

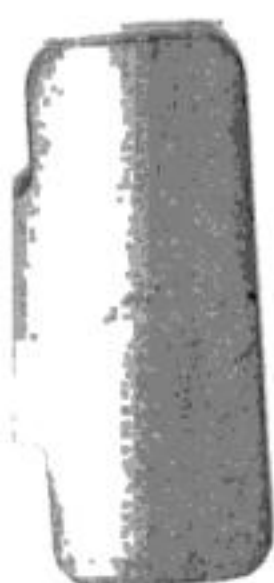
КРИОБИОЛОГИЯ И КРИОМЕДИЦИНА

ISSN 0130-2663



15

1984



АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ И КРИОМЕДИЦИНЫ

Y. Hryshchuk

КРИОБИОЛОГИЯ И КРИОМЕДИЦИНА

РЕСПУБЛИКАНСКИЙ МЕЖВЕДОМСТВЕННЫЙ СБОРНИК
НАУЧНЫХ ТРУДОВ

Основан в 1975 г.

В Ы П У С К

15

КИЕВ НАУКОВА ДУМКА 1984

В сборнике представлены материалы, посвященные изучению механизмов криоповреждения биологических структур, возможностям их защиты с помощью криопротекторов, исследованию фармакологических свойств ряда новых соединений, обладающих криозащитной активностью механизмов зимней спячки у гомойо- и пойкилотермных животных. Освещены работы по изучению лечебного эффекта гипотермии при экспериментальном инфаркте миокарда и использованию криогенных методов в медицине — офтальмологии, хирургии, гинекологии.

Для биологов и медиков, а также специалистов, разрабатывающих теоретические и прикладные вопросы низкотемпературного консервирования биологических объектов.

Редакционная коллегия

Н. С. Пушкарь (ответственный редактор), А. М. Белоус (зам. ответственного редактора), Ю. А. Иткин, Г. С. Лобынцева (ответственный секретарь), В. И. Луговой, В. А. Моисеев, Ю. М. Рудько, Б. П. Сандомирский, А. А. Цуцаева, М. Г. Шенберг, М. И. Шраго (зам. ответственного редактора)

Адрес редколлегии

310015, Харьков 15, ул. Переяславская, 23
Институт проблем криобиологии и криомедицины АН УССР
Тел. 72 41 43

Редакция межведомственных сборников

КРИОБИОЛОГИЯ И КРИОМЕДИЦИНА

Выпуск 15

*Утверждено к печати ученым советом
Института проблем криобиологии и криомедицины АН УССР*

Редактор А. Н. Шадрина
Художественный редактор В. А. Мелашенко.
Технический редактор А. А. Нагорная.
Корректоры Т. А. Обора, Ю. И. Бойко.

Информ. бланк № 6456.

Сдано в набор 19. 03. 84. Подп. в печать 13. 11. 84. БФ 02039. Формат 70×108/16. Бум. тип. № 1. Лит. гарн. Выс. печ. Усл. печ. л. 9,1. Усл. кр.-отт. 9,45. Уч.-изд. л. 9,96. Тираж 1000 экз. Заказ 3242. Цена 1 р. 50 к.

Издательство «Наукова думка». 252601 Киев 4, ул. Репина, 3.
Львовская областная книжная типография. 290000, Львов, ул. Стефаника, 11.

К 4106000000—099 385-84
М221(04)—84

© Издательство «Наукова думка», 1984

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

УДК 615.832.9.032.91

*Г. А. Бабийчук, С. И. Логинов, Ю. Н. Арцыбушев,
А. В. Козлов, А. В. Белостоцкий*

ИЗМЕНЕНИЕ ФАЗОВОЙ СТРУКТУРЫ СИСТОЛЫ ЛЕВОГО ЖЕЛУДОЧКА И ЭЛЕКТРОКАРДИОГРАФИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПОД ВЛИЯНИЕМ КРАНИО-ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ГИПОТЕРМИИ У ЖИВОТНЫХ С ИНФАРКТом МИОКАРДА

Усовершенствование лечения острого инфаркта миокарда может быть достигнуто при разработке эффективных мероприятий по защите ишемического миокарда и ограничению зоны некроза. Наряду с фармакологическими путями воздействия, тормозящими ишемический процесс в миокарде, весьма целесообразно создать условия, способствующие повышенной устойчивости сердца к кислородному голоданию. Этого можно достигнуть при проведении лечебной гипотермии, снижении температуры тела и уменьшении интенсивности обмена веществ.

При остром инфаркте миокарда основными задачами лечебной гипотермии являются угнетение метаболических процессов в поврежденных и интактных областях миокарда, погружение клеток в состояние парбиоза, повышение порога переносимости гипоксии. Все это может создать более благоприятные условия для целенаправленного фармакологического воздействия на нарушенный коронарный кровоток.

Современные аспекты применения лечебной гипотермии в настоящее время широко изучаются. Однако до настоящего времени остаются недостаточно исследованными метаболизм поврежденного миокарда в условиях гипотермического воздействия, характер влияния гипотермии на гемодинамику и ритм сердечной деятельности, мало разработаны методики применения гипотермии, недостаточно совершенная аппаратура для проведения гипотермии в диапазоне необходимых температур.

Задача данной работы — изучение характера воздействия кранио-церебральной гипотермии в среднем диапазоне температур (32—30 °C длительностью 6 ч) на состояние гемодинамических и электрокардиографических показателей у животных с экспериментальным инфарктом миокарда.

Методика исследования. Для изучения влияния кранио-церебральной гипотермии при температурах тела от 32 до 30 °C на фазовую структуру систолы левого желудочка у животных с экспериментальным инфарктом миокарда нами проведено две серии экспериментов на беспородных собаках массой 8—12 кг. Премедикация осуществлялась промедолом, димедролом, атропином, дроперидолом по общепринятым дозам. Вводный наркоз осуществлялся тиопенталом натрия в дозе 20 мг/кг массы. Основной наркоз — гамма-оксимасляная кислота (ГОМК) в дозе 200 мг/кг массы, после чего обеспечивалась вегетативная защита с помощью ганглиоблокады. После релаксации шейно-глоточной мускулатуры производилась интубация трахеи и животное переводилось на искусственную вентиляцию легких (ИВЛ).

Экспериментальный инфаркт миокарда получали путем наложения лигатуры на нисходящую ветвь левой коронарной артерии между проксимальной и средней третью. Регистрация поликардиограмм произво-

дилась на хирургическом кардиополиграфе «Салют». Запись кривой давления из аорты осуществлялась инвазивным методом.

В I серии экспериментов исследовалась динамика изменений фазовой структуры систолы левого желудочка у наркотизированных животных в условиях нормотермии. Во II серии экспериментов изменения поликардиограммы изучались у животных с экспериментальным инфарктом миокарда в условиях кранио-церебральной гипотермии.

Исследовались следующие показатели: общая и механическая систола, фаза асинхронного и изометрического сокращения, фаза изгнания, фаза напряжения, длительность диастолы, внутрисистолический показатель, индекс напряжения миокарда, коэффициент Блумбергера.

Запись поликардиограмм в нормотермии осуществлялась после введения в наркоз, до торакотомии, через 10 мин, 5 ч после окклюзии коронарной артерии. У животных II серии экспериментов запись поликардиограмм производилась после ввода в наркоз, до торакотомии, при ректальной температуре 34, 32 и 31 °С, в период выхода из гипотермии.

Результаты фазового анализа обеих серий экспериментов обработаны на компьютере СМ-1 программой корреляционного анализа. Полученные в результате машинной обработки средние фазовые значения систолы левого желудочка сравнивались с динамической нормой этих величин, рассчитанных по формулам Карпмана.

Результаты и их обсуждение. Результаты исследований свидетельствуют об определенной зависимости изменений длительности фаз систолы левого желудочка у исследуемых животных.

Так, в условиях нормотермии (табл. 1) длительность асинхронного сокращения через 10 мин после моделирования инфаркта миокарда увеличивалась с $0,045 \pm 0,014$ до $0,050 \pm 0,012$ с (при норме $0,033 \pm 0,008$; $0,033 \pm 0,010$ с соответственно). Через 5 ч длительность ее не отлича-

Таблица 1. Динамика изменений фазовой структуры систолы левого желудочка у животных с экспериментальным инфарктом миокарда ($n=12$)

Показатель	До торакотомии		После перевязки артерии			
			через 10 мин	через 5 ч		
	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ
ИС	0,040	0,019**	0,040	0,014	0,047	0,010**
	0,033	0,012	0,040	0,000	0,043	0,05
АС	0,045	0,014**	0,050	0,012**	0,038	0,013**
	0,043	0,008	0,033	0,010	0,038	0,010
Т	0,085	0,025**	0,090	0,022**	0,085	0,017**
	0,075	0,012	0,073	0,010	0,080	0,008
Е	0,123	0,021*	0,158	0,017*	0,153	0,034*
	0,196	0,007	0,203	0,005	0,203	0,010
См	0,174	0,035*	0,198	0,022*	0,200	0,036*
	0,236	0,012	0,243	0,005	0,245	0,013
Со	0,222	0,035*	0,248	0,021*	0,238	0,029*
	0,279	0,011	0,275	0,010	0,283	0,015
Д	0,154	0,059*	0,157	0,030*	0,168	0,073*
	0,115	0,060	0,120	0,037	0,123	0,075
ИНМ	38,700	10,719*	34,750	7,365**	36,00	8,869**
	18,000	6,182	26,000	2,449	27,250	2,986
ВСП	76,800	9,508*	80,000	5,598**	74,250	5,315**
	83,300	2,359	83,250	0,500	82,250	1,718
КБЛ	1,750	0,798*	1,850	0,580**	1,900	0,808**
	2,430	0,793	2,575	0,299	2,475	0,320

Примечание. Здесь и в табл. 2 цифры над чертой — экспериментальные данные, под чертой — норма. Для цифр с одной звездочкой $p < 0,05$, с двумя — $p > 0,05$.

лась от нормальных показателей. В условиях кранио-церебральной гипотермии фаза асинхронного сокращения была подвержена меньшим изменениям, чем в условиях нормотермии при инфаркте миокарда, и существенно не отличалась от нормальных показателей (табл. 1, 2). Фаза изометрического сокращения левого желудочка в обеих сериях наблюдения была в пределах нормальных величин.

Определенный интерес представляет фаза напряжения. Проведенный анализ свидетельствует о ее значительном удлинении ($0,090 \pm \pm 0,022$ с) через 10 мин после перевязки коронарной артерии. Этот показатель имел тенденцию к увеличению в динамике и несколько уменьшался к 5 ч после лигирования артерии ($0,085 \pm 0,017$ с при норме $0,008$ с). В случае применения охлаждения организма величины длительности фазы напряжения незначительно отличались от нормальных показателей, а при ректальной температуре $32-31^\circ\text{C}$ соответствовали норме ($0,084 \pm 0,039-0,083 \pm 0,039$ с). Согласно закону Старлинга в тесной зависимости с фазой напряжения находится фаза изгнания желудочков.

Как видно из табл. 1, 2, в условиях нормотермии при экспериментальном инфаркте миокарда длительность фазы укорачивается уже на 10 мин, а к 5 часам она равняется $0,153 \pm 0,034$ при норме $0,203 \pm \pm 0,010$ с, что свидетельствует о значительном ухудшении сократительной способности миокарда.

В условиях гипотермии скомпроментированный миокард, согласно полученным данным, находится в более благоприятных условиях (о чем свидетельствует удлинение фазы изгнания) по сравнению с данными, полученными в I серии экспериментов, и исходными данными II серии (см. табл. 1, 2). Наиболее выраженная стабилизация фазы

Таблица 2. Динамика изменения фазовой структуры систолы левого желудочка у животных с экспериментальным инфарктом миокарда и кранио-церебральной гипотермии ($n=12$)

Показатель	До торакотомии		$T_{\text{рект}} - 34^\circ\text{C}$		$T_{\text{рект}} - 32^\circ\text{C}$		$T_{\text{рект}} - 31^\circ\text{C}$	
	x	σ	x	σ	x	σ	x	σ
ИС	0,040	0,019**	0,057	0,025**	0,051	0,031**	0,040	0,026**
	0,033	0,013	0,053	0,023	0,054	0,021	0,060	0,017
АС	0,045	0,014**	0,047	0,012**	0,041	0,022**	0,053	0,031**
	0,043	0,008	0,037	0,006	0,040	0,000	0,040	0,000
Т	0,085	0,025**	0,103	0,015**	0,084	0,039**	0,099	0,006**
	0,075	0,012	0,090	0,026	0,083	0,039	0,100	0,017
Е	0,123	0,021*	0,157	0,047**	0,174	0,029*	0,170	0,060**
	0,196	0,007	0,210	0,010	0,211	0,011	0,213	0,006
См	0,174	0,035*	0,213	0,071**	0,296	0,053*	0,193	0,060**
	0,236	0,012	0,250	0,010	0,251	0,009	0,253	0,006
Со	0,222	0,035*	0,260	0,062**	0,269	0,050*	0,263	0,005**
	0,279	0,011	0,297	0,012	0,301	0,031	0,293	0,009
Д	0,154	0,053*	0,207	0,025**	0,201	0,032**	0,230	0,089**
	0,115	0,060	0,173	0,075	0,169	0,045	0,193	0,058
ИНМ	38,700	10,719*	39,667	3,215**	35,143	5,273**	36,333	7,767**
	28,00	6,182	32,333	7,506	32,286	6,525	34,000	5,196
ВСП	76,800	9,508*	74,000	5,292*	78,000	9,661**	87,000	4,359
	83,300	2,359	83,333	1,155	84,286	1,380	84,000	0,000
КБЛ	1,750	0,798*	1,467	0,208*	1,814	0,195*	1,800	0,557**
	1,413	0,793	2,433	0,603	2,271	0,368	2,000	0,173

изгнания при применении кранио-церебральной гипотермии наблюдалась при температурах 32—31 °С. У этих животных показатели механической и общей систолы левого желудочка подтверждают представление, что применяемый режим охлаждения благоприятно влияет на скомпроментированную кардиальную гемодинамику (см. табл. 1, 2). Как показывают полученные нами результаты, охлажденное инфарцированное сердце затрачивает меньше времени на подготовку миокарда к изгнанию крови в аорту.

Так, коэффициент Блумбергера через 5 ч после экспериментального инфаркта миокарда в условиях нормотермии уменьшался по сравнению с нормальными показателями ($1,900 \pm 0,808$ — $2,475 \pm 0,320$). У животных, охлажденных до 32 °С, коэффициент Блумбергера к этому сроку был $1,800 \pm 0,557$ при норме 2,0172.

Благоприятным показателем, свидетельствующим о стабилизации функции сердца, является нормализация индекса напряжения миокарда. После охлаждения животных до ректальной температуры 32—31 °С через 1,5 ч происходит его нормализация, в то время как в условиях нормотермии к этому сроку имеется существенное увеличение индекса напряжения.

Вскрытие перикарда и лигирование коронарной артерии сопровождались у большинства животных острыми расстройствами ритма в виде групповых политопных экстрасистол, параксизмов желудочковой и суправентрикулярной тахикардии. У животных, перенесших операцию, на электрокардиограмме обнаруживались признаки ишемии миокарда в виде подъема интервала S — T над изоэлектрической линией с переходом в недифференцированный зубец T , а в дальнейшем — некроза миокарда (появление зубца Q , депрессия и инверсия T).

Наиболее тяжелым для экспериментальных животных был первый день послеоперационного периода, когда развивались нарушения ритма сердечной деятельности в виде экстрасистолической аритмии, пароксизмов мерцания предсердий, суправентрикулярной и желудочковой тахикардии. Большинство животных удовлетворительно перенесли операцию.

У двух собак в ходе операции на фоне острого трансмурального некроза миокарда развилась картина кардиогенного шока, диагностическими критериями которого явились влажность и холодность покровов, резкое снижение артериального давления, рефрактерное к введению прессорных аминов и кортикостероидов, падение центрального венозного давления, отсутствие мочеотделения по катетеру, введенному в мочевого пузырь, прогрессирующее истощение центров автоматизма сердца первого, второго и третьего порядка.

Проведение средней гипотермии с ректальной температурой 32—30 °С приводило к улучшению трофики миокарда левого желудочка, что заключалось в ликвидации инверсии и депрессии зубца T , появлении стабильного положительного зубца T .

Дальнейшее снижение температуры тела до 20 °С не сопровождалось подобной положительной динамикой. Напротив, в ряде экспериментальных наблюдений происходила инверсия зубца T (эксперимент № 79), свидетельствующая о нарушении процесса реполяризации в миокарде левого желудочка. Учитывая это, у животных с острой ишемией миокарда проводили среднюю гипотермию, которая способствовала уменьшению протяженности зоны ишемии. В эксперименте № 107 кранио-церебральная гипотермия, начатая через 10 мин после перевязки коронарной артерии, привела к выраженному ограничению зоны некроза миокарда. В эксперименте № 97 проведение гипотермии через 30 мин после перевязки коронарной артерии привело к ограничению зоны ишемии миокарда. В нашем эксперименте в дальнейшем развился не типичный трансмуральный, а ограниченный крупноочаговый инфаркт миокарда.

Данные электрокардиограмм свидетельствуют о том, что кранио-церебральная гипотермия при температурах 32—30 °С способствует улучшению трофики миокарда и ограничению размеров зоны ишемии миокарда при острой коронарной недостаточности.

Таким образом, в условиях кранио-церебральной гипотермии миокард находится в выгодных условиях потенциальной лабильности, что повышает его функциональные возможности. Следовательно, гипотермия не оказывает разрушительного действия на сердце, а, наоборот, защищает миокард во время гипоксии.

Ин-т пробл. криобиологии
и криомедицины АН УССР, Харьков

Получено 11.03.83

УДК 57.043

*Е. Я. Баран, Н. М. Петрунь,
Е. И. Кримкевич, Е. И. Цыбуляк*

ПРОТЕКТОРНАЯ РОЛЬ КОНТРИКАЛА ПРИ ПОДГОТОВКЕ ПОЧЕК К ТРАНСПЛАНТАЦИИ

В условиях клинической трансплантации трупная донорская почка претерпевает ряд структурных и метаболических изменений, обусловленных ишемией и приводящих к более или менее выраженному снижению жизнеспособности пересаженного органа. Существенное место в цепи перестроек метаболизма ишемизированной почки занимает активация внутриклеточных протеолитических ферментов [2—4]. В этой связи целесообразно определить возможности использования ингибиторов протеолиза для противоишемической защиты донорской почки и в составе консервирующих сред.

Методика исследования. Исследование проведено в эксперименте на 80 кроликах-самцах массой 2500—3200 г. Изучалось влияние универсального ингибитора протеиназ контрикала на метаболические процессы и функцию почки при ишемии и гипотермической консервации. На первом этапе определяли протекторную роль контрикала *in vivo* в условиях острой циркуляторной ишемии почки. Для обезболивания использовался внутривенный гексеналовый наркоз. В первой, контрольной, серии опытов вызывали ишемию обеих почек путем пережатия их сосудистой ножки в течение 120 мин. Перед созданием ишемии во второй и третьей серии опытов животному внутривенно вводили контрикал (производство «Веб арzneimittelwerk» ГДР, Дрезден) соответственно в дозах 4 тыс. АТрЕ и 8 тыс. АТрЕ на килограмм массы. Нормой служили данные, полученные при исследовании ткани свежееизолированной почки.

После окончания ишемии одна почка удалялась и использовалась для биохимического исследования. В последующие после операции дни следили за развитием почечной недостаточности по данным концентрации мочевины в крови, а также отмечали выживаемость животных. Каждая серия состояла из 10 опытов.

На втором этапе исследования изучали влияние контрикала на эффективность бесперфузионной гипотермической консервации. В первой серии опытов на фоне гексеналового наркоза кролику предварительно вводили внутривенно 1 г/кг маннитола и 200 Ед/кг гепарина. Из поясничного разреза выделяли левую почку и после перевязки сосудов и дистальной части мочеточника ее полностью отсекали. Почка находилась в своем ложе в течение 45 мин. Затем ее извлекали и сосудистое русло однократно отмывали охлажденным консервирующим раствором ВНИИКиЭХ с добавлением альбумина [8]. При температуре таяния льда почка сохранялась в течение 24 ч. Во второй серии опытов в указанный консервант добавляли контрикал в дозе 20 АТрЕ на

1 мл раствора. В каждой серии опытов десять почек использовали для биохимических исследований и десять аутотрансплантировали.

Пересадку почки производили на сосуды шеи животного. Сосудистый анастомоз осуществляли с помощью пластмассовых муфт по методу, описанному Хероном [11]. Перед включением почки в кровоток животному внутривенно вводили в указанных выше дозах маннитол и гепарин. В течение 30 мин после реваскуляризации почки следили за интенсивностью мочеотделения. При этом различали струйное, капельное мочеотделение и отсутствие мочи.

Для биохимических исследований использовали корковый слой почки. Определяли скорость окислительного фосфорилирования и дыхания [7], активность окислительно-восстановительных ферментов: лактатдегидрогеназы (ЛДГ) по методу Вроблевски [13], малатдегидрогеназы (МДГ) по — Вейкеру с соавторами [12], изоцитратдегидрогеназы (ИДГ) и сукцинатдегидрогеназы (СДГ) по методу Ф. Е. Путилиной и Н. Д. Ещенко [6]. Проводили изучение таких ферментов анаэробного гликолиза, как глюкозо-6-фосфатаза (Г-6-Ф), фруктозо-1,6-дифосфаталядолаза (Ф-1,6-ДФА), фосфофруктокиназа (ФК) и фруктозо-1-фосфаталядолаза (Ф-1-ФА) по методу В. А. Ананьева и В. Р. Обуховой [11]. Активность всех ферментов выражалась в микромолях субстрата за час на 1 миллиграмм белка, а альдолаз — в условных единицах.

Кроме того, определяли состояние протеолиза в ткани почки. При этом исследовали аутолиз по количеству гидролизированных белков после 30-минутной инкубации при 37 °С и выражали его в единицах оптической плотности СФ-16 при длине волны 280 мк. Изучали активность трипсиноподобных протеаз по гидролизу белкового субстрата — казеина [9] и синтетического субстрата — БАПНА [10]. Протеолитическая активность выражалась в микрограммах трипсина в час на миллиграмм белка.

Результаты и их обсуждение. При исследовании контрольной группы животных было показано, что 120-минутная ишемия почки приводит к снижению в ее ткани уровня поглощения кислорода при утилизации янтарной, яблочной и альфа-кетоглутаровой кислот на 47, пировиноградной — на 58 и бета-оксимасляной — на 74%. В еще большей мере угнетается сопряженное с окислением фосфорилирование: на 70—94 % при использовании всех перечисленных субстратов. Параллельно уменьшается и сопряженность указанных процессов: коэффициент Р/О снижается при использовании в качестве субстрата окисления метаболитов цикла Кребса почти в два раза. Изменения активности окислительно-восстановительных ферментов незначительны: отмечена тенденция к росту активности лактат- и снижению активности малатдегидрогеназы. Вместе с тем отмечается значительное угнетение гликолиза: активность Г-6-Ф составила $0,063 \pm 0,05$; ФК — $0,125 \pm 0,050$; Ф-1,6-ДФА — $0,043 \pm 0,004$ и Ф-1-ФА — $0,028 \pm 0,003$ (при норме соответственно $0,127 \pm 0,010$; $0,296 \pm 0,02$; $0,062 \pm 0,003$ и $0,036 \pm 0,003$).

В условиях 120-минутной ишемии почки увеличивается аутолиз с $0,082 \pm 0,018$ (в норме) до $0,133 \pm 0,013$, однако активность трипсиноподобных протеиназ существенно не изменяется. Введение контрикала в дозе 4 тыс. АТрЕ не сопровождалось увеличением способности ишемизированной почечной ткани поглощать кислород, но повышало скорость окислительного фосфорилирования при аэробном превращении яблочной, альфа-кетоглутаровой, пировиноградной и бета-оксимасляной кислот. Контрикал способствовал нормализации активности ЛДГ, МДГ и ИДГ, но активность СДГ оставалась значительно сниженной ($0,46 \pm 0,04$ при норме $0,96 \pm 0,12$). При этом сохранялась активность Г-6-Ф, однако происходило ингибирование ФК, Ф-1, 6-ДФА и Ф-1-ФА; показатели активности этих ферментов, как и в контрольной группе, были значительно ниже нормальных величин ($p < 0,05$). На фоне контрикала в дозе 4 тыс. АТрЕ аутолиз оставался выше нормы ($0,121 \pm$

$\pm 0,009$; $p < 0,05$), увеличение дозы препарата до 8 тыс. АТрЕ способствовало нормализации этого процесса ($0,112 \pm 0,18$; $p > 0,5$).

Во второй и третьей серии опытов протеолитическая активность, определяемая по гидролизу казеина, составляла соответственно $0,63 \pm 0,04$ и $0,32 \pm 0,03$ (при норме $0,87 \pm 0,12$), а по гидролизу БАПНА — $0,66 \pm 0,11$ и $0,53 \pm 0,09$ ($1,15 \pm 0,11$ в норме), что достоверно ниже показателей нормы и контрольной группы ($p < 0,05-0,02$). Это подтверждает ингибирующее действие контрикала на протеолитическую активность, возрастающее с увеличением его дозы. Контрикал в дозе 8 тыс. АТрЕ положительно влиял на процессы тканевого дыхания. Уровень окисления и фосфорилирования при добавлении к гомогенату ткани почки альфа-кетоглутаровой кислоты был несколько ниже нормы, однако статистически незначительно, а при аэробном превращении пировиноградной кислоты скорость убыли кислорода (ΔO) и фосфора (ΔP) сохранялась в пределах нормы.

Увеличение дозы контрикала до 8 тыс. АТрЕ оказывало положительное протекторное действие на активность всех исследуемых ферментов анаэробного гликолиза, которая составляла соответственно для Г-6-Ф $0,157 \pm 0,035$; ФК — $0,267 \pm 0,070$; Ф-1,6-ДФА — $0,060 \pm 0,003$ и Ф-1-ФА — $0,035 \pm 0,002$, т. е. фактически не отличалась от показателей нормы. При определении концентрации мочевины плазмы крови выяснилось, что у животных всех опытных серий развивалась почечная недостаточность. Но если в контрольной группе выжило одно животное, то во второй и третьей серии опытов по четыре животных.

Таким образом, предварительное введение контрикала способствовало ослаблению метаболических нарушений в ишемизированной почке, стабилизировало энергообмен (особенно в дозе 8 тыс. АТрЕ) и улучшало жизнеспособность органа. Результаты второго этапа эксперимента показали, что донорские почки, аутотрансплантированные через 24 ч консервации в растворе ВНИИКиЭХ, восстановили инициальную функцию в виде капельного отделения мочи в 43 % случаев, остальные почки находились в состоянии анурии. Добавление в консервирующий раствор контрикала сопровождалось струйным отделением мочи в 14 % случаев, в 72 % — капельным и только в 14 % случаев трансплантаты не функционировали. Активность окислительно-восстановительных ферментов в ткани почки при ее консервации раствором ВНИИКиЭХ (I серия опытов) характеризовалась снижением. Так, активность ЛДГ после консервации составила $4,0 \pm 0,36$; МДГ — $7,1 \pm 0,84$; ИДГ — $0,71 \pm 0,12$ и СДГ — $0,57 \pm 0,11$ при норме соответственно $6,6 \pm 0,18$; $9,0 \pm 0,9$; $0,96 \pm 0,11$ и $0,96 \pm 0,12$).

Данные второй серии опытов показали, что контрикал, добавленный в консервант, способствует сохранению в пределах нормы активности ЛДГ ($4,8 \pm 1,02$) и МДГ ($7,2-2,4$), но не влияет на активность ИДГ и СДГ, которая оставалась на низком уровне. В условиях гипотермической консервации (I серия опытов) несколько усиливалась активность Г-6-Ф и незначительно угнеталась активность ФК. Активность альдозаз не отличалась от нормальных величин. Добавление в консервирующий раствор контрикала фактически не влияло на интенсивность гликолиза: активность исследуемых ферментов находилась на уровне нормальных величин. Аутолиз в первой и во второй сериях опытов значительно усиливался. Контрикал, введенный в консервант, стабилизировал протеолитическую активность в ткани почки: ее показатели сохранялись на уровне нормы.

Как видно из полученных данных экспериментального исследования, контрикал положительно влияет на окислительно-восстановительные и гликолитические процессы в почке, перенесшей ишемию. Препарат стабилизирует энергетический метаболизм. В условиях аноксии компенсаторным механизмом поддержания энергетического статуса клетки, как показано нами ранее [5], является гликолиз. Контрикал *in vivo* способствует усилению интенсивности этого пути обмена. С дру-

гой стороны, препарат оказывает нормализующее действие на активность ферментов цикла трикарбоновых кислот (МДГ, ИДГ), являющихся центром многих метаболических путей, что представляется существенным в условиях патологической перестройки обменных процессов, в том числе наблюдаемых в ишемизированной почке. По-видимому, исходя из результатов изучения протеолиза и аутолиза, контрикал, введенный в консервант, действует не столько как ингибитор протеиназ, сколько как стабилизатор мембран, что подтверждается положительной динамикой активности ЛДГ и МДГ в ткани почки, сохранившейся в растворе ВНИИКиЭХ, содержащем препарат.

Таким образом, полученные данные об использовании контрикала *in vivo* и *in vitro* в условиях эксперимента свидетельствуют о целесообразности применения его как средства противоишемической защиты донорских почек.

1. Ананьева В. А., Обухова В. Р. Микрометод определения в сыворотке активности альдолазы. — *Вопр. вирусологии*, 1958, № 2, с. 119—120.
2. Гитис Е. И., Куценко Г. А., Стецуля В. И. Применение ингибиторов протеолиза при подготовке органов к трансплантации. — В кн.: *Трансплантация органов и тканей: Материалы II респ. конф.* Минск, 1974, с. 31—33.
3. Кримкевич Е. И., Петрунь Н. М., Цыбуляк Е. И. Протеолиз в ткани донорской почки при ишемии и пути его регуляции. — В кн.: *Трансплантация органов и тканей*. Тбилиси, 1979, с. 270.
4. Никитин Ю. П., Катюхин М. Я. Изменение местных коагуляционно-фибринолитических свойств крови и ткани почки при острой ишемии. — В кн.: *Острая ишемия и меры борьбы с постишемическими расстройствами: Тез. докл. Всесоюз. симпоз.* М., 1974, с. 106—107.
5. Петрунь Н. М., Никулина Г. Г., Хоменко Л. А. Энергообеспечение коркового слоя почек при поражении проксимальных и дистальных отделов нефрона. — В кн.: *V Всесоюз. конф. по физиологии почек и водно-солевому обмену*. Л., 1978, с. 44—45.
6. Путилина Е. Ф., Ещенко Е. Д. Активность некоторых дегидрогеназ цикла Кребса в мозгу, печени и почках. — *Вестн. Ленингр. ун-та*, 1969, 21, вып. 4, с. 112—116.
7. Скулачев В. П. Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи. — М.: Мол. гвард., 1962. — 191 с.
8. Бесперфузионный метод консервации почек в клинике с помощью специального раствора / В. И. Шумаков, Н. А. Онищенко, Е. Ш. Штенгольд, А. И. Крылова, П. Я. Филиппев. — *Хирургия*, 1974, № 9, с. 114—118.
9. Бунду Н. М. Ферменты протеолиза и их ингибиторы в медицинской практике. — К.: Здоров'я, 1971. — 184 с.
10. Ерлангер В. Ф. Ферменты протеолиза и их ингибиторы в медицинской практике. — К.: Здоров'я, 1971. — 186 с.
11. Heron J. Kidney transplantation in the rabbit. — *Acta pathol. et microbiol. scand.*, 1970, 78, N 1, p. 90—96.
12. Waechter W. S., Ulmer D. D., Vallee B. Metabolic enzymes and myocardial infarction. II. Malic and lactic dehydrogenase activity and zinc concentrations in serum. — *New Eng. J. Med.*, 1956, 255, p. 449—456.
13. Wroblewski F., La Due J. S. Lactic dehydrogenase activity in blood. — *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 1955, 90, N 1, p. 210—213.

Киев. НИИ урологии и нефрологии МЗ УССР

Получено 10.03.83

УДК 57.043.547.422:618

В. Ф. Карташов

ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕРАТОГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ПОЛИЭТИЛЕНОКСИДА-1500

Одним из важных преимуществ полиэтиленоксидов (ПЭО), обеспечивающим их эффективное использование в качестве криозащитных агентов при низкотемпературном консервировании различных биологических объектов, как известно, является их низкая общая токсичность. Например, благодаря этому свойству можно использовать ПЭО-1500 при криоконсервации клеток красной крови с их последующей трансфузией реципиенту без предварительного удаления полиме-

ра [7]. Перспектива использования этого метода в клинике ставит задачу более широкого изучения влияния ПЭО-1500 на организм. Цель настоящей работы — исследование способности данного полимера индуцировать аномальный эмбриогенез (тератогенез) в условиях его введения в организм при беременности.

За исключением исследования, проведенного нами ранее [5], этот вопрос специально не изучался. Вместе с тем в литературе имеются сведения, полученные в опытах *in vitro*, о наличии у полиэтиленоксида свойств, которые при его контакте с тканями эмбриона могут реализоваться в нарушение процессов пролиферации клеток или их дифференцировки. К важнейшим из них следует отнести антимиотическое и статмокинетическое действие на клетки [2], способность к образованию комплексов с биологически активными металлами [10] и биомакромолекулами [7], угнетение активности ключевых ферментов транскрипции [6].

Полученные нами ранее данные об отсутствии повреждающего действия ПЭО-1500 на развитие плодов белых крыс при его ежедневном введении в течение всей беременности в условно «терапевтической» дозе (0,6 г/кг массы тела — 1/20 ЛД-50) не позволяют в полной мере ответить на вопрос о потенциальной тератогенной способности данного химического соединения, что и побудило нас к проведению дальнейшего исследования.

Методы исследования. Опыты проведены на беспородных белых крысах-самках массой 200—250 г с датированной беременностью. Первым днем беременности считали день обнаружения спермиев в вагинальном мазке крысы в стадии эструс. Во всех сериях экспериментов ПЭО-1500 вводили животным однократно парентерально в виде 20 %-ного раствора с рН 7,2—7,4, приготовленного на 0,9 %-ном растворе хлорида натрия.

Изучение трансплацентарной проницаемости ПЭО-1500 проводили на крысах 20-го дня беременности. Полимер вводили в дозах 0,6—7,7 г/кг массы тела животного (1/20—2/3 ЛД-50). Забор проб амниотической жидкости плодов осуществляли через 15, 30 и 60 мин после введения. Для количественного определения ПЭО в пробах использовали спектрофотометрический метод, разработанный в Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР [3].

Исследование тератогенной активности ПЭО-1500 проводили в 16 сериях опытов, в каждой из которых вещество вводили в один из дней беременности в большой дозе (5,8 г/кг массы тела — 1/2 ЛД-50). Таким образом, экспериментальным воздействием были охвачены основные периоды антенатального развития плода (с 1-го по 16-й день беременности). Контрольным животным в те же сроки беременности вводили соответствующие объемы свежеприготовленного физиологического раствора. На 20-й день беременности крыс забивали декапитацией под легким эфирным наркозом. Плоды извлекали из брюшной полости самок, отделяли от плодных оболочек и пуповины. Внешнее состояние плодов оценивали путем тщательного визуального осмотра. Затем плоды фиксировали в жидкости Буэна и исследовали состояние внутренних органов на серии стандартных срезов тотальных препаратов плодов макромикроскопическим методом Уилсона в описанной модификации [4].

В эксперименте использовано 363 беременные крысы и исследовано 1592 плода 20-го дня развития. Полученные данные обработаны статистически.

Результаты и их обсуждение. При исследовании тератогенной активности химических веществ существенным является вопрос о проницаемости плацентарного барьера для данного соединения [8]. Принято считать, что через плаценту в плод путем простой диффузии способны проникать вещества с молекулярной массой до 1000 дальтон [9]. Учитывая полидисперсный характер исследуемого соединения, не исклю-

чена возможность его трансплацентарного перехода. Наличие в плаценте механизмов активного транспорта веществ и пиноцитоза [8] делают эту возможность еще более вероятной. Кроме того, имеются экспериментальные данные, полученные на белых крысах и человеке [11], свидетельствующие о том, что ПЭО-1500, покидая кровеносное русло, распределяется в органах тела.

Для исследования трансплацентарной проницаемости ПЭО-1500 использовали белых крыс 20-го дня беременности, поскольку известно, что к концу беременности, по мере структурно-функционального созревания плаценты, ее проницаемости для химических веществ повышается [1]. В результате проведенных опытов установлено, что ни при одной из изученных доз в исследованном интервале времени после введения полимер в амниотической жидкости плодов не обнаруживался. Учитывая большие дозы вводимого вещества (до 7,7 г/кг массы тела) и достаточно высокую чувствительность использованного метода (0,005 % — для ПЭО-1500 и 0,02 % — для ПЭО-400), этот факт можно считать важным косвенным свидетельством отсутствия у данного полимерного соединения способности проникать через плацентарный барьер в плод. Однако следует признать, что полученные данные недостаточны для суждения о проницаемости полиэтиленоксида средней молекулярной массы 1500 дальтон через плаценту и этот вопрос требует более глубокого исследования.

Тем не менее известно, что ксенобиотики, поступающие в организм, могут оказывать и опосредованное действие на эмбрион, обусловленное метаболитами, нарушениями общего гомеостаза и рядом других факторов [8]. Поэтому для оценки опасности развития тератогенного эффекта при введении ПЭО-1500 в организм нами было проведено специальное исследование с однократным введением больших доз полимера в отдельные дни беременности. При визуальном осмотре плодов 20-го дня развития отклонений от нормы не отмечалось, за исключением единичного случая расположения кишечника вне брюшной полости у плода из группы с введением ПЭО на 14-й день беременности.

При изучении состояния внутренних органов плодов не выявилось существенных аномалий развития ни в одной из опытных групп. Отмеченные неспецифические нарушения в состоянии плодов, такие как отек подкожно-жировой клетчатки, подкожные гематомы различной степени генерализации и кривоизлияния в брюшную полость, были представлены в опытных и контрольных группах со сходной частотой, что позволяет их отнести к спонтанным аномалиям развития, не обусловленным введением вещества. В единичных случаях отмечались кровоизлияния в других органах: в мозгу — при введении ПЭО на 9-й; в грудной полости — на 10- и 11-й; в печени — на 14-й день беременности.

Таким образом, в опытах с однократным введением ПЭО-1500 нелинейным белым крысам в дозе, которая в 10 раз превышает рекомендованную для клинического применения [7], в основные периоды антенатального развития плода, показано отсутствие у ПЭО-1500 способности индуцировать аномальный эмбриогенез.

Сопоставляя полученные данные с некоторыми упомянутыми выше биологически важными свойствами ПЭО, установленными в опытах *in vitro*, можно предположить, что благодаря высокой скорости выведения полимера из организма [11] *in vivo* не достигаются условия, необходимые для реализации выявленных свойств полиэтиленоксида.

Результаты проведенного исследования позволяют заключить, что полиэтиленоксид средней молекулярной массы 1500 дальтон не обладает потенциальной тератогенной способностью. Получены данные, косвенно свидетельствующие о том, что данный полимер не проникает через плацентарный барьер в плод.

1. Бодяжина В. И. О действии лекарственных веществ на плод. — *Акушерство и гинекология*, 1964, № 5, с. 22—28.
2. Глушко Т. А., Маркова О. П. Особенности пролиферации лейкоцитов периферической крови человека при культивировании с различными криопротекторами. — *Арх. патологии*, 1980, 42, № 11, с. 54—57.
3. Гучок М. М., Ханина Л. А., Шраго М. И., Элькина Л. З. Определение содержания полиэтиленоксидов в биологических материалах. — *Лаб. дело*, 1982, № 4, с. 10—11.
4. Дыбан А. П., Баранов В. С., Акимова И. М. Основные методические подходы к тестированию тератогенной активности химических веществ. — *Арх. анатомии, гистологии и эмбриологии*, 1970, 59, № 10, с. 89—100.
5. Карташов В. Ф., Гучок М. М. О безопасности малых доз полиэтиленоксида-1500 в период беременности. — *Криобиология и криомедицина*, 1983, вып. 12, с. 59—62.
6. Митряев А. Б. Влияние замораживания и криопротекторов на ДНК-зависимые РНК-полимеразы из печени крыс: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Харьков, 1978. — 19 с.
7. Пушкарь Н. С., Шраго М. И., Белоус А. М., Калугин Ю. В. Криопротекторы. — К.: Наук. думка, 1978. — 201 с.
8. Саноцкий И. В., Фоменко В. Н. Отдаленные последствия влияния химических соединений на организм. — М.: Медицина, 1979. — 231 с.
9. Чернух А. М., Александров П. Н. О тератогенном действии химических (лекарственных) веществ. — М.: Медицина, 1969. — 176 с.
10. Moiseyev V. A., Nardid O. A., Belous A. M. On a possible mechanism of the protective action of cryoprotectants. — *Cryoletters*, 1982, 3, N 1, p. 17—26.
11. Shaffer C. B., Critchfield F. H. The absorption and excretion of the solid polyethylene glycols („Carbowas” compounds). — *J. Amer. Pharm. Assoc. Sci. Ed.*, 1947, 36, N 5, p. 152—157.

Ин-т пробл. криобиологии
и криомедицины АН УССР, Харьков

Получено 29.03.83

УДК 57.043:611.36—018.2—018.7:547.422.426.1

В. Ф. Козлова, Н. С. Сигал

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭПИТЕЛИАЛЬНОЙ И СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ ПЕЧЕНИ ЖИВОТНЫХ ПРИ ВВЕДЕНИИ В ОРГАНИЗМ КРИОПРОТЕКТОРОВ

Проведенные комплексные исследования токсикофармакологических свойств криозащитных веществ, относящихся к группе оксиэтильных производных многоатомных спиртов (ОПМС) этиленгликоля — полиэтиленоксида и глицерина — оксиэтилированного глицерина, показали их низкую токсичность, однотипный характер действия, в основе механизма которого лежат дегидратирующие и осмотические свойства, а также выявили наиболее чувствительные к ним органы — печень и почки [2,5—9].

Изучение морфофункционального состояния эпителиальной и соединительной ткани такого жизненно важного органа, как печень, является необходимым условием при выявлении действия на организм новых лекарственных веществ, в том числе и криопротекторов, поскольку эти тканевые системы обеспечивают многочисленные функции синтеза, биотрансформации и обезвреживания поступающих веществ.

С момента повреждающего действия вещества и связанного с ним нарушения физиологической регенерации включается механизм, усиливающий репродуктивные процессы в печени. Поэтому дистрофию и репаративную регенерацию рассматривают как два противоположных отклонения физиологической регенерации от ее нормального течения [14].

Несмотря на органическую связь между физиологической и репаративной регенерацией как составных единого биологического процес-

са непрерывного обновления структур организма, важным моментом является установление взаимоперехода одной формы в другую с целью определения повреждающего действия агента. Одним из проявлений компенсаторной реакции печеночной ткани на действие гепатотропного яда является повышение синтеза ДНК в гепатоцитах, обеспечивающее последующее деление печеночных клеток или их полиплоидизацию, характеризующих развертывание внутриклеточных и клеточных регенераторных процессов [1, 14].

Цель настоящего исследования — изучение состояния эпителиальной и соединительной ткани печени, обнаружение поломок, особенно выявление ранних и латентных изменений в системе клетка—ткань—орган в ответ на введение криопротекторов полиэтиленоксида со средней молекулярной массой 1500 (ПЭО-1500) и оксиэтилированного глицерина со средней молекулярной массой 1412 (ОЭГ-1412) в различных дозах и концентрациях, определение зависимости «доза—время—эффект» при оценке биологической активности криопротекторов, а также установление характера течения восстановительных процессов в паренхиме и строме, взаимоперехода физиологической и репаративной регенерации.

Методы исследования. Исследования проведены на половозрелых белых беспородных крысах и кроликах породы шиншилла, которым парентерально вводили ПЭО-1500 и ОЭГ-1412 в острых и подострых опытах: многократно в течение месяца в малых дозах (1/30 и 1/20 ДЛ-50 в 10- и 20 %-ных концентрациях), троекратно в средних (1/10 и 1/5 ДЛ-50 в 10- и 20 %-ных растворах), однократно в больших (летальных и сублетальных дозах 20-, 30- и 50 %-ных концентрациях).

В сериях экспериментов на крысах, которым вводили 20 %-ные растворы ОЭГ-1412 в дозах 1/20 и 1/5 ДЛ-50 за два часа до забоя, однократно парентерально вводили ^3H -тимидин 1 мкКи на 1 кг массы тела (37 МБК) молекулярной активности 48 кКи/моль (1790 ТБК/моль) с целью автордиографического исследования пролиферативной активности клеток печени.

Во всех сериях экспериментов был поставлен контроль с введением животным соответствующих объемов физиологического раствора. Забой животных всех групп осуществляли путем декапитации сразу, а в отдельных сериях — через 12 и 30 дней после окончания введения веществ.

Методами исследования служили патологоанатомическое вскрытие, гистологический и гистохимический анализ, автордиография и морфометрия. После патологоанатомического вскрытия животных и макроскопической оценки органов отбирали кусочки печени и фиксировали их в 10 %-ном растворе нейтрального формалина и смеси Карнуа. Целлоидин-парафиновые срезы печени окрашивали гематоксилин-эозином, пикрофуксином по ван-Гизону, альциановым синим и реактивом Шиффа по Моури. Для автордиографии использовали мелкозернистую эмульсию типа «М» с экспозицией три недели. Криостатные срезы печени избирательно окрашивались на липиды суданом III и IV, а также суданом черным В. На гистологических препаратах проводили качественную оценку состояния эпителиальной и соединительной ткани печени, морфометрию клеток и их ядер, подсчет количества двуядерных гепатоцитов, определяли митотическую активность и индекс меченых ^3H -тимидином клеток. Результаты исследования подвергались статистической обработке по Фишеру-Стьюденту.

Результаты и их обсуждение. Морфологические исследования показали, что печень кроликов и крыс, которым в течение месяца вводили криозащитные вещества группы ОПМС в малых дозах 10 %-ной концентрации, не изменяет свою цитоархитектонику, имеет характерное строение и обычное соотношение эпителиальной и соединительной ткани (рис. 1). Соединительнотканная основа печени в виде крупнопетлистой сети разделяет паренхиму органа на небольшие участки — дольки.

Последние, как и у животных контрольной группы, более выражены у кроликов в связи с наличием междольковых трабекул и менее четко контурируют у крыс, поскольку прослойки соединительной ткани у них встречаются только в зоне триад. По современным представлениям печеночные триады в виде разветвлений воротной вены и печеночной артерии, а также междольковых желчных протоков, окруженных соединительно-ткаными и нервными волокнами с прилегающими клетками паренхимы и микроциркуляторным руслом, формируют своеобразный микрорайон, где осуществляется транспортная и трофическая

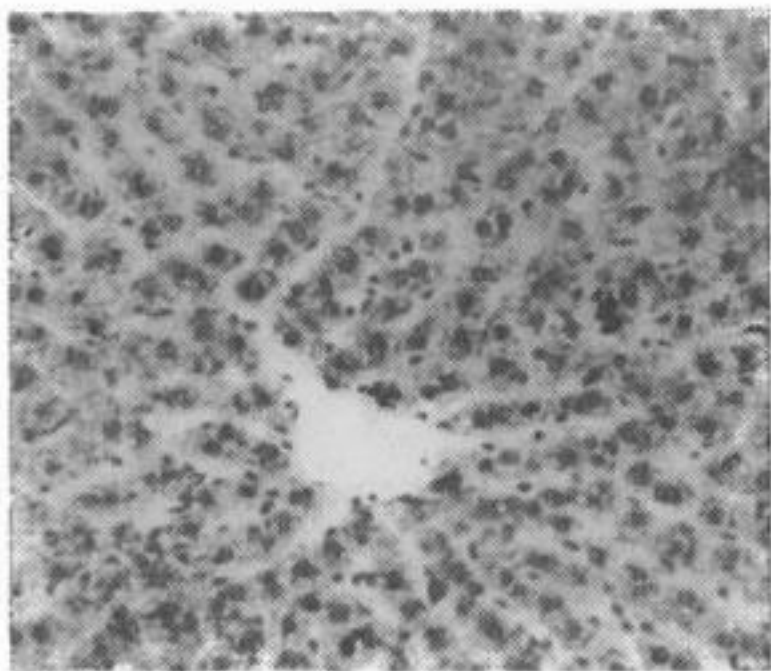


Рис. 1. Характерная структура ткани печени подопытной крысы. Гематоксилин-эозин, $\times 112,5$.

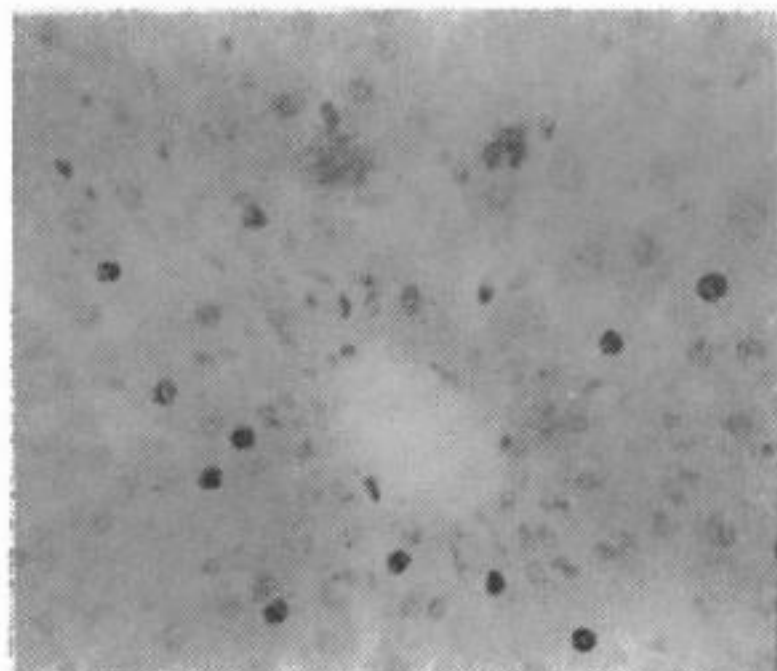


Рис. 2. Интенсивный синтез ДНК гепатоцитами и эндотелиоцитами центробулярной зоны печени подопытной крысы. Авторадиография, гематоксилин-эозин, $\times 160$.

функция системы кровь—клетка—лимфа, обеспечивающие тканевой гомеостаз [3, 4]. В наших исследованиях не выявлено нарушения тканевого гомеостаза микрорайонов печени. Внутренняя, средняя и наружная оболочки междольковых вен и артерий печени подопытных животных не изменены. Синусоидные капилляры вокруг центральной вены слегка расширены и выстланы более рыхло расположенными эндотелиальными клетками. Отмечается полиморфизм звездчатых эндотелиоцитов (клеток Купфера), относящихся к макрофагальной системе и способных к активному фагоцитозу, выполняя защитную функцию, однако у животных подопытных групп преобладают относительно «спокойные» клетки небольших размеров, вытянутой отросетчатой формы.

Звездчатые эндотелиоциты находятся в тесном контакте с клетками железистой паренхимы органа — гепатоцитами, которые располагаются тяжами, формируя печеночные пластинки. Гепатоциты типичной полигональной формы достигают размеров 20—21 мкм у кроликов и 16—17 мкм у крыс. Их ядра округлой формы, диаметра 6—7 мкм, четко структурированы, содержат 2—3 ядрышка. У кроликов многие печеночные клетки (до 15 %), чаще расположенные по периферии долек, содержат по два ядра. У крыс двухъядерные клетки распределены более равномерно во всех зонах долек. Их количество у подопытных животных достигает $8,4 \pm 0,2$ %, что статистически достоверно не отличается от процента двухъядерных клеток печени контрольных крыс $8,8 \pm 0,3$ ($p > 0,05$). Гепатоциты обладают слабой митотической активностью. У кроликов митозы в печени практически отсутствуют, у крыс подопытной группы митотический индекс гепатоцитов $0,3 \pm 0,4$ % не отличается от контроля $0,5 \pm 0,4$, $p > 0,05$.

