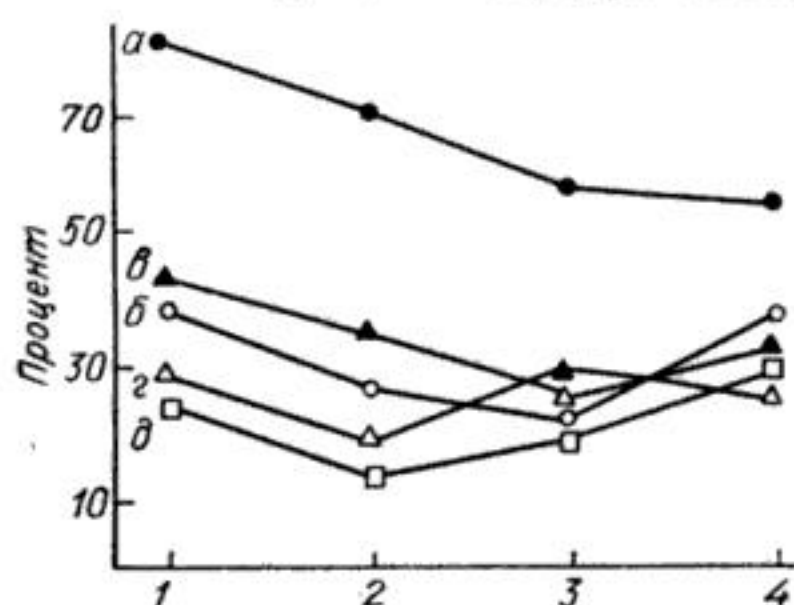
УДК 576.343.577.15:616—001.19

Л. П. Кравченко

ВЛИЯНИЕ КРИОПРОТЕКТОРОВ НА СТАБИЛЬНОСТЬ ЛИЗОСОМ В УСЛОВИЯХ МЕДЛЕННОГО ЗАМОРАЖИВАНИЯ

Активация лизосомальных ферментов в результате экстремальных воздействий нарушает структуру и функцию клетки вследствие лизиса основных ее клеточных компонентов. Значительные нарушения лизосомальных структур отмечены при воздействии на них низких температур. В связи с этим выяснение возможности стабилизации лизосомальных мембран при холодовом воздействии имеет существенное значение в практике низкотемпературного консервирования органов и тканей.

В предыдущих исследованиях нами показано, что значительное повреждение мембран лизосом отмечается в температурном интервале 0—30° С. Эти данные согласуются с результатами опытов многих исследователей, показавших, что диапазон температур от 0 до —40° С является критическим при замораживании клеточных суспензий. В связи с этим представляло интерес исследовать защитные свойства полиэтиленоксида с молекулярным весом 400 (ПЭО-400), глицерина, оксиэтилированного глицерина (ОЭГ) с



Уровень неседиментируемой активности кислых гидролаз (% общей активности) после замораживания суспензии лизосом до —30° С:

1 — рибонуклеаза; 2 — дезоксирибонуклеаза; 3 — катепсины; 4 — фосфатаза. Лизосомы, ресуспендированные в 0,15 М растворе хлористого натрия (рН 7,4) (а), с ПЭО-400 (б), глицерином (в), оксиэтилированным глицерином (г), диметилсульфоксидом (д).

этилированного глицерина (ОЭГ) с $n=10$ и диметилсульфоксида (ДМСО) при замораживании лизосом до —30° С со скоростью 1° С в 1 мин. Показателем повреждения мембран лизосом служило определение уровня неседиментируемой активности маркерных ферментов (кислой рибонуклеазы, дезоксирибонуклеазы, катепсинов и фосфатазы) в среде замораживания.

Материалы и методика. Выделение фракции лизосом и определение активности маркерных ферментов проводились по методам, описанным в предыдущих работах [1, 2].

Результаты и их обсуждение. Предварительно было исследовано влияние криопротекторов на изолированные лизосомы и на активность

растворимых гидролаз в условиях инкубации при температуре 20° С. Установлено, что 30-минутная инкубация суспензии лизосом с 10%-ными растворами (конечная концентрация) криопротекторов не влияла на проницаемость мембран и выход гидролитических ферментов в среду инкубации по сравнению с 0,15 М раствором хлористого натрия, уровень солюбилизации маркерных ферментов в присутствии криопротекторов был значительно ниже или приближался к контрольному

Уровень неседиментируемой активности кислых гидролаз в среде инкубации лизосом с криопротекторами при температуре 20°С в течение 30 мин

Среда инкубации	Фермент			
	РНКаза	ДНКаза	кислая	фосфатаза
0,15 М NaCl контроль	$0,60 \pm 0,07$	$0,24 \pm 0,03$	$2,13 \pm 0,34$	$0,072 \pm 0,005$
ПЭО-400 <i>p</i>	$0,37 \pm 0,08$ <0,05	$0,17 \pm 0,02$ <0,02	$0,99 \pm 0,15$ <0,01	$0,060 \pm 0,006$ >0,05
Глицерин <i>p</i>	$0,69 \pm 0,12$ >0,05	$0,26 \pm 0,03$ >0,05	$1,01 \pm 0,13$ <0,002	$0,040 \pm 0,005$ <0,002
ОЭГ <i>p</i>	$0,43 \pm 0,08$ <0,05	$0,15 \pm 0,03$ <0,05	$0,71 \pm 0,07$ <0,002	$0,060 \pm 0,005$ >0,05
ДМСО <i>p</i>	$0,43 \pm 0,06$ <0,05	$0,26 \pm 0,08$ >0,05	$0,86 \pm 0,06$ <0,002	$0,040 \pm 0,007$ <0,02

Примечание. Величина *p* рассчитана в сравнении с данными, полученными при инкубации лизосом в 0,15 М растворе NaCl без добавок криопротекторов (контроль).

(см. таблицу). После 1-часовой инкубации криопротекторов с растворами солюбилизованных ферментов не обнаруживалось изменений их активности по сравнению с контролем.

Таким образом, изученные криопротекторы не оказывали лабилизирующего влияния на мембраны лизосом до замораживания и не изменяли каталитической активности маркерных белков-ферментов. При замораживании суспензии лизосом в присутствии криопротекторов до -30°C обнаружен значительно меньший уровень солюбилизации гидролитических ферментов в среде замораживания по сравнению с пробами, которые замораживались на 0,15 М растворе хлористого натрия без защитных добавок (см. рисунок). Полученные данные указывают на значительный защитный эффект этих соединений для мембраны лизосом.

Необходимо отметить, что соединение с предполагаемыми криопротекторными свойствами — ОЭГ оказывало значительно более выраженный защитный эффект, чем глицерин. Изученные соединения по степени эффективности криозащиты в отношении мембран лизосом могут быть расположены в такой убывающей последовательности: диметилсульфоксид, оксиэтилированный глицерин, полиэтиленоксид, глицерин.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кравченко Л. П., Луговой В. И., Белоус А. М. Значение концентрационных факторов в криповреждении лизосом. — Укр. біохім. журн., 1976, 48, № 1, с. 11—15.
2. Луговой В. И., Кравченко Л. П. Стабильность лизосомальных мембран при различных режимах замораживания—оттаивания. — Укр. біохім. журн., 1976, 48, № 6, с. 430—432.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
14. XII 1976 г.

УДК 57:536.48.047:612.015.11

Е. В. Кудокоцева

ВЛИЯНИЕ МЕДЛЕННОГО ЗАМОРАЖИВАНИЯ НА ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ МЕМБРАН И ГИДРОКСИЛАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ МИКРОСОМ ИЗ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ

Влияние замораживания на мембраны эндоплазматического ретикулаума печени изучено в недостаточной степени. Вместе с тем исследование механизмов криповреждений на уровне мембран микросом представляет большой интерес, поскольку окислительно-восстановительные реакции, протекающие в мембранах этого типа, являются жизненно важными для функционирования клетки и сохранения ею ряда специфических свойств (окислительное гидроксилирование и др.).

В настоящей работе исследовано влияние медленного замораживания на активность ферментного перекисного окисления липидов микросом, а также на скорость окисления микросомами НАДФН и субстрата микросомального окисления — 4-диметиламинохалкона (ДМХ).

Материалы и методика. В опытах использовали белых беспородных крыс весом 180—250 г. Содержание малонового диальдегида (МДА) определяли в микросомальной фракции, выделенной по методу Камафа [6]. После двукратной промывки микросом раствором, лишенным ионов кальция, осадок суспендировали в среде 125 мМ трис-НСl (рН 7,4). Чистоту фракции микросом контролировали электронно-микроскопически.

Для определения скорости окисления микросомами НАДФН и субстрата микросомального окисления — ДМХ фракцию общих микросом из печени получали по методу А. И. Арчакова [2].

Замораживание суспензии микросом осуществляли медленно — со скоростью 1°C в 1 мин до температуры -25°C . Отогрев суспензии проводили в водяной бане при температуре 37°C .

Результаты и обсуждение. В предыдущих исследованиях нами была изучена кинетика хемилюминесценции микросом печени крыс, а также накопление МДА в НАДФН-зависимой системе перекисного окисления микросомальных липидов в норме и после быстрого замораживания до температуры -196°C и выяснено, что сложная ферментная система мембраны микросом мало чувствительна к такому способу замораживания. В связи с этим большой интерес представляло изучение влияния медленного замораживания на микросомальные мембраны, поскольку, как известно [8, 5], различные режимы замораживания по-разному влияют на структуры клетки. Например, если митохондрии замораживать в жидком азоте, то уровень повреждения их значительно меньше, чем при медленном замораживании [3].

Накопление МДА в микросомальной фракции печени крысы в норме и после воздействия низких температур, мкМ/мг белка

Вариант опыта	Содержание МДА в пробах	Накопление МДА во времени	
		7,5 мин инкубации	15 мин инкубации
Контроль	$0,394 \pm 0,082$	$4,950 \pm 0,791$	$7,843 \pm 0,902$
Медленное замораживание до -25°C и быстрый отогрев	$0,368 \pm 0,153$	$5,125 \pm 0,626$	$7,585 \pm 0,892$

Примечание. Величина p вычисляется в сравнении с контролем и составляет более 0,1.

При медленном замораживании скорость накопления МДА существенно не изменяется (см. таблицу). По-видимому, замораживание микросом не вызывает значительной пространственной разобщенности центров радикалообразования и субстратов окисления — ненасыщенных жирных кислот.

Как известно, перенос электронов в ферментном перекисном окислении осуществляется при участии НАДФН, цитохрома b_5 и апофермента цитохрома Р-450, причем ведущую роль в этих процессах, вероятнее всего, играет SH-группа цитохрома Р-450, комплексирующаяся с ионами эндогенного железа и участвующая в иницировании реакций перекисного окисления в микросомах. Эта же SH-группа цитохрома Р-450 участвует в реакциях переноса электронов при гидроксилировании в микросомах [1]. Поэтому представлялось необходимым изучить скорость окисления субстратов на цитохроме Р-450 и выяснить при этом возможные крионарушения структуры мембран эндоплазматического ретикулума. С этой целью в качестве субстрата мы использовали флуоресцентный зонд — ДМХ. Было установлено, что скорость окисления экзогенного НАДФН микросомами, измеренная по снижению интенсивности флуоресценции НАДФН в норме и после замораживания, не изменяется. Вместе с тем скорость окисления ДМХ при тех же условиях замораживания снижается на 48%. Возможно, что медленное замораживание и последующий отогрев изменяют гидрофобные взаимодействия, играющие решающую роль в фиксации и функционировании цитохрома Р-450, участвующего в реакциях гидроксилирования. При этом нарушения указанных взаимодействий существенно не отражаются на участии этого цитохрома в ферментном перекисном окислении.

Результаты проведенных исследований показывают, что медленное замораживание до -25°C не влияет на ферментное перекисное окисление липидов мембран микросом, однако одна из основных функций мембран — гидроксилирование субстратов — повреждается в значительной степени.

Выявленные нами нарушения функционирования микросом могут быть связаны со многими переменными процесса замораживания, такими как дегидратация [4], гиперконцентрация [7] и другими физико-химическими факторами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арчаков А. И. Микросомальное окисление. М., «Наука», 1975. 327 с.
2. Арчаков А. И., Девичевский В. М., Карузина И. И. и др. Влияние концентрации буфера на скорость реакций транспорта электронов в микросомах печени. — Биохимия, 1968, 33, № 3, с. 479—487.
3. Лемешко В. В., Белоус А. М. Действие неглубокого замораживания на окислительное фосфорилирование, дыхание и флуоресценцию НАД-Н-гомогенатов печени крысы. — В кн.: Актуальные вопросы консервации и трансплантации костного мозга и крови. Харьков, 1972, с. 147—151.
4. Лозина—Лозинский Л. К. Очерки по криобиологии. Л., «Наука», 1972. 287 с.
5. Fishbein W. N., Stowell R. E. Studies on the mechanism of freezing damage to mouse liver using a mitochondrial enzyme assay. II. Comparison of slow and rapid cooling rates. — Cryobiology, 1969, 6, N 3, p. 227—234.
6. Kamath S. A., Narayan K. A. Interaction of Ca^{++} with endoplasmic reticulum of rat liver: a standardized procedure for the isolation of rat liver microsomes. — Anal. Biochem., 1972, 48, N 1, p. 53—61.
7. Lovelock J. E. The denaturation of lipid-protein complexes as a cause of damage during freezing. — Proc. Roy. Soc. London. Ser. B., 1957, 147, N 907, p. 427—433.
8. Mazur P. Cryobiology: the freezing of biological systems. — Science, 1970, 169, N 3934, p. 939—948.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
22. XII 1976 г.

УДК 57:536.48.047

В. М. Медведев, Н. И. Галка, Н. Ф. Северин,
В. И. Гарбуз

ВЛИЯНИЕ АЗОТНОЙ, ГЕЛИЕВОЙ И КИСЛОРОДНОЙ СРЕД НА ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В ОЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЕ КАК МОДЕЛИ БИОЛОГИЧЕСКОГО ОКИСЛЕНИЯ

В настоящее время в народном хозяйстве, медицине и биологии находят все большее применение инертные газы — азот и гелий, в частности, в целях консервации, где они применяются как в сжиженном, так и в газообразном виде. В связи с этим представляет интерес выяснить некоторые аспекты их действия на живые организмы, и в частности на окислительные процессы, протекающие в них.

В данной работе приведены результаты исследования влияния азотной, гелиевой и кислородной сред на окислительные процессы, протекающие в олеиновой кислоте, используемой в качестве модели липидного окисления.

Имеющаяся гипотеза [1] о механизме свечения при самоокислении ненасыщенных жирных кислот и жиров объясняет его как результат релаксации возбужденных альдегидов и кетонов, образующихся при рекомбинации перекисных радикалов. Таким образом, в излучении, сопровождающем процесс окисления, можно ожидать, как минимум, две полосы — «кетонную» и «альдегидную». Поэтому пред-

ставляет интерес регистрация спектра спонтанного излучения олеиновой кислоты.

Исследования проводились с помощью метода сверхслабого свечения. Созданная нами установка работала в режиме счета фотонов. Детектором излучения служил фотоумножитель ФЭУ-42. При анализе спектра спонтанного излучения олеиновой кислоты были использованы интерференционные светофильтры. Полоса пропускания составляла 10—13 нм, коэффициент — 30—50%.

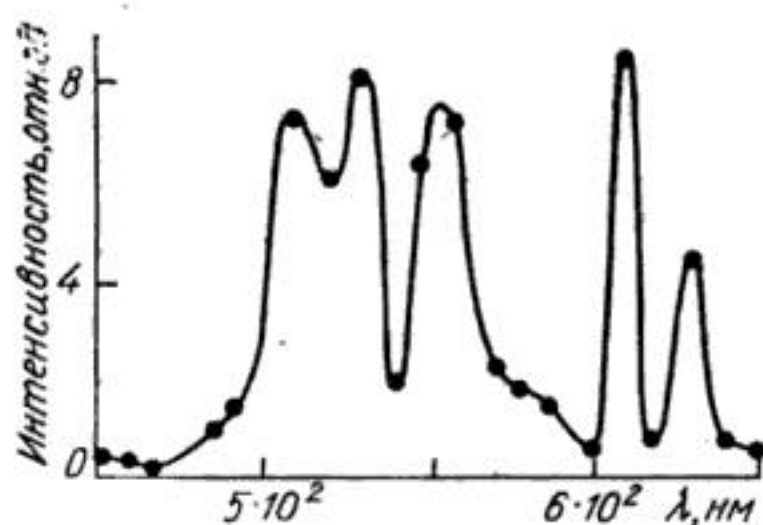


Рис. 1. Спектр собственного излучения олеиновой кислоты.

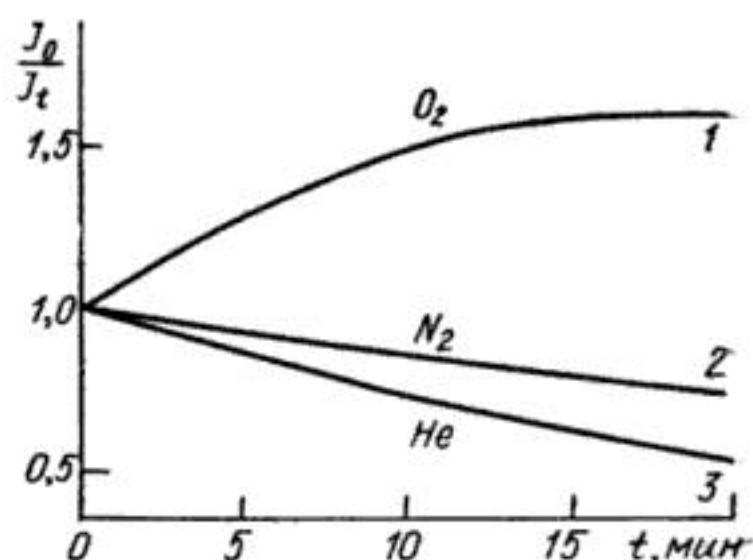


Рис. 2. Влияние кислородной (1), азотной (2), гелиевой (3) сред на скорость окисления олеиновой кислоты.

Исследуемый образец помещался в термостатирующий, герметизированный бюкс, расположенный против фотокатода. Газы в бюкс напускали с помощью замкнутой системы, включающей термостатирующее устройство для уравнения температуры газа и температуры исследуемого образца.

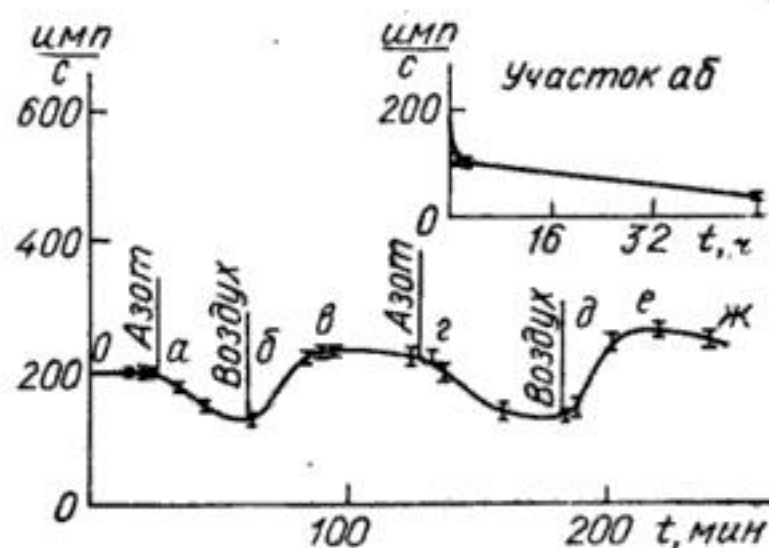


Рис. 3. Результаты периодического создания инертной (азот) и активной (воздух) атмосфер окисляющейся олеиновой кислоты.

В спектре собственного излучения олеиновой кислоты были обнаружены четыре максимума в области 510—640 нм с вершинами при 510; 555; 615 и 630 нм. Первый широкий пик, по-видимому, представляет собой двойной неразрешенный максимум. Можно предположить, что спектр спонтанного излучения состоит из двух серий: 510—555 и 615—630 нм. Полученный спектр является более разрешенным по сравнению со спектром, представленным в работе А. И. Журавлева [2] (рис. 1).

На рис. 2 приведены результаты, демонстрирующие влияние азотной, гелиевой и кислородной сред на скорость окисления олеиновой кислоты. По вертикали отложено отношение интенсивности свечения (скорость окисления) кислоты при воздушной атмосфере к интенсивности окисления соответственно при азотной, гелиевой и кислородной атмосферах. Как видно из рисунка, кислородная атмосфера способствует увеличению скорости окисления кислоты по сравнению с обычным воздухом. Этот факт отражает кинетику скорости окисления при увеличении концентрации кислорода. Противоположно действие азотной и гелиевой атмосфер, причем гелиевая атмосфера оказывает более ингибирующее действие. По-видимому, это связано с различиями в диффузии азота и гелия в олеиновую кислоту.

Результаты периодического создания активной и инертной атмосферы окисляющейся олеиновой кислоты приведены на рис. 3. Участок

Оа представляет установившееся свечение в результате продувки обычным воздухом; *аб* — динамику хемилюминесценции в результате продувки азотом. Как видно из рисунка, последующий пуск воздуха (участок *Ов*) резко увеличивает скорость окисления, а плато, соответствующее насыщению, расположено выше исходного участка *Оа*. Дальнейший цикл азот — воздух вызывает аналогичный эффект. Наблюдаемое явление, по-видимому, можно объяснить, предположив, что при наличии инертной атмосферы в олеиновой кислоте накапливаются радикалы, которые затем увеличивают скорость окисления.

Рассматривая реакцию самоокисления жирных кислот и жиров, можно заметить, что отсутствие кислорода обрывает реакцию на этапах $R' + O_2 \rightarrow RO_2$ и $P + O_2 \rightarrow \eta\nu$.

В связи с тем, что реакция $P + O_2 \rightarrow \eta\nu$ — результат рекомбинации перекисных радикалов RO_2 и обрыв цепи за счет отсутствия кислорода не может вызвать их накопление, становится очевидным, что в отсутствие кислорода происходит накопление радикалов типа R' , а не RO_2 .

Для выяснения условий накопления данных радикалов проведен эксперимент, заключающийся в длительном (40 дней) облучении откачанной на форвакуум олеиновой кислоты солнечным светом. Показано, что в спектре излучения солнца существует компонента, вызывающая образование радикалов типа R' олеиновой кислоты, полная диссипация которых наступает приблизительно через 140 ч после пуска воздуха.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тарусов Б. Н., Журавлев А. И. Биохемилюминесценция липидов. — В кн.: Биолуминесценция. М., 1965, с. 43—45. Труды Моск. о-ва испытателей природы. Т. 21.
2. Журавлев А. И. Субстраты и механизмы эндогенной (химической) генерации возбужденных состояний и сверхслабого свечения в тканях. — Труды Моск. о-ва испытателей природы, 1972, 39, с. 17—31.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
22. XII 1976 г.

УДК 57:536.48.047:547:96+543.3:536.48

В. А. Моисеев, В. В. Манк, А. В. Зинченко,
В. Д. Зинченко

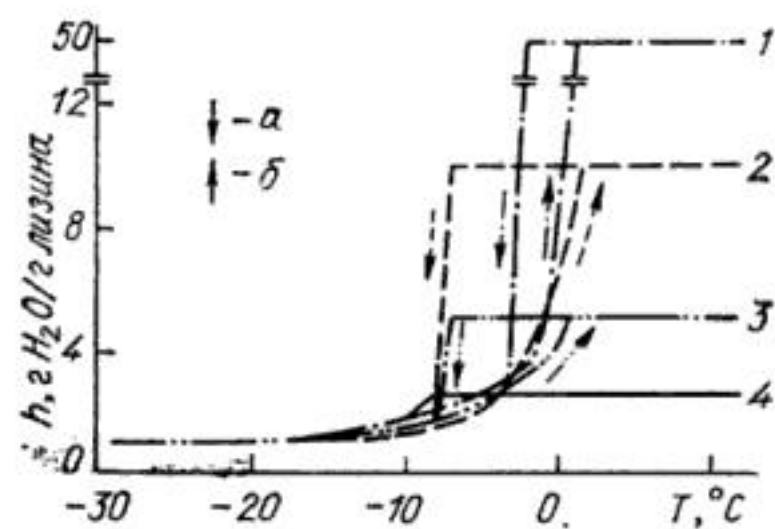
О СОСТОЯНИИ ВОДЫ В РАСТВОРАХ ЛИЗИНА

Известно, что в растворах протеинов, нуклеиновых кислот, аминокислот и ряда водорастворимых полимеров часть воды не замерзает при температуре ниже точки замерзания раствора [1, 6, 7]. Вопросы исследования количества и свойств воды в растворах веществ биологической природы, а также причин, препятствующих ее вымораживанию, важны при изучении низкотемпературного консервирования биологических объектов [2].

В настоящей работе представлены результаты исследования состояния воды в растворах лизина в интервале температур от 20 до -30°C при охлаждении и последующем нагревании раствора с использованием метода ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Спектры ЯМР снимали на приборах РЯ-2305 и JNM-4H-100 с рабочей частотой для протонов соответственно 60 и 100 мГц. Температура поддерживалась с точностью $\pm 1^\circ\text{C}$. После каждого изменения температуры на 1°C смеси выдерживали не менее 2 ч для установления равновесия. Концентрированные растворы L-лизина фирмы «Реанал» готовили без буфера в дистиллированной воде, pH раствора в зависимости от кон-

центрации менялся от 9,35 до 10,3. Чистоту лизина проверяли на хроматографе «Хром-2». В пределах чувствительности прибора примесей не обнаружено.

В спектрах ЯМР водных растворов лизина в интервале концентраций 19,8—99 мг/мл трудно наблюдать полосы протонов функциональных групп аминокислоты вследствие большой интенсивности линии воды. Их можно регистрировать в растворе лизина в тяжелой воде (99,8% D_2O). В этом случае в спектре видны полосы групп CH_2 , CH



Зависимость количества подвижной воды от температуры в растворах лизина различной концентрации (в мг/мл): 1 — 19,8; 2 — 99; 3 — 198; 4 — 396. а — охлаждение; б — нагрев.

и H_2O , положение которых совпадает с известными химическими сдвигами [5]. Линии поглощения NH_3^+ сильно уширены за счет квадрупольной релаксации ядер азота и не видны в полученных спектрах. При охлаждении растворов лизина в обычной воде ниже $0^\circ C$ в спектрах ЯМР резко уменьшается интенсивность полосы воды. Наряду с сигналом невымерзшей воды наблюдаются полосы поглощения функциональных групп лизина. С понижением температуры полосы этих групп постепенно уширяются, в то время как положение их и интегральная интенсивность не зависят от температуры.

На рисунке представлено изменение количества невымерзшей воды в системе, рассчитанное по площади под кривыми поглощения H_2O . Видно, что при охлаждении раствора до некоторой температуры, характерной для данной концентрации, наступает фазовое превращение, в результате которого часть воды переходит в лед. Для слабоконцентрированных растворов этот переход наблюдается вблизи $0^\circ C$. При повышении концентрации смеси точка резкого уменьшения амплитуды сигнала смещается до $-8^\circ C$ и при последующем увеличении концентрации лизина почти не меняется (см. рисунок).

Ниже точки фазового перехода воды в лед на спектре ЯМР остается узкая полоса воды, сохраняющей подвижность при данной температуре. Ее интегральная интенсивность меняется слабо при дальнейшем понижении температуры. Характерно, что количество невымерзшей воды ниже $10^\circ C$ практически одинаково для различных исходных концентраций раствора. В соответствии с гипотезой Кюнтца и др. [6], невымерзшей остается вода, непосредственно связанная с гидрофильными центрами растворенного вещества. Независимость количества подвижной воды от концентрации в исследованном диапазоне составов смеси говорит о том, что при этих концентрациях еще не проявляются взаимодействия молекул лизина, способные привести к блокировке центров связывания воды. В предельном случае, когда в растворе содержится только связанная вода, резкого скачка интенсивности сигнала при охлаждении не наблюдается. При температуре $-25^\circ C$ невымерзшими остаются примерно 0,8 г H_2O /г лизина. Это значение несколько больше величины, полученной Кюнтцем [7] (0,6 г H_2O /г лизина). Отличие результатов, по-видимому, связано с разной скоростью охлаждения смеси, применявшейся в наших опытах и в работе [7].

Размораживание растворов, как видно из рисунка, идет по другим кривым, лежащим под кривыми замораживания и совпадающим с ними при температуре выше $0^\circ C$. Существование температурного гистерезиса и формы гистерезисной петли определяется количеством растворенного лизина. Следует отметить, что независимо от концентрации

исходного раствора обратные кривые размораживания практически совпадают.

Причину наблюдаемых температурных гистерезисов следует связывать, по-видимому, с особенностями фазовых переходов в исследуемых растворах, которые являются гомогенными при высоких температурах. При переходе части воды в лед система становится гетерогенной. При этом образуются и растут кристаллы льда, а также возникают участки повышенной концентрации лизина со связанной водой. Подобное явление четко фиксируется при визуальном наблюдении охлажденных растворов биополимеров в криомикроскопе [3]. Естественно, что плавление образовавшихся кристаллов льда и участков повышенной концентрации лизина подчиняется другим закономерностям, чем те, по которым происходила кристаллизация гомогенного раствора. Известно, например, что в водных растворах с высокой концентрацией биополимера размораживание может потерять характер фазового превращения первого рода и выродиться в растянутый переход порядок—беспорядок, распределенный в определенном интервале температур [4]. Как видно из приведенных экспериментальных данных, подобные закономерности могут иметь место и в растворах аминокислот, т. е. веществ сравнительно небольшого молекулярного веса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зинченко В. Д., Манк В. В., Моисеев В. А., Овчаренко Ф. Д. Исследование межмолекулярных взаимодействий в системе вода—полиэтиленгликоль. — Коллоидный журн., 1976, 38, № 1, с. 44—49.
2. Пушкарь Н. С., Белоус А. М. Введение в криобиологию. К., «Наук. думка», 1975, 343 с.
3. Пушкарь Н. С., Иткин Ю. А., Козьмин Ю. В., Розанов Л. Ф. Микроскопическое и рентгеноструктурное изучение процессов замораживания биологических объектов. — Биофизика, 1973, 18, № 2, с. 389—391.
4. Сырников Ю. П. О некоторых особенностях взаимодействия системы биополимер—вода. — В кн.: Молекулярная физика и биофизика водных систем. Л., 1974, с. 23—26.
5. Bovey F. A. NMR data tables for organic compounds. New York e. a. 1967, 387 p.
6. Kuntz I. D., Brassfield T. S., Law G., Purcell G. Hydration of macromolecules. — Science, 1969, 163, N 1, p. 1329—1332.
7. Kuntz I. D. Hydration of macromolecules. III. Hydration of Polypeptides. — J. Amer. Chem. Soc., 1971, 93, N 2, p. 514—516.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
22. XII 1976 г.

УДК 57:536.48.047:574.96:543.42:541.49

Т. Ф. Морозова, Ю. Е. Микулинский, В. А. Моисеев

ВЛИЯНИЕ ПОЛИЭТИЛЕНОКСИДА НА СПЕКТРЫ ПОГЛОЩЕНИЯ НЕКОТОРЫХ ГЛОБУЛЯРНЫХ БЕЛКОВ

Спектры поглощения белков в видимой и ультрафиолетовой областях спектра могут дать информацию о структурном состоянии молекул белка и о взаимодействии их с растворителем. Для выяснения природы взаимодействия белков с растворителем нами были исследованы спектры поглощения, дифференциальные спектры и кривые плавления трипсина и γ -глобулина при добавлении в раствор различных концентраций полиэтиленоксида с молекулярным весом 400 (ПЭО-400). Указанные белки выбраны по той причине, что наряду с ковалентными связями в поддержании их структуры большую роль играют гидрофобные, электростатические и другие взаимодействия [3]. Кроме того, эти белки ренатурируют после тепловой денатурации в некотором температурном интервале.

Материалы и методика. Для исследования использовали трипсин фирмы «Ферак» (ФРГ), ПЭО-400 фирмы «Мерк» и синтезированный в нашем институте, а также γ -глобулин, выделенный из сыворотки крови лошади по методу Баум-Старка [9]. Результаты, полученные при использовании ПЭО-400 фирмы «Мерк» и синтезированного в институте, были аналогичны. Для уменьшения погрешности, вносимой в спектры светорассеяния растворами с большой концентрацией ПЭО (более 20%), использовали кюветы с длиной оптического пути 5,2 и 1 мм, а также учитывали разницу оптической плотности раствора при расположении кювет на различном расстоянии от фотокаатода. В случае необходимости измеряемые растворы фильтровали. Спектроскопические исследования были проведены на спектрофотометре «Уникам» (SP-8000). Разброс величин оптической плотности растворов при длине волны 325 нм (A_{325}), отражающей светорассеяние, не превышал $\pm 0,05$ единиц оптической плотности, что считается приемлемым для дифференциальной спектроскопии [7]. Кривые плавления были сняты с помощью приставки SP-875 с точностью $\pm 1^\circ \text{C}$.

Результаты и их обсуждение. Спектры поглощения нативного трипсина имеют тонкую структуру в ультрафиолетовой области спектра с максимумами поглощения при длине волны 268 нм и плечами при 258; 264; 283 и 290 нм, что хорошо согласуется с данными литературы [8]. Добавление в раствор ПЭО-400 до 30%-ной концентрации приводит к небольшому (0,5—1 нм) сдвигу максимума спектра в коротковолновую область спектра и к увеличению интенсивности поглощения. При увеличении концентрации ПЭО-400 в растворе до 50% происходит более значительный коротковолновый сдвиг спектров поглощения. Для объяснения этого факта проведены дополнительные спектроскопические исследования по изучению влияния на структуру исследуемого белка добавления в раствор мочевины различной концентрации (до 50%) и диоксана (также до 50%) и их результаты сравнивались с данными литературы.

Добавление в раствор белка мочевины приводило к длинноволновому сдвигу и увеличению активности поглощения. Авторы работы [6] связывают это с «набуханием» молекул трипсина и разрыхлением его структуры, что приводит к необратимой денатурации белка при значительных концентрациях мочевины в растворе.

Анализ спектров поглощения и дифференциальных спектров трипсина при добавлении в раствор диоксана 25-, 50- и 75%-ной концентрации (обладающего сравнимой с ПЭО-400 величиной гидрофобности) показывает наличие двух максимумов поглощения при 268 и 271 нм, увеличение светорассеяния, возрастающее с ростом концентрации диоксана и связанное с агрегацией белка [1]. Интенсивность поглощения также увеличивается по мере добавления диоксана в раствор. Эти изменения, по-видимому, отражают процесс разрыхления молекул трипсина в водно-диоксановых смесях, связанный с нарушением гидрофобных и электростатических взаимодействий в белке [3]. Следует отметить также, что и мочевина изменяет гидрофобные взаимодействия в белке [6], поэтому при небольших концентрациях мочевины и диоксана процессы разрыхления макромолекул белка, в каждом случае, вероятно, могут иметь общие черты.

Кривые плавления трипсина по изменению оптической плотности раствора при термоденатурации белка в водно-полиэтиленоксидных смесях приведены на рисунке (а). Если для нативного белка зона плавления лежит в интервале температур 48—62°С, то, как было показано, при увеличении концентрации ПЭО-400 до 50% зона плавления белка сдвигается в низкотемпературную область приблизительно на 10°С. Кроме того, наблюдались слабо выраженное появление нескольких ступеней на кривой плавления, а также некоторое уменьше-

ние изменения оптической плотности при увеличении концентрации ПЭО-400. При концентрации ПЭО, равной приблизительно 50%, характер плавления белка по положению λ_{max} спектра менялся: при термоденатурации наблюдался длинноволновый сдвиг максимума поглощения.

Кривые плавления для растворов трипсина с диоксаном сходны в основных чертах с кривыми плавления белка в водно-полиэтиленоксидных смесях. Например, при концентрации диоксана 25% плавление трипсина происходит в интервале температур 42—54° С; изменение оптической плотности раствора составляло 0,03 ед. Кривые плавления трипсина в присутствии мочевины 10—20%-ной концентрации также сходны в общих чертах с таковыми плавления трипсина в водно-полиэтиленоксидных смесях.

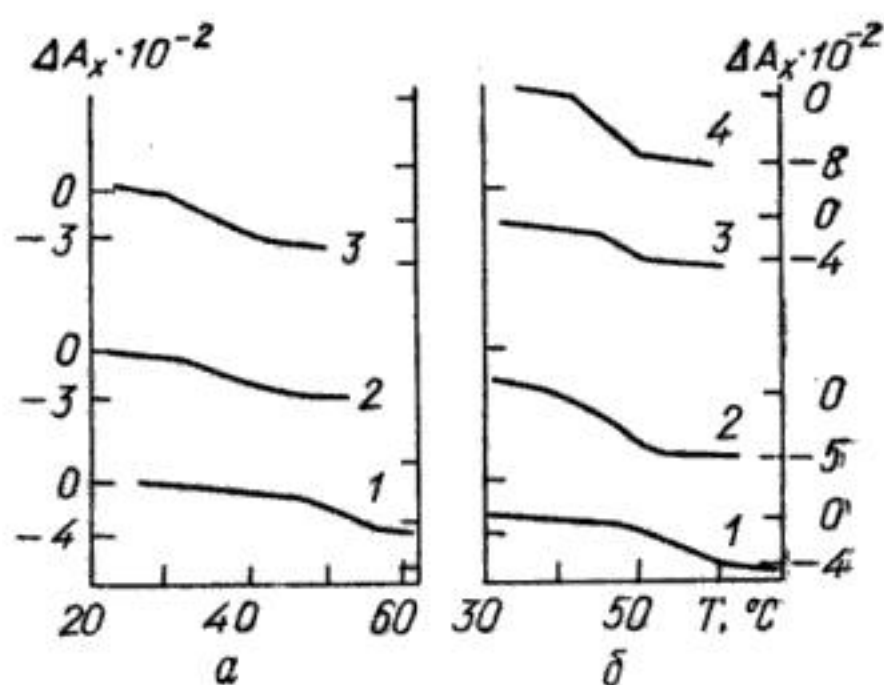
При сравнении приведенных выше результатов видно, что влияние ПЭО-400 на оптические спектры трипсина сходно с влиянием на них диоксана и мочевины в небольших концентрациях. Таким образом, влияние ПЭО-400 приводит, вероятно, к некоторому разрыхлению макромолекулы, однако следует еще раз отметить, что спектры поглощения трипсина в присутствии ПЭО, диоксана и мочевины в небольших концентрациях различны.

Аналогичные исследования проведены на растворах γ -глобулина. Наблюдался спектр поглощения, характерный для γ -глобулина с максимумом поглощения при 277 нм и плечами на 284 и 291 нм. При добавлении в раствор ПЭО отмечались увеличение интенсивности поглощения и небольшой сдвиг в коротковолновую область максимума поглощения. Дифференциальные спектры растворов белка с ПЭО относительно нативного белка появлялись при 283—284 и 290—291 нм. Эти спектры характерны для белков, содержащих тирозин и триптофан, при изменении ближайшего окружения люминофоров вследствие различных причин [5]. При увеличении концентрации ПЭО в растворе в дифференциальных спектрах появляются новые максимумы при 270 и 278 нм.

Спектры плавления γ -глобулина сложные (рисунок, б) и в общих чертах сходны с кривыми плавления бычьего γ -глобулина [2, 4]. При добавлении ПЭО кривые плавления сдвигались в область низких температур, и наблюдалось некоторое уменьшение изменения оптической плотности.

Следует отметить существенные различия в чувствительности структурных изменений трипсина и γ -глобулина к концентрации ПЭО в растворе. Если заметные изменения оптических свойств трипсина наблюдались при концентрации ПЭО, равной 15%, то для γ -глобулина эти изменения наступали начиная с 3%-ной концентрации. По-видимому, это различие связано с наличием у γ -глобулина четвертичной структуры и более разветвленной топологии гидрофобных областей.

Таким образом, исследования оптических свойств растворов трипсина и γ -глобулина указывают на взаимодействие молекул белка с



Плавнение γ -глобулина и трипсина в водных растворах с различным содержанием ПЭО-400: а — плавление γ -глобулина (по изменению оптической плотности раствора) в водно-полиэтиленоксидных смесях при содержании ПЭО в растворе: 0—1% (1); 2—2,5% (2); 3—7,5% (3); б — плавление трипсина по изменению оптической плотности раствора при содержании ПЭО-400 в растворе 0—1% (1); 2—30% (2); 3—40% (3); 4—50% (4). Концентрация белка составляет 0,2%, кроме кривой 1. б, данные для которой получены при концентрации трипсина 0,1%.