Особенностями печени животных, которым в течение месяца вводили 20%-ные растворы криопротекторов в дозе 1/20 ДЛ-50, явились некоторое расширение просветов синусоидных капилляров, реактивное состояние звездчатых эндотелиоцитов, признаки обезвоживания

паренхимы на периферии долек и наряду с этим гипертрофия некоторых гепатоцитов, особенно их ядер, в центральной части долек. У крыс отдельные гепатоциты в диаметре достигают 24—25, а их ядра — 15—16 мкм. Отмечаются усиление ДНК-синтезирующей способности клеток печени, статистически достоверное уменьшение числа двухъядерных гепатоцитов ($6,4 \pm 0,6\%$) и усиление их митотической активности ($5,2 \pm 1,6\%$), что может свидетельствовать о проявлении перехода физиологической регенерации в репаративную и подтверждает ранее высказанное предположение о пороговости дозы [9].

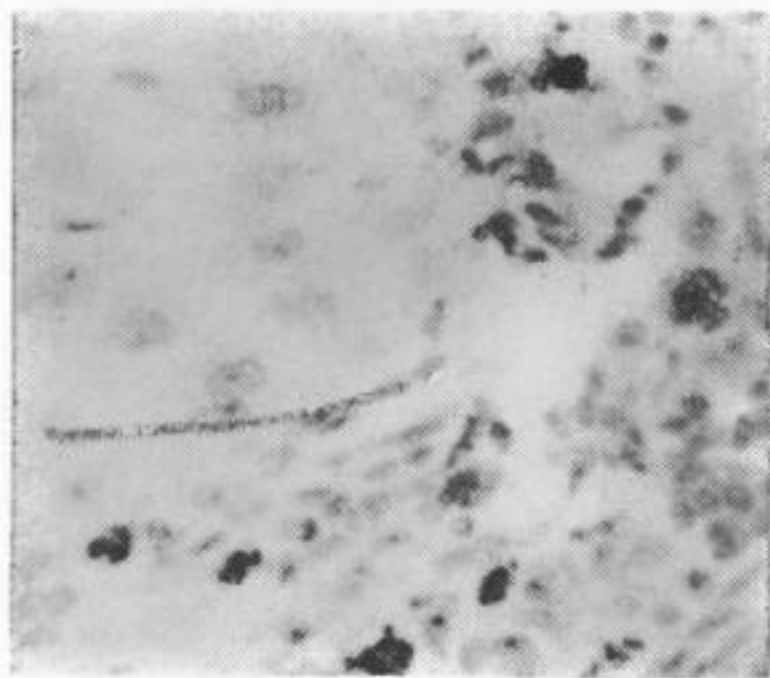


Рис. 3. Автографы клеток соединительной ткани печени подопытных животных, меченые ^3H -тимидином. Зона триад. Авторадиография, гематоксилин-эозин, $\times 160$.

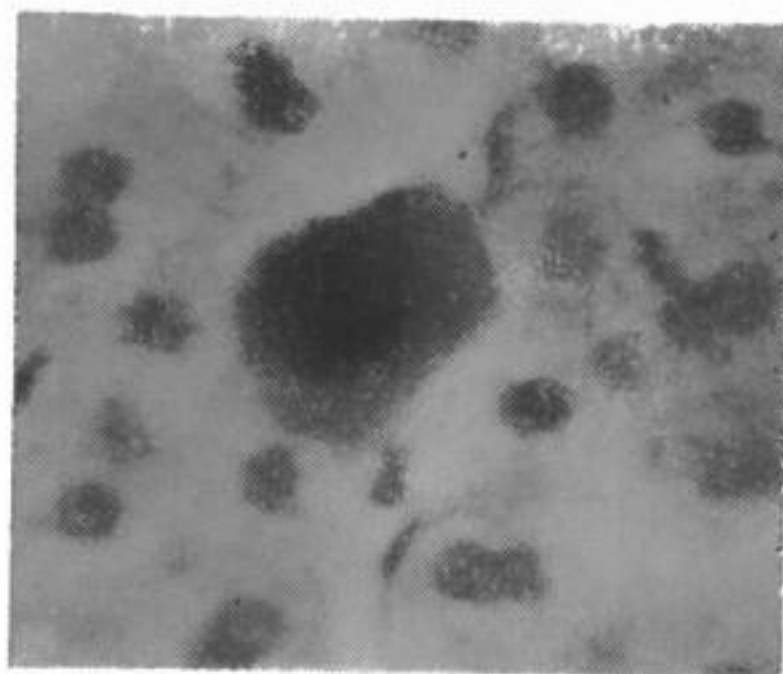


Рис. 4. Гипертрофия клеток печени подопытной крысы. Гематоксилин-эозин, $\times 500$.

При повторном введении в организм животных изучаемых веществ в средних дозах выявлена ранняя реакция клеточных элементов эпителиальной и соединительной ткани печени. Это проявляется в усиленном синтезе ДНК клетками паренхимы и стромы (рис. 2, 3), в реактивном состоянии звездчатых эндотелиоцитов, их гипертрофии и превращении в макрофаги, а также появлении перипортально в зоне триад молодых альцианофильных лаброцитов. Последние обнаруживаются в отсутствие дистрофических изменений паренхимы (1/10 ДЛ-50), а также при развитии зернистой дистрофии гепатоцитов (1/5 ДЛ-50). Они свидетельствуют о нарушении проницаемости сосудов и тканевого гомеостаза, являясь индикатором функционального напряжения органа, регулятором его гидрофильности и сосудистотканевой проницаемости при реакции адаптации на клеточном, тканевом и органном уровнях.

У подопытных животных наряду с нарушением микроциркуляторного русла имеют место обезвоживание клеток паренхимы, уменьшение содержания в них нейтральных полисахаридов — гликопротеинов и признаки зернистой дистрофии, полиплоидия и усиление митотической активности гепатоцитов ($2,2\%$) (рис. 4, 5).

Изучение ДНК-синтезирующей способности клеток печени по включению ^3H -тимидина показало ее статистически достоверное усиление у подопытных животных, забитых сразу после трехкратного парантерального введения криопротекторов в дозе 1/5 ДЛ-50 ($p < 0,02$), и снижение до исходного уровня в контроле при отставленном забое — через две недели после окончания введения вещества ($p > 0,05$). Характерно, что подъем синтеза ДНК совпадает с проявлением дистрофических изменений печеночных клеток, а снижение синтетической активности — с ослаблением деструктивных изменений тканей.

Несколько иначе ведут себя клетки соединительной ткани печени, в том числе и клетки Купфера, количество этих меченых ^3H -тимидином клеток не уменьшается и к концу наблюдения. Это, по-видимому, связано с их пролиферацией, а также с тем, что строма несет не толь-

ко барьерную функцию в организме, но и участвует в проведении «информации структуры» [4, 15], т. е. в формировании тех потоков энергетического и пластического обеспечения, которые необходимы для адекватной перестройки паренхиматозных клеток, в том числе для процессов восстановления паренхимы. Между клетками паренхимы и стромы существуют прямые и обратные связи, в связи с чем паренхиматозная клетка может переходить на новый адаптивный уровень функционирования, в результате чего достигается оптимизация работы микрорайона ткани печени в целом. При адекватно текущей регенерации

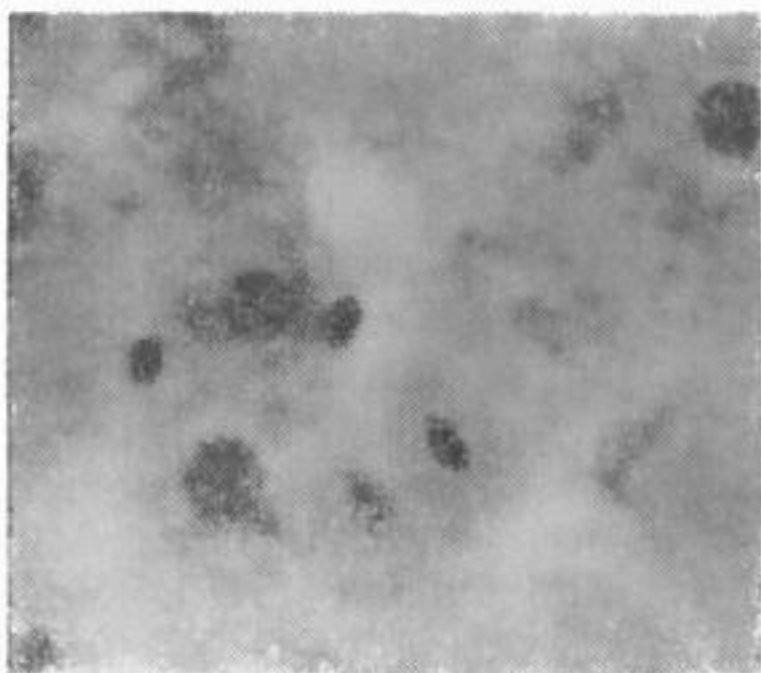


Рис. 5. Митоз гепатоцитов подопытной крысы. Гематоксилин-эозин, $\times 500$.

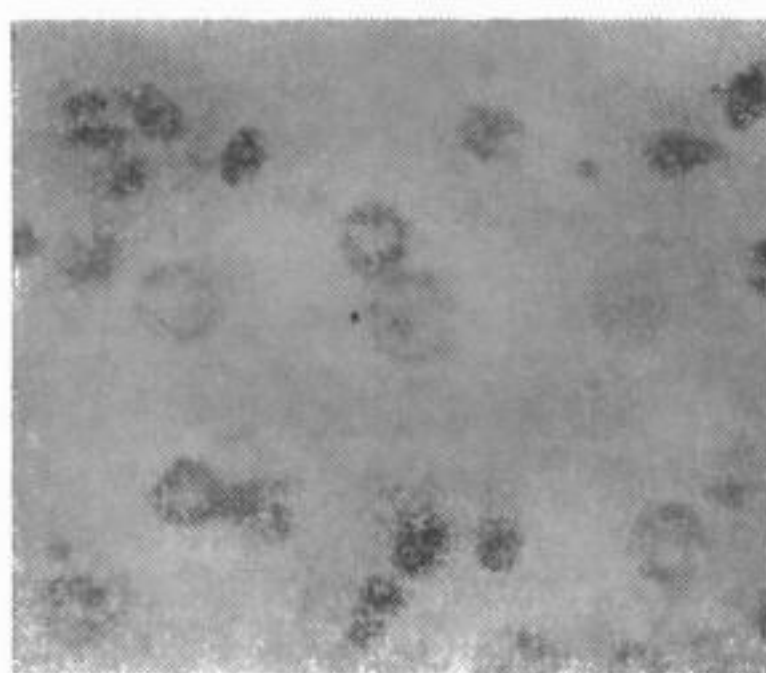


Рис. 6. Дистрофия клеток печени подопытной крысы. Гематоксилин-эозин, $\times 500$.

восстанавливается динамическое равновесие между элементами стромы и паренхимы и структурный гомеостаз органа не нарушается [3, 10].

В наших исследованиях наиболее активными ДНК-синтезирующими зонами печеночной дольки являются центральная и периферическая, поскольку наибольшее количество гипертрофированных, делящихся и меченых ^3H -тимидином клеток наблюдается вокруг центральной вены и в зоне триад (см. рис. 2, 3). По-видимому, эта энергетически высокоактивная популяция клеток обеспечивает поддержание гомеостаза на уровне отдельных зон печеночной дольки, а также всего органа, что согласуется с данными литературы [12, 13]. Авторадиографическое исследование ДНК-синтезирующей способности клеток печени показало большие потенциальные возможности пролиферативной способности ткани печени при повреждении. Наблюдаемое в наших экспериментах увеличение, а затем уменьшение числа меченых ^3H -тимидином клеток паренхимы на фоне гипертрофии и гиперплазии эпителиальных и соединительнотканых элементов печени свидетельствует о развитии защитно-приспособительной реакции органа на вводимое вещество в средней дозе, а затем адаптации к нему. С увеличением дозы (сублетальные, летальные) отмечается усиление дегидратирующегося и гепатотоксического действия ОПМС, что проявляется в уплотнении и уменьшении размеров гепатоцитов, в альтеративных изменениях эпителиальных и соединительнотканых элементов печени в виде диспротеинозов. Немаловажную роль в их развитии, по-видимому, играет циркуляторная гипоксия, возникающая в связи с наблюдаемыми застойными явлениями, особенно выраженными в зоне триад.

Особенности гемодинамики печени обуславливают неоднородность свойств гепатоцитов, расположенных в различных зонах печеночных долек. В клетках периферической зоны обычно преобладают выработка желчи, синтез и отложение гликогена топографически осуществляются в обратном направлении — от центра к периферии дольки. Аналогично топографии выработки гликогена зафиксировано проявление детоксикационной функции гепатоцитов — наличие в клетках центральной зоны токсифицирующих ферментов для биотрансформации чужеродных веществ [16, 17].

В результате нашего исследования обнаружена неоднозначная реакция клеток печени подопытных животных на введение криопротекторов в больших дозах. Она характеризуется вариабельностью морфофункционального состояния гепатоцитов, потерей ими от периферии к центру углеводных компонентов, диффузным развитием зернистой и гидропической дистрофии. Наибольшее функциональное напряжение и признаки диспротеинозов гепатоцитов отмечаются в центролобулярных зонах долек и проявляются гипертрофией клеток, глыбчатостью или зернистостью их цитоплазмы, полиморфизмом ядер: крупных, с большим количеством равномерно расположенного хроматина, крупных, светлых почти лишенных хроматина или наличием его только на внутренней поверхности ядерной мембраны. В меньшей мере встречаются клетки с кариопикнозом и кариолизом (рис. 6). В периферических зонах печеночных долек появляются в большом количестве «темные» клетки, более устойчивые к применяемым воздействиям и, по-видимому, отражающие реакцию адаптации органа на повреждение и сохранение тканевого гомеостаза. На периферии органа субкапсулярно зафиксировано появление молодых клеток камбиального типа, хотя в литературе наличие камбиальных элементов в ткани печени оспаривается [1, 4, 10—14, 16]. Устойчивыми к применяемым воздействиям оказались стенки междольковых желчных протоков, состоящие из кубического и цилиндрического эпителия, единичных бокаловидных клеток и тонкого слоя рыхлой волокнистой соединительной ткани. При введении криопротекторов в больших дозах обнаружено увеличение количества бокаловидных клеток, насыщенных смесью гликопротеинов и гликозаминогликанов, альцианофильных тучных клеток вблизи сосудов и активных купферовских клеток.

Таким образом, в динамике патологического процесса, развивающегося в печени животных при парентеральном введении ОПМС в больших дозах, наряду с регрессивными имеют место и прогрессивные клеточные формы в виде реактивно увеличенных звездчатых эндотелиоцитов, появлении в зоне триад большого количества молодых лаброцитов и бокаловидных клеток в стенке междольковых желчных протоков, субкапсулярно расположенных камбиальных клеток, гипертрофированных и делящихся гепатоцитов, характеризующих репаративную регенерацию органа. Репарация ткани печени осуществляется за счет клеточной и внутриклеточной (особенно у кроликов) форм регенерации. Важным является то, что дистрофические изменения тканей печени, даже достигнув своего наибольшего проявления при введении в организм животных ОПМС в больших дозах, как показали исследования в более отдаленные сроки, оказались обратимыми.

Следовательно, в результате патологоанатомического, гистологического, гистохимического и автордиографического исследования установлена четкая зависимость «доза—время—эффект» в системе клетка—ткань—орган при парентеральном введении в организм криопротекторов ПЭО-1500 и ОЭГ-1412, определены безвредность их в малых дозах, интенсивность и обратимость реакций тканей печени при применении в средних и больших дозах, показаны адекватная динамика восстановительных процессов в эпителиальной и соединительной ткани печени, а также взаимопереход физиологической и репаративной регенерации на внутриклеточном, клеточном, тканевом и органном уровнях, характеризующие развитие компенсаторно-приспособительной и адаптивной реакции печени.

1. Бродский В. Я., Урываева И. В. Клеточная полиплоидия. Пролиферация и дифференцировка. — М.: Наука, 1981. — 259 с.
2. Гучок М. М., Верховский Б. А., Козлова В. Ф. и др. О токсичности полиэтиленоксида-1500. — В кн.: Тез. докл. III съезда фармакологов. Винница, 1977, с. 52—54.
3. Казначеев В. П. Биосистема и адаптация. — Новосибирск: Наука, 1973. — 78 с.

4. Казначеев В. П., Субботин М. Я. Этюды к теории общей патологии. — Новосибирск: Наука, 1971. — 235 с.
5. Козлова В. Ф. Морфологические аспекты реакции клеток, тканей и органов на введение оксиэтилированного глицерина (ОЭГ) в организм животных. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 6, с. 29—34.
6. Козлова В. Ф., Гучок М. М., Щетинский И. М., Верховский Б. А. Итоги морфологического исследования действия некоторых криопротекторов на организм животных. — В кн.: Механизмы криоповреждения и криозащиты биологических структур. Киев: Наук. думка, 1977, с. 36—37.
7. Козлова В. Ф., Гучок М. М., Щетинский И. М., Верховский Б. А. Патоморфологическая оценка влияния криопротектора полиэтиленоксида молекулярного веса 1500 на организм животных. — Криобиология и криомедицина, 1978, вып. 4, с. 68—71.
8. Козлова В. Ф., Шенберг М. Г., Гучок В. М. и др. Неспецифическая реакция адаптации организма на оксиэтильные производные некоторых многоатомных спиртов. — В кн.: Эндокринная система организма и токсические факторы внешней среды: Матер. конф. Л., 1980, с. 157—164.
9. Козлова В. Ф., Шенберг М. Г., Гучок М. М., Щетинский И. М. Митотический индекс и полиплоидия клеток печени как показатель порога вредного действия веществ. — В кн.: Материалы II Всесоюз. симпоз. по сомат. полиплоидии. — Ереван, 1977, с. 52—54.
10. Маянский Д. Н. Клетка Купфера и система мононуклеарных фагоцитов. — Новосибирск: Наука, 1981. — 172 с.
11. Меттсон П. Регенерация — настоящее и будущее. — М.: Мир, 1982. — 175 с.
12. Павлов А. В. Клеточный состав различных зон печеночной долики крыс и кроликов в норме и после экспериментальных воздействий. — Арх. анатомии, гистологии и эмбриологии, 1978, вып. 8, с. 63—69.
13. Пятницкий Н. Н., Жминченко В. М., Касьяненко В. В. и др. Цитологическая организация печеночной балки у крыс. — Бюл. эксперим. биологии и медицины, 1976, 81, вып. 5, с. 606—608.
14. Саркисов Д. С. Очерки по структурным основам гомеостаза. — М.: Медицина, 1977. — 351 с.
15. Серов В. В., Шехтер А. В. Соединительная ткань (Функциональная морфология и общая патология). — М.: Медицина, 1981. — 312 с.
16. Урываева И. В., Фактор В. М., Делоне Г. В. Развитие и локализация в печеночной дольке функции детоксикации. — В кн.: Цитологические механизмы гистогенезов. М.: Наука, 1979, с. 152—154.
17. Шкурин В. А. Ультраструктура «темных гепатоцитов» в условиях физиологической нормы и токсикологического повреждения печени. — Цитология и генетика, 1975, 9, вып. 5, с. 408—411.

Ин-т проб. криобиологии
и криомедицины АН УССР, Харьков

Получено 04.01.83

УДК 547.422.426.1:577.15

Е. Л. Воловельская, А. М. Грек

ВЛИЯНИЕ КРИОПРОТЕКТОРОВ НА СТРУКТУРНЫЕ СВОЙСТВА ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

К настоящему времени становится очевидным, что классические представления о механизме защиты биологических объектов в условиях замораживания—оттаивания с помощью различных криопротекторов, учитывающие только способность криопротективных веществ изменять коллигативные свойства растворов, являются недостаточными для полного и удовлетворительного решения данной проблемы. Экспериментальные факты свидетельствуют, что криопротективные вещества, не меняя ряд физико-химических параметров растворителя, в то же время могут непосредственно взаимодействовать с различными клеточными структурами. Установлено влияние многих криозащитных соединений на конформацию каталитических и других белков [2, 3, 10, 14, 15], кинетические свойства изолированных и мембраносвязанных ферментов [5, 7, 9, 11, 12, 17], причем в ряде случаев обнаружена способность этих веществ повышать стабильность биологических макромолекул к различным повреждающим воздействиям [8, 13, 16]. Вместе с тем многие вопросы, связанные с пониманием молекулярных механизмов взаимодействия криопротекторов и биологических

структур, остаются не решенными. Учитывая сказанное, мы поставили задачу выяснить влияние криопротекторов-полиэтиленгликолей различной молекулярной массы на активность и некоторые структурные свойства лактатдегидрогеназы, используя для этой цели изучение спектров флуоресценции этого фермента.

Материалы и методы. В опытах использовали очищенный изофермент лактатдегидрогеназы (ЛДГ), содержащий только М-субъединицы (М₄-ЛДГ). Исходным источником для получения изофермента служил коммерческий препарат лактатдегидрогеназы, выделенный из

Т а б л и ц а 1. Влияние криопротекторов на активность М₄-ЛДГ, % к контролю

№ п/п	Криопротектор	Активность М ₄ -ЛДГ в присутствии различных концентраций криопротекторов		
		5%	10%	15%
1	ПЭГ-400	99,7±0,6	99,8±1,5	91,1±0,7
2	ПЭГ-1000	100,5±2,9	94,1±0,5	91,7±0,8
3	ПЭГ-4000	101,8±2,8	91,4±0,6	91,5±1,4

мышцы свиньи («Реанал», Венгрия). Выделение и очистку М₄-ЛДГ проводили согласно процедуре, описанной нами ранее [4]. Полученный ферментный препарат растворяли в солевой среде, содержащей в конечной концентрации 1М NaCl; 0,1М NaH₂PO₄ (рН=7,4), содержание ферментного белка в пробах находилось в пределах 500—750 мкг на 1 мл раствора. К пробам указанного состава добавляли полиэтиленгликоли молекулярной массы 400 (ПЭГ-400), 1000 (ПЭГ-1000), 4000 (ПЭГ-4000) до конечной концентрации каждого из этих веществ 5, 10, 15 %, инкубировали в течение 30 мин при 20 °С, после чего определяли ферментативную активность и регистрировали спектры флуоресценции. Контролем служили образцы, не содержащие криопротекторов.

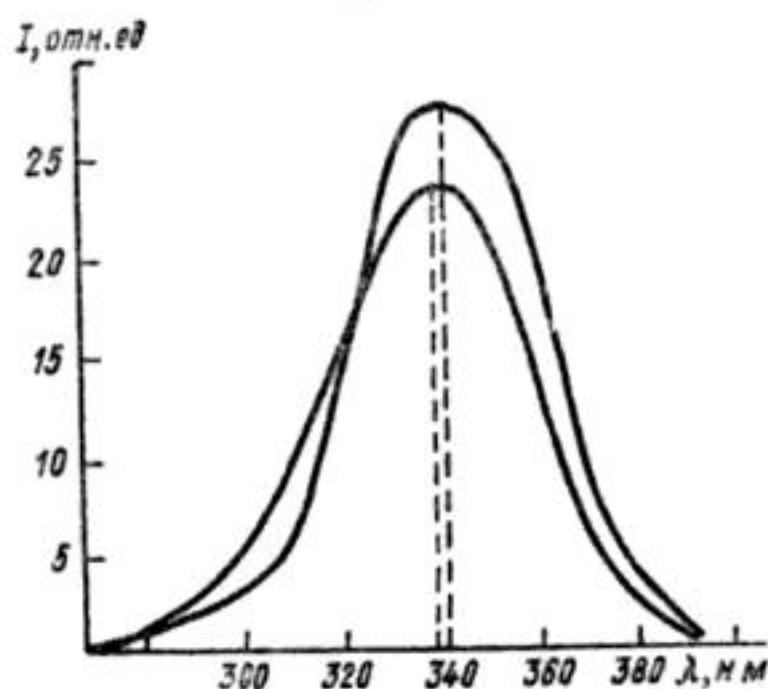
Активность лактатдегидрогеназы определяли по методу, данному в работе [18], и рассчитывали в микромолях НАД-Н на 1 мг белка за 1 мин инкубации реакционной смеси при 37 °С. Количество белка определяли спектрофотометрически при 280 нм и рассчитывали по калибровочной кривой.

Спектры флуоресценции лактатдегидрогеназы регистрировали на спектрофлуориметре модели MPF-2A («Хитачи», Япония) при двух длинах волн возбуждения — 280 и 296 нм. Величины максимума спектра флуоресценции определяли по соотношению интенсивности свечения на склонах спектральных кривых [1], что позволяло рассчитывать положение максимума с точностью ±0,1 нм. Результаты представлены средними величинами из 5—7 опытов с указанием стандартной ошибки.

Результаты и их обсуждение. Из табл. 1 видно, что в присутствии низких концентраций полиэтиленгликолей (5%), независимо от их молекулярной массы, не происходит заметных изменений активности лактатдегидрогеназы. Увеличение содержания ПЭГ-1000 и ПЭГ-4000 в пробах до 10% приводило к небольшому снижению активности фермента, тогда как ПЭГ-400 в такой же концентрации не оказывал влияния на этот показатель. В 15%-ной концентрации все изучавшиеся криопротекторы примерно в равной степени вызывали небольшое снижение активности лактатдегидрогеназы. Полученные результаты позволяют предполагать, что снижение функциональных свойств лактатдегидрогеназы может быть обусловлено влиянием полиэтиленгликолей на конформацию ферментативного белка. Показано, что полиэтиленгликоли различной молекулярной массы вызывают изменения четвертичной структуры тетрамерного фермента *l*-аспарагиназы [15]. В присутствии полиэтиленгликоля наблюдается нарушение вторичной

структуры ряда олигопептидов [16], а также отмечены значительные изменения кинетических параметров многих растворимых ферментов, что расценивается как результат конкурентного или неспецифического влияния данного вещества на активный центр каталитических белков [5, 11, 12].

При исследовании флуоресцентных характеристик M_4 -лактатдегидрогеназы в солевой среде, не содержащей криопротекторов, было установлено, что спектр флуоресценции ферментного белка представляет собой бесструктурную полосу с наличием максимумов свечения — 340 и 336 нм при длинах волн возбуждения 280 и 296 нм соответственно (см. рисунок). Существование различий в положении максимумов флуоресценции при применяемых длинах волн возбуждения свидетельствует о том, что белковая флуоресценция фермента определяется двумя хромофорами — триптофановыми и тирозиновыми остатками в молекуле лактатдегидрогеназы. Добавка в раствор фермента полиэтиленгликолей сопровождалась заметными изменениями спектральных характеристик лактатдегидрогеназы (табл. 2).



Влияние криопротекторов на структуру M_4 -ЛДГ.

При изучении влияния криопротекторов на положение максимума спектра белковой флуоресценции M_4 -ЛДГ (см. табл. 2) было установлено, что добавление криопротекторов различной молекулярной массы в 15% концентрации приводило к сдвигу максимума. При длине возбуждения 280 нм отмечался коротковолновый сдвиг максимума спектра флуоресценции, а при длине волны возбуждения 296 нм — длинноволновый сдвиг. Наибольший коротковолновый сдвиг максимума спектра флуоресценции наблюдался в присутствии 15% ПЭГ-4000. Величина длинноволнового сдвига $\lambda_{\text{возб}} = 296$ нм не зависела от молекулярной массы криопротектора.

Необходимо обратить внимание на то, что в присутствии изучавшихся криопротекторов положение максимума флуоресценции лактат-

Таблица 2. Влияние криопротекторов в 15%-ной концентрации на положение максимума спектра флуоресценции M_4 -ЛДГ

№ п/п	Криопротектор	Максимум флуоресценции	
		при $\lambda_{\text{возб}} = 280$ нм	при $\lambda_{\text{возб}} = 296$ нм
1	Контроль	340	336
2	ПЭГ-400	338	338
3	ПЭГ-1000	338	338
4	ПЭГ-4000	337	338

дегидрогеназы не зависит от длины волны возбуждения, и, следовательно, белковая флуоресценция в этом случае определяется только свечением триптофановых остатков. Такое явление можно объяснить тем, что в результате действия полиэтиленгликолей на конформацию субъединиц фермента происходит перераспреде-

ление триптофановых остатков в более полярное, а тирозиновых — в менее полярное микроокружение, вследствие чего вклад последних в общую флуоресценцию белка снижается. Доказано, что в гидрофобных областях белковой молекулы остатки тирозина находятся в нефлуоресцирующем состоянии [6].

1. Бусел Е. П. Люминесцентные свойства основных хромофоров белка. — В кн.: Молекуляр. биология, М., 1973, с. 88—126.
2. Грек А. М., Луговой В. И., Белоус А. М. Влияние криопротекторов на спектры флуоресценции альбумина сыворотки крови белка. — Укр. биохим. журн., 1974, 1, № 46, с. 62—67.

3. Кирюхин И. Ф. Спектрополяриметрическое изучение γ -глобулина, яичного альбумина и желатины: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Симферополь, 1965. — 17 с.
4. Луговой В. И., Воловельская Е. Л. Исследование изменений субъединичного состава лактатдегидрогеназы при низких температурах. — Укр. биохим. журн., 1980, 52, № 4, с. 441—445.
5. Мосолов В. В., Соколова Е. В. Взаимодействие гликолей и глицерина с активным центром трипсина и химотрипсина. — Докл. АН СССР, 1972, 207, № 1, с. 228—231.
6. Черницкий Е. А., Мажуль В. М. Исследование конформационных переходов сыровоточного альбумина в кислой области люминесцентным способом. — Биофизика, 1970, 15, № 3, с. 408—415.
7. Effect of glycerol on some kinetic parameters of phosphorylase b / Damianovich S., Bot J., Somgyl B., Sumegi J. — Biochem. et biophys. acta, 1972, 284, N 1, p. 345—348.
8. Ibrahim I., Nasz M., Alaa El-Din M. N. Studies of heat stability of lacticmaleic dehydrogenase enzymes (LDH and MDH) in some bacillus species. — Agr. Res. Rev., 1973, 51, N 2, p. 165—170.
9. Laget P., Gallois Y., Jallet P. Effects du glycerol sur les interactions des cations monovalents avec la $(Na^+ - K^+)$ — ATPase des membranes d'erythrocytes humains solubilisees. — Biochimie, 1975, 57, N 8, p. 969—978.
10. Myers J. S., Jakoby W. B. Glycerol as an agent eliciting small conformational changes in alcohol dehydrogenase. — J. Biol. Chem., 1975, 250, N 10, p. 3785—3789.
11. Myers J. S., Jakoby W. B. Effect of polyhydric alcohols on kinetic parameters of enzymes. — Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1979, 51, N 3, p. 631—636.
12. Maurel P., Travers F. Effect de solvants organiques sur la cinetique d'une reaction peroxydasique. — C.r. Acad. Sci., 1973, 276, N 23, p. 3057—3060.
13. O'Malley J. J., Ulmer R. W. Thermal stability of glucose oxidase and its admixtures with synthetic polymers. — Biotechnol. and Bioeng., 1973, 15, N 5, p. 917—925.
14. Ruwart M. J., Holland J. F., Hang A. Fluoronitric evidence of interaction involving cryoprotectants and biomolecules. — Cryobiology, 1975, 12, N 1, p. 26—33.
15. Shifrin S., Parrott C. L. Influence of glycerol and other polyhydric alcohols on the quaternary structure of an oligomeric protein. — Arch. Biochem. and Biophys., 1975, 166, N 3, p. 426—432.
16. Toniolo C., Homora G. M., Fontana A. Polyhydric alcohols: structure-supporting solvents for polypeptides and proteins. — Int. J. Peptide and Protein Res., 1974, 6, N 5, p. 283—285.
17. Tan Kim H., Lourien Rex. Enzymology in aqueous-organic cosolvent-binary mixtures. — J. Biol. Chem., 1972, 247, № 10, p. 3278—3285.
18. Wu R., Racker E. Regulatory mechanism in carbohydrate metabolism. III. Limiting factors in glycolysis of ascite tumor cells. — J. Biol. Chem., 1959, 234, N 5, p. 1028—1035.

Ин-т пробл. криобиологии
и криомедицины АН УССР, Харьков

Получено 11.05.83

УДК 57.043:577.352.001.5

В. Л. Бронштейн, П. Г. Исерович

ФИЗИКО-МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ МАКРОСКОПИЧЕСКОЙ ПОРЫ В ЛИПИДНОМ БИСЛОЕ ПРИ ФАЗОВОМ ПЕРЕХОДЕ

В настоящее время установлена возможность образования макроскопических пор в искусственных липидных мембранах при фазовых переходах [5]. Образование таких пор является причиной потери свойств избирательной проницаемости мембран, их электрического пробоя и т. д. В настоящей статье мы будем называть пору макроскопической, если ее радиус больше толщины мембраны.

Можно предположить, что физической причиной образования пор в мембранах при фазовых переходах является растяжение бислоя, причиной которого служит уменьшение площади, приходящейся на одну молекулу липида в «твердой» фазе. Однако очевидно, что пора, образующаяся при растяжении мембраны, является нестабильной, поскольку нет силы, препятствующей увеличению ее размера. Если мембрана имеет возможность уменьшать свою общую площадь так, что натяже-

ния ее не возникает, то механизм образования макроскопической стабильной поры также трудно предложить.

Рассмотрим физико-математическую модель макроскопической стабильной поры, возникающей в процессе затвердевания «жидкой» липидной фазы внутри более плотной растущей фазы липидов, обсудим криобиологические следствия этого явления.

Физико-математическая модель. Рассмотрим образовавшуюся при фазовом переходе область твердой фазы липида в мембране радиусом R_2 , внутри которой находится включение исходной «жидкой» фазы радиуса R . По мере затвердевания этого включения будет происходить растяжение части мембраны во включении и, как следствие этого, образование поры. По окончании фазового перехода, очевидно, в твердом липидном бислое остается пора радиусом

$$R_1^2 = R^2 \frac{\Delta\omega}{\omega}, \quad (1)$$

где $\frac{\Delta\omega}{\omega}$ — величина относительного уменьшения площади мембраны при затвердевании.

Время жизни такой поры ограничено, поскольку липидам, находящимся вдали, энергетически выгодно диффундировать в пору и она будет постепенно закрываться так же, как залечиваются пустоты в кристаллах, которые образовались при кристаллизации [3]. Другими словами, можно сказать, что пора будет постепенно «испаряться» по мере диффузии из нее вакансий. Движущей силой этого процесса является деформация мембраны, ослабевающая по мере удаления от поры.

Используя известное решение [4] для упруго напряженного цилиндра с полостью

$$\sigma_{rr} = \frac{\sigma R_1}{(R_2^2 - R_1^2)h} \left(1 - \frac{R_2^2}{r^2}\right), \quad (2)$$

где σ_{rr} — соответствующая компонента тензора деформации в цилиндрических координатах (r, φ) ; σ — эффективный коэффициент линейного натяжения на границе поры; h — толщина мембраны, получим выражение для упругой добавки к химическому потенциалу липидов в твердой фазе на границе раздела

$$\varphi = \frac{\omega\sigma}{R_1}. \quad (3)$$

Величина φ , очевидно, подчиняется уравнению Лапласа $\Delta\varphi=0$ с граничными условиями $\varphi(R_1) = \frac{\omega\sigma}{R_1}$, $\varphi(R_2)=0$. Отсюда окончательно получим зависимость φ от координат

$$\varphi = \frac{\omega\sigma}{R_1} \ln \frac{r}{R_2} / \ln \frac{R_1}{R_2}. \quad (4)$$

Используя эту зависимость, имеем выражение для величины диффузионного потока липидов в пору

$$j = D \frac{\partial\varphi}{\partial r} / fKT = \sigma D \omega / r fKT R_1 \ln \frac{R_1}{R_2}, \quad (5)$$

где f — коэффициент отражения; D — коэффициент диффузии, K — константа Больцмана, T — температура.

Полный поток вещества в пору связан с изменением ее радиуса по формуле

$$I = \frac{\sigma D \omega 2\pi}{R_1 \ln\left(\frac{R_1}{R_2}\right) f K T} = 2\pi R_1 \frac{dR_1}{dt}. \quad (6)$$

Интегрируя это уравнение, получаем время жизни поры в виде

$$t = \frac{f K T R_1^3 (-\ln R_2/R_1 + 1/3)}{3\omega D \sigma}. \quad (7)$$

Для проведения оценок величиной $f\left(-\ln \frac{R_2}{R_1} + \frac{1}{3}\right)$ можно пренебречь, поскольку она мало отличается от единицы. Считая $K T = 4 \cdot 10^{-14}$ эрг, $\sigma = 2 \cdot 10^{-6}$ дин, $\omega = 3 \cdot 10^{-15}$ см², $D = 10^{-11}$ см²/с, получаем $t = R_1^3 \cdot 2 \times 10^{18}$ см⁻³, т. е. при радиусе поры около ста ангстрем ее время жизни составит несколько секунд.

Важно отметить, что проведенное выше рассмотрение относится к случаю, когда фазовый переход уже совершился. Однако заживление поры, возникающей во включении, происходит и во время фазового перехода по тому же механизму. При этом протекают два разнонаправленных процесса. С одной стороны, по мере затвердевания включения происходит растяжение мембраны и увеличение диаметра поры, а с другой — диффузионный перенос липидов во включение, компенсирующий дефицит площади, возникающий при фазовом переходе. Таким образом, возможность возникновения поры в мембранах при фазовом переходе и ее размер будут зависеть от скорости, с которой происходит фазовый переход.

Обсуждение. Известно [1, 6], что ряд явлений повреждения клеток при замораживании характеризуются потерей свойств избирательной проницаемости биологических мембран. К ним прежде всего относятся температурный шок, солевая денатурация, гипербарическое повреждение [2] и другие. Возможно, что нарушение проницаемости мембран в этих явлениях связано именно с возникновением пор при фазовых переходах. Согласно предложенной нами модели, образование пор в мембране при фазовом переходе возможно тогда, когда образуются достаточно крупные, содержащие включения, области «твердой» фазы липидов, т. е. при быстром происхождении области температуры или других термодинамических параметров, при которых происходит фазовый переход, поры в мембранах могут не возникать из-за мелкой дисперсности новой фазы. В другом крайнем случае, когда область фазового перехода проходит медленно, так что поры успевают закрываться описанным выше диффузионным механизмом, потеря свойств избирательной проницаемости мембраны также не должна наблюдаться. Изложенное хорошо согласуется с закономерностью повреждения клеток при быстром охлаждении их в зоне положительных температур. Действительно, температурный шок не проявляется при очень медленном и очень быстром охлаждении и наиболее выражен в области промежуточных скоростей охлаждения [1, 6].

1. Белоус А. М., Бондаренко В. А. Структурные изменения биомембран при охлаждении. — Киев: Наук. думка, 1982. — 254 с.
2. Бронштейн В. Л., Иткин Ю. А., Шурда Г. Г., Исерович П. Г. Механизм повреждения молочнокислого стрептококка *S. cremoris* T18₁₅ при замораживании. — Криобиология и криомедицина, 1982, вып. 12, с. 35—38.
3. Гегузин Я. Е., Кривоглаз М. А. Движение макровключений в твердых телах. — М.: Металлургия, 1971. — 343 с.
4. Ландау Л. Д., Лившиц Е. М. Теория упругости. — М.: Наука, 1965. — 202 с.
5. Петров В. В., Осин Н. С., Предводителев Д. А., Антонов В. Ф. Ионная проницаемость бислойных мембран из синтетических фосфолипидов в области фазового перехода. — Биофизика, 1978, 23, вып. 1, с. 61—65.
6. Пушкарь Н. С., Белоус А. М. Введение в криобиологию. — Киев: Наук. думка, 1975. — 342 с.

Ин-т пробл. криобиологии
и криомедицины АН УССР, Харьков

Получено 18.03.83

Л. К. Стусь, Т. Ф. Стрибуль, В. М. Куракса

ВЛИЯНИЕ ПОСТОЯННОГО, ПЕРЕМЕННОГО И ИМПУЛЬСНОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ НА НЕКОТОРЫЕ ПАРАМЕТРЫ ПРОЦЕССА КРИОКОНСЕРВАЦИИ СУСПЕНЗИЙ ЭРИТРОЦИТОВ

В настоящее время известны способы магнитной обработки клеточных суспензий и тканей в процессе их консервации при субнулевых и низких температурах, повышающие сохранность консерванта [3, 4, 6]. Повышение сохранности биообъекта наблюдается при магнитном воздействии до и после снижения температуры [2]. В некоторых работах показано, что под воздействием постоянного магнитного поля увеличивается скорость охлаждения биологических объектов при неизменных условиях теплоотвода [1, 5]. Однако в целом механизм действия магнитного поля как фактора, стимулирующего резистентность биообъектов в процессе консервации, не ясен. Имеющиеся данные носят отрывочный характер и не позволяют априори выбрать вид поля и его характеристики так, чтобы заранее можно было надеяться на положительный эффект при консервации биообъектов.

В связи с изложенным, цель наших исследований — выяснение степени влияния постоянного (ПМП), переменного (ПеМП) и импульсного магнитного поля (ИМП) на скорость охлаждения суспензий эритроцитов и установление связи этого параметра с сохранностью клеток при криоконсервации.

Методика исследования. Работа проведена на эритроцитах крови человека, консервированных на ЦОЛИПК-7 б. Замораживание суспензии эритроцитов осуществляли путем погружения образцов крови в охлажденный до -15°C спирт или жидкий азот. Эритроциты замораживали под защитой водного раствора полиэтиленоксида с молекулярной массой 1500 (ПЭО-1500) в 10%-ной конечной концентрации, иногда с добавлением NaCl. Процесс замораживания контролировали термографически с помощью термодпары, смещенной в центр объема суспензии. Степень повреждения эритроцитов оценивали по показателю гемолиза, который может быть выражен в миллиграмм-процентах свободного гемоглобина в надосадочной жидкости после центрифугирования клеточной суспензии [7]. При экспериментах в ПМП образец помещали между полюсами постоянного магнита с напряженностью поля $H-2000$ Э.

Переменное магнитное поле создавали путем вращения ампул с суспензией эритроцитов в зазоре соленоида, запитанного постоянным током. Степень неоднородности поля изменяли с помощью ферромагнетика, располагаемого в различных местах рабочего пространства соленоида магнита. Для определения оптимальных условий омагничивания исследования проведены на основе полного 4-факторного эксперимента [8]. В качестве изучаемых факторов выбраны следующие параметры: напряженность магнитного поля H с уровнем варьирования — 0; 2500 Э; время омагничивания $t=4; 15$ с; неоднородность магнитного поля — 0; 40 Э; число оборотов ампулы с образцом — 0; 800 об/мин. В качестве функции отклика выбраны угол наклона касательной к термограмме замораживания в области кристаллизации y , гемолиз эритроцитов после размораживания — y_1 .

Влияние ИМП на суспензию эритроцитов при криоконсервации исследовали по схеме трехфакторного эксперимента [8]. Изучаемые факторы и пределы их варьирования следующие: время омагничивания $t=5, 15$ с; напряжение, подаваемое на соленоид, $U=50, 220$ В; частота следования импульсов $f=5, 25$ Гц. В качестве функции отклика выбраны угол наклона касательной к термограмме на участке кристаллизации — y_2 гемолиз эритроцитов после размораживания — y_3 . Эритроциты замораживали под защитой ПЭО-1500 с NaCl.

Результаты исследований. В процессе исследований установлено, что при замораживании до -15°C эритроцитарной суспензии, обработанной ПМП на этапе эквilibрации ее с ПЭО-1500, переохлаждение образцов возрастает приблизительно в два раза. Кроме того, на 8,5% увеличивается время кристаллизации, а угол наклона касательной к плато термограммы уменьшается на 23% по сравнению с контрольным образцом, замороженным без предварительного омагничивания ($P=0,95$). При замораживании контрольных образцов крови до -196°C угол наклона касательной к кривой в области кристаллизации составляет 25° . Омагничивание эритроцитов в процессе их эквilibрации с ПЭО-1500 привело к увеличению угла до $47,7^{\circ}$. Если эритроциты омагничивали в ПМП только на этапе замораживания, угол наклона касательной к термограмме в области кристаллизации составил $43,5^{\circ}$. Для случая, когда омагничивание суспензии эритроцитов проводили и на этапе эквilibрации с криопротектором и при замораживании, угол наклона касательной к термограмме в области кристаллизации составил $51,5^{\circ}$.

Таким образом, предварительная обработка суспензии эритроцитов ПМП на этапе эквilibрации с ПЭО-1500, а также непосредственно в процессе замораживания образца увеличивает скорость охлаждения на этапе кристаллизации в среднем в 1,7—2,0 раза ($P=0,95$).

Исследования сохранности эритроцитов при замораживании показали, что ПМП напряженностью 2000 Э улучшает сохранность реакционноспособных SH-групп эритроцитов при глубоком охлаждении. Гемолиз клеток, их осмотическая резистентность и внеклеточная концентрация ионов K^+ в среднем не изменяются [9].

При изучении влияния ПМП на параметры процесса охлаждения и сохранность эритроцитов после отогрева искали математическое описание данных процессов в виде уравнения регрессии $y = B_0 + B_1X_1 + B_2X_2 + B_{12}X_1X_2 + \dots$. Расчет коэффициентов регрессии для функций отклика показал, что уравнение, описывающее уменьшение угла наклона касательной к термограмме на этапе кристаллизации, и уравнение, описывающее уровень гемолиза, являются адекватными и в кодированных переменных первое уравнение имеет следующий вид: $y = 57,83 - 1,59X_3 - 2,03X_3X_4$, где X_1 — скорость вращения образцов в магнитном поле; X_3 — время омагничивания; X_4 — неоднородность магнитного поля. Полученное уравнение свидетельствует о том, что возрастание значений факторов уменьшает угол наклона кривой, т. е. уменьшает скорость кристаллизации. Из анализа уравнения регрессии для гемоглобина $y_1 = 516,8 + 26,25X_1 + 18,75X_1X_3$ следует, что фактор вращения и его совместное действие с фактором времени увеличивает гемолиз эритроцитов.

Таким образом, уменьшение скорости кристаллизации приводит к увеличению гемолиза эритроцитов после размораживания. Наибольший вклад в уменьшение скорости кристаллизации и увеличение гемолиза эритроцитов вносят скорость и время вращения образцов в поле.

В результате исследований влияния ИМП на процесс кристаллизации суспензий эритроцитов и их сохранность при низкотемпературном консервировании были получены уравнения регрессии, описывающие зависимости угла наклона касательной к кривой температура—время на участке кристаллизации, а также гемолиз эритроцитов после размораживания. Адекватным образом было получено уравнение для угла наклона касательной к термограмме на участке кристаллизации. Это уравнение имеет следующий вид: $y_2 = 56,2 + 2,06X_2^1X_3^1$, где X_2^1 — напряжение на соленоиде; X_3^1 — частота следования импульсов. Из уравнения для y_2 следует, что скорость кристаллизации зависит от совместного вклада напряженности и частоты импульсного магнитного поля. Увеличение этих параметров ведет к увеличению скорости кристаллизации. Уравнение для гемолиза эритроцитов имело незначимые коэффициенты из-за большого разброса экспериментальных данных. Однако была обнаружена тенденция к уменьшению гемолиза эритро-

дитов, омагниченных по следующим программам: $t=5$ с, $U=50$ В, $f=5$ Гц; $t=5$ с, $U=220$ В, $f=25$ Гц. Эффективное значение напряженности ИМП в обоих случаях приблизительно одинаково и равно 2500 и 2700 Э. Дополнительные исследования, проведенные на крови восьми доноров, показали, что в образцах крови, омагниченных по этим программам, уровень свободного гемоглобина составил 341 ± 39 и 341 ± 20 соответственно, а в контроле — 510 ± 50 .

Таким образом, ИМП, действующее на суспензию эритроцитов в период эквilibрации, увеличивает скорость кристаллизации суспензии и уменьшает гемолиз эритроцитов.

Выводы. Проведенные исследования показали, что ПМП, ПеМП и ИМП изменяют скорость кристаллизации суспензии эритроцитов. Лучшая эффективность омагничивания достигается в случае воздействия поля во время эквilibрации и замораживания суспензий эритроцитов. ПМП и ИМП, действующие в процессе низкотемпературного консервирования, улучшают сохранность эритроцитов. Влияние переменного магнитного поля на суспензию эритроцитов в процессе эквilibрации с ПЭО проявилось в уменьшении скорости охлаждения образцов крови и увеличении гемолиза эритроцитов после замораживания—отогрева. Добавление к раствору ПЭО-1500 соли NaCl и обработка эритроцитов в ИМП привели к увеличению скорости охлаждения образцов и уменьшению гемолиза эритроцитов после замораживания—отогрева по сравнению с контролем. Следовательно, импульсное магнитное поле, на наш взгляд, является более перспективным для повышения сохранности эритроцитов при низкотемпературной консервации. Обработку образцов крови целесообразно проводить перед замораживанием и в процессе замораживания.

1. Бражников А. М., Малова Н. Д., Ефимов А. В. Влияние постоянного магнитного поля на процессы холодильной обработки мясopодуков. — Экспресс-информация. Холодил. пром-сть и транспорт, М., 1977, вып. 5, с. 10—12.
2. Воскобойников В. А., Озирная Д. И., Каухчешвили Э. И. А. с. 359887 (СССР). Способ охлаждения пищевых продуктов и биологических материалов. — Оpubл. в Б. И., 1974, № 10.
3. Ковалев М. Г. Влияние постоянного магнитного поля на сперматозоиды быков-производителей. — В кн.: Актуал. вопp. повышения продуктивности сельскохозяйственных животных. Минск, 1969, с. 25—28.
4. Мешалкин Е. Н., Альперин Л. Я., Яшков В. Т., Шкляева Л. Н., Байков В. А. А. с. 698600 (СССР). Способ консервации легкого. ПеМП. — Оpubл. в Б. И., 1979, № 43.
5. Озирная Д. И. Исследование теплофизических процессов замораживания мышечной ткани: Автореф. дис. ... канд. техн. наук. М., 1975. — 25 с.
6. Пирузян Л. А., Барсегян Л. Х. О влиянии постоянного магнитного поля на консервированную кровь. — В кн.: Применение магнитных полей в клинике: Тез. докл. Куйбышев. обл. конф. Куйбышев, 1976, с. 67—68.
7. Рождественская М. А. Определение Нb в плазме консервированной крови. — В кн.: Актуальные вопросы переливания крови. М.: Медгиз, 1955. — 55 с.
8. Саутин С. Н. Планирование экспериментов в химии и химической технологии. — Л.: Химия, 1975, с. 1—24.
9. Скорняков Б. А., Вишневский В. И., Стусь Л. К. и др. Влияние постоянного магнитного поля на некоторые свойства эритроцитов при низкотемпературном консервировании. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 8, с. 24—30.

Ин-т пробл. криобиологии
и криомедицины АН УССР, Харьков

Получено 04.06.83

УДК 591.186:597.544:599.321

А. И. Белич

СОМАТОВЕГЕТАТИВНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФОРМ ПОКОЯ ПЕРВИЧНОГО СНА, АНАБИОЗА И ЗИМНЕЙ СПЯЧКИ

Ранее было показано, что в суточной периодике поведения рыб и амфибий, помимо бодрствования, наблюдаются три формы покоя [3, 9, 14, 16, 17]. Эти формы покоя были объединены И. Г. Кармановой в понятие «первичный сон» позвоночных — как исток истинного сна

теплокровных [9, 18]. У рыб и амфибий указанные формы покоя равнозначны [5, 19], и лишь одна форма покоя (П-3) в дальнейшем, на уровне рептилий, претерпевает значительные эволюционные преобразования и переходит в промежуточную форму сна (рептилии) и далее — в медленноволновую и парадоксальную фазы сна млекопитающих [9, 12]. Две другие формы покоя первичного сна не получают дальнейшего развития и остаются в рецессивном состоянии [18].

Используя метод непрерывной регистрации сердечного ритма и двигательной активности нефиксированного животного без имплантиро-

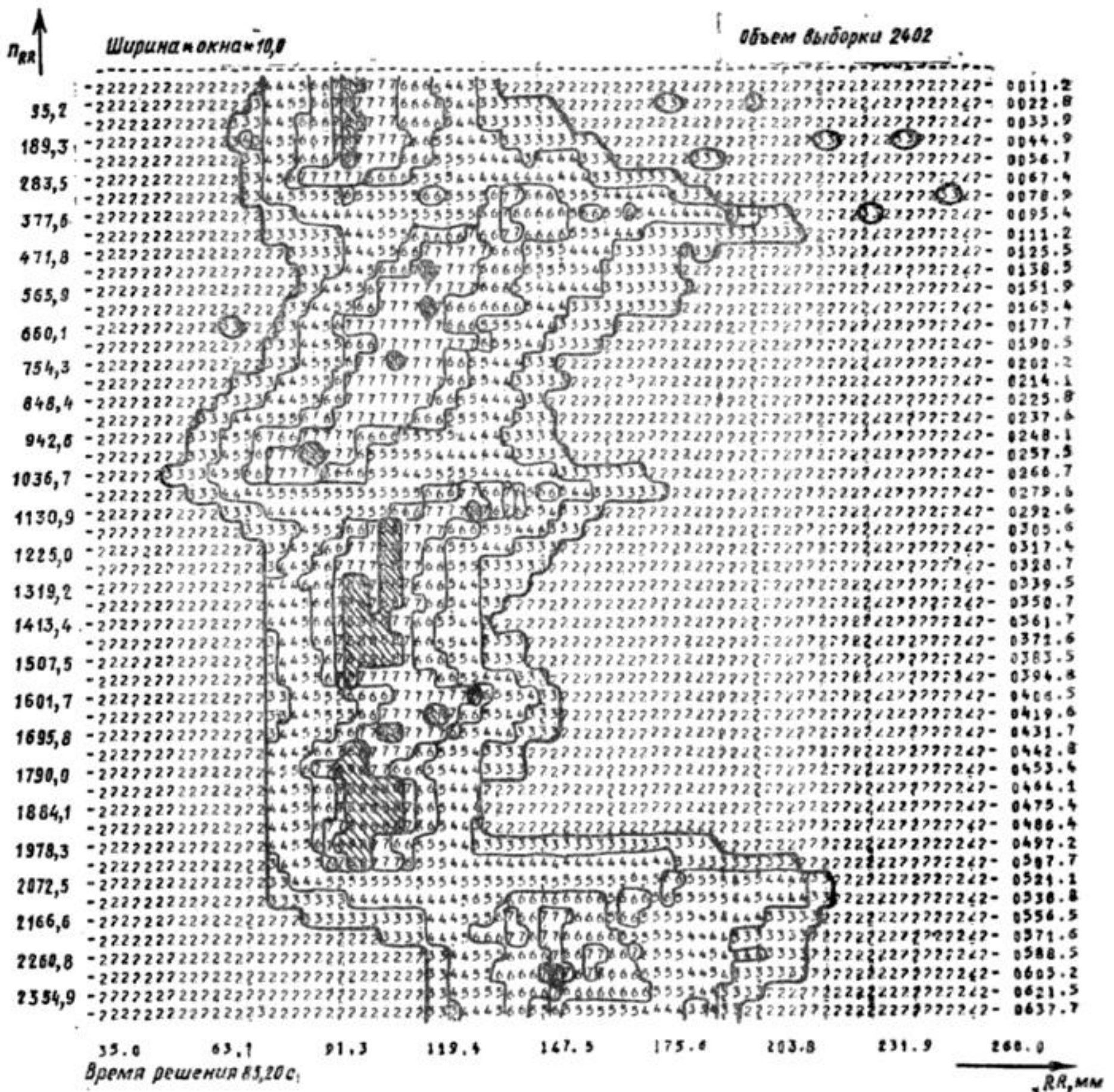


Рис. 1. Машинный график-картина отображения динамики сердечного ритма карликового сомика (17 ч 50 мин—18 ч 50 мин):

n_{RR} — последовательные RR-интервалы; время — минуты (масштаб 1:1); RR, мм — периоды сердечных сокращений (скорость регистрации 100 мм/с). Здесь и на рис. 4 цифры на плоскости — двумерная плотность вероятностей периодов сердечных сокращений, нормированная от 0 до 9; контурные линии — линии равной плотности вероятностей распределения RR-интервалов.

ванных или накладных электродов [2] с последующей математической обработкой экспериментальных данных на ЭВМ БЭСМ-6 по программе «Система-76», обеспечивающей построение двумерных распределений вероятностей последовательных периодов сердечных сокращений [1], получаем паттерны каждого из состояний цикла бодрствование — первичный сон. На рис. 1 в качестве примера показан фрагмент суточной динамики сердечного ритма карликового сомика при отображении в виде двумерной плотности распределения вероятностей RR интервалов ЭКГ. Рис. 1 наглядно демонстрирует (сверху вниз) состояние пассивного бодрствования, переходящего в форму покоя П-2 и далее в по-

кой П-3. Такие паттерны динамики сердечного ритма разрешают математическое описание временной и вегетативной характеристики каждого из изучаемых состояний и временной характеристики внутрисуточной организации цикла бодрствование—сон [4, 10, 12].

Изучение суточной динамики сердечного ритма и двигательной активности, а также мышечного тонуса и порогов поведенческого пробуждения помогло установить, что у карликового сомика *Ictalurus pambulosus* и травяной лягушки *Rana temporaria* в осенне-зимний период их жизнедеятельности в суточной периодике поведения четко выра-

Тоническое изменение сердечного ритма у позвоночных при смене состояний цикла бодрствование—сон, анабиозе и зимней спячке

Состояние	Холоднокровные		Теплокровные
	Карликовый сомик	Травяная лягушка	Арктический суслик
Бодрствование:			
активное (АБ)	98,0±2,3	34,0±0,4	190,0±2,0
пассивное (ПБ)	80,0±15,0	22,0±6,4	150,0±9,6
Покой:			
с пластическим мышечным тонусом (П-1)	50,0±2,8	8,2±3,2	Не обнаружен
с ригидным мышечным тонусом (П-2)	63,8±4,2	14,0±1,2	"
с расслаблением скелетной мускулатуры (П-3)	40,0±5,1	12,2±2,4	"
Анабиоз	40,0±5,1	2,0±0,16	
Зимняя спячка (ЗС)	40,0±5,1		3,5±0,6

Примечание. Частота сердечных сокращений приведена в 1 мин.

жены активное бодрствование (АБ), пассивное бодрствование (ПБ) и три формы покоя: П-1, П-2, П-3 [3, 12, 19]. В состоянии бодрствования частота сердечных сокращений животных достигает максимальных значений (см. таблицу). При внесении постороннего предмета в поле зрения животного наблюдается реакция избегания. При действии светового и звукового раздражителя со стороны сердечной деятельности реакции практически не наблюдается (рис. 2). В состояниях покоя у животных отсутствует двигательная реакция как на приближение постороннего предмета, так и на слабое тактильное раздражение, что позволяет вести тестирование мышечного тонуса.

Дневная форма покоя рыб и амфибий П-1 характеризуется выраженным пластическим тонусом скелетной мускулатуры (напоминает так называемую восковидную гибкость *Flexibilitas cerea*). Характерной особенностью этого состояния является застывание животного в той или иной принятой им неестественной позе, которая сохраняется, в связи с чем эта форма дневного покоя рассматривается как обездвиженность типа каталепсии [9]. Например, можно отвести хвост сомика влево или вправо, и эта поза сохраняется в течение нескольких секунд. На фоне формы покоя П-1 частота сердечных сокращений низкая (см. таблицу, П-1). Реакция сердца на звуковой и тактильный раздражитель выражается у сомика замедлением, а у травяной лягушки — учащением частоты сердечных сокращений (рис. 2, П-1). Ночная форма покоя П-3 характеризуется самым низким тонусом мышц. Так, у сомика тело наклонено набок под углом 60—80° к горизонту, хвост лежит плашмя; тело травяной лягушки прижимается ко дну аквариума, голова лежит на дне (тонус мышц, удерживающих голову в поднятом положении снижен), глазные яблоки втянуты и прикрыты третьим веком или веки сомкнуты. Частота сердечных сокращений заметно снижена по сравнению с П-1 (см. таблицу). Пороги поведенческого пробуждения понижены — в ответ на прикосновение животное не перехо-

дит в состояние активного бодрствования. Реакция на звуковое раздражение практически отсутствует (см. рис. 2, П-3). Форма покоя П-2 рыб и амфибий, прежде всего, характеризуется позой, например у травяной лягушки «комочек», а также наличием выраженного ригидного мышечного тонуса. При попытке придать животному неестественную позу оно следует в направлении прилагаемого усилия, жестко сохраняя прежнюю позу и обнаруживая состояние «оцепенения» в мышцах, что определяет название этого состояния как обездвиженность типа кататонии [9]. Сердечный ритм в П-2 замедлен по отношению к бодрство-

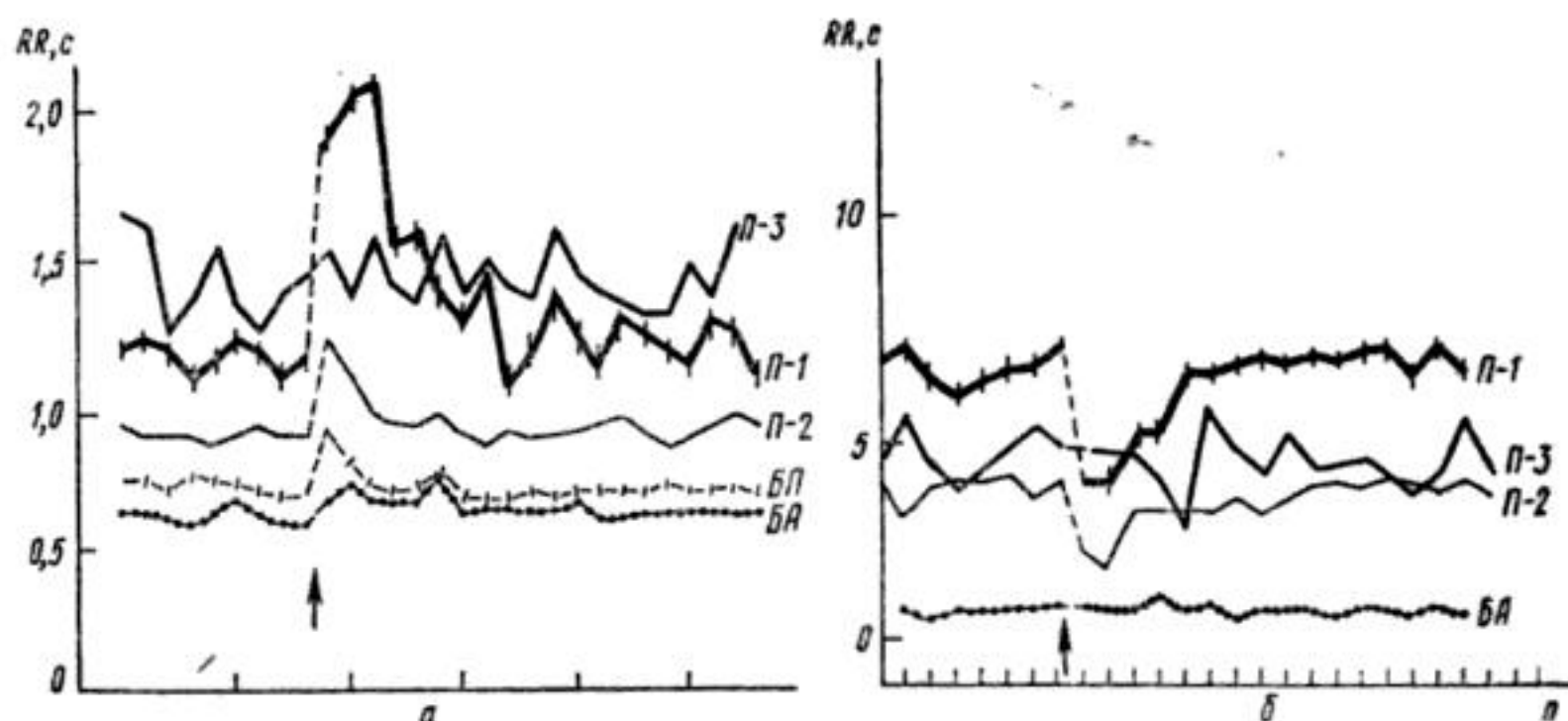


Рис. 2. Реакция карликового сомика (а) и травяной лягушки (б) в ответ на звуковой раздражитель в разных состояниях цикла бодрствование—первичный сон: по оси ординат RR, c — значения периодов между двумя последовательными сокращениями сердца, с; по оси абсцисс n — последовательные RR -интервалы ЭКГ. Стрелка — момент действия раздражителя.

ванию, но более частый, чем в дневном покое (см. таблицу, П-2). Реакция на звуковое раздражение не вызывает такого резкого замедления (у сомика) и учащения (у лягушки) сердечного ритма, как на фоне дневного покоя П-1 (см. рис. 2, П-2). На фоне этой формы покоя наблюдаются фазические колебания сердечного ритма, сочетающиеся с фазическими проявлениями со стороны скелетной мускулатуры без поступательного движения животного [6]. Продолжительность формы покоя П-2 у карликового сомика в течение суток 10 ± 6 мин, суммарная суточная продолжительность достигает 8 часов; у травяной лягушки — 20 ± 7 мин, суммарная суточная продолжительность составляет 12—13 ч, что определяется полифазной характеристикой временной внутрисуточной организации цикла бодрствование—первичный сон (рыбы, амфибии) [4, 10].

Этот же метод регистрации сердечного ритма и двигательной активности и такая же математическая обработка были применены для анализа суточной динамики сердечного ритма травяной лягушки, находящейся в естественном анабиозе при температуре $+5 \pm 0,5^\circ C$ в осенне-зимний период. По нашим наблюдениям, травяная лягушка в состоянии анабиоза пребывает в позе «комочек» с ригидным мышечным тонусом, обнаруживая «оцепенелость», глаза открыты, отсутствует реакция избегания, при попытке придать позу животное следует в направлении усилия, оставаясь в позе «комочек». При анабиозе частота сердечных сокращений снижается до двух ударов в минуту (см. таблицу, анабиоз), повышаются пороги поведенческого пробуждения, мышечный тонус, на фоне анабиоза наблюдаются двигательные автоматизмы (рис. 3).

В зимней спячке арктического суслика *Citellus Parryi* наблюдается стереотипная поза «комочек», или «клубочек», глаза закрыты, реакция избегания отсутствует, пороги поведенческого пробуждения высокие — животное можно легко перемещать, поза сохраняется, частота сер-

дечных сокращений падает до трех ударов в минуту (см. таблицу, ЗС), наблюдаются двигательные автоматизмы, обнаруживается «ощепенность». При непрерывной суточной регистрации сердечного ритма и двигательной активности суслика в процессе зимней спячки и последующей обработке по программе «Система-76» была выявлена и описана математически соматовегетативная характеристика состояния зимней спячки этого животного [7]. Паттерны двумерной плотности

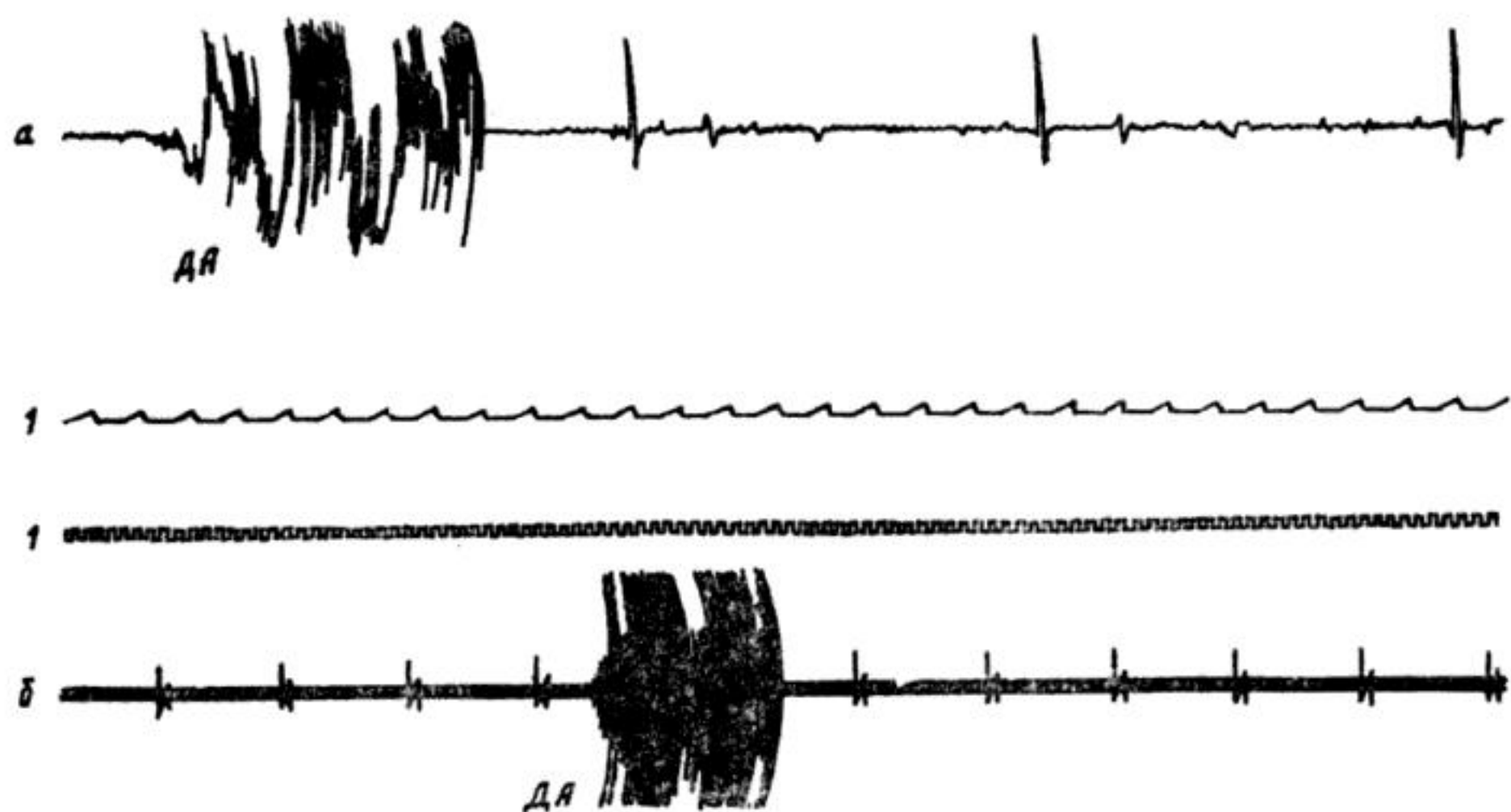


Рис. 3. Фрагмент ЭКГ травяной лягушки, зарегистрированной бесконтактным методом во время дневного покоя П-1 (а) и при анабиозе (б):

1 — отметка времени; ДА — двигательный автоматизм.

распределения вероятностей RR интервалов ЭКГ сопоставимы с такими для формы покоя П-2, особенно по максимальной плотности интервала RR (рис. 4, 8) и дисперсии по минимальному и максимальному RR интервалу (см. рис. 4).

Как следует из изложенного выше, многие черты соматовегетативной характеристики формы покоя первичного сна позвоночных П-2, анабиоза пойкилотермных и зимней спячки гомойотермных животных сопоставимы. Нейрофизиологическое исследование преобразования цикла сна при погружении в спячку арктического суслика *Citellus Parryi* показало, что в картине ЭЭГ на фоне зимней спячки наблюдаются ЭЭГ паттерны, сопоставимые с таковыми у пойкилотермных позвоночных в естественном цикле их жизнедеятельности [11]. Методом цитоспектрофотометрии было показано, что форма покоя первичного сна П-2, анабиоз и зимняя спячка имеют однонаправленные сдвиги нейрохимических характеристик [8]. Сопоставление уровня серотонина в мозгу травяной лягушки при естественной форме покоя П-2 и анабиозе обнаружило достоверную корреляцию между этими состояниями (см. работу [15]).

В связи с этим нам представляется возможным предположить, что ряд признаков форм покоя первичного сна позвоночных, характерных для холоднокровных, сохраняется в фенотипе цикла бодрствование—сон теплокровных зимоспящих позвоночных. Возможно, существуют определенные механизмы регуляции цикла бодрствование—первичный сон позвоночных, лежащие в основе механизма сна всех млекопитающих, но проявляющиеся лишь в процессе сна, либо в условиях резкого снижения метаболизма (зимняя спячка теплокровных, анабиоз холоднокровных позвоночных). Такое предположение согласуется с представлениями Хинтона [23] и Лозины-Лозинского [13] о способности животного организма к анабиозу как первичному свойству жизни. Не про-

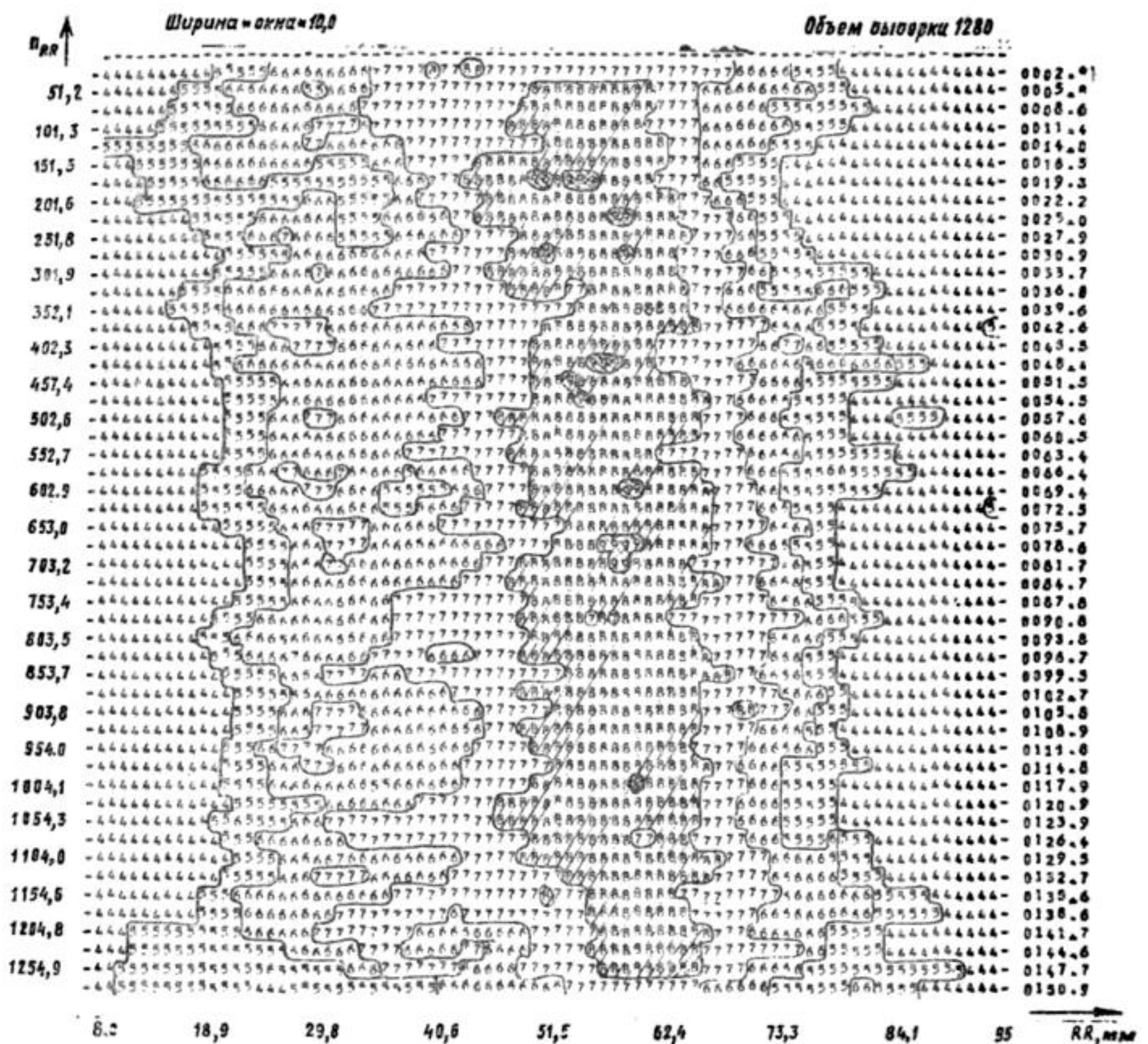


Рис. 4. Машинный график-картина отображения динамики сердечного ритма суслика, находящегося в глубокой зимней спячке (январь, 10 ч 32 мин—15 ч 47 мин): n_{RR} — последовательные RR-интервалы; время — минуты (масштаб 1:2); RR, мм — периоды сердечных сокращений (скорость регистрации 7,5 мм/с, масштаб 1:2).

тиворечит это предположение и гипотезе Геллера о гомологии сна и гибернации [21, 22].

1. Александров В. В., Белич А. И., Карманова И. Г., Шнейдеров В. С. Анализ суточной динамики сердечного ритма болотной черепахи *Emys orbicularis* на ЭВМ. — Журн. эволюц. биохимии, 1980, 16, № 2, с. 200—203.
2. Белич А. И. Непрерывная длительная регистрация частоты сердечных сокращений бесконтактным методом. — Физиол. журн. СССР, 1979, 65, № 7, с. 1079—1082.
3. Белич А. И. Цикл бодрствование—сон у холоднокровных позвоночных по данным непрерывной бесконтактной регистрации сердечного ритма и двигательной активности. — Журн. эволюц. биохимии и физиологии, 1980, 16, № 4, с. 371—379.
4. Белич А. И. Изучение внутрисуточной организации цикла «бодрствование—сон» у холоднокровных позвоночных: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Л., 1980. — 20 с.
5. Белич А. И. Сомато-вегетативная характеристика прогрессивно развивающейся формы покоя (П-3) первичного сна позвоночных. — В кн.: Вопросы эволюционной физиологии: VIII совещ. по эволюц. физиологии. Тез. сообщ. Л.: Наука, 1982, с. 33—34.
6. Белич А. И., Карманова И. Г., Шиллинг Н. В. Двигательные автоматизмы на фоне первичного и промежуточного сна у холоднокровных позвоночных. — Журн. эволюц. биохимии и физиологии, 1982, 18, № 3, с. 274—280.
7. Белич А. И., Чепкасов И. Е. Анализ сердечного ритма на фоне сна и зимней спячки у суслика *Citellus Parryi*. — Там же, № 6, с. 590—595.
8. Демин Н. Н., Карманова И. Г. Развитие биохимических компонентов механизмов регуляции функциональной активности головного мозга во время сна в эволюционном ряду позвоночных. — В кн.: Сон как фактор регуляции функционального состояния мозга. Паланга, 1982, с. 54—57.

9. Карманова И. Г. Эволюция сна. Этапы формирования цикла бодрствование—сон в ряду позвоночных. — Л.: Наука, 1977. — 173 с.
10. Карманова И. Г., Белич А. И. Внутрисуточная организация цикла бодрствование — первичный сон (Фило- и онтогенетический аспекты проблемы). — В кн.: Развитие научного наследия акад. Л. А. Орбели. Л.: Наука, 1982, с. 126—139.
11. Карманова И. Г., Белич А. И., Пастухов Ю. Ф., Чепкасов И. Е. Преобразование цикла сна при погружении в спячку арктического суслика *Citellus Parryi* (Эволюционный аспект проблемы генеза зимней спячки). — Журн. эволюц. биохимии и физиологии, 1983, 19, № 1, с. 78—83.
12. Карманова И. Г., Белич А. И. Временная организация цикла бодрствование — первичный сон у карликового сомика *Ictalurus nebulosus*. — Там же, № 2, с. 147—153.
13. Лозина-Лозинский Л. К. Эволюционные аспекты анабиоза и гипобиоза. — В кн.: Науч. конф. Ин-та цитологии АН СССР, посвящ. 15-летию ин-та. Л., 1972, с. 56—57.
14. Попова Д. И., Чурносков Е. В. Суточные циклы бодрствования и покоя у лягушки *Rana temporaria*. — Журн. эволюц. биохимии и физиологии, 1976, 12, № 2, с. 199—201.
15. Попова Н. К., Лобачева И. И., Карманова И. Г., Шиллинг Н. В. Изменение серотонина в мозгу при различных формах первичного сна у лягушки *Rana temporaria*. — Там же, 1982, 18, № 4, с. 430—432.
16. Титков Е. С. Особенности суточной периодики бодрствования и покоя у карликового сомика *Ictalurus nebulosus*. — Там же, 1976, 12, № 4, с. 335—340.
17. Шиллинг Н. В. О роли вегетативной нервной системы в регуляции первичной формы сна у лягушки *Rana temporaria*. — Там же, 1979, 15, № 2, с. 184—189.
18. Karmanova I. G. Evolution of sleep. Stages of the formation of the wakefulness-sleep cycle in vertebrates. — Basel: Karger, 1982. — 164 p.
19. Karmanova I. G., Belich A. I., Lazarev S. G. An electrophysiological study of wakefulness and sleep like states in fish and amphibians. — In: Brain mechanisms of behaviour in lower vertebrates. Soc. for Experim. Biol., Cambr. press, 1981, p. 181—202.
20. Karmanova I. G., Lazarev S. G. Stages of sleep evolution (facts and hypothesis). — Waking and sleeping, 1979, 3, N 2, p. 137—147.
21. Heller H. C. Hibernation: Neural aspects. — Ann. Rev. Physiol., 1979, 41, p. 305—321.
22. Heller H. C., Walker J. M., Florant G. L., Glotzbach S. F., Berger R. J. Sleep and hibernation: electrophysiological and thermoregulatory homologies. — In: Strategies in cold: Natural thermogenesis and torpidity / Eds L. Wand, J. W. Hudson, New York: Acad. press, 1978, p. 225—265.
23. Hinton H. E. Reversible suspension of metabolism and the origin of life. — Proc. Roy. Soc., 1968, 171, N 1022, p. 43—56.

Ин-т эволюц. физиологии

и биохимии им. И. М. Сеченова АН СССР, Ленинград

Получено 12.03.83

УДК 616.74—009.85:591.543.42:011.3

Л. Я. Данилова, В. В. Федуров

ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В ДЕНЕРВИРОВАННЫХ МЫШЦАХ ЗИМОСПЯЩИХ

В качестве модели для изучения роли реактивности в патогенезе нейрогенной дистрофии мы использовали зимнюю спячку сусликов. Известно, что развитие нейродистрофического процесса в мышцах проявляется в нарушении энергетического обмена. При денервации угнетаются окислительные процессы, активизируется пентозофосфатный цикл, разобщается окисление и фосфорилирование, а также происходит переключение метаболизма на гликолитический путь освобождения энергии [1, 4, 6]. В настоящей работе проводились исследования по выяснению степени энергетических нарушений в денервированных мышцах и их зависимость от реактивности организма. В качестве объекта были выбраны суслики, которые изучались в трех состояниях — бодрствующем, спящем, характеризующихся глубоким угнетением реактивности и метаболизма, и пробуждающемся, при котором происходит взрыв теплопродукции, обеспечивающий повышение температуры тела в течение нескольких часов на 32—33 °С. Зимоспящие суслики исследовались после двух-трехмесячной спячки в декабре—январе при

ректальной температуре (РТ) 4—6 °С (количество дыханий 8—10, сердечных сокращений 5—6 в минуту). Бодрствующие — при РТ 37 °С. С целью пробуждения спящих сусликов их переносили в помещение при t 20—22 °С. При температуре 9—12 °С у сусликов учащалось дыхание, появлялась дрожь, при РТ 22—26 °С суслики были полностью активными и достаточно агрессивными. В среднем восстановление РТ до 37 °С происходило в течение полутора—двух часов. Нейрогенная дистрофия моделировалась путем высокой, односторонней перерезки седалищного нерва. Гистохимически в икроножной мышце исследовалась активность и топография сукциндегидрогеназы (СДГ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), НАД·Н- и НАДФ·Н ДГ [5]. Гликоген выявляли с помощью ПАС-реакции по Мак-Манусу. Температурную зависимость сукциндегидрогеназной реакции (КФ 1.6.99.3) исследовали в координатах Аррениуса [10], спектрофотометрически [8] на СФ-16 с термостатируемым кюветодержателем. Для электронно-микроскопического исследования мышц производились фиксация 2%-ным раствором осмиевой кислоты, обезвоживание и заливка в ЭПОН-812. Среды контрастировали раствором уранилацетата и азотнокислым свинцом по Рейнольдсу. Исследование проводилось на микроскопе УЭМВ-100Б.

Установлено, что в мышцах бодрствующих сусликов активность НАД-зависимых дегидрогеназ, а также СДГ, отражающих окислительный путь обмена, выражена хорошо. Активность ЛДГ проявляется умеренно. Через семь недель после перерезки седалищного нерва у бодрствующих сусликов на тыле стопы появляются трофические расстройства в виде облысения с гиперемией, а иногда с небольшой язвой в центре. Активность дегидрогеназ цикла Кребса, НАД·Н- и НАДФ·Н ДГ снижается. Упорядоченное расположение зерен диформаза сменяется хаотичным, зерна укрупнены, их количество значительно уменьшается. Активность ЛДГ меняется неодинаково в различных волокнах, но в целом повышается. Содержание гликогена в мышечных волокнах снижается. Электронная микроскопия продольных срезов икроножной мышцы выявляет дезорганизацию сократительного материала, уменьшение количества митохондрий и нарушение их структуры. Митохондрии набухают, их матрикс просветляется, уменьшается количество крист. Таким образом, у бодрствующих сусликов развитие нейрогенной дистрофии в связи с деструкцией митохондрий сопровождается угнетением окислительных процессов. В условиях зимней спячки не выявлено существенных изменений в активности окислительных и гликолитических ферментов, а также содержания гликогена. Однако электронно-микроскопически обнаружено значительное увеличение числа митохондрий, которые располагаются плотными рядами вдоль миофибрилл. При определении содержания митохондриального белка выявлено его увеличение с 12,4 мг/г ткани у бодрствующих до 19,7 мг/г ткани у спящих сусликов ($p < 0,05$). Перерезка нерва у спящих сусликов в меньшей степени сказывается на состоянии трофических процессов. В этих условиях никогда не наблюдается внешних проявлений дистрофии — облысения, язвы. Активность окислительно-восстановительных ферментов снижается незначительно, а в некоторых случаях не меняется. Изменений содержания гликогена не выявлено.

В процессе пробуждения активность ферментов в мышцах интактной и денервированной конечностях менялась различно. В интактной мышце активность окислительных и гликолитических ферментов повышалась, однако в разных волокнах это было выражено неодинаково. В денервированной мышце активность всех изучаемых ферментов снижалась. Существенной разницы в активности ферментов в мышцах сусликов, исследованных в начале пробуждения при РТ 12 °С и при РТ 22—26 °С, когда суслик уже полностью активен, не обнаружено. В процессе пробуждения гликоген расходовался особенно из интактной конечности, свидетельствуя о более активном включении в термогенез мышц с сохраненной иннервацией.

Для изучения молекулярных механизмов изменения активности ферментов при денервации и зимней спячке исследовалась температурная зависимость сукциндегидрогеназной реакции в координатах Аррениуса. Митохондрии для этой цели выделялись из икроножной мышцы [6]. У бодрствующих сусликов обнаружена бифазность графиков Аррениуса. Прерывность (скачок) линии зависимости $\lg V$ от $1/T$ выявлен при 19—21 °С. У зимоспящих при этой температуре скачок не обнаружен. Перелом на графике объясняется конформационными изменениями фермента в связи с изменениями при низкой температуре его липидного окружения [9]. Отсутствие перелома у зимоспящих можно расценить как признак адаптации животных к холоду, обеспечивающий возможность ферментативных реакций при снижении температуры тела. Денервация у бодрствующих сусликов не оказала влияния на характер температурной зависимости активности фермента, однако удельная активность СДГ снизилась на 40%. Денервация в условиях спячки не вызывает существенных изменений в характере термодинамических констант сукциндегидрогеназной реакции и удельной активности фермента. По-видимому, угнетение активности фермента в денервированных мышцах зависит в большей степени от количественных, а не качественных его изменений.

Для суждения о степени энергетических нарушений в мышцах мы проводили электрофизиологические исследования с определением скорости восстановления внутримышечной температуры, напряжения O_2 , уровня восстановленных пиридиннуклеотидов и скорости кровотока у пробуждающихся сусликов [3]. Установлено, что в денервированной конечности все исходные показатели ниже, а скорость их восстановления меньше, чем в контрольной.

В отличие от последней уровень НАД/Ф/ H_2 и напряжение кислорода в денервированной конечности в процессе согревания не снижается, а продолжает нарастать параллельно увеличению скорости кровотока, что служит подтверждением наличия повреждения в дыхательной цепи и терминальном окислении.

Таким образом, развитие нейрогенной дистрофии у бодрствующих сусликов, как и у гомойотермных, сопровождается нарушениями энергетических процессов, которые выражаются в угнетении окислительного и активации гликолитического пути освобождения энергии. Ведущим звеном в этом процессе является повреждение митохондрий, однако степень ферментативной недостаточности, в известной мере, определяется реактивностью организма. Угнетение реактивности в период спячки ослабляет метаболические сдвиги, связанные с утратой нервного контроля. Повышение реактивности в период пробуждения и увеличение в связи с этим функциональной нагрузки на ферментативные процессы выявляют их недостаточность в денервированной мышце. По-видимому, при зимней спячке существуют внутриклеточные механизмы адаптации, не связанные с нервным контролем.

1. Данилова Л. Я., Ковришко Н. М. О состоянии некоторых ферментов гликолиза и тканевого дыхания в мышцах с нарушенной иннервацией. — В кн.: Роль нервной системы в возникновении патологических процессов и их компенсация, Ив.-Франковск: Изд. Ив.-Франков. мед. ин-та, 1972, с. 85—86.
2. Данилова Л. Я., Ковришко Н. М., Колесова Н. А. О состоянии некоторых ферментов цикла Кребса, терминального окисления и гликолиза в денервированных мышцах зимоспящих сусликов. — В кн.: Теоретические и практические проблемы действия низкой температуры на организм. Л., Б. И. 1975, с. 56—57.
3. Данилова Л. Я., Колесова Н. А., Симеонова Н. К. О состоянии окислительных процессов в денервированных мышцах зимоспящих и пробуждающихся сусликов. — В кн.: Тез. докл. пятого совещ. по пробл. «Гисто-гематические барьеры», посвящ. 100-летию со дня рождения акад. Л. С. Штерна (20—23 нояб. 1978 г.). М., 1978, с. 291—292.
4. Ильин В. С., Емельянов А. М., Комаров Г. П. и др. Биохимическая основа нервной трофики и ее нарушения в скелетной мышце. — Журн. эволюц. биохимия и физиология, 1972, 8, № 3, с. 240—258.
5. Пирс Э. Гистохимия. — М.; Л., 1962. — 962 с.

6. Северин С. В., Зайцева Н. Н. Особенности окислительного фосфорилирования в скелетных мышцах при денервации. — Укр. биохим. журн., 1965, № 5, с. 787—796.
7. Gowrg O. H., Rosenbroch W. S., Fass A. G. Protein measurment with the solin phenol reagent. — J. Biol. Chem., 1951, 193, p. 265.
8. Rossi E., Norling B., Persson B. Studies with ubiquinone — depleted submitochondrial particles: Effects extraction and reincorporation of ubiquinone on the kinetics of succinats. Dehydrogenase. — Eur. J. Biochem., 1970, 16, p. 508—513.
9. Sander mann H. Regulation of membrane enzymes by lipids. — Biochim. et biophys. acta, 1978, 515, p. 209—237.
10. Zeylemaker W. P., Jansen H., Veeger C. Studies on succinate dehydrogenase. VII. The effect of temperature on the succinate oxidation. — Ibid., 1971, 242, p. 14—22.

Киев. мед. ин-т им. А. А. Богомольца

Получено 12.05.83

УДК 57.043.591.186:597.554:599.321

И. Г. Карманова, С. Г. Колаева, Л. И. Крамарова,
Е. А. Аристакесян, Н. В. Шиллинг,
О. Е. Хомулецкая, Г. Г. Сапожкова

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА КИШКИ ЗИМОСПЯЩЕГО СУСЛИКА (*CYTELLUS UNDULATUS PALLAS*) НА ФОРМЫ ПОКОЯ ПЕРВИЧНОГО СНА ТРАВЯНОЙ ЛЯГУШКИ

В последнее время накапливаются данные, свидетельствующие, что в мозге [25] и периферических тканях [8] во время зимней спячки млекопитающих появляются или увеличиваются в концентрации факторы пока неидентифицированной природы, вызывающие выраженный эффект снижения метаболизма и температуры у теплокровных. Снижение метаболизма и температуры носит характер, специфический для физиологического процесса вхождения в спячку у зимоспящих, что позволяет предположить существование рецепторов для опосредованного действия данных факторов и у незимоспящих млекопитающих. Исходя из отсутствия видовой специфичности этих факторов у теплокровных [23, 24], можно предположить, что подобные рецепторы существуют и у пойкилотермных позвоночных. Установление этого факта дало бы основания говорить о генетической закреплённости этих рецепторов и значительно расширило бы наши представления об эволюции регуляторных факторов гибернации.

В лаборатории сравнительной физиологии сна Института эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова АН СССР было показано, что первичный сон позвоночных (рыбы, амфибии) состоит из трех форм покоя, одна из которых является гомологом промежуточной формы сна рептилий, медленноволновой и парадоксальной фаз сна птиц и млекопитающих [9, 11, 20]. Другая форма покоя первичного сна, условно названная нами П-2, по некоторым данным, установленным в лаборатории, имеет ряд признаков, сопоставимых с таковыми при гипобии травяных лягушек [7, 13]. Эта форма покоя сопровождается хорошо выраженной торпидностью, что проявляется в усилении ригидного тонуса, в увеличении порогов пробуждения на тактильные и другие раздражители. П-2 характеризуется более редкой частотой сердечного ритма с минимальной дисперсией по сравнению с активным и пассивным бодрствованием [2, 15]. Кроме того, для этой формы покоя характерно доминирование в электрограмме переднего мозга Θ -подобной активности (4—6 Гц) [10, 12].

Все сказанное выше определило наш интерес к изучению влияния экстракта, выделенного из кишки зимоспящего суслика в состоянии гибернации, на цикл бодрствование—первичный сон травяной лягушки, и в частности, на форму покоя П-2.

Для нейрофизиологической идентификации форм покоя первичного сна травяных лягушек в настоящей работе был использован разрабо-

танный в лаборатории метод представления распределения мощности электроэнцефалографического сигнала по спектру частот [1], который оказался весьма информативным для анализа низкоамплитудной полиморфной биоэлектрической активности головного мозга травяных лягушек, находящихся в состояниях бодрствования, трех форм покоя первичного сна и гипобриоза. На основе этого метода оценивался вклад волновых компонентов δ -, Θ -, α - и β -диапазонов частот в суммарную мощность биоэлектрической активности примордиального гиппокампа.

Опыты проводились на самцах травяных лягушек в осенне-зимний (12 особей) и летний сезоны (13 особей). Биоэлектрическая активность переднего мозга (примордиальный гиппокамп) и электромиограмма длинной мышцы спины регистрировались в условиях хронического эксперимента с помощью восьмиканального энцефалографа «Орион». Сердечный ритм записывался бесконтактным методом [3, 22] с помощью угольных электродов, опущенных в воду и улавливающих ЭКГ-сигнал от животного, находящегося в аквариуме. Температура воды и воздуха в камере поддерживалась на уровне 18—20 °С. Кроме того, восьми лягушкам в осенне-зимний и семи в летний периоды вводили экстракт кишки зимоспящего суслика (ЭКЗС) в дозе 3,0 мг/г внутрибрюшинно с последующей (через 2—3 ч) записью полиграммы.

Изучение гипобриоза проводилось на восьми травяных лягушках, находившихся в течение 1—2 месяцев в холодильной камере при температуре около +4 °С. Наркоз, вживление электродов и эксперимент проводили в условиях низких температур от +2 до +7 °С. По ходу каждого опыта ЭЭГ-сигнал с помощью анализатора-интегратора раскладывался на указанные выше частотные составляющие с одновременной интеграцией значений мощности для каждого диапазона частот за 30 с. Результаты анализа функций спектральной плотности нормировались, обрабатывались статистически и представлялись в виде графика.

Распределение нормированной мощности электроэнцефалограммы примордиального гиппокампа травяных лягушек, находящихся в трех формах покоя первичного сна в летний период, приведено на рис. 1. Остановимся более подробно на характеристике П-2 первичного сна. Как видно из рис. 1, для этой формы покоя по сравнению с другими формами характерно незначительное доминирование δ - и Θ -диапазонов частот. При этом вклад α -диапазона минимален, а β_1 — максимален.

При изучении ЭЭГ-характеристик примордиального гиппокампа травяных лягушек в состоянии П-2 в различные сезоны года нами установлено, что спектральная плотность ЭЭГ-сигнала в летний период (рис. 2, I) отличается от таковой в осенне-зимний (рис. 2, II). При этом оказалось, что распределение частотных составляющих биоэлектрической активности мозга зимой приближается к ЭЭГ-характеристикам, типичным для состояния гипобриоза. Этот интересный факт указывает на существенную перестройку механизмов регуляции формы покоя П-2 под влиянием факторов сезона.

Введение ЭКЗС по поведенческим признакам вызывало глубокое состояние торпидности, аналогичное естественной форме покоя П-2. Однако состояние торпидности, вызванное ЭКЗС, в отличие от естественной формы покоя П-2 наблюдалось на протяжении 24 ч и более. По частоте сердечного ритма оно также было сопоставимо с естественной формой покоя П-2. Распределение частотных составляющих ЭЭГ примордиального гиппокампа также оказалось близким к такому при естественной форме покоя П-2 первичного сна в соответствующие сезоны года (см. рис. 2, I). По-видимому, введение экстракта оказывает влияние именно на эндогенные механизмы регуляции перестройки биоэлектрической активности амфибий.

На рис. 2 показано также изменение мощности электроэнцефалограммы примордиального гиппокампа травяных лягушек, находящихся в состоянии гипобриоза. Оно характеризуется значительным увеличени-

ем δ - и подавлением β_1 -диапазонов частот. Последнее указывает на значительную перестройку функциональных систем под влиянием низких температур. По предварительным данным нашей лаборатории угнетение β_1 -диапазона обуславливается подавлением системы, лежащей в основе «виджеленс». «Виджеленс» (бдительность), по данным В. П. Кёлла [21], определяет готовность любой системы интеграции обеспечить ее максимальное реагирование на эндогенные или экзогенные раздражители. В интеграции цикла бодрствование—сон «виджеленс» определяет готовность перехода животного из состояния сна или

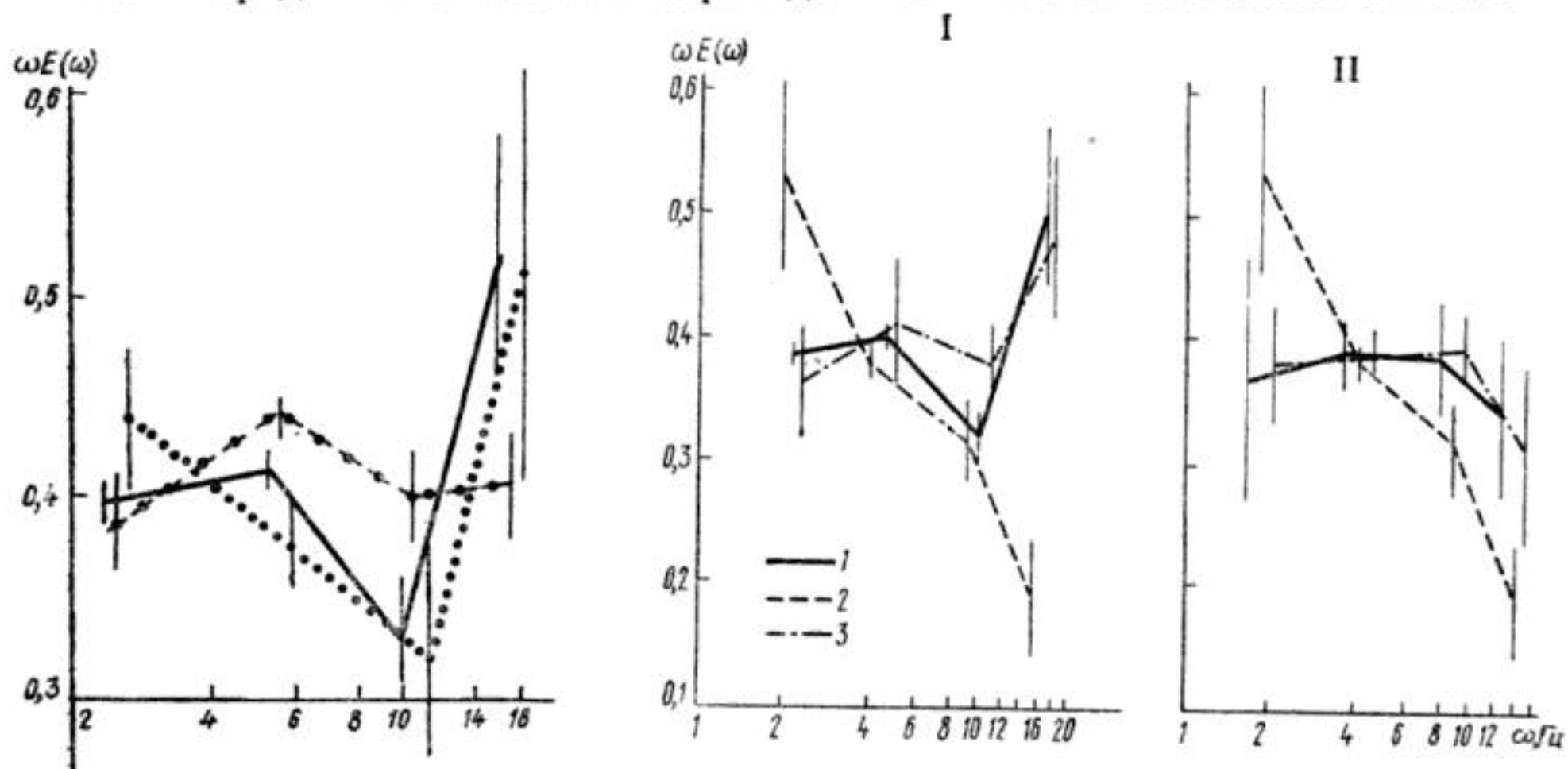


Рис. 1. Распределение нормированной мощности электроэнцефалограммы переднего мозга (примордиальный гиппокамп) травяных лягушек, находящихся в трех формах покоя первичного сна:

здесь и на рис. 2 по оси абсцисс — частота, Гц (в логарифмическом масштабе), по оси ординат — нормированное произведение мощности суммарного ЭЭГ-сигнала на частоту.

Рис. 2. Изменения распределения нормированной мощности ЭЭГ переднего мозга травяных лягушек, находящихся в естественной форме покоя П-2 первичного сна (I — лето, II — зима), при гипобии и на фоне состояния, вызванного введением экстракта кишки зимоспящего суслика (ЭКЗС):

1 — П-2, 2 — гипобия, 3 — на фоне ЭКЗС.

покоя в активное бодрствование. Таким образом, исходя из четкого представления θ - и α -диапазонов (по сравнению с β_1 -), в состоянии гипобии травяных лягушек сохраняется активность лимбических структур и переднего гипоталамуса [9, 14, 18]. И, наконец, необходимо остановиться на значительном увеличении медленных (0,5—3 Гц) волновых компонентов. При сопоставлении ряда литературных источников [4—6, 16, 17] с данными нашей лаборатории мы приходим к весьма важному выводу о проявлении на фоне гипобии в примордиальном гиппокампе травяных лягушек первичных ритмов возбуждения. Последнее указывает на высвобождение аутогенных механизмов поддержания жизнедеятельности, что проявляется в доминировании медленных волн в ЭЭГ.

На основании представленных в нашей статье результатов можно думать о влиянии экстракта, выделенного из кишки зимоспящего суслика в состоянии гибернации, на генетически закрепленные системы регуляции, лежащие в основе одной из форм покоя первичного сна (П-2), что свидетельствует о функциональной гомологии П-2 и гипобии. Интересно подчеркнуть то, что введение экстракта моделирует у травяных лягушек состояние, весьма напоминающее П-2 первичного сна с распределением волновых компонентов ЭЭГ, характерных для состояния П-2 соответствующего сезона. Следовательно, только такие сезонные факторы, как низкие температуры, фотопериодичность и другие, могут вызвать переход животного в состояние истинного гипобии.

Более того, по предварительным данным, факторы, выделенные из кожи и кишечника травяных лягушек, находящихся в состоянии гипобноза, вызывали у белых мышей эффект выраженного снижения метаболизма и температуры тела, аналогичный таковому при введении ЭКЗС.

Сопоставляя данные, представленные в этой статье, с результатами, полученными ранее в лаборатории механизмов организации биоструктур Института биологической физики АН СССР [8], можно прийти к заключению, что снижение метаболизма и температуры тела под влиянием ЭКЗС активизирует те специфические процессы вхождения в спячку, которые закреплены в эволюционном ряду млекопитающих. При этом результаты настоящей статьи указывают на наличие подобных систем у пойкилотермных позвоночных.