молекулами ПЭО. Однако для выяснения механизма этого взаимодействия (гидрофобное, электростатическое или же посредством дегидратации белка) необходимо проведение дальнейших исследований другими методами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Егиазарова А. Р. Спонтанная агрегация белков при их старении. — Биол. журн. Армении, 1973, 26, № 12, с. 55—59. На арм. яз.
2. Завьялов В. П., Кирюхин И. Ф., Троицкий Г. В. Обратимые температурные переходы нативных γ -глобулинов и яичного альбумина. — Молекулярная биология, 1972, 4, № 5, с. 808—812.
3. Ивков М. Н., Мосолов В. В., Бурштейн Э. А. Флуоресценция некоторых белков в водно-диоксановых растворах. — Молекулярная биология, 1968, 1, № 2, с. 839—842.
4. Кирюхин И. Ф., Троицкий Г. В., Завьялова В. П. Обратимые температурные переходы фракций γ -глобулинов с различными изоэлектрическими точками и их конформация при физиологических условиях. — Молекулярная биология, 1972, 6, № 2, с. 196—200.
5. Коган Г. А. Применение метода дифференциальной спектроскопии для изучения структуры белков. — В кн.: Молекулярная биология. Т. 3. М., 1975, с. 216—286.
6. Кушнер В. П., Божков В. М. Тепловая денатурация трипсина в присутствии мочевины. — Молекулярная биология, 1967, 4, № 1, с. 526—531.
7. Окулов В. И., Троицкий Г. В. Ультрафиолетовые спектры нативного и денатурированного бычьего γ -глобулина. — Молекулярная биология, 1969, 3, № 4, с. 578—587.
8. Нейрат Г., Бэйли К. Белки. Т. 2. М., Изд-во иностр. лит., 1956. 856 с.
9. Baumstark G. S., Laffin R. G., Bardawil W. A. A preparative method for separation of 7S-gamma globulin from human plasma. — Arch. Biochem. and Biophys., 1964, 108, N 3, p. 514—517.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
22. XII 1976 г.

УДК 536.48:612.111:539.16

А. П. Осипенко

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОНИЦАЕМОСТИ ^{22}Na И ФОСФОЛИПИДНОГО СОСТАВА МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА, ПОДВЕРГНУТЫХ ИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ В ЗАМОРОЖЕННОМ СОСТОЯНИИ

Предварительное замораживание эритроцитов человека повышает их осмотическую резистентность к ионизирующему излучению, что согласуется с феноменом температурного эффекта, описанного Дертингером и Юнгом [3]. Однако осмотическая резистентность еще не может служить надежным критерием нативности мембран эритроцитов.

В настоящее время показано, что гораздо более чувствительны к действию экстремальных факторов изменения состава плазматической мембраны и ее проницаемости [5, 9, 10]. В связи с этим представляло интерес изучить пассивный транспорт натрия и фосфолипидный состав эритроцитов, облученных в замороженном (-196°C) состоянии.

В опытах использовали эритроциты донорской крови человека двухдневного хранения, которые трижды отмывали в 0,9%-ном растворе хлористого натрия путем центрифугирования при 1500 об/мин. Разведенную суспензию эритроцитов в соотношении шесть к одному замораживали в полиэтиленовых контейнерах объемом 1,5 см³ по методике ЦОЛИПК [1] с использованием 15%-ного глицерина и последующим суспендированием их в физиологическом растворе при pH 7,4. Образцы крови облучали на рентгеновской установке ТУР = TW-60 в дозе 2000 и 4000 Р. Величину проницаемости эритроцитов

для ^{22}Na определяли после 24 ч инкубации при 4°C в растворе, содержащем 150 мМ хлористого натрия (рН 7,4) и 1 мкюри ^{22}Na в 1 мл суспензии эритроцитов. Радиоактивность ^{22}Na определяли на установке, собранной из комплекта электронной аппаратуры типа РПС2-03Т, с использованием торцового газонаполненного счетчика. Эффективность регистрации β -частиц такой установки составляла около 1%. Хроматографический анализ липидов из эритроцитов, экстрагированных по Кейтсу [4], проводили в тонком слое силикагеля [6]. Отдельные фракции фосфолипидов определяли спектрофотометрически [2].

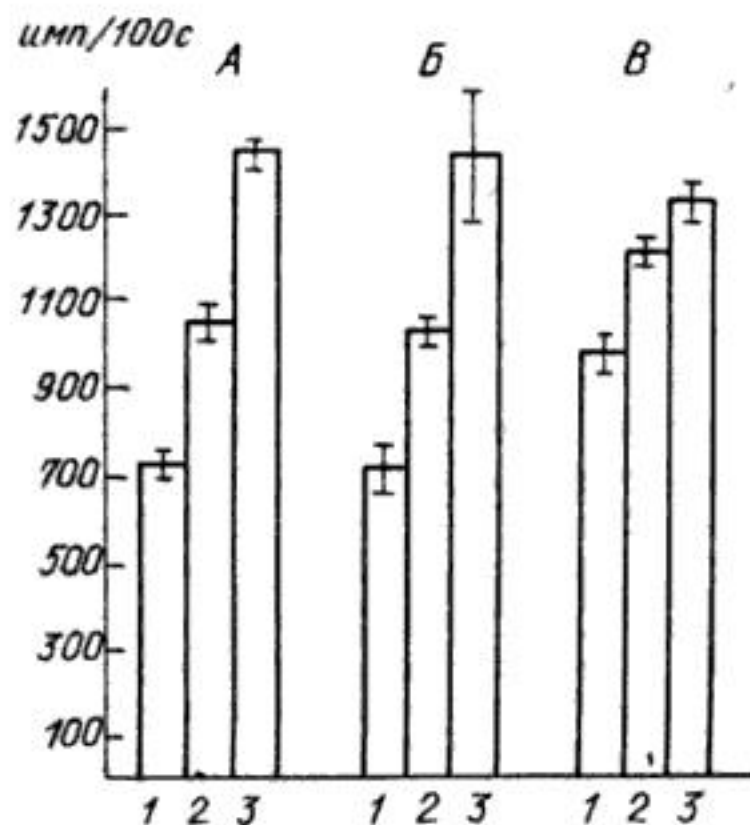


Рис 1. Зависимость проницаемости мембран эритроцитов от дозы и температурных режимов облучения:

А — при 4°C ; Б — при 4°C в 15%-ном глицерине; В — быстрое замораживание до -196°C ; 1 — без облучения; 2 — облучение дозой 2000 Р; 3 — облучение дозой 4000 Р.

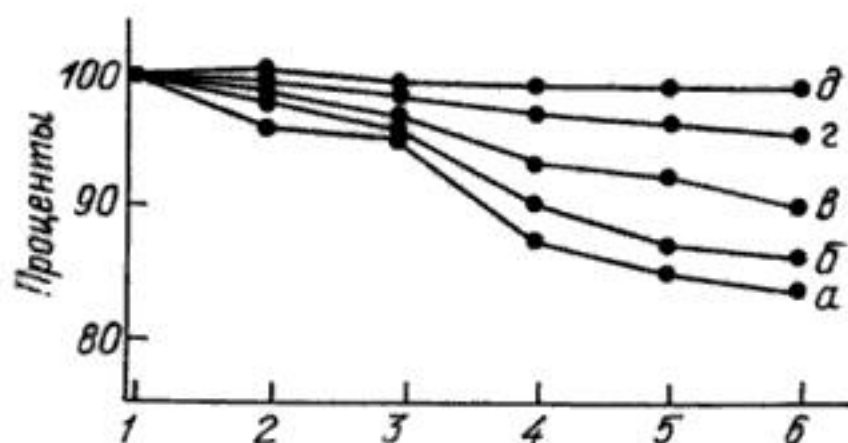


Рис. 2. Фосфолипидный состав мембран эритроцитов после замораживания и облучения (а — лецитин; б — этаноламинфосфатид; в — холестерин; г — серинфосфатид; д — сфингомиелин):

1 — в физиологическом растворе (4°C); 2, 3 — облучение в физиологическом растворе при температуре 4°C (2 — 200 Р, 3 — 400 Р); 4 — замораживание в 15%-ном глицерине (-196°C); 5 — облучение в замороженном состоянии (200 Р, -196°C); 6 — облучение в замороженном состоянии (4000 Р). Данные обработаны статистически, достоверные различия получены при сравнении лецитина (а) и этаноламинфосфатида (б).

В первой серии опытов исследовался пассивный транспорт ионов в эритроцитах. Эти данные представлены на рис. 1. Облучение эритроцитов в дозе 2000 Р при 4°C увеличивает их проницаемость для ионов натрия в среднем на 45%, а возрастание дозы облучения в два раза вызывает дальнейший рост проницаемости ионов в эритроциты, что хорошо согласуется с результатами работы [9], в которой изучали изменение пассивного транспорта ^{22}Na в эритроцитах при облучении их γ -лучами. Суспендирование эритроцитов в физрастворе, содержащем 15% глицерина, не влияет на транспорт ^{22}Na в указанных выше условиях. При комбинированном воздействии глубокого охлаждения и радиации быстрое замораживание эритроцитов хотя и увеличивало проницаемость мембран, однако чувствительность их к повреждающему действию радиации уменьшалась. Из литературных данных известно также, что под влиянием облучения или низких температур может произойти нарушение фосфолипидного состава мембран эритроцитов и их проницаемости для электролитов, в том числе и для натрия. Так, в работе [8] показано, что облучение эритроцитов некоторых видов животных вызывает химические изменения фосфолипидов мембран эритроцитов и нарушение их проницаемости. Вместе с тем замораживание эритроцитов сопровождается потерей фосфолипидов и изменением ионной проницаемости их мембран [10]. Результаты подобного рода экспериментов, проведенных нами, представлены на рис. 2, показывающем, что потеря некоторых фосфолипидов из состава мембран (лецитина, этаноламинфосфатида и холестерина) более существен-

на при замораживании, чем при рентгеновском облучении. В то же время количество сфингомиелина, серинфосфатида как при облучении, замораживании, так и их сочетанном действии существенно не изменяется. Отсутствие прямой зависимости в изменении фосфолипидов и проницаемости ионов натрия позволяет предположить, что нарушение проницаемости биомембран может быть обусловлено изменением не только фосфолипидов, но и других структурных единиц клеточной мембраны, как это показано А. М. Кузиным и Т. Е. Павловской [5] и Б. Г. Тенчовым [7].

Таким образом, приведенные выше результаты свидетельствуют о том, что фосфолипидный состав мембран в условиях действия глубокого охлаждения и радиации изменяется в большей степени под влиянием замораживания и отогрева, чем после облучения в дозе 2000 или 4000 Р. Пассивный транспорт ^{22}Na в мембранах эритроцитов также чувствителен к действию замораживания—отогрева, однако облучение в указанных выше дозах при температуре 4°C вызывает еще большее изменение проницаемости эритроцитов для ^{22}Na . При облучении эритроцитов в замороженном состоянии нарушение проницаемости мембран этих клеток менее выражено, что является еще одним подтверждением возрастания резистентности эритроцитов к облучению в замороженном состоянии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Виноград-Финкель Ф. Р., Киселев А. Е. Методы долгосрочного хранения в замороженном состоянии эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов, предназначенных для трансфузий. Метод. письмо. М., 1969. 15 с. МЗ СССР ЦОЛИПК.
2. Грибанов Г. А., Сергеев С. А. Экспресс-микроанализ общих липидов сыворотки крови и их фракций. — *Вопр. мед. химии*, 1975, 21, № 6, с. 652—655.
3. Дертингер Г., Юнг Х. Температурный эффект. — В кн.: Молекулярная радиобиология. М., 1973, с. 102—111.
4. Кейтс М. Экстракция липидов из субклеточных частиц, клеточных элементов и плазмы крови. — В кн.: Техника липидологии. М., 1975, с. 75—76.
5. Кузин А. М., Павловская Т. Е. Действие ионизирующего излучения на клеточные мембраны. М., Атомиздат, 1973. 109 с.
6. Покровский А. А. Разделение фосфолипидов сыворотки крови методом тонкослойной хроматографии. — В кн.: Биохимические методы исследования в клинике. М., 1969, с. 322—329.
7. Тенчов Б. Г. Возможная роль переориентации фосфолипидных молекул в транспорте ионов через мембраны. — *Биофизика*, 1975, 20, № 3, с. 437—440.
8. Тимофеев-Рисовский Н. Б. Первичные радиобиологические процессы. М., Атомиздат, 1973. 334 с.
9. Kankura Takako, Nakamura Wataru, Eto Hideo, Nakao Makoto. Effect of ionizing radiation on sodium ion permeability in various mammalian erythrocytes. — *Radiat. Res.*, 1974, 59, N 1, p. 22—26.
10. Lovelock J. E. The denaturation of lipid-protein complexes as a cause of damage during freezing. — *Proc. Roy. Soc. London Ser. B*, 1957, 147, N 1, p. 427—433.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
22. XII 1976 г.

УДК 57:537.48.047:612.46:615.014.41:577.15:536.48

В. М. Сахнович, В. В. Лемешко

ОЦЕНКА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ПОЧКИ ПОСЛЕ ПЕРФУЗИИ И ЗАМОРАЖИВАНИЯ—ОТТАИВАНИЯ ПО ЭНЕРГОЗАВИСИМЫМ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫМ ПРЕВРАЩЕНИЯМ ПИРИДИННУКЛЕОТИДОВ

При изучении влияния низких температур на биологические объекты и разработке способов низкотемпературной консервации органов большое значение имеет выбор функциональных систем, состояние которых наиболее полно отражает их жизнеспособность.

Согласно последним данным, одной из наиболее чувствительных структур клетки к экстремальным воздействиям, в том числе низким температурам, являются митохондрии, функция которых состоит в энергообеспечении клетки [1, 4—6]. Активность дыхательной и энерготранспортной цепей митохондрий, а также их сопряжение в значительной мере определяются состоянием внутренней мембраны и могут быть качественно оценены по энергозависимым окислительно-восстановительным (ОВ) превращениям пиридиннуклеотидов (ПН).

В настоящей работе показано, что превращения ПН, измеряемые в гомогенатах коры почек кролика, могут служить объективным тестом для оценки функционального состояния митохондрий органов после воздействия на них различных криопротекторов, перфузионных сред и низких температур.

В опытах почки кролика перфузировали 15%-ным раствором ПЭО-400 или 12,5%-ным раствором ДМСО на растворе Хенкса при температуре 4°C в течение 7—10 мин. Замораживание почек до -196°C осуществляли в тонкостенном алюминиевом контейнере цилиндрической формы, содержащем перфузионный раствор. Скорость замораживания почек составляла 10°C в 1 мин. Оттаивание производили в водяной бане при температуре 41°C . После оттаивания из коркового слоя почки готовили 20%-ный гомогенат на среде следующего состава: 0,25 М сахарозы, 5 мМ трилона Б, 0,1% БСА, 20 мМ трис-НСl, рН 7,4.

Энергозависимые ОВ-превращения ПН регистрировали флуориметрически (длина волны возбуждения — 366 мкм, флуоресценции — 460 мкм) в реакционной среде следующего состава: 70 мМ КCl, 0,14 М сахарозы, 10 мМ KH_2PO_4 , 20 мМ трис-НСl, рН 7,4.

Характер ОВ-переходов ПН в норме приведен на рис. 1, а. Как видно, добавка сукцината вызывает восстановление НАД(P)^+ за счет так называемого энергозависимого обратного переноса электронов. Добавка АДФ, активируя цепь переноса электронов, смещает динамическое равновесие уровня $\text{НАД(P)}-\text{H}$ — НАД(P)^+ в сторону окисления ПН. Олигомицин ингибирует энерготранспортную цепь и на прочно сопряженных митохондриях приводит к накоплению восстановленных форм ПН. Трифторметоксикарбонилцианидфенилгидразон (ФКЦФ), разобщая дыхание и окислительное фосфорилирование, вызывает в итоге быстрое окисление $\text{НАД(P)}-\text{H}$. Ротенон ингибирует дыхательную цепь на уровне НАДН -дегидрогеназного комплекса дыхательной цепи. После добавки ротенона наблюдается простое накопление $\text{НАД(P)}-\text{H}$ в результате дегидрирования субстратов цикла Кребса. При повреждении митохондрий происходит нарушение многообразных реакций,

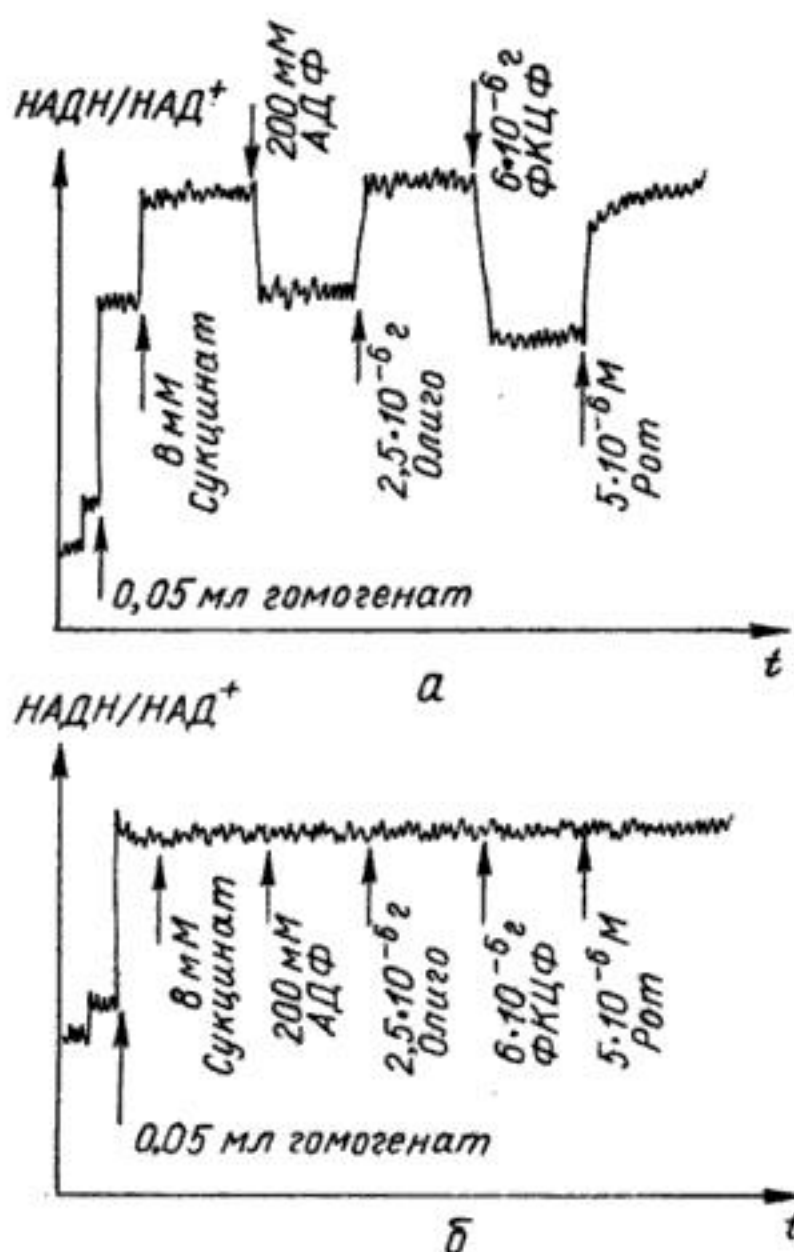


Рис. 1. Диаграмма энергозависимых окислительно-восстановительных превращений пиридиннуклеотидов в гомогенате коркового вещества нативной почки:

а — до замораживания; б — после быстрого замораживания и быстрого оттаивания.

протекающих в них, что, в свою очередь, отражается на ОВ-переходах ПН, вплоть до полного исчезновения их. Так, в гомогенате коры почки после замораживания—оттаивания без криопротекции не наблюдается никаких превращений ПН (рис. 1, б), что обусловлено полной неспособностью митохондрий синтезировать АТФ.

Гипотермическая перфузия почки 15%-ным раствором ПЭО-400 существенно снижает скорость и амплитуду ОВ-превращений ПН на вносимые добавки, что, очевидно, объясняется способностью ПЭО-400

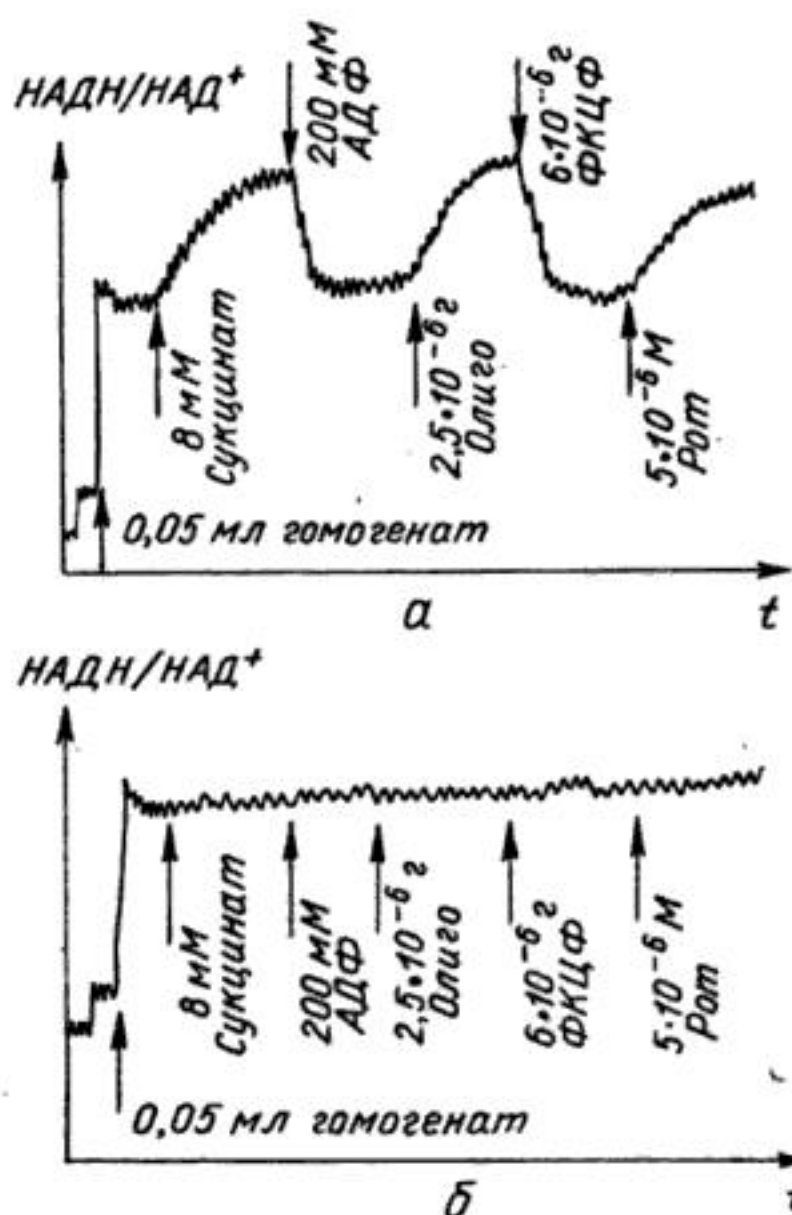


Рис. 2. Диаграмма энергозависимых окислительно-восстановительных превращений пиридиннуклеотидов в гомогенате коркового вещества почки, перфузированной 15%-ным ПЭО-400:

а — до замораживания; б — после быстрого замораживания и быстрого оттаивания.

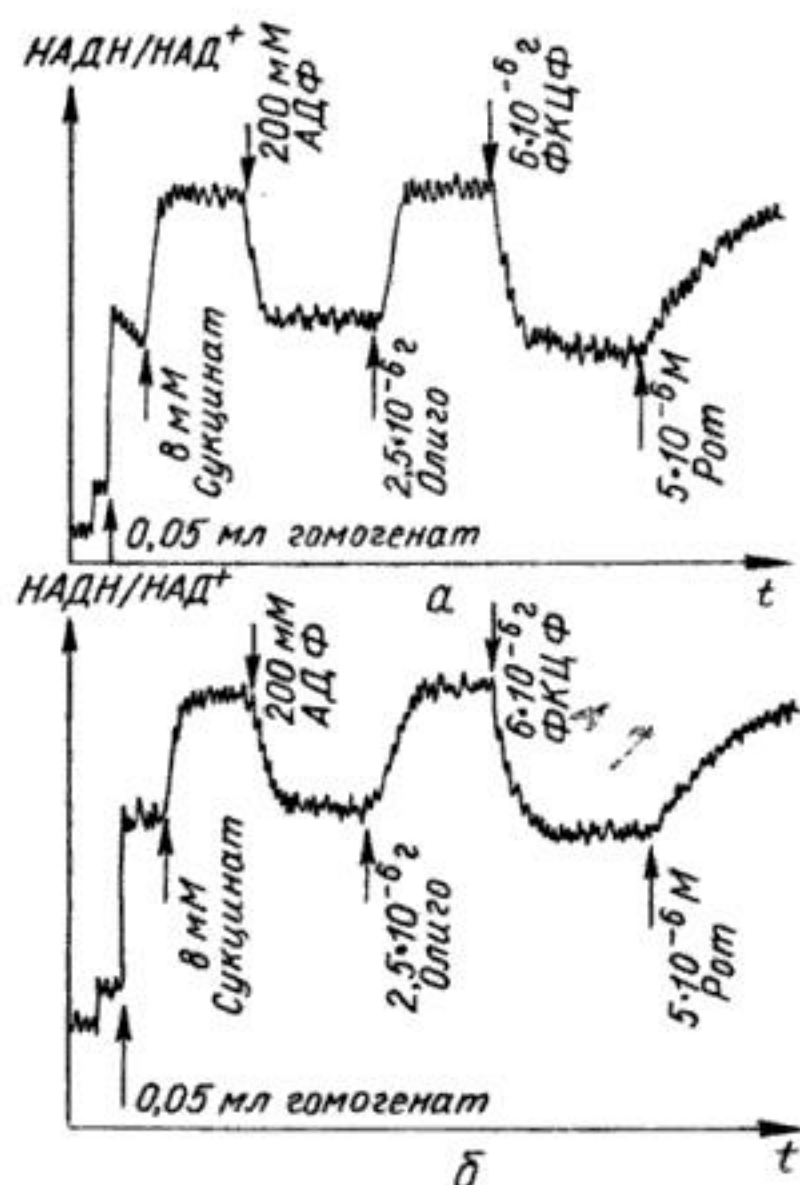


Рис. 3. Диаграмма энергозависимых окислительно-восстановительных превращений пиридиннуклеотидов в гомогенате коркового вещества почки, перфузированной 12,5%-ным ДМСО:

а — до замораживания; б — после быстрого замораживания и быстрого оттаивания.

оказывать ингибирующее действие на НАДН-дегидрогеназный участок дыхательной цепи [1, 2]. После замораживания—оттаивания почки, перфузированной раствором ПЭО-400, наблюдалось полное нарушение сопряжения дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий, о чем свидетельствует отсутствие энергозависимых ОВ-превращений ПН (рис. 2, а, б).

В работе было также изучено влияние гипотермической перфузии 12,5%-ным раствором ДМСО и последующего замораживания—оттаивания на состояние митохондрий почек. Как видно из рис. 3, характер ОВ-переходов ПН после перфузии и последующего замораживания—оттаивания почти не изменился, что свидетельствует о сохранении сопряжения между дыханием и окислительным фосфорилированием. Последнее возможно лишь при сохранении интактности внутренней мембраны митохондрий или, по меньшей мере, ее способности удерживать градиент ионов водорода.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что ПЭО-400 в 15%-ной концентрации не сохраняет энергопродуцирующую си-

стему почек, подвергнутых глубокому замораживанию. ДМСО обеспечивает практически полное сохранение энергопродуцирующей системы митохондрий при глубоком замораживании почки, и это позволяет делать оптимистические прогнозы о принципиальной возможности сохранения жизнеспособности органов при глубоком замораживании и отогреве.

Таким образом, регистрация энергозависимых ОВ-переходов ПН позволяет достаточно эффективно оценивать жизнеспособность органов при разработке способов их консервации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белоус А. М., Лемешко В. В. Цепь транспорта электронов и окислительное фосфорилирование митохондрий под влиянием полиэтиленоксида и глицерина. — IV Междунар. биофиз. конгресс. Тезисы докл. Т. 3. М., 1972, с. 183—184.
2. Лемешко В. В., Белоус А. М., Мишнев Л. Г. Влияние криопротекторов (глицерина и ПЭО-400) на дыхательную цепь митохондрий печени крыс. — Криобиология и криомедицина, 1975, вып. 1, с. 67—70.
3. Fishbein W. N. Studies on the mechanism of freezing damage to mouse liver using a mitochondrial enzyme assay. III. Cryophylaxis DMSO and enzyme localization. — Cryobiology, 1971, 8, N 3, p. 293—299.
4. Lusena C. V. Release of enzymes from rat liver mitochondria by freezing. — Can. J. Biochem., 1965, 43, N 9, p. 1787—1798.
5. Mazur P. The role of cell membranes in freezing of yeast and other single cells. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1965, 125, N 2, p. 658—676.
6. Sherman J. K. Correlation in cryoinjury of mitochondrial ultrastructure with respiratory control ratio, cytochrome oxidase activity and rate of tissue oxygen consumption (Abstr.). — Cryobiology, 1970, 6, N 6, p. 581—587.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
22. XII 1976 г.

УДК 57:536.48.047.612.015.11

Н. П. Суббота

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА СРЕДЫ И УСЛОВИЙ ХРАНЕНИЯ НА ИЗМЕНЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ЦИТОХРОМОВ В ГОМОГЕНАТАХ КОРЫ ПОЧКИ КРЫСЫ

Ряд экспериментальных биологических и медицинских задач (например, связанных с диагностикой различных заболеваний) требуют определения концентрации дыхательных ферментов в биоматериале. Поскольку определение активности биоматериала может проводиться в разные по времени сроки, возникает необходимость в разработке различных методов его хранения. В связи с этим в настоящей работе исследовано изменение концентрации переносчиков электронов — цитохромов a и $c+c_1$ — при различных условиях, времени хранения, комбинации сред выделения и хранения с целью подбора оптимальных условий хранения материала.

Материалы и методика. Гомогенат коры почки получали на холоду (от $+2$ до -4°C) при соотношении ткани и среды выделения соответственно 1 : 2. Были взяты 3 состава сред (в мМ на 1 л) — среда 1: сахарозы — 300, версена — 0,2, Φ_n — 2, pH 7,4; среда 2: сахарозы — 300, версена — 0,2, Φ_n — 2, NaHCO_3 — 6, pH 7,4; среда 3 (описанная в работе [3]), но без ГОМК: глюкозы — 90, K_2SO_4 — 50, KHCO_3 — 10, MgSO_4 — 30, pH 7,4.

Гомогенат хранили в узкой пробирке с притертой пробкой, слой ткани не менее 2 см — анаэробное хранение, и в посуде с широким горлом при толщине слоя 0,4—0,5 см — аэробное хранение.

Концентрацию цитохромов в тканевых гомогенатах определяли методом дифференциальной спектрофотометрии. Спектры регистрировали при комнатной температуре при добавлении 50,0 мг ткани на 1 мл среды инкубации. Для определения концентрации использовали α -полосы дифференциального спектра поглощения цитохромов (восстановленные минус окисленные). В одну из кювет добавляли 3 мМ цианида, 40 мкМ ДНФ, 5 мМ сукцината, в другую — 240 мкМ ДНФ и 4,8 мМ амитала. Концентрацию цитохромов (в мМ) в гомогенатах определяли, как описано в работе [2], из соотношения

$$C = \frac{\Delta D \times 2,3}{K \times l},$$

где C — концентрация цитохрома в мМ; D — концентрация цитохрома (ед. опт. пл/см·мМ); l — длина оптического пути; $K=14$ для цитохрома a , 18 — для цитохромов $c+c_1$.

Результаты и обсуждение. В результате проведенных исследований было выяснено, что при анаэробном хранении гомогенатов уровень концентрации цитохромов практически был всегда выше, чем при аэробном.

При хранении гомогенатов, приготовленных на среде 1, концентрация цитохрома a падала на 23% через 24 ч и на 41 — через 48 ч аэробного хранения, а концентрация цитохромов $c+c_1$ — соответственно на 7 и 12%. При анаэробном хранении сохранялась 85%-ная концентрация цитохрома a через 24 ч хранения и 83-ная — через 48 ч ($p<0,05$). Концентрация цитохромов $c+c_1$ уменьшалась незначительно — на 2% через 24 ч и на 5 — через 48 ч хранения.

При добавлении в среду 1 NaHCO_3 концентрации цитохрома a через 24 ч при аэробном хранении составляла 72, при анаэробном — 70% контроля, а цитохромов $c+c_1$ — соответственно 80 и 98%. Однако через 48 ч хранения эти показатели значительно снижались — при анаэробном хранении концентрация цитохрома a падала на 52%, а цитохромов $c+c_1$ — на 33 ($p<0,05$).

Среда 3 обеспечивала сохранение такого же уровня концентраций исследованных цитохромов, как и среда 1 через 24 ч хранения, однако через 48 ч концентрация цитохрома a снижалась на 34% при анаэробном хранении и на 46 — при аэробном ($p<0,05$). Концентрация цитохромов $c+c_1$ при аэробном хранении уменьшалась на 4% через 24 ч и уже не изменялась через 48 ч, а при анаэробном — мало изменялась через 24 ч и падала на 12% после 48 ч хранения ($p<0,05$).

Снижение концентрации цитохромов при хранении гомогенатов может быть связано со «старением» мембран, десорбцией цитохрома с с внутренней мембраны [4] либо активацией фосфолипазы A_2 , однако эти предположения необходимо подтвердить экспериментально.

Как видно из представленных данных, при хранении материала в виде гомогената в течение 24 ч оптимальным условием является хранение его в пробирке с узким горлом в среде 1 или 3. Однако ни одна из сред не обеспечивает сохранения уровня концентрации цитохромов, близкого к контрольному. Поэтому необходимо для этих целей использовать другие подходы, в частности хранение биоматериала при низких температурах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Джафаров А. И. Физико-химические изменения в переживающих и консервируемых тканях. Автореф. канд. дис. М., 1965. 37 с.
2. Евтодченко Ю. В., Мохова Е. Н. Митохондрии. Структура и функция. М., «Наука», 1966. 131 с.

3. *Штенгольд Е. Ш.* Консервация почек в эксперименте и клинике. Автореф. докт. дис. М., 1974. 38 с.
4. *Cheach K. S.* Effect of loss of cytochrome c following storage of mitochondria in situ. — *FEBS Lett.*, 1971, N 19, p. 105—108.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
22. XII 1976 г.

УДК 57:536.48.047:612.11.7.444.616.4:541.49

А. М. Утевский, В. А. Чуйко, Н. Ф. Губина,
Г. А. Онуфриева, Н. Н. Фенченко, Г. П. Петренко

ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР И КРИОПРОТЕКТОРОВ НА АКТИВНЫЙ ЗАХВАТ НЕЙРОМЕДИАТОРОВ ТРОМБОЦИТАМИ И VAS DEFERENS

Особый интерес для криобиологии представляет вопрос о влиянии различных криопротекторов и криоконсервирования на взаимодействие факторов ауторегуляции разных уровней, на возможную их диссоциацию и реинтеграцию. В отличие от изучения отдельных уровней (молекулярного, субмолекулярного и надмолекулярного, органонидного, целлюлярного, органотканевого и организменного), где получено много данных в рамках криобиологии, значительно меньше освещены вопросы соотношения этих уровней, способности биообъекта в условиях низкотемпературного консервирования сохранять, а при оттаивании (деконсервировании) восстанавливать полноценную многоуровневую (многоярусную) систему, каждый уровень которой способен регулировать и быть регулируемым.

Одним из существенных элементов включения «регуляторов» одного уровня в функцию и ауторегуляцию другого является процесс активного захвата (Uptake), а в некоторых системах обратного захвата (Reuptake) биогенных моноаминов (БМА), играющих роль нейромедиаторов, нейромодуляторов, гормонов и аутогормонов, проявляющих свои функции на разных уровнях организации биологической системы.

В данной работе исследовались процессы поглощения серотонина (5-ОТ) тромбоцитами и норадреналина (НА) нервно-гладкомышечным прибором — семявыносящим протоком vas deferens.

Способность тромбоцитов накапливать серотонин обеспечивается наличием на мембране специфических рецепторов [1] и зависит от состояния последних. При действии криопротекторов данная функция тромбоцитов претерпевает определенные изменения.

Из исследованных нами соединений группы полиэтиленоксидов (ПЭО) — ПЭО-400, ПЭО-100 и ПЭО-600 — ингибирующее действие оказывали все препараты.

При использовании ПЭО-100 в концентрации 2,5% поглощение серотонина уменьшается на 45,4%, при 5%-ном — на 62,3; при концентрации 10% — на 68,3%. Под влиянием 2,5%-ного ПЭО-400 захват серотонина снижается на 23%, 5%-ного — на 26, 10%-ного — на 47,7%. ПЭО-600 вызывает ингибирование поглощения серотонина в 2,5%-ной концентрации — на 51%, 5%-ной — на 24, 10%-ной — на 25,2% (рис. 1).

Работами других исследователей отмечено отрицательное влияние на захват серотонина классического криопротектора — ДМСО [3]. Вместе с тем было обнаружено, что сохранение функции тромбоцитов в значительной мере определяется видом криопротектора и программой охлаждения. В частности, захват серотонина тромбоцитами,

понижаясь при 30 мин выдерживания в растворе ДМСО на 11%, после замораживания—оттаивания уменьшался на 64%. В наших исследованиях с применением криопротекторов группы ПЭО сравнивалось влияние двух режимов охлаждения: быстрого (300°C в 1 мин) и медленного (1°C в 1 мин до -20°C) с последующим погружением в азот (-196°C). Эти исследования позволили установить, что быстрое охлаждение как с использованием криопротекторов, так и без них сопровождается практически полной потерей способности сорбировать серотонин против градиента концентрации. Медленное замораживание позволяет сохранить исследуемую функцию лишь в отдельных случаях. При этом необходимо отметить, что положительные результаты были получены как с применением криопротекторов, так и без них. Исследовали содержание НА в *vas deferens* до и после замораживания, способность данного органа к активному захвату экзогенного НА (30 мкг в 1 мл) после опустошения запасов КА в нем тирамином (0,2 мМ, 110 мин). НА определяли дифференциальным флуориметрическим методом В. О. Осинской. На основании

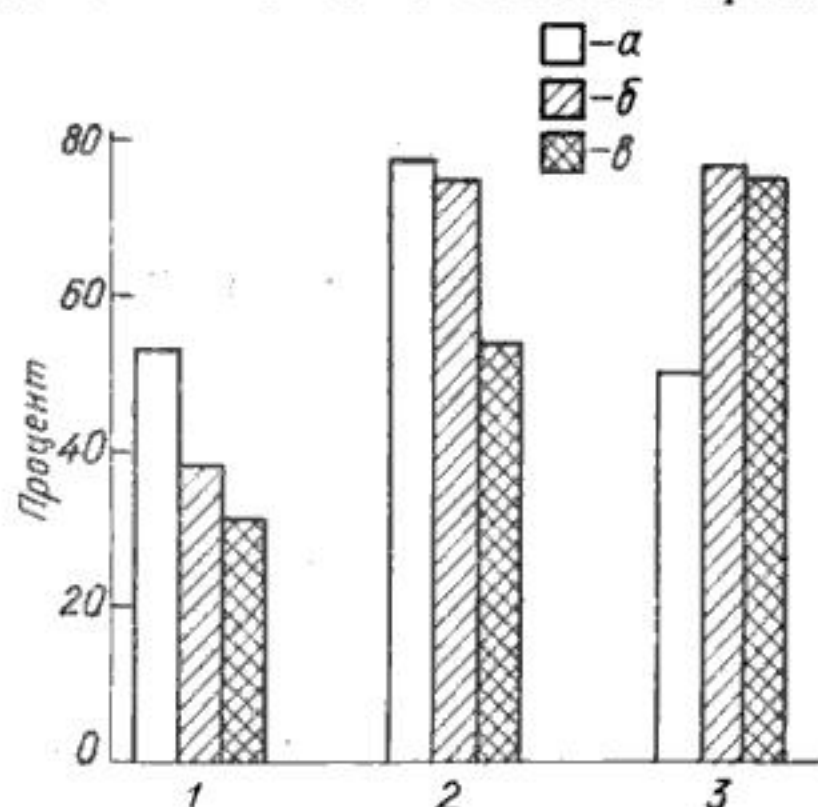


Рис. 1. Влияние концентрации криопротекторов ПЭО-100 (1), ПЭО-400 (2), ПЭО-600 (3) на активный захват серотонина тромбоцитами (в % к норме): а — 2,5; б — 5; в — 10.

проведенных исследований можно заключить, что ПЭО-400 оказывает ингибирующее влияние на процесс захвата НА. Однако эффект проявляется при использовании концентрации ПЭО-400, равной 15% и выше, при этом составляя 50% по отношению к контролю.

Инкубирование *vas deferens* с 5- и 10%-ной концентрациями ПЭО-400 в течение 30 мин не влияет на уровень поглощения НА. Глицерин проявляет ингибирующее действие уже в более умеренных концентрациях. Однако в пределах 5—10% захват экзогенного НА снижается только на 13—19%.