Таким образом, факторы, содержащиеся в экстрактах зимнеспящих во время зимней спячки, вызывают специфичные для гипобноза изменения у тепло- и холоднокровных представителей позвоночных. Этот факт свидетельствует о существовании единой генетически закрепленной системы рецепторов для опосредованного действия этих факторов в широком ряду позвоночных.

1. Аристакесян Е. А., Гиргидов А. Д. Метод представления распределения мощности электроэнцефалографического сигнала по спектру частот. — Физиол. журн. СССР, 1983, 96, № 11, с. 1239—1242.
2. Белич А. И. Цикл бодрствования — сон у холоднокровных позвоночных по данным непрерывной бесконтактной регистрации сердечного ритма и двигательной активности. — Журн. эволюц. биохимии и физиологии, 1980, 9, № 4, с. 371—379.
3. Белич А. И. Непрерывная длительная регистрация частоты сердечных сокращений бесконтактным методом. — Физиол. журн. СССР, 1982, 65, с. 1079—1082.
4. Войно-Ясенецкий А. В. Первичные ритмы возбуждения в онтогенезе. — Л.: Наука, 1974. — 148 с.
5. Войно-Ясенецкий А. В. Автоматизм и рефлекс в онтогенезе теплокровных. — В кн.: Развитие научного наследия академика Л. А. Орбели. Л.: Наука, 1982, с. 75—86.
6. Войно-Ясенецкий А. В., Дмитриева Л. Е. Взаимодействие ауторитмических и рефлекторных механизмов в ответах незрелой коры кролика на ритмические афферентные стимулы. — Журн. эволюц. биохимии и физиологии, 1981, 17, № 2, с. 191—198.
7. Демин Н. Н. Некоторые эволюционные аспекты нейробиологии сна и естественного гипобноза. — В кн.: XIV Всесоюз. физиол. о-ва. Баку, 1983. — 64 с.
8. Иваницкий Г. Р., Колаева С. Г., Пастухов Ю. Ф. и др. Эффект выраженного снижения метаболизма у теплокровных эндогенными веществами из тканей зимнеспящих в состоянии спячки. — Докл. АН СССР, 1982, 267, № 4, с. 978—980.
9. Карманова И. Г. Эволюция сна (этапы формирования цикла бодрствование — сон в ряду позвоночных). — Л.: Наука, 1977. — 174 с.
10. Карманова И. Г., Лазарев С. Г. Новые данные с нейрофизиологии сна рыб и амфибий (к генезу медленноволновой и парадоксальной фаз сна позвоночных). — Докл. АН СССР, 1979, 245, № 3, с. 757—760.
11. Карманова И. Г., Хомуцевская О. Е., Шиллинг Н. В. Сравнительно-физиологический анализ этапов эволюции сна и механизмов его регуляции. — Успехи физиол. наук, 1981, 12, № 2, с. 3—19.
12. Лазарев С. Г. Электроэнцефалографический анализ бодрствования и первичной формы сна у лягушки. — Журн. эволюц. и биохимии и физиологии, 1978, 14, № 4, с. 379—384.
13. Попова Н. К., Лобачева И. И., Карманова И. Г., Шиллинг Н. В. Изменения уровня серотонина в мозгу при различных формах покоя первичного сна у лягушки. — Журн. эволюц. биохимии и физиологии, 1982, 18, № 4, с. 430—432.
14. Чурносоев Е. В. Ритмическая составляющая ЭЭГ 8—12 Гц как коррелят обездвиженности типа каталепсии. — Журн. эволюц. биохимии и физиологии, 1974, 10, № 6, с. 610—616.
15. Шиллинг Н. В. О роли вегетативной нервной системы в регуляции первичной формы сна у лягушки. — Там же, 1979, 15, № 2, с. 184—189.
16. Corner M. A. Sleep and the beginning of behavioral in the animal kingdom — studies of ultradian motility cycles in early life. — Progr. Neurobiol., 1977, N 8, p. 279.
17. Hamborger V. Some aspects of the embryology of behavior. — Rev. Biol., 1963, N 38, p. 342.
18. Heller H. C. Hibernation: Neural aspects. — Ann. Rev. Physiol., 1979, N 41, p. 305—321.
19. Karmanova I. G., Belich A. I., Lazarev S. G. An electrophysiological study of wakefulness and sleep-like states in fish and amphibians. — In: Brain mechanisms of behavior in lower vertebrates. Cambridge. Cambr. univ. press, 1981, p. 181—202.

20. *Karmanova I. G., Lazarev S. G.* Stages of sleep evolution. — Waking and sleeping, 1979, 3, N 2, p. 137—147.
21. *Koella W. P.* A modern neurobiological concept of vigilance. — *Experientia*, 1982, 38, N 12, p. 1426—1437.
22. *Rommel S. A.* A simple method for recording fish heart and operculum beats without the use of implanted electrodes. — *Fish. Res. Board Can.*, 1973, 30, N 5, p. 693—694.
23. *Swan H.* Kamango and antabolon. — *Arch. Surg.*, 1963, 87, p. 715—716.
24. *Swan H., Jenkins D., Knox K.* Antimetabolic extract from brain of *Protopterus aethiopicus*. — *Nature*, London, 1968, 217, p. 671.
25. *Swan H., Schatte C.* Antimetabolic extract from the brain of the hibernating ground squirrel. — *Science*, 1977, 195, p. 84—85.

Ин-т эволюц. физиологии и биохимии
им. И. М. Сеченова АН СССР, Ленинград
Ин-т биол. физики АН СССР, Пущино

Получено 12.05.83

УДК 57.043

Я. Я. Колдаев, В. И. Курпатовский, Н. А. Онищенко

О ВОЗМОЖНОСТИ УМЕНЬШЕНИЯ ПОВРЕЖДАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ КРИОПРОТЕКТОРОВ ПРИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

В настоящее время общепризнано, что криопротекторы не обеспечивают адекватной защиты от криогенных повреждений [7]. Это обусловлено тем, что наряду с криопротекторным они оказывают повреждающее действие на тканевые и клеточные структуры органов [2, 5, 6]. Известно также, что криопротекторное действие возрастает с увеличением концентрации криопротектора, но при этом увеличивается и его повреждающее действие.

Цель настоящей работы — снижение токсического действия криопротекторов, применяемых в эффективных концентрациях путем предварительного введения донору ДМСО, который, как было показано нами ранее, увеличивает устойчивость органов к криогенным повреждениям и токсическому воздействию криопротекторов.

Материал и методы. Опыты проводили на 174 крысах линии Вистар, массой 150—200 г. Было выполнено три серии опытов. Первую серию проводили на 96 крысах и выясняли действие различных концентраций криопротекторов на активность кислой ДНКазы II и целостность мембран почек крыс. Вторую серию проводили на 42 животных и исследовали активность кислой ДНКазы II и целостность лизосомальной мембраны при предварительном введении ДМСО и инкубации в консервирующем растворе ИТОИТ-2 с добавлением различных концентраций ДМСО. Третью серию проводили на 36 крысах и изучали активность фермента и целостность мембран лизосом почек крыс при замораживании и оттаивании целого органа с различными комбинациями применения ДМСО.

Методика исследования. У крыс под гексеналовым наркозом забирали обе почки, по большой кривизне делали три надреза и погружали в консервирующий раствор ИТОИТ-2 [3] на 4 ч при 4 °С. В консервирующий раствор добавляли ДМСО фирмы «Серва» (ФРГ) или глицерин (СССР) с таким расчетом, чтобы конечная концентрация составляла 5, 10, 15% и т. д. После четырех часов инкубации почки вынимали из раствора и гомогенизировали в 0,25 М растворе сахарозы в соотношении 1 : 9. В гомогенате определяли активность кислой ДНКазы II К. Ф. 3.1.4.6 по данным работы [4]. Для оценки повреждающего действия криопротекторов на мембраны лизосом почек крысы мы предложили определять активность фермента в гомогенате без добавления неионного детергента тритона X-100, разрушающего мембраны, а для изучения влияния на активность фермента — использовали определение общей активности фермента. Замораживание почек крыс

проводили в смеси сухой углекислоты и 96° этилового спирта, оттаивание в водяной бане при 37°С. Предварительное введение ДМСО осуществляли внутрибрюшинно в виде 10%-ного раствора в дозе 0,5—1 г/кг массы. Статистически обрабатывали по методу Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. В табл. 1 представлены результаты по сравнительному анализу действия различных концентраций глицерина и ДМСО, добавленных в консервирующий раствор на стабильность мембран лизосом почек крыс и активность кислой ДНКазы II.

Т а б л и ц а 1. Изменения активности кислой ДНКазы II гомогената почек крыс после четырехчасовой инкубации в растворе ИТОИТ-2 с добавлением криопротекторов различной концентрации

Группа опытов	Глицерин		ДМСО	
	Активность кислой ДНКазы II в микромолях АМФ на грамм ткани в минуту			
	без детергенты	с детергентом	без детергента	с детергентом
Интактные почки	0,248±0,080	1,100±0,139	0,248±0,080	1,100±0,139
Контроль	0,325±0,122	1,257±0,093	0,242±0,077	0,870±0,100
Препарат, %	0,785±0,110*	1,285±0,228	0,699±0,135	1,685±0,220**
10	1,357±0,219**	1,657±0,197	0,825±0,108	1,828±0,210**
15	2,071±0,177**	1,814±0,176*	2,585±0,149***	1,799±0,242**
20	1,771±0,265**	2,010±0,184*	1,628±0,084**	0,970±0,185
30	1,699±0,174**	1,957±0,058*	0,914±0,164**	1,090±0,089
50	0,370±0,120	0,728±0,139	0,940±0,186*	1,042±0,099

Примечание. Здесь и в табл. 3 достоверность по отношению к контролю * — $p < 0,5$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$.

В целом выявлено увеличение активности кислой ДНКазы II по сравнению с контролем при возрастании концентрации глицерина и ДМСО от 5 до 15% с $0,785 \pm 0,110$ до $2,071 \pm 0,177$ мкМ АМФ в случае глицерина и от $0,242 \pm 0,077$ до $2,585 \pm 0,149$ мкМ АМФ в случае ДМСО. Это свидетельствует о повреждающем действии возрастающих концентраций криопротекторов. Этот повреждающий эффект на мембраны лизосом почек крысы более выражен у 15%-ного раствора ДМСО, однако 10%-ный раствор глицерина повреждает мембраны лизосом сильнее, чем ДМСО той же концентрации, $1,357 \pm 0,219$ мкМ АМФ и $0,825 \pm 0,108$ мкМ АМФ соответственно, $p < 0,01$. В дальнейшем при возрастании концентрации криопротекторов происходит уменьшение активности фермента в обоих случаях. На наш взгляд, это обусловлено прямым действием криопротекторов на структуру кислой ДНКазы II, что доказывают приведенные выводы, в которых показана зависимость активности кислой ДНКазы II от концентрации ДМСО, добавленного в реакционную среду.

В экспериментах с использованием неионного детергента активность кислой ДНКазы II также возрастала при увеличении концентрации криопротекторов в консервирующем растворе. Однако активность фермента максимальна при концентрации глицерина 20% — $2,010 \pm 0,184$ мкМ АМФ, при концентрации ДМСО 10% — $1,828 \pm 0,210$ мкМ АМФ. В дальнейшем при увеличении концентрации криопротекторов происходит уменьшение активности кислой ДНКазы II. В работе [8] приводятся данные, указывающие на отсутствие влияния возрастающих концентраций ДМСО на функцию почек, которые перфузировали растворами с ДМСО. Необходимо отметить, что в этом эксперименте время перфузии было незначительно, а в наших опытах длительность экспозиции — 4 часа. По-видимому, продолжительность опытов и обусловила различные результаты, полученные группой Сигала и нами.

Исходя из анализа полученных данных, мы пришли к выводу, что максимальное повреждение ДМСО и глицерином мембран лизосом по-

чек крыс выражено при больших концентрациях, начиная с 15%. Также был сделан вывод о более сильном дестабилизирующем действии глицерина, чем ДМСО. Поэтому мы исключили из дальнейших исследований глицерин. Зная, что криопротекторное действие ДМСО увеличивается с увеличением концентрации и исходя из приведенных данных о повреждающем действии криопротектора, мы остановили свой

выбор на концентрации 10% и использовали в дальнейшем именно этот раствор.

В целях уменьшения повреждающего действия на ткань почки и увеличения криопротекторного действия ДМСО мы использовали предварительное введение ДМСО и исследовали динамику активности кислой ДНКазы II после инкубации в консервирующем растворе с разными концентрациями ДМСО в соответствии с предыдущим опытом. Ре-

Таблица 2. Динамика активности кислой ДНКазы II гомогената почек крыс после предварительного введения ДМСО животному и четырехчасовой инкубации в растворе ИТОИТ-2 с добавлением различных концентраций ДМСО

№ п/п	Группа опытов	Активность кислой ДНКазы II в микромолях АМФ на грамм ткани в минуту	
		с детергентом	без детергента
1	Интактные почки	0,513±0,110	0,199±0,069
2	Инкубация в растворе	0,406±0,106	0,318±0,070
3	То же + 5%	0,528±0,173	0,285±0,136
4	" + 10%	0,456±0,116	0,342±0,131
5	" + 15%	0,825±0,240	0,642±0,217
6	" + 20%	0,415±0,110	0,314±0,090
7	" + 30%	0,367±0,020	0,210±0,080

зультаты, приведенные в табл. 2, показали ярко выраженный защитный эффект предварительного введения ДМСО на стабильность мембран лизосом почек крысы. Данные работы [2] также свидетельствуют о том, что ДМСО в концентрации 5—25% является выраженным стабилизатором мембран лизосом. При увеличении концентрации ДМСО до 15% активность кислой ДНКазы II незначительно возросла и все изменения были статистически недостоверны. Это доказывает, что предварительное введение ДМСО стабилизирует мембраны лизосом и в этом случае мы не наблюдаем повреждающего действия возрастающих концентраций ДМСО. Исследуя полученные результаты, мы установили, что предварительное введение ДМСО снижает активность самого фермента при консервации почек в 2—3 раза. Например, без предварительного введения ДМСО при консервации с 10%-ным раствором ДМСО активность кислой ДНКазы II составляет $1,828 \pm 0,210$, а с предварительной защитой — $0,456 \pm 0,116$ мкМ АМФ. Эти факты указывают на большое увеличение стабильности мембран лизосом почек крысы при предварительном введении ДМСО. Эта стабилизация выражена столь явно, что даже применение детергента тритона X-100 — (классического дестабилизатора мембран лизосом) не вызвало обычного в таких случаях выхода фермента из лизосом. Однако нельзя не допустить возможности проникновения предварительно введенного ДМСО внутрь лизосом и инактивации самого фермента, поскольку показано, что ДМСО обладает выраженной способностью проникать через мембраны клеток и клеточных органелл [1]. Это предположение требует дальнейшего исследования.

В следующем эксперименте мы изучали влияние предварительного введения ДМСО на криопротекторное действие этого препарата. Результаты представлены в табл. 3. Установлено, что при предварительной 30-минутной инкубации в растворе ИТОИТ-2 без использования детергента активность кислой ДНКазы II после замораживания и оттаивания снижается практически в два раза. В этом же случае, но с применением детергента активность фермента снижается, но это не достоверно. На наш взгляд, налицо криопротекторный эффект ДМСО, однако он выражен неявно. Использование предварительного введения ДМСО резко усилило криопротекторное действие препарата, уменьшив выход кислой ДНКазы II в три раза и достоверно снизив активность

фермента при применении детергента. Комбинация обоих факторов — после 30-минутной инкубации в консервирующем растворе и предварительного введения ДМСО незначительно снизило оба показателя по сравнению с описанным последним фактором (различия статистически недостоверны). Из полученных результатов можно сделать вывод, что предварительное введение ДМСО в организм животного усиливает

Таблица 3. Изменения активности кислой ДНКазы II гомогената почек крысы после замораживания и оттаивания при различных условиях подготовки животного и ткани

Группа опытов	Среда	Активность кислой ДНКазы II в микромолях АМФ на грамм ткани в минуту	
		с детергентом	без детергента
Замораживание и оттаивание (контроль)	Раствор	$0,640 \pm 0,299$	
	Ткань	$1,738 \pm 0,236$	$2,128 \pm 0,134$
Замораживание и оттаивание с предварительной инкубацией в 10%-ном растворе ДМСО	Раствор	$0,342 \pm 0,060$	
	Ткань	$0,957 \pm 0,184^*$	$1,970 \pm 0,166$
Замораживание и оттаивание с предварительным введением животному ДМСО	Раствор	0	
	Ткань	$0,285 \pm 0,068^{***}$	$0,742 \pm 0,064^{***}$
Замораживание и оттаивание с предварительным введением животному ДМСО и 30-минутной инкубацией в 10%-ном растворе ДМСО	Раствор	0	
	Ткань	$0,258 \pm 0,066^{***}$	$0,585 \pm 0,039^{***}$

криопротекторное действие препарата по сравнению с консервацией в растворе с ДМСО. Таким образом, концентрация ДМСО до 15% не вызывает ярко выраженного токсического эффекта на ткань почек крысы при четырехчасовой инкубации при 4°C; предварительное введение ДМСО в дозе 0,5—1 мг/кг массы уменьшает до 50% повреждающее действие концентраций криопротекторов; предварительная фармакологическая подготовка животного диметилсульфоксидом усиливает криозащитные свойства криопротектора.

Выводы

Концентрация ДМСО, %	Активность кислой ДНКазы II в микромолях АМФ на грамм ткани в 1 мин
5	$1,323 \pm 0,08$
10	$1,657 \pm 0,115$
15	$1,034 \pm 0,141$
50	$0,769 \pm 0,013$

1. Баррет, Хит. Лизосомы, методы исследования. — М.: Мир, 1976. — 278 с.
2. Даниленко М. В., Туркевич И. М. Клиническое применение димексида. — Киев: Здоров'я, 1976. — 143 с.
3. Пушкарь Н. С., Белоус А. М. Введение в криобиологию. — Киев: Наук. думка, 1975. — 344 с.
4. Шумаков В. И., Клейза В. Ю., Онищенко В. А. и др. Консервация почек бесперфузионным способом. — Хирургия, 1982, № 3, с. 73—77.
5. Seleno-de-methionine reduces freezing injury in heart protected with ethandiole. — Cryobiology, 1981, 18, p. 370—378.
6. Fahny G. M., Karow A. M. Cryoprotection. Absence correlation between electrolyte toxicity and cryoinjury in slowly frozen, cryoprotected rat heart. — Ibid., 1977, 14, p. 418—428.
7. Gregory M. F. Analysis of „Solution Effects“ injury rabbit renal cortex in the presence of dimethyl sulfoxide. — Ibid., 1980, 17, p. 371—389.
8. Segal N. B., Calley U., Guttman F. M. Dimethyl sulfoxide distribution in rabbit kidney and function following hypertonic mashout. — Ibid., 6, p. 603—604.

НИИ трансплантологии и искусств.
органов МЗ СССР, Москва

Получено 04.01.83

**ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ
ГОМОРИ-ПОЛОЖИТЕЛЬНОЙ ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНОЙ
НЕЙРОСЕКРЕТОРНОЙ СИСТЕМЫ (ГГНС)
В ПЕРИОД ЗИМНЕГО ОЦЕПЕНЕНИЯ
У ПОЙКИЛОТЕРМНЫХ И ГИБЕРНАЦИИ
У ГОМОИОТЕРМНЫХ ПОЗВОНОЧНЫХ**

Спячка гомойотермных животных является замечательной видовой адаптацией, направленной прежде всего на перенесение неблагоприятного периода жизни, связанного с ограничением добывания корма в определенные сезоны года. В регуляции этого процесса вовлечены многие системы организма. Несомненно, что важнейшая роль принадлежит центральной нервной системе (ЦНС), и в частности ее нейроэндокринному аппарату [9]. Как известно, последний в ЦНС представлен гипоталамо-гипофизарной системой, комплексом циркумвентрикулярных органов, включая эпифиз, а на периферии — мощной хромаффинной системой (мозговое вещество надпочечника, параганглии, МИФ-клетки). В нашей статье внимание будет сосредоточено на участии ГГНС в механизме гибернации гомойотермных млекопитающих. Однако для понимания закономерностей функционирования ГГНС у гибернирующих млекопитающих мы прибегли к изучению этой системы не только у близкородственных видов, различающихся глубиной спячки, но также и у пойкилотермных (*Anaemia*), впадающих в осенне-зимний период в оцепенение различной степени. Как показали многочисленные исследования ГГНС и эндокринных желез, выполненные исследователями школы Н. Л. Гербильского, такой сравнительно-эколого-гистофизиологический подход весьма плодотворен для выяснения участия этих систем в реализации видовых адаптаций в онтогенезе [2]. В некоторых наших обзорно-теоретических статьях показано, что именно ГГНС, продуцирующая такие пептидные нейрогормоны, как вазопрессин, окситоцин (и их гомологи), картико- и меланолиберин, имеют прямое отношение к регуляции различных систем, непосредственно обеспечивающих защитно-приспособительные возможности организма, в том числе и его поведенческие реакции [6, 7].

В настоящей статье обобщены литературные данные, а также результаты исследований, выполненных коллективом ученых под руководством автора. Инициатором и активным участником исследований был профессор А. Д. Слоним.

Как показали исследования ГГНС, у пойкилотермных с осени начинается процесс накопления в системе, и, особенно в заднем нейрогипофизе (ЗНГ), гомори-положительного нейросекреторного вещества (НСВ), максимум которого приходится на зимний период. Капилляры в пределах ГГНС находятся в спавшемся состоянии. Для зимнего периода характерны наименьшие размеры перикарионов, ядер и ядрышек нейросекреторных клеток (НСК). Большие массы НСВ характерны для животных и в ранний весенний период. Например, в преоптическом ядре (ПЯ) лящей (*Ambystoma tigrinum* L.), пойманных подо льдом в Финском заливе в начале апреля, наряду с пылевидным НСВ наблюдается большое количество огромных капель нейросекрета, часто располагающихся вне перикарионов НСК. Сходной структуры крупные капли характерны и для ПЯ лягушек (*Rana temporaria* L.) в апреле, перед началом их размножения. Такое каплевидное НСВ описано в ПЯ у ряда других видов костистых рыб и амфибий в зимнее время [4, 5, 12]. Важно подчеркнуть, что каплевидное НСВ выявляется не только при окраске по Гомори, но и обычными методами без предварительного окисления препаратов, причем эти капли при окраске азан по Гей-

денгайну интенсивно воспринимают азокармин. Как известно, этим же красителем окрашивается депонирующийся секреторный материал в виде крупных гранул или капель в аденотропоцитах гипофиза и коллоид в фолликулах щитовидной железы у рыб и амфибий в зимний период. Отсюда следует, что каплевидное НСВ у лещей и лягушек является формой его депонирования зимой в НСК. Действительно, с подъемом температуры окружающей среды и началом размножения наблюдаются резкое уменьшение количества крупных капель НСВ и снижение степени окраски их азокармином, и приобретение свойств воспринимать анилиновый синий, что свидетельствует о разжижении секрета. В период размножения каплевидное НСВ практически отсутствует у лещей и лягушек. Электронно-микроскопические исследования Л. С. Онищенко ПЯ у весенне-летних лягушек показали, что каплевидное НСВ обнаруживается в цистернах гранулярной эндоплазматической сети не только в перикарионах, но и в отростках НСК, где затем и начинается своеобразное «растворение» капель. Каплевидное НСВ характерно не для всех видов пойкилотермных. В частности, оно не обнаружено у сазана (*Surginus sagrio* L.) в отличие от близкородственного вида леща. Способ депонирования секрета в виде капель отражает видовую адаптацию в онтогенезе [2]. Действительно, для лещей, в отличие от сазана, характерен более интенсивный одновременный нерест, для чего необходим значительный запас нейрогормонов перед наступлением размножения.

Несомненный интерес представляют данные, полученные при исследовании ЗНГ у осетра (*Acipenser güldenstädti* Brandt) и белуги (*Huso huso* L.), пойманных зимой в двух районах Волги: в низовье (около Астрахани) подо льдом на зимовальной яме и в незамерзающем бьефе под плотинной Волгоградской ГЭС в период зимних спусков воды [1]. Оказалось, что ЗНГ у относительно активных, пойманных под плотинной рыб, гипермирован и содержит меньше пылевидного НСВ, чем у особей на зимовальной яме. Эти данные косвенно говорят о том, что у рыб под плотинной ГГНС активна и из ЗНГ происходит выброс нонапептидных нейрогормонов в общий кровоток.

Анализ приведенных выше данных, полученных на пойкилотермных, свидетельствует, что по мере снижения температуры окружающей среды наблюдается снижение активности ГГНС, особенно ее нейрогемальных отделов, из которых уменьшается выброс нейрогормонов в кровоток. Этот выброс минимален зимой. Однако в перикарионах НСК синтез НСВ происходит постепенно. Но низкий базальный уровень и медленный транспорт НСВ по аксонам приводят к накоплению и депонированию больших масс секрета к ранней весне. Затем, с повышением температуры среды, происходит активация ГГНС, максимум которой наступает перед размножением. Таким образом, степень активности ГГНС у пойкилотермных находится в тесной зависимости от температуры окружающей среды.

Иной характер, чем у пойкилотермных, носят изменения в активности ГГНС у двух видов зимоспящих сусликов [7, 10, 11]. Однако в начальный период спячки сусликов с момента впадения в нее (октябрь) до ее середины (декабрь) наблюдается сходство с изменениями в ГГНС у пойкилотермных, что выражается в постепенном снижении активности этой системы. Было установлено повышение содержания НСВ во всех отделах системы, уменьшение размеров перикарионов, ядер и ядрышек НСК в супраоптическом (СОЯ), постоптическом (ПОЯ) и паравентрикулярном (ПВЯ) ядрах. В декабре, в период самой глубокой спячки, у краснощеких сусликов (*Citellus erythrogenus*, Brandt) аккумулируется настолько огромное количество НСВ, что в ЗНГ трудно различить питуциты и сильно спавшиеся капилляры. Существенные отличия в ГГНС сусликов от рыб и амфибий проявляются с января, когда у грызунов прогрессируют признаки активации нейросекреторной системы. В марте, перед пробуждением зверьков,

активность ГГНС по данным морфометрии более чем в два раза превосходит таковую перед началом гибернации. Особенно яркие изменения наблюдаются в НСК из СОЯ и ПОЯ и их глиальных «сателлитов». В срединном возвышении и ЗНГ наблюдаются отчетливые морфологические признаки транспорта нейrogормонов в кровоток. Однако максимум активности ГГНС характерен для периода размножения. Особенно яркие изменения в структуре ГГНС выявлены у краснощеких сусликов, характеризующихся глубокой спячкой (без пробуждения). Длиннохвостые суслики (*Citellus undulatus* Pallas) периодически просыпаются и принимают пищу. Параллельно с активацией ГГНС к моменту пробуждения зверьков увеличивается масса их надпочечников и семенников, а также возрастают показатели, характеризующие функцию почек, скелетных мышц и кожи. Показано также, что щитовидная железа у краснощеких сусликов перед их пробуждением высоко активна [3, 9, 10]. Как мы полагаем, активация со стороны гипоталамуса функции периферических эндокринных желез ряда висцеральных органов и гаметогенеза во второй половине периода гибернации осуществляется главным образом филогенетически молодым, более тонким трансденогипофизарным нейrogормональным путем. Древний, парааденогипофизарный путь нейrogормональной регуляции этих функций, видимо, включается преимущественно в активный период жизни сусликов, а именно в разгар репродукции, когда большие количества нонапептидов проявляют свое тормозное влияние.

Сравнивая изменения ГГНС у пойкилотермных с таковыми у млекопитающих гибернаторов в осенне-весенний период, приходим к выводу, что у холоднокровных степень функциональной активности ГГНС зависит от влияния внешних факторов, и прежде всего от температуры, в то время как у млекопитающих деятельность ГГНС контролируется преимущественно внутренними факторами. Среди последних, по-видимому, особо важное значение принадлежит изменению уровня метаболизма, прежде всего, энергетических и пластических веществ, контролируемого генетическим аппаратом. Триггером к гибернации, видимо, служат внешние факторы (температура, влажность, длина светового дня и др.). Но действие этих факторов будет неэффективно, если уровень метаболизма не достигнет определенного уровня, необходимого для перехода в спячку. Активация ГГНС у сусликов с середины спячки, видимо, инициируется внутренними, генетически запрограммированными факторами метаболического характера. Мы думаем, что в основе механизма реализации таких адаптаций, как гибернация млекопитающих, перелет птиц и миграция рыб, лежат общие принципы.

Нужно помнить, что сигналы от экстеро- и интерорецепторов, прежде чем достигнуть ГГНС, проходят существенную переработку в выше- и нижележащих регуляторных центрах ЦНС, в том числе и корковых, определяющих поведение готовящихся к спячке животных. Без сомнения ГГНС, являясь эффекторным нейrogормональным звеном ЦНС, активно вовлечена в обеспечение такой важной видовой адаптации, какой является гибернация. При этом картины морфофункционального состояния ГГНС позволяют косвенно судить о глубине спячки животного и уровне активности висцеральных органов, в том числе и эндокринных желез в ходе гибернации.

1. Алтуфьев Ю. В., Власенко А. Д., Поленов А. Л., Шевелева Н. Н. Анализ состояния нейрогипофиза и гонад осетра *Acipenser güldenstädti* Brandt и белуги *Huso huso* (L.) под плотиной Волгоградской ГЭС и на рыбозимовальной яме «Машкина коса» в зимний период. — *Вопр. ихтиологии*, 1980, № 20, с. 307—316.
2. Гербильский Н. Л. Общебиологическое значение проблемы нейросекреции. — В кн.: *Нейросекреторные элементы и их значение в организме* / Под ред. Н. Л. Гербильского, А. Л. Поленова. М.; Л.: Наука, 1964, с. 3—5.
3. Калабухов Н. И. Периодические изменения в организме грызунов. — Л.: Наука, 1969. — 248 с.
4. Моисеева Е. А., Константинова М. С. Влияние инъекции адреналина на гипоталамо-гипофизарную нейросекрецию у амфибий и рептилий. — В кн: *Центральные*

- и периферические механизмы нервной деятельности. Ереван, 1966, с. 323—329.
5. *Поленов А. Л.* Гипоталамическая нейросекреция. — Л.: Наука, 1968. — 160 с.
 6. *Поленов А. Л.* Взаимодействие пептидных и моноаминовых нейрогормонов — основной принцип двойной нейроэндокринной регуляции. — Успехи физиол. наук, 1979, т. 10, с. 28—53.
 7. *Штарк М. Б.* Мозг зимнеявляющихся. — Новосибирск: Наука, СО, 1970. — 240 с.
 8. *Polenov A. L.* Hypothalamic neurohormonal mechanisms of adaptation. — In: Adv. Physiol. Sci. Endocrinology, neuroendocrinology, neuropeptides-II / Eds E. Stark, G. B. Makara, B. Halasz, Gy. Rappay. Budapest: Akad. Klado, 1981, vol. 14, p. 1—22.
 9. *Polenov A. L., Yurisova M. N.* The Hypothalamohypophysial system in the ground squirrels, *Citellus erythrogenys* Brandt and *Citellus undulatus* Pallas. I. Microanatomy and cytomorphology of the Gomori-positive neurosecretory system with special reference to its state during hibernation. — Z. mikrosk-anat. Forsch., 1975, 89, s. 991—1014.
 10. *Yurisova M. N., Polenov A. L.* The hypothalamo-hypophysial system in the ground squirrel, *Citellus erythrogenys* brandt. II. Seasonal changes in the classical neurosecretory system of a hibernator. — Cell Tissue Res., 1979, 198, p. 539—556.
 11. *Yurisova M. N., Polenov A. L., Slonim A. D.* Annual dynamics of activity of the hypothalamo-hypophysial neurosecretory system in ground squirrels, *Citellus erythrogenys* brandt and *C. undulatus* pallas. — In: Neurosecretion and neuroendocrine activity / Eds W. Bargmann, A. Oksche, A. Polenov, B. Scharrer. VII Intern. Symp. Neurosecret. (Leningrad, 17—21 Aug. 1976). Berlin etc.: Springer, 1978, p. 325—328.
 12. *Scharrer E., Scharrer B.* Neuroendocrinology. — New York; London: Columb. univ. press, 1963. — 289 p.

Ин-т эволюц. физиологии и биохимии
им. И. М. Сеченова АН СССР, Ленинград

Получено 12.05.83

УДК 591.543.42

Б. И. Словилов, З. Г. Невретдинова

ВЛИЯНИЕ 5-ОКСИТРИПТОФАНА НА ТЕМПЕРАТУРУ МОЗГА И ПОТРЕБЛЕНИЕ КИСЛОРОДА У АРКТИЧЕСКИХ ДЛИННОХВОСТЫХ СУСЛИКОВ ВО ВРЕМЯ ГЕТЕРОТЕРМНОГО СЕЗОНА

Участие серотонина в регуляции температуры тела и его влияние на энергетический метаболизм у зимоспящих в разные периоды их жизнедеятельности остается во многом невыясненным [4, 9]. Показано, что ряд физиологических сдвигов, характерных для вхождения в спячку арктических сусликов, — снижение потребления кислорода и температуры мозга, другие показатели — в определенной степени воспроизводятся при действии предшественника серотонина в биологическом синтезе — 5-окситриптофаном (5-ОТФ) за 1—1,5 месяца до зимней спячки [11]. Поэтому интересно выяснить влияние 5-ОТФ на температуру мозга и потребление кислорода во время гетеротермного сезона, после повторных пробуждений из спячки у арктических сусликов и провести сопоставление с результатами аналогичных показателей подготовительного периода, а также сравнить эффекты 5-ОТФ с изменением данных показателей у интактных животных при погружении в спячку.

Материал и методика. Эксперименты проведены в ноябре—феврале 1982—1983 гг. на пяти арктических длиннохвостых сусликах (*C. Parryi Richardsoni*) — массой 470—530 г, отловленных в Анадырском районе Магаданской области. Хирургическая операция имплантации электродов (медь-константановая термopapa) в преоптическую область гипоталамуса для регистрации температуры мозга (T_m) осуществлялась под нембуталовым наркозом (60 мг/кг). Краниальные концы прикреплялись к соответствующим контактам микроразъемов, площадка которого закреплялась в кости черепа животного с помощью пластполимера норакрила. Соединительный кабель — диаметром 1,5 мм, длиной 120—140 см — не мешал свободному передвижению животного

в пределах гнездовой камеры. Описание методики по одновременной автоматической регистрации потребления кислорода (ПК) — VO_2 мл/(кг·мин), температуры мозга и других показателей в длительном эксперименте опубликовано ранее [1]. Опыты проводились при $+6^\circ\text{C}$, 5-ОТФ вводили внутривенно из расчета 50 мг/кг массы тела животного.

Результаты и их обсуждение. Изменения T_m и ПК у животных после введения 5-ОТФ (рис. 1) и у интактных животных при вхождении в спячку (рис. 2, 3) сходны по опережающему снижению ПК. Раз-

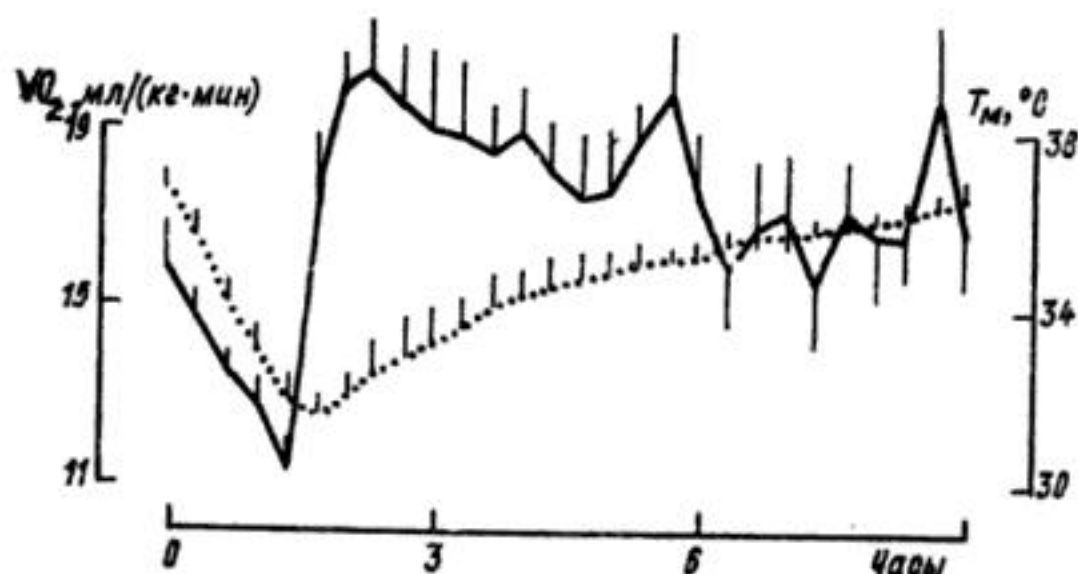


Рис. 1. Влияние 5-окситриптофана на потребление кислорода (сплошная кривая) и температуру мозга (пунктирная) во время кратковременных периодов пробуждений из спячки у арктических сусликов.

ница лишь в том, что при вхождении в спячку эти изменения более «растянуты» во времени. Восстановление ПК после угнетающего действия 5-ОТФ характеризуется быстрым подъемом — максимальные величины, значительно превосходящие исходные, отмечены уже через 10—15 мин от начала восстановления. Подобный «взрывной» подъем ПК отмечен и у пробуждающихся от зимней спячки арктических сусликов [10]. Показано также, что вход в спячку возможен в виде непрерывного процесса угнетения ПК и T_m ; в виде повторных спадов и подъемов ПК и T_m на фоне постепенного угнетения обоих показателей. Выявленные циклические изменения ПК и T_m (на рис. 3 они даны в сжатом виде) не освещены в исследованиях других авторов. Поэтому ниже приводим описание отдельного цикла: при исходных величинах T_m — $26,2^\circ\text{C}$, ПК — 3,1 мл/(кг·мин), T_m сравнительно быстро (через 12 мин) поднималась до максимальных величин ($28,7^\circ\text{C}$). Почти одновременно увеличивалось и ПК, но максимум (24,3 мл/(кг·мин)) выделялся раньше (через 8 мин). Последующее плавное снижение демонстрирует аналогичную картину — достижение исходных величин до начала подъема) — T_m через 85 мин, ПК — значительно быстрее — через 60 мин. Необходимо добавить, что подобие всех циклов выражалось не только через опережающее, быстрое изменение ПК (достижение максимальных и исходных величин после подъема), но и через определенную характерную структуру цикла — волнообразное изменение с быстрым подъемом и плавным снижением. Вероятно, такие четко повторяющиеся изменения отражают работу определенных регулирующих механизмов. Предполагается, что вход в зимнюю спячку управляется нервным компонентом регуляции, исходящим из лимбической системы [6, 13]. Допускается наличие в этом процессе двух стадий: первой подготовительной (последовательно сменяющееся возбуждение и торможение) и второй, в которой преобладают тормозные процессы [13]. Непосредственно до вхождения в спячку такие взаимоотношения описаны в виде известного феномена «тест капли» — на примере температуры тела у сусликов. Подобные эффекты выявлены

также, что вход в спячку

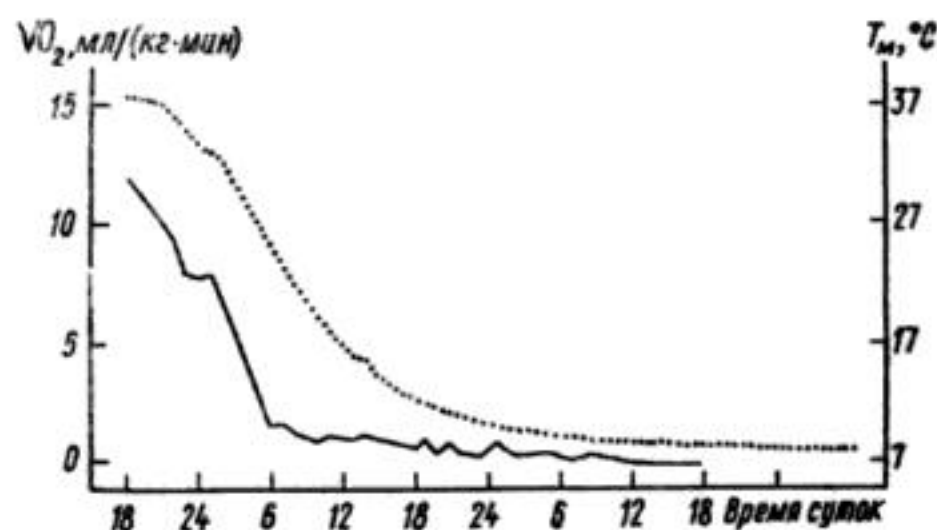


Рис. 2. Процесс непрерывного угнетения потребления кислорода (сплошная кривая) и температуры мозга (пунктирная) при вхождении арктического суслика в спячку (опыт 19.01.83).

и в наших опытах. Они отличаются тем, что их возникновение возможно и на этапе вхождения в спячку.

Биологический смысл таких спонтанно циклически возникающих изменений, очевидно, в том, что они предварительно позволяют «настроить» необходимые интегративные взаимодействия определенных функциональных систем для их предстоящей работы на минимизированном уровне.

При сравнении эффектов, вызванных 5-ОТФ, с результатами аналогичных экспериментов, выполненных нами в августе—сентябре [11],

можно сделать выводы, что его влияние на энергообмен во время зимней спячки выражено в гораздо меньшей степени (снижение ПК на 28%), чем в подготовительном периоде (снижение ПК на 66% исходного уровня), что подтверждается и более быстрым восстановлением ПК. При анализе T_m (по данным сезонам года) не выявлено существенных различий. Возможно в обоих случаях достигался «предел» ответных терморегуляторных реакций (увеличение теплоотдачи), поскольку

доза 100 мг/кг не вызывала более значительного снижения T_m . Такие эффекты влияния 5-ОТФ на ПК, вызванные у арктических сусликов во время зимней спячки, можно объяснить повышенной активностью $Na^+K^+ - АТФазы$ [2], определяющей «захват», транспорт и активное внутриклеточное депонирование серотонина [7]. Наряду с почти полным прекращением обмена норадреналина в мозгу сусликов [8], депонирование серотонина создает дополнительные предпосылки для инактивации норадреналина около синапса [12]. Возможны и другие объяснения: меньший эффект снижения ПК в результате более быстрого разрушения серотонина. Этот путь менее вероятен, поскольку на краснощеких сусликах показано, что содержание 5-оксииндолуксусной кислоты (метаболита серотонина) в это время года не увеличено [5].

Приведенный выше механизм серотонина в регуляции интимных механизмов угнетения энергообмена у арктических сусликов в это время года отражает только частично те перестройки, которые формируются в наступающем гипобиозе. Очевидно, не только серотонин, но и другие биологически активные вещества ответственны, вероятно, только за отдельные звенья регуляции спячки, а ведущие факторы индукции этого состояния остаются неизвестными [3].

По-видимому, выявленные в наших опытах изменения реализуются через определенные взаимоотношения влияния нервной и нейрохимической компонент регуляции.

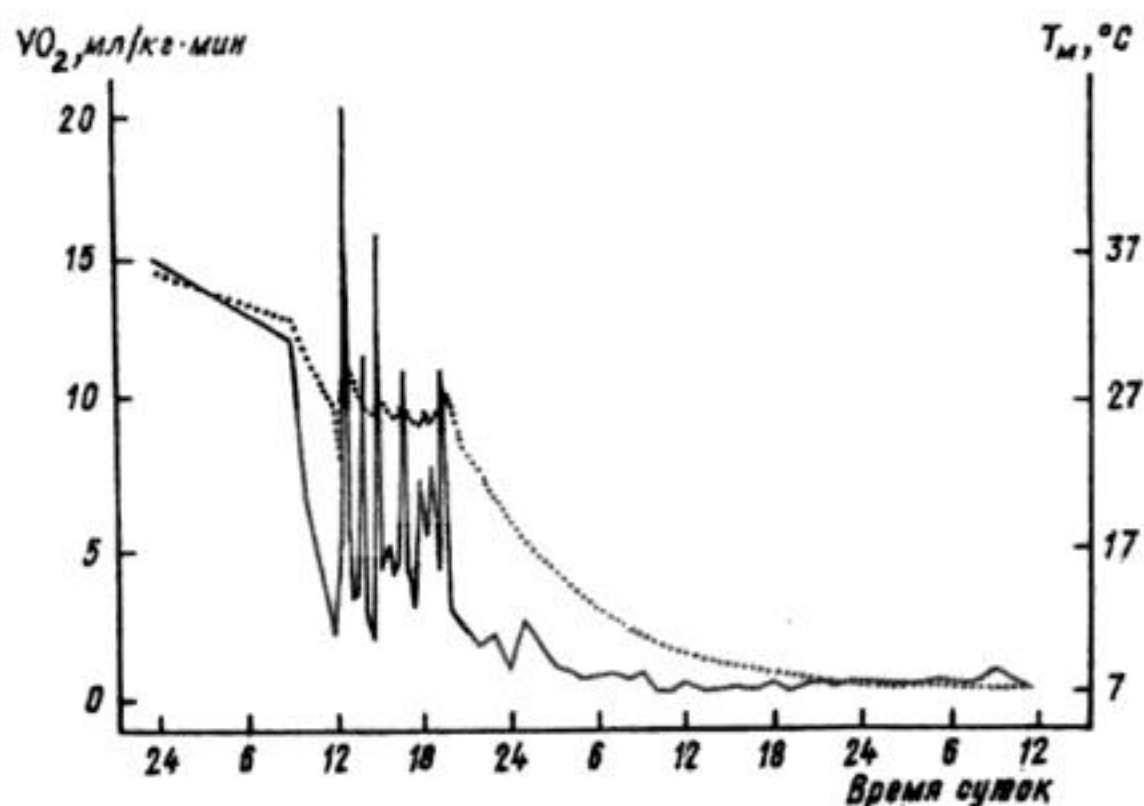


Рис. 3. Циклический процесс (спады — подъемы) угнетения потребления кислорода (сплошная кривая) и температуры мозга (пунктирная) при вхождении арктического суслика в спячку (опыт 24.02.82).

1. Вайн-Риб М. А., Пастухов Ю. Ф., Чуйко В. В. Автоматический респирометр для длительной регистрации динамики потребления кислорода в эколого-физиологических экспериментах. — Экология, 1981, № 3, с. 96—98.
2. Высочина Т. К., Попова Н. К. Действие серотонина на транспортную АТФазу синапсом мозга сусликов. — В кн.: Механизмы зимней спячки млекопитающих. Владивосток, Б. И., 1977, с. 112—117.
3. Пастухов Ю. Ф., Ерошенко Т. М. Роль медиаторов и нейропептидов в терморегуляции. — В кн.: Важнейшие теорет. и практ. пробл. терморегуляции: Тез. докл. (Новосибирск, 4—6 окт.). Новосибирск, 1982, с. 30—32.

4. *Попдва Н. К.* О роли серотонина в терморегуляции. — Там же, с. 144.
5. *Попова Н. К., Войтенко Н. Н.* Обмен серотонина во время зимней спячки. — Докл. АН СССР, 1974, **218**, № 6, с. 1488—1490.
6. *Штарк М. Б.* Мозг зимне спящих. — Новосибирск: Наука, 1970—142 с.
7. *Bogdanski D. F., Tissari A. H., Brodie B. B.* Mechanism of transport and storage of biogenic amines. — Biochem. Biophys. acta, 1970, **219**, p. 189—199.
8. *Draskoczy P. R., Lyman C. P.* Turnover of catecholamines in active and hibernating ground squirrels. — J. Pharmacol. and Exp. Ther., 1967, **155**, p. 101—111.
9. *Jansky L., Lehouckova M., Vybiral S. et al.* Effect of serotonin on thermoregulation of a hibernator (*Mesocricetus auratus*). — Physiol. bohemosl., 1973, **22**, p. 115—124.
10. *Morrison P., Galster W.* Patterns of hibernation of the arctic squirrel. — Canad. J. Zool., 1975, **53**, p. 1345—1355.
11. *Pastukhov Yu. F., Chepkasov I. E., Slovikov B. I. et al.* Role of serotonin in preparation for hibernation in arctic ground squirrels. — Acta Univ. carol. Biol., 1979, p. 209—211.
12. *Scroop G. C., Walsh Y. O.* Interactions between angiotensin, noradrenaline and serotonin of the peripheral blood vessels in man. — Austral. J. Exp. Biol. and Med. Sci., 1968, **46**, p. 573—580.
13. *South F., Heat J., Luecke R. et al.* Status of the role of the central nervous system and thermoregulation during hibernation. — In: Hibernation and hypothermia, perspectives and challenges. Amsterdam, 1972, p. 129—133.

Ин-т биол. пробл. Севера
ДВНЦ АН СССР, Владивосток

Получено 12.05.83

УДК 591.104

*Н. И. Федотчева,
Г. Д. Миронова, М. Н. Кондрашова*

ИНГИБИРОВАНИЕ ДЫХАНИЯ И К⁺-ТРАНСПОРТИРУЮЩЕЙ СИСТЕМЫ МИТОХОНДРИЙ ПРИ ЗИМНЕЙ СПЯЧКЕ

Одним из основных проявлений зимней спячки на уровне клеточного метаболизма является снижение в митохондриях (МХ) дыхания и фосфорилирования [4, 5, 7]. Анализ литературных данных показывает, что снижение активности ферментов дыхательной цепи МХ при спячке не может полностью объясняться влиянием низкой температуры. Так, ингибирование окисления янтарной кислоты МХ печени спящих сусликов в третьем и четвертом метаболических состояниях наблюдается в диапазоне температур от температуры зимней спячки до 37 °С [5, 7], а при температуре зимней спячки ингибирование дыхания МХ спящих сусликов более сильное, чем МХ активных животных [4]. Способность зимоспящих развивать интенсивный метаболизм и термогенез в период пробуждения предполагает, что в основе ингибирования дыхательной цепи лежат регуляторные, обратимые процессы.

Учитывая литературные данные о возможности регуляции дыхательной цепи МХ жирными кислотами [11], длинноцепочечными ацил-КоА [7], щавелевоуксусной кислотой [6], мы предположили, что адаптационные изменения МХ при спячке могут быть связаны с изменением метаболизма этих соединений, т. е. носить функциональный характер. Они могут появляться или устраняться при смене одного преобладающего метаболического пути на другой, например, липолиза при спячке — на гликолиз при пробуждении. В статье показано, что снижение дыхания МХ печени спящих сусликов в большой степени определяется ингибированием дыхательной цепи щавелевоуксусной кислотой, которая является одним из важнейших субстратов митохондриального и клеточного метаболизма.

В отличие от гипотермии, при которой снижение температуры приводит к необратимым изменениям, при зимней спячке сохраняется структурная целостность клеток и органелл, что обеспечивается механизмами, поддерживающими ионные градиенты в клетках и тканях спящих животных [9]. При лимите энергии ионный гомеостаз в состоя-

нии спячки поддерживается, по-видимому, благодаря снижению пассивной проницаемости мембраны для ионов [10, 13]. Транспортные процессы в МХ при зимней спячке ранее не исследовались, хотя имеющиеся в литературе данные об изменениях липидного состава МХ-мембран и увеличении ненасыщенности жирных кислот в липидах [8], конформационных изменениях гидрофобных связей липидов мембраны [3] указывают на важность и необходимость подобных исследований.

Скорости ДНФ-стимулированного дыхания МХ печени спящих и активных сусликов на разных субстратах окисления

Субстрат окисления	Скорость дыхания в присутствии 100 мкМ ДНФ (нг, ат. 0/мин·мг)	
	МХ спящих сусликов	МХ активных сусликов
Сукцинат 4 мМ	38,9	115,3
Сукцинат 4 мМ+глутамин 2 мМ	54,8	—
Сукцинат 4 мМ+изоцитохром 2 мМ	77,8	110,0
Сукцинат 4 мМ+цитохром с 20 мкМ	56,0	—
Пир. 4 мМ+малат 2 мМ	24,3	86,9
Аскорбат 4 мМ+ТМФД 200 мкМ	95,5	117,3

В данной статье изучался транспорт ионов K^+ в МХ печени сусликов в период спячки, активности и пробуждения.