Под влиянием быстрого охлаждения (300°C в 1 мин) до температуры -196°C без применения криопротекторов содержание НА в *vas deferens* снижается на 18%. Способность к обратному захвату НА снижается при этом на 42,5%. Добавление ПЭО-400 в концентрациях 5; 10 и 15% сопровождается понижением захвата НА соответственно на 22; 46 и 51%. Таким образом, наиболее удовлетворительные результаты получены при использовании 5%-ной концентрации ПЭО-400.

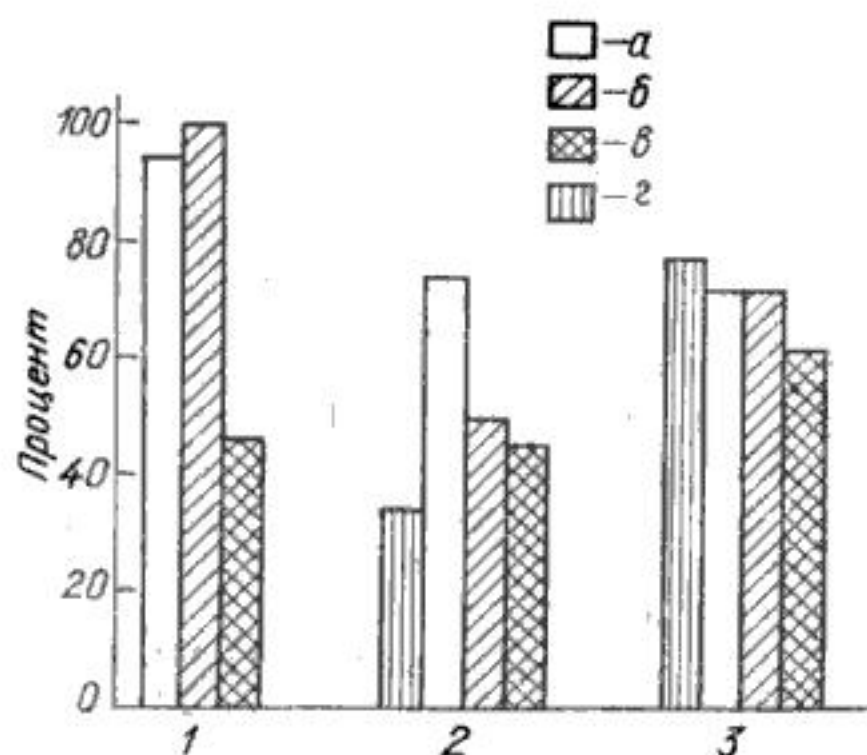


Рис. 2. Влияние ПЭО-400 (1) и охлаждения до -196°C со скоростью 300°C в 1 мин (2) и 1°C в 1 мин (3) на активный «захват» норадреналина семявыносящим протоком (в % к норме): а — 2,5; б — 5; в — 10; г — замораживание без криопротектора.

Выраженное ингибирование исследуемой функции в присутствии 10- и 15%-ного ПЭО-400, возможно, является не только результатом неблагоприятного действия замораживания, но и непосредственного действия криопротекторов (рис. 2).

При медленном охлаждении (-1°C в 1 мин) способность *vas deferens* к обратному захвату НА понижается лишь на 17%. Применение криопротектора ПЭО-400 не сопровождается сохранением способности к захвату медиатора. Более того, при 5—10%-ной концентрации ПЭО-400 степень обратного захвата медиатора снижается на 25%, при 15%-ной — на 40, при 20%-ной — на 47%.

Таким образом, на разных объектах и на процессах разнородных, хотя функционально до известной степени аналогичных (активный «захват» необходимых для регуляции факторов), выявлено действие низких температур, быстрого и медленного замораживания, влияния криопротекторов группы ПЭО (ПЭО-100, ПЭО-400 и ПЭО-600) и глицерина. Наряду с частными характеристиками зависимости исследованных процессов от программы охлаждения, наличия или отсутствия криопротекторов, их структуры и концентрации, может быть сделан более общий вывод о различной криорезистентности исследованных биологических структур.

Так, обнаружены высокая криолабильность механизма «захвата» 5-ОТ тромбоцитами и некоторая криорезистентность в отношении «захвата» НА таких биоструктур, как *vas deferens*. Кроме того, исследуемые процессы в тромбоцитах оказались более уязвимыми к действию криопротекторов, чем в специализированном органе — *vas deferens*. Изучение других сторон обмена нейромедиаторов, гормонов и аутогормонов в различных условиях криоконсервирования и криозащиты, проводимое нами, указывает на значение для полноценной реституции биообъектов после деконсервирования сохранения ими способности регулировать и быть регулируемы, активности их нейрогуморальных, аутогормональных и мембранорецепторных механизмов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лакин К. М., Крылов Ю. Ф., Макаров В. А. и др. Химический состав, метаболизм и агрегация тромбоцитов. — Кардиология, 1974, № 11, с. 128—135.
2. Оксенкрук Г. Ф. Поглощение серотонина тромбоцитами человека — методика скрининга антидепрессантов. — Бюл. эксперим. биологии и медицины, 1976, № 1, с. 51—52.
3. Kim B. K., Baldini M. G. Biochemistry, function and hemostatic effectiveness of frozen human platelets. — Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1974, 145, p. 830—835.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
4. XII 1976 г.

УДК 611.841.2.018.74:615.014.41:536.48.533.3

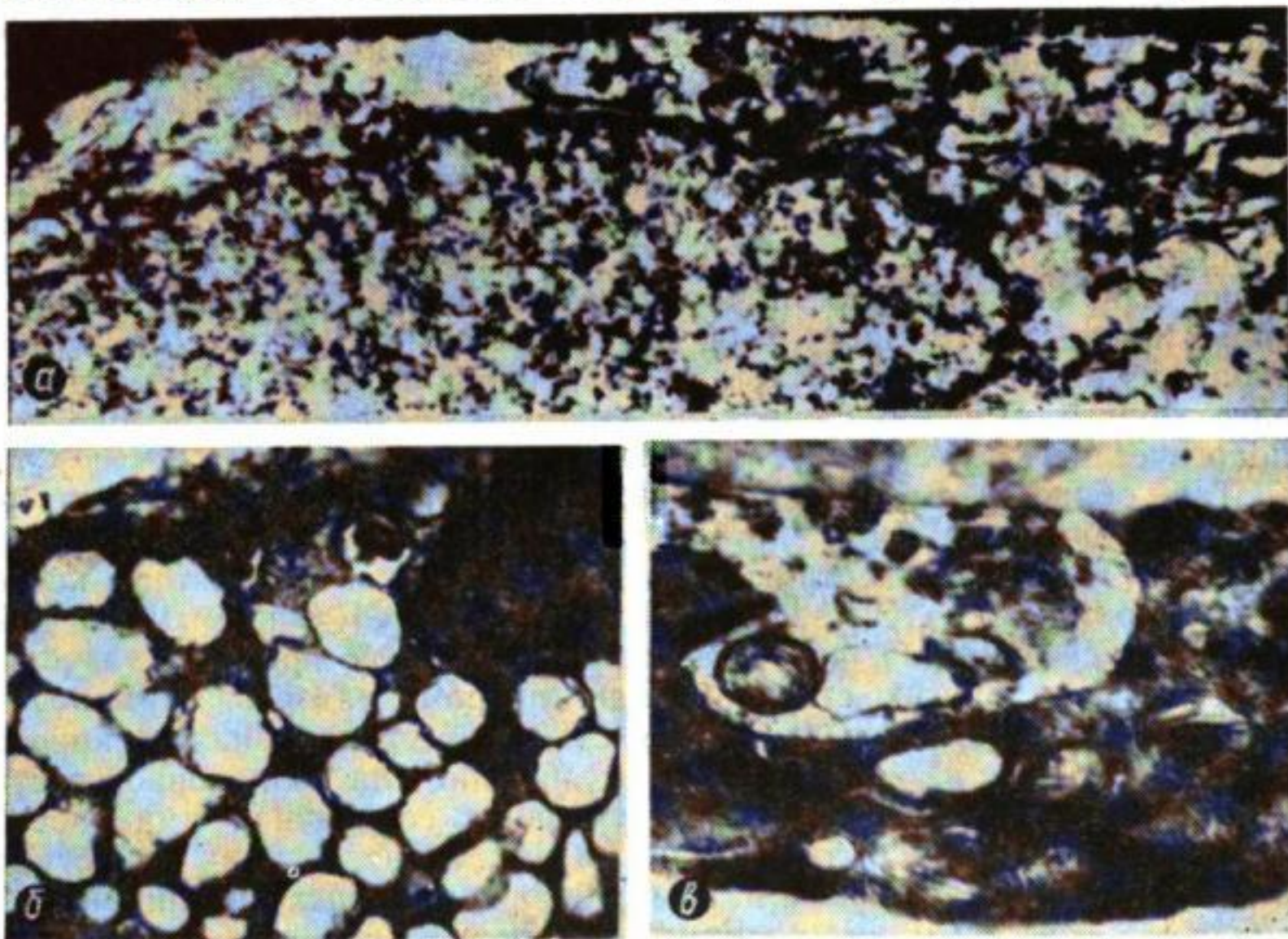
В. С. Журавлев

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ЭНДОТЕЛИИ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ РОГОВИЦ ЧЕЛОВЕКА. I. ВЛИЯНИЕ ВРЕМЕНИ ХРАНЕНИЯ ДО ЗАМОРАЖИВАНИЯ

В настоящее время методы низкотемпературного консервирования роговиц глаза человека с целью последующей сквозной пересадки получили широкое распространение у нас в стране и за рубежом. При оценке сохранности криоконсервированного материала одним из важных методов является изучение ультраструктуры роговицы, особенно

эндотелиального слоя ее, от которого во многом зависит судьба трансплантата.

Роговицы человека перед низкотемпературным консервированием обычно проходят периоды трупного хранения при температуре окружающей среды и хранения при 4°C во время транспортировки. По имеющимся данным, исходное состояние ультраструктуры роговиц перед замораживанием оказывает заметное влияние на результаты низкотемпературного консервирования с диметилсульфоксидом (ДМСО).



Эндотелий роговицы человека:

a — участки цитоплазмы соседних клеток; трупное время — 4 ч, во влажной камере при 4°C 4 ч. $\times 17\,000$; *b* — трупное время 4 ч, при 4°C во влажной камере 18 ч. $\times 12\,000$; *v* — то же, что *a*, после криоконсервирования с ПЭО-400, $\times 12\,000$. Объяснения в тексте.

по методу Кауфмана и Капеллы [6]. Однако для других методов низкотемпературной консервации роговицы подобных исследований не проводили. Ввиду этого целью данной работы было изучение значения времени хранения роговиц человека перед низкотемпературным консервированием (-196°C) с полиэтиленоксидом мол. веса 400 (ПЭО-400) по методу В. М. Чередниченко с соавт. [1] для сохранности ультраструктуры клеток эндотелия.

Исследовали роговицы человека через 8 и 24 ч после смерти. Трупное время — 4 ч, остальное время материал хранили во влажной камере при 4°C . Деконсервированные роговицы фиксировали глутаральдегидом и четырехокисью осмия [9], обезвоживали в ацетоне и заключали в смесь эпон—аралдит [4]. Срезы толщиной 50 нм получали на ультратоме LKB 8802A (Швеция), контрастировали уранил-ацетатом и цитратом свинца [7] и исследовали в микроскопе ЭМВ-100 ЛМ при ускоряющем напряжении 75 кВ.

Обнаруженные ультраструктурные изменения в клетках эндотелия после 8-часового хранения перед замораживанием сводились в основном к частичной вакуолизации некоторых митохондрий с исчезновением крист (рисунок, *a*). Межклеточные границы были без изменений, клетки плотно прилегали к десцементовой мембране.

После 24-часового хранения перед замораживанием наблюдались выраженная вакуолизация митохондрий и цистерн эндоплазматической

сети, а также уменьшение плотности гиало- и карноплазмы (см. рисунок, б). Клетки местами отходили от десцеметовой мембраны.

Криоконсервирование с ПЭО-400 роговиц, хранившихся перед замораживанием в течение 8 ч, вызывает резкое набухание и вакуолизацию всех митохондрий с исчезновением крист (см. рисунок, в). Перинуклеарное пространство местами расширено, клетки лишь частично прилегают к десцеметовой мембране. Аналогичные изменения, однако выраженные в большей степени, характерны для ультраструктуры клеток эндотелия криоконсервированных роговиц, хранившихся в течение 24 ч перед замораживанием.

Отмеченные изменения согласуются с таковыми, описанными другими авторами для роговиц, криоконсервированных с ДМСО [5]. Эти изменения при определенных условиях могут быть обратимыми [8]. Они, по-видимому, не связаны с грубыми нарушениями функций клеток, поскольку функциональные показатели сохранности таких клеток после криоконсервирования с ПЭО-400 незначительно отличаются от нормы [2].

Таким образом, криоконсервирование роговиц с ПЭО-400, как и с ДМСО, приводит к развитию ультраструктурных изменений, происходящих перед замораживанием в результате 8- и 24-часового хранения. По имеющимся данным [5], криоконсервирование с ДМСО роговиц после 3-часового трупного хранения, имеющих неизмененную ультраструктуру эндотелия, не вызывает появления каких-либо изменений [5]. Поэтому можно предполагать, что для достижения лучшей сохранности ультраструктуры эндотелия при криоконсервировании с ПЭО-400 необходимо использовать роговицы со сроком хранения при 4° С менее 8 ч.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чередниченко В. М., Шарлай Т. М., Обозная Э. И. Определение жизнеспособности роговичных трансплантатов, консервированных при низких температурах, по интенсивности поглощения кислорода. — В кн.: Трансплантация органов и тканей. Рига, 1972, с. 494—495.
2. Юрченко Т. Н., Шарлай Т. М., Журавлев В. С. и др. Низкотемпературная консервация роговой оболочки. — В кн.: Современные проблемы криобиологии и медицины. М., 1975, с. 151—154.
3. Millonig G. Further observations on a phosphate buffer for osmium solutions in fixation. — 5th Intern. Congr. Vol. 2. New York, 1962, p. 8—17.
4. Mollenhauer H. R. Plastic embedding mixtures for use in electron microscopy. — Stain Technol., 1964, 39, N 1, p. 111—114.
5. Kanai A., Valenti G. G., Kaufman H. E. Ultrastructural studies of cryopreserved corneal endothelium. — In: Corneal Preservation. Springfield, 1973, p. 248—269.
6. Kaufman H. E., Capella J. A. Preserved corneal tissue for transplantation. — J. Cryosurg., 1968, 1, N 1, p. 125—129.
7. Reynolds E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. — J. Cell Biol., 1963, 17, N 2, p. 208—212.
8. Van Horn D. L., Schultz R. O. Ultrastructural changes in cryopreserved and experimentally rehydrated corneal tissue. — In: Corneal Preservation. Springfield, 1973, p. 237—247.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
22. XII 1976 г.

УДК 57:536.48.047

Я. Г. Эренпрейс, Р. А. Зирне

ВЛИЯНИЕ ГЛУБОКОГО ЗАМОРАЖИВАНИЯ И ОТТАИВАНИЯ КЛЕТОК АСЦИТНОЙ ГЕПАТОМЫ ЗАЙДЕЛЯ КРЫС НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ ЯДЕР

Изменения структуры и других свойств клеток при замораживании описаны в ряде работ. Тем не менее перестройки, которые при этом претерпевает клеточное ядро, включая его основной компонент —

хроматин, прослежены явно недостаточно. Изучению этого вопроса и посвящена настоящая работа.

Материалы и методика. Клетки асцитной гепатомы Зайделя крыс быстро охлаждали до -196°C без применения криопротекторов, погружая ампулы с асцитической жидкостью в жидкий азот, затем медленно (в течение 2 ч 30 мин) оттаивали до 4°C . Оттаявшую асцитическую жидкость делили на две части. Одну часть фиксировали с помощью добавления равного количества 2%-ного раствора OsO_4 , приготовленного на 0,14 М NaCl и охлажденного до 4°C . К другой части асцитической жидкости добавляли гепаринат натрия с конечной концентрацией 0,025%, приготовленный на 0,14 М NaCl, и экспонировали при 4°C в течение 2 и 5 мин, после чего фиксировали как необработанный гепарином асцит. Фиксацию проводили при той же температуре в течение 1,5—2 ч, затем обезвоживали в спиртах и заключали в эпон. В качестве контроля фиксировали асцитическую жидкость непосредственно после ее взятия. Срезы готовили на ультрамикротоме ЛКБ-8 800 контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и изучали в электронном микроскопе ЭМВ-100 Л.

Результаты и их обсуждение. *Контроль.* Электронно-микроскопический контур ядра относительно ровный. Хроматин фибриллярно-зернистой структуры, деление его на компактный и диффузный, а также маргинация выражены слабо. Крупные ядрышки разнообразной формы имеют хорошо выраженную нуклеолонему и часто контактируют с ядерной оболочкой обычного строения, которая имеет множество пор.

После замораживания и оттаивания ультраструктура ядер сильно изменена. Заметно увеличена доля компактного хроматина, занимающего примерно половину объема клеточного ядра и четко отделенного от диффузного. Компактный хроматин отличается очень высокой электронной плотностью и практически бесструктурен. У большинства клеток ядерная оболочка сильно извилиста, на значительном расстоянии отстает от конденсированного хроматина, образующего периферический слой ядра. Несмотря на отслоение ядерной оболочки, содержимое ядра сохраняет округлые очертания.

Сморщенное ядро связано с ядерной оболочкой плотными тяжами хроматина. В области диффузного хроматина встречаются скопления электронноплотных гранул, возможно, природы РНК. Ядрышко не определяется. Некоторые ядра имеют крупную зону округлой формы, которая может быть заполнена диффузным хроматином или выглядит пустой; сходная зона, появляющаяся после замораживания и оттаивания, описана в литературе. Замораживание связано с сильным возрастанием концентрации электролитов ядра, снижающейся при оттаивании клеток. Эти колебания, очевидно, и вызывают наблюдаемые изменения в ядерной морфологии. Повышение молярности ядерной среды должно вызывать диссоциацию комплекса ДНП с полным отделением гистонов от ДНК. При оттаивании, когда полярность снижается, гистоны, по-видимому, опять садятся на ДНК, вызывая конденсацию хроматина, и доля конденсированного хроматина при этом заметно возрастает, что отмечено и другими авторами. Если принять, что конденсация хроматина определяется гистонами, причиной этого может быть, во-первых, частичная экстракция анионных компонентов ядра, в норме связывающих гистоны, например РНК, а, во-вторых, замораживание—оттаивание, вероятно, вызывающее увеличение проницаемости ядерной оболочки. Это должно вызывать снижение концентрации ионов ядра и выравнивание ее с таковой ионов в окружающей среде (концентрация одновалентных ионов в интактном ядре равна 0,3—0,42 М). Следствием спада молярности до 0,14 М будет усиление связывания гистонов с ДНК, влекущее за собой конденсацию хроматина.

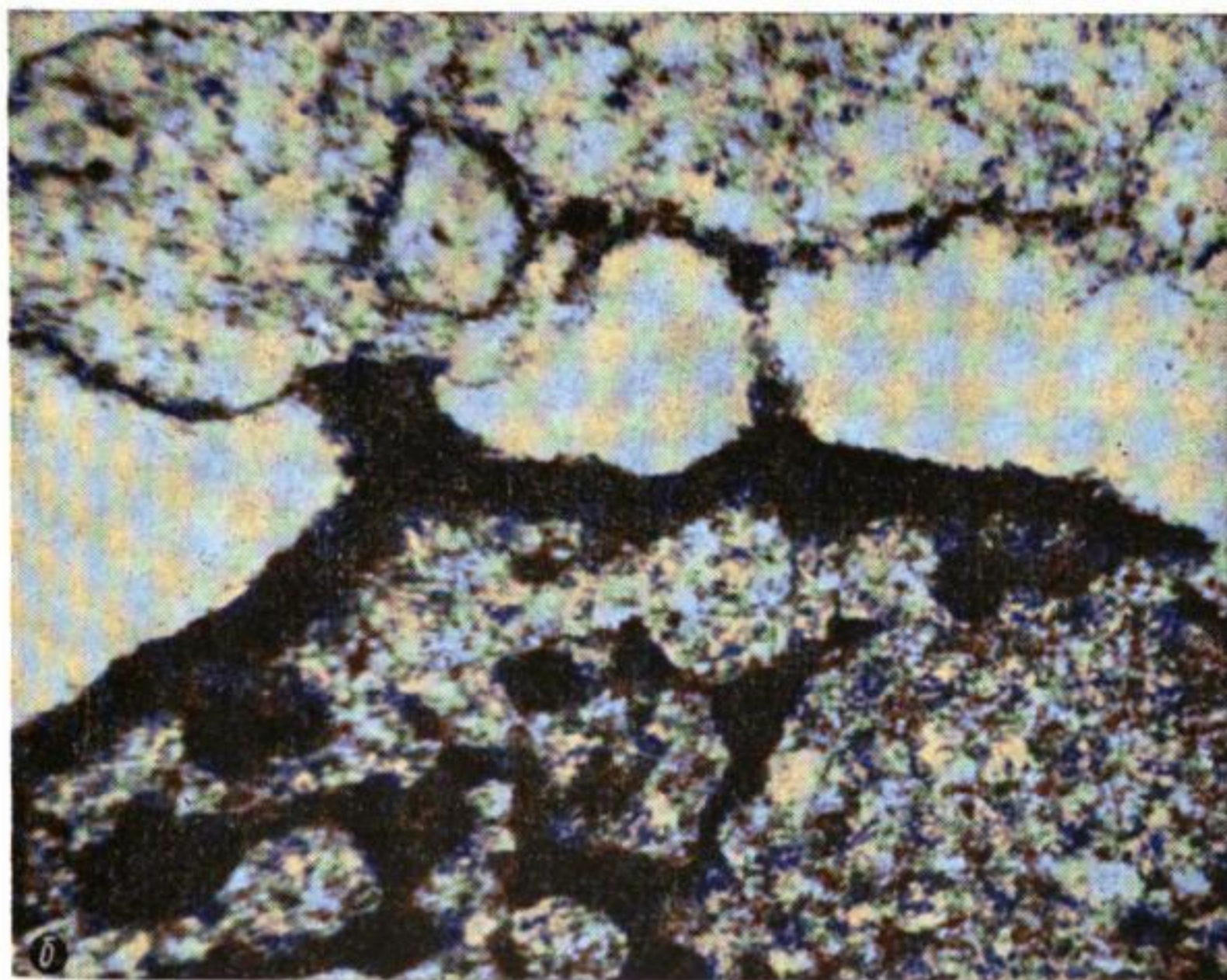
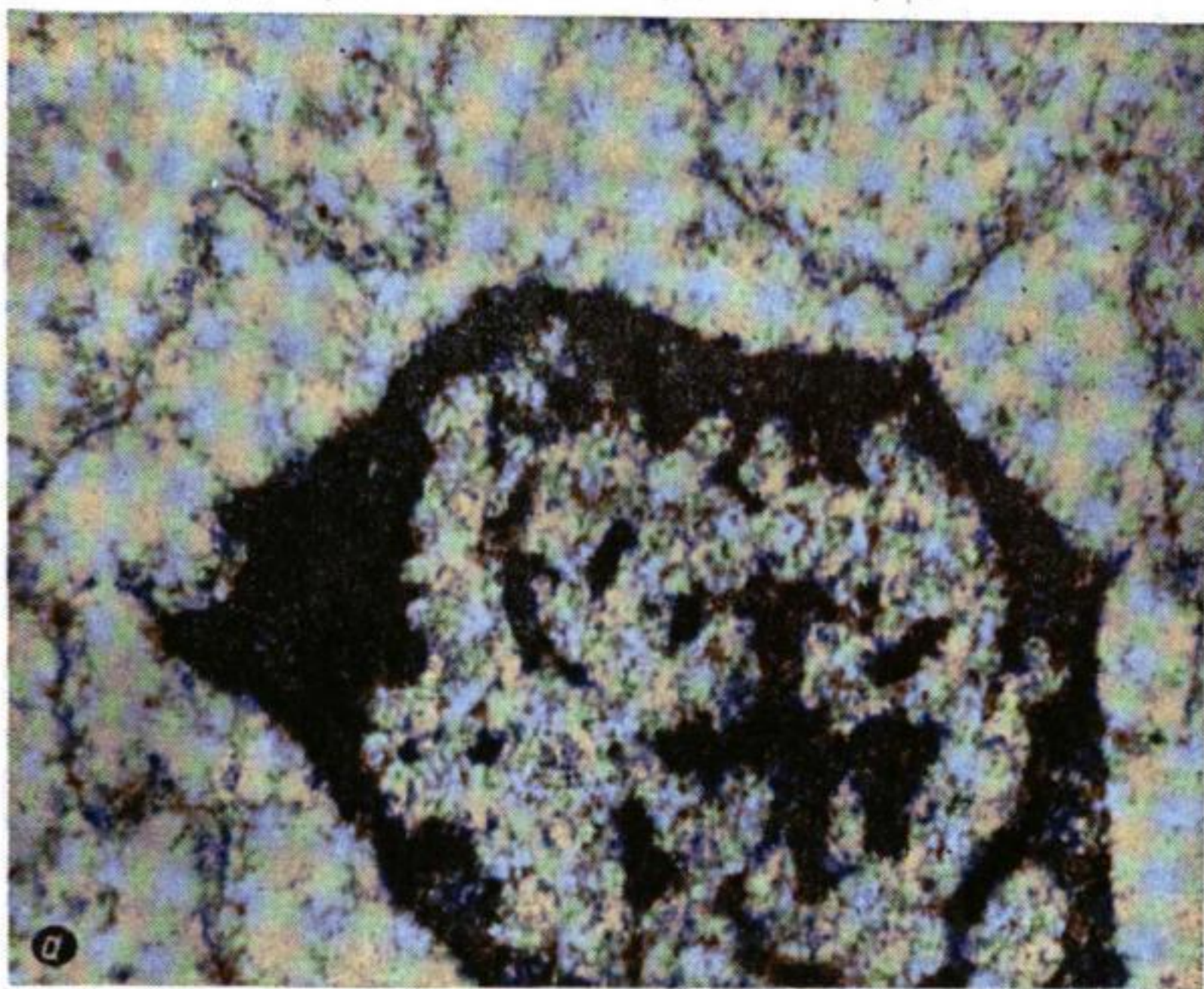


Рис. 1. Асцитная клетка после замораживания—оттаивания. Разделение хроматина на сильно конденсированный и полностью деконденсированный:
 а — отслоение ядерной оболочки, $\times 32\,000$; б — связь хроматина с ядерной оболочкой, $\times 37\,000$.

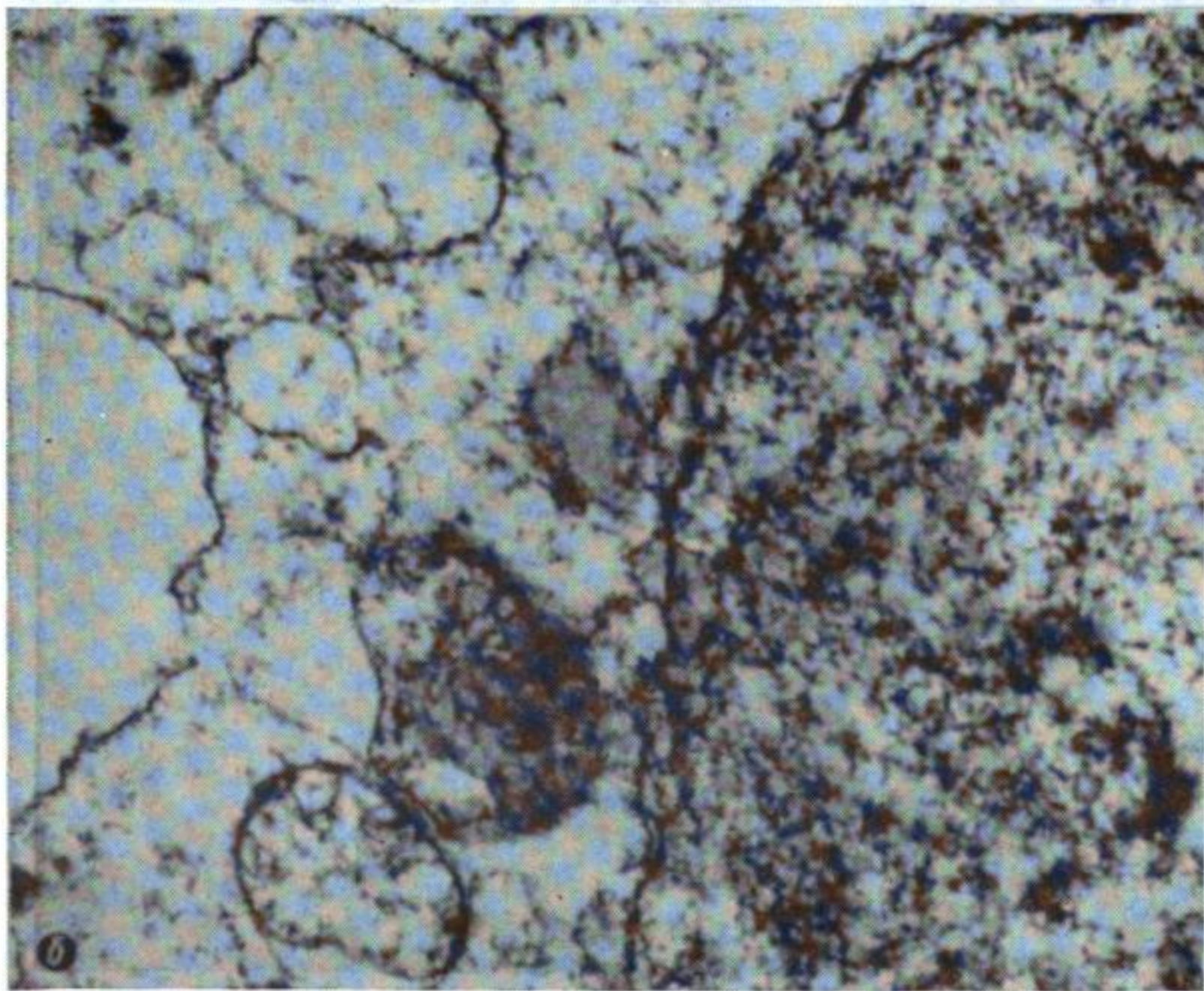
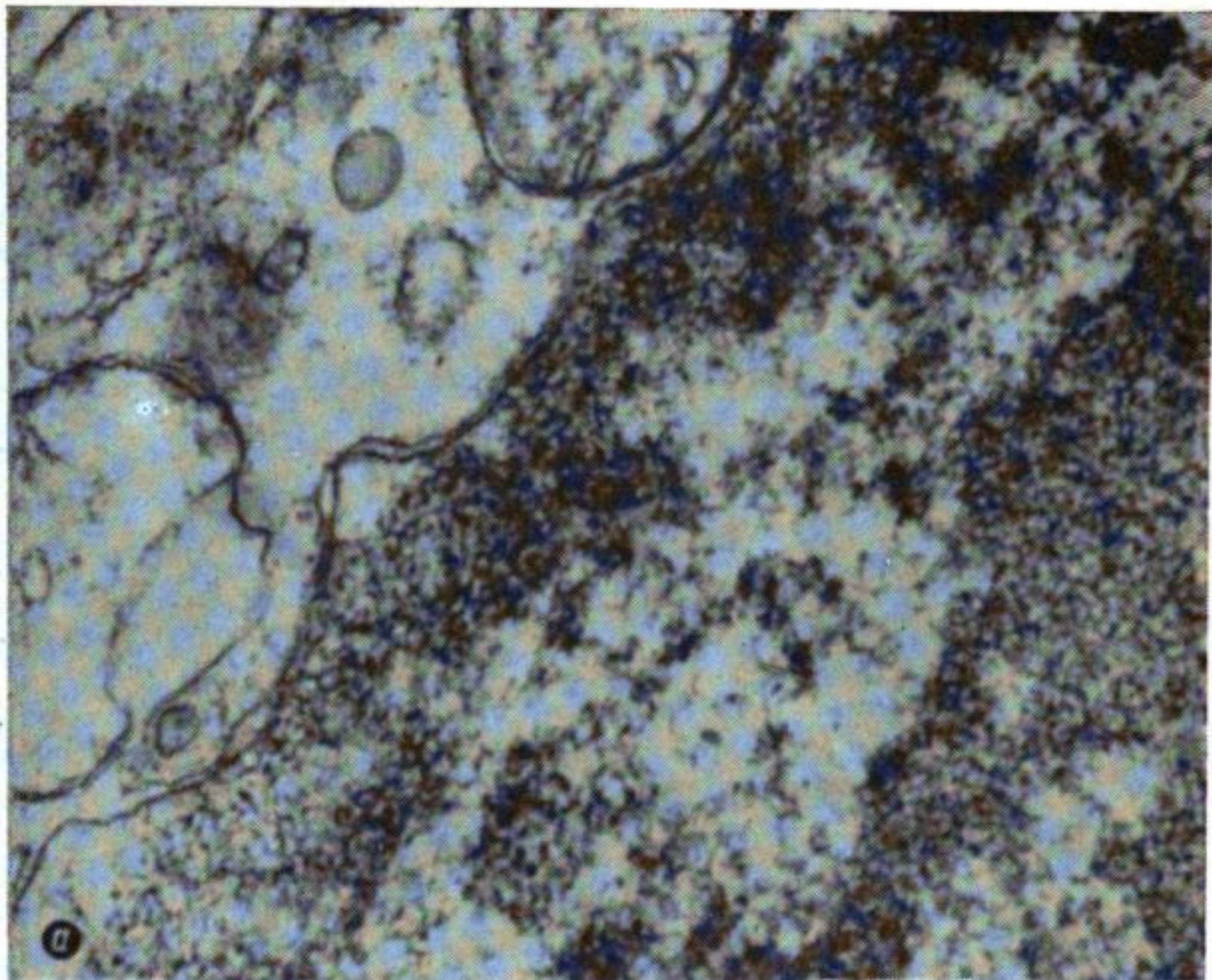


Рис. 2. Асцитная клетка после замораживания и оттаивания:
 а — воздействие гепарина в течение 2 мин. Частичная деконденсация сильно конденсированного хроматина, сужение щели между последним и ядерной оболочкой, $\times 41\,000$; б — воздействие гепарином в течение 5 мин. Полная деконденсация всего хроматина, который плотно прилегает к ядерной оболочке, $\times 46\,000$.

Для проверки предположения о роли гистонов в появлении сильно конденсированного хроматина и выяснения возможности деконденсации его были поставлены опыты с гепарином.

Электронно-микроскопически уже через 2 мин от начала воздействия гепарином наблюдаются частичная деконденсация сильно конденсированного хроматина и увеличение объема ядерного содержимого, вследствие чего щель между периферическим хроматином и ядерной оболочкой сужается, а контур ядерной оболочки становится ровным. После 5-минутного воздействия гепарином у большинства клеток весь хроматин уже полностью деконденсирован и деления его на конденсированный и диффузный больше не наблюдается. У части клеток хроматин упакован даже более рыхло, чем в контроле, а фибриллы его истончены. Хроматин плотно прилегает к ядерной оболочке. Местами наблюдаются повреждения ядерной оболочки, особенно наружного ее листка. В основном же типичная картина структуры ядерной оболочки и пор сохранена. Ядрышки при любом сроке воздействия гепарином не видны.

Полученные результаты находятся в соответствии с представлением о существенной роли гистонов в упаковке хроматина и свидетельствуют о высокой лабильности связи между гистонами и ДНК.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
6. XII 1976 г.

УДК 57:536.48.047:574.24.043:617.7

Т. Н. Юрченко

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРНЫХ РЕЖИМОВ НА АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ НА КРИОСТАТНЫХ СРЕЗАХ

Подготовка ткани для проведения гистоэнзимологического исследования включает ее охлаждение (замораживание в камере криостата или жидком хладагенте) и отогрез. При этом возможно изменение внутриклеточных структур с повреждением эндогенного метаболического цикла и значительной потерей уровня окислительно-восстановительных реакций [2, 4, 7].

Информация о структурных изменениях, проявляющихся при замораживании—оттаивании в различных условиях получения криостатных срезов имеет самостоятельное значение. Регулируя скорость и конечную температуру охлаждения объекта, можно выявить те температурные зоны, в которых происходит как наименьшее, так и наибольшее снижение активности ферментов [5, 6, 8, 9].

Целью настоящей работы явилось изучение влияния некоторых температурных режимов при подготовке ткани для гистоэнзимологического исследования, объектом которого служила роговая оболочка кролика. Замораживание производилось: 1) в камере криостата на охлажденном столике до температуры -20°C (медленное охлаждение); 2) погружением образца в жидкий азот (быстрое охлаждение) и последующей монтировкой на криостатный стол при температуре камеры и стола -20°C ; 3) охлаждение на специально сконструированном криостоле (быстрое охлаждение) с регулируемой подачей азота (разработка Ю. М. Рудько), обеспечивающем понижение температуры объекта до -70°C и сохранение этой температуры во время получения срезов.

Определялись содержание и активность следующих окислительно-восстановительных ферментов: лактат-, малат-, α -глицерофосфат и сукцинат дегидрогеназ (ЛДГ, МДГ, α -ГФДГ, СДГ) и НАД- и НАДФ-

диафоразы. В каждом опыте параллельно использовались интактные роговые оболочки и роговицы, инкубированные в течение 10 мин в растворе полиэтиленоксида молекулярного веса 400 (ПЭО-400). Максимальная интенсивность реакции оценивалась визуально в 34 балла, отсутствие реакции — 0 баллов. Результаты обрабатывались статистически.

При замораживании без предварительной инкубации с раствором ПЭО в эпителии наиболее активна НАД-диафораза (3,28), наименее — СДГ (0,6). У пяти ферментов из шести медленное замораживание до -20°C давало высокие показатели активности. Исключением явилась СДГ, которая при этих же условиях обнаруживала минимальное количество продукта. При охлаждении до -70°C интенсивность окрашивания у ЛДГ, МДГ, α -ГФДГ, НАД- и НАДФ-диафраз была незначительной. В сравнительной оценке активности быстрое охлаждение погружением образца в азот давало средний уровень реакции, только активность НАД-диафразы снизилась до 2,14 балла.

Применение криопротектора не изменяло общей картины в распределении активности. Четыре фермента (кроме СДГ и МДГ) обнаруживали наибольшую активность при медленном охлаждении, СДГ была наименее активной (0,8), активность МДГ была средней (2,8). Самые высокие цифры, определяющие интенсивность реакции, были у НАД-диафразы (3,62). Погружение роговой оболочки в азот вызывало некоторое понижение эффективности реакции, хотя и менее выраженное, чем при замораживании до -70°C .

В стромальных клетках роговицы охлаждение без криопротектора приводило к следующему. Наиболее высокая активность определялась у МДГ (2,85), наименьшая — у СДГ (0,4). Медленное охлаждение до -20°C позволяло сохранить относительно высокие значения активности для всех ферментов, кроме СДГ (0,4). Замораживание до -70 и -196°C несколько снижало активность, при этом охлаждение до -196°C было менее повреждающим.

После предварительной инкубации в растворе ПЭО и последующем охлаждении сохранилась та же тенденция, однако уровень реакции был выше. Особенно наглядно это выглядит на примере МДГ, активность которой увеличивалась при медленном охлаждении от 1,83 (без криопротектора) до 2,83 (с криопротектором).

В эндотелии роговой оболочки охлаждение интактной ткани выявило, что наиболее активна МДГ (3,42), наименее — СДГ (0,25). Оптимальный режим для выявления окислительно-восстановительных ферментов в эндотелии трудно определить однозначно, как это можно сделать для других слоев роговой оболочки. ЛДГ, α -ГФДГ и НАД-диафораза активнее всего при медленном замораживании до -20°C , МДГ и НАД-диафораза — при быстром замораживании до -196°C , активность СДГ максимальна при быстром охлаждении до -70°C . Применение раствора ПЭО обеспечивало, как правило, повышение интенсивности реакции.

Сравнительная оценка активности ферментов в различных слоях роговицы показала, что эпителий и эндотелий обладают высоким уровнем окислительно-восстановительных ферментов. Из изученных температурных режимов оптимальным, обеспечивающим максимальное выявление продукта реакции, является медленное охлаждение до -20°C . Применение ПЭО-400 в качестве инкубационной среды перед замораживанием образцов обеспечивает повышение уровня реакции при всех способах получения срезов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белоус А. М., Луговой В. И., Гулезский А. К. Актуальные проблемы современной криобиологии. — Криобиология и криомедицина, 1975, вып. 1, с. 8—15.

2. *Левина Г. Я.* О некоторых морфологических особенностях цирроза печени (гистохимическое исследование) — Архив патологии, 1967, № 7, с. 46—52.
3. *Мадиевский Ю. М., Моисеенко А. И.* Приспособление для количественной оценки гистохимических реакций. — Архив патологии, 1965, № 1, с. 89—91.
4. *Митин К. С.* Электронно-гистохимическое исследование ишемии миокарда в эксперименте. — Архив патологии, 1965, № 1, с. 40—47.
5. *Пирс Э.* Гистохимия. М., Медгиз, 1962. 176 с.
6. *Прочуханов Р. А.* Задачи и перспективы количественной гистохимии. — Архив патологии, 1975, № 2, с. 77—85.
7. *Рэ Л.* Консервация жизни холодом. М., Медгиз, 1962. 76 с.
8. *Смирнова Е. А., Райхлин Н. Т.* Онкоциты — система серотонинцитов. — Архив патологии, 1975, № 2, с. 16—21.
9. *Фукс Б. Б.* Цитохимия иммуногенеза. — Архив патологии, 1976, № 4, с. 11—18.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
22. XII 1976 г.

НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЕ КОНСЕРВИРОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

УДК 57:536.48.047:541.64:547.422:615.387

М. И. Шраго, Л. П. Бредихина, В. Г. Тимченко,
В. Г. Лубяный, Е. Г. Легостаева, Ю. В. Кононов,
В. М. Трушков

ПОЛИЭТИЛЕНОКСИДЫ В НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОМ КОНСЕРВИРОВАНИИ ЭРИТРОЦИТОВ (НЕКОТОРЫЕ ИТОГИ И ПЕРСПЕКТИВЫ)

Низкотемпературное консервирование эритроцитов в настоящее время из лабораторий ученых перешло в стадию широких испытаний в условиях банков крови: исследуются трансфузиологические аспекты в связи с клиническим применением эритроцитов, восстановленных после замораживания и длительного хранения, выясняются организационные и экономические стороны проблемы.

Следует подчеркнуть, что помимо практического значения указанная проблема представляет большой теоретический интерес, поскольку эритроциты оказались удобным объектом криобиологических исследований при постановке экспериментов по длительному сохранению жизнеспособности клеток в условиях глубокого охлаждения.

Имеются публикации [1, 7], подтверждающие морфологическую и функциональную сохранность эритроцитов после долгосрочного пребывания в замороженном состоянии, их терапевтическую ценность. Однако фундаментальные исследования низкотемпературного консервирования клеток крови в банках убеждают в том, что указанная проблема еще далеко не исчерпана и ряд вопросов заслуживает дальнейшей разработки.

Криоконсервирование эритроцитов, как и других клеточных суспензий, осуществляется в средах, содержащих специальные добавки, так называемые криопротекторы. Последние, будучи веществами, чуждыми организму, в значительной степени определяют конечный эффект процедуры.

У большого числа различных химических соединений изучена криозащитная активность в отношении эритроцитов, однако практическое значение приобрели хорошо известные криопротекторы: глицерин, поливинилпирролидон (ПВП), гексаэтиловый крахмал, полимеры окиси этилена. Остальные препараты (глюкоза, фруктоза, сахара и др.) оказались значительно менее эффективными и используются в качестве вспомогательных компонентов в криозащитных средах либо на этапах обработки восстановленного материала.

Криозащиту можно обеспечить, применяя криопротекторы двух типов — проникающих и не проникающих в клетку. Заметим, кстати, что принятое в криобиологии разделение криозащитных веществ на эндо- и экзоцеллюлярные основано на характере их взаимодействия с эритроцитами и далеко не всегда совпадает с поведением других клеток человека, а также эритроцитов иных видов животных.

Из эндоцеллюлярных криопротекторов в низкотемпературном консервировании эритроцитов в СССР и за рубежом широко используется глицерин, обеспечивающий высокую сохранность клеток (до 90%). В соответствии со скоростью замораживания применяются различные концентрации криопротектора: при медленном охлаждении — до 40%, при быстром — значительно меньше (до 20%).

Существенный недостаток указанного криопротектора — необходимость удаления его из клеток перед трансфузией вследствие гемолиза оттаявших клеток, содержащих глицерин, при помещении в изотоническую среду. Деглицеринизация клеток требует специального оборудования, значительно усложняет и удорожает процесс низкотемпературного консервирования.

Заслуживают внимания сообщения о целесообразности клинического применения отмывтых эритроцитов, получаемых после удаления глицерина. Одновременно ведутся работы по созданию других криопротекторов, могущих упростить весь технологический комплекс низкотемпературного консервирования эритроцитов.

Такую возможность дает применение криопротекторов, не проникающих в эритроциты и не требующих удаления перед введением в кровяное русло реципиента. В этом направлении исследуются три группы полимерных соединений: ПВП, гексаэтиловый крахмал, полимеры окиси этилена и их производные. Криозащитная активность ПВП зависит от молекулярного веса образца [2, 5]. Лучшие результаты получены с ПВП молекулярного веса 25 000 [2, 5]. Этот полимер-гомолг, в отличие от низкомолекулярных, не является медицинским препаратом, его парентеральное введение может вызвать побочные явления.

Изучение криопротекторных возможностей гексаэтилового крахмала еще не вышло за пределы исследовательских разработок, поскольку не показано явных преимуществ применения его по сравнению с другими криозащитными веществами.

Несомненный интерес представляют криопротекторы — полимеры окиси этилена и их производные — в низкотемпературном консервировании эритроцитов. В настоящем сообщении представлены некоторые итоги и перспективы указанных исследований. Результаты изложены в соответствии с методическими этапами их постановки. Вначале определялся криозащитный эффект различных ПЭО в лабораторных условиях — на клеточных объемах, равных 1—2 мл. Затем лучшие результаты воспроизводились на больших объемах эритроцитной массы (100—150 мл), чтобы приблизиться к требованиям банка замороженной крови. Для оценки клеточного статуса применялся комплекс показателей: 1) содержание гемоглобина в надосадочной жидкости после центрифугирования клеточной взвеси фотокolorиметрическим методом по М. А. Рождественской [4]; 2) определение процента сохранившихся клеток по Хантсману, Икину, Хану (1962); 3) осмотическая резистентность клеток в растворах хлористого натрия и калия; 4) выход калия из клеток методом пламенной фотометрии; 5) активность 2,3-ДФГ по И. С. Лугановой, М. Н. Блинову [3]; 6) кислородная емкость и кривые диссоциации оксигемоглобина газометрическим методом на приборе Ван-Слайка. Последние определялись в образцах, показавших высокую сохранность клеток.

Для замораживания и хранения замороженных эритроцитов используются главным образом три температурных уровня: 1) — 79°С (обеспечивается твердой углекислотой); 2) от —80 до —120°С (создается в специальных аппаратах с фреоновым охлаждением) и 3) —190°С (поддерживается в замораживателях и хранилищах за счет хладагента — жидкого азота).

Вообще замораживание эритроцитов с современными криопротекторами производится с одной скоростью на всей температурной шкале. Скорость охлаждения изменяется в соответствии с видом защитных добавок, их концентрацией, а также объема, геометрической формы и материала контейнера, в который помещается материал для замораживания. Таким образом, для решения проблемы низкотемпературного консервирования эритроцитов главное значение приобретают криопротекторы.

Некоторые интегральные показатели сохранности эритроцитов после контакта

Показатель	Контроль (взвесь эритроцитов в физрастворе)	ПЭО-400	
		15%	p
Свободный Нв в надосадочной жидкости, мг %	$7,21 \pm 0,4$	$11,2 \pm 0,95$	$< 0,05$
Сохранившиеся клетки, %	$99,97 \pm 0,004$	$99,95 \pm 0,01$	$> 0,05$
Осмотическая резистентность в растворах NaCl, %	$0,39 \pm 0,015$	$0,6 \pm 0,01$	$< 0,05$
Осмотическая резистентность в растворах KCl, %	$0,52 \pm 0,03$	$0,81 \pm 0,015$	$< 0,05$
Осмотическая резистентность в растворах KCl, %	$0,55 \pm 0,025$	$0,69 \pm 0,02$	$< 0,05$
Содержание K^+ в надосадочной жидкости, мэкв/л	$0,71 \pm 0,03$	$1,1 \pm 0,03$	$< 0,05$
Содержание 2,3-ДФГ, мкмоль/мл эритроцитов	$3,76 \pm 0,48$	$2 \pm 0,13$	$< 0,05$
	$7,45 \pm 0,57$	$5,9 \pm 0,2$	$< 0,05$

Некоторые интегральные показатели сохранности

Показатель	Контроль (взвесь эритроцитов в физрастворе)	ПЭО-400	
		15%	p
Свободный Нв в надосадочной жидкости, мг %	$7,21 \pm 0,4$	$400 \pm 20,5$	$< 0,05$
Сохранившиеся клетки, %	$99,97 \pm 0,004$	$97,5 \pm 0,3$	$< 0,05$
Осмотическая резистентность в растворах NaCl, %	$0,39 \pm 0,015$ —	$0,9 \pm 0,04$ —	$< 0,05$
Осмотическая резистентность в растворах KCl, %	$0,52 \pm 0,03$	$6,2 \pm 0,2$	$< 0,05$
Осмотическая резистентность в растворах KCl, %	$0,55 \pm 0,025$ —	$1,4 \pm 0,1$ —	$< 0,05$
Содержание 2,3-ДФГ, мкмоль/мл эритроцитов	$0,71 \pm 0,03$	$7,0 \pm 0,3$	$< 0,05$
	$7,45 \pm 0,57$	$4,9 \pm 0,15$	$< 0,05$

В данной работе исследована криозащитная активность растворов ПЭО молекулярного веса 100—6000 в конечных концентрациях 5—10—15—20%. В опытах использовали образцы ПЭО, синтезированные в Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР, в Харьковском научно-исследовательском химико-фармацевтическом институте, на Казанском заводе органического синтеза, а также фирмы «Мерк».

Криозащитная активность обнаружена у этиленгликоля и ряда полимер-гомологов молекулярного веса 100—6000. Образцы более высокого молекулярного веса вызывали такую агломерацию клеток, что восстановить клеточную взвесь не удавалось. В растворы низкомолекулярных ПЭО следует добавлять хлористый натрий и другие ионы, поскольку водные системы сами по себе вызывают гемолиз, в то время как ПЭО молекулярного веса 1000 и выше не вызывают явного повреждения эритроцитов. Этот феномен нуждается в расшифровке. Осмотическое давление водных растворов низкомолекулярных полимеров оказывается выше такового высокомолекулярных в тех же концентрациях, а для предупреждения гемолизирующего действия в них следует вводить соли и тем самым еще повысить давление. В порядке предположения можно допустить, что низкомолекулярные фракции полидисперсного образца ПЭО проникают в клетку и при этом наступает

Таблица 1

с ПЭО до замораживания (% ПЭО в конечной концентрации)

ПЭО-1000		ПЭО-1500		ПЭО-4000	
15%	<i>p</i>	15%	<i>p</i>	15%	<i>p</i>
9,4 ± 0,8	> 0,05	6,79 ± 0,82	> 0,05	3,1 ± 0,2	< 0,05
99,95 ± 0,01	> 0,05	99,97 ± 0,009	> 0,05	99,9 ± 0,1	< 0,05
0,47 ± 0,02	< 0,05	0,38 ± 0,01	> 0,05	0,38 ± 0,02	> 0,05
0,58 ± 0,017	< 0,05	0,54 ± 0,02	> 0,05	0,48 ± 0,01	> 0,05
0,53 ± 0,015	> 0,05	0,55 ± 0,015	> 0,05	0,5 ± 0,015	> 0,05
0,67 ± 0,015	> 0,05	0,62 ± 0,04	> 0,05	0,63 ± 0,02	> 0,05
4,9 ± 0,22	> 0,05	2,55 ± 0,15	> 0,05	2,4 ± 0,2	< 0,05
7,2 ± 0,13	> 0,05	8,98 ± 1,19	> 0,05	9,4 ± 0,34	> 0,05

Таблица 2

эритроцитов после размораживания

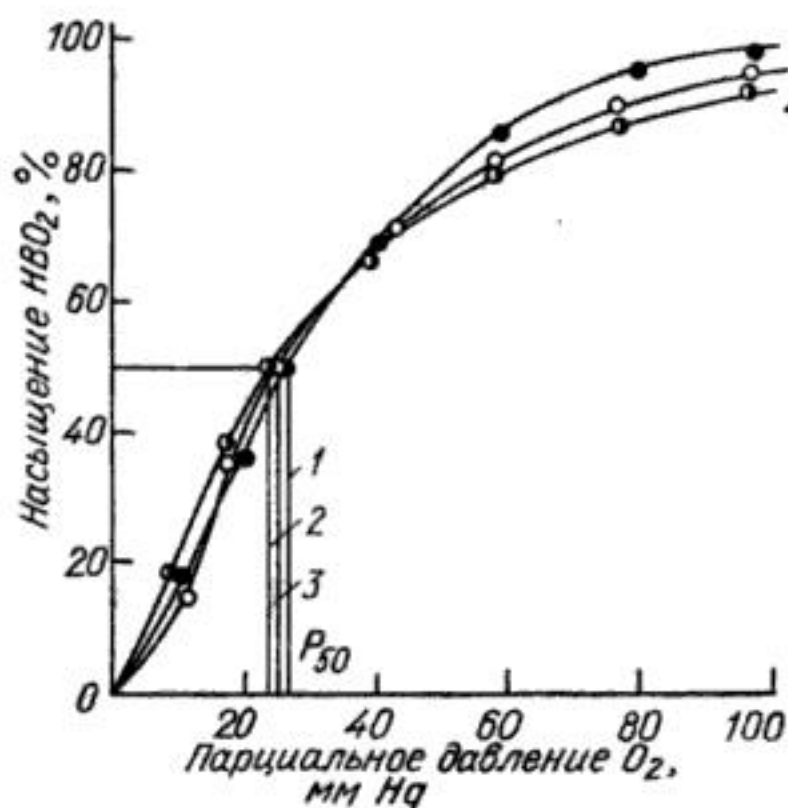
ПЭО-1000		ПЭО-1500		ПЭО-4000	
15%	<i>p</i>	10%	<i>p</i>	10%	<i>p</i>
179,6 ± 5,2	< 0,05	272 ± 16,73	< 0,05	391 ± 15,2	< 0,05
98,85 ± 0,8	< 0,05	98,25 ± 0,36	< 0,05	97,9 ± 0,6	< 0,05
0,41 ± 0,01 —	> 0,05	0,34 ± 0,015 —	> 0,05	0,48 ± 0,04 —	> 0,05
0,65 ± 0,05	> 0,05	0,55 ± 0,025	> 0,05	3,6 ± 0,1	< 0,05
0,58 ± 0,02 —	> 0,05	0,48 ± 0,04 —	> 0,05	1,21 ± 0,3 —	< 0,05
0,72 ± 0,01	> 0,05	1,5 ± 0,1	< 0,05	6,8 ± 0,5	< 0,05
7,7 ± 0,5	> 0,05	7,48 ± 0,7	> 0,05	5,9 ± 0,6	> 0,05

значительное понижение осмотического давления среды, в то время как ПЭО более высокого молекулярного веса в клетку не проникают и, обладая значительной гидратационной способностью, образуют многослойную защитную гидратную оболочку вокруг наружной клеточной мембраны, оказывая тем самым противогемолитическое действие.

Пребывание эритроцитов в растворах ПЭО в течение 1—3 ч не вызывало явного гемолиза. Однако можно отметить некоторые признаки их повреждения. В первую очередь к ним относится наблюдаемое снижение показателей осмотической резистентности эритроцитов (табл. 1). Кроме того, изучались другие показатели клеточного статуса, несущие информацию о степени его сохранности: содержание калия, уровень 2,3-ДФГ. Результаты этих исследований также приведены в табл. 1. Из представленных данных следует, что растворы ПЭО с молекулярным весом 100—4000 в 10—15%-ной конечной концентрации не оказывали явного гемолизирующего воздействия на эритроциты. Наилучшие показатели сохранности жизнеспособности эритроцитов обеспечивали ПЭО с молекулярным весом 1500 в 10—15%-ной конечной концентрации.

Криозащитная активность изучалась у растворов ПЭО, не оказавших токсичного воздействия на клетки. При этом было установлено, что 20—30%-ные растворы ПЭО молекулярного веса 1000—4000 обес-

печивают сохранность 80—90% клеток (табл. 2). Однако клетки, восстановленные из замороженного состояния, несут определенные признаки повреждения, которые можно выявить при переносе их из криозащитной среды в изоосмотическую либо еще лучше в гипотоническую (0,6%-ный раствор хлористого натрия). При такой оценке степени сохранности оказалось, что наиболее резистентными являются эритроциты, подвергавшиеся замораживанию в 20%-ных растворах ПЭО молекулярного веса 1500 (см. табл. 2).



Кривые диссоциации оксигемоглобина эритроцитов человека до и после низкотемпературного консервирования в 20%-ном растворе ПЭО-1500 (рН 7,4; температура 37° С):

1 — контроль; 2 — взвесь эритроцитов в 20%-ном ПЭО-1500 до замораживания; 3 — размороженная взвесь в 20%-ном ПЭО-1500.

хранности эритроцитов при замораживании, принятом в условиях банка. При использовании стандартных алюминиевых контейнеров, разработанных в ЦОЛИПК, конечная концентрация ПЭО должна быть повышена до 15—20% (табл. 3).

Дыхательная функция таких эритроцитов полностью сохранялась (см. рисунок). Как видно из рисунка, после экспозиции клеток в растворе криопротектора перед замораживанием, а также после оттаивания кривые сохраняют первоначальную S-образную форму и параметры ($P_{50}=24,5\div 25$ мм Н; P_{50} контроля равен 26 мм Н).

Таким образом, в лабораторных исследованиях из ряда ПЭО отобран оптимальный криопротектор для эритроцитов. Таким криозащитным веществом оказался полиэтиленоксид молекулярного веса 1500.

Следующий этап работы заключался в воспроизведении указанных результатов в условиях банка замороженной крови при замораживании не 1—2 мл клеточной массы, а 100—150 мл.

В результате выполненных работ удалось достигнуть высокой со-

Таблица 3

Некоторые показатели сохранности эритроцитов после замораживания с ПЭО-1500 различной концентрации в условиях банка (% ПЭО в конечной концентрации)

Показатель, мг %	10 %-ная ПЭО-1500	20-ная ПЭО 1500	p
Свободный Нв в надосадочной жидкости	93±7,5	14,1±1,5	<0,05
Сохранившиеся эритроциты	65±4,6	98 ±1,5	<0,05
Свободный Нв в надосадочной жидкости после перенесения в изоосмотическую среду	1180±22,3	308,3±15,6	<0,05

Низкотемпературное консервирование эритроцитов в банке не исчерпывается только криозащитным эффектом — возникает ряд вопросов организационного и методического плана, в первую очередь, связанных с обеспечением стерильности процесса на всех этапах и безопасности передачи инфекции, в частности вирусного гепатита, а также сохранения специфичности иммуногематологических реакций при переливании эритроцитарной массы.

Обеспечение стерильности материала при использовании экзоцеллюлярных криопротекторов не составляет особых трудностей. Более

того, количество манипуляций при этом сокращается, так как отпадает необходимость повторных отмываний клеточек, производимых при удалении эндоцеллюлярных криопротекторов, и тем самым снижается опасность бактериального загрязнения.

По вопросу о степени опасности переноса трансфузионного вирусного гепатита мы еще не пришли к окончательному мнению.

НВ-антиген является липопротеином с очень устойчивыми физико-химическими свойствами, что способствует гипотетическим признакам возбудителя вирусного гепатита и может объяснить безрезультатные попытки инактивировать вирус гепатита в компонентах и препаратах крови.

Специальные исследования, проведенные в Центральном институте гематологии и переливания крови АН СССР, показали, что переливание размороженных отмытых эритроцитов значительно снижает уровень заболеваемости посттрансфузионным гепатитом. При этом сам процесс ультрабыстрого замораживания эритроцитной взвеси не влияет на титр НВ-антигена в ней. Не изменяется титр от длительности хранения замороженных эритроцитов при ультранизких (-196°C) температурах, но в то же время титр НВ-антигена находится в прямой зависимости от метода и количества отмываний эритроцитной взвеси от криопротекторного раствора. В суспензии размороженных эритроцитов после 3-разового отмывания антиген гепатита В при использовании метода встречного иммуноэлектроосмосфореза (ВИЭОФ) не выявлялся.

Изучено влияние 20%-ного раствора ПЭО-1500 на НВ-антиген и антитела к нему в процессе консервирования эритроцитной взвеси при различных температурах и в зависимости от сроков хранения. Предметом изучения явились плазма и эритроцитная масса крови доноров, содержащих НВ-антиген или антитела к нему в смеси с 20%-ным раствором ПЭО-1500 в соотношении 1 : 1. Контролем служила плазма или сыворотка указанных доноров. Опытные образцы сохранялись при температуре 4°C (условия бытового холодильника) и при -196°C . Срок хранения от 27 ч до 3 месяцев.

НВ-антиген и антитела к нему определялись методом ВИЭОФ на дальневосточном агаре с использованием разработанной нами тест-системы. Титрование производилось методом последовательных разведений. Титр НВ-антигена колебался от 1 : 2 до 1 : 16, титр НВ-антител — от 1 : 2 до 1 : 4.

Как известно, НВ-антиген сохраняется в плазме крови на протяжении нескольких лет независимо от температуры хранения. В контрольных образцах идентифицирован антиген на всех этапах хранения при температуре от 4° до -196°C .

При постановке опытных исследований мы предполагали, что 20%-ный раствор ПЭО-1500 не оказывает угнетающего воздействия ни на НВ-антиген, ни на антитела к НВ-антигену, поскольку в опытных образцах плазмы, соотношенной к 20%-ному раствору ПЭО-1500 как 1 : 1, НВ-антиген и антитела к нему выявлялись при -196°C и 4°C независимо от сроков хранения.

При исследовании эритроцитной массы, позитивной по НВ-антигену, соотношенной с 20%-ным раствором ПЭО-1500 как 1 : 1, выявление НВ-антигена находилось в зависимости от его титра.

При низких титрах последнего в плазме (1 : 1, 1 : 2) в супернатанте эритроцитарной взвеси НВ-антиген методом ВИЭОФ практически не идентифицировался или давал сомнительный результат независимо от температуры и сроков хранения. Полученные нами данные являются предварительными и находятся в стадии разработки.

Парентеральное применение препаратов, содержащих криопротекторы, предъявляет к ним определенные требования. В первую очередь,

крипротекторы должны обладать высокой криозащитной активностью, с тем чтобы в размороженном материале содержалось минимальное количество экзоцеллюлярного гемоглобина и других субстанций, образующихся при повреждении клеток, что оказывает побочное воздействие на организм реципиента. Кроме того, крипротекторы, содержащиеся в трансфузионной среде, должны быть малотоксичными. Эти вопросы требуют специальных токсико-фармакологических исследований.

Знание некоторых физико-химических свойств крипротекторов (вязкости, величины поверхностного натяжения, осмотического давления, способности вызывать агломерацию клеток и др.) дает основание предположить возможность влияния их на реологические свойства крови. Последние могут изменяться от присутствия субтоксичных и даже нетоксичных доз препарата. Влияние крипротекторов на реологические свойства крови изучается нами в настоящее время. Результаты первых опытов показали, что ПЭО оказывают влияние на текучесть крови. Причем этот эффект зависит от молекулярного веса ПЭО и концентрации в клеточной суспензии.

Таким образом, ПЭО, представляющие собой ряд полидисперсных полимеров среднего молекулярного веса 100—4000—6000, обеспечивают высокую сохранность эритроцитов в процессе замораживания и могут найти применение в низкотемпературном консервировании клеток для переливания.

В ряду ПЭО имеются крипротекторы эндо- и экзоцеллюлярного действия. Оценка действия этих веществ на эритроциты по комплексу показателей устанавливает преимущество ПЭО молекулярного веса порядка 1500 и обосновывает применение его в качестве крипротектора эритроцитов в банках крови. ПЭО-1500 обеспечивает сохранность до 99,1 % клеток.

Установлены условия, обеспечивающие оптимальные результаты криоконсервирования малых объемов клеточного материала в лабораторных опытах и объемов, используемых в банках. Показана сохранность эритроцитов, замороженных в криозащитных растворах ПЭО. Рассмотрены некоторые вопросы, связанные с применением крипротекторов, не требующих отмывания размороженных клеток, и с парентеральным введением их: опасности бактериального загрязнения, переноса инфекции, возможного влияния нетоксических доз на организм реципиента и т. д. Перечисленные проблемы находятся на ранних стадиях изучения, требуют выяснения в связи с внедрением разрабатываемых методов в работу банков замороженной крови.

В ряду крипротекторов, не обладающих специальным терапевтическим действием, весьма актуальны исследования, направленные на повышение криозащитной эффективности с помощью изменения режимов охлаждения, отогрева, включения в криоконсервант дополнительных нетоксичных компонентов и других воздействий. Ввиду перспективности разработок крипротекторов, которые не требуют отмывания клеток, указанные вопросы заслуживают дальнейшего изучения.

И наконец, требуют изучения морфо-функциональный статус клеток после низкотемпературного консервирования и возможности их дальнейшего хранения. Следует стремиться к тому, чтобы эритроциты не только обладали исходным объемом жизнедеятельности, но могли восстановить его в случае повреждения. Таким образом, возникает проблема репарации, или реабилитации, клеток, перенесших замораживание—оттаивание.

Таковы перспективные направления в дальнейшем развитии проблемы низкотемпературного консервирования эритроцитов с крипротекторами, не требующими отмывания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Виноград-Финкель Ф. Р., Гинзбург Ф. Г., Федорова Л. И. и др. Криоконсервирование эритроцитов и их функциональная полноценность (хранение в жидком азоте до 7 лет). — Проблемы гематологии, 1973, № 9, с. 3—11.
2. Виноград-Финкель Ф. Р., Крутиков В. А., Тальская И. Н., Коралюк К. И. Применение поливинилпирролидона при ультрабыстром замораживании цельной крови и эритроцитной массы и рациональные пути использования их для трансфузий в клинике. — Проблемы гематологии, 1969, № 1, с. 41—48.
3. Луганова И. С., Блинов М. Н. Определение 2,3-дифосфоглицериновой кислоты не-энзиматическим методом и содержание 2,3-дифосфоглицерата и АТФ в эритроцитах больных хроническим лимфолейкозом. — Лаб. дело, 1975, № 11, с. 652—655.
4. Рождественская М. А. Определение гемоглобина в плазме консервированной крови. — Актуальные вопр. переливания крови, 1955, № 4, с. 55—57.
5. Doeblner G. F., Sakaida R. R., Cawley C. W., Rinfret A. P. Cryogenic preservation of whole blood for transfusion. In vitro study of a process using rapid freezing and protection by polyvinylpyrrolidone. — Transfusion, 1966, 6, N 2, p. 37—44.
6. Hantsman R. G., Itkin E. W., Hurn B. A. Blood groups and enzymes of human red cells after a year's storage in liquid nitrogen. — Brit. Med. J., 1962, N 11, p. 1508—1514.
7. Valeri C. R. Blood banking and the use of frozen blood products. CRS Press, 1976, 360 p.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
22.XII 1976 г.

УДК 57:536.48.047

А. Н. Гольцев

ВЛИЯНИЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ НАТИВНОГО И ДЕКОНСЕРВИРОВАННОГО КОСТНОГО МОЗГА НА СОДЕРЖАНИЕ БЛЯШКООБРАЗУЮЩИХ КЛЕТОК В СЕЛЕЗЕНКАХ ЛЕТАЛЬНО ОБЛУЧЕННЫХ РЕЦИПИЕНТОВ

Целью настоящего исследования было сравнительное изучение динамики накопления бляшкообразующих клеток (БОК) в селезенках летально облученных реципиентов, защищенных нативным (группа А) и деконсервированным (группа Д) костным мозгом. В опытах с трансплантацией летально облученным реципиентам нативных (группа С) и деконсервированных (группа Т) миелокариоцитов совместно с сингенными тимоцитами была оценена способность клеток костного мозга участвовать в кооперативных процессах на этапах развития иммунного ответа к эритроцитам барана (БЭ).

Контролем служили облученные мыши, не защищенные костным мозгом, а также иммунизированные нормальные мыши. В опытных группах реципиентов иммунизировали в день трансплантации костного мозга, а также на 7; 15; 21; 25; 30; 40 и 60-е сутки после трансплантации. Реципиентам групп С и Т тимоциты были введены в дни иммунизации животных. Учет содержания БОК в селезенках реципиентов всех групп проводили на 8-е сутки после иммунизации.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что большинство облученных мышей линии (CBA×C57BL)_{F₁} погибли в течение 1—2-х недель после облучения, если им не вводили миелокариоциты. При иммунизации таких мышей сразу после облучения в селезенках выживших к 8-м суткам животных определялось лишь незначительное число БОК ($12 \pm 2,2$).

В селезенках мышей групп А и Д число БОК было больше, чем в селезенках облученных контрольных животных, однако данный показатель был достоверно ниже во все сроки, чем таковой у нормальных иммунизированных мышей. Кроме того, у реципиентов групп А и Д

наблюдалось удлинение промежутка времени от момента введения мие-локариоцитов до начала интенсивного накопления БОК.

Так, при иммунизации защищенных реципиентов сразу после трансплантации нативного и деконсервированного костного мозга количество БОК равнялось $29,4 \pm 4,2$ и $23,9 \pm 3,5$. В тех случаях, когда животных иммунизировали спустя 7 дней после трансплантации, число БОК составляло $56,2 \pm 7,1$ и $40,6 \pm 2,1$.

Начиная с 7-х и по 21-е сутки наблюдалось быстрое увеличение количества БОК у животных групп А и Д. Однако если у мышей группы А число БОК при иммунизации на 15-е сутки увеличивалось почти в 12 раз по сравнению с 7-ми, то в группе Д — только в 5 раз ($56,2 \pm 7,1$ и $674 \pm 78,4$; $40,6 \pm 2,1$ и $208 \pm 18,6$ соответственно). Эти результаты можно объяснить, по всей видимости, тем, что после деконсервирования ингибировалась активность течения всех клеточных реакций иммунитета на разных стадиях его становления.

Необходимо отметить, что при иммунизации реципиентов обеих опытных групп на 15-е сутки после имплантации миелокариоцитов различия в количественном содержании БОК были наиболее выраженными и только в этот срок носили достоверный характер ($674 \pm 78,4$ и $208 \pm 18,6$; $p < 0,001$). При иммунизации во все последующие сроки наблюдения показатели содержания БОК в селезенках реципиентов обеих групп не имели достоверных различий.

В то же время необходимо отметить, что хотя при иммунизации в период с 7-х по 21-е сутки число БОК в селезенках реципиентов групп А и Д увеличилось в 42 раза, абсолютное их содержание к 21-м суткам составляло только 9,5% уровня содержания БОК в селезенках нормальных иммунизированных мышей (20640 ± 1797).

В течение 4-й недели после трансплантации нативной и деконсервированной миелоидной ткани число БОК в селезенках реципиентов обеих групп продолжало увеличиваться. Время удвоения их количества составляло в среднем 4—5 дней, и уже к концу месяца уровень их достигал 50% уровня содержания БОК в селезенках нормальных иммунизированных мышей.

С этого времени скорость накопления БОК у животных опытных групп начинала несколько снижаться, а время их удвоения возрастало до 4-х недель. Так, при иммунизации на 40-е сутки число БОК у реципиентов обеих групп составляло только 57% их содержания у иммунизированных необлученных животных, а спустя 2 месяца после трансплантации костного мозга число их не превышало 73% (20640 ± 1247 и 15000 ± 2000 ; $p < 0,05$).

При изучении способности клеток костного мозга участвовать в кооперативных процессах с сингенными тимоцитами были получены такие результаты. Иммунизация облученных мышей, которым были введены только клетки тимуса, не вызывала достоверного увеличения числа БОК в селезенках по сравнению с их содержанием у облученных иммунизированных мышей ($17,6 \pm 2,1$ и $12,8 \pm 2,7$; $p > 0,5$). Однако когда тимоциты были введены облученным и защищенным костным мозгом мышам, значительное число БОК при иммунизации БЭ определялось в более ранние сроки, чем у реципиентов, которым был введен костный мозг *per se*.

Так, у реципиентов группы С, иммунизированных в день трансплантации нативного костного мозга, число БОК было в 7,9 раза выше по сравнению с аналогичным показателем у защищенных мышей, которым тимоциты не вводили ($231,7 \pm 58,4$ и $29,4 \pm 4,2$; $p < 0,001$).

Сходные результаты были получены у животных групп Т в указанный срок наблюдения, однако количество БОК в данном случае было достоверно ниже, чем таковое в селезенках реципиентов группы С ($99,6 \pm 13,6$ и $231,7 \pm 58,4$; $p < 0,05$).

Наиболее выраженный эффект стимуляции в отношении накопления БОК под влиянием тимоцитов отмечался при иммунизации животных на 7-е сутки после трансплантации миелокариоцитов. В данном случае число БОК увеличивалось в 19,6 раза в селезенках реципиентов группы С и в 17,7 раза в селезенках реципиентов группы Т по сравнению с их содержанием в селезенках мышей, защищенных нативным и деконсервированным костным мозгом *per se* (56,2 : 1107,7 и 40,6 : 718,6; $p < 0,001$ в обоих случаях). Начиная с 7-х суток и во все последующие сроки наблюдения показатели содержания БОК в селезенках реципиентов группы Т не имели достоверных различий по сравнению с такими же показателями в группе С.

При иммунизации мышей на 15-е сутки после трансплантации костного мозга и тимоцитов эффект ускорения накопления БОК в селезенках еще сохранялся, однако уже с 21-х суток отмечалась выраженная тенденция к его ослаблению, а начиная с 25-х суток и в дальнейшем в течение всего времени наблюдения абсолютные показатели содержания БОК в селезенках реципиентов с трансплантатом костного мозга и тимоцитов не отличались от таковых в группе иммунизированных мышей, защищенных костным мозгом *per se*.

Таким образом, представленные результаты свидетельствуют о том, что трансплантация сингенного нативного и деконсервированного костного мозга способствует восстановлению иммунного ответа к БЭ у летально облученных реципиентов. Однако это восстановление не является полным в течение длительного времени; даже через два месяца после трансплантации костного мозга число БОК в селезенках реципиентов обеих групп составляло только 73% уровня их содержания в селезенках необлученных животных.

Наряду с этим в селезенках иммунизированных мышей группы Д на определенных этапах посттрансплантационного периода (с 7-х по 15-е сутки) отмечалось запаздывание накопления БОК по сравнению с аналогичным процессом в селезенках мышей группы А.

Введение с костным мозгом сингенных тимоцитов ускоряло процесс накопления БОК в селезенках реципиентов, защищенных не только нативным, но и деконсервированным костным мозгом; проявление эффекта было ограничено ранними сроками посттрансплантационного периода.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
22. XII 1976 г.

УДК 57:536.48.047:612.112.94:615.014.41:536.48

А. А. Цуцаева, Н. Н. Попов, Т. Н. Воскобойникова

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО КОНСЕРВИРОВАНИЯ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ТИМОЦИТОВ

В настоящее время лимфоидная ткань находит все более широкое применение при лечении иммунодефицитных состояний различного генеза. Однако она еще ограничено используется в практике по ряду причин, в том числе из-за отсутствия оптимальных способов ее консервирования.

Большое количество работ посвящено разработке методов низкотемпературного консервирования лимфоцитов. Полученные при замораживании лимфоцитов крови данные свидетельствуют либо о полном сохранении клетками функциональной активности, либо о частичном

ее снижении [1—3]. Исследований, посвященных изучению влияния низких температур и криопротекторов на иммунобиологические свойства тканевых лимфоцитов, чрезвычайно мало.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния низкотемпературного консервирования на функциональную активность тимоцитов. О свойствах тимоцитов и их активности после деконсервирования судили по их способности взаимодействовать с клетками костного мозга. Клетки получали из тимусов мышей (CBA×C57BL)F₁, замораживали их до —196° С по разработанной нами программе под защитой ПЭО-400 в 10%-ной концентрации. Деконсервировали при температуре 41° С.

Изучение влияния трансплантации деконсервированных тимоцитов на содержание эндо- и экзогенных колоний проводилось на мышах линии (CBA×C57BL)F₁. С этой целью мышам, облученным в дозе 650 Р, через 6—8 ч вводили 5·10⁵ или 1·10⁸ деконсервированных клеток тимуса. На 9-е сутки методом Тилла и Мак-Каллаха определяли количество гемопоэтических колоний в селезенках. Контролем служили животные, которым тимоциты не вводились, а также животные, которым вводились нативные и убитые замораживанием—оттаиванием тимоциты.

Влияние деконсервированных тимоцитов на репопуляционную активность деконсервированных миелокариоцитов изучали в следующей постановке опытов: мышам, облученным дозой 850 Р, через 6—8 ч вводили 2·10⁵ деконсервированных миелокариоцитов и 5·10⁷ или 1·10⁸ деконсервированных сингенных клеток тимуса. Количество гемопоэтических колоний в селезенках облученных животных определяли по методу Тилла и Мак-Каллаха на 9-е сутки с момента трансплантации клеток. В контрольной группе были животные, которым трансплантировали деконсервированные миелокариоциты *per se*, а также сочетанно с нативными клетками тимуса и с тимоцитами, убитыми замораживанием—оттаиванием.

Влияние трансплантации деконсервированных тимоцитов на формирование гемолизинпродуцирующих клеток в селезенках летально облученных реципиентов, защищенных клетками костного мозга, изучали в следующей постановке опытов: мышам линии (CBA×C57BL)F₁, облученным в дозе 850 Р, трансплантировали 5·10⁶ клеток костного мозга и 5·10⁷ деконсервированных тимоцитов (сингенная система) и иммунизировали взвесью эритроцитов барана (0,5 мл 5%-ной взвеси, в/б). Количество плакообразующих единиц определяли в селезенках методом Ерне на 10-е сутки после облучения.

Влияние тимоцитов на формирование деконсервированными миелокариоцитами экзогенных колоний в селезенках летально облученных мышей

Трансплантируемые клетки			Количество экзоколоний на 9-е сутки	Относительный вес селезенки
деконсервированные клетки костного мозга	нативные тимоциты	деконсервированные тимоциты		
2·10 ⁵	—	—	3,0±0,8	1,09
2·10 ⁵	5·10 ⁵	—	6,4±1,2	3,00
2·10 ⁵	1·10 ⁸	—	10,7±0,9	2,96
2·10 ⁵	—	5·10 ⁵	5,8±0,7	2,53
2·10 ⁵	—	1·10 ⁸	8,8±0,9	2,98

Жизнеспособность тимоцитов после замораживания до температуры —196° С под защитой ПЭО-400 в наших опытах составила 43%.

Трансплантация деконсервированных тимоцитов сублетально облученным животным приводила к достоверному увеличению количества гемопоэтических колоний в селезенках и увеличению их веса по сравнению с животными, которым клетки не трансплантировались.

Трансплантация $5 \cdot 10^5$ деконсервированных клеток через 6—8 ч с момента облучения повышала количество эндогенных колоний в 1,7—1,8 раза, трансплантация $1 \cdot 10^8$ деконсервированных клеток — в 2,2—2,8 раза; введение нативных тимоцитов в дозе $5 \cdot 10^5$ увеличивало количество гемопоэтических колоний в 1,9—2,1 раза, в дозе $1 \cdot 10^8$ — в 2,6—3,0 раза. Введение тимоцитов, убитых замораживанием—оттаиванием, не оказывало влияния на колониеобразование в селезенках, и изученные показатели не отличались от таковых у животных, которым клетки не трансплантировались. Относительный вес селезенки у животных, которым вводили деконсервированные и нативные тимоциты, достоверно не различался и составлял 2,52—2,96; у животных, которым тимоциты не трансплантировали, этот показатель был равен 1,83—1,90.

Деконсервированные тимоциты также оказывали стимулирующее действие на пролиферативную активность деконсервированных клеток костного мозга, о чем свидетельствовало увеличение количества экзогенных колоний и веса селезенки у животных, которым были введены указанные сочетания клеток, по сравнению с аналогичными показателями, полученными при трансплантации облученным животным деконсервированных клеток костного мозга *per se* (см. таблицу). Однако у деконсервированных тимоцитов способность стимулировать репулационную активность миелокариоцитов была снижена по сравнению с этой способностью нативных тимоцитов. Деконсервированные тимоциты в дозе $1 \cdot 10^8$ более интенсивно стимулировали пролиферативную активность деконсервированных миелокариоцитов, чем в дозе $5 \cdot 10^5$ клеток. Причем этот эффект, оказываемый деконсервированными тимоцитами в дозе $1 \cdot 10^8$ клеток, был несколько выше эффекта, оказываемого нативными клетками в дозе $5 \cdot 10^5$. При этом изменения веса селезенки у животных в зависимости от дозы трансплантируемых тимоцитов не наблюдалось. Трансплантация тимоцитов, убитых замораживанием—оттаиванием, не оказывала влияния на процессы колониеобразования деконсервированными клетками костного мозга. Во всех вариантах этой серии экспериментов содержание колоний и вес селезенки у животных, которым вводили деконсервированные миелокариоциты сочетанно с нативными или деконсервированными тимоцитами, приближались к таковым в группе животных, которым вводили нативные миелокариоциты *per se*, но ни в одном случае не превышали их.