Материалы и методы. Исследования проводились на арктических сусликах (*Citellus parryi*), МХ печени выделяли общепринятым методом. Среда выделения содержала 300 мМ сахарозы, 10 мМ триса, рН 7,5. Дыхание МХ измерялось полярографически, в кювете объемом 1 мл при концентрации белка МХ 3—3,5 мг. Среда инкубации содержала 150 мМ сахарозы, 50 мМ КСl, 3 мМ фосфата, 10 мМ триса, рН 7,5. Содержание и скорость выхода ионов K^+ из МХ определяли с помощью K^+ -селективного электрода по увеличению концентрации ионов K^+ в среде при действии ДНФ и последующем лизисе МХ детергентом тритоном X-100. Набухание МХ измеряли спектрофлуориметрически при длине волны 540 нм. Все опыты проводили в термостатируемой кювете при температуре 26 °С, оптимальной для функционирования интактных МХ.

Результаты и их обсуждение. Анализ механизма ингибирования дыхания при зимней спячке. Наиболее характерным изменением метаболизма при зимней спячке является снижение скорости дыхания МХ. Ингибирование дыхания МХ печени спящих сусликов наблюдается во всех метаболических состояниях МХ. В таблице представлены данные, показывающие скорости дыхания МХ печени спящих и активных сусликов при окислении субстратов, поступающих в дыхательную цепь на разных ее участках. Скорость дыхания измерялась в присутствии 100 мкМ ДНФ, поскольку скорость разобщенного дыхания максимально выявляет амплитуду ингибирования дыхательной цепи. Из таблицы следует, что скорость дыхания МХ печени спящих сусликов на НАД-зависимых субстратах и сукцинате значительно снижена по сравнению с дыханием МХ активных животных. Скорость дыхания, связанного с конечным участком дыхательной цепи, который окисляет аскорбат в присутствии искусственного акцептора ТМФД, значительно превышает скорость дыхания на субстратах, окисляющихся дегидрогеназами, но остается сниженной по сравнению с дыханием МХ активных сусликов. Активация дыхания в присутствии экзогенного цитохрома с также указывает на снижение окислительной способности конечного участка дыхательной цепи.

Снижение скорости окисления янтарной кислоты обусловлено ингибированием сукцинатдегидрогеназы щавелевоуксусной кислотой, так как оно снимается при внесении в среду инкубации янтарной с глутаминовой или янтарной с изолимонной кислот. Скорость разобщенного

дыхания МХ спящих сусликов при этом может возрасти в два раза.

Щавелевоуксусное торможение (ЩТ) дыхательной цепи может объяснять наличие более сниженной скорости окисления янтарной кислоты при температуре зимней спячки. Возможно, что именно ЩТ дыхания является одним из первичных механизмов, инициирующих снижение температуры и метаболизма при погружении животного в состояние спячки. Возможность увеличения скорости дыхания МХ при снятии ЩТ дыхания показывает, что ингибирование дыхательной цепи носит обратимый характер и может определяться двумя факторами: повышением сродства сукцинатдегидрогеназы к щавелевоуксусной кислоте при понижении температуры и увеличением концентрации оксалоацетата в связи с низкой скоростью глюконеогенеза в период зимней спячки.

Таким образом, при анализе данных таблицы видно, что ингибирование дыхания МХ печени спящих сусликов связано с торможением дыхательной цепи на всех ее участках. В большей степени ингибирование проявляется на уровне дегидрогеназ. Возможность ускорения дыхания при снятии ЩТ показывает, что ингибирование дыхания МХ при зимней спячке носит функциональный, обратимый характер.

Ингибирование K^+ -транспортной системы МХ при спячке. Мы отмечали, что МХ сохраняют свою

целостность при температуре зимней спячки. Одним из возможных механизмов, предохраняющих МХ от набухания или потери K^+ , может быть снижение проницаемости МХ-мембраны для ионов K^+ . Для оценки возможных изменений проницаемости МХ-мембраны для K^+ в периоды спячки, пробуждения и активности животных нами исследовалась скорость выхода ионов K^+ из деэнергизованных МХ в присутствии ДНФ и скорость зависимой от дыхания аккумуляции K^+ в изотоническом ацетате K^+ .

На рис. 1, А приведены результаты, показывающие содержание и скорость выхода ионов K^+ из МХ печени активных, пробуждающихся и спящих сусликов. Скорость выхода K^+ значительно снижена в период спячки и резко возрастает при переходе животного из состояния спячки в активное состояние. Скорость выхода ионов K^+ из МХ активных сусликов близка к скорости выхода K^+ из МХ печени крысы, которая зависит от редокс-состояния пиридиновых нуклеотидов и в целом отражает проницаемость МХ-мембраны для ионов K^+ [1, 12]. Ингибирование дыхания на участке от дегидрогеназ до цитохромов (см. таблицу), по-видимому, влияет на снижение скорости выхода K^+ из МХ при действии ДНФ (см. рис. 1). В период пробуждения наблюдается активация K^+ -транспортной системы, результатом которой является увеличение содержания K^+ в МХ. Дыхание этих МХ имеет высокую скорость. Вероятно, повышенный вход K^+ , который приводит

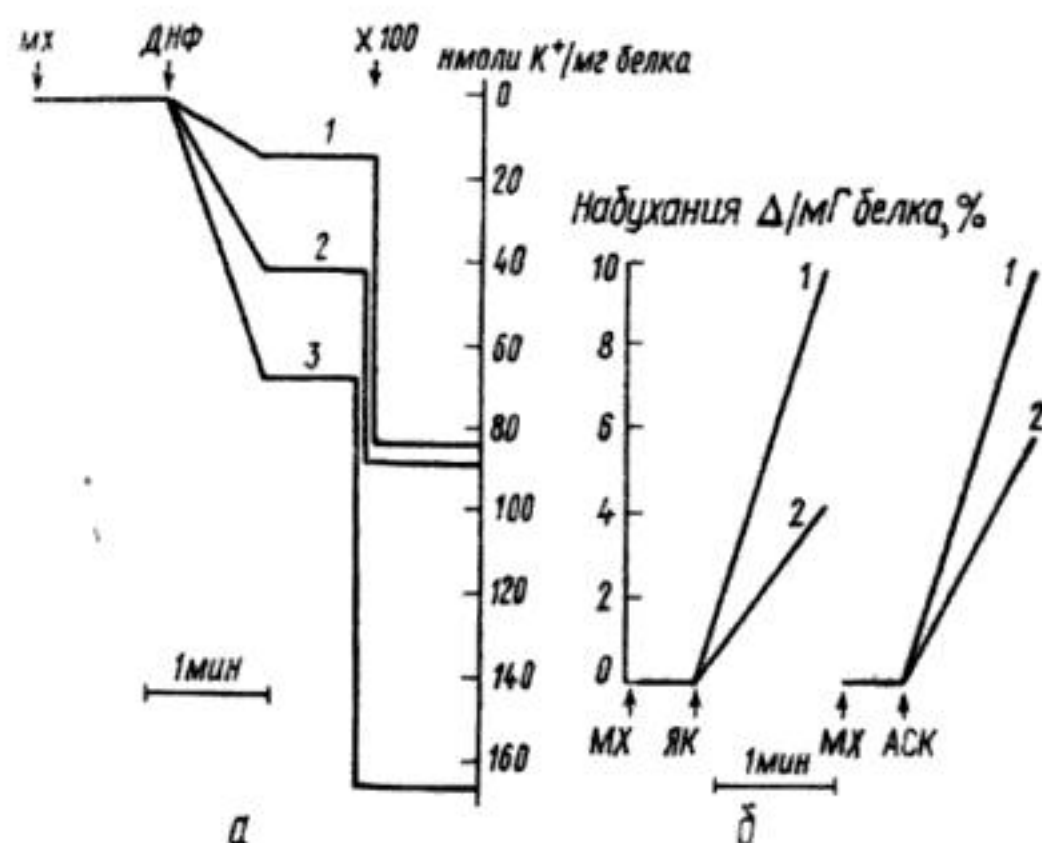


Рисунок. Изменения системы транспорта K^+ в МХ при разных физиологических состояниях суслика.

Изменение содержания и скорости выхода ионов K^+ из МХ при спячке (1), активности (2) и пробуждении (3). Среда: сахароза — 300 мМ, трис — 10 мМ, рН 7,5; добавки: ДНФ — 100 мкМ, тритон X-100 — 1% (А); изменение скорости набухания МХ печени активных (1) и спящих (2) сусликов. Среда: K^+ -ацетат — 150 мМ, трис — 10 мМ, рН 7,5, ротенон — 1 мкМ; добавки: сукцинат — 4 мМ или аскорбат — 4 мМ, ТМФД — 200 мкМ (Б).

к увеличению содержания K^+ в МХ этого периода, отражает увеличение скорости аккумуляции и окисления субстратов дыхания.

МХ печени активных и спящих сусликов не поглощают K^+ при инкубации в изотоническом ацетате K^+ , если отсутствует субстрат дыхания. Набухание МХ индуцировалось внесением в среду инкубации янтарной кислоты или аскорбата в присутствии ТМФД (см. рис. 1, Б). Скорость набухания МХ печени спящих сусликов значительно ниже, независимо от субстрата дыхания. Данные таблицы показывают, что скорость дыхания МХ спящих сусликов на аскорбате намного превышает таковую на янтарной кислоте. Отсюда следует, что набухание МХ в данных условиях инкубации лимитируется не скоростью сопряженного дыхания, а проницаемостью МХ-мембраны для ионов K^+ .

Итак, методически разные подходы к оценке проницаемости МХ-мембраны для ионов K^+ приводят к результатам, показывающим, что в период спячки проницаемость существенно снижается. Мы предполагаем, что проводимость МХ для ионов K^+ определяется наличием в МХ-мембране специфического белка, свойством которого является способность индуцировать транспорт K^+ на бислойной липидной мембране [2]. Количественное определение белка, выделенного из гомогената печени суслика, показало, что белок практически отсутствует в период спячки, в то время как у активных животных его количество и специфическая активность — транспорт K^+ через искусственную мембрану — аналогичны данным, полученным для белка из МХ сердца быка [2].

Таким образом, ингибирование дыхания и проницаемости МХ-мембраны является адаптационными изменениями МХ, направленными на минимальную энергизацию при сохранении структурной целостности МХ. Эти изменения легко обращаются при переходе из одного физиологического состояния в другое, поскольку связаны с регуляцией дыхательной цепи субстратами и метаболитами, изменения которых, по-видимому, вызывают смену этих состояний.

1. Кудзина Л. Ю., Юрков И. С., Полтева Н. А. и др. Влияние редокс-состояния дыхательной цепи на проницаемость мембраны митохондрий для ионов K^+ . — Биохимия, 1979, 44, № 1, с. 154—159.
2. Миронова Г. Д., Федотчева Н. И., Макарова П. Р. и др. Белок из митохондрий сердца быка, индуцирующий канальную калиевую проводимость бислойных липидных мембран. — Биофизика, 1981, 26, № 12, с. 451—457.
3. Aloia R. C. The role of membrane fatty acids in mammalian hibernation. — Fed. Proc., 1980, 39, N 12, p. 2974—2979.
4. Chaffee R. R. J., Hoch F. L., Lymon C. P. Mitochondrial oxidative enzymes and phosphorylation in cold exposure and hibernation. — Amer. J. Physiol., 1961, 201, N 1, p. 29—32.
5. Horowitz B. A., Nelson L. Effect of temperature on mitochondrial respiration in hibernation and non-hibernation. — Comp. Biochem. and Physiol., 1968, 24, N 3, p. 385—394.
6. Kondrashova M. N., Grigorenko E. V., Guzar I. B., Okon E. B. Hyperactive metabolic state of mitochondria under stress. — In: 2-nd Eur. bioenerg. conf. Lyon, 1982, p. 589—590.
7. Lerner E., Shug A., Elson Ch., Shrago E. Reversible inhibition of adenine nucleotide translocation by long chain fatty acyl Coenzyme A esters in liver mitochondria of diabetic and hibernating animals. — J. Biol. Chem., 1972, 247, N 5, p. 1513—1519.
8. Plather W. S., Steffen D. G., Tempel G., Musacchia X. I. Mitochondrial membrane fatty acids of liver and heart of the euthermic and hibernating ground squirrel. — Comp. Biochem. and Physiol. 1976, 53, p. 279—283.
9. Willis J. S. Potassium and sodium content of tissues during hibernation. — Science, 1964, 146, p. 546—547.
10. Willis J. S., Zeidler R. B., Hohla D. H., Forster R. F. K-transport and K-retention in cultured cells from kidney cortex of hibernating and nonhibernating mammals. — Cryobiology, 1975, 12, N 6, p. 555—560.
11. Wojtczak L., Boguka K., Sarzala M. G., Laluska H. Effect of fatty acids on energy metabolism and the transport of adenine nucleotides in mitochondria and other cellular structures. — FEBS Sump., 1969, 17, p. 79—92.

12. Yung D. W., Brierly G. P. The redox state of pyridine nucleotides controls permeability of uncoupled mitochondria to K^+ . — *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1982, **106**, N 4, 1372—1377.
13. Zeidler R. B., Willis J. S. Cultured cells from renal cortex of hibernators and non-hibernators. — *BBA*, 1976, **436**, p. 628—651.

Ин-т биол. физики АН СССР, Пущино

Получено 12.05.83

УДК 612.351.11:577.158.8.013—06:591.543.42

В. В. Федуров, В. И. Мироненко

РЕГУЛЯЦИЯ ОБМЕНА НЕОМЫЛЯЕМЫХ ЛИПИДОВ У ЗИМОСПЯЩИХ ЖИВОТНЫХ

Неомыляемые липиды органов млекопитающих состоят из таких биологически важных соединений, как стерины, изопреноидные спирты, убихиноны, сквален и другие углеводороды. Синтез их осуществляется из общих предшественников — моно- и полипренипирофосфатов во всех тканях животных, но наиболее активно в печени [5, 10]. Постоянство концентраций в клетках этих соединений поддерживается путем регуляции активности некоторых ключевых стадий новообразования [10], но наиболее важным звеном является 3-гидрокси-3-метилглутарил-СоА редуктаза (ГМГ-СоА редуктаза), катализирующая образование мевалоновой кислоты [7]. Вместе с тем регуляция биосинтеза этих веществ осуществляется и на других участках полиферментной системы [10]. Ведущим механизмом, изменяющим активность ключевых ферментов биосинтеза неомыляемых липидов, является регуляция по типу обратной связи. При повышении уровня стерина в тканях наблюдается ингибирование синтеза мевалоната и в последующем конечных продуктов и, наоборот, его понижение, например, с помощью ускорения выведения стерина из организма сопровождается значительной активацией ГМГ-СоА редуктазы [11]. При этом меняются концентрация этого фермента и его удельная активность. Следует заметить, что изменение удельной активности ГМГ-СоА редуктазы наступает гораздо быстрее, чем изменение ее концентрации [7]. Ранее нами было показано, что у суслика малого в период зимней спячки уровень общих стерина, осаждаемых дигитонином, в печени достоверно более высок, чем во время активного состояния, а уровень убихинона остается почти постоянным, незначительно понижаясь [2]. Включение метки из $1\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетата срезами печени сусликов во время спячки понижается и в стерины и в убихинон, тогда как включение $2\text{-}^{14}\text{C}$ -мевалоната уменьшается в стерины и увеличивается в убихинон [4].

В данной статье приведены результаты экспериментов, поставленных с целью определения характера изменений активности полиферментной системы, катализирующей новообразование стерина и убихинона при переходе зимоспящих животных от активного состояния к зимней спячке и наоборот.

Методы исследований. Опыты были поставлены на сусликах малых средней массой около 200 г. Бодрствующих животных содержали в металлических клетках при температуре $15\text{--}20^\circ\text{C}$ на рационе, состоящем из злаков, овощей, сухого сена. Спячку вызывали помещением сусликов в отдельные клетки при температуре около 5°C , пробуждение — извлечением их из холодильника. Исследовали несколько групп животных: активных — в мае—июне и сентябре—октябре; в состоянии спячки — в декабре—январе, часть из них искусственно выводили из спячки и брали их в опыты после достижения ректальной температуры $37\text{--}38^\circ\text{C}$, некоторые из них получали внутривентриально циклогексимид — ингибитор белкового синтеза [3] в дозе 2 мг на одно животное. Животных обезглавливали, извлекали печень и нарезали из нее тонкие срезы и инкубировали их 3 ч в специальных сосудах при 37°C либо

с 1-¹⁴C-ацетатом, либо с 2-¹⁴C-мевалонатом (Франция). Детали экспериментов с мечеными соединениями подробно описаны в наших предыдущих публикациях [3]. Исследовали также температурную зависимость включения метки из 1-¹⁴C-ацетата в стерины и убихинон срезами печени активных и зимоспящих сусликов.

Результаты и их обсуждение. Включение метки из 1-¹⁴C-ацетата срезами печени активных сусликов, исследованных в сентябре—октябре, несколько ниже, чем у животных, исследованных в мае—июне (табл. 1). Возможно, что в природных условиях эти различия более выражены по сравнению с обнаруженными нами. Суслики, исследованные в мае—июне, перезимовали в условиях вивария и не впадали в спячку так как находились при температуре 15—17°C. Вместе с тем не исключено, что уже в подготовительный период, предшествующий спячке, происходят перестройки ферментов, катализирующих биосинтез убихинона и стерина. Это предположение находит в какой-то мере подтверждение в опытах, где срезы печени активных и спящих сусликов инкибировали при различной температуре (табл. 2). Если у активных сусликов включение метки срезами в стерин и убихинон существенно ниже при низкой температуре инкубации, чем при 37°C, то у сусликов в состоянии спячки эти различия менее

Таблица 1. Включение метки из 1-¹⁴C-ацетата в стерин и убихинон срезами печени весенне-летних и осенних бодрствующих сусликов ($M \pm m$)

№ п/п	Группа животных	Удельная радиоактивность ¹	
		стерина	убихинона
1	Весенне-летние	65,2±18,0	20,3±3,1
2	Осенние	54,8±18,4	16,8±3,1

Примечание. Здесь и в табл. 2 количество исследованных животных четыре, удельная радиоактивность выражена в 10⁻³ имп/мин.²

Таблица 2. Включение метки из 1-¹⁴C-ацетата в убихинон и стерин срезами печени бодрствующих и зимоспящих сусликов (по 4 в каждом опыте) при температуре 37°C и 15°C ($M \pm m$)

Состояние животного	Т, инкубации срезов	Удельная радиоактивность	
		стерина	убихинона
Активное	37	54,8±18,8	16,8±3,1
	15	20,3±7,8 $p < 0,05$	8,1±4,5 $p < 0,05$
Гибернация	57	5,8±3,7	13,4±4,4
	15	3,2±2,9 $p > 0,05$	6,1±3,3 $p < 0,05$

выражены. В этом плане интересны также исследования, проведенные на сусликах после их искусственного пробуждения и предварительного введения им циклогексимида. Из табл. 3 видно, что пробуждение животных сопровождается активацией включения метки из обоих меченых предшественников. Введение ингибитора биосинтеза белка подавляет эту активацию включения метки в стерин и менее выражено в убихинон. Эти данные можно интерпретировать в том смысле, что у зимоспящих животных во время пробуждения от спячки имеет место активация ферментов, катализирующих биосинтез несомыляемых липидов, в основном путем их ускоренного новообразования. Наряду с этим, по-видимому, имеет место также увеличение их удельной активности. Известно, что скармливание животным жиров с большим количеством ненасыщенных жирных кислот и стерина приводит к изменению удельной активности ГМГ-СоА редуктазы и ее термодинамических характе-

Таблица 3. Влияние циклогексимида на активацию биосинтеза стерина и убихинона в печени сусликов при пробуждении их от спячки ($M \pm m$)

Метка	Циклогексимида	Удельная активность	
		стерина	убихинона
1- ¹⁴ C-ацетат	—	49,35±18,96	23,32±9,35
	+	15,40±12,20	15,10±7,74
		$p < 0,05$	$p > 0,05$
2- ¹⁴ C-мевалонат	—	93,00±26,54	53,90±27,17
	+	40,90±6,18	87,00±9,89
		$p < 0,05$	$p > 0,05$

ристик [8, 9]. С другой стороны, у зимоспящих животных во время спячки в тканях обнаружено повышение уровня стерина и ненасыщенных жирных кислот [2], что может отражаться на активности исследуемой в данной работе полиферментной системы. Вместе с тем проведенный нами ингибиторный анализ показал, что уменьшение скорости синтеза ферментов, катализирующих новообразование стерина, является ведущим механизмом.

1. Галкин А. П. Об особенности ингибирования биосинтеза белка циклогексимидом и применение этого антибиотика при изучении роли белкового анаболизма в регуляции функциональной активности генома у эукариот. — Молекуляр. биология, 1976, вып. 12, с. 44—59.
2. Федуров В. В. Включение 1-¹⁴C-ацетата в убихинон и стерин срезми печени зимоспящих, пробуждающихся и активных сусликов. — Журн. эволюц. биохимии и физиологии, 1976, вып. 14, с. 192—193.
3. Федуров В. В. Регуляция обмена убихинона: исследование в регенирирующей печени. — Вопр. мед. химии, 1978, вып. 25, с. 232—240.
4. Федуров В. В. Регуляция обмена убихинона у животных. — Молекуляр. биология, 1980, вып. 25, с. 17—28.
5. Beytia E. D., Porter J. W. Biochemistry of polyisoprenoid biosynthesis. — Annu. Rev. Biochem., 1976, 45, p. 113—142.
6. Brown M. S., Goldstein J. L. Multivalent feedback regulation of HMG-CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth. — J. Lipid Res., 1980, 21, p. 505—517.
7. Brown W. E., Rodwell V. W. Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (EC 1.1.1.34). — Exp. Suppl., 1980, 36, p. 234—272.
8. Mitropoulos K. A., Venkatesan S. The influence of cholesterol on the activity on the isothermic kinetics and on the temperatureinduced kinetic of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. — Biochim. et biophys. acta, 1977, 489, p. 126—142.
9. Mitropoulos K. A., Venkatesan S., Balasubramaniam S. On the mechanism of regulation of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and of acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase by dietary fat. — Ibid., 1980, 619, p. 247—257.
10. Schroepfer G. V. Sterol biosynthesis. — Annu. Rev. Biochem., 1981, 50, p. 585—626.
11. Siperstein M. D., Fagan V. M. Studies on the feed-back regulation of cholesterol synthesis. — Adv. Enzymol. Regul., 1964, 2, 249—264.

Киев. мед. ин-т им. А. А. Богомольца

Получено 20.06.83

УДК 612.80.015.612.58

Э. З. Эмирбеков, Р. А. Абдуллаев,
Н. К. Кличханов

СОДЕРЖАНИЕ АМИНОКИСЛОТ-НЕЙРОМЕДИАТОРОВ В МОЗГУ ПРИ ГЛУБОКОЙ ГИПОТЕРМИИ

Охлаждение теплокровного организма сопровождается значительным снижением физиологических и биохимических процессов [2—4, 6, 8]. Ткань мозга особенно чувствительна к понижению температуры тела [20]. В нашей лаборатории получены многочисленные факты, раскрывающие механизмы температурной регуляции азотно-белкового обмена

мозга при низких температурах тела [10]. Установлено, что при охлаждении гомойотермного животного до состояния холодового «наркоза» ($20-18^{\circ}\text{C}$) в мозгу наряду с патологическими нарушениями имеют место и компенсаторные изменения [1]. Адаптивная устойчивость мозга охлажденного организма в значительной степени связана с поддержанием синаптической функции. Наряду с синаптической функцией медиаторные аминокислоты имеют и важную метаболическую функцию [17].

Цель настоящего исследования — определение количества нейромедиаторных аминокислот — глутаминовой, аспарагиновой, ГАМК глицина, таурина в тканях мозга при принудительном глубоком охлаждении теплокровного организма.

Материалы и методы. Опыты проводили на лабораторных белых крысах-самцах массой 150—200 г. Гипотермию животных вызывали, погружая их в холодовые камеры, в которых циркулировала вода с температурой $4-5^{\circ}\text{C}$. Ректальную температуру снижали равномерно и медленно, так что за 50—60 мин она достигала $20-19^{\circ}\text{C}$. Состояние глубокой гипотермии у крыс поддерживали в течение 1—2 часа.

Контрольных и подопытных животных в нужный момент замораживали жидким азотом. После извлечения большие полушария мозга, мозжечок, средний и продолговатый мозг растирали в порошок в жидком азоте. Безбелковый экстракт тканей мозга получали депротеинизацией 1%-ной пикриновой кислотой с последующим удалением ее на колонке со смолой Дауэкс 2×8 (200/400 меш.). Содержание свободных аминокислот в образце определяли с помощью автоматического анализатора аминокислот ААА-881 (ЧССР).

Результаты и их обсуждение. Как видно из таблицы, при охлаждении крыс до температуры 20°C в больших полушариях мозга содержание глутамата повышается, а аспартата и ГАМК, метаболизм которых тесно связан с глутаминовой кислотой, уменьшается. Подобные сдвиги в содержании указанных аминокислот характерны для мозжечка, среднего и продолговатого мозга. Однако в среднем и продолговатом мозгу при этом, в отличие от других отделов мозга, концентрация глутамата и ГАМК достоверным изменениям не подвергается.

При пролонгировании состояния глубокой гипотермии (20°C) в течение одного и двух часов, когда крысы находятся в состоянии разлитого торможения, в динамике содержания нейротрансмиттерных аминокислот как возбуждающих — глутамата, аспартата, так и тормозящих — глицина, ГАМК и таурина наблюдается определенная закономерность. Так, при поддержании гипотермии в течение двух часов отношение суммы глутамата и аспартата к сумме глицина, ГАМК и таурина снижается за счет повышения содержания последних. Высокая концентрация указанных аминокислот в мозгу при гипотермии, обнаруженная в наших опытах, совпадает с данными о том, что при низкой температуре синапсомы мозга аккумулируют нейротрансмиттеры [14] и у охлажденных крыс обнаруживается повышенная поглощаемость этих аминокислот срезами мозга [12]. Охлаждение организма до 20°C не нарушает мембранно-транспортные механизмы в мозгу [15].

Известно, что в присутствии аспартата медиаторная функция глутамата сильно потенцируется и в некоторых синапсах, может быть, медиатором является не глутамат, а смесь глутамата и аспартата [5, 18, 19]. Глицинэргические нейроны у теплокровных животных полностью или главным образом сосредоточены в продолговатом и среднем мозгу [13, 16]. Этим, видимо, объясняется различная направленность и степень выраженности обнаруженных нами сдвигов в содержании индивидуальных аминокислот в отделах мозга.

Результаты нашей работы вместе с предыдущими исследованиями [7, 9] свидетельствуют о влиянии низкой температуры на обменные процессы в ткани мозга, в результате чего устанавливаются новые взаимоотношения между медиаторными аминокислотами в соответствии

**Содержание аминокислот в различных отделах головного мозга крыс
(мкМ на 1 г ткани) при гипотермии 20° С**

Аминокислота	Контроль		Гипотермия		Пролонгированная гипотермия			
					1 ч		2 ч	
	М	±m	М	±m	М	±m	М	±m
<i>Большие полушария</i>								
Глутамат	9,14	0,39	10,67	0,44*	9,41	0,39	7,23	0,64*
Аспартат	3,21	0,25	2,23	0,35*	2,17	0,19	3,28	0,14
ГАМК	2,54	0,17	1,82	0,14*	2,24	0,13	2,94	0,16*
Глицин	0,80	0,05	1,13	0,07*	1,17	0,07*	0,87	0,05
Таурин	4,21	0,20	5,10	0,21	5,50	0,20	5,48	0,21
<i>Мозжечок</i>								
Глутамат	8,14	0,30	9,41	0,40*	8,43	0,39	6,73	0,32
Аспартат	2,97	0,16	2,03	0,19*	2,13	0,14*	2,87	0,17
ГАМК	2,14	0,17	1,68	0,15*	1,87	0,16	1,99	0,15
Глицин	1,03	0,07	1,07	0,06	1,00	0,07	1,01	0,04
Таурин	3,87	0,18	3,92	0,20	3,75	0,17	3,86	0,20
<i>Средний мозг</i>								
Глутамат	7,65	0,31	7,92	0,59	8,01	0,30	8,71	0,40*
Аспартат	2,80	0,11	2,01	0,16*	1,97	0,10*	2,50	0,12
ГАМК	1,87	0,13	1,67	0,12	1,67	0,14	2,21	0,13*
Глицин	1,12	0,10	1,07	0,12	1,15	0,09	1,61	0,10*
Таурин	4,45	0,22	4,33	0,22	5,21	0,24	5,76	0,23
<i>Продолговатый мозг</i>								
Глутамат	7,23	0,27	7,04	0,18	7,47	0,21	8,29	0,32*
Аспартат	2,54	0,10	2,04	0,06*	1,86	0,07*	2,50	0,10
ГАМК	1,91	0,11	1,72	0,12	1,87	0,16	2,45	0,12*
Глицин	1,27	0,08	1,14	0,10	1,07	0,09	1,47	0,07*
Таурин	3,75	0,16	3,66	0,17	3,72	0,18	3,82	0,19

* Достоверные различия, $p < 0,05$.

с их индивидуальными функциями. Анализ приведенных данных по динамике содержания аминокислот — нейромедиаторов и активности ферментов, участвующих в их метаболизме при различных гипотермических состояниях [10, 11], позволяет заключить, что механизм молекулярных процессов направлен на обеспечение тканей охлажденного мозга соответствующей концентрацией нейромедиаторов.

1. Абдуллаев Р. А. Свободные аминокислоты и аминокислотный состав белков мозга при гипотермии и постгипотермическом периоде: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Ереван, 1982. — 29 с.
2. Майстрах Е. В. — Гипотермия и набиоз. — М.; Л.: Наука, 1964. — 327 с.
3. Неговский В. А. Оживление организма и искусственная гипотермия. — М.: Медгиз, 1960. — 304 с.
4. Осташков К. В. Современные проблемы гипотермии. — Физиол. журн., 1979, 25, № 5, с. 585—592.
5. Сахаров Д. А. Медиаторы. — В кн.: Общая физиология нервной системы. Руководство по физиологии. Л.: Наука, 1979, с. 218—277.
6. Эмирбеков Э. З. Азотистый метаболизм мозга при гипотермии и зимней спячке. — Махачкала: Дагучпедгиз, 1969. — 137 с.
7. Эмирбеков Э. З., Ибрагимов И. И., Абдуллаев Р. А. Распределение биогенных аминов в головном мозге крыс при гипотермии. — Укр. биохим. журн., 1978, 50, № 3, с. 296—298.
8. Эмирбеков Э. З. Функциональная нейрхимия. — Махачкала, Изд-во Даг. ун-та, 1980. — 128 с.
9. Эмирбеков Э. З., Абдуллаев Р. А., Ибрагимов И. И. Содержание биогенных аминов в головном мозге при искусственном и естественном охлаждении животных. — Укр. биохим. журн., 1980, 52, № 4, с. 416—422.
10. Эмирбеков Э. З. Механизм пластичности азотистого метаболизма мозга при низких температурах тела. — В кн.: Механизмы пластичности мозга / Под общ. ред.

- О. С. Адрианова, Э. З. Эмирбекова. Махачкала, изд. Даг. ун-та, 1982, с. 187—189.
11. Эмирбеков Э. З., Мейланов И. С. Температурная зависимость активности глутаминазы из мозга крысы при гипотермии. — Биохимия, 1982, 47, № 9, с. 1466—1470.
 12. Эмирбеков Э. З. Влияние гипотермии на поглощение аминокислот срезами мозга. — Нейрохимия, 1982, 1, № 3, с. 254—260.
 13. Экклс Дж. Тормозные пути центральной нервной системы. — М., Мир, 1971. — 168 с.
 14. Baker B. V., Vilhardt H., Hope D. B. Cold-induced release of hormone and proteins for nerve endings isolated from Bovine neural lobes. — J. Neurochem., 1975, 24, p. 1091—1093.
 15. Emirbekov E. Z., Sershen M., Laitha A. Lack of hypothermia of cerebral amino acid uptake in vivo. — Brain Res., 1977, 125, p. 187—191.
 16. Krnjevic K. Chemical nature of synaptic transmission in vertebrates. — Physiol. Revs., 1974, 54, p. 418—540.
 17. Roberts E., Hammerslag R. Amino acid transmitters. — In: Basic neurochemistry / Eds. G. J. Siegel, R. W. Alberts, R. Kartzma, R. W. Agrnoff. Boston: Brown & Co., 1976, p. 218—245.
 18. Shank R. P., Freeman A. R., McBride M. J., Aprison M. N. Glutamate and aspartate as mediators of neuromuscular excitation in the lobster. — Comp. Biochem. and Physiol., 1975, 50, p. 127—131.
 19. Spencer H. J. Antagonism of cortical excitation of striatal neurons by glutamic acid diethyl ester: evidence for glutamic acid as an excitatory transmitter in the rat striatum. — Brain Res., 1976, 102, p. 91—101.
 20. Swan H. Thermoregulation and bioenergetics: patterns for vertebrate survival. — New York: Amer. elsevier, 1971. — 325 p.

Даг. ун-т им. В. И. Ленина, Махачкала

Получено 12.05.83

КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

УДК 57.043.615.387:547.963.32

А. Н. Гольцев, А. А. Цуцаева

ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ «ВТОРИЧНОЙ БОЛЕЗНИ» У РЕЦИПИЕНТОВ С ТРАНСПЛАНТАТОМ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОГО КОСТНОГО МОЗГА

Основным препятствием трансплантации реципиентам чужеродной гемопоэтической ткани является развитие «вторичной болезни», в патогенезе которой важную роль играет реакция дифференцирующихся из клеток-предшественников *T*-лимфоцитов против антигенов хозяина [10, 13, 17]. В этой связи начало развития и степень выраженности синдрома во многом определяются активностью процесса образования пула функционально-активных *T*-лимфоцитов [17].

Известно, что под влиянием криоконсервации обратимо ингибируются пролиферативная активность стволовых клеток, скорость их дифференцировки, образования зрелых форм миелоидного ряда, наряду с незначительным изменением процессов дифференцировки клеток эритроидного ряда [3, 8, 14]. В организме облученных реципиентов, защищенных криоконсервированным костным мозгом, отмечается также запаздывание начала развития иммунного ответа на тимус-зависимый антиген, в реализации которого принимают участие *T*-лимфоциты [2, 3]. Не исключено, что указанные особенности дифференцировки и пролиферации криоконсервированных стволовых кроветворных клеток в организме облученных реципиентов могут найти отражение и в особенностях развития реакций трансплантационного иммунитета, и в частности развитии «вторичной болезни».

Учитывая изложенное выше, целью данной работы было изучение динамики и интенсивности развития «вторичной болезни» в организме реципиентов с трансплантатом криоконсервированного полуаллогенного костного мозга.

Материалы и методы исследования. В опытах были использованы мыши линии СВА и гибриды (СВА×С57В1) F_1 8—10 недельного возраста, полученные из питомника лабораторных животных АМН СССР, ст. Столбовая. Костный мозг вымывали из бедренных костей раствором ЦОЛИПК-3, взвесь миелокариоцитов готовили путем ресуспендирования ткани через иглы уменьшающегося размера с последующей фильтрацией на капроновых фильтрах.

Замораживание костного мозга проводили под защитой криопротектора полиэтиленоксида с молекулярной массой 400 (ПЭО-400) 15%-ной концентрации при -196°C по двухэтапной программе [5]. Образцы оттаивали на водяной бане при $+40^{\circ}\text{C}$. Мышей-реципиентов (СВА×С57В1) F_1 обрабатывали перед трансплантацией по ранее описанному методу [3] и вводили внутривенно $3 \cdot 10^7$ ядерных клеток нативного (I группа) или криоконсервированного (II группа) костного мозга мышей линии СВА.

Степень выраженности синдрома оценивали по клиническим признакам (снижение массы тела и время появления диареи), началу гибели и количеству погибших реципиентов в течение 100 дней наблюдения. В контрольной группе были мыши с трансплантатом сингенного

нативного костного мозга. Каждая из трех групп была разделена на две подгруппы, одну из которых оставляли для определения 100-дневной выживаемости. Из лимфоузлов мышей второй подгруппы готовили взвесь клеток, которую вводили ($3,5 \cdot 10^6$) сублетально облученным «вторичным реципиентам» (CBA $\times$ C57Bl) F_1 с целью изучения динамики накопления РТПХ-активных клеток в организме реципиентов опытных групп. О функциональной активности клеток лимфоузлов судили по их способности ингибировать процессы эндогенного колониеобразования. Цифровой материал обработан статистически по методу Стьюдента [1].

Частота случаев диареи и масса тела летально облученных мышей (CBA $\times$ C57Bl) F_1 в различные сроки после трансплантации костного мозга

Время после трансплантации костного мозга, недели	Характер трансплантируемого костного мозга					
	нативный (CBA)		криоконсервированный (CBA)		сингенный	
	Масса тела, г	Диарея*	Масса тела, г	Диарея	Масса тела, г	Диарея
3	23,3 $\pm$ 0,6	0	24,1 $\pm$ 0,4	0	24,3 $\pm$ 0,4	0
4	22,4 $\pm$ 0,5	17,7	24,1 $\pm$ 0,6	0	23,8 $\pm$ 0,3	0
5	21,3 $\pm$ 0,7	55,2	24,0 $\pm$ 0,5	21,8	23,7 $\pm$ 0,7	0
6	19,4 $\pm$ 0,4	83,3	23,3 $\pm$ 0,6	46,9	23,5 $\pm$ 0,5	0
7	17,7 $\pm$ 0,4	100	21,5 $\pm$ 0,6	78,3	23,2 $\pm$ 0,2	0
8	16,3 $\pm$ 0,7	100	20,1 $\pm$ 0,3	100	22,6 $\pm$ 0,5	0
9	15,8 $\pm$ 0,6	100	17,8 $\pm$ 0,8	100	22,4 $\pm$ 0,7	0
10	15,9 $\pm$ 0,7	100	17,2 $\pm$ 0,5	100	23,2 $\pm$ 0,3	0
12	17,8 $\pm$ 0,8	51,8	19,4 $\pm$ 0,5	47,1	23,3 $\pm$ 0,3	0
14	20,3 $\pm$ 0,7	16,6	21,1 $\pm$ 0,6	18,7	22,8 $\pm$ 0,4	0

* Процент животных с диареей общего числа выживших к данному сроку.

Результаты. Как видно из таблицы и рис. 1, снижение массы тела реципиентов всех трех групп в постлучевом периоде отмечалось в течение одной недели, после чего наблюдалось постепенное его восстановление. У мышей контрольной группы начиная с 15-х суток и в дальнейшем в течение всего периода наблюдения существенных изменений массы тела не отмечалось. У реципиентов с трансплантатом нативного костного мозга (группа I) снижение массы тела, в результате развития синдрома, начиналось с 25-х суток и продолжалось до 65-го—70-го дня наблюдения. В группе животных с трансплантатом криоконсервированного костного мозга (группа II) масса тела начинала снижаться только с 35-х суток, достигая минимальных значений к 70-му дню, причем в этом интервале времени масса тела реципиентов II группы была достоверно больше, чем реципиентов I группы. С 70-х суток масса тела выживших к этому сроку животных опытных групп увеличивалась и к 100 дню она приближалась к исходным значениям.

Случаи диареи у мышей I группы начинали определяться с четвертой недели после трансплантации (см. таблицу). В дальнейшем число мышей с диареей увеличивалось, и с 7-й по 10-ю неделю диарея наблюдалась у всех мышей данной группы. Во II группе диареи начинали отмечаться только в конце 5-й недели, причем на протяжении

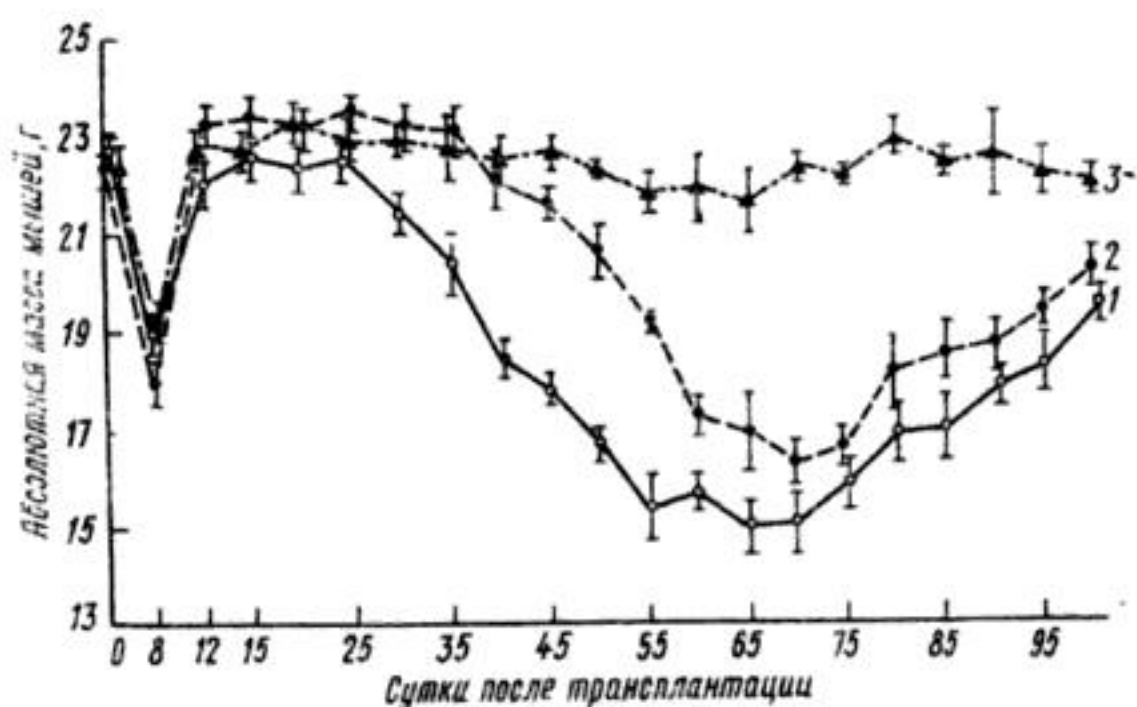


Рис. 1. Изменение массы тела летально облученных мышей после трансплантации полуаллогенного нативного (1), полуаллогенного криоконсервированного (2), сингенного нативного (3) костного мозга.

5-, 6-й недель частота случаев диареи была в два раза меньше, чем в I группе.

Данные о динамике гибели реципиентов, с трансплантатом костного мозга, свидетельствуют о том, что в группе мышей с трансплантатом сингенного костного мозга за весь период наблюдения погибло около 10% животных (рис. 2). Смертность животных в I группе в период с 20-х по 40-е сутки была также небольшая и составляла $12,2 \pm 2,9\%$. Максимальное число мышей в этой группе (48,5%) с признаками «вторичной болезни» погибло между 40- и 70-ми сутками, а к

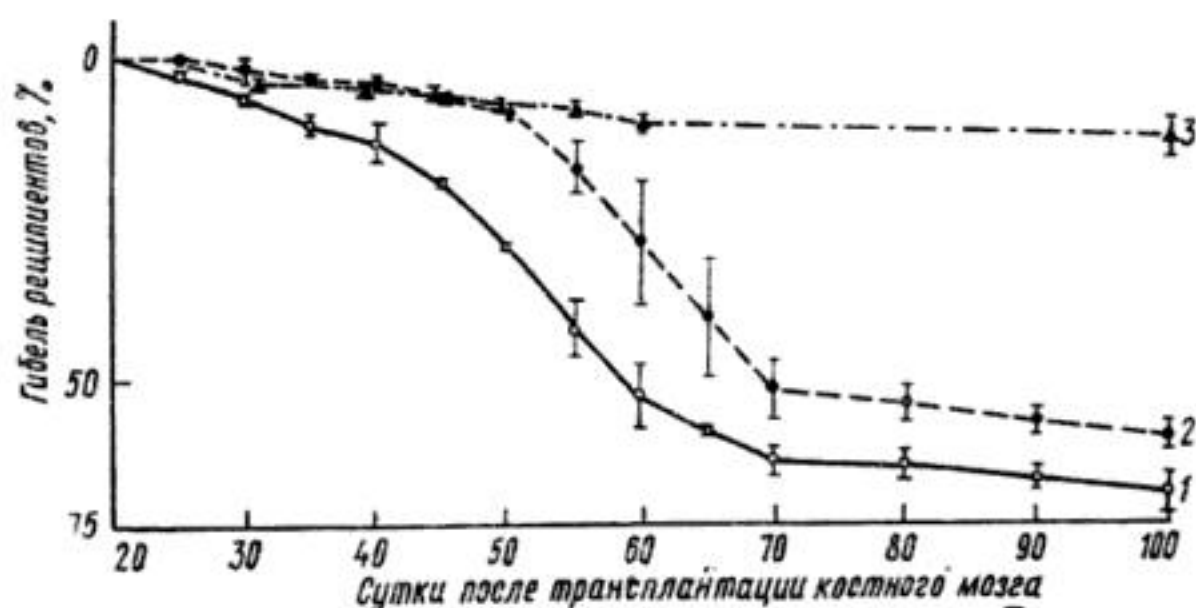


Рис. 2. Гибель летально облученных реципиентов после трансплантации полуаллогенного нативного (1) и полуаллогенного криоконсервированного (2), сингенного нативного (3) костного мозга. Количество мышей, выживших к 20-м суткам, принято за 100%.

100-му дню наблюдения количество погибших реципиентов составило $64,7 \pm 3,7\%$.

Во II группе начало гибели мышей, обусловленное развитием «вторичной болезни», отмечалось в более поздние сроки. Только к 55-м суткам процент погибших животных становился примерно таким же, как на 40-е сутки в I группе ($15,8 \pm 3,9\% : 12,2 \pm 2,9\%$). К 100-му дню в данной группе погибло $54,3 \pm 2,8\%$ животных, т. е. значительно меньше, чем к этому же сроку в I группе ($54,3 \pm 2,8 : 64,7 \pm 3,7$; $p < 0,05$).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что «вторичная болезнь» у животных с трансплантатом криоконсервированного костного мозга развивается в более поздние сроки и протекает менее активно, чем с нативным миелотрансплантатом. С целью выяснения возможных причин более позднего начала развития «вторичной болезни» у реципиентов с трансплантатом криоконсервированного костного мозга было проведено изучение динамики накопления РТПХ-активных клеток в лимфоузлах мышей обеих опытных групп.

При изучении динамики накопления РТПХ-активных клеток в лимфоузлах мышей с трансплантатом полуаллогенного костного мозга было установлено (рис. 3), что у реципиентов I группы клетки, способные ингибировать рост эндогенных гемопоэтических колоний в селезенках сублетально облученных мышей, появлялись с 29-х суток (ингибция $1,7 \pm 24,6\%$ колоний).

Максимальная ингибция эндогенного колониеобразования наблюдалась при введении клеток лимфоузлов, полученных на 48-е сутки после миелотрансфузии, введение этих клеток вызывало ингибцию $82,7 \pm 4,4\%$ колоний.

В лимфоузлах реципиентов II опытной группы клетки, обладающие способностью ингибировать рост эндогенных колоний, появлялись в более поздние сроки. Лишь на $10,2 \pm 0,9\%$ снижалось количество эндогенных колоний при введении клеток лимфоузлов, полученных на 36-е сутки. С увеличением срока после трансплантации костного мозга ингибирующая активность клеток лимфоузлов повышалась, достигая максимума к 60-му дню наблюдения. При введении клеток, взятых в этот срок, отмечалась ингибция $70,6 \pm 3,9\%$ колоний, что было зна-

чительно меньше в сравнении с аналогичным показателем, полученным при введении клеток лимфоузлов реципиентов I группы ($82,7 \pm 4,4 : 70,6\% \pm 3,9\%$, $p < 0,05$).

Обсуждение полученных результатов. Известно, что в организме облученных реципиентов, защищенных костным мозгом, стволовые кроветворные клетки дифференцируются в миелоидный и лимфоидный росток кроветворения [2, 6, 8, 9, 12, 20]. Восстановление миелоидного и эритроидного ростка кроветворения можно констатировать по степени пролиферативной активности клеточных элементов в гемопоэтичес-

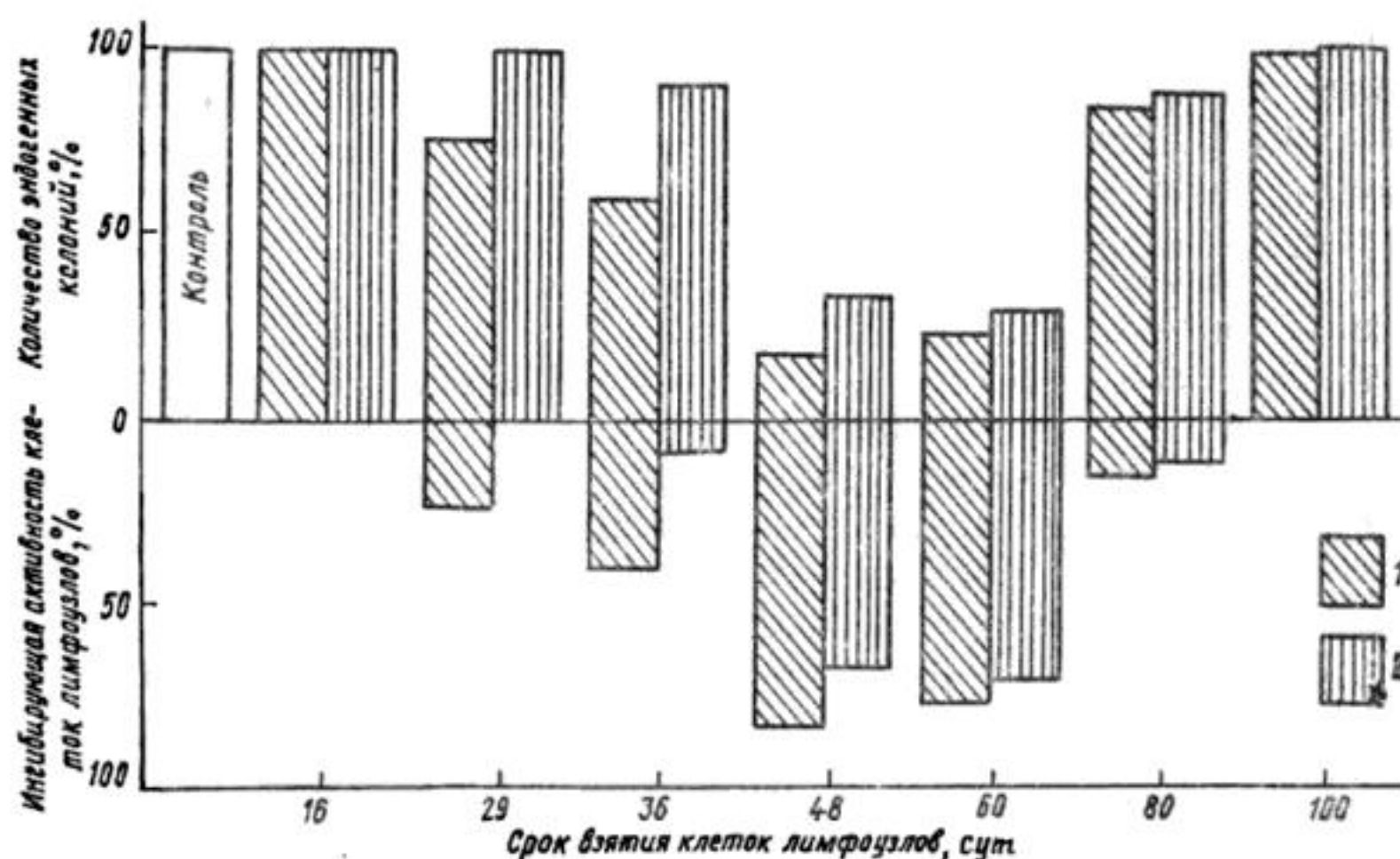


Рис. 3. Ингибция роста эндогенных колоний в селезенке «вторичных» субллетально облученных реципиентов после введения клеток лимфоузлов «первичных» реципиентов. Контроль — количество эндогенных колоний у реципиентов без введения клеток лимфоузлов. Сутки после трансплантации нативного (1), криоконсервированного (2) костного мозга.

ких колониях, формируемых предшественниками эритроидно-гранулоцитарного ряда в селезенке и костном мозге летально облученных реципиентов [4, 7, 19].

В то же время хорошим тестом для изучения динамики восстановления T -системы могут служить иммунные реакции, реализуемые этими клетками. К таким реакциям относится реакция «трансплантат против хозяина» — РТПХ, в инициации которой в первую очередь принимают участие T -лимфоциты [13, 15—17] и которая, как принято считать, играет основную роль в патогенезе «вторичной болезни» [10, 13]. В этой связи степень выраженности синдрома во многом может быть обусловлена активностью течения процесса формирования пула T -лимфоцитов и степенью их функциональной зрелости.