Способность тимоцитов после замораживания участвовать в кооперативных реакциях с миелокариоцитами в индукции иммунитета оценивали по количеству плакообразующих единиц в селезенках латентно облученных реципиентов после введения клеток костного мозга и тимуса. Сочетанная трансплантация миелокариоцитов с деконсервированными тимоцитами приводила к 10-кратному увеличению количества плакообразующих клеток в селезенках по сравнению с данными, полученными при трансплантации костного мозга *per se*. Добавление нативных тимоцитов к трансплантату миелокариоцитов способствовало увеличению количества гемолизинпродуцирующих клеток в 12 раз. Таким образом, функциональная активность деконсервированных тимоцитов, реализуемая в этой реакции, выражена в меньшей степени, чем нативных.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что тимоциты после криоконсервирования сохраняют иммунобиологические свойства, однако интенсивность реакций, реализуемых ими, снижается. Это может быть объяснено либо гибелью части клеток, либо ингибцией активности течения обменных процессов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gross R. L., Levin A. G., Peers F. G. e. a. Spontaneous rosette and rosette inhibition tests on fresh and cryopreserved lymphocytes. — *Cryobiology*, 1975, 12, N 5, p. 455—462.

2. Nathan P. Freeze-thaw-refreeze cycle to prepare lymphocytes for HLA antibody detection or tissue typing. — Cryobiology, 1974, 11, N 4, p. 305—311.
3. Pegg D. J. The preservation of leucocytes for cytogenetic and cytochemical studies. — Brit. J. Haematol., 1965, N 11, p. 586—593.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
22. XII 1976 г.

УДК 57:536 48.047:612.112.94:615.014.41:536.48

А. А. Цуцаева, Н. Н. Попов, Т. Н. Воскобойникова

ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР И КРИОПРОТЕКТОРА ПЭО-400 НА МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА КЛЕТОК ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ

Целью настоящего исследования явилось дальнейшее изучение влияния низких температур и криопротектора ПЭО-400 на иммунобиологические свойства тканевых лимфоцитов. В данной работе изучались морфо-функциональные свойства клеток лимфатических узлов, подвергнутых низкотемпературному консервированию.

О функциональной активности деконсервированных клеток лимфатических узлов судили по их способности к адаптивному переносу трансплантационного иммунитета, killing effect in vitro, ингибции эндоколонизации селезенки. Клеточный состав и структуру клеток до и после замораживания изучали в мазках, приготовленных из клеточных суспензий и окрашенных по Гимза. Лимфоциты получали из лимфатических узлов intactных и иммунных мышей линии СВА трехмесячного возраста весом 18—21 г. Клетки замораживали по разработанной нами программе до -196°C под защитой криопротектора ПЭО-400.

Адаптивный перенос трансплантационного иммунитета осуществляли в сингенной системе клетками региональных лимфатических узлов, полученных спустя 14 суток с момента трансплантации кожных лоскутов мышей линии BALB. Облученным 850 Р мышам линии СВА через 6—8 ч трансплантировали $30 \cdot 10^6$ примированных клеток лимфатических узлов и $5 \cdot 10^6$ intactных клеток костного мозга. Тест-трансплантат пересаживали в тот же день. Считали его отторгнутым, если вся или почти вся его поверхность была некротизирована. Цитотоксическую активность клеток лимфатических узлов определяли в опытах in vitro. Об интенсивности реакции судили по степени освобождения ^{51}Cr из клеток-мишеней методом Цероттини [1]. Клетками-мишенями служили эпидермальные клетки хвостов мышей линии BALB, полученные по методу Шейд и др. [2]. Примированные лимфоциты получали на 9—11-е сутки после трансплантации кожных лоскутов. Результаты экспериментов выражали в процентах: [(освобождение в присутствии иммунных лимфоцитов — спонтанное освобождение) : (максимальное освобождение — спонтанное освобождение)] $\cdot 100\%$.

Способность клеток лимфатических узлов ингибировать процессы эндоколонизации оценивали по количеству макроскопических колоний, подсчитываемых в селезенках мышей линии (СВА $\times$ С57BL) F_1 спустя 9 дней с момента облучения дозой 550 Р и последующей трансплантации клеток лимфатических узлов мышей линии СВА в дозе $0,5 \cdot 10^6$, $2 \cdot 10^6$ клеток.

Количество жизнеспособных клеток в деконсервированных образцах по трипановому синему составило 46%. В клеточном составе суспензий лимфатических узлов отмечалось нарастание процента малых лимфоцитов за счет снижения содержания средних и больших лимфо-

цитов, а также лимфобластов (табл. 1). Морфологически лимфоциты после деконсервирования не отличались от интактных, однако в мазках встречались единичные клетки с поврежденной цитоплазмой.

Таблица 1

Клеточный состав суспензий лимфатических узлов до и после низкотемпературного консервирования

Тип клеток	Процент лимфоидных клеток				p*
	до замораживания		после замораживания		
	$\bar{x}$	$\pm Sx$	$\bar{x}$	$\pm Sx$	
Лимфоциты:					
малые	44,33	2,08	55,16	1,64	<0,001
средние	46,01	2,15	37,50	2,81	<0,005
большие	10,33	1,08	5,50	0,97	<0,010
Лимфобласты	6,66	0,61	2,33	0,34	<0,001
Плазматические клетки	0,83	1,86	0,11	0,14	—

* p — степень достоверности различий между клеточным составом до и после низкотемпературного консервирования.

Результаты экспериментов по изучению свойств деконсервированных иммунных лимфоцитов свидетельствуют о том, что иммунные потенции их после деконсервирования не изменяются. При введении деконсервированных примированных клеток облученным реципиентам отмечалось отторжение кожных лоскутов в те же сроки (на 9—11-е сутки), что и у животных, которым вводили иммунные лимфоциты, не подвергавшиеся замораживанию. Однако в трансплантатах кожи мышей при введении деконсервированных лимфоцитов отмечались более обширные геморрагии. Не было выявлено также достоверных различий в скорости развития иммунных реакций и времени отторжения аллотрансплантатов кожи у мышей, которым вводились как нативные, так и деконсервированные интактные лимфоциты. Трансплантаты у животных этих групп отторгались на 17—18-е сутки. У животных, которым имплантировали лишь клетки костного мозга, в эти сроки не отмечалось гибели аллотрансплантатов.

Таблица 2

Освобождение ^{51}Cr из эпидермальных клеток-мишеней мышей BALB под влиянием криоконсервированных примированных клеток лимфатических узлов мышей линии СВА, %

Цитотоксическая активность иммунных лимфоцитов после замораживания определялась в опытах *in vitro*. Соотношение аденоцитов с клетками-мишенями в экспериментах составило 200 : 1; 100 : 1; 50 : 1. Было установлено, что деконсервированные клетки лимфатических узлов сохраняют цитотоксические свойства, причем достоверных различий в интенсивности этой реакции, реализуемой как нативными, так и деконсервированными клетками, не было выявлено (табл. 2).

При изучении способности деконсервированных клеток лимфатических узлов ингибировать активность течения процессов эндоколонизации было установлено, что трансплантация деконсервированных лимфоцитов в дозе $0,5 \cdot 10^6$ клеток снижает количество эндогенных колоний на 26%, тогда как введение эквивалентной дозы нативных клеток вы-

Эффекториме клетки	Соотношение клеток-мишеней и лимфоцитов в цитотоксической реакции		
	1:200	1:100	1:50
Криоконсервированные лимфоциты	61,3	40,0	22,7
Нативные лимфоциты	65,5	40,7	22,3

зывает ингибицию эндоколоний на 41%. С увеличением количества трансплантируемых лимфоцитов до $2 \cdot 10^6$ клеток эти различия нивелировались, в результате чего в обоих случаях количество гемопоэтических колоний снижалось соответственно на 80 и 84%.

Таким образом, данные, полученные при изучении свойств клеток лимфатических узлов после низкотемпературного консервирования, свидетельствуют о сохранении деконсервированными клетками изученных функциональных свойств, присущих нативным клеткам. Относительное увеличение количества малых лимфоцитов за счет снижения количества больших и средних, а также бластов в образцах после низкотемпературного консервирования свидетельствует о более высокой криорезистентности малых лимфоцитов по сравнению с клетками, находящимися на различных стадиях клеточной дифференцировки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cerottini J. C., Brunner K. T. In vitro assay of target cell lysis by sensitized lymphocytes. — In: In vitro methods in cell mediated immunity. New York—London, 1971, p. 369—372.
2. Sheid Margrit, Boyse Edward A., Carswell Elizabeth A., Old Lloyd L. Serologically demonstrable alloantigens of mouse epidermal cells. — J. Exy. Med., 1972, 135, N 4, p. 935—955.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
22. XII 1976 г.

УДК 57:536.48.047:612.112.94:615.014.41:536.48

Т. Н. Воскобойникова, Е. А. Гордиенко

ВЛИЯНИЕ РЕЖИМОВ ЗАМОРАЖИВАНИЯ НА НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ СОХРАННОСТИ ТКАНЕВЫХ ЛИМФОЦИТОВ

Результаты ранее проведенных исследований [4] свидетельствуют о более высокой криолабильности тканевых лимфоцитов по сравнению с лимфоцитами периферической крови. Учитывая это, целью настоящей работы явилось изучение влияния различных скоростей охлаждения и криопротекторов группы полиэтиленоксида (ПЭО-100 и ПЭО-400) в 10%-ной концентрации на некоторые морфо-функциональные свойства тканевых лимфоцитов плодов человека. Объектом исследования были клетки тимуса и селезенки 3—6-месячных плодов человека. Исходная жизнеспособность клеток тимуса составляла 92—98%, кле-

Показатели жизнеспособности тканевых лимфоцитов

Программа замораживания	Используемый криопротектор	Спленоциты	
		Жизнеспособность, %	Количество ядродержащих клеток в $1 \text{ мл} \cdot 10^7$
№ 1	ПЭО-100	$61,08 \pm 2,88$	$(0,98 \pm 0,016)$
	ПЭО-400	$52,02 \pm 3,94$	$(0,098 \pm 0,013)$
№ 2	ПЭО-100	$52,11 \pm 2,80$	0,98
	ПЭО-400	$47,94 \pm 4,03$	0,98
№ 3	ПЭО-100	$24,40 \pm 2,18$	$(0,96 \pm 0,014)$
	ПЭО-400	$10,92 \pm 4,06$	$(0,97 \pm 0,010)$
№ 4	ПЭО-100	$92,31 \pm 2,01$	$(0,99 \pm 0,015)$
	ПЭО-400	$56,38 \pm 3,12$	0,98

- * При культивировании с ФГА нативные спленоциты образовывали $40,01 \pm 2,83$ бластов.
 ** При культивировании с ФГА нативные тимоциты образовывали $15,02 \pm 0,83$ бластов.

ток селезенки — 94—99, а количество ядросодержащих клеток в пробах, приготовленных для низкотемпературного консервирования, — $1,0 \cdot 10^7$ клеток/мл.

Изучалось влияние следующих режимов замораживания: № 1 — от 15 до -30°C , со скоростью $1-3^\circ\text{C}/1$ мин и от -30 до -196°C со скоростью 400°C в 1 мин; № 2 — от 15 до -30°C со скоростью $5^\circ\text{C}/1$ мин и от -30 до -196°C со скоростью $400^\circ\text{C}/1$ мин; № 3 — от 15 до -30°C со скоростью $10^\circ\text{C}/1$ мин и от -30 до -196°C со скоростью $400^\circ\text{C}/1$ мин.

С целью возможного повышения процента жизнеспособных клеток после низкотемпературного консервирования на одном из этапов замораживания была опробована «холодовая адаптация», предложенная Фаррантом с сотрудниками и использованная ими при замораживании эритроцитов и лимфоцитов периферической крови человека. Программа замораживания № 4 включала этап «холодовой адаптации» после охлаждения клеток до -28°C . Режим замораживания № 4 заключался в охлаждении клеток от температуры 15 до -5°C со скоростью 45°C в 1 мин и от температуры -5 до -28°C со скоростью 3°C в 1 мин, после чего следовала «холодовая адаптация» в течение 20 мин, затем образцы переносили в жидкий азот.

Образцы оттаивали на водяной бане при температуре 41°C . Отмывку от криопротектора осуществляли путем медленного добавления раствора ХЭНКС, содержащего 50% инактивированной человеческой сыворотки группы В(II) с последующим центрифугированием и удалением надосадочной жидкости.

Защитный эффект криопротекторов и пригодность программы замораживания оценивали по следующим тестам: по количеству ядросодержащих клеток в единице объема; по проценту жизнеспособных клеток, определенных по методу с применением суправитального красителя — трипанового синего; изучали клеточный спектр лимфограмм и морфологию клеток в мазках, приготовленных из деконсервированных суспензий и окрашенных азур II-эозином; исследовалась также способность деконсервированных лимфоцитов к трансформации в присутствии ФГА.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что различные режимы охлаждения существенно не влияют на изменение количества ядросодержащих клеток в образцах (см. таблицу).

При замораживании лимфоцитов по примененным двухэтапным программам охлаждения было установлено, что жизнеспособность клеток уменьшается с увеличением скорости охлаждения на I этапе замораживания.

после замораживания по различным программам

Лимфоциты			
Количество бластов на 100 просчитанных клеток*	Жизнеспособность, %	Количество ядросодержащих клеток в 1 мл, $\cdot 10^7$	Количество бластов на 100 просчитанных клеток**
$2,01 \pm 1,00$	$62,11 \pm 2,81$	0,99	$2,21 \pm 1,18$
—	$51,08 \pm 4,03$	0,98	—
—	$56,26 \pm 1,93$	($0,98 \pm 0,018$)	—
—	$49,19 \pm 2,16$	0,97	—
—	$21,08 \pm 3,12$	($0,96 \pm 0,015$)	—
—	$15,18 \pm 3,02$	($0,96 \pm 0,02$)	—
$35,06 \pm 2,11$	$90,03 \pm 2,02$	1,0	$11,00 \pm 2,00$
$5,03 \pm 1,13$	$52,18 \pm 1,09$	0,97	$3,12 \pm 2,14$

При сравнении ограждающего эффекта ПЭО-400 и ПЭО-100 последний обладал более выраженным криопротекторным действием при замораживании тканевых лимфоцитов. В присутствии ПЭО-100 в образцах, замороженных по программе № 4 с применением «холодовой адаптации», количество жизнеспособных клеток после деконсервации и отмывки от криопротектора максимально и составляет 90—92%.

Учет лимфограмм деконсервированных и отмытых от криопротектора клеточных суспензий позволил судить о морфологической сохранности различных групп клеток, составляющих лимфоидный пул. Так, при замораживании образцов по программе № 3 в мазках обнаруживались лишь малые лимфоциты и большое количество разрушенных и деформированных клеток, которые невозможно было дифференцировать. В мазках, приготовленных из лимфоцитов, замороженных по программам № 1, 2, 4, сохранившиеся клетки морфологически не отличались от нативных. Следует отметить, что с увеличением скорости охлаждения на I этапе замораживания при использовании двухэтапных программ замораживания отмечалось увеличение количества поврежденных клеток.

При увеличении скорости охлаждения (более 3° С в 1 мин) на первом этапе замораживания отмечалось перераспределение клеточных форм в лимфограммах — увеличивалось число малых и средних лимфоцитов и уменьшалось количество молодых форм — ретикулярных клеток, лимфобластов, переходных клеток.

Трансформирующая способность лимфоцитов сохранялась только при замораживании под защитой ПЭО-100 по программам № 1 и 4. Наибольшее количество бластных форм наблюдалось в тех образцах, которые замораживали под защитой ПЭО-100 по программе замораживания № 4 (см. таблицу).

Таким образом, результаты проведенных морфо-функциональных исследований деконсервированных тканевых лимфоцитов плодов человека показали большую сохранность клеток при замораживании, включающем применение быстрых скоростей охлаждения на начальных этапах криоконсервирования и «холодовую адаптацию».

ЛИТЕРАТУРА

1. Арсеньева М. А., Порошенко Г. Г. Культуры лейкоцитов периферической крови человека в гематологии и радиологии. М., «Наука», 1974. 214 с.
2. Лаврик С. С., Зверкова А. С., Афанасьева Е. Ю. Консервирование клеток селезенки поливинилпирролидоном методом глубокого замораживания. — Врачебное дело, 1971, № 2, с. 9—13.
3. Leibo S. P., Mazur P. The role of cooling rates in low temperature preservation. — Cryobiology, 1971, 6, N 8, p. 447—456.
4. Stopford C. R., Mac Queen J. M., Amos D. B., Ward F. E. Some variations in lymphocyte freezing method which do not affect cell viability. — Tissue Antigens, 1972, N 2, p. 20—28.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редакцию
22. XII 1976 г.

УДК 57:536.48.047:612.112.541.49:536.48

С. Д. Корчиков, А. М. Воротилин, Е. А. Гордиенко

ЗАМОРАЖИВАНИЕ ЭРИТРОЦИТОВ В ПРИСУТСТВИИ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ КРИОПРОТЕКТОРОВ

В работе [1] найдена оценка эквивалентного пересыщению клетки переохлаждения протоплазмы при замораживании суспензии с постоянной скоростью $\dot{T}$. Очевидно,

$$\delta T = \dot{T} \tau_1 (e^{-t/\tau_1} - 1), \quad (1)$$

где δT — искомое переохлаждение; τ_1 — усредненное по интервалу кристаллизации τ_1 (характерное время обезвоживания клеток). Если продолжительность кристаллизации в данной точке $\delta t_{кр} \gg \tau_1$, то переохлаждение внутриклеточного раствора достигает значения $\bar{T}\tau_1$. Поскольку движущей силой процесса обезвоживания является переохлаждение протоплазмы, существует оптимальная скорость охлаждения, при которой последнее в клетке достаточно мало, так что внутриклеточные кристаллы не образуются, а повреждающее воздействие, связанное с обезвоживанием клетки, не успевает проявляться.

Пусть δT_{max} — максимально допустимое переохлаждение внутриклеточного раствора, при котором все еще не наступает внутриклеточное кристаллообразование. Тогда для исключения внутриклеточной кристаллизации, согласно [1], необходимо, чтобы

$$\delta T_{max} \gg \delta T = \bar{T}.$$

Оптимальной скоростью охлаждения, очевидно, будет

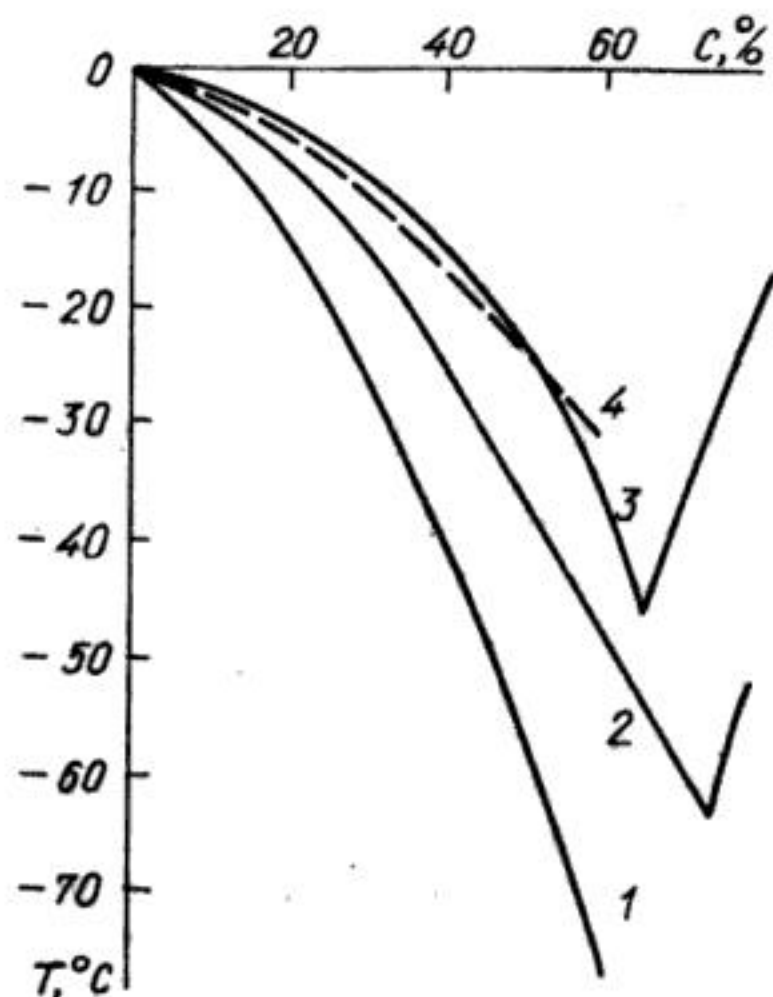
$$\dot{T}_{opt} \sim \frac{1}{\tau_1}.$$

Для эритроцита $\tau_1 \sim \frac{a^2}{D}$ [2], поскольку перераспределение воды между клеткой и окружающей ее средой лимитируется диффузией воды по объему клетки, т. е. при $D_1 = 10^{-5} \frac{cm^2}{c}$ $a \sim 10^{-3}$ см T_{opt} (порядка десятков градусов в 1 мин).

Движущая сила процесса обезвоживания — разность химических потенциалов воды по обе стороны мембраны. Выравнивание этих значений происходит двояко: за счет изменения давления и за счет изменения концентрации внутри клетки. Ввиду слабой зависимости химического потенциала от давления решающую роль в выравнивании играет изменение концентрации. Если бы в раствор была помещена «клетка», наполненная чистой водой, она бы практически полностью потеряла воду, поскольку химический потенциал чистой воды не может заметно меняться и стать равным химическому потенциалу внутриклеточного раствора только за счет избыточного давления, создаваемого при деформации клеточной мембраны. Напротив, если в гипертонический раствор попадает клетка, содержащая достаточное количество растворенных веществ, то при обезвоживании химический потенциал внутриклеточной воды быстро меняется за счет изменения концентрации внутриклеточных веществ; при этом выравнивание химических потенциалов воды происходит при значительно меньшем обезвоживании клеток. Эти выводы остаются в силе для области практически применяемых в криобиологических экспериментах концентраций ввиду монотонной зависимости химических потенциалов от растворенных веществ. Обезвоживанию клеток в наибольшей степени будут препятствовать те из криопротекторов, проникающих через мембрану, от концентрации которых наиболее сильно зависит химический потенциал воды. При этом опасность обезвоживания будет уменьшаться при увеличении исходной концентрации криопротектора в клетке, который попадает внутрь клетки в период экспозиции замораживания.

О степени зависимости химического потенциала воды от концентрации различных растворенных веществ в области фазового перехода можно судить по характеру диаграмм плавления водных растворов этих веществ. Более эффективными в указанном смысле будут те вещества, изменения концентрации которых в растворе сильнее смещают температуру кристаллизации.

На рисунке приведены фазовые диаграммы ряда криопротекторов. Судя по характеру фазовых диаграмм, эффективность в предотвращении повреждений, связанных с обезвоживанием, уменьшается в ряду: метанол, этиленгликоль, глицерин, ПЭО-100. Эта зависимость усиливается за счет того, что вещество с меньшим молекулярным весом, как правило, лучше проникает через мембрану, а исходная концентрация криопротектора в клетке, как видно из приведенного анализа, также сильно влияет на степень обезвоживания. Однако метанол в необходимых концентрациях токсичен, что делает невозможным его использование в качестве криопротектора. Учитывая эти оба фактора, можно предположить, что наиболее эффективным является этиленгликоль. При этом эффективность криозащиты, обеспечиваемая им, должна увеличиваться по мере увеличения его исходной концентрации.



Концентрационная зависимость температур замерзания водных растворов криопротекторов (весовые проценты):
1 — метанол; 2 — этиленгликоль; 3 — глицерин; 4 — ПЭО-100.

Результаты проведенных нами экспериментов в основном согласуются с выдвинутыми представлениями. При одинаковой (20%) концентрации изученных криопротекторов минимальный процент гемолиза получен при замораживании с этиленгликолем по следующей программе замораживания: охлаждение со скоростью $10\text{--}40^\circ\text{C}$ в 1 мин до -55°C (достигалось погружением образца в спиртовую ванну конечной температуры), экспозиция при -55°C в течение 1—3 мин и дальнейшее охлаждение до -196°C со средней скоростью 20°C в 1 мин, полученное погружением в жидкий азот контейнера объемом 250 мл, заключенного в металлический кожух с определенным воздушным зазором. Отогрев производился на водяной бане при температуре 20°C . При указанных режимах охлаждения и отогрева гемолиз не превышал 2%. Исключение тепловой остановки при -55°C увеличивало гемолиз до 7—10%.

Необходимость температурной остановки в районе эвтектической области объясняется следующими обстоятельствами: во-первых, при быстром охлаждении образца от эвтектической области до температуры хранения (-196°C) регулярный режим охлаждения не успевает установиться, так как скорость охлаждения образца в разных точках совершенно различна. Поскольку локальные скорости охлаждения при этом могут значительно отличаться от оптимальной скорости в зависимости от положения клеток в консервируемом образце, различается и их выживаемость. При характерном размере образца $a=1$ см регулярный режим охлаждения успевает установиться за времена порядка $\frac{a^2}{\chi}$, где χ — температуропроводность, т. е. при $\chi \sim 3 \cdot 10^{-2}$ составляет

30 с. Таким образом, регулярный режим устанавливается при скоростях 20°C в 1 мин. Экспериментально доказано, что превышение этой скорости в 1,25—5 раз приводило к увеличению гемолиза до 5%. Охлаждение со скоростью, меньшей, чем 20°C в 1 мин, также приводило к потере жизнеспособности клеток, что можно объяснить повреж-

дением клеток рекристаллизационными процессами при этих условиях охлаждения. По-видимому, концентрированные растворы криопротекторов, выделяющиеся в каналах между кристаллами льда, имеют тенденцию к стеклованию, когда концентрация становится близкой к эвтектической. Это обстоятельство способствует сохранению клеток, поскольку снижает механические повреждения. Наличие значительных температурных градиентов в образце индуцирует выпадение эвтектической смеси. Поэтому температурная остановка, способствующая выравниванию температуры вдоль образца, благоприятствует выживанию эритроцитов при замораживании.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гордиенко Е. А., Бронштейн В. Л. К механизму лизиса. Математическая модель. — В кн.: Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины. К., 1974, с. 13—15.
2. Гордиенко Е. А., Бронштейн В. Л., Козьмин Ю. В. Особенности внутриклеточной кристаллизации в эритроцитах. — В кн.: Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины. К., 1974, с. 10—13.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
5. XII 1976 г.

УДК 57:536.48.047:534.8

Г. С. Лобынцева, В. И. Вишневский, В. Ф. Марценюк,
О. И. Гордиенко

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ УЛЬТРАЗВУКА НА ЭРИТРОЦИТЫ С ПРИМЕНЕНИЕМ МАТЕМАТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ПЛАНИРОВАНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

При низкотемпературном консервировании биологических объектов зачастую применяются завышенные концентрации криопротекторов, поскольку за короткое время эквilibрации перед замораживанием они обеспечивают наилучший контакт с клетками. Ускорить процесс взаимодействия клетка — криопротектор можно предварительным ультразвуковым озвучиванием клеточной суспензии после добавления криопротектора.

В связи с этим нами был проведен эксперимент, позволяющий выявить силу влияния на сохранность эритроцитов таких параметров, как концентрация криопротектора, мощность ультразвука, длительность озвучивания и частота ультразвуковых колебаний.

Материалом для исследования служили эритроциты донорской крови человека, в качестве криопротектора использовали полиэтиленоксид молекулярного веса 1500 (ПЭО-1500) 2, 4, 5, 7 и 10%-ной концентрации.

Приготовленные образцы озвучивали в специальных стаканах на частотах 880 кГц (установка УТП-1) и 2500 кГц (установка УТП-3М) с переменной мощностью от 0,1 до 3 Вт/см², после чего суспензию клеток разливали в полиэтиленовые ампулы объемом 2 мл и замораживали погружением в жидкий азот; отогревали клетки в водяной бане при 42° С. В опытах подсчитывали процент сохранившихся клеток по отношению к контролю и гемолиз.

Таблица 1
Уровни факторов и интервалы варьирования

Фактор	Уровень факторов			Интервал варьирования
	-1	0	+1	
x_1 , Вт/см ²	0,2	0,9	1,6	0,7
x_2 , мин	2,0	5,0	8,0	3,0
x_3 , %	3,0	4,0	5,0	1,0

В наших исследованиях определялось влияние режимов озвучивания, а также выявлялось оптимальное сочетание концентрация криопротектора — ультразвук — время озвучивания. Эксперименты проводили по плану 2^3 .

В качестве факторов рассматривали мощность ультразвука (x_1), длительность озвучивания (x_2), концентрацию криопротектора (x_3). Кодированное значение переменных указано в табл. 1. Матрица планирования и результаты экспериментов приведены в табл. 2.

Таблица 2

Матрица планирования и результаты экспериментов

Фактор			Частота УЗ, кГц					
			880			2500		
x_1	x_2	x_3	y_1	y_2	y_3	y_1	y_2	y_3
+	+	+	35,9	51,4	62,6	37,8	56,6	83,9
—	+	+	45,7	34,2	78,9	47,9	45,7	68,7
+	—	+	36,0	24,5	91,1	60,4	58,9	47,3
—	—	+	56,6	36,2	52,8	74,6	72,3	52,8
+	+	—	10,3	19,9	5,7	19,6	21,2	8,2
—	+	—	4,2	5,7	—	8,5	17,5	9,8
+	—	—	10,3	20,7	9,9	44,1	19,1	46,4
—	—	—	9,7	16,8	8,1	42,9	9,7	6,4

Примечание. $y_{1,2,3}$ — сохранившиеся клетки в каждом опыте, %.

Проверка дисперсий опытов по критерию Фишера показала, что они неоднородны. К удовлетворительным результатам привело рассмотрение в качестве выходной функции $\bar{y}$.

Таблица 3

Итоги обработки результатов полного факторного эксперимента 2

Частота УЗ, кГц	Уровень регрессии	Дисперсия воспроизводимости среднего значения выхода 2 (y)	Число степеней свободы	Доверительный интервал коэффициентов уравнения регрессии	Дисперсия адекватности	Адекватность
880	$\bar{y} = 5,07 + 0,15x_1 - 0,12x_2 + 1,93x_3$	1,6	15	1,2	0,604	Да
2500	$\bar{y} = 5,96 + 0,23x_1 - 0,43x_2 + 1,66x_3$	1,45	16	0,9	1,706	Да

Как видно из табл. 3, коэффициенты первого и второго факторов незначительно отличаются от нуля. В опытах полного факторного эксперимента также не проявилось действие ультразвука. Третий фактор — концентрация ПЭО-1500 — имеет значимый положительный эффект в уравнении регрессии, поэтому для увеличения сохранности эритроцитов необходимо возрастание концентрации криопротектора по сравнению с ее основным уровнем. Из испытанных конечных концентраций (4, 7 и 10%) лучшие результаты получены при 7%-ном ПЭО-1500 в суспензии (88% сохранившихся клеток).

Проведенные эксперименты показали, что при данной ошибке воспроизводимости опытов ультразвук с частотой 880 и 2500 кГц и мощностью до 2 Вт/см² при нашем способе озвучивания перед замораживанием не оказывает существенного влияния на исход низкотемпературного консервирования эритроцитов.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
22.XII 1976 г.

О. П. Маркова, Э. И. Обозная, Б. С. Лакиза,
П. В. Комлик, И. А. Морозов

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ЯДЕРНЫХ КЛЕТОК ПОСМЕРТНОГО КОСТНОГО МОЗГА, ПОЛУЧЕННОГО РАЗЛИЧНЫМИ СПОСОБАМИ, КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ДЛЯ КЛИНИЧЕСКИХ ЦЕЛЕЙ

Исследовался костный мозг трупов скоропостижно скончавшихся людей спустя 4—6 ч после наступления смерти. Консервирующий раствор — ЦОЛИПК-3, криопротектор — полиэтиленоксид молекулярного веса 400 (ПЭО-400) в 15%-ной конечной концентрации. Костномозговую взвесь подвергали замораживанию до -196°C в металлических гофрированных контейнерах емкостью 150 мл по двухэтапной программе. Размораживание производили в водяной бане при 42°C .

Изучено 23 образца костного мозга, полученных аспирационным, фрагментационным и компрессионным методами.

Аспирационный метод включает пункцию костей и эксфузию костного мозга с помощью разрежения в системе. Фрагментационный метод заключается в измельчении костей и вымывании из их фрагментов костного мозга. Компрессионным методом костномозговые клетки получали путем компрессии фрагментов костей, подвергшихся извлечению костного мозга фрагментационным методом.

Морфо-функциональное состояние миелокариоцитов оценивалось следующими тестами: подсчет количества ядерных клеток, определение процента жизнеспособных клеток, изучение миелограмм, определение цитохромоксидазной активности (ЦХО) по методу Берстона и содержание фосфолипидов (ФЛ) по Аккерману. Количественную оценку результатов исследования производили с помощью среднего гистохимического коэффициента по Астальди и Вергу.

С помощью фрагментации и компрессии получено значительно большее количество ядерных клеток по сравнению с аспирацией (соответственно $51 \pm 17,5$; $47 \pm 8,5$ и $9,3 \pm 2,7$ тысяч в 1 мкл) без особых различий в проценте жизнеспособных клеток (соответственно $77,0 \pm 4,0$; $74,0 \pm 5,1$ и $79,0 \pm 2,4$).

Изучение миелограмм показало, что в костном мозге, взятом с помощью аспирации, содержится значительная примесь периферической крови и относительно снижено количество бластных клеток, незрелых гранулоцитов и мегакариоцитов по сравнению с материалом, полученным двумя другими методами.

Активность ЦХО ядерных клеток, извлеченных фрагментационным ($1,53 \pm 0,26$) и компрессионным ($1,49 \pm 0,14$) методами, несколько выше по сравнению с таковой аспирационным методом ($1,43 \pm 0,08$). Что касается содержания ФЛ, то в ядерных клетках при аспирационном методе их содержание выше ($1,77 \pm 0,23$), чем при двух остальных ($1,45 \pm 0,09$ и $1,11 \pm 0,26$).

Дальнейшие исследования показали, что после замораживания—оттаивания под защитой ПЭО-400 в костном мозге, заготовленном разными методами, сохраняется следующее количество ядерных клеток по отношению к исходному: 55% при аспирационном, 84 — при фрагментационном и 85% при компрессионном методах, что составляет в 1 мкл соответственно: $5,1 \pm 0,6$; $43 \pm 16,9$ и $40,0 \pm 9,2$ тысяч. Процент жизнеспособных клеток, полученных аспирационным методом, составил $65,0 \pm 5,6$, фрагментационным — $70,0 \pm 8,5$ и компрессионным — $63,0 \pm 5,0$, что равно в 1 мкл соответственно 3315 ± 1005 ; 30100 ± 8191 и

25900±571 клеток. При этом достоверное снижение процента жизнеспособных клеток по сравнению с исходным отмечено только при аспирационном методе.

При цитологическом исследовании криоконсервированного костного мозга, получаемого указанными методами, отмечены заметное уменьшение размеров клеток, некоторое уплотнение структуры и изменение способности к окрашиванию. В миелограммах обнаружены колебания процентного соотношения миелокариоцитов по сравнению с процентным соотношением в исходных образцах в пределах недостоверных величин, за исключением достоверного увеличения количества недифференцируемых клеток (голаядерные и сморщенные клетки, преимущественно мононуклеары, идентификация которых затруднительна).

После размораживания наблюдалось однотипное снижение активности ЦХО при всех трех методах заготовки костного мозга. В клетках, извлеченных аспирационным способом, сохранялось 66% цитохромоксидазной активности, фрагментационным — 53 и компрессионным — 55%. Аналогичные изменения отмечены и в содержании ФЛ: процент сохранившихся ФЛ был равен соответственно 63; 58 и 50.

Таким образом, проведенными морфо-функциональными исследованиями установлено, что костномозговая взвесь, полученная фрагментационным и компрессионным методами, характеризуется значительно большим количеством ядерных клеток вообще, незрелых гранулоцитов и бластных клеток в частности, меньшей примесью форменных элементов периферической крови по сравнению с аспирационным методом. После замораживания—оттаивания клеток, полученных фрагментационным и компрессионным методами, сохраняется большее их количество по отношению к исходному, чем при аспирационном. Изменения морфологического состава, активности цитохромоксидазы и фосфолипидов после замораживания—оттаивания ядерных клеток, полученных тремя способами, однотипны.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
16. XII 1976 г.

УДК 57:536.48.047:612.014.424.5

Ю. П. Тимошенко, Б. Д. Костарев, И. С. Пахомова

РАЗМОРАЖИВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ СВЧ-ЭНЕРГИЕЙ.

VI. К ВОПРОСУ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ЛОКАЛЬНОГО НАГРЕВА

При сверхвысокочастотном (СВЧ) размораживании тепло генерируется по всему объему нагреваемого объекта пропорционально коэффициенту потерь в каждой точке. В процессе размораживания в области температур, выше эвтектической, биологические объекты представляют собой существенно гетерогенную среду. Появившаяся жидкая фаза обладает большим коэффициентом потерь по сравнению с оставшейся замороженной частью образца, что приводит к перераспределению между ними удельной поглощаемой мощности. Это является причиной интенсивного нагрева жидкой фазы и, как следствие, повреждения размораживаемого объекта.

Экспериментально установлено, что при размораживании медленно замороженных объектов (ядерные клетки крови, костный мозг) вероятность возникновения локального нагрева возрастает, хотя различий в диэлектрических свойствах медленно и быстро замороженных образцов не обнаружено. Причина этого, по-видимому, заключается

в структуре, образующейся в ходе процесса замораживания. Как известно, в процессе медленного охлаждения большинство клеток вытесняется растущими кристаллами льда в каналы, заполненные концентрированными растворами солей и криопротекторами. При нагреве таких образцов при температуре от -196 до -30°C неравномерное распределение температур выравнивается высокой теплопроводностью в замороженном состоянии. Поэтому можно предположить, что появившаяся при температуре выше -30°C жидкая фаза связана с плавлением эвтектических смесей. Значительная концентрация клеток в местах предполагаемого локального нагрева существенно осложняет проблему размораживания, увеличивая вероятность повреждения такого объекта по сравнению с быстро замороженным.

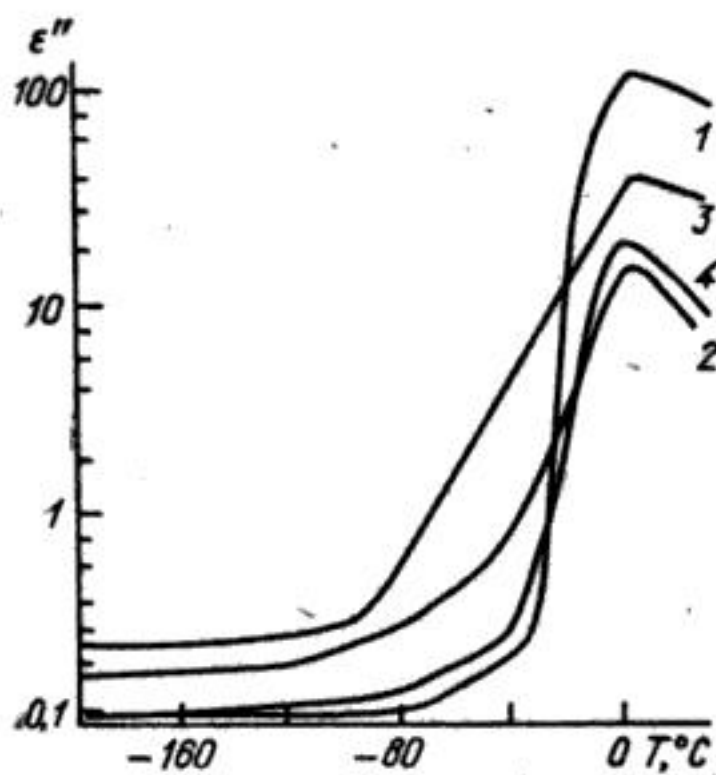


Рис. 1. Температурная зависимость коэффициента диэлектрических потерь на частоте 2370 МГц: 1 — эвтектический раствор NaCl; 2 — эвтектический раствор ПЭО-400; 3 — система физических растворов NaCl и ПЭО-400 в эвтектических концентрациях; 4 — суспензия ядросодержащих клеток крови с 10%-ным ПЭО-400. Масштаб по оси ординат логарифмический.