Результаты проведенных нами экспериментов по пересадке костного мозга в полуаллогенной системе свидетельствуют о том, что при трансплантации криоконсервированных миелокариоцитов отмечаются более позднее начало развития и снижение интенсивности «вторичной болезни». Особенности развития синдрома у реципиентов данной группы могут быть обусловлены, по-видимому, несколькими причинами. Прежде всего влиянием самого процесса замораживания—оттаивания на функциональную активность миелокариоцитов. Так, ингибирующее влияние факторов низкотемпературной консервации на пролиферативную активность и скорость дифференцировки стволовых клеток, выражающееся в запаздывании формирования зрелых форм миелоидного ряда [7, 8], может отражаться и на динамике дифференцировки из прекурсоров лимфоидных клеток T -лимфоцитов. Подтверждением данного положения является позднее накопление (и с меньшей функциональ-

ной активностью) в лимфоузлах реципиентов с криоконсервированным миелотрансплантатом РТПХ-активных клеток.

Кроме того, дифференцировка зрелых *T*-лимфоцитов из клеток-предшественников осуществляется, как считают некоторые авторы [13], при наличии «нормального» соотношения клеточных популяций в костном мозге, трансплантируемом облученным реципиентам. В то же время в процессе криоконсервации миелоидной ткани, являющейся весьма гетерогенной клеточной популяцией, может происходить частичная или полная элиминация определенных клеточных типов.

Стронг с соавторами [18], в частности, используя реакцию бласттрансформации для оценки функциональной активности криоконсервированных лимфоидных клеток, наблюдали большую криолабильность *T*-лимфоцитов, чем *B*-лимфоцитов. И хотя содержание *T*-лимфоцитов в костном мозге мышей весьма незначительно, их важная роль в регуляции процесса пролиферации и дифференцировки клеточных популяций миелотрансплантата показана весьма убедительно [8, 11, 15, 16], т. е. снижение содержания *T*-лимфоцитов в костном мозге после криоконсервации может быть также причиной, обуславливающей особенности развития «вторичной болезни».

Таким образом, можно заключить, что при трансплантации летально облученным реципиентам криоконсервированного костного мозга в полуаллогенной системе наблюдается развитие «вторичной болезни», однако степень выраженности синдрома у реципиентов данной группы значительно снижена по сравнению с трансплантацией нативного костного мозга.

1. Ашмарин И. П., Воробьев А. А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. — Л.: Медгиз, 1962. — 180 с.
2. Гольцев А. Н. Сравнительное изучение функциональных свойств деконсервированных и нативных миелокариоцитов в организме облученных реципиентов: Автореф. дис. ... канд. мед: наук: — Киев, 1978: — 24 с.
3. Гольцев А. Н. Влияние трансплантации нативного и деконсервированного костного мозга на содержание бляшкообразующих клеток в селезенке летально облученных реципиентов. — Криобиология и криомедицина, 1978, вып. 4, с. 45—47.
4. Дроздова О. А., Останкова Л. В., Зиновьева В. В., Гольцева А. Н. Восстановление гемопоэза под влиянием трансплантации реконсервированного трупного костного мозга. — В кн.: Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины: Материалы симпозиума. 17—18 окт. 1974 г. Киев: Наук. думка, 1974, с. 107—109.
5. Пушкарь Н. С., Даценко Б. М., Иткин Ю. А., Щелокова А. В. Глубокое охлаждение как метод консервирования и длительного хранения костного мозга. — Клиническая хирургия, 1967, № 12, с. 25—26.
6. Хаитов Р. М. Экспериментальный анализ практически значимых проблем трансплантации кроветворных тканей облученным реципиентам: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — М., 1972. — 38 с.
7. Цуцаева А. А., Микулинский Ю. Е., Гольцев А. Н., Останкова Л. В. Иммунологические свойства деконсервированных миеловариоцитов и влияние некоторых биологически активных веществ на течение репаративных процессов в них. — Криобиология и криомедицина, 1979, вып. 5, с. 57—70.
8. Цуцаева А. А., Гольцев А. Н., Дроздова О. А., Останкова Л. В. Влияние низкотемпературной консервации на пролиферативную активность и топографию расселения донорских и трупных колониеобразующих единиц (КОЕ) в облученном организме. — Цитология и генетика, 1980, 14, № 6, с. 25—30.
9. Чертков И. Л., Фриденштейн А. Я. Клеточные основы кроветворения. — М.: Медицина, 1977. — 272 с.
10. Шевелев А. С. Реакция «Трансплантат против хозяина» и трансплантационная болезнь. — М.: Медицина, 1976. — 215 с.
11. Goodman J., Shinpock S., Basford N. Thymic involvement in control of bone marrow growth. Use of T-cell-depleted hybrid mice. — Exp. Hematol., 1979, 7, N 1, p. 17—26.
12. Kraal G., Geldof A. A., Boden D. T-cell differentiation in lethally irradiated and reconstituted mice. — Cell. Immunol., 1980, 49, N 1, p. 110—119.
13. Ledney G., van Bekkum D. Secondary disease in irradiated mice grafted with allogeneic bone marrow from antilymphocyte serum-treated donors. — J. Nat. Cancer. Inst., 1969, 42, p. 633—641.
14. Liu P., Poon K., Crook L. et al. Hemopoietic activities of cryopreserved murine fresh and postmortem bone marrow cells. — Cryobiology, 1979, 16, N 4, p. 513—516.
15. Raff M. Two distinct population of peripheral lymphocytes in mice distinguishable by immunofluorescence. — Immunology, 1970, 19, p. 637—650.
16. Raff M. T- and B-lymphocytes and immune responses. — Nature, 1973, 242, N 1, p. 19—23.

17. *Shmal M.* Quantitation of donor T-cell reactivity in graftversus-host response. — *Transplantation*, 1975, **19**, N 2, p. 180—182.
18. *Strong D., Factor M., Woody J., Seel K.* In vitro immunologic responsiveness of frozen stored human lymphocytes. — *Cryobiology*, 1974, **11**, N 6, p. 542—543.
19. *Till J. E., McCulloch E. A.* Repair processes in irradiated mouse hematopoietic tissue. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1964, **114**, p. 115—123.
20. *Walles V., Leuchars E. A., Chwalinski S.* On the sparse seeding of bone marrow and thymus in radiation chimeras. — *Transplantation*, 1975, **19**, N 1, p. 2—11.

Ин-т пробл. криобиологии
и криомедицины АН УССР, Харьков

Получено 14.02.8

УДК 57.043:612.35:547.43:615.9

*В. М. Гучок, В. Ф. Козлова, В. Ф. Карташов,
Л. З. Верховская, А. И. Григоращенко, М. М. Гучок*

ФУНКЦИЯ И СТРУКТУРА ПЕЧЕНИ КРОЛИКОВ ПРИ ВВЕДЕНИИ МАЛОЙ ДОЗЫ 1,2-ПРОПАНДИОЛА

Исследованиями, выполненными в Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР и зарубежными авторами, показано, что 1,2-пропандиол (1,2-ПД) является активным криопротектором [9, 10] и малотоксичным веществом [1—3, 11, 14]. На его основе в Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР разработан новый перспективный криоконсервант для эритроцитов.

В литературе нет четких данных о влиянии 1,2-ПД на функцию и структуру печени, не установлены безопасные дозы и концентрации при парентеральном введении вещества в организм. Кроме того, известно, что около 50% 1,2-ПД, введенного парентерально в организм, метаболизируется в печени. Отечественные образцы 1,2-ПД в этом плане вообще не изучены. Изложенное выше и послужило основанием для настоящего изучения влияния малой дозы 1,2-ПД при продолжительном парентеральном введении его в организм.

Методы исследования. В субхронических опытах на 10 кроликах-самцах породы шиншилла массой 2,0—2,7 кг, содержащихся на обычной диете вивария, изучено влияние 1,2-ПД при продолжительном парентеральном введении в организм. Животные были разделены на две равные группы. 1,2-ПД вводили внутривенно ежедневно кроме выходных дней в течение 21 дня в дозе 1/20 ЛД-50 (0,6 г/кг) в 5%-ной концентрации. Доза выбрана с учетом того, что при введении в организм одного литра размороженной эритроцитарной массы, человек будет получать 0,2 г/кг 1,2-ПД в концентрации, не превышающей 1,5%. 1,2-ПД готовился на физиологическом растворе, и контрольной группе кроликов вводили соответствующие объемы этого же раствора.

За время эксперимента животным введено 11,4 г/кг (1,05 ДЛ-50) 1,2-ПД. В ходе эксперимента в динамике (до введения 1,2-ПД, через 7,14 и 21 сутки) определяли общий белок методом рефрактометрии и белковые фракции сыворотки крови — альбумины, глобулины (α_1 , α_2 , β , γ) методом электрофореза на бумаге, рассчитывали альбумино-глобулиновые коэффициенты и коэффициенты ретенции после постановки бромсульфалеиновой (БСФ) пробы по В. Н. Тугариновой и другим [6]. Кроме того, определяли активность некоторых ферментов сыворотки крови — аланинаминотрансферазу (АЛТ) и аспартат-аминотрансферазу (АСТ) по Райтману и Френкелю [13], холинэстеразу (ХЭ) по Хестрину [12] и щелочную фосфатазу (ЩФ) по биотесту фирмы «Лаксма», Брно, ЧССР.

После изучения функционального состояния печени произведено патологоанатомическое вскрытие животных, определены их массы и относительная масса печени, произведена фиксация печени в 10%-ном растворе нейтрального формалина с последующей гистологической

обработкой материала и гистологическим исследованием. Образцы печени заливали в целлоидин-парафин, срезы толщиной 5—7 мм окрашивали гематоксилинэозином, а также альциановым синим и реактивом Шиффа с целью идентификации гликозаминогликанов и гликопротеинов. Полученные экспериментальные данные подвергнуты статистической обработке.

Результаты и их обсуждение. Известно, что одним из важнейших показателей деятельности печени является ее белокобразующая функция. Изучение влияния 1,2-ПД на протеинсинтезирующую функцию пе-

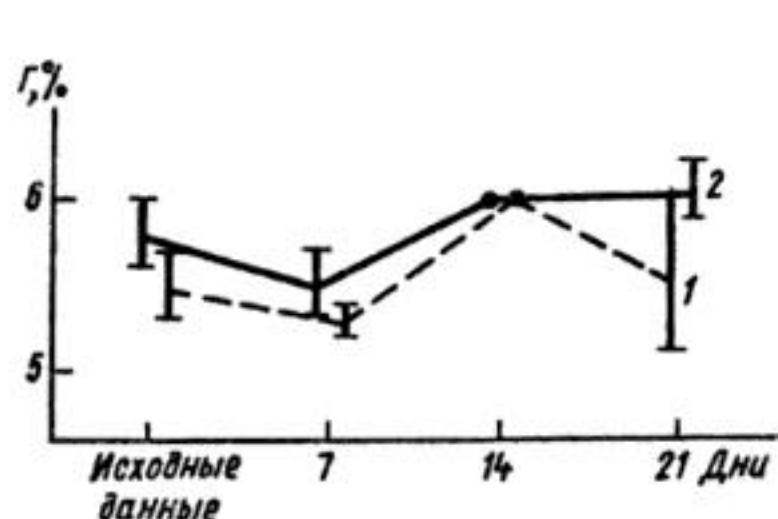


Рис. 1. Содержание общего белка в сыворотке крови кроликов:
1 — опыт, 2 — контроль.

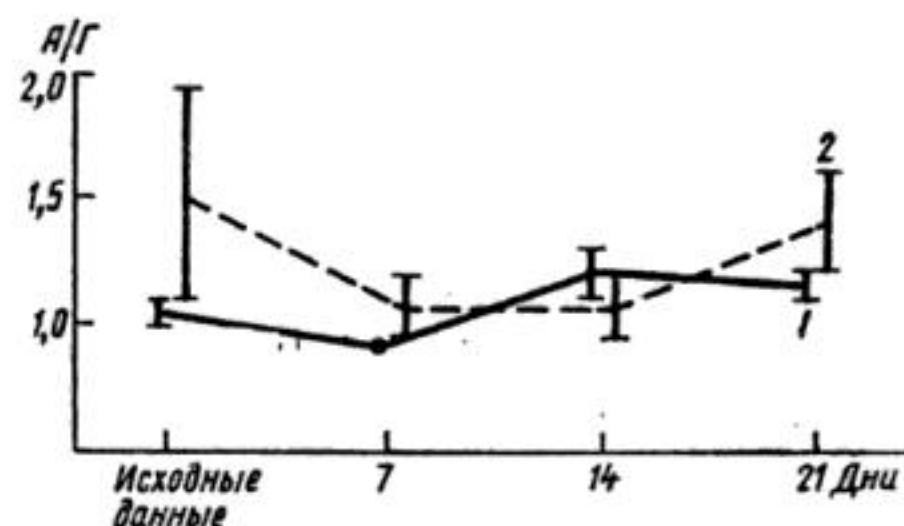


Рис. 2. Альбумино-глобулиновые коэффициенты сыворотки крови кроликов:
1 — опыт, 2 — контроль.

чени позволило установить, что величины содержания общего белка в сыворотке крови у кроликов опытной и контрольной групп через 7, 14 и 21 сутки после начала введения криопротектора колебались в диапазоне $5,29 \pm 0,1$ — $6,06 \pm 0,12$. При этом сравнение по периодам наблюдения показателей общего белка опытной группы с соответствующими показателями контрольной группы не выявило значимых различий (рис. 1). Содержание альбуминов на 7-е сутки снижалось в опытной и контрольной группах животных, не выходя за доверительные границы физиологических колебаний соответственно на 6 и 12% с возвратом к исходным пределам на 14-е сутки, что не позволяет объяснить изменение их содержания действием исследуемого вещества (табл. 1).

Из табл. 1 видно, что различия в содержании α_2 и γ -глобулинов на 21-е сутки произошли за счет увеличения α_2 и уменьшения γ -фракций в контроле, эти изменения нельзя объяснить действием 1,2-ПД. Колебание величины альбумино-глобулинового коэффициента на 7-е сутки наблюдения не выходили за пределы физиологических колебаний (рис. 2). Следовательно, продолжительное парентеральное введение 5%-ного раствора 1,2-ПД в дозе 1/20 ДЛ-50 не нарушает протеинообразующей функции печени.

О состоянии экскреторной функции печени судили по величине показателей коэффициентов ретенции (Кр), вычисляемых на основании проведенной БСФ пробы. Полученные данные, приведенные в табл. 2 показали, что в течение всего периода наблюдения не было значимых различий между Кр опытных и контрольных животных. Следовательно, 1,2-ПД в изучаемой дозе и концентрации при продолжительном внутривенном введении его не нарушает экскреторной функции печени кроликов.

Наряду с приведенными данными, для выявления состояния функции печени были использованы показатели активности ферментов в сыворотке крови. Показатели активности АЛТ, АСТ, ХЭ и ЩФ в сыворотке крови опытной и контрольной групп представлены в табл. 2, где видно, что различия в активности ферментов в сыворотке крови этих групп животных при сравнении по соответствующим периодам наблюдения не значимы. Таким образом, приведенные данные также указывают на отсутствие патологических процессов в печени опытной и контрольной групп кроликов.

Т а б л и ц а 1. Показатели динамики белковых функций сыворотки крови у кроликов

Группа животных	Статистические критерии	Периоды определения, дни	Альбумины, относительные, %	Глобулины, относительные, %			
				α_1	α_2	β	γ
Опытная	$x_1 + Sx_1$	Исходные данные 7	51,4±0,76	8,6 ± 0,48	7,52±0,53	12,49±0,96	19,99±1,05
Сравнение средних	p	14	48,2±0,35	9,26±0,39	9,25±0,79	12,65±0,52	20,8±0,85
		21	54,51±1,55	8,46±0,64	8,47±0,37	11,56±0,48	17,07±1,47
			53,68±1,49	7,53±1,6	7,38±0,43	11,50±0,67	19,9±1,31
Контрольная	$x_2 + Sx_2$	Исходные данные	<0,05	<0,02	>0,5	>0,1	<0,2
		7	<0,05	>0,25	>0,5	>0,5	>0,1
		14	>0,25	>0,25	>0,25	>0,25	>0,5
		21	>0,1	>0,25	<0,05	<0,05	<0,001
			58,61±2,88	6,89±0,31	9,55±1,86	9,95±1,1	16,81±0,19
		7	51,58±1,35	8,47±0,58	8,62±0,97	12,4±1,11	18,94±1,05
		14	50,94±3,19	9,08±0,21	9,15±0,58	12,96±1,33	17,87±2,03
		21	57,84±2,12	9,87±1,01	10,32±0,97	9,31±0,47	12,23±0,64

Т а б л и ц а 2. Показатели БСФ пробы (коэффициенты ретенции и активность АЛТ, АСТ, ХЭ; ЩФ в сыворотке крови у кроликов

Группа животных	Статистические критерии	Периоды наблюдения, дни	БСФ проба, Кр	АЛТ, мкМ в 1 мл за 1 ч	АСТ, мкМ в 1 мл за 1 ч	ХЭ, мкг, мин в 1 мл	ЩФ
Опытная	$x_1 + Sx_1$	Исходные данные 7	2,08±0,12	1,03±0,032	0,56±0,045	131,2±7,07	153,8±19,70
Сравнение средних	p	14	2,42±0,17	1,17±0,13	0,56±0,039	151,9±10,91	140,4±20,78
		В конце опыта	2,23±0,43	1,66±0,25	0,77±0,095	162,4±45,5	100,48±23,19
			2,41±0,22	1,67±0,16	0,69±0,100	150,8±9,44	82,78±17,38
Контрольная	$x_2 + Sx_2$	Исходные данные	>0,5	>0,05	>0,5	>0,5	>0,1
		7	>0,25	>0,25	>0,5	>0,25	>0,5
		14	>0,5	>0,1	>0,1	>0,5	>0,5
		В конце опыта	>0,5	>0,1	>0,1	>0,5	>0,5
			2,2±0,24	1,16±0,059	0,55±0,077	123,6±11,80	112,6±15,78
		7	2,02±0,35	0,99±0,19	0,56±0,074	134,9±9,38	131,6±18,28
		14	2,52±0,36	1,18±0,14	0,63±0,031	148,4±18,7	105,2±13,11
		В конце опыта	2,4 ± 0,14	1,21±0,19	0,50±0,067	144,98±43,35	92,02±14,8

Весовые коэффициенты печени обеих групп животных колебались в пределах $22,42 \pm 0,772$ — $22,90 \pm 0,314$ и статистически значимо не отличались между собой.

Таким образом, результаты исследования функционального состояния печени опытной и контрольной групп кроликов с помощью комплекса функциональных критериев позволяют считать, что продолжительное (в течение 3-х недель) парентеральное введение 5%-ной концентрации 1,2-пропандиола в дозе 1/20 ДЛ-50 не нарушает изученных функций печени животных. Затем были проведены гистологическое

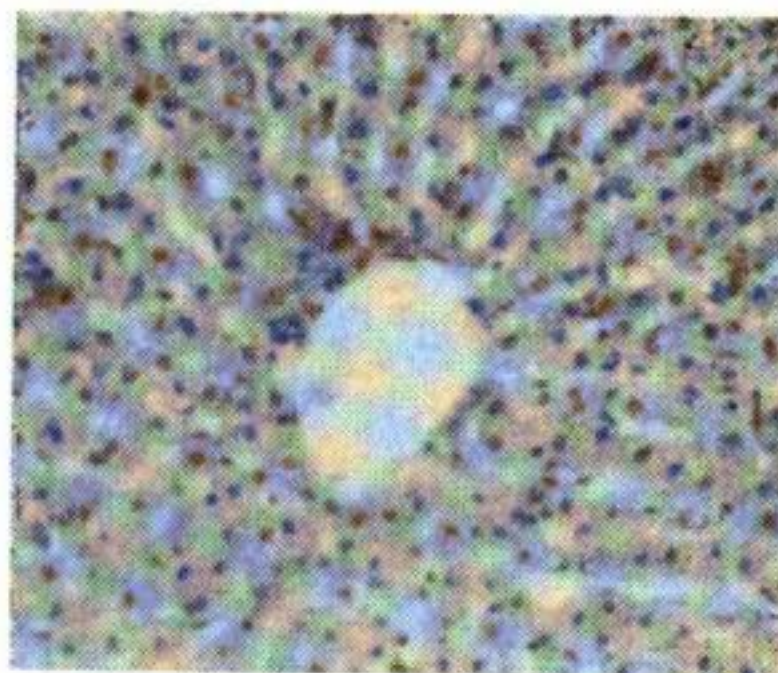
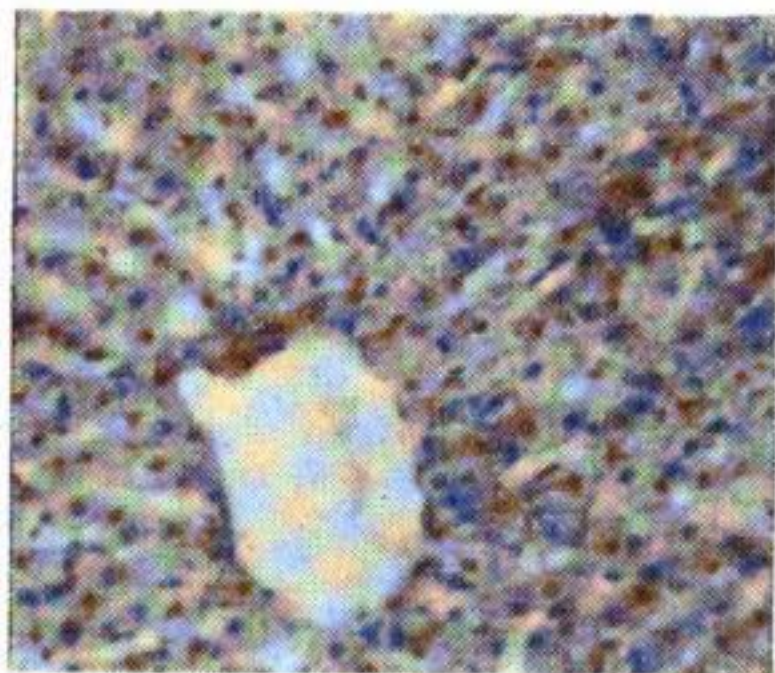


Рис. 3. Печень контрольного кролика. Центральные дольки. Гематоксилин-эозин. $\times 112,5$.

Рис. 4. Характерная структура печени подопытного кролика. Цитоархитектоника органа не изменена. Гематоксилин-эозин. $\times 112,5$.

и гистохимическое исследования печени животных. Морфологические исследования показали, что печень кроликов, которым в течение 21-го дня вводили 5%-ные растворы 1,2-ПД в дозе 1/20 ДЛ-50, имеет характерное дольчатое и балочное строение (рис. 3, 4). Паренхима представлена полигональными одно- и двухъядерными гепатоцитами

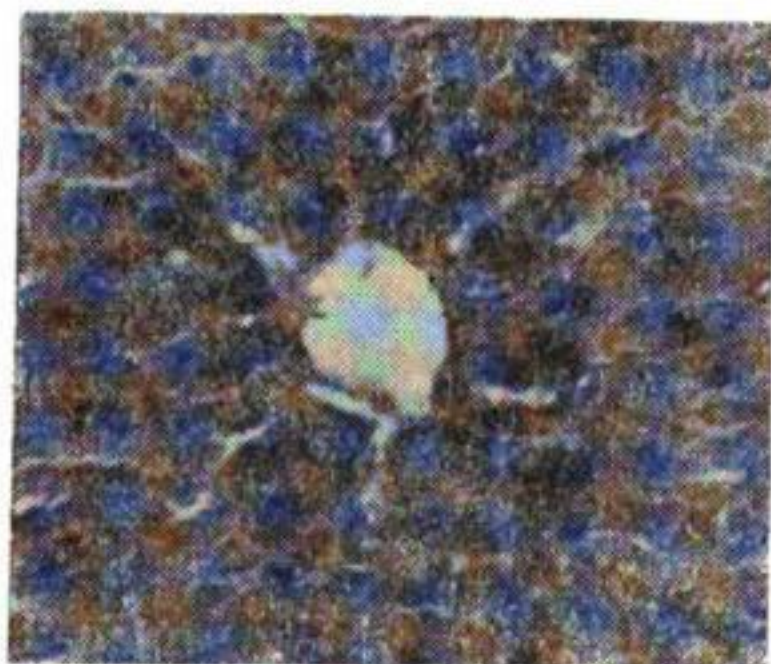


Рис. 5. Насыщенность гликопротеинами гепатоцитов центроглобулярной зоны. Окраска по Моури. $\times 112,5$.

с хромофильной цитоплазмой. Округлые ядра содержат в основном центрально расположенные ядрышки и равномерно распределенный хроматин.

Фигур митоза не наблюдается. Гепатоциты, особенно расположенные вокруг центральных вен, дают интенсивную PAS-положительную окраску, т. е. насыщены гликопротеинами (рис. 5).

Это свидетельствует о том, что даже при указанных длительных воздействиях к печени не предъявлено повышенных требований и центральная зона ее умеренно включалась в работу, оставаясь своеобразным морфофункциональным резервом. Поско-

льку с центральной зоной связывают детоксикационную функцию печени [7, 8], можно полагать, что вводимый раствор 1,2-ПД, в указанной дозе и концентрации не влияет на функциональную способность органа.

Известно, что строма органа несет не только морфогенную нагрузку, но и отвечает за резистентность ткани повреждений [4, 5]. В наших исследованиях не выявлено повреждения стромы. Соединительнотканная основа органа слабо выражена в основном в зоне триад. Кровеносные сосуды умеренно кровенаполнены, синусоидные капилляры слегка расширены, эндотелиоциты, в том числе и купферовские клетки, не изменены. Не выявлено в ткани печени лаброцитов — индикаторов функционального напряжения органа.

Результаты гистологического и гистохимического исследования свидетельствуют о том, что 1,2-ПД в дозе 1/20 ДЛ-50 5%-ной концентрации при продолжительном введении в организм кроликов не вызывает нарушения структуры печени. Сопоставление полученных экспериментальных данных, характеризующих функциональное и морфологическое состояние печени опытных и контрольных групп кроликов, показывает, что продолжительное (в течение 3-х недель) парентеральное введение 1,2-ПД в дозе 1/20 ДЛ-50 5%-ном растворе, приготовленном на физиологическом растворе, не нарушает ни функции, ни структуры печени.

Следовательно, 1,2-пропандиол в дозе 1/20 ДЛ-50 (0,6 г/кг) в 5%-ной концентрации при многократном внутривенном введении в организм кроликов не нарушает функции и структуры печени.

1. Гучок В. М., Зборовская Э. А. О токсичности α -пропиленгликоля. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 8, с. 46—49.
2. Гучок М. М., Гучок В. М. Сравнительное исследование токсичности криопротекторов. — В кн.: I Укр. съезд гематологов и трансфузиологов: Тез. докл. 10—12 дек. 1980 г., Харьков; Киев, 1980, с. 176.
3. Гучок М. М., Гучок В. М., Мазалов В. К. Сравнительное исследование токсичности этиленгликоля, α -пропиленгликоля и глицерина. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 9, с. 36—43.
4. Маянский Д. Н. Клетка Купфера и система мононуклеарных фагоцитов. — Новосибирск: Наука, 1981. — 172 с.
5. Серов В. В., Шехтер А. Б. Соединительная ткань (функциональная морфология и общая патология). — М.: Медицина, 1981. — 312 с.
6. Тугаринова В. Н., Миклашевский В. Е., Скобцова Г. Г. Модификация микрометода бромсульфаленовой пробы на экскреторную функцию печени. — Лаб. дело. 1967, № 4, с. 218—220.
7. Урываева И. В., Фактор В. М., Делонс Г. В. Развитие и локализация в печеночной дольке функции детоксикации. — В кн.: Цитологические механизмы гистогенезов. М.: Наука, 1979, с. 152—154.
8. Шкуриний В. А. Ультраструктура «темных» гепатоцитов в условиях физиологической нормы и токсического повреждения печени. — Цитология и генетика, 1975, 9, вып. 5, с. 408—411.
9. Boutron P., Arnaud F. Comparison of the survival rates of red blood cells in 1,2-propandiol and glycerol after cooling to -196°C and rewarming. — In: Proceedings of the International Meeting of the Society for Low Temperature Biology. Prague, 1980, p. 17.
10. Boutron P., Kaufman A. Stability of the amorphous state in the system water-1,2-propandiol. — Cryobiology, 1979, 16, N 6, p. 557—568.
11. Hanzlik P. I., Newman H. W., Van Winkle W. Jr. et al. Toxicity, fats and excretion of propylene glycol and some other glycols. — J. Pharmacol. and Exp. Ther., 1939, 67, N 1, p. 101—113.
12. Hestrin Sh. The reaction of Acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine and its analytical application. — J. Biol. Chem., 1949, 180, N 1, p. 243.
13. Reitman S., Frankel S. A calorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. — Amer. G. Clin. Pathol., 1957, 28, N 1, p. 56—63.
14. Ruddick T. A. Toxicology, metabolism and biochemistry of 1,2-propandiol. — Toxicol. and Appl. Pharmacol., 1972, 21, N 1, p. 102—111.

Ин-т пробл. криобиологии
и криомедицины АН УССР, Харьков

Получено 28.02.83

*К. Л. Чимишкян, В. Н. Кострыкина, Н. И. Белянчикова,
Г. Ш. Овумян, Г. А. Удалов, М. Г. Киртадзе*

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ АЛЛОГЕННЫХ КЛЕТОК ФЕТАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

К настоящему времени уже имеются экспериментальные доказательства эффективного использования клеток аллогенной фетальной печени в опытах на линейных животных для защиты от гибели летально облученных реципиентов [3, 5]. Из литературных источников известно также о ряде успешных трансплантаций клеток эмбриональной печени, полученных от одного и реже от двух или трех доноров для восстановления острых дефицитов кроветворения у детей [1, 2]. Очевидно, что для взрослого человека доза клеток эмбриональной печени и соответственно количество доноров должны быть значительно больше.

Невозможность получения большого количества материала одновременно обусловила цель настоящей работы, заключающуюся в изучении возможности хранения материала при сверхнизкой температуре, полученного от большого количества несовместимых доноров, и его эффективности для защиты летально облученных реципиентов в условиях эксперимента.

Эксперименты проводили с мышами (CBA×C57BL6j) F_1 массой 24—27 г, беременными мышами линии CBA/lacsto (Столбовая), а также с нелинейными мышами разведения питомника «Крюково». Донорами клеток фетальной печени были 86 нелинейных мышей 16—19 дней беременности, содержащих около 1000 плодов. Взвесь клеток фетальной печени готовили на среде 199 с 10% фетальной бычьей сыворотки.

В материал добавляли 10% диметилсульфоксида (ДМСО) или 10% полиэтиленоксида (ПЭО) и замораживали по следующей программе: 1 °C/мин до температуры —40 °C, 5 °C/мин до —80 °C и 20 °C/мин до —120 °C. Затем полиэтиленовые контейнеры емкостью 1 мл помещали в жидкий азот (—196 °C). Размораживание осуществляли в водяной бане при температуре +40 °C.

Реципиентов облучали дозой 1200 рад. Материал вводили в вену реципиентам в тот же день после облучения в количестве $1,3—31,5 \times 10^6/0,5$ мл. Клонирование клеток фетальной печени проводили по методу Тилла и Маккулоха [4], используя в качестве реципиентов мышей (CBA×C57BL/6j) F_1 .

Из данных, представленных в таблице, следует, что криоконсервация клеток мышей CBA/lacsto с 10% ДМСО позволяет сохранить в материале значительное количество КОЕ_с. В этих условиях материал с ПЭО представлен менее эффективным. Исходя из этого, наши дальнейшие исследования на нелинейных мышах проведены с клетками, замороженными с 10%-ным ДМСО.

Облучение контрольных животных приводило к резкому снижению количества лейкоцитов и тромбоцитов в периферической крови. Отмечалась гибель 100% мышей в течение первых 12 суток.

У 110 опытных животных, получивших после облучения криоконсервированные клетки фетальной печени в дозе $31,5 \times 10^6/0,5$ мл, также отмечалась лейкоцитопения к пятому дню. Однако к десятому дню в периферической крови постепенно восстанавливался уровень лейкоцитов и тромбоцитов. К этому времени наблюдались лимфоцитопения и резко выраженный моноцитоз, которые к 25-му—30-му дню приходили в норму. В дальнейшем у части выживших мышей наблюдали сдвиг лейкоцитарной формулы влево.

Следует отметить, что 32,2% опытных мышей погибало в течение первых 30 дней наблюдения и еще 10% к 80-му дню после облучения

**Способность к образованию экзоколоний клеток фетальной печени мышей
до и после криоконсервации**

Исследуемый материал	Количество наблюдений	Доза клеток, $\times 10^6$	Количество КОЕ _с , $M \pm m$	Количество КОЕ _с на 10^6 клетках печени, $M \pm m$
До криоконсервирования	9	1,5	$23,6 \pm 1,2$	$15,7 \pm 0,8$
После криоконсервирования с 10%-ным ДМСО	10	1,3	$13,8 \pm 1,7$	$10,6 \pm 1,3$
После криоконсервирования с 10%-ным ПЭО	10	3,0	$10,4 \pm 0,7$	$3,4 \pm 0,2$
Контроль на эндоколониеобразование	9	—	0	—

и защиты клетками фетальной печени. Проведенное спустя шесть месяцев избирательное исследование клеток костного мозга 20% мышей-самцов позволило обнаружить у них клетки женского кротида. Из 551 подсчитанных митозов 273 содержали Y-хромосому и 278 — X-хромосому.

Полученные результаты указывают на принципиальную возможность использования криоконсервированных клеток аллогенной фетальной печени нелинейных мышей, полученных от многих доноров для восстановления кроветворной системы летально облученных реципиентов.

1. Buckley R. H., Whisnant J. K., Schiff R. J. et al. Correction of severe combined immunodeficiency by fetal liver cells. — N. Engl. J. Med., 1976, 294, p. 1076—1081.
2. Pahva R., Pahva S., Good R. A. et al. Rationale for combined use of fetal liver and thymus for immunological reconstitution in patients with variants of severe combined immunodeficiency. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, 74, p. 3002—3010.
3. Yunis F., Fernandes G., Smith J., Good R. Long survival and immunologic reconstitution or allogeneic fetal liver and neonatal spleen cells. — Transplant Proc., 1976, 8, N 4, p. 521—527.
4. Till J. E., McCulloch E. A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. — Radiat. Res., 1961, 14, p. 213—222.
5. Uphoff D. E. Alteration of survival pattern by homologous fetal hematopoietic tissue in lethally irradiated mice. — Abstrs. Radiat. Res., 1959, 11, p. 474—476.

ВОНЦ АМН СССР, Москва

Получено 30.06.83

III

КРИОМЕДИЦИНА

УДК 57.043:611.77:[615.014.41+617—089.843]

*Б. П. Сандомирский, Н. А. Волкова,
Ю. И. Исаев*

СОСТОЯНИЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ АЛЛОТРАНСПЛАНТАТОВ КОЖИ

С целью подготовки ожоговых ран к закрытию аутологичной кожей, а также при отсутствии последней в случаях экстенсивных ожогов используются временные биологические покрытия. Работы, выполненные в этом направлении [6, 8, 10], и аналитические обзоры [2] свидетельствуют о возможностях использования криоконсервированной кожи для указанных целей, что обеспечивает улучшение лечения пострадавших с распространенными глубокими ожогами. Наилучшими временными покрытиями признают свежие аллотрансплантаты, несколько хуже — замороженные при низких температурах, последнее место принадлежит лиофилизированным тканям [5, 7]. В связи с ограниченным сроком хранения (3—5 сут) свежих трансплантатов, требованиям клиники лучше всего отвечает криоконсервированная кожа, способная сохранить жизнеспособность на протяжении длительного времени.

Ростовые возможности криоконсервированной под защитой малотоксичного криопротектора ПЭО-400 постмортальной кожи человека освещены в ранее опубликованных работах [1, 9]. При этом установлено, что примененный способ криоконсервации обеспечивает функционально-структурную сохранность части камбиальных клеток эпидермиса и дериватов кожи, а также фибробластических клеточных элементов при хорошей сохранности волокнистых структур дермы. В условиях органной культуры реализуется способность выживших клеточных элементов к проявлению элементарных клеточных свойств — миграции, пролиферации и роста при отсутствии убедительных признаков специфической дифференцировки, кератинизации. Задача настоящего исследования — изучение морфофункционального состояния трансплантированной криоконсервированной постмортальной кожи человека.

Материал и методы. Операции по пересадке криоконсервированной кожи выполнены у 14 больных с глубокими термическими поражениями на площади 5—40% поверхности тела. Подбор аллотрансплантатов производили по группам крови (система АВО) с учетом резус-принадлежности.

Гистологическое изучение криоконсервированной трупной кожи проводили сразу после размораживания, на 4-е, 6—7-е, 10—12-е и 14—15-е сутки после пластики на ожоговые раны, причем биоптат брали с края пересаженного лоскута. В одном случае наблюдение за состоянием пересаженной кожи вели до 35 суток. Фрагменты кожных лоскутов фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина, обезживали и изготавливали парафиновые блоки.

Депарафинированные срезы толщиной 5—7 мкм после окрашивания гематоксилином и эозином изучали под световым микроскопом.

Результаты. Исходные деконсервированные кожные лоскуты имели типичное строение эпидермиса и вошедших в трансплантат сосочкового и части сетчатого слоев дермы. Особенным в структуре фрагментов кожи представилось наличие значительного количества пигмента, сконцентрированного в слое базальных клеток. Сосочковый слой дермы, обладающий выраженной сосудистой сетью, в большом количестве содержал фибробласты, гистиоциты и тучные клетки. Тинкториальные свойства эпидермиса и дермы таких лоскутов не отличались от нативного трупного материала.

После 4-х суток пребывания на ране аллотрансплантаты значительно изменялись. Эпидермис на большом протяжении был отделен от дермы и имел выраженную склонность к оксифилии, а ядра его клеток в большинстве случаев были лизированы. Следует отметить, что часть клеток росткового слоя сохраняла нормальную морфологию. На отдельных участках лоскута субэпидермально выявлялись скопления клеток гематогенного происхождения, преимущественно эритроцитов. В дерме аллотрансплантатов в этот срок наблюдения отмечены про-

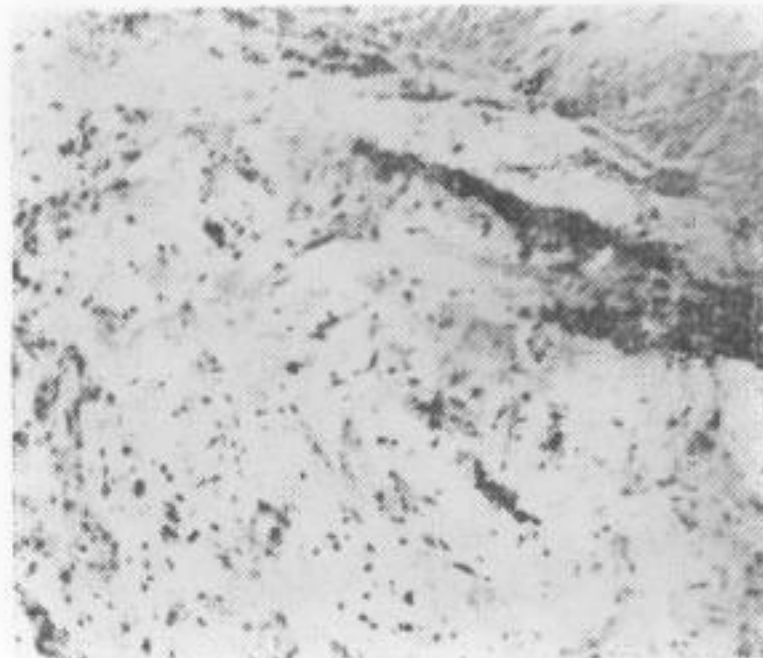


Рис. 1. Аллотрансплантат криоконсервированной постмортальной кожи, 11 суток после трансплантации. Гематоксилин и эозин. $\times 100$.

являющие признаки дистрофии свободные клеточные элементы собственно лоскута и элементы, проникшие со стороны ложа. Часть капилляров лоскутов подвержена фибриноидному набуханию, в просвете их отмечен гемосидерин, другие капилляры слегка расширены и содержат форменные элементы крови. В части трансплантата, прилежащей к спайному слою, выявлены геморрагии. Сама грануляционная ткань богата переполненными кровью сосудами и свободными клеточными элементами гематогенного и гистиогенного происхождения. Возле отдельных сосудов встречаются точечные кровоизлияния.

К концу первой — началу второй недели наблюдения очевидна гибель эпителиальных компонентов лоскутов, остается лишь коллагеновая часть дермы, слабо инфильтрированная нейтрофильными лейкоцитами, лимфоцитами, единичными плазматическими и тучными клетками. Клеточные элементы, мигрируя к поверхности трансплантата, отграничивают некротизированную часть дермы, что отчетливо наблюдается с 11-х суток. Отторжение аллотрансплантата происходит постепенно: сперва отделяется сосочковый, затем фрагментами сетчатый слой. В глубоких отделах дермы аллотрансплантата отмечены тяжи эндотелия и соединительнотканые клетки из грануляционной ткани. Последняя в этот срок содержит большое количество переполненных кровью сосудов и клеточных элементов.

К концу второй недели трансплантат имеет трехслойное строение: на поверхности расположен струп, состоящий из некротизированных фрагментов дермы, глубже лежат коллагеновые волокна дермы, инфильтрированные клеточными элементами, которые к поверхности формируют лейкоцитарно-лимфоцитарный вал. Глубокие слои дермы проросли сосудами и содержат большое количество свободных малодифференцированных молодых клеток, преимущественно гистиоцитарного ряда. Сосудистая сеть грануляционной ткани переполнена кровью, наблюдаются экстравазаты. В отдельных случаях отмечены бактериальная контаминация лоскутов и формирование поверхностных микроабсцессов, что сопровождается бурной лейкоцитарной реакцией.

При дальнейшем наблюдении, вплоть до 35-х суток, установлено сохранение основной тенденции в состоянии трансплантатов: постепенное отторжение некротизирующихся участков сетчатого слоя, прора-

стание стромы дермы сосудами из грануляционной ткани, инфильтрация дермы клетками гематогенного ряда и малодифференцированными клеточными элементами гистиогенного происхождения, что позволяет говорить о постепенном замещении дермы молодой грануляционной тканью.

Таким образом, гистологическое наблюдение дает возможность оценить поведение деконсервированных аллотрансплантатов как вре-



Рис. 2. Больная Ч., 16 лет, и. б. № 12153, диагноз: ожог пламенем III АБ—IV ст. 55 (40%) поверхности тела:

а — гранулирующие раны до операций, б — аллотрансплантаты криоконсервированной постморальной кожи на ожоговых ранах, в — прижившие алло- и ауто-трансплантаты в ходе восстановления кожного покрова.

менное приживление, сопровождающееся десквамацией эпидермиса и длительным сохранением дермы.

Клиническое состояние аллотрансплантатов деконсервированной трупной кожи подтверждает выявленную гистологически тенденцию длительного переживания фрагментов такой ткани на раневой поверхности, что может в ряде случаев иметь решающее значение для благоприятного исхода лечения. Подтверждением сказанному служит история болезни № 12153, Ч. Е. А., 16 лет, поступившей в Харьковский ожоговый центр 10.06.82 г. через 12 суток после травмы (ожог пламенем III АБ — IV степени туловища, верхних и нижних конечностей 55 (40) % поверхности тела). Через 20 суток при очищении ран от некротического струпа произведено закрытие гранулирующих поверхностей аллотрансплантатами. В дальнейшем после спонтанного или насильственного удаления консервированной ткани произведено поэтапное восстановление кожного покрова расщепленными ауто-трансплантатами.

Обсуждение. Полученные при трансплантации деконсервированных кожных лоскутов данные согласуются с точкой зрения [3, 4] об удлинении срока существования на ране криоконсервированных аллотрансплантатов в сравнении с нативными. Однако такое представление о биологических свойствах изучаемого объекта не может быть однозначным хотя бы потому, что раневое ложе не создает идеальных условий для существования изолированного фрагмента кожи. Кроме того, иммунологические влияния еще более ухудшают особенности питания трансплантата. Следует отметить, что инвазия трансплантата клеточными элементами реципиента маскирует собственный клеточный состав лоскута. Все это сдерживает реализацию свойственных пересаженным деконсервированным фрагментам потенциальных возможностей. В связи с этим представляет интерес сопоставление результатов аллотрансплантации и проведенного нами ранее органного культивирования криоконсервированной трупной кожи [1, 9]. Прежде всего обращают на себя внимание однотипность характера и последовательность происходящих в лоскуте процессов. Первый этап — отторжение некротизиро-

ванного эпидермиса — наблюдается и в одних и в других условиях содержания лоскутов уже к 4—5 суткам. Причем в обоих случаях отмечено наличие морфологически неизмененных клеточных элементов росткового слоя, сохранившихся на дерме. Однако уже в этот срок в трансплантат проникают клеточные элементы со стороны ложа, что исключено *in vitro*. Вслед за отторжением эпидермиса в конце первой—начале второй недели в культивируемых фрагментах происходит эпителизация эксплантатов преимущественно за счет сохранившегося камбиального эпителия дериватов кожи, попавших в эксплантат. При трансплантации лоскутов наблюдаются инфильтрация коллагеновой стромы клетками гемато- и гистиогенного происхождения и проникновение тяжелой грануляционной ткани.

В дальнейшем, в третью неделю существования, культивируемые фрагменты еще более полно проявляют свои тканеспецифические возможности: формируется эпителиальный пласт, тяготеющий к вертикальной анизоморфности, эпителии и кератинизации, хотя признаки последней малоубедительны. Фибробластические клетки проявляют свою активность в виде миграции на поддерживающий фильтр. Состояние трансплантатов зависит от влияния со стороны реципиента: поверхностные слои дермы постепенно некротизируются и отторгаются, глубокие пласты ее прорастают сосудами и большим количеством молодых свободных малодифференцированных клеток. Сосудистая сеть грануляционной ткани в этот срок переполнена кровью, наблюдаются экстравазаты.

Таким образом, попытка охарактеризовать полноценность деконсервированной ткани с помощью наиболее достоверных тестов определения жизнеспособности — трансплантаций и культивирования тканей — показывает, что они скорее дополняют, чем исключают друг друга. При обследовании материала, предназначенного для аллогенной пластики, выраженными преимуществами обладает органное культивирование как метод определения состояния тканеспецифических функций биологического объекта. В то же время трансплантации позволяют изучать и обсуждать сохранность иммунобиологических свойств деконсервированной кожи.

1. Волкова Н. А., Сандомирский Б. П. Органное культивирование криоконсервированной кожи человека. — Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 12, с. 53—58.
2. Ганжа П. Ф., Гришкевич В. М., Юденич В. В. Современные методы лечения ожогов: Науч. обзор / Под ред. М. И. Кузина. — М., 1981. — 78 с.
3. Гинсбург Р. Л., Павлова М. Н., Моин М. Л. Клинико-морфологические особенности приживления кожи после консервации ее в жидком гелии. — В кн.: Заготовка, консервирование и стерилизация биологических тканей. М., 1970, с. 143—147.
4. Моин М. Л. Сравнительное изучение действия консервации при крайне низкой температуре на ауто- и гомотрансплантат кожи. — В кн.: Трансплантация органов и тканей. Горький, 1970, с. 480—481.
5. Kiene S. Differentialtherapeutische Indikationen zur Anwendung von Xenoderm und SYSpur-derm bei Verbrennungen und anderen Hautdefecten. Kommentar zur Arbeit von J. Moserova. Vergleichstudie verschiedener Hautersatzmittel. — Zbl. Chir., 1981, 106, N 18, S. 1201—1203.
6. Liljedahl S., Davies J., Lamke L. et al. The treatment of patients with massive third degree burns. — In: The 5-th Intern. Congr. burn injuries: Abstr. book. Stockholm, 1978, 349. — p. 47.
7. Palmer P. Erfahrungen mit lebender tiefgekuhlter und lyophilisierter Spalthaut als biologischen Verband. — Zbl. Chir., 1974, 99, N 35, p. 1101—1104.
8. Shuck J. M. The use of heteroplastic grafts. — Burns, 1975, 2, p. 47—53.
9. Volkova N. A., Sandomirsky B. P. Organ culture of human skin grafts preserved by freezing. — Cryo—Letters, 1982, 3, N 4, p. 227—238.
10. Zellner P. R. Konservierte Leichenhaut zur Deckung großflächiger drittgradiger Verbrennungswunden. — Zbl. Chir., 1974, 99, N 35, p. 1105—1107.

Ин-т пробл. криобиологии
и криомедицины АН УССР, Харьков

Получено 12.05.83

КРИОХИРУРГИЯ В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ ГИПЕРПЛАСТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ МАТКИ

Криохирургия как один из наиболее эффективных методов лечения занял достойное место и широко применяется в лечении предопухолевых и опухолевых заболеваний во всех областях медицины, в том числе и в гинекологии [1, 6, 7, 9, 10, 12, 13].

Наряду с этим актуальной в гинекологии является проблема лечения гиперпластических процессов матки, что обусловлено их широкой распространенностью и значительной вероятностью малигнизации [8, 10, 17]. Такие виды гиперпластических процессов, как железисто-кистозная гиперплазия эндометрия, железистые полипы, аденоматоз или атипическая гиперплазия, служат фоном для развития рака, который возникает на этой почве в 70 % случаев [2] и только в 30 % случаев рост начинается на атрофичном эндометрии.

С целью определения места криохирургии в комплексном лечении гиперпластических процессов матки нами обследовано и проведено лечение 72 женщин в климактерическом и менопаузальном возрасте, из них железисто-кистозная гиперплазия эндометрия была у 42 больных (59%), полипоз — у 16 (22%), атипическая гиперплазия эндометрия — у 14 (19%). 36 больных страдали маточными кровотечениями в течение 1—2 лет; 20 — в течение 3—4 лет и 16 — 5 лет и более. Анализируя данные анамнеза и выявленной патологии выяснено, что избыточная масса была у 25 больных (34,7%), гипертоническая болезнь — у 42 (58,2%), нарушения функции поджелудочной и щитовидной железы — у 8 (10%). Воспалительными заболеваниями гениталий страдали 18 больных (25%), сочетание гиперплазии эндометрия с миомой матки выявлено у 40 женщин (55,5%). У большинства обследованных женщин начало менструаций было своевременным (в 13—15 лет 72%), и только у 28% заболевших оно было поздним (16—19 лет), что могло быть обусловлено патологией гипоталамо-гипофизарной системы и вызвать в дальнейшем функциональные и органические поражения гениталий.

Из всех находившихся под нашим наблюдением женщин только 10 (13,9%) страдали бесплодием, а 87% имели в анамнезе роды и 80% — аборты, из них 40% более трех. Основной жалобой больных было наличие маточных кровотечений после задержки менструаций от двух недель до двух месяцев. Все больные в прошлом подвергались диагностическому выскабливанию эндометрия, из них трижды и более раз — 38 человек (52,7%), лечение гестагенами получали 21 (29,1%), синтетическими прогестинами — 55 (76,4%), андрогенами — 12 (16%). Все больные в комплексном лечении получали препараты, усиливающие сократительную деятельность матки и 38 из них антианемическую терапию.

Предварительно и через 3, 6, 12 и 24 месяца после лечения больным кроме общеклинического обследования проводились кольпоцитологическое с подсчетом КПИ и цитологическое исследование эндометрия, полученного путем аспирации и смыва из полости матки, гистологическое исследование эндометрия, полученного при вакуум-кюретаже, радиоизотопная диагностика, гистероскопия и гистерография.

Криодеструкция эндометрия производилась с помощью устройства, действующего по принципу принудительной циркуляции жидкого азота с криозондом диаметром 8 мм по следующей методике: после обезболивания: промедол 2% — 1 мл, антропин 0,01% — 1 мл, анальгин 50% — 2 мл с последующим опрыскиванием слизистой цервикального канала 10%-ным раствором лидокаина — проводилось расширение цервикального канала расширителями Гегара № 8—9. Криовоздействию

предшествовал вакуумкюретаж матки, что кроме получения материала для гистологического контроля создавало оптимальные условия для равномерного замораживания тканей. Криовоздействие производилось в четырех точках: у дна, в трубных углах и центре матки, за внутренним зевом. У женщин с небольшой полостью матки трех первых точек было достаточно.

Тотальная криодеструкция эндометрия проведена 40 больным. При гистологическом исследовании выявлена железисто-кистозная гиперплазия эндометрия — у 18 человек, полипоз эндометрия у 12 и атипическая гиперплазия — у 10. Длительность наблюдения после лечения — 1,5—2,5 года, из них в течение 1 года наблюдалось 5 женщин, 1,5 лет — 8, двух лет и более — 27. Всем больным лечение производилось амбулаторно, у двух после криовоздействия на 3—4 сутки в результате задержки выделений из матки отмечался подъем температуры до 37,6 °С. Эти явления были купированы назначением спазмолитиков и расширением цервикального канала с целью улучшения оттока. Через 1—2 часа после криовоздействия появлялись серозно-кровянистые выделения, продолжавшиеся 1—2 дня, после чего становились серозными и длились 15—25 дней. В результате лечения аменорея наступала у 28 человек (70%), у 10 (25%) больных установились скудные регулярные менструации — это больные в возрасте 43—45 лет. У двух больных кровянистые выделения были нерегулярные и скудные. Полное излечение — отсутствие клинических проявлений и нормализация морфоструктуры эндометрия — отмечено у 32 больных (80%), у 7 больных из 10 с атипической гиперплазией при отсутствии кровотечения выявлена умеренная гиперплазия эндометрия, у одной больной обнаружена киста яичника, по поводу чего было проведено оперативное лечение. Полученные нами результаты лечения согласуются с данными Е. М. Вихляевой с соавторами [4, 5], в которых отмечается неоднородность результатов криогенного лечения больных с гиперпластическими процессами эндометрия и отмечается у части из них при клиническом улучшении сохранение гиперплазии эндометрия. Авторы рекомендуют рациональное лечение на следующих этапах наблюдения. Учитывая данные об эффективности лечения атипической гиперплазии большими дозами 17 ОПК [2, 3], мы сочли возможным у таких больных в сочетании с локальным криовоздействием провести гормонотерапию 17 ОПК в половинной дозе. Комбинированное криогормональное лечение получили 39 больных 44—58 лет, из которых у 7 женщин криодеструкция эндометрия, как самостоятельный вид лечения, была недостаточной. По данным гистологического исследования у 22 человек выявлена железисто-кистозная гиперплазия эндометрия, у 6 — полипоз, у 4 — атипическая гиперплазия. Все эти больные после криодеструкции эндометрия получали 17 ОПК по 250 мг два раза в неделю в течение шести месяцев. Непосредственно после криовоздействия гормональное лечение было назначено 25 больным, через шесть месяцев после лечения — десяти, и через год — четверем больным. Лечение оказалось эффективным у 36 больных, отсутствие нормализации морфоструктуры эндометрия при клиническом выздоровлении — у двух больных. Дальнейшее лечение тестенатом в течение полугода дало положительный эффект.

Для одной больной комбинированное криогормональное лечение оказалось недостаточным. Это больная 44 лет с атипической железистой гиперплазией эндометрия, страдавшая кровотечениями в течение 7 лет, без обменно-эндокринных нарушений, которая до криолечения перенесла четыре диагностических выскабливания эндометрия, получала сокращающие средства, бисерукин. Гормональное лечение, назначенное сразу же после криодеструкции эндометрия, оказалось неэффективным, и больной было проведено оперативное лечение. Гистологическое исследование выявило текоматоз яичников. При контрольных обследованиях в отдаленные сроки было установлено, что у 12 из 70

больных через 1—1,5 месяца после лечения появились маточные кровотечения, хотя при гистологическом исследовании в эндометрии не было признаков гиперплазии. При проведении гистероскопии у них установлено наличие подслизистых миоматозных узлов. Этим больным проведена локальная криодеструкция узлов фибромиомы под визуальным контролем с помощью криоэндоскопа. Лечение проводилось в стационарных условиях. В послеоперационном периоде некротизированные ткани отторгались и выделялись вместе с экссудатом. При обследовании в течение 1,5 лет у 10 больных наступило стойкое выздоровление. У двух женщин после годичной ремиссии кровотечения возобновились, что связано с неполным удалением сравнительно больших фиброматозных узлов (5×4×4 см).

Таким образом, дифференцированный подход в выборе метода комбинированной криохирургии гиперпластических процессов матки позволяет повысить его эффективность и уменьшить объем необходимых лечебных манипуляций.

1. Бакулева Л. П., Кузьмина Т. И., Асатиани Т. И. и др. Криовоздействие — метод лечения некоторых заболеваний шейки матки. — В кн.: Тез. III съезда акушеров-гинекологов. Белорусская ССР. Минск, 1979, с. 252—253.
2. Бохман Я. В. Предраковые заболевания эндометрия: особенности патогенеза, принципы лечения, факторы риска. — В кн.: IV съезд акушеров-гинекологов РСФСР: Труды, М., 1977, с. 198—203.
3. Бохман Я. В., Прянишников В. А., Чепик О. Ф. Комплексное лечение при гиперпластических процессах и раке эндометрия. — М.: Медицина, 1979. — 279 с.
4. Вихляева Е. М., Запорожан В. Н., Петрова А. С. и др. Эффективность криогенного лечения при гиперпластических процессах эндометрия. — В кн.: Тез. Всесоюз. симпозиум. «Профилактика, ранняя диагностика и комплексное лечение рака тела матки». Псков, 1981. — 59 с.
5. Вихляева Е. М., Фанченко Н. Д., Запорожан В. Н. и др. Состояние эстроген-рецепторных систем и клинический эффект криохирургии гиперплазированного эндометрия. — Акушерство и гинекология, 1982, № 6, с. 11—15.
6. Горбунова Ж. К. Використання комбінованого методу кріовпливу і конусовидної електроексцизації в лікуванні передпухлинних станів шийки матки. — Педіатрія, акушерство і гінекологія, 1981, № 4, с. 47—48.
7. Грищенко В. И. Гипотермия и криохирургия в акушерстве и гинекологии. — М.: Медицина, 1974. — 280 с.
8. Железнов Б. И. Некоторые итоги изучения проблемы предрака эндометрия. — Акушерство и гинекология, 1978, № 3, с. 17—19.
9. Ляшев Л. М. Лечение дисфункциональных маточных кровотечений криохирургическим методом. — Там же, № 10, с. 38—39.
10. Пачес А. И., Шенталь В. В., Птуха Т. П. Разработка криогенного метода лечения злокачественных опухолей. — Вестн. АМН СССР, 1980, № 5, с. 45—50.
11. Савельева Г. М., Серов В. Н. Предрак эндометрия. — М.: Медицина, 1980. — 162 с.
12. Fraser J. Cryosurgery. — Prog. Surg., 1975, 15, p. 136—159.
13. Jage A. A. Rectal tumors treated by cryosurgery. — JAMA, 1971, N 216, p. 418—425.
14. Ritzmann H., Hillemanns H. J. Die Hiperplasie formen des Endometriums und Ihre Beziehungen zum Endometriumkarzinom. — Arch. Gynkol., 1977, 223, S. 345—356.

Одес. мед. ин-т им. Н. И. Пирогова

Получено 21.02.83

УДК 57.043

В. М. Чередниченко, П. А. Бездетко

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КРИОПРОТЕКТОРА — ПОЛИЭТИЛЕНОКСИДА МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССОЙ 400 — ПРИ ЛЕЧЕНИИ ГЛАУКОМЫ

Полиэтиленоксид молекулярной массой 400 (ПЭО-400) в криобиологии и криомедицине находит применение как эффективный криопротектор при низкотемпературной консервации клеток и тканей [3, 6]. Известно, что ПЭО-400 обладает высокими осмотическими, дегидратационными, а при введении в организм животных и осмодиуретическими свойствами [2, 4, 6]. Это позволяет предположить возможность

практического применения ПЭО-400 в новом качестве, а именно для снижения внутриглазного давления. Исходя из этого нами с разрешения Фармакологического комитета Минздрава СССР проведены клинические исследования, целью которых явилось изучение возможности применения ПЭО-400 в качестве средства для снижения внутриглазного давления у больных глаукомой.

Влияние ПЭО-400 на внутриглазное давление прослежено у 98 больных (47 женщин, 51 мужчина) различного возраста. Гипотензивное действие препарата изучалось при различных формах глаукомы, а также у лиц с исходным нормальным уровнем офтальмотонуса. Больных с первичной открытоугольной глаукомой было 33, с первичной закрытоугольной 22 и с вторичной глаукомой различного генеза — 19.

С исходным нормальным внутриглазным давлением (ВГД) было 24 человека. ПЭО-400 назначался больным в виде 50% водного раствора в дозе 1,5 г чистого вещества на килограмм массы больного.

У всех наблюдавшихся нами после приема ПЭО-400 отмечено снижение ВГД. Так, у лиц с исходным нормальным ВГД офтальмотонус снизился в среднем на 2,2 мм рт. ст., что, по-видимому, обусловлено высокими компенсаторными возможностями регуляции ВГД у здорового человека [1,5]. Применение ПЭО-400 больным с первичной открытой и закрытоугольной глаукомой привело к снижению уровня ВГД в среднем на 17—47% с максимально выраженным гипотензивным действием через 1,5 ч после приема препарата. Даже через 24 ч после приема ПЭО-400 ВГД оставалось ниже исходного. В ряде случаев с помощью ПЭО-400 удалось купировать у больных острый приступ глаукомы, не поддававшийся лечению другими медикаментозными средствами.

Проведенные нами тонографические исследования показали, что после перорального приема ПЭО-400 у больных с первичной глаукомой увеличивается коэффициент легкости оттока камерной влаги, что свидетельствует о положительных изменениях в гидродинамике внутриглазной жидкости.

Известно, что особенно трудную категорию больных при медикаментозном лечении глаукомы составляют больные со вторичной глаукомой. Наши наблюдения над 19 больными с этой формой глаукомы показали, что перорально введенный ПЭО-400 снижает внутриглазное давление в среднем на 46,5% от исходного.

Таким образом, ПЭО-400 оказался эффективным средством для снижения ВГД у больных с различными видами глаукомы. Гипотензивное действие ПЭО-400 сходно с действием таких осмотических активных препаратов, как маннитол, глицерин, мочеви́на, однако ПЭО-400 превосходит их по длительности снижения ВГД.

Весьма важен вопрос о влиянии осмотических препаратов на общее состояние больных. Из литературы известно [5, 7], что маннитол, мочеви́на и глицерин могут вызывать ряд осложнений, в том числе опасных для жизни больного. Проведенные нами клинические наблюдения показали, что ПЭО-400 хорошо переносится больными, не вызывает каких-либо серьезных осложнений, изменений в крови и моче, не сказывается на уровне артериального давления, не влияет существенно на суточный диурез. Наши наблюдения полностью согласуются с данными других авторов [2, 3, 6] о хорошей переносимости полиэтиленоксидов. Диарея, отмеченная нами в 15% принимавших ПЭО-400 больных, не является проявлением побочного или токсического действия препаратов, а объясняется особенностями его фармакологического влияния при пероральном способе применения, при котором вследствие гиперосмотического действия ПЭО происходит перемещение воды из крови в желудочно-кишечный тракт.

Следовательно, проведенное нами клиническое изучение возможности использования ПЭО-400 как гиперосмотического средства для снижения внутриглазного давления показало, что ПЭО-400 в дозе 1,5 г

чистого вещества на килограмм массы больного при пероральном введении в виде 50% водного раствора эффективно снижает ВГД.

На основании полученных нами результатов клинических наблюдений мы считаем возможным рекомендовать ПЭО-400 в качестве осмотически высокоактивного, малотоксичного и практически безопасного при пероральном применении препарата. ПЭО-400 с успехом может быть использован в клинической практике для временного снижения внутриглазного давления у больных глаукомой и внутриглазными гипертониями, при купировании острого приступа глаукомы, для подготовки больных к глазным операциям. Препарат применяется и в качестве осмотерапевтического средства при лечении экссудативных процессов, послеоперационных цилиохориоидальных отслоек и других заболеваний. Применение ПЭО-400 позволит расширить арсенал средств, используемых в офтальмологии в качестве осмотических препаратов.

1. Биетти Д., Буччи М. Г. Гипотензивные глазные средства осмотического действия. — Офтальмол. журн., 1966, № 6, с. 443—453.
2. Брук М. М., Пушкарь Н. С., Шкурко В. К. К влиянию полиэтиленоксида на организм животных. — В кн.: Науч. тр. Харьк. мед ин-та, 1968, вып 78, с. 18—22.
3. Гайсенюк Л. А. Изучение полиэтиленоксида-400 при низкотемпературном консервировании и трансплантации костного мозга в онкологической клинике: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Харьков, 1972. — 25 с.
4. Наточин Ю. В., Шахматова Е. И. Диуретическое действие полиэтиленгликолей. — Бюл. эксперим. биологии и медицины, 1970, № 4, с. 79—81.
5. Нестеров А. П., Бунин А. Я., Кацнельсон Л. А. Внутриглазное давление. Физиология и патология. — М.: Наука, 1974. — 381 с.
6. Пушкарь Н. С., Шраго М. И., Шраго М. И., Белоус А. М., Калугин Ю. В. Криопротекторы. — К.: Наук. думка, 1978. — 204 с.
7. Bietti G., Bucci M. G. Le sostanze ipotenizzanti oculari ad azione osmotica. — Boll. oculist., 1967, 45, N 11, p. 735—770.

Офтальмол. клин. больница № 14
им. проф. Л. Л. Гиршмана, Харьков
Укр. ин-т усовершенствования врачей МЗ УССР,
Харьков

Получено 15.03.83

УДК 57.043

*В. М. Чередниченко, П. А. Бездетко,
Ю. Л. Станиславский*

ОПЫТ КРИОТЕРАПИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПРИДАТОЧНОГО АППАРАТА ГЛАЗА

Применение холода для лечения различных глазных заболеваний за последние два десятилетия приобрело широкое распространение [1, 2, 5—7]. В офтальмологической практике низкие температуры применяются главным образом для лечения заболеваний роговой оболочки, глаукомы и значительно реже — при заболеваниях придаточного аппарата глаза — век и конъюнктивы [3, 4]. Вместе с тем эти заболевания составляют более половины той патологии, с которой приходится сталкиваться практическому врачу. Из этих соображений мы провели наблюдения над группой больных с заболеваниями придаточного аппарата глаза, леченных с помощью локальных криовоздействий в кабинете криотерапии при Харьковской городской офтальмологической больнице № 14 им. проф. Л. Л. Гиршмана.

За период с 1979 по 1982 гг. с заболеваниями придаточного аппарата глаза в кабинете прошли лечение 134 больных в возрасте от 2 месяцев до 78 лет, из них женщин — 83, мужчин — 51 человек. 43 больных лечились по поводу множественных папиллом кожи век, 34 больных были с контагиозным моллюском, у 18 имелись кистозные

образования на коже век (атеромы, гидроцистомы и др.). 18 больных получали криотерапию по поводу ангиом кожи век. У всех больных ангиомы были врожденными. Капиллярные ангиомы были у 7, капиллярно-ветвистые у 6 и кавернозные у 5 человек. Двое больных лечились по поводу базально-клеточного рака кожи нижнего века. Среди больных с заболеваниями конъюнктивы 6 человек получали криотерапию в связи с лимфангиомами и лимфангиоэктазиями и 5 — по поводу рецидивирующего птеригиума.

В качестве источника низкой температуры нами использовалась разработанная и изготовленная в Физико-техническом институте низких температур АН УССР универсальная криоофтальмологическая установка УМ-14 (авторы — Б. Н. Муринец-Маркевич, В. Я. Осипов, В. М. Чередниченко), позволяющая получать охлаждение криоинструмента до -80°C . Для лечения заболеваний придаточного аппарата глаза мы применяли разрушающую дозу гипотермии (температура аппликатора -70 , -80°C , экспозиция от 20 до 60 с, диаметр рабочей части криоаппликатора 3 мм).

При лечении гемангиом криоаппликации проводили два-три раза в неделю. Их общее число определялось видом и размерами опухоли. Так, облитерация и исчезновение капиллярных и капиллярно-ветвистых гемангиом кожи век достигались в среднем после трех криоаппликаций. Обычно после криоаппликации возникал очаг крионекроза, который к концу лечения полностью эпителизировался. Кавернозные гемангиомы криовоздействию поддавались хуже и их полное извлечение достигнуто только у трех больных с опухолями небольших (до 10 мм в диаметре) размеров. Замораживание гемангиом начинали с периферии и постепенно переходили к центральным их отделам.

Весьма успешным оказалось лечение криоаппликациями контагиозного моллюска. Как правило, для ликвидации патологического образования достаточно было одной криоаппликации продолжительностью 20—30 с, и в последующем рецидивов не отмечалось.

При множественных папилломах кожи век хороший эффект от криотерапии был получен у 32 больных с небольшими папилломатозными образованиями. При крупных папилломах на широком основании, имевших место у 11 больных, для деструкции патологического образования потребовалось 10—12 криоаппликаций. Хороший результат после криотерапии получен у двух больных с базально-клеточным раком кожи нижнего века. После трех криоаппликаций на месте опухоли образовался очаг крионекроза, заместившийся тонким рубцом. Последующее наблюдение на протяжении двух лет не выявило признаков рецидива.

В группе больных с кистозными образованиями век хороший результат криолечения отмечен при гидроцистомах и небольших атеромах. Криотерапия оказалась неэффективной при атеромах больших (более 10 мм) размеров, и их пришлось удалить хирургическим путем.

При заболеваниях конъюнктивы положительные результаты от криоаппликаций получены при лимфангиомах и лимфангиоэктазиях конъюнктивы век и глазного яблока. После двух-трех криоаппликаций эти образования подвергались облитерации и исчезали.

При рецидивирующих птеригиумах мы отмечали на некоторое время задержку их роста после криоаппликаций, однако ни в одном случае не получили стойкого излечения.

Результаты криотерапии заболеваний придаточного аппарата глаза позволяют сделать вывод о целесообразности использования низких температур для лечения различных заболеваний век и конъюнктивы. Криотерапевтические манипуляции с использованием универсальной офтальмологической криоустановки УМ-14 переносятся больными легко при минимальной реакции со стороны окружающих патологический очаг здоровых тканей, с хорошими функциональными и косметическими исходами. Установка УМ-14 проста в управлении, позволяет четко

дозировать силу криовоздействия, удобна для лечения заболеваний придаточного аппарата глаза. Криотерапия должна шире применяться для лечения заболеваний век и конъюнктивы.

1. *Абрамов В. Г., Артамонов В. П.* Применение холода в офтальмологии. — Ярославль: Верх.-Волж. кн. изд-во, 1973. — 153 с.
2. *Бездетко П. А.* К вопросу о выборе оптимальных температурных параметров для криотерапии в офтальмологии. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 6, с. 3—5.
3. *Ерошевский Т. И., Затулина Н. И.* Криотерапия при некоторых заболеваниях глаз. — Офтальмол. журн., 1970, вып. 3, с. 183—185.
4. *Золотарева М. М., Чвялева К. И., Василевич А. И.* Гипотермия при глазных заболеваниях. — Минск: Беларусь, 1978. — 112 с.
5. *Шенталь В. В., Птуха Т. П., Михайловский А. В.* Лечение опухолей лица и головы методом криогенного воздействия. — В кн.: Новые приборы и устройства в биологии и медицине. К., 1975, с. 11—12.
6. *Matthaus W., Krantz H.* Kryotherapie in der Augenheilkunde. — Dresden: Steinkopff, 1973. — 202 p.
7. *Moreau P., Haut I.* Cryoophthalmologie. — Paris: Masson, 1971. — 718 p.

Офтальмол. клин. больница № 14
им. проф. Л. Л. Гиршмана, Харьков
Укр. ин-т усовершенствования врачей МЗ УССР,
Харьков

Получено 15.03.83

УДК 616—001.4—002.3:615.832.9

*М. Г. Шенберг, В. В. Волина,
В. П. Чеканов, И. П. Высеканцев*

ЗАЖИВЛЕНИЕ ИНФИЦИРОВАННЫХ РАН ПОСЛЕ ДЕЙСТВИЯ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР

Применение холода оказывает положительный эффект при лечении инфицированных ожоговых ран [2, 4]. В связи с этим представляет интерес изучение криовоздействия при лечении экспериментальных гнойных ран. С этой целью проведено исследование влияния холода на заживление кожных ран, инфицированных золотистым стафилококком.

Материал и методы. 54-м крысам-самцам линии Вистар массой 180—220 г на предварительно проэпилированную кожу спины наносили раны площадью в 4 см², которые затем инфицировали культурой золотистого стафилококка (штамм 209) с концентрацией 10⁹ микробных клеток в 1 мл. После введения 1 мл микробной культуры в течение всего срока наблюдений раны находились под асептическими повязками. Животные были разделены на две группы: у 24-х подопытных крыс раны подвергались криовоздействию, а 30 крыс были оставлены в качестве контроля, при этом в обеих группах животных в процессе наблюдения измерялись размеры ран. Крыс забивали путем декапитации под эфирным наркозом через 2, 3, 5, 8, 12, 17, 22, 27 и 32 суток после нанесения ран. В указанные сроки участки кожи, окружающие раны, иссекали на всю их глубину и фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине. Целлоидиновые срезы толщиной 7—8 мк окрашивали гематоксилином и эозином по Ван-Гизону и Моури. Для изучения динамики микробной обсемененности ран из их глубины в различные сроки наблюдения стерильно отбирали образцы ткани, взвешивали их и гомогенизировали с физиологическим раствором. Различные разведения гомогената высевали на мясо-пептонный агар. Учет результатов после культивирования проводили по количеству макроколоний.

Результаты исследований. Измерение размера ран позволило установить, что на 1—3 сутки после криовоздействия площадь их у подопытных животных значительно увеличены по сравнению с контролем. Однако уже на 17-е сутки раны, подвергнутые криовоздействию, макроскопически отличаются полной эпителизацией, в то время как в контрольной группе их площадь составляет $0,8 \pm 0,02$ см².

При посевах материала, взятого из ран животных обеих групп в различные сроки, обнаружены колонии только золотистого стафилококка. Количество таких колоний на 1 г ткани, высеянных из ран подопытной группы животных, уже на 6—12-е сутки после криовоздействия оказалось на 96% ниже, чем в контроле.

При гистологическом исследовании ран контрольных животных, не подвергавшихся криовоздействию, через 2—3 суток обнаруживаются начальные признаки образования грануляционной ткани, о чем свидетельствует слой энергично развивающихся сосудов непосредственно

под струпом. В глубине раны обнаруживаются кровоизлияния. Наблюдается мощная инфильтрация дермы полиморфноядерными лейкоцитами из глубоко расположенных сосудов околораневой зоны, просвет

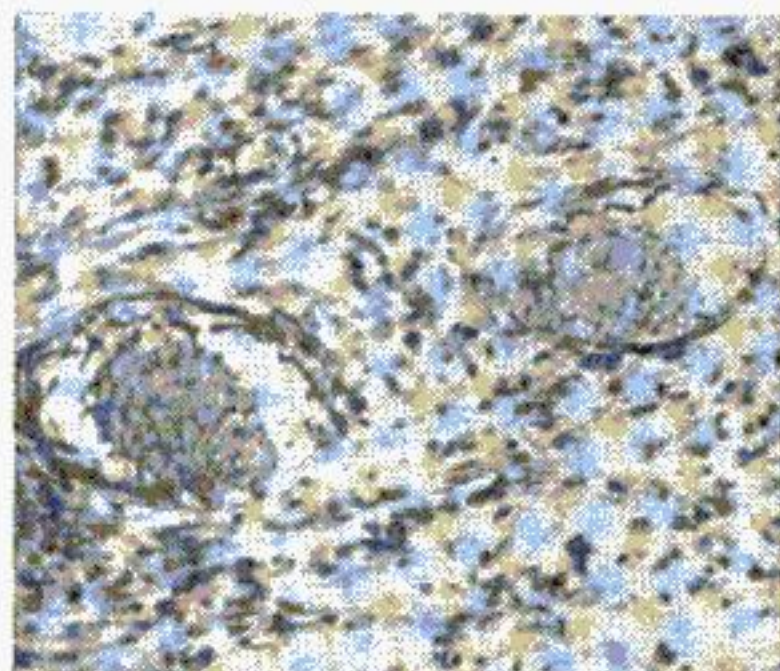
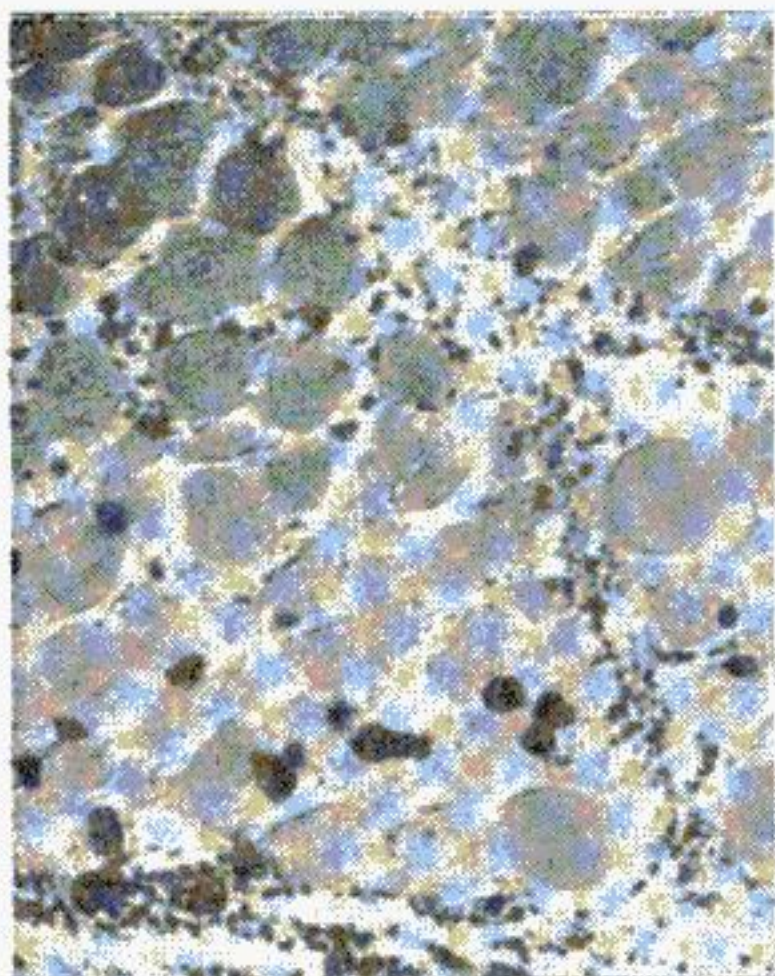


Рис. 1. Лаброциты между пучками волокон собственной мышцы кожи на 3-е сутки после нанесения раны. Гематоксилин и эозин. 7×20 .

Рис. 2. Околораневая зона. Кровеносные сосуды с тромбами в глубине сетчатого слоя дермы на 32-е сутки после нанесения раны. Гематоксилин и эозин. 7×20 .

которых заполнен нейтрофилами. Обращает на себя внимание большое количество тучных клеток (лаброцитов) в глубоких слоях дермы (рис. 1). Между мышечными волокнами собственной мышцы кожи и вокруг глубоко залегающих сосудов имеются скопления макрофагов. В околораневой зоне наблюдается пролиферация базальных клеток росткового слоя эпидермиса и эпителия волосяных фолликулов.

На 5-е сутки после нанесения ран обнаруживается массивный струп, под ним широкий и плотный слой лейкоцитов, преимущественно полиморфноядерных, среди которых встречаются и фагоцитирующие, и погибшие клетки. Имеются участки расплавления дермы. Хорошо развита грануляционная ткань, в составе клеток которой много лаброцитов, плазмоцитов и мононуклеаров, причем лаброциты встречаются и в стадии дегрануляции. Обнаруживаются веретеновидные, а также более зрелые клетки фибробластического ряда. Под грануляционной тканью располагаются макрофаги. Отмечается начало формирования рубцовой ткани. В ростковом слое эпидермиса и реже в волосяных фолликулах околораневой зоны встречаются одиночные делящиеся клетки. В глубоких отделах дермы обнаруживаются дегранулирующие лаброциты. Мышечные волокна собственной мышцы кожи характеризуются резким изменением тинкториальных свойств.

На 8-е сутки после нанесения ран струп начинает отторгаться, под струпом обнаруживается некротизированная ткань, а в глубине раны и по ее краям — хорошо сформированная грануляционная ткань. Собственная мышца кожи полностью лизирована. В зоне, окружающей рану, местами наблюдается пролиферация базальных клеток росткового слоя эпидермиса и эпителия волосяных фолликулов. Дериваты кожи сохранены. Мышечные волокна собственной мышцы ко-

жи разъединены лейкоцитарным инфильтратом. Вблизи собственной мышцы кожи обнаруживаются расширенные и заполненные кровью сосуды, а также тромбоз некоторых из них. Обращает на себя внимание большое количество лаброцитов, расположенных в глубине дермы. На месте подкожной клетчатки обнаруживается хорошо сформированная грануляционная ткань, инфильтрированная нейтрофильными лейкоцитами и мононуклеарами.

Через 12 суток по краям раны наблюдается подрастание эпителиального пласта под некротизированные участки. Фигуры митоза часто отмечаются в эпителии волосяных фолликулов и базальных клетках росткового слоя эпидермиса. Раневой дефект заполнен сформированной грануляционной тканью, переходящей в рубцовую. В глубине раневого дефекта встречаются крупные заполненные кровью сосуды. Мышечные волокна собственной мышцы кожи разъединены клеточным инфильтратом, состоящим, главным образом, из мононуклеаров; встречаются единичные макрофаги. В верхних слоях дермы наблюдаются преимущественно полиморфноядерные лейкоциты. В окружающей рану зоне встречается множество лаброцитов двух видов: содержащих плотно расположенные базофильные гранулы, целиком заполняющие цитоплазму, и дегранулирующих.

На 17-е сутки после нанесения ран наблюдается начало эпителизации раневого дефекта, который заполнен рубцовой соединительной тканью, инфильтрированной, главным образом, лимфоцитами. В зоне, окружающей рану, наблюдается пролиферация эпителия волосяных фолликулов, количество которых резко увеличено. В глубоких отделах дермы отмечается умеренное количество лаброцитов, встречаются единичные макрофаги.

На 22-е сутки многослойный эпителий с дифференциацией на слои обнаруживается только по краям раны. В центре раны, где имеется гной, эпителий отсутствует. В раневой зоне обнаруживается лейкоцитарная инфильтрация, большое количество плазмоцитов и гистиоцитов. В новообразованных сосудах эндотелий отличается увеличением размеров и слабобазофильной цитоплазмой. В глубоких слоях околораневой зоны отмечается большое количество лаброцитов, часть которых находится в стадии дегрануляции.

Через 27 суток после нанесения ран в большинстве случаев наблюдается лишь краевая эпителизация. В центре раневого дефекта еще обнаруживается гнойное отделяемое, в толще соединительной ткани встречаются абсцессы, а также расширенные и заполненные кровью сосуды. В глубине раневого дефекта имеются скопления плазмоцитов и сидерофагов. Кроме того, наблюдается умеренное количество тучных клеток в области раневого дефекта и околораневой зоне.

На 32-е сутки после нанесения ран обнаруживается полная эпителизация раневого дефекта, однако при этом отмечается изменение тинкториальных свойств эпидермоцитов. В центре раны базальные клетки росткового слоя эпидермиса уплощены и расположены беспорядочно, а непосредственно под ними в дерме обнаруживаются диффузно расположенные плазмоциты и гистиоциты. Граница между эпидермисом и дермой местами нечеткая ввиду плохо выраженной базальной мембраны. Под эпидермисом и в глубине раны обнаруживаются расширенные кровеносные сосуды, кое-где содержащие смешанные тромбы. В глубоких слоях дермы соединительная ткань состоит из тонких пучков коллагеновых волокон и фиброцитов. В глубине сетчатого слоя дермы околораневой зоны обнаруживаются расширенные кровеносные сосуды с тромбами в некоторых из них (рис. 2). Количество лаброцитов меньше, чем в предыдущие сроки.

У подопытных животных через одни сутки после криовоздействия обнаруживается струп большой толщины, отделяющийся от подлежащей ткани дермы плотным инфильтратом из полиморфноядерных клеток, под которым имеется грануляционная ткань, содержащая нейтро-

филы, а также лаброциты и макрофаги, расположенные диффузно и группами. В зоне, окружающей рану, эпидермис и волосяные фолликулы инфильтрированы лейкоцитами, структура и тинкториальные свойства клеток нарушены, а мышечные волокна собственной мышцы кожи разъединены мощными прослойками воспалительного инфильтрата.

Через 3-е суток после криовоздействия под струпом обнаруживается некротизирующаяся дерма. Грануляционная ткань располагается вблизи подкожной клетчатки. Она богата различными клетками, в том

числе лаброцитами, плазмócитами и макрофагами, а также клетками фибробластического ряда. Собственная мышца кожи местами полностью лизирована, и на ее месте обнаруживаются полиморфноядерные

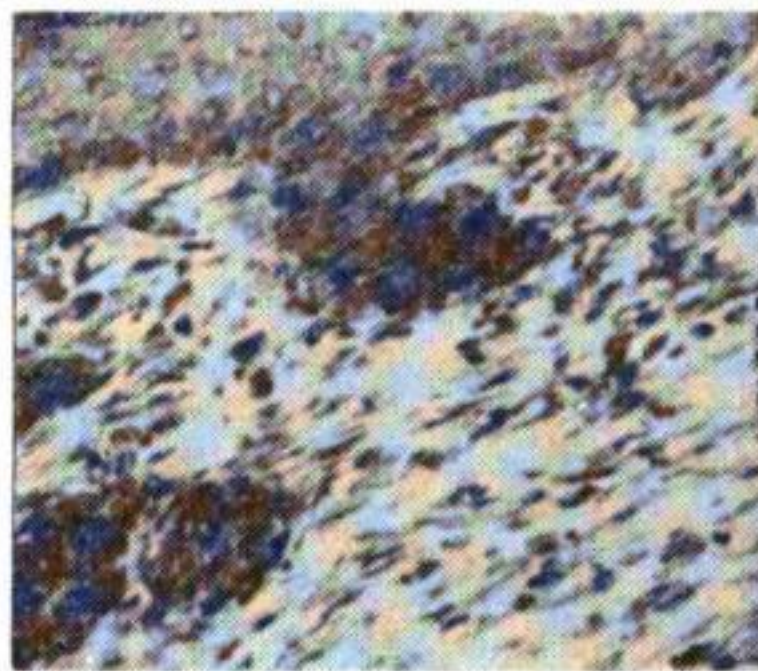
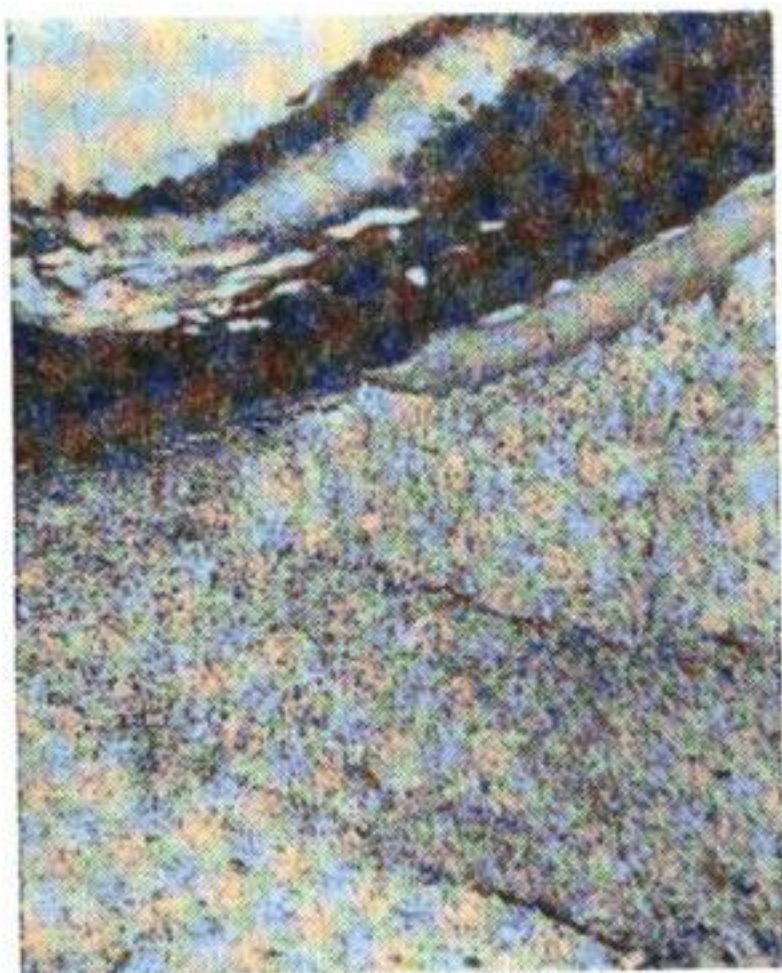


Рис. 3. Отторжение струпа и нарастание на раневой дефект эпителиального пласта через 6 суток после криовоздействия. Ван-Гизон. 7×20.

Рис. 4. Эпидермис с сосочками росткового слоя, вдающимися в ткань дермы, на 25-е сутки после криовоздействия на рану. Гематоксилин и эозин. 7×20.

лейкоциты. Зона, окружающая рану, содержит сморщенные нейтрофилы.

Через 6 суток после криовоздействия струп отторгается, чему, видимо, способствует и давление эпителиального пласта (рис. 3). Под струпом обнаруживается зрелая грануляционная ткань с большим количеством лаброцитов, заполненных гранулами и дегранулирующих. Отмечается начало формирования рубцовой ткани, в которой делящиеся фибробласты встречаются крайне редко. В окружающей рану зоне наблюдается гипертрихоз. В глубоких слоях дермы, а также между мышечными волокнами собственной мышцы кожи содержится много лаброцитов и макрофагов.

Через 10 суток после криовоздействия струп почти на всем протяжении раны отторгнут. Видна краевая эпителизация раневого дефекта, хорошо развита грануляционная ткань, очень богатая различными клеточными элементами. В глубине раневого дефекта между некротизированными мышечными волокнами собственной мышцы кожи и скелетных мышц имеются очаговые скопления макрофагов, плазмócитов и умеренное количество лаброцитов. В зоне, окружающей рану, наблюдаются пролиферация базальных клеток росткового слоя эпидермиса и большое количество волосяных фолликулов. В глубоких отделах дермы встречается множество кровеносных сосудов.

Через 15 суток после криовоздействия эпителизация раневого дефекта еще не закончена. В центре раны новообразованный эпителиальный пласт расслаивается гнойным отделяемым и отторгается вместе с ним. Расположенная под ним грануляционная ткань содержит расширенные и заполненные кровью сосуды, густо инфильтрирована лейкоцитами, главным образом мононуклеарами, и умеренным коли-

чеством сплошь разрушенных полиморфноядерных клеток. В околораневой зоне обнаруживается большое количество волосяных фолликулов, а в глубоких отделах дермы наблюдается умеренное количество периваскулярно расположенных лаброцитов.

На 20-е сутки после криовоздействия поверхность раны покрыта многослойным эпителием. В соединительной ткани, заполнившей раневой дефект, содержится много мононуклеаров, видны места закладки волос. В околораневой зоне наблюдается и умеренное количество лаброцитов.

Через 25 суток после криовоздействия в большинстве опытов наблюдается полная эпителизация раны. Эпителий дифференцирован на слои с сосочками, вдающимися в толщу соединительной ткани дермы (рис. 4). Рубцовая соединительная ткань представлена тонкими пучками коллагеновых волокон, между которыми обнаруживаются фиброциты и диффузно расположенные лимфоциты, кое-где образующие скопления. Встречаются отдельные плазмциты и сидерофаги. По краям раны происходит закладка волосяных фолликулов.

Через 30 суток после криовоздействия новообразованный эпидермис неравномерно утолщен, базальные клетки росткового слоя располагаются беспорядочно, изредка в них встречаются митозы. Граница между эпидермисом и дермой (базальная мембрана) местами выражена нечетко. В области беспорядочного расположения эпидермоцитов наблюдается увеличенная клеточность дермы за счет гистиоцитов, лимфоцитов и клеток фибробластического ряда. В глубоких отделах дермы и в подкожной клетчатке обнаруживаются скопления лимфоцитов вокруг кровеносных сосудов. Часть сосудов расширена, стенка их — без изменений структуры, однако в некоторых содержатся тромбы. В околораневой зоне в глубине дермы обнаруживается много лаброцитов.

Обсуждение. При сопоставлении данных, полученных при заживлении ран в обеих группах животных, в опыте уже через сутки после криовоздействия отмечаются некоторые отличия; толстый струп и более интенсивное формирование грануляционной ткани, отделенной от струпа плотным слоем полиморфноядерных лейкоцитов. Через 3-е сутки после криовоздействия на дне раны почти полностью отсутствует собственная мышца кожи, остатки волокон которой пронизаны полиморфноядерными лейкоцитами, в то время как в контроле наблюдается, главным образом, изменение тинкториальных свойств этой мышцы.

Через 6 суток после криовоздействия происходит отторжение струпа, чему способствует и давление нарастающего с боков эпителиального пласта. В эти же сроки в контроле лишь начинается отторжение струпа, под которым находится некротизированная ткань.

Таким образом, в ранние сроки, особенно на 6-е сутки после криовоздействия, видно ускорение очищения и эпителизации ран по сравнению с контролем, отмеченное ранее в экспериментах на кроликах [3]. Однако в дальнейшем, на 15-е сутки после криовоздействия, происходит расслоение и элиминация новообразованного эпителия из центра раны вместе с гнойным отделяемым, заканчивающаяся к 25-м суткам. В контроле повторное выделение гноя наблюдается на 22—27-е сутки.

Следовательно, очищение ран в опыте и контроле происходит дважды, и течение раневого процесса носит двухволновый характер, на что указывают также и другие авторы, изучавшие заживление ран [5]. Однако после криовоздействия сроки процесса заживления ран опережают контрольные.

Обращают на себя внимание и некоторые особенности клеточного состава в ранах в процессе их репарации: если в контроле большое количество лаброцитов наблюдается в течение 12-и суток и снижается к 17—32-м суткам, то после криовоздействия их много на 1—6-е сутки,

затем в период с 10-х по 20-е сутки количество их уменьшается, а к 30-м суткам, когда отмечается полная эпителизация ран, число лаброцитов в глубоких слоях дермы снова возрастает. Имеются указания, что лаброциты играют роль пускового механизма при заживлении ран, однако длительность их обнаружения и, главное, наличие в глубине под образовавшимся эпидермисом даже на 30-е сутки после криовоздействия свидетельствует о том, что роль этих клеток в процессе репарации значительно шире и связана с иммунологическими реакциями ткани. Об этом свидетельствует также и наличие плазмоцитов и макрофагов в ранах обеих групп животных.

Развитие рубцовой ткани, тесно связанное с клетками фибробластического ряда, происходит наиболее интенсивно на 12-е сутки после нанесения ран. При этом редко встречаются делящиеся клетки фибробластического ряда, хотя количество их явно возрастает. Вполне вероятно, что пополнение этих клеток происходит за счет малодифференцированных элементов соединительной ткани. Подобные наблюдения отмечены при экспериментальном изучении заживления гнойных ран [1, 6].

Следует отметить более раннее заживление ран при макроскопическом измерении их площади и резко выраженное влияние криовоздействия на микрофлору ран — намного превышающее величины всех остальных исследуемых параметров. Так, полное заживление ран с образованием тонковолокнистого рубца наступает на 15-е сутки после криовоздействия (в контроле — на 18-е сутки), в то время как снижение числа колоний на 96% наблюдается уже к 6-м суткам, сохраняясь на этом уровне и на 12-е сутки, что связано, вероятно, не с прямым действием холода на микрофлору, а с активной защитной клеточной реакцией, вызывающей гибель микроорганизмов.

Итак, воздействие холода приводит к определенному ускорению заживления ран. Более интенсивное их очищение после криовоздействия, наблюдаемое на 8-е сутки, можно объяснить криодеструкцией ткани, приводящей к некрозу и последующей элиминации некротизированной ткани вместе с находящейся в ней микрофлорой. Кроме того, существенным моментом исхода репаративного процесса является образование тонковолокнистой рубцовой ткани, заполняющей раневой дефект. Однако следует отметить, что и на 32-е сутки в подкожной клетчатке подопытных животных, несмотря на наблюдаемую нормализацию строения поверхностных слоев кожи, встречаются еще единичные очаги воспалительной инфильтрации, исход которых следовало бы уточнить при более поздних сроках наблюдения.

1. Музыкант Л. И., Каем Р. И., Журавлева М. В. Гистохимическое изучение раневого процесса в эксперименте. — В кн.: Первая Всесоюз. конф. по ранам и раневой инфекции: Тез. докл. — М., 1977, с. 30—32.
2. Исаев Ю. И. Дозированное местное охлаждение в лечении термических ожогов: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Харьков, 1980. — 25 с.
3. Панков Е. Я., Шенберг М. Г., Маркова О. П. и др. Морфологические особенности заживления гнойных ран при криовоздействии. — В кн.: Первая Всесоюз. конф. по ранам и раневой инфекции: Тез. докл. М., 1977, с. 34—35.
4. Сандомирский Б. П., Исаев Ю. И., Волина В. В. Холодовое лечение ожогов. — Киев: Наук. думка, 1981. — 104 с.
5. Саркисов Д. С., Пальцын А. А., Втюрин Б. В. и др. Функциональная морфология раневого процесса. — В кн.: Первая Всесоюз. конф. по ранам и раневой инфекции: Тез. докл. М., 1977, с. 5—7.
6. Grillo H. C. Origin of fibroblasts in wound healing: an autoradiographic study of inhibition of cellular proliferation by local X-irradiation. — *Ann. Surg.*, 1963, **157**, N 3, p. 453—467.

Ин-т пробл. криобиологии
и криомедицины АН УССР, Харьков

Получено 28.02.83

УДК 62—52:615:472.832.9

*А. С. Капрельянц, В. П. Гальчанский,
С. И. Ткаченко*

КОМПЛЕКС АВТОМАТИЗИРОВАННОЙ АППАРАТУРЫ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА ТКАНЕЙ ПРИ ЛОКАЛЬНОМ ОХЛАЖДЕНИИ

В настоящее время использование низких температур в различных областях медицины находит широкое применение. В то же время все большее внимание уделяется экспериментальным и теоретическим исследованиям, направленным на выяснение механизмов действия локального охлаждения на ткани и органы. При этом особое значение придается исследованию ультраструктурного уровня организации живого как морфологической основе протекания всех метаболических процессов, обеспечивающих функционирование клеток и тканей [1].

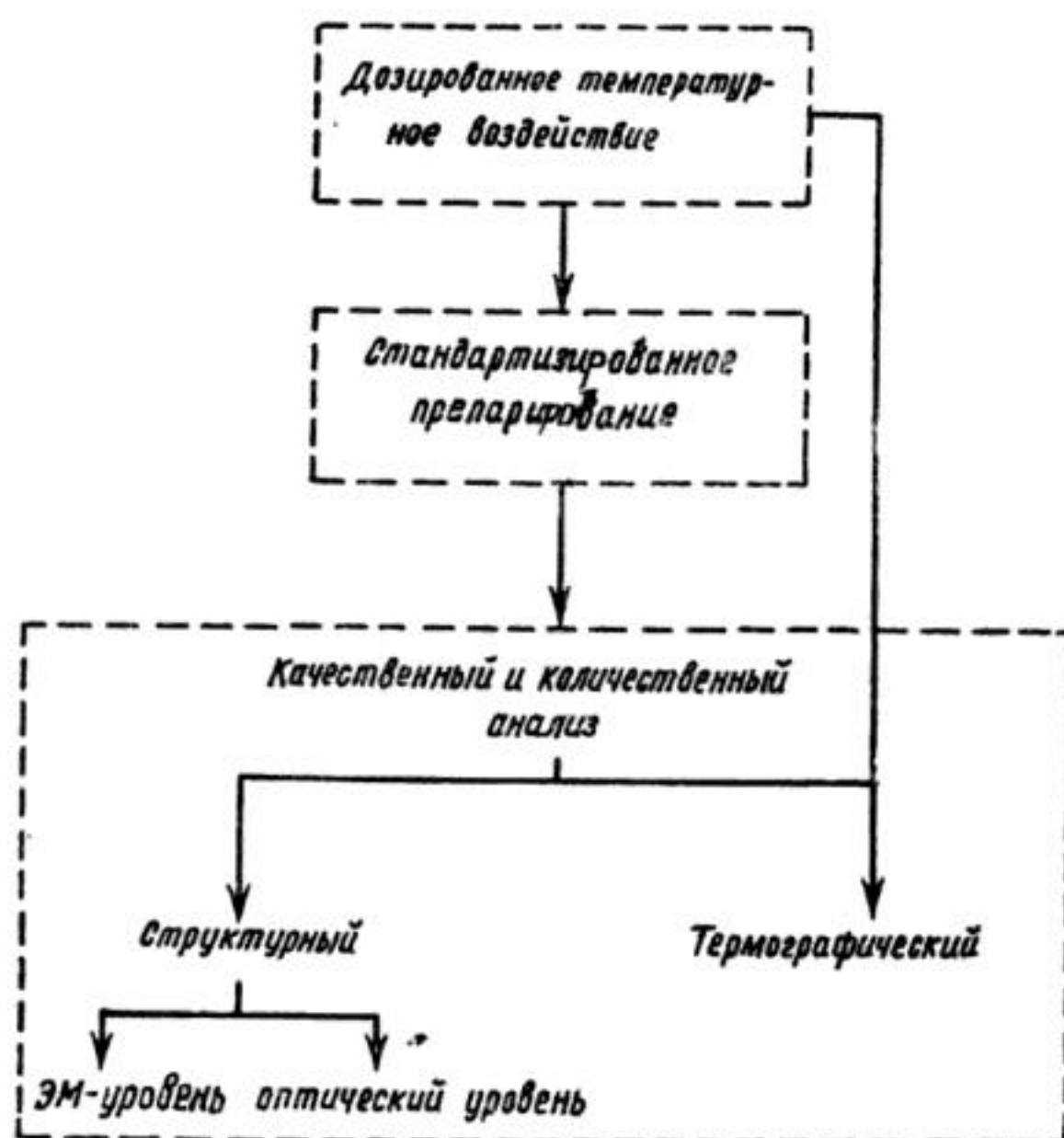
Большинство криомедицинских исследований укладывается в схему: холодное воздействие на объект — препарирование — анализ. Исходя из логики криомедицинского эксперимента и в соответствии с представлениями о технологии научных исследований как о системе мероприятий, оптимизирующих процесс получения новых знаний, представляется целесообразным рассмотреть и построение исследовательской аппаратуры как специализированного комплекса технических средств, наиболее полно реализующих выполнение технологических этапов всего эксперимента с минимизацией артефактов и обеспечивающих возможность получения и анализа новой информации.

Учитывая изложенное выше, нами разрабатывается автоматизированная проблемно-ориентированная лаборатория (АПОЛ) для криомедицинских исследований. Структурно АПОЛ построена в виде трех-уровневой системы (см. рисунок): блока холодного воздействия; блока препарирования; блока анализа.

Блок холодного воздействия предназначен для обеспечения дозированного температурного воздействия и возможности получения количественных характеристик объекта в процессе охлаждения. В состав блока холодного воздействия входит автоматизированная система охлаждения и регистрации температуры (криоинструмент исследовательский), включающая следующие технические средства: криоаппликатор с различными размерами рабочей части и источником холода (сосудом Дьюара с жидким азотом типа ССЖ-2); автоматический блок управления (варьирует скорость и конечную температуру охлаждения); система регистрации температуры (оценка пространственно-временной характеристики процесса охлаждения).

Блок препарирования предназначен для четкой стандартизации условий обработки объекта, что является необходимым требованием, обеспечивающим впоследствии возможность и корректность проведения метризации получаемой информации. В состав блока препарирования входят следующие технические средства: автоматизированная система контролируемой обработки ткани («АСКОТ») обеспечивает обработку объекта химическими реактивами заданный период времени; устройство для препарирования объекта по методу «замораживание—замещение» (визуализация локализации кристаллов льда).

Одной из основных частей комплекса является блок анализа, предназначенный для количественной оценки получаемой информации. Блок анализа имеет две подсистемы: автоматического анализа электронно-микроскопических изображений (включает трансмиссионный электронный микроскоп типа ЭВМ-100, А (К) или ЭВМ-100 БР, устройство связи с объектом «Растр» и мини-ЭВМ «СМ-1» [2]; автоматизированного морфологического анализа (включает устройство съема мор-



Функциональная блок-схема комплекса аппаратуры для криомедицинских исследований.