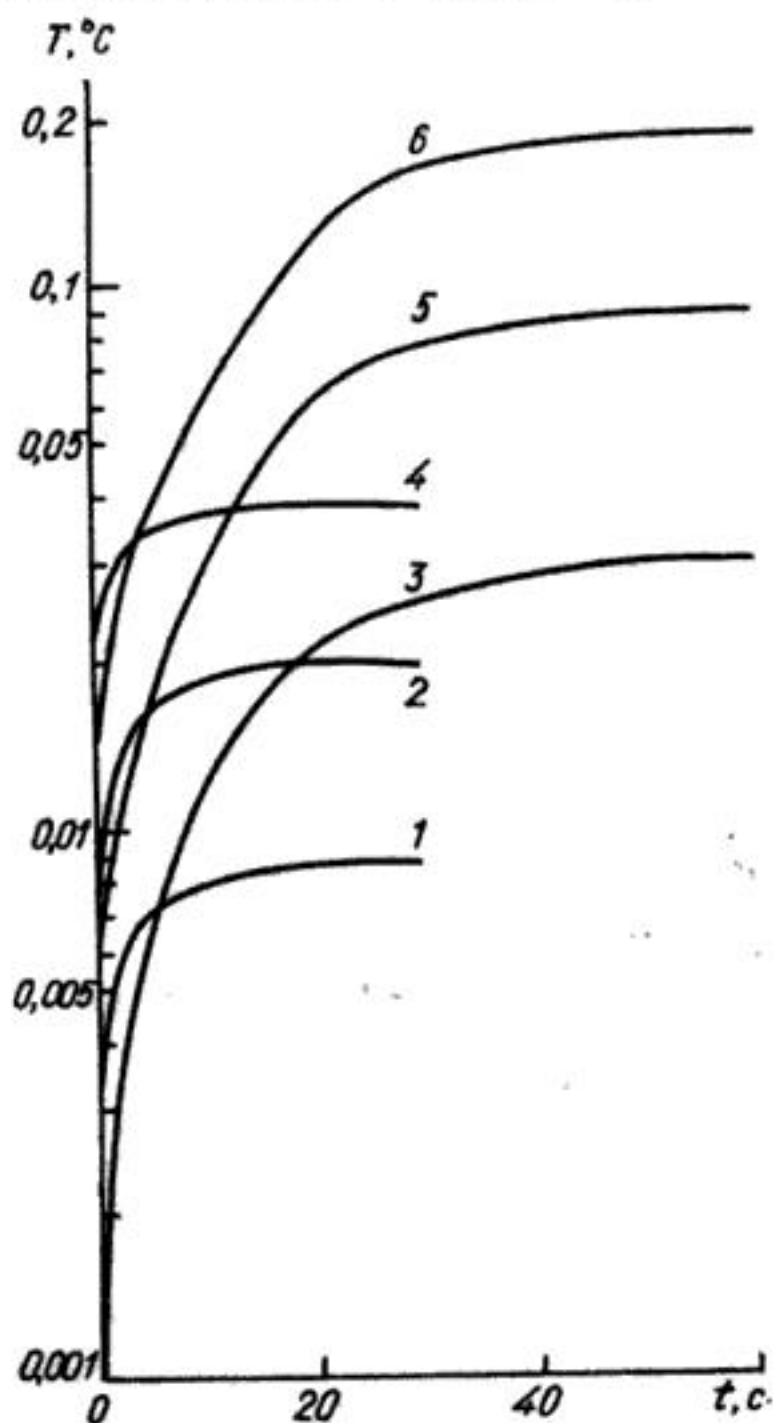


Рис. 2. Динамика установления температурного перепада между жидким включением и окружающей твердой фазой. Радиус шара R , м, частота f , МГц: 1 — 0,001, 433; 2 — 0,001, 915; 3 — 0,01, 433; 4 — 0,001, 2370; 5 — 0,01, 915; 6 — 0,01, 2450. Масштаб по оси ординат логарифмический.

Следует отметить положительную роль криопротектора в обеспечении равномерного нагрева. Его присутствие в суспензии клеток расширяет температурный диапазон фазовых превращений в область низких температур и существенно уменьшает величину коэффициента диэлектрических потерь (ϵ'') появляющегося жидкого включения. Как видно из рис. 1, (ϵ'') эвтектического раствора NaCl (кривая 1) уменьшается в присутствии ПЭО-400 (кривая 3). При этом следует учесть также тот факт, что концентрация солей и криопротектора в локальном включении в ходе процесса нагрева будет понижаться. Это повышает стабильность процесса нагрева, так как поглощение СВЧ-мощности уменьшается с ростом температуры.

Если предположить, что в процессе размораживания форма образующегося жидкого включения сферическая, то поглощенная инте-

гравная мощность, расходуемая на его нагрев, может быть определена по следующей формуле [1]:

$$W = \pi \omega \varepsilon'' \sum_{n=1}^{\infty} (2n+1) \{ |a_n^0|^2 I_{11}'' + |b_n^0|^2 I_{21}'' \}.$$

Как показывают расчеты, в жидком сферическом включении выделяется значительно бо́льшая удельная мощность нагрева, чем в остальном материале. В данном случае представляет интерес расчет нарастания температуры локального включения, закон изменения которого при постоянной мощности нагрева будет определяться теплоотдачей с его поверхности.

Для малых размеров сферического включения радиусом 0,1—1 мм дифференциальное уравнение нагрева имеет вид [2]

$$C\rho \frac{dT}{d\tau} + \frac{\alpha S}{V} (T - T_0) = \frac{W}{V}$$

при начальном условии $\Theta = T|_{\tau=0} = T_0 \text{ const}$, где C, ρ — удельная теплоемкость и плотность образца; VS — объем и поверхность включения; α — коэффициент теплоотдачи включения; $\frac{W}{V}$ — количество тепла, выделяемого в единицу времени в единице объема.

Обозначив $\Theta = T - T_0$, уравнение можно записать как $\frac{d\Theta}{d\tau} + \frac{\alpha S}{VC\rho} \Theta = \frac{W}{VC\rho}$. Решение имеет вид $\Theta = \frac{A_2}{A_1} (1 - e^{A_1 \tau})$, где $A_1 = \frac{W}{VC\rho}$; $A_2 = \frac{\alpha S}{VC\rho}$ — постоянные в процессе нагрева. Точный расчет параметров

неравномерного процесса нагрева осложнен изменениями агрегатного состояния вещества, размера включения и условиями его теплоотдачи, а также температурной зависимостью диэлектрических и теплофизических свойств. В этом случае представляется целесообразным приближенно оценить основные величины с тем, чтобы дальнейшая корректировка была произведена в ходе экспериментальной отработки режимов нагрева. Все модельные расчеты проведены при использовании усредненных диэлектрических характеристик объекта. Для сферического включения температурная зависимость ε'' представлена кривой 3, а для окружающей среды — кривой 4 (рис. 1).

Как видно из рис. 2, увеличение размеров включения приводит к возрастанию температурного перепада (Θ) между жидким включением и окружающей его твердой фазой. Это означает, что по мере протекания процесса плавления неравномерность нагрева образца возрастает. Неравномерное распределение температуры будет частично компенсироваться большой скрытой теплотой плавления льда, однако устранить неравномерность в распределении удельной поглощенной мощности в материале почти невозможно. Возникающие градиенты температур могут быть значительно меньше, если осуществлять отвод тепла с поверхности образца. Скорость отбора тепла будет определяться требуемой равномерностью температуры и скоростью нагрева. В начальный период зарождения жидкой фазы, для которого перепад температур в материале еще настолько мал, что теплоотдачей включения можно пренебречь, скорость повышения температуры имеет вид $\frac{dT}{d\tau} =$

$= A_1 \tau$. Для малых скоростей нагрева (50°С в 1 мин) возникающие температурные перепады малы. Проведенные эксперименты показы-

вают, что при данных скоростях нагрева на частоте 2370 мГц процесс плавления по объему контейнера толщиной 10 мм происходит почти одновременно. С повышением скорости нагрева температурные перепады пропорционально возрастают.

Предлагаемым нами способом можно получить равномерный процесс плавления основной массы образцов при высоких скоростях нагрева в случае поддержания температуры его поверхности около 0°C . Экспериментально это осуществляется помещением образца в охлажденную жидкость с малыми потерями. В этом случае в замороженных объектах равномерный процесс плавления наблюдается при скоростях нагрева 100°C в 1 мин. Сравнительный анализ кривых (см. рис. 2) указывает на то, что с понижением частоты скорость нагрева при тех же неравномерностях температуры может быть увеличена. В проводимых экспериментах на частоте 433 мГц удовлетворительное распределение температуры по образцу наблюдается при скоростях нагрева 200°C в 1 мин.

Учитывая физические свойства, можно предположить, что отклонения в форме, размерах и параметрах (R , $\epsilon^*\text{C}$) включения должны влиять на характер его нагрева. Приведенные расчетные кривые на рис. 3 указывают на то, что с учетом температурной зависимости диэлектрических свойств образца на частотах 433 и 915 мГц увеличение радиуса включения сопровождается незначительным повышением температурного перепада. При нагреве на 2370 мГц в зависимости от параметров включения (R , $\epsilon''=\varphi(T)$) температурные перепады более значительные и режим нагрева может носить неустойчивый характер.

Если предположить равновероятное распределение по образцу образующихся включений с различным радиусом (от 0,1 до 1 мм), то с понижением частоты источника СВЧ-энергии следует ожидать более равномерного повышения температуры размораживаемого объекта. Таким образом, частоты 433 и 915 мГц можно рекомендовать для размораживания контейнеров больших объемов (250—500 мм), необходимых для клинических целей.

Проводилась сравнительная оценка образцов, размороженных на частотах 2370; 915 и 433 мГц. При размораживании ядросодержащих клеток крови с 10%-ной концентрацией ПЭО-400 достоверных различий в сохранности клеток, размороженных на разных частотах, не обнаружено. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о сохранении большинства клеточных форм (разрушается лишь незначительная часть сегментоядерных лейкоцитов). У небольшого количества лейкоцитов (10—15%) наблюдаются разрывы клеточной мембраны и частичный лизис цитоплазматических структур.

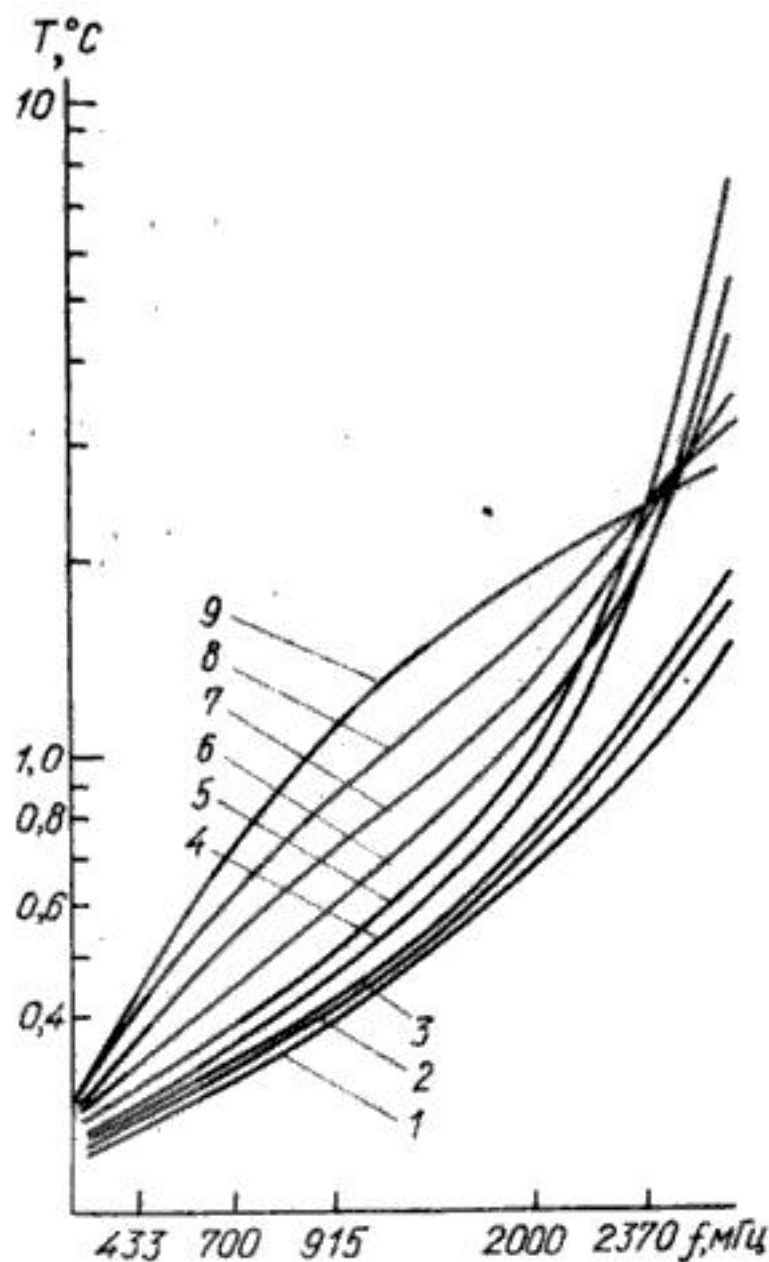


Рис. 3. Зависимость установившихся температурных перепадов для локальных включений различного радиуса от частоты источника СВЧ-энергии. Радиус шара R , м:
1 — 0,001; 2 — 0,003; 3 — 0,004; 4 — 0,005;
5 — 0,006; 6 — 0,007; 7 — 0,008; 8 — 0,009;
9 — 0,01. Масштаб по обеим осям логарифмический.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лыков А. В. Теория теплопроводности. М., «Высш. школа», 1967. 599 с.
2. Страттон Д. А. Теория электромагнетизма. М., Гостехиздат, 1948. 493 с.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

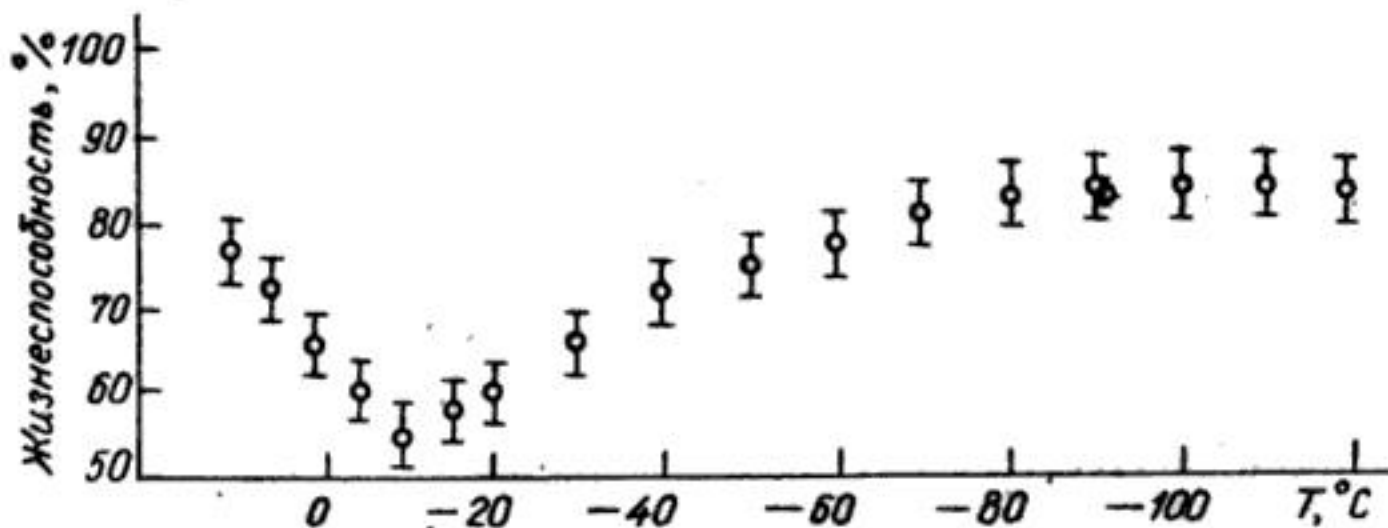
Поступила в редколлегию
22. XII 1976 г.

УДК 57:536.48.047:615.387

Ю. П. Тимошенко, Г. С. Лобынцева, А. И. Полякова,
В. Г. Тимченко

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА РАЗМОРАЖИВАНИЯ КЛЕТОЧНЫХ СУСПЕНЗИЙ

Общепринятым является тот факт, что не только условия охлаждения, но и условия размораживания оказывают существенное влияние на выживаемость клеток. Для быстрозамороженных клеток оптимальная скорость нагрева выше той, которая необходима для клеток,



Зависимость жизнеспособности клеток от скорости отогрева.

замороженных с медленной скоростью. Имеющиеся в литературе сведения, как правило, относятся к средней скорости повышения температуры в процессе размораживания. Менее освещен вопрос влияния скорости нагрева на сохранность клеток на различных участках температурного диапазона (от -196 до 4°C).

Нами были проведены эксперименты по изучению влияния различных скоростей нагрева на сохранность клеток крови с целью определения интервала температур, в котором наблюдается наибольшая зависимость повреждения клеток от скорости нагрева. Ядродержащие клетки периферической крови человека были заморожены под защитой ПЭО-400 10%-ной концентрации по двухэтапной программе. При размораживании скорости нагрева в зоне твердого состояния вещества составляли 10; 50; 100; 200 и 300°C в 1 мин, в зоне фазовых превращений и в жидком состоянии — 10; 50 и 100°C в 1 мин. Отогрев материала осуществляли с указанными скоростями от -196°C до температур, обозначенных на оси абсцисс (см. рисунок), после чего отогревали с постоянной скоростью 100°C в 1 мин до температуры 4°C . Объем отогреваемого материала составлял около 2 мл.

В интервале температур от -196° до -70°C изменение скорости нагрева от 300 до 10°C в 1 мин не вызывало достоверного уменьшения количества жизнеспособных клеток даже при длительном (в течение нескольких часов) хранении при температуре -70°C (см. рисунок). При морфологическом анализе исследуемых образцов не было обнаружено достоверного изменения клеточного состава лейкома-

при прохождении указанной выше температурной зоны. Лишь незначительная часть клеток носила явные признаки разрушений, выражающихся в вакуолизации цитоплазмы, сморщивании клеток, скоплении нитей хроматина на одном из полюсов ядер, разрыве клеточной мембраны. При электронно-микроскопическом исследовании отмечалась незначительная гипертрофия эндоплазматического ретикулума сегментоядерных нейтрофилов. При этом у нас нет никаких оснований полагать, что данные повреждения обусловлены изменениями в процессе отогрева.

В зоне температур выше -70°C при недостаточно быстром нагреве (менее 50°C в 1 мин) количество жизнеспособных клеток уменьшалось тем больше, чем дольше образец выдерживался при указанных температурах. Так, при -30°C достаточно было 10 мин, чтобы потеря клеток возросла вдвое, что может быть объяснено проявлением рекристаллизационных процессов. Однако если скорости отогрева в этом температурном диапазоне повысить до 100 и более градусов в 1 мин, то основная часть клеток оставалась без значительных морфологических и субмикроскопических изменений. Как видно из результатов проведенных экспериментов, область повреждающих температур начиналась от -60°C , а в области температур от -40 до -30°C повреждения клеток возрастали, что также объяснено высокотемпературным смещением процесса рекристаллизации при больших скоростях нагрева.

Максимальные повреждения клеток наблюдались в процессе прохождения интервала температур от -30 до -10°C . Повреждающий эффект возрастал как от понижения скорости нагрева, так и от продолжительности воздействия и был обусловлен плавлением эвтектических смесей с высокой концентрацией солей и криопротектора, в которых расположены клетки, вытесненные сюда кристаллами чистого льда в процессе медленного охлаждения. Морфологически клетки были сильно изменены: встречалось большое количество гранулоцитов с вакуолизированными ядрами и цитоплазмой, с разрывами клеточной мембраны, рерафикацией ядер, голоядерные клетки. Изучение лейкограмм показало значительное уменьшение количества зрелых гранулоцитов при незначительном увеличении числа лимфоцитов. При электронно-микроскопическом анализе обнаружено большое количество клеток с полностью разрушенной ультраструктурой и частично поврежденных клеток с разрывом плазматической мембраны и увеличением перинуклеарного пространства. Время, за которое проявлялись описанные повреждения, мало. Так, выдержка образцов в течение 5—10 мин при температурах от -15 до -10°C приводила к почти полной гибели клеток.

При повышении температуры от -5 до 0°C , как показали калориметрические исследования, происходит плавление основной массы льда, что уменьшает повреждающую концентрацию солей в окружающей клетку жидкой фазе и способствует увеличению их сохранности. Незначительный повреждающий фактор в этом диапазоне температур, очевидно, обусловлен дегидратационными процессами, связанными с изменением объема клетки.

В связи с изложенным выше мы пришли к выводу о том, что в процессе размораживания клетка подвергается различным по степени воздействия повреждающим факторам. Несмотря на то что имеющиеся данные относятся больше к числу косвенных, мы считаем более вероятным тот факт, что максимальные повреждения происходят от воздействия концентрированных растворов солей, а не в результате превышения максимально допустимого осмотического давления. Таким образом, результаты проведенных опытов подтверждают существующее мнение, что наибольшим повреждениям клетка подвергается в об-

ласти фазовых превращений, скорость прохождения которой необходимо увеличить.

В настоящее время для восстановления биологических объектов из состояния глубокого охлаждения используется способ отогрева в водяной бане при $+42^{\circ}\text{C}$. Повышение температуры теплоносителя выше $+40^{\circ}\text{C}$, а следовательно, и скорости нагрева ограничено появлением необратимых изменений в размораживаемом образце, особенно в его поверхностных слоях.

Существенный недостаток данного вида теплоподвода — появление жидкой фазы вблизи стенок контейнера, которое происходит обычно при температуре в центре от -50 до -40°C , что приводит к уменьшению скорости нагрева оставшейся части образца.

Уменьшить время пребывания клеток в опасной температурной зоне можно при использовании поэтапного способа размораживания. Отогрев на первом этапе осуществлялся погружением контейнера в теплоноситель с температурой от -70 до -60°C на время, достаточное для выравнивания температуры по всему объему образца. На втором этапе контейнер отогревается в водяной бане (40°C) до требуемой температуры.

Проверку эффективности предлагаемого поэтапного способа размораживания для других видов клеток проводили на эритроцитах, замороженных под защитой 20%-ного ПЭО-1500 в металлических гофрированных контейнерах объемом 300 мл погружением в жидкий азот. Эффективность криоконсервирования оценивали по количеству гемоглобина в надосадочной жидкости. Было установлено, что при двухэтапном способе размораживания количество гемоглобина в надосадочной жидкости было $829 \pm 16,2$ мг%, в то время как при размораживании в водяной бане (40°C) — $1032 \pm 15,3$ мг%.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что предлагаемый нами поэтапный способ может быть использован для отогрева как медленно замороженных ядродержащих клеток крови, так и быстро замороженных эритроцитов. Важная особенность предлагаемого способа размораживания — возможность транспортировки консервированного материала в переносных сосудах, заполненных сухим льдом, который является менее дорогостоящим и более удобным в эксплуатации, чем жидкий азот. При этом материал может храниться в клинике в течение нескольких часов перед окончательным его размораживанием.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
16. XII 1976 г.

УДК 57:536.48.047;536.48;576.51.48

Сафонова Т. С., Маркова В. М., Мануильский В. Д.

ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР НА БАКТЕРИИ *E. COLI B/rWP2hcr⁺try⁻*

В настоящее время актуальной задачей является разработка методов низкотемпературного консервирования микроорганизмов, позволяющих сохранить присущие им морфо-функциональные свойства и постоянство генотипа.

Цель настоящей работы — изучение влияния низких температур (-196°C) на выживаемость, рост и развитие микробной популяции, интенсивность мутагенеза бактерий *E. coli B/rWP2hcr⁺try⁻*. В работе использовали бактерии *E. coli* штамма *WP2hcr⁺try⁻*, полученные из Института цитологии АН СССР. Бактерии выращивали в течение 18 ч

при 37° С на среде М9 с добавлением триптофана (20 мкг/мл) при интенсивной аэрации. Бактериальную взвесь в физиологическом растворе, содержащую 1×10^9 клеток в 1 мл, замораживали в полиэтиленовых ампулах объемом 1,5 мл со скоростью охлаждения около 400° С/мин. После кратковременного пребывания в жидком азоте образцы деконсервировали на водяной бане при 41° С. Количество выживших бактерий в образцах определяли по числу сформировавшихся колоний на ПАМ через 18 ч роста при 37° С. Для выявления прототрофных ревертантов использовали глюкозо-минеральную полубогащенную среду М9. Интенсивность мутагенеза в интактной популяции и в популяции бактерий, подвергнутых замораживанию, оценивали, сравнивая число мутантов, возникающих при посеве бактериальных взвесей, содержащих одинаковое количество жизнеспособных клеток. Чувствительность бактерий к фагу Т3 определяли по методу Адамса. Количество генераций в растущей популяции рассчитывали по формуле $n = 3,32 (\log N_1 - \log N_0)$, где n — число генераций за время $t_1 - t_0$; N_0 — число клеток в начале и N_1 — в конце исследуемого отрезка времени. Статистическую обработку данных проводили по методу Фишера—Стьюдента.

Как показали результаты экспериментов, кратковременное однократное замораживание при —196° С *E. coli* B/rWP2hcr+try[–] приводило к снижению выживаемости бактерий до $20,6 \pm 1,4\%$.

Под влиянием низкотемпературного воздействия изменялась скорость роста и развития деконсервированных микроорганизмов. При культивировании на мясо-пептонном бульоне при 37° С скорость размножения бактерий, переживших замораживание, в первые пять часов после посева была достоверно ниже, чем у бактерий в контрольных образцах. К седьмому часу культивирования на питательной среде скорость роста в опытной и контрольной популяциях выравнивалась (табл. 1).

Результаты изучения влияния низких температур на частоту возникновения мутантов у бактерий *E. coli* B/rWP2hcr+try[–] свидетельствуют о том, что частота возникновения реверсий от триптофанзависимости к прототрофии в деконсервированной популяции практически не отличалась от частоты мутаций в интактной популяции (табл. 2).

Таблица 1

Влияние замораживания—оттаивания на скорость роста популяций бактерий *E. coli* B/rWP2hcr+try[–]

Время роста популяции, ч	Количество генераций, л		
	интактная популяция	деконсервированная популяция	
	$x \pm Sx$	$x \pm Sx$	p^*
2	$0,92 \pm 0,10$	$0,37 \pm 0,17$	0,05
3	$3,25 \pm 0,17$	$1,15 \pm 0,15$	<0,02
4	$3,74 \pm 0,14$	$2,83 \pm 0,11$	<0,05
5	$5,51 \pm 0,26$	$3,75 \pm 0,12$	<0,05
7	$9,21 \pm 0,24$	$9,17 \pm 0,27$	

* p — степень достоверности различий между числом генераций интактной и деконсервированной популяций.

Таблица 2

Частота возникновения мутаций в популяции бактерий *E. coli* B/rWP2hcr+try[–], подвергавшихся замораживанию при —196° С

try [–] → try ⁺			
4° С		–196° С	
Число клеток в посеве на чашку, $\cdot 10^7$	Число мутантов в посеве на чашку, $x \pm Sx$	Число клеток в посеве на чашку, $\cdot 10^{-7}$	Число мутантов в посеве на чашку, $x \pm Sx$
2,8	$27 \pm 0,08$	2,2	$22 \pm 0,007$
2,3	$23 \pm 0,06$	1,8	$24 \pm 0,06$
4,7	$22 \pm 0,09$	2,5	$26 \pm 0,08$
6,0	$24 \pm 0,08$	6,0	$25 \pm 0,09$
6,6	$17 \pm 0,06$	6,6	$28 \pm 0,08$
7,3	$36 \pm 0,05$	7,6	$32 \pm 0,02$

Тинкотриальные, морфологические, культуральные, ферментативные свойства, а также чувствительность к фагу ТЗ у выживших после замораживания особей не изменялись. Таким образом, результаты экспериментов показывают, что при замораживании бактерий *E. coli* B/rWP2hcr+try- криолабильная часть популяции составляет 79,4%. Воздействие низких температур снижает скорость роста деконсервированных микроорганизмов на протяжении пяти часов культивирования на питательной среде. При однократном замораживании—оттаивании в геноме клеток не образуются мутационные повреждения, о чем свидетельствуют отсутствие изменений в количестве ревертантов, стабильность морфологических и биохимических свойств, а также сохранение исходного уровня чувствительности к фагу ТЗ.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
14. XII 1976 г.

УДК 57:536.48.047:616—091.8:615.9:541.49

В. Ф. Козлова, М. М. Гучок, И. М. Щетинский,
Б. А. Верховский

ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ КРИОПРОТЕКТОРА—ПОЛИЭТИЛЕНОКСИДА МОЛЕКУЛЯРНОГО ВЕСА 1500 — НА ОРГАНИЗМ ЖИВОТНЫХ

Полиэтиленоксиды (ПЭО), в том числе ПЭО-1500, в нашей стране и за рубежом широко используются с различной целью в фармацевтической и медико-биологической практике [1—3, 5—7]. ПЭО-400 и ряд других полимер-гомологов обладают высокой криозащитной активностью [5—7 и др.]. Перспективным в этом отношении представляется и ПЭО-1500. Данные о его токсичности при парентеральном введении в организм очень малочисленны, неполны и частично противоречивы.

Задачей настоящего исследования явилось патоморфологическое изучение влияния ПЭО-1500 на организм животных при парентеральном введении. Исследование проведено в острых и подострых опытах на 20 кроликах породы шиншилла и 16 белых крысах. В острых опытах с целью изучения патогенеза острого тяжелого токсикоза кроликам однократно внутрибрюшинно вводили 10%-ный раствор ПЭО-1500 в летальных и близких к ним дозах (6,5—11,0 г/кг веса). ДЛ-50, определенная по методу Дейхмана и Ле Бланка [8], равна 8,0 г/кг. В подострых опытах — с целью изучения переносимости — 10%-ные растворы криопротектора вводились кроликам внутривенно, крысам внутрибрюшинно 2 раза в неделю в течение месяца в дозах 1/20 и 1/30 ДЛ-50. Для крыс доза ДЛ-50, рассчитанная по В. Б. Прозоровскому [4], составляет 11,52 г/кг. Контрольным животным вводились соответствующие объемы 0,9%-ного раствора хлористого натрия или дистиллированной воды.

Методы исследования: патологоанатомическое вскрытие, гистологический и гистохимический анализы (окраска целлоидин-парафиновых срезов сердца, легких, печени, почек, селезенки и надпочечников гематоксилин-эозином, по Ван-Гизону, комбинированным методом по Мюури, избирательное окрашивание замороженных срезов печени и надпочечников на липиды суданом III и IV, а также суданом черным В).

Результаты исследования. При патологоанатомическом вскрытии кроликов, павших через 19—20 ч после введения вещества в дозе 8—11 г/кг, обнаружены: разлитой серозный отек подкожной клетчатки и кожи в местах введения, общий венозный застой, несвернувшаяся кровь

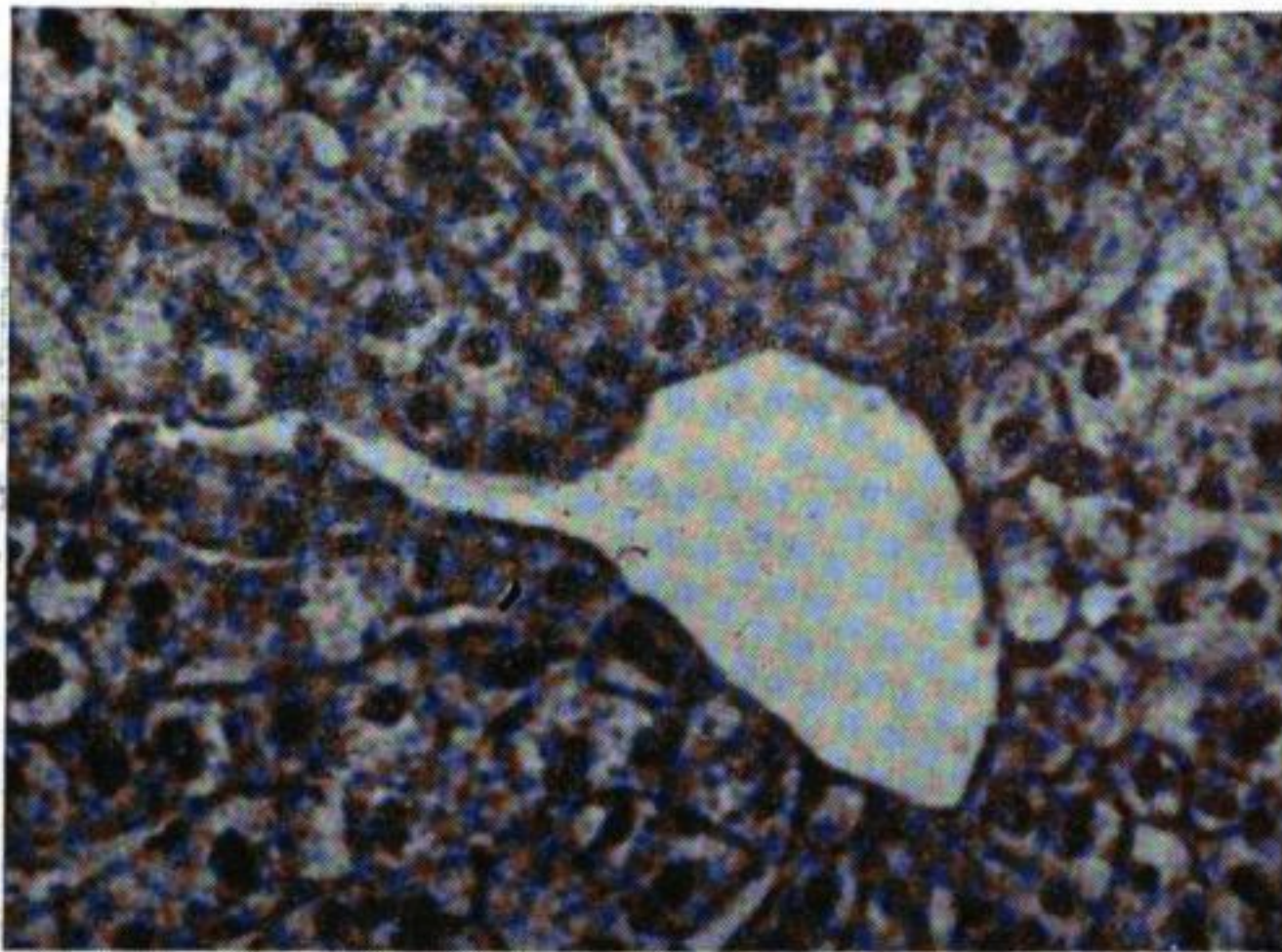


Рис. 1. Характерная структура печени контрольного кролика. Гематоксилин-эозин, $\times 180$.

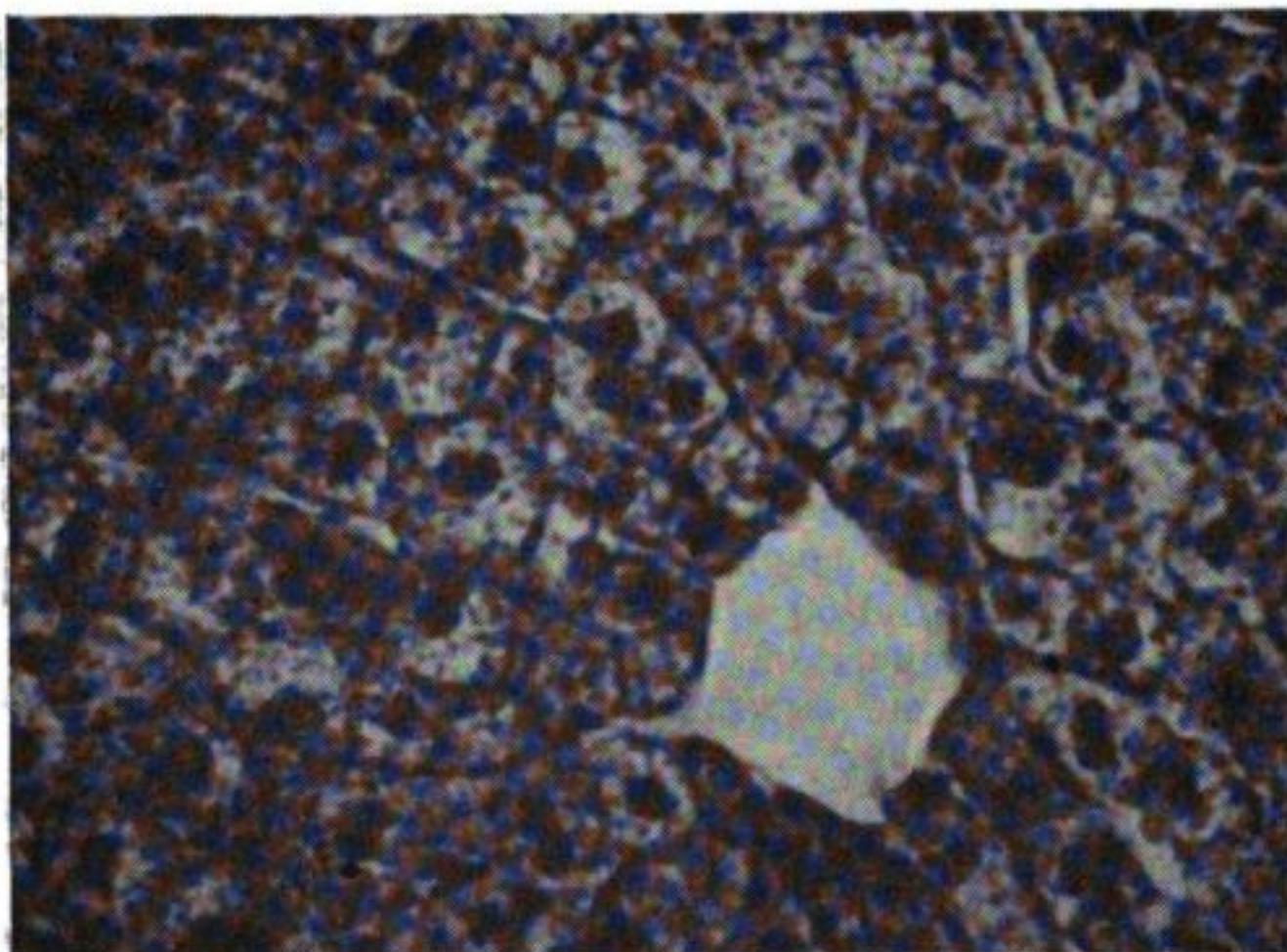


Рис. 2. Морфологическая картина печени без изменений. Кролик — внутривенное введение в течение месяца 1/20 ДЛ-50 10%-ного раствора ПЭО-1500. Гематоксилин-эозин, $\times 180$.

в кровеносных сосудах, умеренный серозный гидроторакс и асцит, коллапс и ателектаз легких, дистрофия печени и почек. У кроликов, выживших и забитых через неделю после введения ПЭО-1500 в дозе 6,5—7,5 г/кг, обнаружены только дистрофические изменения в печени и почках, а также умеренная гипертрофия коры надпочечников.

По результатам патогистологического и гистохимического исследований было установлено, что под влиянием летальных доз ПЭО-1500 нарушается микроциркуляция крови, развиваются стазы, дистрофические изменения как в мышце, так и в соединительнотканном каркасе сердца. Нарушаются тинкториальные свойства структур миокарда, мышечные волокна становятся неравномерно хроматофильными, теряют

гликоген, а некоторые миоциты — поперечную исчерченность, становятся тусклыми и мутными. В соединительнотканной основе сердца отмечаются распад гликопротеидных комплексов, накопление свободных полисахаридов.

Ткань легкого в зависимости от дозы вводимого вещества характеризуется вариабельностью состояния — от утолщения отдельных межальвеолярных перегородок до коллапса и ателектаза. Она богата макрофагальными элементами и тучными клетками. В соединительной ткани органа отмечены мукоидное набухание, застойная гиперемия, диапедез.

Выраженные изменения (расширение внутридольковых капилляров и переполнение сосудов кровью, реактивное состояние купферовских клеток и лаброцитоз, дискомплексация долей и потеря гепатоцитами углеводных компонентов) выявлены в печени животных. Изменения в паренхиме органа носят в основном характер зернистой и гидропической, реже — жировой дистрофии.

В почках животных развивается полнокровие сосудистых клубочков, капилляров коркового и мозгового слоев, набухание эндотелия, зернистая и гидропическая дистрофия эпителия мочевыводящих путей, декомпозиция белково-углеводных комплексов основных структур. В полостях некоторых кровеносных сосудов появляются молодые формы эозинофилов и миелоциты.

В селезенке регистрируются пролиферация молодых соединительнотканых элементов, усиление макрофагальной активности, появление большого количества различной степени зрелости тучных клеток. В надпочечниках — расширение синусоидов сетчатой зоны и мозгового вещества, гипертрофия клеток коры, перераспределение липидов — появление суданофильных и суданофобных зон. У животных серии подострых опытов весовые коэффициенты, макро- и микроскопическая структура сердца, легких, печени, почек, селезенки и надпочечников подопытных и контрольных крыс и кроликов существенно не отличались между собой (рис. 1, 2). Не выявлено также признаков раздражения брюшины, слизистых желудочно-кишечного тракта и кожи.

Результаты исследования позволяют сделать следующие выводы:

1. Многократное внутривенное (внутрибрюшинное) введение ПЭО-1500 в дозе 1/30 и 1/20 ДЛ-50 в 10%-ных водных растворах не изменяет макро- и микроскопической структуры изученных внутренних органов крыс и кроликов, не вызывает раздражения брюшины и кожи в местах введения вещества.

2. В основе патогенеза острого токсикоза, вызванного введением летальных и близких к ним доз ПЭО-1500, лежат чрезмерное напряжение организма, изменение сосудисто-тканевой проницаемости, перераспределение тканевой жидкости, декомпозиция гликопротеидных соединений, реактивное состояние клеток ретикуло-эндотелиальной системы, паренхиматозная дистрофия (особенно экскреторных органов).

ЛИТЕРАТУРА

1. Глузман М. Х., Дашевская Б. И., Оницез П. И., Безрук П. И. Водорастворимые основы для суппозиторий и мазей. — Мед. пром-сть СССР, 1956, № 4, с. 14—15.
2. Дашевская Б. И. Полиэтиленоксиды в фармации. Труды Харьк. науч.-исслед. химико-фармац. ин-та, 1957, 11, с. 108—115.
3. Дашевская Б. И., Глузман М. Х., Бодня В. М. Полиэтиленоксиды и их применение в фармации. М., 1974, № 2. 27 с. Обзорная информация. Серия химико-фармац. промышленность.
4. Прозоровский В. Б. Использование метода наименьших квадратов для пробит-анализа кривых летальности. — Фармакология и токсикология, 1962, № 1, с. 115—119.
5. Пушкарь Н. С. Консервирование глубоким охлаждением (-196°C) костного мозга и его использование в клинических целях. Автореф. докт. дис. Харьков, 1968. 28 с.

6. Пушкарь Н. С., Белоус А. М. Введение в криобиологию. К., «Наук. думка», 1975. 344 с.
7. Шраго М. И. О криозащитном действии полимеров окиси этилена на эритроциты человека при глубоком охлаждении. (К проблеме консервирования крови). Автореф. докт. дис. Л., 1971. 29 с.
8. Елизарова О. Н. Определение пороговых доз промышленных ядов при пероральном введении. М., «Медицина», 1971. 192 с.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
22. XII 1976 г.

УДК 57:536.48.047.615.9.06

М. М. Гучок, Б. А. Верховский, В. К. Мазалов,
Н. С. Сигал, Л. З. Элькина

О ВЛИЯНИИ ПОЛИЭТИЛЕНОКСИДА МОЛЕКУЛЯРНОГО ВЕСА 1500 НА ФУНКЦИИ ПЕЧЕНИ И СВЕРТЫВАЕМОСТЬ КРОВИ

Перспективность широкого использования ПЭО-1500 в медико-биологической практике в качестве криопротектора и в фармации требует всестороннего изучения его влияния на организм. Однако неясен вопрос о характере и степени влияния парэнтеральных введений ПЭО-1500 на функции печени и гемостаз. Отечественные образцы ПЭО-1500 в этом плане вообще не изучены. Все это послужило основанием для настоящего исследования, посвященного изучению влияния ПЭО-1500 на функции печени и свертываемость крови.

Методы исследования. Опыты проведены на 22 половозрелых кроликах-самцах породы шиншилла, содержащихся на обычной диете вивария. ДЛ-50 определяли методом Дейхмана и Ле Бланка [6], вещество вводили внутривенно в дозах 6,5—11,0 г/кг.

Подострые опыты проведены на 15 кроликах, разделенных на 3 равные группы. ПЭО-1500 вводили внутривенно (через 2 дня в течение месяца в 10%-ной концентрации на 0,9%-ном растворе NaCl) (одной группе животных в дозе 1/30 (266 мг/кг) и другой — 1/20 (400 мг/кг) ДЛ-50, контрольным кроликам — соответствующие объемы 0,9%-ного раствора NaCl. В динамике (до введения ПЭО-1500, через 7; 14 и 30 дней после начала его применения) определяли показатели общего белка (рефрактометрически) и белковых фракций сыворотки крови (электрофорез на бумаге), бромсульфалеиновой (БСФ) пробы [5], тромбоэластограмм (ТЭГ) по Гартерту [7], аланин-трансаминазы (АЛТ) и аспарагин-трансаминазы (АСТ) крови по Райтману и Френкель. Исследование периферической крови (гемоглобин, эритроциты, лейкограмма), определение весовых коэффициентов органов и патологоанатомическое вскрытие животных проведены общепринятыми методами. Органы затем подвергнуты гистологическому и гистохимическому исследованиям, а их результаты приведены в работе В. Ф. Козловой и соавторов, опубликованной в настоящем сборнике. Полученные данные подвергнуты статистической обработке.

Результаты и их обсуждение. В острых опытах установлено, что после внутривенного введения больших доз вещества к концу первого часа развиваются общее угнетение, затем атаксия и к концу второго часа у части животных появляются периодические клонические судороги, нарушение рефлексов положения тела. В летальных случаях гибель кроликов наступает через одни-двое суток. Выжившие животные с конца вторых-третьих суток и в течение последующего 14-дневного периода наблюдения внешне не отличаются от здоровых. Доза ДЛ-50 ПЭО-1500 составила приблизительно 8,0 г/кг.

Патологоанатомическим вскрытием, в числе других изменений, обнаружены выраженная дистрофия печени, реактивное состояние клеток ретикуло-эндотелиальной системы, подтвержденные гистологически, и несвернувшаяся кровь в сосудах.

В подостром эксперименте состояние экскреторной функции печени оценивалось по данным БСФ-пробы. Установлено, что через 30 с после введения БСФ среднее содержание его в крови всех групп кроликов колебалось в пределах $8,4-10,9$ мг%; через 20 мин — $3,6 \pm 1,7-13,0 \pm 3,6\%$ и через 40 мин — $3,4 \pm 1,4-7,5 \pm 2,9\%$ исходного уровня.

Активность АЛТ и АСТ определяли с целью обнаружения возможного проявления «синдрома цитолиза», в понятие которого вкладываются [4] самые различные степени повреждения гепатоцита (от легких нарушений проницаемости мембран до некроза и собственно цитолиза печеночной клетки). Активность АЛТ колебалась в диапазоне $8,48-15,88$, а АСТ — $2,82-9,12$ условных единиц.

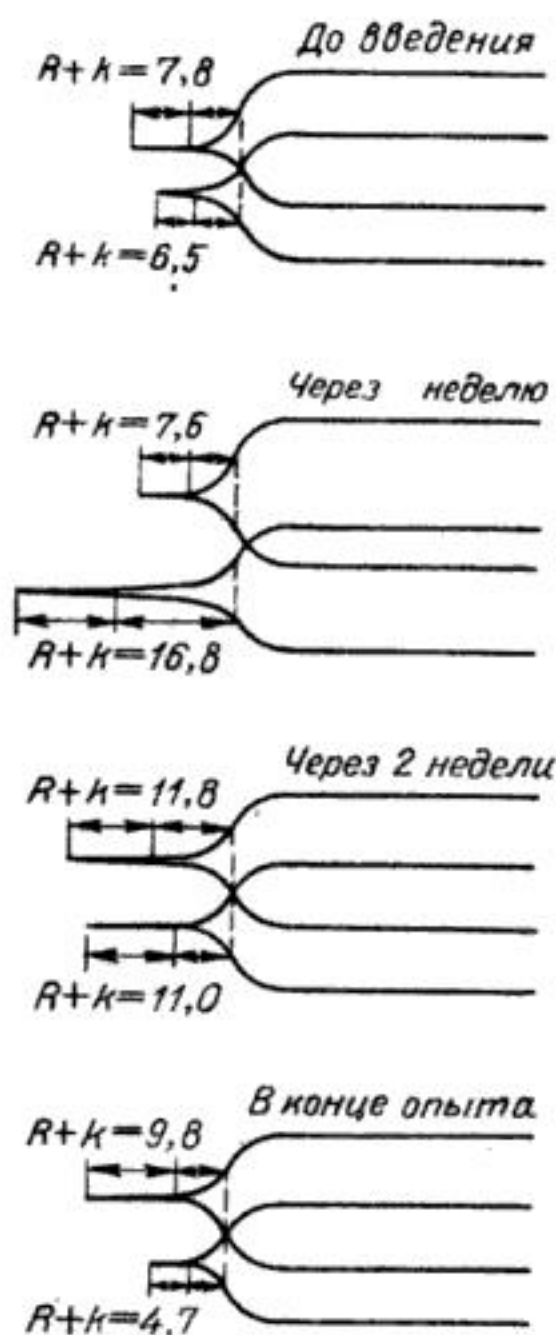
При изучении белокобразующей функции печени по состоянию сывороточных белков обнаружено, что содержание общего белка колебалось в диапазоне $6,94 \pm 0,17-7,58 \pm 0,33\%$; альбуминов — $57,96 \pm 2,0-68,44 \pm 2,8\%$; α -глобулинов — $7,5 \pm 0,36-12,6 \pm 1,06\%$; β -глобулинов — $7,64 \pm 0,78-12,35 \pm 0,84\%$ и γ -глобулинов — $14,8 \pm 1,13-18,97 \pm 0,78\%$. Выявленные колебания этих показателей и альбумино-глобулинового (А/Г) коэффициента обычно не выходили за пределы физиологических [1].

Показатели содержания БСФ и коэффициентов его ретенции, активности АЛТ и АСТ, общего белка и его фракций, А/Г коэффициента сыворотки крови опытных и контрольной групп кроликов статистически значимо не различались между собой во все периоды наблюдения.

Исследование периферической крови не выявило существенных изменений в лейкограмме, содержании гемоглобина, количестве эритроцитов и лейкоцитов. Отмечены лишь незначимая, не выходящая за пределы физиологических колебаний, тенденция к уменьшению числа лейкоцитов к концу эксперимента после введения большей дозы ПЭО-1500 и уменьшение на 2—3% моноцитов.

По данным ТЭГ, на 7-е сутки от начала введения вещества в дозе 1/20 ДЛ-50 выявлены увеличение в среднем по группе в 2,5 раза и по сравнению с контролем в 2 раза константы скорости коагуляции ($R+K$) цельной крови (см. рисунок), характеризующей I—II и начало III фазы свертывания, незначимое уменьшение величины максимальной эластичности сгустка (E) и достоверное ($p < 0,05$) снижение на 50,4—28,3% общего индекса коагуляции (I). К 14-м суткам, несмотря на продолжавшееся введение вещества, указанные изменения резко уменьшались или наступала полная нормализация ТЭГ, а к концу эксперимента отмечено незначимое увеличение свертываемости кро-

Схема тромбозластограмм. Константы скорости коагуляции ($R+k$) в динамике. Средние данные контрольных (верхние контуры) и опытных (введение ПЭО-1500, 1/20 ДЛ-50, нижние контуры) кроликов.



ви ($R+K=72,4\pm14,8\%$ и $I=132,6\pm7,8\%$ исходных величин по группе при полностью нормализовавшемся показателе E):

После введения $1/30$ ДЛ-50 ПЭО-1500 константа $R+K$ достоверно увеличилась лишь на $30\pm15,9\%$ и к 14—30-м суткам составила соответственно $87,3\pm20,5$ — $88,1\pm21,9\%$ исходной величины. К указанным срокам нормализовались и другие показатели ТЭГ.

При патологоанатомическом вскрытии кроликов не выявлено макроскопических признаков изменения структуры печени и других органов, не обнаружено значимых различий весовых коэффициентов печени опытных и контрольных животных.

Результаты исследования позволяют считать, что по данным острой токсичности по классификации секции ПДК [2] ПЭО-1500 следует отнести к малотоксичным веществам. Многократное внутривенное введение вещества в дозах $1/30$ и $1/20$ ДЛ-50 не нарушает изученных функций печеночных клеток и состава периферической крови кроликов, но вызывает умеренное, проходящее, несмотря на продолжающееся введение ПЭО-1500, снижение свертываемости крови, прямо зависящее от дозы криопротектора. Нарушение гемостаза проявляется по типу первичной декомпенсации, позволяющей, по мнению И. В. Саноцкого [3] и других авторов, предполагать, что данная доза (концентрация) близка к порогу хронического действия. Одной из вероятных причин изменения гемостаза, по-видимому, является влияние криопротектора на РЭС ряда органов, участвующих в образовании различных факторов свертывания крови, что согласуется с гистологическими и гистохимическими данными о действии летальных доз вещества.

В итоге можно сделать следующие выводы.

1. По классификации секции ПДК ПЭО-1500 при однократном внутривенном введении в организм относится к группе малотоксичных веществ. ДЛ-50 для кроликов $\approx 8,0$ г/кг.

2. Многократное продолжительное внутривенное введение ПЭО-1500 в дозе $1/30$ и $1/20$ ДЛ-50 в 10%-ных водных растворах не нарушает изученных функций печеночных клеток и состава периферической крови, но может вызвать умеренное непродолжительное снижение свертываемости крови, что необходимо учитывать при использовании ПЭО-1500 в медико-биологической практике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гольдберг Д. И., Гольдберг Е. Д., Шубин Н. Г. Гематология животных. Томск, Изд-во Томского ун-та, 1973. 351 с.
2. Саноцкий И. В., Уланова И. П. Критерии вредности в гигиене и токсикологии при оценке опасности химических соединений. М., «Медицина», 1975. 327 с.
3. Саноцкий И. В. Полная токсикометрия. — В кн.: Методы определения токсичности и опасности химических веществ. М., 1970, с. 50—54.
4. Сучков А. В. О применении исследования активности комплекса ферментов сыворотки крови для диагностики повреждений печени. — Труды по новой аппаратуре и методикам, методы исследования активности некоторых ферментов в клинике, 1967, вып. 6, с. 4—12.
5. Тугаринова В. Н., Миклашевский В. Е., Скобцева Г. Г. Модификация микрометода бромсульфалениновой пробы на экскреторную функцию печени. — Лаб. дело, 1967, № 4, с. 218—220.
6. Елизарова О. Н. Определение пороговых доз промышленных ядов при пероральном введении. М., «Медицина», 1971. 35 с.
7. Довгялло Г., Крыжановский В. Практическое руководство по исследованию свертывающей системы крови в клинике. Минск, «Беларусь», 1969. 71 с.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
22. XII 1976 г.

Н. С. Пушкарь

СООБЩЕНИЕ О 13-м ЗАСЕДАНИИ МЕЖДУНАРОДНОГО ОБЩЕСТВА КРИОБИОЛОГОВ, США

С 1-го по 6-е августа 1976 г. в г. Вашингтоне (США) проводилось 13-е ежегодное собрание общества криобиологов. Программой было предусмотрено 2 симпозиальных и 8 секционных заседаний. Кроме того, была организована выставка современной криогенной аппаратуры производства ведущих фирм США.

Тематика симпозиальных заседаний: криоповреждения и криоконсервация крови. *Тематика секционных заседаний:* криоконсервирование клеток млекопитающих; замораживание эритроцитов; вопросы криоиммунологии; криоконсервирование лейкоцитов и цельной крови; гибернация и гипотермия; криохирургия и перфузия органов; бесклеточные системы и методы; растения, микроорганизмы и беспозвоночные.

Из сообщений, посвященных проблеме низкотемпературного консервирования клеток крови, особый интерес представляют доклады по изучению механизмов клеточных криоповреждений. В докладе Р. Левина, Е. Кравальхо, Ч. Хаггинса (R. Levin, E. Cravalho and C. Huggins) «Влияние концентрационной поляризации растворенных веществ на выживаемость эритроцитов при замораживании» обращено внимание на явление концентрационной поляризации, играющее, по мнению авторов, существенную роль в выживаемости клеток при различных скоростях охлаждения.

Объектом исследования служили эритроциты человека в водных растворах NaCl. При увеличении скорости охлаждения (500° в 1 мин) отмечается значительная поляризация внутриклеточных веществ вследствие повышения вязкости содержимого клетки и нарушения в ней диффузионных процессов. При этом происходят перераспределение электролитов внутри клеток, осаждение их на внутренних поверхностях мембран, усиливается льдообразование внутри клеток, что в итоге приводит к гибели клеток. В двух докладах Х. Соузу, П. Мазура, У. Ралла (H. Souzu, P. Mazur and W. Rall) по общему вопросу «Корреляция между выживаемостью медленно замороженных эритроцитов человека и составом незамороженной части внеклеточной среды при различных субнулевых температурах» было показано, что гемолиз эритроцитов существенно зависит от скорости охлаждения, концентрации глицерина и скорости отогрева в разных температурных пределах. Оказалось, что при высоких концентрациях глицерина (2,5—3 М) после замораживания до -100° выживаемость становится независимой от скорости отогрева, как и при малых концентрациях криопротектора в диапазоне температур от -20 до -35° C.

Анализ фазовых диаграмм растворов глицерина, NaCl и выживаемости эритроцитов показал, что между температурой, вызывающей 50%-ный гемолиз, и концентрацией электролитов при различных концентрациях глицерина имеется низкая зависимость. При увеличении концентрации глицерина эритроциты погибают при все более низких концентрациях NaCl. Предполагается существование некоторой зависимости между гемолизом эритроцитов и фракций незамерзшей воды.

Т. Ней (T. Nei) в докладе «Влияние исходной концентрации клеток на гемолиз замороженных эритроцитов после оттаивания» привел дополнительные данные о том, как при медленном замораживании клетки концентрируются в узких незамерзших каналах, окруженных льдом, а при быстром — равномерно распределяются в твердой фазе.

Дж. Мак-Грат, Е. Кравальхо, Ч. Хаггинс (J. McGrath, E. Cravalho, C. Huggins) изучали механизм гипертонического гемолиза с помощью специально созданной оптической термостатирующей системы, позволяющей снизить число ошибок, связанных с центрифугированием материала. Изучению зависимости сохранности эритроцитов от осмотических процессов и кинетики проницаемости были посвящены доклады Р. Уильямса, Х. Меримена (R. Williams, H. Meruman) «Осмотическое проявление температурного шока в эритроцитах человека» и П. Мазура, Р. Миллера (P. Mazur, R. Miller) «Использование коэффициентов проницаемости для прогнозирования осмотического поведения эритроцитов человека при удалении глицерина из клетки». Авторы представили дополнительные сведения о характере осмотических явлений в клеточной мембране в процессе низкотемпературного консервирования эритроцитов.

Т. Папанек, М. Робинс, Ч. Хаггинс, Е. Кравальхо (T. Papenek, M. Robbins, C. Huggins, C. Cravalho) с помощью специального аппарата, позволяющего исследовать процессы в остановленном потоке и последующей обработкой результатов на ЭВМ, показали, что проникновение глицерина в эритроциты несколько больше, чем предполагалось ранее на основании проведенных измерений. Добавление к клеткам раствора цитрат-фосфатглюкозы снижает проницаемость клеток для глицерина.

Два доклада были посвящены дальнейшему изучению механизмов криозащитного действия экстрацеллюлярных криопротекторов: Р. Уильямса (R. Williams) «Предлагаемый механизм криозащиты» и Е. Аллена, Л. Уэзерби, П. Пермоуда (E. Allen, L. Weatherbee, P. Permoad) «Ультроструктурные исследования эритроцитов при консервировании с гидроксипропиловым крахмалом».

Результаты изучения возможности длительного хранения деглицеринизированных эритроцитов были изложены в докладе Баттона и Кевы (Button, Kevy) «Длительное хранение деглицеринизированных эритроцитов». Для восстановления морфофункциональной полноценности деглицеринизированных эритроцитов авторы применяли среды, содержащие инозин, что обеспечивало 3-дневное хранение восстановленных эритроцитов для последующих трансфузий. С. Сумида (S. Sumida) представил доклад на тему «Замороженная кровь и гепатит», в котором на большом клиническом материале показал, что отмывание и деглицеринизация клеток дают возможность значительно снизить частоту возникновения посттрансфузионного гепатита. Автор пришел к выводу, что длительно хранить в замороженном состоянии следует донорскую кровь, имеющую отрицательную реакцию по австралийским антигенам А и А и с нормальным уровнем трансаминаз. Особый интерес представлял доклад Дж. Стаплеса (J. Staples) «Применение пакетов замороженных эритроцитов детской крови», употребляемых для переливания недоношенным детям, а также в практике неонатальной и детской хирургии. Автор провел 354 трансфузии 170 реципиентам и допускает, что детская кровь содержит биологические стимуляторы, обеспечивающие ее высокую терапевтическую активность.

В сообщении Б. Савье, У. Ханна (B. Sawyer, W. Hann), посвященном изучению механизмов сенсibilизации реципиентов лейкоцитарными антигенами, показано, что лейкоциты оттаянной и деглицеринизированной крови могут вызвать определенный иммунный ответ у нормальных лимфоцитов в смешанной культуре. Подобная реакция обнаружена у реципиентов после переливания иммунокомпетентных клеток замороженной крови.

Доклады, посвященные проблемам криоиммунологии, отражали в основном следующие направления исследований: совершенствование методов криоконсервации лимфоцитов периферической крови; изуче-

ние влияния исходного функционального состояния клеток на результаты криоконсервации; изучение функциональных свойств криоконсервированных лимфоидных клеток; изучение возможных перестроек поверхностных мембран криоконсервированных клеток; использование криоконсервированных клеток на практике.

Были также представлены уже известные и ранее опубликованные результаты по совершенствованию методов низкотемпературной консервации лимфоцитов периферической крови. В частности, в сообщении Стеллы Найт, Дж. Фарранта, Л. Мак-Ганна (Stella C. Knight, J. Farrant, L. McGann) изложен метод консервации лимфоцитов периферической крови по двухэтапной программе аутологичных сыворотках, полученных из почки и крови теленка без криопротекторов. Авторы оценивали результаты в деконсервированных образцах по количеству клеток, способных реагировать на ФГА. Показано, что замораживание лимфоцитов в указанных выше средах способствует сохранению количества ФГА-отвечающих клеток в пределах 60%. Близкие результаты получены при замораживании лимфоцитов в образцах цельной крови. Авторы считают предложенные среды перспективными для криоконсервации лимфоцитов, поскольку при этом можно применять криопротекторы и снизить таким образом дополнительные токсические эффекты, связанные с преинкубацией клеток с тем или иным химическим криозащитным соединением.

В противоположность этим данным Ф. Л. Данкберг, М. К. Персидский, Р. Спранг и Л. Олсон (F. Dankberg, M. Persidsky, R. Sprung, L. Olson) сообщили, что добавление 10%-ной аутологичной сыворотки или плазмы к среде консервации гранулоцитов в присутствии 80%-ного ДМСО не предохраняет клетки от повреждения клеточных мембран, причем эффект повреждения возрастает пропорционально увеличению концентрации сыворотки и плазмы.

Влияние исходного состояния лимфоидных клеток на эффективность консервации было рассмотрено в сообщении Р. Уида, Е. Дженкинса (R. Weed, E. Jenkins). На основании результатов исследований авторы приходят к выводу, что предшествующая стимуляция лимфоцитов фитогемагглютинином не оказывает влияния на эффективность консервации и не способствует повышению криопротективного действия применявшегося ДМСО.

Результаты, представленные в серии докладов по изучению функциональной активности лимфоидных клеток, консервированных под защитой различных криопротекторов, свидетельствуют о том, что наиболее широко распространенными тестами оценки жизнеспособности клеток являются прежде всего методы суправитального окрашивания с помощью трипанового синего, тест по определению трансформирующей активности клеток с помощью ФГА, конканавалина А в смешанной культуре лимфоцитов, тест по определению способности к ризеткообразованию.

В сообщении Д. Бриана, Т. Фуллера, Ч. Хагинса (D. Bryan, T. Fuller, C. Huggins) показано, что при консервации лимфоцитов в 50%-ной среде RPMI с добавлением 10%-ного ДМСО и 40% аутологичной оттаянной либо лишенной γ -глобулина сыворотки человека после оттаивания сохраняется тот же процент ризеткообразующих Т-клеток (имеющих СЗ-комплемент-рецептор на поверхности) и клеток, обладающих Ig-рецепторами на поверхности (В-клетки), что и в незамороженных образцах. Интенсивность включения ^3H -тимидина после стимуляции конканавалином А определялись на 2 ч раньше, чем в свежих образцах, но выраженность максимума ответа и количество митозов были снижены по сравнению с аналогичными показателями в контроле. При этом с помощью электронной микроскопии выявлены структурные изменения мембран. Лимфоциты сохраняли свою транс-

формирующую активность при замораживании под защитой 7,5%-ного ДМСО и в присутствии 15%-ной человеческой сыворотки спустя 6 месяцев хранения их в жидком азоте.

Судя по доложенным результатам, криоконсервированные лимфоциты переливали онкологическим больным для определения состояния их иммунологической активности.

В докладе Дж. Фарранта и Стеллы Найт (J. Farrant, Stella C. Knight) представлены результаты исследований по изучению характера перестроек плазматических мембран асцитных клеток после криоконсервирования. Показано, что антигенный спектр мембран клеток не изменялся, в результате чего при введении их животным каких-либо иммунных перестроек у реципиента выявить не удалось.

На секции «Бесклеточные системы и методы» была представлена небольшая группа докладов, посвященных исследованию физико-химических процессов, происходящих при замораживании биологических объектов.

В докладе Дж. Боста, М. Динвита (J. Baust, M. Dinvite) «Предварительные исследования по диффузному проникновению криозащитных агентов через лед» представлены данные по изучению глубины проникновения криопротекторов в образцы льда, полученные из дегазированной тридистиллированной воды. Показано, что глубина проникновения — функция времени, внешнего давления и размера молекулы при данной температуре.

Поскольку вымерзание льда в образце сопровождается накоплением растворенных веществ в остаточной жидкости, изучение величины диффузии криозащитных веществ через твердую фазу, по нашему мнению, важно для анализа процессов массопереноса при замораживании биологических объектов и изменений, происходящих в образце во время хранения его при различных температурах.

В докладе М. Л. Шепарда, Р. И. Познера и Ф. Х. Кокса (M. Shepard, R. Pozner, F. Cocks) «Тепловые свойства равновесного и неравновесного состояния водных трехкомпонентных растворов на сложных физиологических средах, содержащих ДМСО и глицерин» методом дифференциально-термического анализа изучалась диаграмма фазового равновесия между концентрированным внеклеточным раствором и образующимся льдом. В этих исследованиях внеклеточный раствор моделировался (NaCl+глицерин, NaCl+ДМСО на среде Игла или среде Игла с добавкой 20%-ной сыворотки (по объему) зародыша теленка). В работе также получены численные оценки тенденций стеклообразования в этих средах. Показано, что неравновесное и равновесное термодинамическое поведение в указанных растворах лишь незначительно отличается от поведения аналогичных растворов, приготовленных на чистой воде. Эти исследования позволяют сделать вывод о возможности использования диаграмм равновесия между кристаллами льда и водным раствором криопротектора для анализа процессов, сопровождающих замораживание биологических объектов.

В докладе К. Диллера (K. Diller) «Термодинамические модели замораживания клеток» разработаны две физико-математические модели, описывающие влияние клеток в процессе замораживания на существенные факторы, сопутствующие процессу криоконсервирования. Первая модель криоконсервирования состояла из бинарной системы NaCl—вода. Вторая, более общая модель учитывает наличие внутриклеточных криозащитных веществ и возможность их проникновения в клетку в процессе замораживания. Описывается влияние двухэтапного охлаждения, нелинейности скорости охлаждения, переохлаждения внеклеточного раствора и изменения проницаемости на прогрессивное обезвоживание клеток при разных режимах замораживания. Подход к анализу процесса обезвоживания и других явлений, избранный Дил-

лером, представляется нам целесообразным и полезным, поскольку отражает современные представления и методы к анализу основных параметров, сопровождающих замораживание биологических объектов.

В докладе М. О'Каллагана, Е. Кравальхо, Г. Хагинса (M. O'Callaghan, E. Cravalho, C. Huggins) «Модель тепло- и массопереноса при замораживании биоматериала» с целью выделения главных параметров низкотемпературной консервации обсуждались результаты моделирования на ЭВМ процессов тепло- и массопереноса при замораживании тканей. Модель ткани состояла из блоков кубических клеток, разделенных каналами. Предполагалось, что лед тает в этих каналах, вызывая обезвоживание прилегающих к ним клеток. Рассчитанные на ЭВМ поля температуры и концентрации как функции времени использовали в модели Левина для определения объема клетки и степени ее переохлаждения, а также распределения растворенных веществ. Последние учитывались для построения показателя сохранности клеток в разных точках образца. Авторы считают, что предложенная ими модель может быть использована для установления оптимальных температурных режимов при замораживании тканей. Необходимо отметить, что данная работа посвящена малоисследованному вопросу, который недостаточно четко сформулирован в современной криобиологической литературе. Имеется в виду проблема управления процессом замораживания биологического материала, которая осложнена возникновением значительных пространственных физико-химических неоднородностей в ходе замораживания, а также отогрева биоматериала. В связи с этим режим консервации не может быть задан достаточно полно такими параметрами, как скорость охлаждения, скорость отогрева, температура и т. д., поскольку эти величины различны в разных точках образца. Использование методов физико-математического моделирования процессов тепло- и массопереноса представляется нам перспективной проблемой криобиологии. К недостаткам доклада М. О'Каллагана (M. O'Callaghan) следует отнести то, что принятая в нем модель замораживаемой ткани не учитывает возможности механического повреждения клеток растущими кристаллами льда и внутриклеточной кристаллизации, что суживает область использования модели для случаев медленного замораживания. По проблеме «Гибернация и Гипотермия» несколько докладов было посвящено методическим вопросам индукции гибернации у животных и исследованию поведенческих реакций животных в период гибернации: Х. Музачча, У. Вокерта и Д. Диверса (X. Musacchia, W. Vokert, D. Deavers) «Модель гибернации при гипотермии, вызванной гелотан-гелоксом» (Halothane-Helox); Дж. Нока, Дж. Сентурия (J. Nock and J. Senturia) «Геливая гипотермия у *Marmota monax*»; Ф. Сауса, Р. Льюха и М. Задмана (F. South, R. Luescke, M. Zatzman) «Сон и активность сурка во время вхождения в зимнюю спячку». Существенный интерес представляют доклады об экспериментальных исследованиях по применению гипотермии в качестве фактора, потенцирующего влияние противоопухолевых средств и снижающего токсическое действие химиопрепаратов по отношению к костному мозгу: Ч. Саттона (C. Sutton) «Усиление поглощения антинеопластических агентов при гипотермии опухоли, индуцированной микроволнами, и глиомы мышей».

П. Поповича, Р. Шаффера и В. Поповича (P. Popovic, R. Schaffer, V. Popovic) «Предохранение костного мозга от токсичности ВС и с помощью гипотермии». Из сообщений, доложенных на заседании секции «Растения, микроорганизмы и беспозвоночные» заслуживают внимания работы по замораживанию простейших, поскольку надежных методов консервации этих микроорганизмов к настоящему времени нет.

В частности, в докладе И. Уильсона, Дж. Фарранта (I. Wilson, J. Farrant) «Хранение плазмодий *Knowlesi* при двухэтапном замора-

живании» представлены данные по изучению биологических свойств малярийных плазмодиев, хранившихся в жидком азоте. Показано, что криоустойчивость плазмодиев повышается при холодовом закаливании (-25 , -27°).

В докладе Ф. Симиона и П. Даджета (F. Simione, P. Dugget) «Успешная криоконсервация Suctorian Ciliate» показана возможность хранения при -196°C в биологически полноценном состоянии инфузорий Suctorian Ciliate.

На выставке криомедицинского оборудования наиболее полно была представлена аппаратура фирмы Юнион Карбид. Фирмой продемонстрированы экспонаты, ранее привозившиеся в СССР на выставку «Здравоохранение-74». Фирма рекламирует образцы, среди которых мировое признание получили сосуды Дьюара и хранилища для биообъектов. Представленные фирмой образцы выпускаются серийно, экспортируются во многие страны, в том числе и в СССР. Изделия фирмы весьма технологичны в изготовлении, имеют хорошие медико-технические данные. Фирма МВЕ экспонировала изделия, по своим данным в основном весьма близкие к изделиям фирмы Юнион Карбид.

Анализ докладов, представленных на 13-м ежегодном заседании Общества криобиологов, позволяет прийти к выводу о достаточно высоком методическом уровне и существенной научной значимости исследований, проводимых за рубежом и охватывающих практически все проблемы криобиологии и криомедицины.

Интересно прежде всего дальнейшее развитие теоретических исследований по физико-математическому моделированию механизмов криоповреждения с привлечением для этих целей электронно-вычислительных машин, что успешно до настоящего времени разрабатывалось П. Мазуром (P. Mazur) и его сотрудниками. В этом отношении необходимо отметить значительную методологическую общность подхода к анализу процессов, сопровождающих низкотемпературную консервацию биологических объектов, в указанных выше докладах с исследованиями, проводимыми в нашей стране, например, в Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР. Кроме того, в настоящее время в этом институте сформулирована задача управления низкотемпературным консервированием клеточных взвесей и приведены данные поисковой работы по решению этого вопроса методом физико-математического моделирования. Постановка и решение этой задачи для более высоких уровней биологической организации — задача будущего.

Следует отметить дальнейшее расширение исследований за рубежом по вопросу изучения характера перестроек плазматических мембран лимфоидных клеток и состояния мембранных рецепторов под действием низких температур, сравнительное изучение криочувствительности отдельных популяций и субпопуляций лимфоидных клеток.

Необходимо отметить высокий уровень аппаратного оснащения в автоматизации большинства экспериментальных криобиологических исследований, проводимых за рубежом, что позволяет существенно сократить сроки эксперимента и внедрения результатов исследований в практику.

Анализ выставки криогенного оборудования, экспонировавшегося для участников Общества криобиологов, свидетельствует о большой номенклатуре и высоком качестве изделий, выпускаемых фирмами США. Продукция фирм широко используется в практике медицины и биологии, что указывает на целесообразность и рентабельность ее применения. Криогенное оборудование и аппаратура производятся на специализированных, хорошо технически оснащенных предприятиях, в связи с чем изделия фирм по своей стоимости не имеют конкурентов.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
6. XII. 1976 г.

СОДЕРЖАНИЕ

ВОПРОСЫ КРИОПОВРЕЖДЕНИЙ И КРИОЗАЩИТЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ	
Белоус А. М., Бондаренко В. А., Бондаренко Т. П. Биохимическая модификация липидов биомембран как причина гибели клеток при низкотемпературном консервировании	3
Бондаренко В. А., Бондаренко Т. П., Белоус А. М. Взаимодействие полиэтиленоксидов с искусственными фосфолипидными и митохондриальными мембранами	7
Кравченко Л. П. Влияние криопротекторов на стабильность лизосом в условиях медленного замораживания	9
Кудокоцева Е. В. Влияние медленного замораживания на перекисное окисление липидов мембран и гидроксилазную активность микросом из печени крысы	11
Медведев В. М., Галка Н. И., Северин Н. Ф., Гарбуз В. И. Влияние азотной, гелиевой и кислородной сред на окислительные процессы в олеиновой кислоте как модели биологического окисления	13
Моисеев В. А., Манк В. В., Зинченко А. В., Зинченко В. Д. О состоянии воды в растворах лизина	15
Морозова Т. Ф., Микулинский Ю. Е., Моисеев В. А. Влияние полиэтиленоксида на спектры поглощения некоторых глобулярных белков	17
Осипенко А. П. Исследование проницаемости ^{22}Na и фосфолипидного состава мембран эритроцитов человека, подвергнутых ионизирующей радиации в замороженном состоянии	20
Сахнович В. М., Лемешко В. В. Оценка жизнеспособности почки после перфузии и замораживания—оттаивания по энергозависимым окислительно-восстановительным превращениям пиридиннуклеотидов	22
Суббота Н. П. Влияние состава среды и условий хранения на изменение концентрации цитохромов в гомогенатах коры почки крысы	25
Утевский А. М., Чуйко В. А., Губина Н. Ф., Онуфриева Г. А., Фенченко Н. Н., Петренко Г. П. Влияние низких температур и криопротекторов на активный захват нейромедиаторов тромбоцитами и <i>vas deferens</i>	27
Журавлев В. С. Ультраструктурные изменения в эндотелии криоконсервированных роговиц человека. I. Влияние времени хранения до замораживания	29
Эренпрейс Я. Г., Зирне Р. А. Влияние глубокого замораживания и оттаивания клеток асцитной гепатомы Зайделя крыс на ультраструктуру ядер	31
Юрченко Т. Н. Влияние температурных режимов на активность некоторых ферментов на криостатных срезах	35
НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЕ КОНСЕРВИРОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ	
Шраго М. И., Бредихина Л. П., Тимченко В. Г., Лубяный В. Г., Легостаева Е. Г., Кононов Ю. В., Трушков В. М. Полиэтиленоксиды в низкотемпературном консервировании эритроцитов (некоторые итоги и перспективы)	38
Гольцев А. Н. Влияние трансплантации нативного и деконсервированного костного мозга на содержание бляшкообразующих клеток в селезенках летально облученных реципиентов	45
Цуцаева А. А., Попов Н. Н., Воскобойникова Т. Н. Изучение влияния низкотемпературного консервирования на функциональную активность тимоцитов	47
Цуцаева А. А., Попов Н. Н., Воскобойникова Т. Н. Влияние низких температур и криопротектора ПЭО-400 на морфо-функциональные свойства клеток лимфатических узлов	50
Воскобойникова Т. Н., Гордиенко Е. А. Влияние режимов замораживания на некоторые показатели морфо-функциональной сохранности тканевых лимфоцитов	52
Корчиков С. Д., Воротилин А. М., Гордиенко Е. А. Замораживание эритроцитов в присутствии низкомолекулярных криопротекторов	54

Лобынцева Г. С., Вишневский В. И., Марценюк В. Ф., Гордиенко О. И. Изучение влияния ультразвука на эритроциты с применением математических методов планирования эксперимента	57
Маркова О. П., Обозная Э. И., Лакиза Б. С., Комлик П. В., Морозов И. А. Сравнительная оценка морфо-функционального состояния ядерных клеток посмертного костного мозга, полученного различными способами, криоконсервированных для клинических целей	59
Тимошенко Ю. П., Костарев Б. Д., Пахомова И. С. Размораживание биологических объектов СВЧ-энергией. VI. К вопросу возникновения локального нагрева	60
Тимошенко Ю. П., Лобынцева Г. С., Полякова А. И., Тимченко В. Г. Исследование процесса размораживания клеточных суспензий	64
Сафонова Т. С., Маркова В. М., Мануильский В. Д. Влияние низких температур на бактерии <i>E. coli</i> В/гWP2hcr+try-	66
Козлова В. Ф., Гучок М. М., Щетинский И. М., Верховский Б. А. Патоморфологическая оценка влияния криопротектора—полиэтиленоксида молекулярного веса 1500 — на организм животных	68
Гучок М. М., Верховский Б. А., Мазалов В. К., Сигал Н. С., Элькина Л. З. О влиянии полиэтиленоксида молекулярного веса 1500 на функции печени и свертываемость крови	71
Пушкарь Н. С. Сообщение о 13-м заседании международного Общества криобиологов, США	74

КРИОБИОЛОГИЯ И КРИОМЕДИЦИНА. ВЫПУСК 4

Печатается по постановлению ученого совета
Института проблем криобиологии и криомедицины АН УССР

Редактор Е. Т. Тальнова. Художественный редактор Р. И. Калыш.
Технический редактор В. И. Самборук. Корректоры М. Т. Кравчук, Э. Я. Белокопытова

Информ. бланк № 1678.

Сдано в набор 9. 09. 77. Подп. в печ. 27. 12. 77. БФ 01316. Формат 70×108/16. Бумага типогр. № 1.
Лит. гарн. Выс. печ. Усл. печ. л. 8,05. Уч.-изд. л. 8,19. Тираж 1000 экз. Заказ 3586. Цена
1 руб. 20 коп.

Издательство «Наукова думка», 252601, Киев, ГСП, Репина, 3.
Областная книжная типография Львовского областного управления по делам издательств,
полиграфии и книжной торговли, Львов, Стефаника, 41.

УДК 57:536.48.047:578,088:576,311:612,35

Биохимическая модификация липидов биомембран как причина гибели клеток при низкотемпературном консервировании. Белоус А. М., Бондаренко В. А., Бондаренко Т. П. — Криобиология и криомедицина, 1978, вып. 4, с. 3—6.

Замораживание и последующий отогрев изменяют состояние мембран митохондрий. При этом существенное значение имеют режимы замораживания и отогрева. Делается вывод, что низкотемпературное воздействие на клетки может привести к существенным изменениям их фосфолипидного состава, проницаемости и осмотическому лизису при отогреве. Поэтому биохимическая модификация в составе липидов — важная причина гибели клеток при их деконсервировании.

Ил. 3. Табл. 1. Список лит.: 17 назв.

УДК 578,088:576,311:612,35

Взаимодействие полиэтиленоксидов с искусственными фосфолипидными и митохондриальными мембранами. Бондаренко В. А., Бондаренко Т. П., Белоус А. М. — Криобиология и криомедицина, 1978, вып. 4, с. 7—9.

Исследовалось влияние полиэтиленоксидов (ПЭО) различных молекулярных весов на состояние мембран липосом и митохондрий печени крыс. Показано, что ПЭО с молекулярным весом 400 и выше способен существенно усилить активирующее действие ионов Fe^{2+} на хемилюминесценцию суспензии липосом и митохондрий. Активирующее действие ПЭО-400 коррелирует со способностью лабилизировать мембраны митохондрий, что выражается в повышении экстрактивности мембранных липидов.

Ил. 3. Список лит.: 9 назв.

УДК 576.343.577 15:616—001.19

Влияние криопротекторов на стабильность лизосом в условиях медленного замораживания. Кравченко Л. П. — Криобиология и криомедицина, 1978, вып. 4, с. 9—11.

Замораживали суспензию изолированных лизосом в присутствии криопротекторов (ПЭО-400, глицерина, ОЭГ, ДМСО) со скоростью $1^\circ C$ в 1 мин до $-30^\circ C$. Показателем повреждения мембран лизосом служило определение уровня неседиментируемой активности маркерных ферментов (кислых РНКазы, ДНКазы, катепсинов и фосфатазы) в среде замораживания. Показано, что в присутствии защитных соединений значительно сохраняется структура лизосом, о чем свидетельствует меньший уровень солюбилизации белков-ферментов.

Ил. 1 Табл. 1. Список лит.: 2 назв.

УДК 57:536.48.047:612.015.11

Влияние медленного замораживания на перекисное окисление липидов мембран и гидроксилазную активность микросом из печени крысы. Кудкоцева Е. В. — Криобиология и криомедицина, 1978, вып. 4, с. 11—13.

Исследовано влияние медленного замораживания со скоростью $1^\circ C$ в 1 мин до $-25^\circ C$ на активность перекисного окисления липидов микросом и на скорость окисления микросомами НАДФН и субстрата микросомального окисления — 4-диметиламинохалкона (ДМХ). Показано, что под влиянием замораживания накопление малонового диальдегида не изменяется. Скорость окисления микросомами экзогенного НАДФН остается на прежнем уровне, а скорость окисления ДМХ при тех же условиях замораживания снижается на 48%. Некоторое нарушение структуры и функции мембраны происходит в результате повреждающих факторов замораживания.

Табл. 1. Список лит.: 8 назв.

УДК 57:536.48.047

Влияние азотной, гелиевой и кислородной сред на окислительные процессы в олеиновой кислоте как модели биологического окисления. Медведев В. М., Галка Н. И., Северин Н. Ф., Гарбуз В. И. — Криобиология и криомедицина, 1978, вып. 4, с. 13—15.

Приведены результаты исследования влияния азотной, гелиевой, воздушной и кислородной сред на окислительные процессы, протекающие в олеиновой кислоте, используемой в качестве модели липидного окисления. В спектре собственного излучения олеиновой кислоты обнаружено четыре максимума в области 510—640 нм. Их вершины лежат в районе 510; 555; 615 и 630 нм. Ширина двух первых на уровне 0,5 порядка 50 нм, а двух последних — 15 нм.

Ил. 3. Список лит.: 2 назв.

УДК 57:536.48.047:547:96+543.3:536.48

О состоянии воды в растворах лизина. Моисеев В. А., Манк В. В., Зинченко А. В., Зинченко В. Д. — Криобиология и криомедицина, 1978, вып. 4, с. 15—17.

На основании анализа спектров ЯМР растворов лизина в диапазоне температур от 20 до -30°C показано, что для некоторого интервала концентраций при размораживания интенсивность линии воды изменяется с изменением температуры по другому закону, чем при замораживании, что связано с образованием участков повышенной концентрации растворенного вещества. В замороженных водных растворах остаются подвижными при -30°C примерно 0,8 г воды на 1 г лизина.

Ил. 1. Список лит.: 7 назв.

УДК 57:536.48.047:574.96:543.42:541.49

Влияние полиэтиленоксида на спектры поглощения некоторых глобулярных белков. Морозова Т. Ф., Микулинский Ю. Е., Моисеев В. А. — Криобиология и криомедицина, 1978, вып. 4, с. 17—20.

Изучалось плавление глобулярных белков — трипсина и γ -глобулина — методами спектрофотометрии в водно-полиэтиленоксидных смесях различной концентрации, а также при разных денатурирующих воздействиях на белковую макромолекулу. Обсуждаются возможные конформационные изменения белковых макромолекул, возникающие при действии ПЭО-400.

Ил. 1. Список лит.: 9 назв.

УДК 536.48:612.111:539.16

Исследование проницаемости ^{22}Na и фосфолипидного состава мембран эритроцитов человека, подвергнутых ионизирующей радиации в замороженном состоянии. Осипенко А. П. — Криобиология и криомедицина, 1978, вып. 4, с. 20—22.

Исследованы фосфолипидный состав и проницаемость мембран эритроцитов после замораживания—отогрева, облучения и сочетанного их действия. Показано, что фосфолипидный состав изменяется в большей степени от замораживания—отогрева, чем от облучения дозами 2000 и 4000 р. Проницаемость мембран эритроцитов для ионов натрия увеличивается пропорционально дозе облучения при 4°C и является довольно чувствительной к замораживанию—отогреву. При облучении эритроцитов в замороженном состоянии изменение проницаемости мембран этих клеток менее выражено, что предполагает возрастание резистентности эритроцитов в данных условиях к облучению.

Ил. 2. Список лит.: 10 назв.

УДК 57:537.48.047:612.46:615.014.41:577.15:536.48

Оценка жизнеспособности почки после перфузии и замораживания—оттаивания по энергезависимым окислительно-восстановительным превращениям пиридиннуклеотидов. Сахнович В. М., Лемешко В. В. — Криобиология и криомедицина, 1978, вып. 4, с. 22—25.

Показано, что превращения пиридиннуклеотидов, измеряемые в гомогенатах коры почки кролика флуорометрическим методом, могут служить объективным тестом для оценки функционального состояния митохондрий органов после воздействия на них различных крипротекторов, перфузионных сред и низких температур. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что 15%-ный ПЭО-400 не сохраняет энергопродуцирующую систему почек, подвергнутых глубокому замораживанию. ДМСО обеспечивает практически полное сохранение энергопродуцирующей системы митохондрий при глубоком замораживании почки, и это позволяет делать оптимистические прогнозы о принципиальной возможности сохранения жизнеспособности органов при глубоком замораживании и отогреве.

Ил. 3. Список лит.: 6 назв.

УДК 57:536.48.047.612.015.11

Влияние состава среды и условий хранения на изменение концентрации цитохромов в гомогенатах коры почки крысы. Суббота Н. П. — Криобиология и криомедицина, 1978, вып. 4, с. 25—27.

Исследовали изменение концентрации переносчиков электронов — цитохромов a и $c+c_1$ — при различных сроках и условиях хранения гомогенатов коры почки крысы. Установлено, что лучшими условиями для хранения биоматериала являются анаэробные, хотя исследованные в работе комбинации сред не обеспечивали сохранение концентрации указанных выше цитохромов на высоком уровне.

Список лит.: 4 назв.

УДК 57:536.48.047:612.11.7.444.616.4:541.49

Влияние низких температур и криопротекторов на активный захват нейромедиаторов тромбоцитами и vas deferens. Утевский А. М., Чуйко В. А., Губина Н. Ф., Онуфриева Г. А., Фенченко Н. Н., Петренко Г. П. — Криобиология и криомедицина, 1978, вып. 4, с. 27—29.

Исследовалось влияние криопротекторов и криоконсервирования на процессы активного захвата медиаторов — серотонина тромбоцитами и норадреналина семявыносящим протоком. Обнаружена высокая криолабильность механизма поглощения медиатора тромбоцитами и относительная криоустойчивость у семявыносящего протока. Приводится обсуждение полученных данных и высказывается предположение о возможном значении для полноценной реституции деконсервированных объектов механизмов нейрогуморальной регуляции.

Ил. 2. Список лит.: 3 назв.

УДК 611.841.2.018.74:615.014.41:536.48.533.3

Ультраструктурные изменения в эндотелии криоконсервированных роговиц человека. I. Влияние времени хранения до замораживания. Журавлев В. С. — Криобиология и криомедицина, 1978, вып. 4, с. 29—31.

Показана зависимость между степенью ультраструктурных изменений в эндотелии роговиц, криоконсервированных с полиэтиленоксидом (-196°C), и развитием посмертных (8 и 24 ч) изменений перед консервированием. Высказывается предположение о необходимости для достижения лучшей ультраструктурной сохранности использовать роговицы со сроком хранения после смерти менее 8 ч.

Ил. 1. Список лит.: 8 назв.

УДК 57:536.48.047

Влияние глубокого замораживания и оттаивания клеток асцитной гепатомы Зайделя крыс на ультраструктуру ядер. Эренпрейс Я. Г., Зирне Р. А. — Криобиология и криомедицина, 1978, вып. 4, с. 31—35.

На основании исследования электронно-микроскопической структуры ядер гепатомы Зайделя показано изменение после замораживания—оттаивания конденсации хроматина, предотвращаемое инкубацией с гепарином и, согласно предположению авторов, связанное с изменением взаимоотношения гистонов с ДНК.

Ил. 2.

УДК 57:536.48.047:574.24.043:617.7

Влияние температурных режимов на активность некоторых ферментов на криостатных срезах. Юрченко Т. Н. — Криобиология и криомедицина, 1978, вып. 4, с. 35—37.

Приведены сведения о состоянии некоторых окислительно-восстановительных ферментов в ткани роговой оболочки при различной температуре получения срезов. В качестве криозащитного вещества использован полиэтиленоксид. Обнаружено его влияние на уровень интенсивности реакции. Полученные данные вносят необходимую коррекцию в условия получения криостатных срезов.

Список лит.: 9 назв.

УДК 57:536.48.047:541.64:547.422:615.387

Полиэтиленоксиды в низкотемпературном консервировании эритроцитов (некоторые итоги и перспективы). Шраго М. И., Бредихина Л. П., Тимченко В. Г., Лубяный В. Г., Легостаева Е. Г., Кононов Ю. В., Трушков В. М. — Криобиология и криомедицина, вып. 4, с. 38—45.

Показаны действие ПЭО различного молекулярного веса на эритроциты, а также их криозащитная активность. Состояние клеточного статуса оценивалось по комплексу функциональных показателей. Лучшие результаты достигнуты с криопротектором ПЭО-1500. Обсуждаются вопросы, возникающие при использовании в криоконсервировании экзоцеллюлярных криопротекторов — обеспечение стерильности материала, опасность переноса инфекции и др.

Ил. 1. Табл. 3. Список лит.: 7 назв.

УДК 57:536.48.047

Влияние трансплантации нативного и деконсервированного костного мозга на содержание бляшкообразующих клеток в селезенках летально облученных реципиентов. Гольцев А. Н. — Криобиология и криомедицина, 1978, вып. 4, с. 45—47.

Настоящая статья посвящена сравнительному изучению динамики накопления БОК в селезенках летально облученных реципиентов, защищенных деконсервированным и нативным костным мозгом. Представленные результаты свидетельствуют о том, что трансплантация сингенного деконсервированного и нативного костного мозга способствует восстановлению иммунного ответа к эритроцитам барана у летально облученных реципиентов, однако это восстановление не является полным в течение длительного времени и через 2 месяца составляет 73% уровня их содержания в селезенках необлученных животных. Введение с костным мозгом сингенных тимоцитов ускоряет накопление БОК в селезенках реципиентов.

УДК 57:536.48.047:612.112.94:615.014.41:536.48

Изучение влияния низкотемпературного консервирования на функциональную активность тимоцитов. Цуцаева А. А., Попов Н. Н., Воскобойникова Т. Н. — Криобиология и криомедицина, 1978, вып. 4, с. 47—50.

Изучалось влияние низкотемпературного консервирования на иммунобиологические свойства и функциональную активность тимоцитов. Получены данные о том, что деконсервированные тимоциты подобно нативным клеткам оказывают активирующее влияние на процессы эндоколонизации в селезенках сублетально облученных животных, стимулируют пролиферативную активность деконсервированных клеток костного мозга, участвуют в кооперативных реакциях с миелокариоцитами в индукции антителогенеза. Однако после деконсервирования несколько снижается их активность.

Табл. 1. Список лит.: 3 назв.

УДК 57:536.48.047:612.112.94:615.014.41:536.48

Влияние низких температур и криопротектора ПЭО-400 на морфо-функциональные свойства клеток лимфатических узлов. Цуцаева А. А., Попов Н. Н., Воскобойникова Т. Н. — Криобиология и криомедицина, 1978, вып. 4, с. 50—52.

Представлены данные по изучению влияния низкотемпературного консервирования на морфо-функциональные свойства клеток лимфатических узлов. Полученные результаты свидетельствуют о сохранении лимфоцитами после деконсервирования изученных функциональных свойств: способности к адаптивному переносу трансплантационного иммунитета, ингибиции эндоколонизации селезенки. Изучение клеточного состава суспензий лимфатических узлов до и после замораживания показало более высокую криорезистентность малых лимфоцитов по сравнению с другими клетками, находящимися на различных стадиях клеточной дифференцировки.

Табл. 2. Список лит.: 2 назв.

УДК 57:536.48.047:612.112.94:615.014.41:536.48

Влияние режимов замораживания на некоторые показатели морфо-функциональной сохранности тканевых лимфоцитов. Воскобойникова Т. Н., Гордиенко Е. А. — Криобиология и криомедицина, 1978, вып. 4, с. 52—54.

Приведены некоторые морфо-функциональные аспекты исследования биологической сохранности тканевых лимфоцитов, подвергавшихся замораживанию по различным режимам. Подобрана программа охлаждения, позволяющая сохранить 90—92% клеток в жизнеспособном состоянии. Лимфоциты после деконсервирования сохраняли способность трансформироваться в бласты в присутствии ФГА.

Табл. 1. Список лит.: 4 назв.

УДК 57:536.48.047:612.112.541.49:536.48

Замораживание эритроцитов в присутствии низкомолекулярных криопротекторов. Корчиков С. Д., Ворстилин А. М., Гордиенко Е. А. — Криобиология и криомедицина, 1978, вып. 4, с. 54—57.

На основе анализа диаграмм плавления растворов криопротекторов и теоретического анализа температурной зависимости степени обезвоживания клетки с изменением химического потенциала вне- и внутриклеточной среды сделано предположение о том, что из проникающих в клетки криопротекторов наиболее эффективным является этиленгликоль. Приведенные результаты экспериментов в основном согласуются с теоретическими выводами.

Ил. 1. Список лит.: 2 назв.

УДК 57:536.48.047:534.8

Изучение влияния ультразвука на эритроциты с применением математических методов планирования эксперимента. Лобынцева Г. С., Вишневский В. И., Марценюк В. Ф., Гордиенко О. И. — Криобиология и криомедицина, 1978, вып. 4, с. 57—59.

Изучали влияние предварительного озвучивания ультразвуком клеточных суспензий на выживаемость эритроцитов, подвергнутых низкотемпературному консервированию с полиэтиленоксидом молекулярного веса 1500.

Итоги обработки результатов полного факторного эксперимента 2^3 показали, что при данной ошибке воспроизводимости опытов ультразвук с частотой 880 и 2500 кГц и мощностью 0,1—3 Вт/см² при нашем способе озвучивания перед замораживанием не оказывает существенного влияния на исход низкотемпературного консервирования эритроцитов.

Табл. 3.

УДК 57:536.48.047:615.361—018.46

Сравнительная оценка морфо-функционального состояния ядерных клеток посмертного костного мозга, полученного различными способами, криоконсервированных для клинических целей. Маркова О. П., Обозная Э. И., Лакиза Б. С., Комлик П. В., Морозов И. А. — Криобиология и криомедицина, 1978, вып. 4, с. 59—60.

Проведена сравнительная оценка морфо-функционального состояния ядерных клеток посмертного костного мозга, полученного аспирационным, фрагментационным и компрессионным (после фрагментации) способами, криоконсервированных под защитой ПЭО-400 в металлических контейнерах емкостью 150 мл. Показано, что морфологический состав и функциональные состояния криоконсервированных ядерных клеток, полученных тремя способами, существенно не отличаются от исходных. Однако фрагментационным и компрессионным (после фрагментации) способами возможно заготовить значительно большее количество клеток.

УДК 57:536.48.047:612.014.424.5

Размораживание биологических объектов СВЧ-энергией. VI. К вопросу возникновения локального нагрева. Тимошенко Ю. П., Костарев Б. Д., Пахомова И. С. — Криобиология и криомедицина, 1978, вып. 4, с. 60—64.

Изучалось распределение температуры при СВЧ-нагреве замороженных биологических объектов вблизи жидкого сферического включения. Показано, что увеличение размеров включения приводит к возрастанию температурного перепада между жидким включением и окружающей его жидкой фазой. С повышением скорости нагрева температурные перепады пропорционально возрастают. Численные расчеты и экспериментальная проверка указывают на то, что нагрев на частотах 433 и 915 мГц предпочтителен по сравнению с 2370 мГц.

Ил. 3. Список лит.: 2 назв.

УДК 57:536.48.047:615.387

Исследование процесса размораживания клеточных суспензий. Тимошенко Ю. П., Лобынцева Г. С., Полякова А. И., Тимченко В. Г. — Криобиология и криомедицина, 1978, вып. 4, с. 64—66.

Исследовано влияние скоростей нагрева на различных участках температурного диапазона от —196 до 4°С. Установлено, что изменение скорости нагрева в диапазоне температур от —196 до —70°С не влияет на сохранность ядерных клеток крови, замороженных с 10%-ным ПЭО-400. Наибольшие повреждения клеток отмечены при медленных скоростях нагрева в интервале температур от —20 до —10°С. Предложен поэтапный процесс размораживания клеток крови: на I этапе отогрев осуществляется погружением в теплоноситель с температурой —70, на II этапе —40°С.

Ил. 1.

УДК 57:536.48.047:536.48:576.51.48

Влияние низких температур на бактерии *E. coli* В/гWP2hcr⁺try⁻. Сафонова Т. С., Маркова В. М., Мануильский В. Д. — Криобиология и криомедицина, 1978, вып. 4, с. 66—68.

Изучалось влияние однократного замораживания при —196°С на выживаемость, рост и развитие микробной популяции, стабильность генома бактерий *E. coli* В/гWP2hcr⁺try⁻. Показано, что воздействие низких температур снижает выживаемость бактерий, изменяет скорость роста деконсервированной популяции и не вызывает изменений в генетическом материале клеток.

Табл. 2.

УДК 57:536.48.047:616—091.8:615.9:541.49

Патоморфологическая оценка влияния криопротектора — полиэтиленоксида молекулярного веса 1500 — на организм животных. Козлова В. Ф., Гучок М. М., Щетинский И. М., Верховский Б. А. — Криобиология и криомедицина, 1978, вып. 4, с. 68—71.

Представлены патоморфологические данные о действии парэнтеральных введений полиэтиленоксида молекулярного веса 1500 (ПЭО-1500) на организм животных. В острых и подострых случаях установлено, что многократное внутривенное и внутрибрюшинное введение ПЭО-1500 в дозе 1/30 и 1/20 ДЛ-50 в 10%-ных водных растворах не изменяет макро- и микроскопическую структуру внутренних органов кроликов и крыс, не вызывает раздражения брюшины и кожи в местах введения вещества. В основе патогенеза острого токсикоза, развившегося в ответ на введение летальных и близких к ним доз криопротектора, лежат изменение сосудисто-тканевой проницаемости, перераспределение тканевой жидкости, реактивное состояние клеток ретикуло-эндотелиальной системы, дистрофия паренхиматозных органов, развивающиеся в условиях стрессовой реакции организма.

Ил. 2. Список лит.: 8 назв.

УДК 57:536.48.047:615.9.06

О влиянии полиэтиленоксида молекулярного веса 1500 на функции печени и свертываемость крови. Гучок М. М., Верховский Б. А., Мазалов В. К., Сигал Н. С., Элькина Л. З. — Криобиология и криомедицина, 1978, вып. 4, с. 71—73.

В острых и подострых опытах на половозрелых кроликах установлено, что многократные внутривенные введения ПЭО-1500 в течение месяца (1/30 и 1/20 ДЛ-50, 10%-ные водные растворы) не нарушают основных функций печеночных клеток и состава периферической крови, но вызывают умеренное, временное, несмотря на продолжающееся введение вещества, снижение свертываемости крови. После внутрибрюшинного введения летальных доз криопротектора нарушались состояние ретикуло-эндотелиальной системы и гемостаз. Доза ДЛ-50 для кроликов составила приблизительно 8,0 г/кг внутрибрюшинно, что позволяет отнести ПЭО-1500 к малотоксичным веществам.

Ил. 1. Список лит.: 7 назв.

УДК 57.536.48.047

Сообщение о 13-м заседании Международного общества криобиологов, США. Пушкарь Н. С. — Криобиология и криомедицина, 1978, вып. 4, с. 74—79.

Приводится информация о работе 13-го заседания международного Общества криобиологов в Вашингтоне, США и дано краткое содержание отдельных документов.

UDC 578.088:576.311:612.35

Biochemical Modification of Biomembrane Lipids as a Cause of Cell Death During Low-Temperature Preservation. Belous A. M., Bondarenko V. A., Bondarenko T. P. — Kriobiologija i Kriomedicina, 1978, iss. 4, p. 3—6.

Freezing and the subsequent thawing result in changes in the state of mitochondria membranes, the freezing and thawing regimes being of great importance.

It is concluded that low-temperature affects the cells and may cause significant changes in their phospholipid content, permeability and osmotic lysis at thawing. Therefore, the biochemical modification in the content of lipids is one of the main causes of cell death during thawing.

3 figs. 1 table. Refs: 17 titles.

UDC 578.088:576:612.35

Polyethylene Oxide Interaction with Artificial Phospholipid and Mitochondrial Membranes. Bondarenko V. A., Bondarenko T. P., Belous A. M. — Kriobiologija i Kriomedicina, 1978, iss. 4, p. 7—9.

The effect of polyethylene oxides (PEO) of different molecular weights on the state of liposome and mitochondria membranes was studied in rat livers. It is shown that PEO M.W. 400 and higher can significantly increase the Fe^{2+} activating effect on chemiluminescence of liposome and mitochondria suspensions. The activating effect of PEO-400 correlates with the ability to labilize mitochondria membranes, that is manifested in the increased extractivity of membrane lipids.

3 figs. Refs: 9 titles.

UDC 576.343.577.15:616—001.19

Cryoprotectant Effect on Lysosome Stability at Slow Freezing. *Kravchenko L. P.* — *Kriobiologija i Kriomedicina*, 1978, iss. 4, p. 9—11.

A suspension of isolated lysosomes was frozen in the presence of different cryoprotectants (PEO-400, glycerol, OEG, DMSO) at 1°/min down to -30°C . The level of the marker enzymes (acid RNA-ase, DNA-ase, cathepsins, phosphatase) non-sedimenting activity in the freezing medium served as an index of damage to lysosome membranes. It is shown that the lysosome structure is considerably preserved in the presence of cryoprotective compounds, that is confirmed by a less solubilization level of protein-enzymes.

1 fig. 1 tables. Refs: 2 titles.

UDC 57:536.48.047:612.015.11

Effect of Slow Freezing on Peroxide Oxidation of Membrane Lipids and Hydroxylase Activity of Rat Liver Microsomes. *Kudokotseva E. V.* — *Kriobiologija i Kriomedicina*, 1978, iss. 4, p. 11—13.

The present paper deals with the results of studies in the effect of slow freezing at 1°/min down to -25°C on the peroxide oxidation activity of microsome lipids and oxidation rate of NADPH and microsome oxidation substrate (4-dimethylaminochalkone) by microsomes. It is shown that freezing does not affect malone dialdehyde accumulation. Microsome oxidation rate of exogenic NADPH remains at the initial level, but the oxidation rate of 4-dimethylaminochalkone reduces by 48% under the same freezing conditions. It is supposed that there is some impairment of membrane structure and function as a result of freezing damaging factors.

1 table. Refs: 8 titles.

UDC 57:536.48.047

The Effect of Nitrogen, Helium and Oxygen Media on Oxidative Processes in Oleic Acid. *Medvedev V. M., Galka N. I., Severin N. F., Garbuz V. I.* — *Kriobiologija i Kriomedicina*, 1978, iss. 4, p. 13—15.

The effect of nitrogen, helium, air and oxygen media was studied as applied to the oxidative processes in oleic acid used as a model of lipid oxidation.

Four maxima were detected in the spectrum of oleic acid in a region of 510÷÷640 nm. Their peaks are in a region of 510, 555, 615 and 630 nm. The width of two former maxima at the level of 0.5 is of 50 nm order, and that of two latter maxima of 15 nm.

3 figs. Refs: 2 titles.

UDC 547.96+543.3:536.48

On the State of Water in Lysin Solutions. *Moiseev V. A., Mank V. V., Zinchenko A. V., Zinchenko V. D.* — *Kriobiologija i Kriomedicina*, 1978, iss. 4, p. 15—17.

NMR spectra analyses of lysin solutions in a temperature range from 20° to -30°C showed that there is a concentration interval where the intensity of the water line during thawing changes with temperature according to another law that during freezing, that is associated with formation of sites with increased solute concentration. About 0.8 g of water per 1 g of lysin remains mobile in the frozen water solutions at -30°C .

1 fig. Refs: 7 titles.

UDC 57:536.48.047:574.96:543.42:541.49

Polyethylene Oxide Effect on the Absorption Spectra of Some Globular Proteins. *Morozova T. F., Mikulinskij Ju. E., Moiseev V. A.* — *Kriobiologija i Kriomedicina*, 1978, iss. 4, p. 17—20.

Melting of globular proteins, trypsin and gamma-globulin, was studied by spectrophotometry techniques in water-polyethylene oxide mixtures of different concentrations and at different denaturing effects on a protein macromolecule. Possible conformational changes in protein macromolecules resulted from the PEO-400 effect are discussed.

1 fig. Refs: 9 titles.

UDC 536.48:612.111:539.16

Studies in ^{22}Na Permeability and Phospholipid Content of Membranes of Frozen-Irradiated Human Red Blood Cells. *Osipenko A. P.* — *Kriobiologija i Kriomedicina*, 1978, iss. 4, p. 20—22.

The phospholipid content and membrane permeability of human erythrocytes was studied after freezing-thawing, irradiation and their combined effect. It is shown that the phospholipid content is more affected by freezing-thawing than by irradiation at 2,000 and 4,600 R. Erythrocyte membrane permeability for Na ions increases in proportion to the increase in the radiation dose at 4° C and is rather sensitive to freezing and thawing. The change in the membrane permeability is less manifested if erythrocytes are irradiated in the frozen state, that suggests an increase in erythrocyte resistance to irradiation under such conditions.

2 figs. Refs: 10 titles.

UDC 57:537.48.047:612.46:615.014.41:577.15:536.48

Kidney Viability Estimation After Perfusion and Freezing-Thawing by Energy-Dependent Redox Transformations of Pyridine Nucleotides. *Sakhnovich V. M., Lemeshko V. V.* — *Kriobiologija i Kriomedicina*, 1978, iss. 4, p. 22—25.

The present paper shows that pyridine nucleotide transformations measured in the rabbit kidney cortex homogenates by the fluorometric method may serve as an objective test for estimating the organ mitochondria functional state following the application of different cryoprotectants, perfusion media and low temperatures.

The data obtained suggest that 15% PEO-400 does not preserve the energy-producing system of deeply frozen kidneys. DMSO provides practically complete preservation of the energy-producing system of mitochondria at deep freezing of the kidney, that permits optimistic prognosis to be made on the principal possibility to maintain viability of the organs at deep freezing and thawing.

3 figs. Refs: 6 titles.

UDC 57:536.48.047.612.015.11

Effect of the Medium Composition and Storage Conditions on Changes in Cytochrome Concentration of Kidney Cortex Homogenates. *Subbota N. P.* — *Kriobiologija i Kriomedicina*, 1978, iss. 4, p. 25—27.

Changes in the concentration of electron carriers, *a* and *c+c₁* cytochromes, were studied in the rat kidney cortex homogenates with different storage periods and conditions.

It is found that the best storage conditions for the biological materials are anaerobic, though the media combinations studied in the present research did not provide the maintaining of the cytochrome concentration at a high level.

Refs: 4 titles.

UDC 57:536.48.047:612.11.7.444.616.4:541.49

Low Temperature and Cryoprotectants Effect on the Neuromediator Capture by Thrombocytes and vas deferens. *Utevskij A. M., Chujko V. A., Gubina N. F., Onufrieva G. A., Fenchenko N. N., Petrenko G. P.* — *Kriobiologija i Kriomedicina*, 1978, iss. 4, p. 27—29.

The effect of cryoprotectants and cryopreservation was studied as applied to the processes of active capture of mediators (serotonine by thrombocytes and noradrenaline by deferent duct). It is found that the mechanism of the mediator uptake by thrombocytes is highly cryolabile and the deferent duct is relatively cryoresistant.

The neurohumoral regulation mechanisms are supposed to be significant in reconstitution of the frozen-thawed tissues.

2 figs. Refs: 3 titles.

UDC 611.841.2.018.74:615.014.41:536.48.533.3

Ultrastructural Changes in the Cryopreserved Human Cornea Endothelium. 1. Effect of Prefreezing Storage Period. *Zhuravlev V. S.* — *Kriobiologija i Kriomedicina*, 1978, iss. 4, p. 29—31.

The degree of ultrastructural changes in polyethylene oxide cryopreserved (—196° C) cornea endothelium is shown to be dependent on the postmortem (8h and 24h) changes prior to cryopreservation. It is suggested that only the cornea with the storage period after death less than 8h should be used to achieve better ultrastructural preservation.

1 fig. Refs: 8 titles.

UDC 57:536.48.047

Effect of Deep Freezing and Thawing of the Seidel Ascitic Hepatoma in Rats on the Nuclei Ultrastructure. *Erenpreis Ja. G., Zirne R. A.* — *Kriobiologija i Kriomedicina*, 1978, iss. 4, p. 31—35.

Electron-microscopic examination of the Seidel hepatoma nuclei structure showed a change in the chromatin condensation after freezing and thawing, that is prevented by incubation with heparin and is presumably connected with the relation of histones to DNA.

2 figs.

UDC 57:536.48.047:574.23.043:617.7

Effect of Temperature Regimes on the Activity of Some Enzymes in Cryostat Sections. *Jurchenko T. N.* — *Kriobiologija i Kriomedicina*, 1978, iss. 4, p. 35—37.

The paper presents data on the state of some redox enzymes in the cornea tissue at different temperatures of sections obtaining, polyethylene oxide being used as a cryoprotectant. Its influence on the level of the reaction intensity is detected. The data obtained introduce necessary corrections into the conditions of cryostat sections obtaining.

Refs: 9 titles.

UDC 57:536.48.047:541.64:547.422:615.387

Polyethylene Oxides in the Low-Temperature Preservation of Red Blood Cells (Some Results and Prospects). *Shago M. I., Bredikhina L. P., Timchenko V. G., Lubyanyj V. G., Legostaeva E. I., Kononov Ju. V., Trushkov V. M.* — *Kriobiologija i Kriomedicina*, 1978, iss. 4, p. 38—45.

The effect of PEO of different molecular weights on red blood cells and their cryoprotective activity is shown. Cell status is assessed by a complex of functional indexes. The best results are obtained with polyethylene oxide M. W. 1,500.

The problems arising when using exocellular cryoprotectants: sterility of the material, infection risks, etc., are discussed.

1 fig. 3 tables. Refs: 7 titles.

UDC 57:536.48.047

The Effect of Native and Frozen-Thawed Bone Marrow Transplantation on the Number of Plaque-Forming Cells (PFC) in Spleens of Lethal-Irradiated Recipients. *Goltsev A. N.* — *Kriobiologija i Kriomedicina*, 1978, iss. 4, p. 45—47.

The present paper deals with a comparative examination of PFC accumulation dynamics in spleens of lethal-irradiated recipients protected by the frozen-thawed and native bone marrow. The data obtained show that syngeneic frozen-thawed and native bone marrow transplantation favours the restoration of the immune response to SRBC in lethal-irradiated recipients. This restoration, however, is not complete for a long period of time and is 73% of their number in the spleen of a non-irradiated animal 2 months later. The administration of syngeneic thymocytes together with bone marrow increases PFC accumulation in recipients spleens.

UDC 57:536.48.047:612.112.94:615.014.41:536.48

Studies in the Low-Temperature Preservation Effect on Thymocyte Functional Activity. *Tsutsaeva A. A., Popov N. N., Voskoboynikova T. N.* — *Kriobiologija i Kriomedicina*, 1978, iss. 4, p. 47—50.

The effect of low-temperature preservation on thymocyte immunobiological properties and functional activity was studied.

The data obtained show that the frozen-thawed thymocytes, just as native cells activate the endocolonization processes in spleens of sublethal-irradiated animals, stimulate the proliferative activity of the frozen-thawed bone marrow cells, and are involved into the cooperative reactions with myelocaryocytes in antibody genesis induction. There is a slight reduction in their activity after thawing.

1 table. Refs: 3 titles.

UDC 57:536.48.047:612.112.94:615.014.41:536.48

Low Temperature and PEO-400 Effects on Morphofunctional Properties of Lymphatic Node Cells. *Tsutsaeva A. A., Popov N. N., Voskoboynikova T. N.* — *Kriobiologija i Kriomedicina*, 1978, iss. 4, p. 50—52.

The paper presents the results of experimental studies in the low temperature storage effect on the morphofunctional properties of lymphatic node cells. The data obtained testify to the preservation of the functional properties in the frozen-thawed lymphocytes: the ability for transplantation immunity adoptive transport, spleen endocolonization inhibition, killing effect in vitro. Small lymphocytes appeared to be more cryoresistant in comparison with other cells at different stages of cell differentiation.

2 tables. Refs: 2 titles.

UDC 57:536.48.047:612.112.94:615.014.41:536.48

Freezing Regimes Effect on Some Indexes of Morphofunctional Intactness of Tissue Lymphocytes. *Voskoboynikova A. N., Gordienko E. A.* — *Kriobiologija i Kriomedicina*, 1978, iss. 4, p. 52—54.

Some morphofunctional aspects are discussed concerning the investigation of biological integrity of tissue lymphocytes frozen by different methods. Cooling program providing 90—92% of surviving cells is described. After thawing lymphocytes retained their blast-transforming ability in the presence of PHA.

1 table. Refs: 4 titles.

UDC 57:536.48.047:612.111:541.49:536.48

Erythrocyte Freezing in the Presence of Low Molecular Weight Cryoprotectants. *Korchikov S. D., Vorotilin A. M., Gordienko E. A.* — *Kriobiologija i Kriomedicina*, 1978, iss. 4, p. 54—57.

On the basis of cryoprotectant solutions melting diagrams and theoretic consideration of the temperature dependence of cell dehydration due to a change in the chemical potential of intra- and extracellular media it is suggested that ethylene glycol is the most effective cryoprotective agent of those penetrating into cells. Experimental results are in agreement with theoretical conclusions.

1 fig. Refs: 2 titles.

UDC 57:536.48.047:536.8

Studies in Supersound Effect on Erythrocytes Using the Mathematical Methods of Experiment Planning. *Lobyntseva G. S., Vishnevskij V. I., Martsenjuk V. F., Gordienko O. I.* — *Kriobiologija i Kriomedicina*, 1978, iss. 4, p. 57—59.

The effect of the preliminary supersonic irradiation was studied as applied to cell suspensions on the survival rate of erythrocytes frozen with polyethylene oxide M. W. 1,500.

Processing of the results of a complete factor experiment 2^3 shows that at the given error of the experiment reproducibility supersound (the frequency being of 880 and 2500 Hz and power from 0.1 to 2 W/cm²) does not significantly affect the survival of erythrocytes at the given method of supersonic irradiation.

3 tables.

UDC 57:536.48.047:615.361—018.46

Comparative Estimation of Morphofunctional State of Nuclear Cells of Cadaver Bone Marrow Obtained by Different Methods and Cryopreserved for Clinical Purposes. *Markova O. P., Oboznaja E. I., Lakiza B. S., Komlik P. V., Morozov I. A.* — *Kriobiologija i Kriomedicina*, 1978, iss. 4, p. 59—60.

A comparative estimation of a morphofunctional state of nuclear cells of cadaver bone marrow obtained by aspiration, fractionation and compression techniques is carried out after cryopreservation with PEO-400 in metal containers (150 ml).

It is shown that the morphological structure and functional state of nuclear cells obtained by three methods do not significantly differ from the initial one. However, fractionation and compression techniques provide the obtaining of a considerably greater number of cells.

UDC 57:536.48.047:612.014.424.5

SHF-Thawing of Biological Systems. VI. On the Problem of Local Heating. *Timoshenko Ju. P., Kostarev B. D., Pakhomova I. S.* — *Kriobiologija i Kriomedicina*, 1978, iss. 4, p. 60—64.

Temperature distribution during SHF-thawing of frozen biological systems was studied near liquid spherical inclusion. It is shown that an increase in the inclusion dimensions leads to rise in the temperature gradient between the liquid inclusion and surrounding liquid phase. The temperature gradients increase in proportion to a rise in the thawing rate. Numerical calculations and experimental findings show that warming at 433, 915 MHz is more preferable than that at 2370 MHz.

3 figs. Refs: 2 titles.

UDC 57:536.48.047:615.387

The Study of the Cell Suspension Thawing Process. *Timoshenko Ju. P., Lobyntseva G. S., Poljakova A. I., Timchenko V. G.* — *Kriobiologija i Kriomedicina*, 1978, iss. 4, p. 64—66.

The effect of thawing rates was studied in different parts of the temperature range from -196°C to $+4^{\circ}\text{C}$. Changes in the thawing rate within a temperature range from -196°C to -70°C are established not to affect the survival of nuclear blood cells frozen with 10% PEO-400. Cells were most severely damaged at low thawing rates in a temperature range from -20 to -10°C . A two-step thawing procedure is suggested for thawing blood cells: warming by immersion into heat carrier at a temperature of -70°C , then at $+40^{\circ}\text{C}$.

1 fig.

UDC 57:536.48.047:536.48:576.51.48

Low Temperature Effect on *E. coli* B/rWP2hcr⁺try⁻. *Safonova T. S., Markova V. M., Manuilskij V. D.* — *Kriobiologija i Kriomedicina*, 1978, iss. 4, p. 66—68.

The present paper deals with the effect of single cooling at -196°C on the survival, growth and development of the microbe population, stability of the *E. coli* B/rWP2hcr⁺try⁻ genome. It is shown that low temperatures decrease the bacteria survival after the growth rate of the frozen-thawed population and cause no changes in the genetic material of cells.

2 tables.

UDC 57:536.48.047:616—091.8:615.9:541.49

Pathomorphological Estimation of Polyethylene Oxide M. W. 1,500 Effect on Animal Organisms. *Kozlova V. F., Guchok M. M., Shchetinskij I. M., Verkovskij B. A.* — *Kriobiologija i Kriomedicina*, 1978, iss. 4, p. 68—71.

The paper presents pathomorphological data on the effect of parenteral administration of polyethylene oxide M.W. 1,500 on the animal organisms. Multiple intravenous and intra-abdominal administration of PEO-1,500 in 1/30 and 1/20 DL-50 doses of 10% water solutions does not affect the macro- and microscopic structure of viscera of rabbits and rats, but results in the irritation of peritoneum and skin in the site of administration. The acute toxicosis resulted from the administration of lethal and sublethal doses of PEO-1,500 is characterized by a change in tissue vascular permeability, redistribution of tissue fluid, the reactive state of reticuloendothelial cells, parenchymatous degeneration developing under conditions of the organism stress reaction.

2 figs. Refs: 8 titles.

UDC 57:536.48.047:615.9.06

On the Effect of Polyethylene Oxide M. W. 1,500 on the Liver Functions and Blood Coagulability. *Guchok M. M., Verkhovskij B. A., Mazalov V. K., Sigal N. S., Elkina L. Z.* — *Kriobiologija i Kriomedicina*, 1978, iss. 4, p. 71—73.

Acute and subacute experiments with mature rabbits showed that multiple (1 month) intravenous administrations of PEO-1,500 (1/30 and 1/20 DL-50, 10% water solutions) do not affect the main functions of the liver cells and the composition of peripheral blood but result in a moderate transient (despite the continuing administration) decrease in blood coagulability.

Intra-abdominal administration of lethal doses of the cryoprotectants causes the manifested liver degeneration, reactive state of reticuloendothelial system and hemostasis disturbance parallel with other changes.

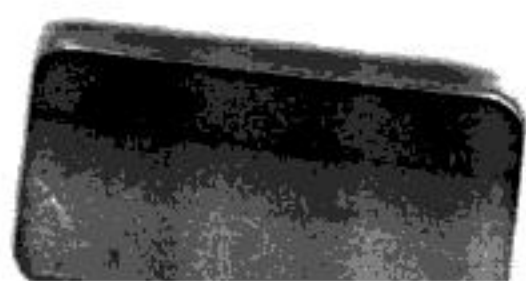
DL-50 for rabbits is about 8.0 g/kg intraperitoneally, that makes it possible to consider PEO-1,500 as an innocuous substance.

1 figs. Refs: 7 titles.

UDC 57.536.48.047

Information on the 13th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, USA. *Pushkar N. S.* — *Kriobiologija i Kriomedicina*, 1978, iss. 4, p. 74—79.

Information is presented on the work of the 13th Annual meeting of the Society for Cryobiology in Washington (USA) and summaries of some papers are given.



1 руб. 20 коп.

«НАУКОВА ДУМКА»
КРИОБИОЛОГИЯ И КРИОМЕДИЦИНА. 1978
вып. 4, 1—92