фологической информации с промежуточных носителей типа фотографии и негативы и микроЭВМ «Электроника-60М»).

В нашей стране и за рубежом большинство микроскопических и электронно-микроскопических исследований, в том числе выполняемых в области криомедицины, в настоящее время ведется субъективными методами визуальной оценки. Отсутствие объективных количественных оценок существенно снижает объем получаемых таким образом данных. Разрабатываемый комплекс автоматизированной аппаратуры обеспечивает возможность получения необходимого объема количественной информации о структуре и свойствах объекта в условиях локального охлаждения, обрабатывать его и проводить сопоставительный анализ величины «фактора воздействия» и «ответа объекта».

1. Пушкарь Н. С., Капрельянц А. С., Панков Е. Я. Ультраструктура клетки при низких температурах. — К.: Наук. думка, 1978. — 140 с.
2. Пушкарь Н. С., Капрельянц А. С. Введение в электронно-микроскопическую технику для медико-биологических исследований. — Киев: Наук. думка, 1982. — 109 с.

Ин-т пробл. криобиологии
и криомедицины АН УССР, Харьков

Получено 27.04.83

I. Теоретическая и экспериментальная криобиология

<i>Бабийчук Г. А., Логинов С. И., Арцыбушев Ю. Н., Козлов А. В., Белостоцкий А. В.</i> Изменение фазовой структуры систолы левого желудочка и электрокардиографических показателей под влиянием кранио-церебральной гипотермии у животных с инфарктом миокарда	3
<i>Баран Е. Я., Петрунь Н. М., Кримкевич Е. И., Цыбуляк Е. И.</i> Протекторная роль контрикала при подготовке почек к трансплантации	7
<i>Карташов В. Ф.</i> Исследование тератогенной активности полиэтиленоксида-1500	10
<i>Козлова В. Ф., Сигал Н. С.</i> Морфологическая характеристика эпителиальной и соединительной ткани печени животных при введении в организм криопротекторов	13
<i>Воловельская Е. Л., Грек А. М.</i> Влияние криопротекторов на структурные свойства лактатдегидрогеназы	19
<i>Бронштейн В. Л., Исерович П. Г.</i> Физико-математическая модель макроскопической поры в липидном бислое при фазовом переходе	22
<i>Стусь Л. К., Стрибуль Т. Ф., Куракса В. М.</i> Влияние постоянного, переменного и импульсного магнитного поля на некоторые параметры процесса криоконсервации суспензий эритроцитов	25
<i>Белич А. И.</i> Соматовегетативная характеристика форм покоя первичного сна, анабиоза и зимней спячки	27
<i>Данилова Л. Я., Федуров В. В.</i> Энергетические процессы в денервированных мышцах зимоспящих	33
<i>Карманова И. Г., Колаева С. Г., Крамарова Л. И., Аристакесян Е. А., Шиллинг Н. В., Хомутецкая О. Е., Сапожкова Г. Г.</i> Влияние экстракта кишки зимоспящего суслика (<i>Citellus undulatus</i> Pallas) на формы покоя первичного сна травяной лягушки	36
<i>Колдаев Я. Я., Кирпатовский В. И., Онищенко Н. А.</i> О возможности уменьшения повреждающего действия криопротекторов при криоконсервации	40
<i>Поленов А. Л.</i> Функциональная морфология гомори-положительной гипоталамо-гипофизарной нейросекреторной системы (ГГНС) в период зимнего оцепенения у пойкилотермных и гибернации у гомойотермных позвоночных	44
<i>Словиков Б. И., Невретдинова З. Г.</i> Влияние 5-окситриптофана на температуру мозга и потребление кислорода у арктических длиннохвостых сусликов во время гетеротермного сезона	47
<i>Федотчева Н. И., Миронова Г. Д., Кондрашова М. Н.</i> Ингибирование дыхания и K^+ -транспортирующей системы митохондрий при зимней спячке	50
<i>Федуров В. В., Мироненко В. И.</i> Регуляция обмена неомыляемых липидов у зимоспящих животных	54
<i>Эмирбеков Э. З., Абдуллаев Р. А., Кличханов Н. К.</i> Содержание аминокислот-нейромедиаторов в мозгу при глубокой гипотермии	56

II. Криоконсервирование биологических объектов

<i>Гольцев А. Н., Цуцаева А. А.</i> Особенности течения «вторичной болезни» у реципиентов с трансплантатом криоконсервированного костного мозга	60
<i>Гучок В. М., Козлова В. Ф., Карташов В. Ф., Верховская Л. З., Григорашенко А. И., Гучок М. М.</i> Функция и структура печени кроликов при введении малой дозы 1,2-пропандиола	65
<i>Чимишкян К. Л., Кострыкина В. Н., Белянчикова Н. И., Овумян Г. Ш., Удалов Г. А., Киртадзе М. Г.</i> Трансплантация криоконсервированных аллогенных клеток фетальной печени в эксперименте	70

III. Криомедицина

Сандомирский Б. П., Волкова Н. А., Исаев Ю. И. Состояние криоконсервированных аллотрансплантатов кожи	72
Запорожан В. Н., Литвиненко Т. М. Криохирургия в комплексном лечении гиперпластических процессов матки	76
Чередниченко В. М., Бездетко П. А. Использование криопротектора — полиэтиленоксида молекулярной массой 400 — при лечении глаукомы	78
Чередниченко В. М., Бездетко П. А., Станиславский Ю. Л. Опыт криотерапии заболеваний придаточного аппарата глаза	80
Шенберг М. Г., Волина В. В., Чеканов В. П., Высеканцев И. П. Заживление инфицированных ран после действия низких температур	82

IV. Криогенная техника

Капрельянц А. С., Гальчанский В. П., Ткаченко С. И. Комплекс автоматизированной аппаратуры для количественного анализа тканей при локальном охлаждении	88
--	----

I. Theoretical and Experimental Cryobiology

<i>Babiychuk G. A., Loginov S. I., Artsybushev Yu. N., Kozlov A. V., Belostotsky A. V.</i> Changes in the Phase Structure of Left Ventricle Systole and Electrocardiographic Indices Under the Influence of Craniocerebral Hypothermia in Animals with Myocardial Infarction	3
<i>Baran E. Ya., Petrun N. M., Krimkevich E. I., Tsybulyak E. I.</i> The Protective Role of Contrical During Preparation of Kidneys for Transplantation	7
<i>Kartashov V. F.</i> A Study of Teratogenous Activity of Polyethylene Oxide-1500	10
<i>Kozlova V. F., Sigal N. S.</i> Morphological Characteristics of Epithelial and Connective Tissues of the Animal Liver when Introducing Cryoprotectors into the Organism	13
<i>Volovelskaya E. L., Grek A. M.</i> Effect of Cryoprotectors on Structural Properties of Lactate Dehydrogenase	19
<i>Bronshtein V. L., Iserovich P. G.</i> A Physicomathematical Model of a Microscopic Pore in the Lipid Bilayer During Phase Transition	22
<i>Stus L. K., Stribul T. F., Kuraksa V. M.</i> Effect of a Constant, Variable and Pulse Magnetic Field on Certain Parameters of Cryopreservation Process of Erythrocyte Suspensions	25
<i>Belich A. I.</i> Somatic and Vegetative Characteristics of the Sleep-Like States of the Primary Sleep, Anabiosis and Hibernation	27
<i>Danilova L. Ya., Fedurov V. V.</i> Energetical Processes in Denervated Muscles of Hibernating Animals	33
<i>Karmanova I. G., Kolayeva S. G., Kramarova L. I., Aristakesyan E. A., Shilling N. V., Khomutetskaya O. E., Sapozhnikova G. G.</i> Influence of the Ground Squirrel (<i>Citellus undulatus</i> pal.) Intestine Extract upon Resting States of Primary Sleep of the Brown Frog	36
<i>Koldaev Ya. Ya., Kirpatovsky V. I., Onishchenko N. A.</i> A Possibility to Decrease the Injury Effect of Cryoprotectors During Cryopreservation	40
<i>Polenov A. L.</i> The Functional Morphology of Gomori-Positive Hypothalamohypophysial Neurosecretory System (HHNS) in the Period of Winter Torpor in Poikilotherms and Hibernation in Homoithermal Vertebrates	44
<i>Slovikov B. I., Nevretdinova Z. G.</i> The Influence of 5-oxytryptophan on the Brain Temperature and Oxygen Consumption in Arctic Long-Tailed Ground Squirrels During Heterothermic Season	47
<i>Fedotcheva N. I., Mironova G. D., Kondrashova M. N.</i> Inhibition of the Mitochondrial Respiration and K^+ -Transporting System During Hibernation	50
<i>Fedurov V. V., Mironenko V. I.</i> Regulation of Nonsaponifiable Lipid Metabolism in Hibernating Animals	54
<i>Emirbekov E. Z., Abdullaev R. A., Klichkanov N. K.</i> Neurotransmitter-Amino Acid Content in the Rat Brain During Deep Hypothermia	56

II. Cryopreservation of Biological Systems

<i>Goltsev A. N., Tsutsayeva A. A.</i> Peculiarities in the «Secondary Disease» Course in Recipients with Cryopreserved Bone Marrow Graft	60
<i>Guchok V. M., Kozlova V. F., Kartashov V. F., Verkhovskaya L. Z., Grigorashchenko A. I., [Guchok M. M.]</i> Function and Structure of the Rabbit Liver when Administering a Small Dose of 1,2-Propanediol	65
<i>Chimishkyan K. L., Kostrikina V. N., Belyanchikova N. I., Ovumyan G. Sh., Udalov G. A., Kirtadze M. G.</i> Experimental Transplantation of Cryopreserved Allogenic Cells of Fetal Liver	70

III. Cryomedicine

<i>Sandomirsky B. P., Volkova N. A., Isaev Yu. I.</i> The State of Cryopreserved Allografts of Skin	72
<i>Zaporozhan V. N., Litvinenko T. M.</i> Cryosurgery in Complex Treatment of Hyperplastic Processes of the Uterus	76
<i>Cherednichenko V. M., Bezdetko P. A.</i> The Use of Polyethylene Oxide with Molecular Mass of 400 as a Cryoprotector for Glaucoma Treatment	78
<i>Cherednichenko V. M., Bezdetko P. A., Stanislausky Yu. L.</i> Experience in Cryotherapeutics of Ocular Auxiliary Apparatus Diseases	80
<i>Shenberg M. G., Volinina V. V., Chekanov V. P., Vysekantsev I. P.</i> Healing of Infectious Wounds After Low-Temperature Effect	82

IV. Cryogenic Techniques

<i>Kapreliants A. A., Galchansky V. P., Tkachenko S. I.</i> A Complex of Automated Apparatus for Quantitative Analysis of Tissues under Local Cooling	88
---	----

УДК 615.832.9.032.91

Изменение фазовой структуры систолы левого желудочка и электрокардиографических показателей под влиянием кранио-церебральной гипотермии у животных с инфарктом миокарда / Бабийчук Г. А., Логинов С. И., Арцыбушев Ю. Н., Козлов А. В., Белостоцкий А. В. — Криобиология и криомедицина, 1984, вып. 15, с. 3—7.

Приведены данные фазовой структуры систолы левого желудочка у наркотизированных животных (собак) с экспериментальным инфарктом миокарда в условиях нормотермии и умеренной кранио-церебральной гипотермии. Исследована длительность отдельных фаз и периодов систолы левого желудочка, а также коэффициента Блюмбергера, ВСП, ИНМ при нормотермии и в условиях охлаждения. Показано, что скомпрометированный миокард при КЦГ находится в более благоприятных условиях, чем при нормотермии. Применяемый режим охлаждения в диапазоне температур 32—30 °С способствует улучшению трофики миокарда, повышает его функциональные возможности. Табл. 2.

УДК 57.043

Протекторная роль контрикала при подготовке почек к трансплантации / Баран Е. Я., Петрунь Н. М., Кримкевич Е. И., Цыбуляк Е. И. — Криобиология и криомедицина, 1984, вып. 15, с. 7—10.

На кроликах изучено влияние универсального ингибитора протеаз — контрикала на метаболические процессы и функцию почки при ишемии и гипотермической консервации. Установлено, что препарат стабилизирует энергетический метаболизм, оказывает нормализующее действие на активность ферментов цикла трикарбоновых кислот, что представляется существенным в условиях патологической перестройки обменных процессов, наблюдаемых в ишемизированных почках. Библиогр.: 13 назв.

УДК 57.043.547.422:618

Исследование тератогенной активности полиэтиленоксида-1500 / Карташов В. Ф. — Криобиология и криомедицина, 1984, вып. 15, с. 10—13.

Способность ПЭО-1500 индуцировать аномальный эмбриогенез была изучена на нелинейных белых крысах-самках с датированной беременностью. ПЭО-1500 в виде 20%-ного раствора вводили однократно парентерально в каждый из дней беременности с 1-го по 16-й день в дозе (5, 8 г/кг), десятикратно превышающей рекомендованную для клинического применения ПЭО-1500 в качестве криопротектора при низкотемпературном консервировании эритроцитов человека. Плоды 20-го дня развития исследовали общепринятым методом Уилсона. Показано, что ПЭО-1500 не обладает потенциальной тератогенной способностью. Получены также данные, косвенно свидетельствующие о том, что данный полимер не проникает через плацентарный барьер в плод. Библиогр.: 11 назв.

УДК 57.043:611.36—018.2—018.7:547.422.426.1

Морфологическая характеристика эпителиальной и соединительной ткани печени животных при введении в организм криопротекторов / Козлова В. Ф., Сигал Н. С. — Криобиология и криомедицина, 1984, вып. 15, с. 13—19.

Методами патологоанатомического, гистологического, гистохимического и автордиографического исследования установлена четкая зависимость «доза—время—эффект» в системе клетка—ткань—орган при введении в организм криопротекторов ПЭО-1500, ОЭГ-1412. Показаны адекватная динамика восстановительных процессов эпителиальной и соединительной ткани печени при введении веществ в малых и средних дозах, взаимопереход физиологической и репаративной регенерации, развитие компенсаторно-приспособительной и адаптивной реакции печени при введении веществ в больших дозах. Ил. 6. Библиогр.: 17 назв.

УДК 547.422.426.1:577.15

Влияние криопротекторов на структурные свойства лактатдегидрогеназы / Воловельская Е. Л., Грек А. М. — Криобиология и криомедицина, 1984, вып. 15, с. 19—22.

Изучены активность и флуоресцентные свойства изолированного M_4 -изофермента лактатдегидрогеназы в солевой среде в присутствии полиэтиленгликолей молекулярной массы 400, 1000, 4000 в 5-, 10-, 15%-ной конечной концентрации. Установлено, что в 10- и 15%-ной концентрации все изучавшиеся криопротекторы вызывали снижение активности лактатдегидрогеназы. Изменение активности M_4 -изофермента в присутствии криопротекторов коррелировало с изменением его флуоресцентных свойств. На основании полученных данных предполагается, что изменение функциональных свойств лактатдегидрогеназы может быть обусловлено непосредственным влиянием полиэтиленгликолей на структуру M_4 -изофермента. Табл. 2. Рис. 1. Библиогр.: 18 назв.

УДК 57.043:577.352:001.5

Физико-математическая модель макроскопической поры в липидном бислое при фазовом переходе / Бронштейн В. Л., Исерович П. Г. — Криобиология и криомедицина, 1984, вып. 15, с. 22—24.

Рассматривается физико-математическая модель макроскопической поры, возникающей в процессе затвердевания включения «жидкой» липидной фазы внутри более плотной растущей фазы липидов в бислое. Обсуждаются криобиологические следствия этого явления. Библиогр.: 6 назв.

УДК 57.043.621.3.029

Влияние постоянного, переменного и импульсного магнитного поля на некоторые параметры процесса криоконсервации суспензий эритроцитов / Стусь Л. К., Стрибуль Т. Ф., Куракса В. М. — Криобиология и криомедицина, 1984, вып. 15, с. 25—27.

Исследовано влияние постоянного, переменного и импульсного магнитного поля на скорость охлаждения суспензий эритроцитов и связь этого параметра с сохранностью клеток при криоконсервации. Показано, что ПМП, ПеМП и ИМП изменяют скорость кристаллизации суспензии эритроцитов. Лучшая эффективность омагничивания достигается в случае воздействия поля перед замораживанием и в процессе замораживания. Импульсное магнитное поле, на наш взгляд, является более перспективным для повышения сохранности эритроцитов при низкотемпературной консервации. Библиогр.: 9 назв.

УДК 591.186:597.544:599.321

Соматовегетативная характеристика форм покоя первичного сна, анабиоза и зимней спячки / Белич А. И. — Криобиология и криомедицина, 1984, вып. 15, с. 27—33.

Методом непрерывной поинтервальной регистрации сердечного ритма и двигательной активности с последующей математической обработкой экспериментальных данных на ЭВМ были изучены состояния естественного цикла бодрствование—первичный сон карликового сомика *Ictalurus nebulosus* и травяной лягушки *Rana temporaria*, а также состояние естественного анабиоза травяной лягушки и зимней спячки арктического суслика *Citellus Parryi* Rich. В результате сопоставления данных, полученных на холонокровных, с результатами литературных и собственных данных, полученных на теплокровных зимоспящих животных (арктический суслик), обсуждается вопрос о гомологии анабиоза холонокровных и зимней спячки теплокровных одной из форм покоя первичного сна позвоночных. Ил. 4. Табл. 1. Библиогр.: 23 назв.

УДК 616.74—009.85:591.543.42:577.3

Энергетические процессы в денервированных мышцах зимоспящих / Данилова Л. Я., Федуров В. В. — Криобиология и криомедицина, 1984, вып. 15, с. 33—36.

Зимняя спячка использована в качестве моделей для изучения роли активности нейрогенной дистрофии. Развитие нейродистрофического процесса в икроножной мышце бодрствующих сусликов после перерезки седалищного нерва сопровождается угнетением окислительных процессов и активацией гликолиза. Ведущим звеном в этих изменениях является деструкция митохондрий. Зимняя спячка ослабляет проявления нейрогенной дистрофии, а пробуждение, повышая потребности мышц в энергетическом обеспечении, увеличивает степень энергетических нарушений в денервированных мышцах. Анализ характера термодинамической зависимости СДГ в координатах Аррениуса свидетельствует о том, что при зимней спячке существуют внутриклеточные механизмы адаптации, не связанные с наличием нервного контроля. Библиогр.: 10 назв.

УДК 57.043.591.186:597.554.599.321

Влияние экстракта кишки зимоспящего суслика (*Citellus undulatus* Pallas) на формы покоя первичного сна травяной лягушки / Карманова И. Г., Колаева С. Г., Крамарова Л. И., Аристакесян Е. А., Шиллинг Н. В., Хомутецкая О. Е., Сапожкова Г. Г. — Криобиология и криомедицина, 1984, вып. 15, с. 36—40.

Впервые приводятся сравнительные нейрофизиологические данные, характерные для форм покоя первичного сна и гипобиоза травяных лягушек. Установлено, что введение экстракта, выделенного из кишки зимоспящего суслика в состоянии гипбернации, вызывает состояние, сопоставимое с одной из форм покоя первичного сна (П-2). Показано также, что в зимнее время года происходит значительная функциональная перестройка этой формы покоя и распределение волновых компонентов электроэнцефалограммы приближается к таковому при гипобиозе. Обсуждается вопрос о наличии функциональной гомологии П-2 первичного сна гипобиозу. Ил. 2. Библиогр.: 25 назв.

О возможности уменьшения повреждающего действия криопротекторов при криоконсервации / Колдаев Я. Я., Кирпатовский В. И., Онищенко Н. А. — Криобиология и криомедицина, 1984, вып. 15, с. 40—43.

Исследуется токсическое и защитное действие криопротекторов ДМСО и глицерина на лизосомы почек крыс. В качестве критерия повреждения был выбран выход фермента кислой ДНКазы II из лизосом почек. Установлено, что при концентрации криопротекторов в насыщающем растворе до 15% токсическое действие криопротекторов было выражено нерезко. При дальнейшем увеличении концентрации ДМСО и глицерина отмечалось увеличение внелизосомальной активности фермента, отражающее лабильность лизосомальных мембран и снижение общей активности кислой ДНКазы II, свидетельствующее о конформационных изменениях белковых молекул. Предварительное введение ДМСО животным позволило увеличить концентрацию ДМСО в консервирующем растворе до 30% без развития выраженных повреждений. При исследовании криопротекторного действия ДМСО на лизосомы почек крысы после замораживания и оттаивания было показано, что предварительное введение ДМСО значительно уменьшает их повреждение и выход фермента из лизосом по сравнению с контролем. Делается вывод о возможности уменьшения токсического действия и увеличения криогенного эффекта при предварительном введении ДМСО. Табл. 3. Библиогр. 8 назв.

Функциональная морфология гомори-положительной гипоталамо-гипофизарной нейросекреторной системы (ГГНС) в период зимнего оцепенения у пойкилотермных и гибернации у гомойотермных позвоночных / Поленов А. Л. — Криобиология и криомедицина, 1984, вып. 15, с. 44—47.

Суммированы данные сравнительного эколого-гистофизиологического исследования изменений ГГНС у пойкилотермных (рыбы, амфибии) в период зимнего оцепенения и гомойотермных гибернирующих млекопитающих. Показано, что у *Apaupia* в осенне-весенний период до «пробуждения» животных наблюдается снижение активности ГГНС и происходит депонирование нейросекрета. У гибернирующих сусликов с момента впадения в спячку и до ее середины в ГГНС наблюдаются те же процессы, однако в середине зимы нейросекреторная система постепенно активизируется. При этом по данным морфометрии активность ГГНС у сусликов ко времени пробуждения в два раза активнее, чем в начале спячки. Обсуждаются механизмы и пути нейроэндокринной регуляции и роль внешних и внутренних факторов в осуществлении гибернации. Библиогр.: 12 назв.

Влияние 5-окситриптофана на температуру мозга и потребление кислорода у арктических длиннохвостых сусликов во время гетеротермного сезона / Словигов Б. И., Невретдинова З. Г. — Криобиология и криомедицина, 1984, вып. 15, с. 47—50.

На пяти арктических длиннохвостых сусликах (*S. parryi* Richardsoni) массой 470—530 г зимой во время вхождения в спячку после повторных пробуждений изучалось влияние 5-окситриптофана (5-ОТФ — 50 мг/кг) на потребление кислорода (ПК) и температуру мозга (T_m). Полученные данные сравнивались с аналогичными показателями у интактных животных, входящих в спячку, а также с результатами аналогичных экспериментов подготовительного периода (август—сентябрь). Выявлено, что влияние 5-ОТФ на ПК зимой значительно меньше, чем осенью (снижение соответственно на 28 и 66% исходного уровня). Различия по T_m не выявлено. При сравнении ПК и T_m у интактных животных, входящих в спячку, и после введения 5-ОТФ отмечается некоторое сходство в динамике угнетения: в обоих случаях выявлено опережающее снижение ПК. Восстановление ПК после введения 5-ОТФ характеризуется «взрывным» подъемом этого показателя, сходного с быстрым повышением ПК у сусликов, пробуждающихся от зимней спячки. Показано также, что вхождение в спячку возможно в виде непрерывного процесса угнетения ПК и T_m ; в виде повторяющихся подъемов и спадов на фоне их постепенного угнетения. Предполагается, что меньший гипометаболический эффект 5-ОТФ зимой связан с активацией системы, осуществляющей депонирование серотонина. Вероятно, выявленные изменения реализуются через определенные взаимоотношения влияния нервной и нейрохимической компоненты регуляции. Ил. 3. Библиогр.: 13 назв.

УДК 591.104

Ингибирование дыхания и K^+ -транспортирующей митохондрий при зимней спячке / Федотчева Н. И., Миронова Г. Д., Кондрашова М. Н. — Криобиология и криомедицина, 1984, вып. 15, с. 50—54.

При окислении НАД-зависимых субстратов и янтарной кислоты ДНФ-стимулируемое дыхание МХ печени сусликов, находящихся в состоянии спячки, значительно ниже дыхания МХ бодрствующих сусликов. В основе торможения дыхания лежит ингибирование сукцинатдегидрогеназы щавелевоуксусной кислотой. Содержание ионов K^+ в МХ не меняется в периоды спячки и активности, но значительно возрастает в период пробуждения. Ингибирование K^+ -транспортирующей системы МХ в период спячки связано с понижением проницаемости МХ-мембраны и ослаблением энергообеспечения транспортных процессов. Гомеостаз ионов K^+ обеспечивает структурную целостность МХ при температуре зимней спячки. Адаптационные изменения МХ направлены на минимальную энергизацию и легко обратимы, что обеспечивает возможность перехода из одного физиологического состояния в другое. Ил. 1. Библиогр.: 13 назв.

УДК 612.351.11:577.158.8.013-06:591.543.42

Регуляция обмена неомыляемых липидов у зимоспящих животных / Федуров В. В., Мироненко В. И. Криобиология и криомедицина, 1984, вып. 15, с. 54—56.

Изучали включение $1\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетата и $2\text{-}^{14}\text{C}$ -мевалоната в убихинон и стерины срезами печени сусликов в весенне-летний и осенний периоды года. Животных брали в опыт в активном состоянии, во время спячки и при искусственном пробуждении. Изучали также действие предобработки на пробуждающихся сусликов введений циклогексимида — специфического ингибитора синтеза белка на скорость включения метки в убихинон и стерины. Показано, что синтез стерина в печени сусликов в состоянии спячки существенно уменьшается. Биохимический анализ показал, что это уменьшение скорости новообразования стерина обусловлено уменьшением скорости синтеза ферментов, катализирующих новообразование этих соединений. Табл. 3. Библиогр.: 11 назв.

УДК 612.80.015.612.58

Содержание аминокислот-нейромедиаторов в мозгу при глубокой гипотермии / Эмирбеков Э. З., Абдуллаев Р. А., Кличханов Н. К. — Криобиология и криомедицина, 1984, вып. 15, с. 56—59.

Изучено распределение нейромедиаторных аминокислот — глутаминовой, аспарагиновой, ГАМК, глицина, таурина в отделах мозга крыс в динамике пролонгированной (1 и 2 ч) гипотермии 20°C . Установлено, что в состоянии холодового «наркоза» отношение суммы возбуждающих медиаторных аминокислот (глутамата и аспарагата) к сумме тормозящих (ГАМК, глицин и таурин) снижается за счет повышения последних. Полученные результаты позволяют заключить, что механизм молекулярных процессов направлен на обеспечение тканей охлажденного мозга соответствующей концентрацией нейромедиаторов. Табл. 1. Библиогр.: 20 назв.

УДК 57.043.615.387:547.963.32

Особенности течения «вторичной болезни» у реципиентов с трансплантатом криоконсервированного костного мозга / Гольцев А. Н., Цуцаева А. А. — Криобиология и криомедицина, 1984, вып. 15, с. 60—65.

Проведено сравнительное изучение динамики и интенсивности развития «вторичной болезни» после трансплантации облученным мышам-реципиентам полуаллогенного криоконсервированного (-196°C) и нативного костного мозга. Установлено, что у мышей с трансплантатом криоконсервированного костного мозга начало развития «вторичной болезни» отмечается в более поздние сроки, а степень выраженности синдрома значительно снижена по сравнению с трансплантацией нативных миеокариоцитов. Показано более позднее накопление в лимфоидных органах мышей, защищенных криоконсервированным костным мозгом, РТПХ-активных Т-лимфоцитов, инициирующих развитие «вторичной болезни». Особенности развития последней связаны с изменением динамики формирования пула иммунокомпетентных Т-лимфоцитов в организме реципиентов, что обусловлено, по-видимому, ингибирующим влиянием факторов низкотемпературной консервации на процессы пролиферации и дифференцировки стволовых гемопоэтических клеток. Ил. 3. Табл. 1. Библиогр.: 20 назв.

УДК 57.043:612.35:547.43:615.9

Функция и структура печени кроликов при введении малой дозы 1,2-пропандиола / Гучок В. М., Козлова В. Ф., Карташов В. Ф., Верховская Л. З., Григорашенко А. И., Гучок М. М. — Криобиология и криомедицина, 1984, вып. 15, с. 65—69.

В субхронических опытах на половозрелых кроликах породы шиншилла установлено, что 1,2-пропандиол отечественного изготовления в дозе 1/20 ЛД-50 (0,6 г/кг) в 5%-ной концентрации раствора на физиологическом растворе при ежедневном внутривенном введении в течение 21 дня не нарушает функции и структуры печени. Ил. 5. Библиогр.: 14 назв.

УДК 616.15—092.9

Трансплантация криоконсервированных аллогенных клеток фетальной печени в эксперименте / Чимишкян К. Л., Кострыкина В. Н., Белянчикова Н. И., Овумян Г. Ш., Удалов Г. А., Киртадзе М. Г. — Криобиология и криомедицина, 1984, вып. 15, с. 70—71.

Приведены данные экспериментального изучения возможности эффективной защиты летально облученных нелинейных мышей криоконсервированными клетками аллогенной фетальной печени, полученными от многих доноров. Показана возможность замораживания фетальных клеток печени при сверхнизких температурах с сохранением их жизнеспособности по критерию экзоколониообразования. Гематологические исследования периферической крови, проведенные в динамике, а также данные кариологического изучения клеток костного мозга реципиентов, получивших аллогенные криоконсервированные клетки фетальной печени, свидетельствуют об успешном их приживлении и восстановлении кроветворения у нелинейных мышей после летального облучения. Табл. 1. Библиогр. 5 назв.

УДК 57.043:611.77:[615.014.41+617—089.843]

Состояние криоконсервированных аллотрансплантатов кожи / Сандомирский Б. П., Волкова Н. А., Исаев Ю. И. — Криобиология и криомедицина, 1984, вып. 15, с. 72—75.

Изучено морфофункциональное состояние трансплантированной криоконсервированной кожи человека. Гистологическое изучение биоптатов кожных лоскутов произведено на 4, 6—7, 10—12, 14—15 и 35-е сутки после аллотрансплантации криоконсервированной кожи 14 больным с глубокими термическими ожогами. Приведенные результаты позволяют оценить поведение деконсервированных аллотрансплантатов как временное приживление, сопровождающееся десквамацией эпидермиса и длительным сохранением дермы. Ил. 2. Библиогр.: 10 назв.

УДК 57.043

Криохирurgia в комплексном лечении гиперпластических процессов матки / Запорожан В. Н., Литвиненко Т. М. — Криобиология и криомедицина, 1984, вып. 15, с. 76—78.

Под наблюдением находилось 72 женщины с гиперпластическими процессами матки в климактерическом и постклимактерическом возрасте. После комплексного обследования им было проведено криогенное лечение с помощью установки, действующей по принципу принудительной циркуляции жидкого азота. У 40 больных проведена только криодеструкция эндометрия, полного излечения удалось добиться у 80% случаев. Больным с атипической гиперплазией и рецидивирующими формами железистой гиперплазии в комплексе лечения после криовоздействия назначалась гормонотерапия 17 ОПК. Хороший результат достигнут у 85% больных. При сочетании указанной патологии с фибромиомой матки после комбинированного криогормонального лечения у 12 женщин проведена локальная криодеструкция подслизистых миоматозных узлов при помощи криоэндоскопа, стойкое выздоровление отмечено у 10 больных. Таким образом, дифференцированный подход в выборе метода комбинированной криохирургии гиперпластических процессов матки позволяет повысить его эффективность и уменьшить объем необходимых лечебных манипуляций. Библиогр.: 14 назв.

УДК 57.043

Использование криопротектора — полиэтиленоксида молекулярной массы 400 — при лечении глаукомы / Чередниченко В. М., Бездетко П. А. — Криобиология и криомедицина, 1984, вып. 15, с. 78—80.

Представлены результаты применения криопротектора-полиэтиленоксида молекулярной массы 400 с целью снижения внутриглазного давления у больных первичной и вторичной глаукомами. Получены данные, свидетельствующие о снижении внутриглазного давления после перорального приема 50% водного раствора ПЭО-400 в количестве 1,5 г препарата на килограмм массы больного. Отмечен быстрый и выраженный гипотензивный эффект. Показана хорошая переносимость ПЭО-400, возможность его применения в терапии глаукомы. Библиогр.: 7 назв.

УДК 57.043

Опыт криотерапии заболеваний придаточного аппарата глаза /Чередниченко В. М., Бездетко П. А., Станиславский Ю. Л. — Криобиология и криомедицина, 1984, вып. 15, с. 80—82.

Прослежены результаты лечения 134 больных с различными заболеваниями придаточного аппарата глаза локальным криовоздействием с помощью универсальной криоофтальмологической установки УМ-14. Хорошие результаты получены при гемангиомах век, контагиозном моллюске, небольших множественных папилломах, раке кожи века, лимфангиомах и лимфангиоэктазиях конъюнктивы. Малоэффективным оказалось лечение при рецидивирующих птеригиомах. Библиогр.: 7 назв.

УДК 616—001.4—002.3:615.832.9

Заживление инфицированных ран после действия низких температур /Шенберг М. Г., Волина В. В., Чеканов В. П., Высеканцев И. П. — Криобиология и криомедицина, 1984, вып. 15, с. 82—87.

При экспериментальном исследовании процесса заживления инфицированных золотистым стафилококком ран после локального криовоздействия обнаружено ускорение очищения и эпителизации этих ран, а также образование на их месте тонковолокнистого рубца. Отмечается также резко выраженное влияние криовоздействия на микрофлору ран. Ил. 4. Библиогр.: 6 назв.

УДК 62—52:615.472.832.9

Комплекс автоматизированной аппаратуры для количественного анализа тканей при локальном охлаждении /Капрельянц А. С., Гальчанский В. П., Ткаченко С. И. — Криобиология и криомедицина, 1984, вып. 15, с. 88—89.

Приводится структурная схема автоматизированного комплекса аппаратуры для проведения криомедицинских исследований, которая представлена в виде трехуровневой системы: блока холодового воздействия, блока препарирования, блока анализа. Описывается назначение и состав технических средств, входящих в него. Ил. 1. Библиогр.: 2 назв.

UDC 615.832.9.032.91

Changes in the Phase Structure of Left Ventricle Systole and Electrocardiographic Indices Under the Influence of Craniocerebral Hypothermia in Animals with Myocardial Infarction /Babiyshuk G. A., Loginov S. I., Artsybushev Yu. N., Kozlov A. V., Belostotsky A. V. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1984, iss. 15, p. 3—7.

Data on the phase structure of left ventricle systole in narcotized animals (dogs) with experimental myocardial infarction under conditions of normothermia and mild craniocerebral hypothermia are given in this article. The duration of certain phases and periods of the left ventricle systole and the Blumberger coefficient, VSP, INM has been studied under normothermia and during cooling. It is shown that the compromised myocard under CCH is under more favourable conditions than under normothermia. Cooling from 32 to 30 °C contributes to the myocard trophics improvement and raises its functional possibilities. 2 tables.

UDC 57.043

The Protective Role of Contrical During Preparation of Kidneys for Transplantation /Baran E. Ya., Petrun N. M., Krimkevich E. I., Tsybulyak E. I. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1984, iss. 15, p. 7—10.

The influence of universal protease inhibitor—contrical—on metabolic processes and kidney function during ischemia and hypothermic preservation has been studied on rabbits. It is shown that the preparation stabilizes the energy metabolism, produces a normalizing effect on enzymes of the tricarboxylic acid cycle, which is essential under conditions of pathological reconstitution of metabolic processes, observed in ischemized kidneys. Refs: 13 titles.

UDC 57.043.547.422:618

A Study of Teratogenous Activity of Polyethylene Oxide-1500 /Kartashov V. F. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1984, iss. 15, p. 10—13.

The ability of PEO-1500 to induce anomalous embryogenesis was studied on nonstrain albino female rats with dated pregnancy. PEO-1500 in 20% solution was administered parenterally once each day of pregnancy (from the first to the 16th day) in a dose (5.8 g/kg) exceeding tenfold the dose recommended for clinical application of PEO-1500 as a cryoprotector at the time of low-temperature preservation of human erythrocytes. The foetus of the 20th day of development was investigated by the Wilson conventional method. PEO-1500 is shown not to have a potential teratogenous ability. In addition, data were obtained to indirectly show that the given polymer does not penetrate through the placenta barrier into the foetus. Refs: 11 titles.

UDC 57.043:611.36—018.2—018.7:547.422.426.1

Morphological Characteristics of Epithelial and Conjunctive Tissues of the Animal Liver when Introducing Cryoprotectors into the Organism / Kozlova V. F., Sigal N. S. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1984, iss. 15, p. 13—19.

A precise „dose-time-effect“ dependence in the cell-tissue-organ system when introducing cryoprotectors PEO-1500, OEG-1412 into the organism has been established by methods of pathoanatomical, histological, histochemical and autoradiographical investigations. The latter were performed to show adequate dynamics of recovery processes in epithelial and conjunctive tissues of the liver when administering the substances in small and mean doses, intertransition of physiological and reparation regeneration, development of compensator-accomodative and adaptive response of the liver when introducing the substances in large doses. 6 figs. Refs: 17 titles.

UDC 547.422.426.1:577.15

Effect of Cryoprotectors on Structural Properties of Lactate Dehydrogenase / Volovelskaya E. L., Grek A. M. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1984, iss. 15, p. 19—22.

Activity and fluorescent properties of the isolated M_4 -isoenzyme of lactate dehydrogenase have been studied in salt medium in the presence of polyethylene glycols with molecular mass of 400, 1000, 4000 and of 5, 10, 15% final concentration. It is stated that all the studied cryoprotectors of 10 and 15% concentration caused a decrease in the lactate dehydrogenase activity. The alteration of M_4 -isoenzyme activity in the presence of cryoprotectors correlated with alteration of its fluorescent properties. On the basis of the data obtained it is supposed that changes in functional properties of lactate dehydrogenase may be due to an effect of polyethylene glycols on the structure of M_4 -isoenzyme. 1 fig. 2 tables. Refs: 18 titles.

UDC 57.043:577.352.001.5

A Physicomathematical Model of a Microscopic Pore in the Lipid Bilayer During Phase Transition / Bronshtein V. L., Iserovich P. G. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1984, iss. 15, p. 22—24.

A physicomathematical model is discussed for a microscopic pore formed during solidification of the inclusion of the liquid lipid phase in a denser growing lipid phase in the bilayer. Cryobiological aspects of this phenomenon are considered. Refs: 6 titles.

UDC 57.043.621.3.029

Effect of a Constant, Variable and Pulse Magnetic Field on Certain Parameters of Cryopreservation Process of Erythrocyte Suspensions / Stus L. K., Stribul T. F., Kuraksa V. M. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1984, iss. 15, p. 25—27.

It is studied how a constant, variable and pulse magnetic field influences the erythrocyte suspension cooling rate and how this parameter is connected with cell preservation during cryoconservation. It is shown that CMF, VMF and PMF change the rate of erythrocyte suspension crystallization. Best efficiency of magnetizing is achieved in the case of field effect before freezing as well as during freezing process. The pulse magnetic field is more effective for an erythrocyte preservation during low-temperature conservation. Refs: 9 titles.

UDC 591.186:597.544:599.321

Somatic and Vegetative Characteristics of the Sleep-Like States of the Primary Sleep, Anabiosis and Hibernation / Belich A. I. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1984, iss. 15, p. 27—33.

Studies have been made on the heart rate and motor activity during primary sleep in calfish and frog *Rana temporaria*, on anabiosis in frog *Rana temporaria* and winter hibernation in the arctic long-tailed ground squirrel *Citellus Parryi* Rich. Significant similarities were found in dynamics of the heart rate and motor activity under those conditions. Functional homology is established for one of the forms of the sleep-like state of primary sleep, anabiosis of poikilotherms and hibernation of homoiotherms. 4 figs. 1 table. Refs: 23 titles.

UDC 616.74—009.85:591.543.42:577.3

Energetical Processes in Denervated Muscles of Hibernating Animals / Danilova L. Ya., Fedurov V. V. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1984, iss. 15, p. 33—36.

Hibernation was used as a model for studying the role of activity in pathogenesis of neurogenic dystrophy. The development of neurodystrophic process in the calf muscle of awakened ground squirrels after denervation of the ischiadic nerve was accompanied by depression of oxidizing processes and glycolysis activation. The main role in those changes is attributed to mitochondrion destruction. Hibernation decreased neurogenic dystrophy and awakening, while increasing muscle needs in energy supply, increased the degree of energy breakdowns in denervated muscles. The analysis of thermodynamical dependence of SDH in Arrhenius plots shows that during hibernation there exist intracellular mechanisms of adaptation, which are not connected with the nerve control. Refs: 10 titles.

UDC 57.043.591.186:597.554:599.321

Influence of the Ground Squirrel (*Citellus undulatus* pal.) Intestine Extract upon Resting States of Primary Sleep of the Brown-Frog / Karmanova I. G., Kolayeva S. G., Kramarova L. I., Aristakesyan E. A., Shilling N. V., Khomutetskaya O. E., Sapozhnikova G. G. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1984, iss. 15, p. 36—40.

For the first time comparative neurophysiological data typical of forms of rest and hypobiosis are presented for the brown frog. The injection of extract from the ground squirrel gut during hibernation was found to evoke the condition comparable with one of the resting states of primary sleep (SLS-2). It is also shown that a significant functional transformation of this form of rest occurs during the winter period, and the EEG wave distribution approaches this state during hypobiosis. Functional homology is observed between SLS-2 of the primary sleep and hypobiosis. 3 figs. Refs: 25 titles.

UDC 57.043

A Possibility to Decrease the Injury Effect of Cryoprotectors During Cryopreservation / Koldaev Ya. Ya., Kirpatovsky V. I., Onishchenko N. A. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1984, iss. 15, p. 40—43.

Cryoprotectors DMSO and glycerol have been studied for their toxic and protective effects on renal lysosomes in rats. Acidic DNAases II release from renal lysosomes was chosen as a damage criterion. The studies have shown that the toxic effect of cryoprotectors in a saturated solution with cryoprotection concentration up to 15% was not pronounced. Further increase of DMSO and glycerol concentration resulted in an increase of extralysosomal enzyme activity associated with lysosomal membrane labilization and reduction of the total activation of acidic DNAase II, due to conformational changes in protein molecules. Preliminary DMSO injection to animals enabled a 30% increase in the DMSO concentration in the preserving solution without development of manifested injuries. Studies of cryoprotective DMSO effect on renal lysosomes in rats after freezing and thawing have shown that the preliminary DMSO injection considerably reduced their damage and release from lysosomes as compared with the control experiment. A conclusion has been made on possibility to reduce the toxic action and to increase the cryogenic effect due to a preliminary DMSO injection. 3 tables. Refs: 8 titles.

UDC 591.543.42+612.822

The Functional Morphology of Gomori-Positive Hypothalamohypophyseal Neurosecretory System (HHNS) in the Period of Winter Torpor in Poikilotherms and Hibernation in Homoiothermal Vertebrates / Polenov A. L. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1984, iss. 15, p. 44—47.

Results are presented for comparative ecologo-histophysiological studies of changes in HHNS of poikilotherms (fish, amphibia) during winter torpor and homoiothermic hibernating mammals. Activity of HHNS decreases and storing of neurosecretory material is observed in Anamnia during the autumn-spring period up to arousal from torpor. Similar processes occur in hibernating ground squirrels beginning onset of hibernation and up to the middle (December) of it. However at this time (December) a gradual activation of HHNS occurs. Morphometric data give evidence that the HHNS activity in ground squirrels is twice higher at the time of arousal than at the beginning of hibernation. Mechanisms and pathways of neuroendocrine regulation as well as the role of external and internal factors in realization of hibernation are discussed. Refs: 12 titles.

The Influence of 5-Oxytryptophan on the Brain Temperature and Oxygen Consumption in Arctic Long-tailed Ground Squirrels During Heterothermic Season / Slovikov B. I., Nevretdinova Z. G. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1984, iss. 15, p. 47—50.

It is revealed that the hypometabolic effect of 5-OTP in arctic ground squirrels is not so marked in winter as compared with autumn (decreasing O_2 consumption from the basal level to 28 and 66%, respectively). It is also shown that entering hibernation is possible in the following way: a) as a process of continuous depression of O_2 consumption and the brain temperature; b) as a process of cyclic repeated increases and decreases similar to the known „drop-test“ phenomenon. 3 figs. Refs: 13 titles.

Inhibition of the Mitochondrial Respiration and K^+ -Transporting System During Hibernation / Fedotcheva N. I., Mironova G. D., Kondrashova M. N. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1984, iss. 15, p. 50—54.

DNP-stimulated respiration of liver mitochondria during oxidation of both NAD-dependent substrates and succinate is much lower in hibernating versus active squirrels. It is shown that the inhibition of succinate dehydrogenase by oxaloacetate underlies the diminishing of respiration at hibernation. The content of K^+ ions is unchanged during hibernation but it significantly increases in arousing from hibernation. The rate of K^+ transport both passive and energy-dependent decreases in mitochondria of hibernating squirrels. This inhibition is connected with a decrease in the membrane permeability for K^+ ions. Inhibition of the K^+ -transporting mitochondrial system seems to maintain the ion homeostasis and the mitochondrial structure during hibernation. This alteration of mitochondrial metabolism is connected with minimal energy-production and is reversible. This, in turn, provides a possibility for transition of animals from one physiological state to another. 2 figs. Refs: 13 titles.

Regulation of Nonsaponifiable Lipid Metabolism in Hibernating Animals / Fedurov V. V., Mironenko V. I. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1984, iss. 15, p. 54—56.

Studies have been made on the incorporation of $1-^{14}C$ -acetate and $2-^{14}C$ -mevalonate into ubiquinone and sterols in slices of the ground squirrel liver during spring-summer and autumn periods of the year. Slices have been studied from hibernating, non-hibernating and arousing animals. Studies have been made for an effect of cycloheximide (a specific inhibitor of protein biosynthesis) on the rate of label incorporation into ubiquinone and sterols. It is observed that the sterol biosynthesis in the liver considerably decreases during hibernation. Biochemical analysis shows that this inhibition of the rate of sterol biosynthesis is caused by diminishing of the synthesis rate of enzymes which catalyzes new formation of those compounds. 3 tables. Refs: 10 titles.

Neurotransmitter-Amino Acid Content in the Rat Brain During Deep Hypothermia / Emirbekov E. Z., Abdullaev R. A., Klichkhanov N. K. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1984, iss. 15, p. 56—59.

Regional distribution of neurotransmitter amino acids — glutamate, aspartate, GABA, glycine and taurine — was studied in rat brain parts in dynamics of prolonged (1 and 2 h) $20^\circ C$ hypothermia. It is found that in the state of cold „narcosis“ the relation of the sum of exciting mediative amino acids (glutamate, aspartate) to the sum of inhibitory amino acids (GABA, glycine, taurine) lowers due to an increase of the latter. The results necessitate a conclusion that the molecular mechanism is directed to a supply cooled brain tissues with suitable concentration of neurotransmitters. 1 table. Refs: 20 titles.

Peculiarities in the „Secondary Disease“ Course in Recipients with Cryopreserved Bone Marrow Graft / Goltsev A. N., Tsutsayeva A. A. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1984, iss. 15, p. 60—65.

A comparative study is performed on dynamics and intensity of the „secondary disease“ development after transplantation of semi-allogenic cryopreserved (-196°C) and native bone marrow to irradiated recipient mice. It is stated that there occurs a later development of the „secondary disease“ among mice with cryopreserved bone marrow graft, the degree of syndrome manifestation greatly decreases in comparison with transplantation of native myelokariocytes. It is shown that RTPX-active T-lymphocytes which initiate development of the „secondary disease“ get accumulated in lymphoid organs of mice protected with cryopreserved bone marrow. Peculiarities of the „secondary disease“ development are connected with changes in dynamics of immunocompetent T-lymphocyte pool forming in the recipient organism due to an inhibitory effect of low-temperature preservation on the process of proliferation and differentiation of stem hemopoietic cells. 3 figs. 1 table. Refs: 20 titles.

Function and Structure of the Rabbit Liver when Administering a Small Dose of 1,2-Propanediol / Guchok V. M., Kozlova V. F., Kartashov V. F., Verkhovskaya L. Z., Grigorashchenko A. I., Guchok M. M. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1984, iss. 15, p. 65—69.

It has been found that in subchronic experiments with adult Chinchilla rabbits, home-made 1,2-propanediol in a dose of $1/20$ LD-50 (0.6 g/kg) in 5% concentration (in saline solution) does not effect the liver function and structure when daily injected during 21 days. 5 figs. Refs: 14 titles.

Experimental Transplantation of Cryopreserved Allogenic Cells of Fetal Liver / Chimishkyan K. L., Kostrikina V. N., Belyanchikova N. I., Ovumyan G. Sh., Udalov G. A., Kirtadze M. G. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1984, iss. 15, p. 70—71.

Data are given for an experimental study of possibility to effectively protect lethally irradiated nonlinear mice by cryopreserved cells of the allogenic fetal liver got from many donors. It is shown possible for fetal liver cells to be frozen at super-low temperatures with preservation of their viability according to exocolony formation. Haematological studies of the peripheral blood, done in dynamics, and also data of the karyological study of the bone marrow cells of recipients which received allogenic cryopreserved fetal liver cells give evidence for their survival and reconstitution of haemopoiesis in nonlinear mice after lethal irradiation. 1 table. Refs: 5 titles.

The State of Cryopreserved Allografts of Skin / Sandomirsky B. P., Volkova N. A., Isaev Yu. I. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1984, iss. 15, p. 72—75.

The morphological and functional state of transplanted cryopreserved human skin has been studied. Histological investigation of skin graft biopsies was made on the 4th, 6-7th, 10-12th, 14-15th and 35th day after allotransplantation of cryopreserved skin to 14 patients with deep thermal burns. Given results made it possible to evaluate the behaviour of thawed allografts as a temporary survival accompanied by desquamation of epidermis and long-term derma preservation. 2 figs. Refs: 10 titles.

Cryosurgery in Complex Treatment of Hyperplastic Processes of the Uterus / Zaporozhan V. N., Litvinenko T. M. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1984, iss. 15, p. 76—78.

72 women with hyperplastic processes of the uterus in climax and post-climax age were under study. After complex investigation they were given a cryogenic treatment with a device which worked at the principle of compulsory circulation of liquid nitrogen. 40 patients were given only a cryodestruction of endometrium resulting in complete cure for 80% of cases. Patients with atypical hyperplasia and recurrent forms of gland hyperplasia after cryoeffect were given hormonotherapy 17 OPK. Good results were observed in 85% of cases. In combination of the mentioned pathology with the uterus fibromyoma 12 women were given local cryoendoscope after a combined cryohormonal treatment, good cure was observed in 10 patients. The differential approach to choosing the method of combined cryosurgery of hyperplastic processes of the uterus permits enhancement of its effectiveness and reduction in the volume of necessary treatment manipulations. Refs: 14 titles.

UDC 57.043

The Use of Polyethylene Oxide with Molecular Mass of 400 as a Cryoprotector for Glaucoma Treatment / Cherednichenko V. M., Bezdetko P. A. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1984, iss. 15, p. 78—80.

Results are given for utilization of the PEO-400 cryoprotector for lowering the intraocular pressure in patients with primary and secondary glaucomas. Data are obtained to show lowering of the intraocular pressure after oral uptake of 50% aqueous solution of PEO-400 in a dose of 1.5 g per kilogramm of the patient mass. Effect of quick and pronounced hypotension is observed. Good tolerance for PEO-400 and possibility of its use in glaucoma therapy are shown. Refs: 7 titles.

UDC 57.043

Experience in Cryotherapeutics of Ocular Auxiliary Apparatus Diseases / Cherednichenko V. M., Bezdetko P. A., Stanislavsky Yu. L. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1984, iss. 15, p. 80—82.

Results of treatment by the local cryoinfluence with the help of the universal cryoophthalmological device UM-14 are analyzed for 134 patients with various ocular auxiliary apparatus diseases. This method is efficiently applied for treating hemangiomas of eyelids, molluscum contagiosum, small numerous papillomas, eyelid skin cancer, lymphangiomas and lymphangiectasias of conjunctiva. The treatment of recurring pterygiums turned out to be of little effectiveness. Refs: 7 titles.

UDC 616—001.4—002.3:615.832.9

Healing of Infectious Wounds After Low-Temperature Effect / Shenberg M. G., Volina V. V., Chekanov V. P., Vysekantsev I. P. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1984, iss. 15, p. 82—87.

An experimental study of healing wounds infected with golden staphylococcus after local cryoeffect resulted in stating an acceleration of cleaning and epithelization of these wounds and formation on their place a thin-fibre cicatrix. It is also found that the cryoeffect on the wound microflora is clearly pronounced. 4 figs. Refs: 6 titles.

UDC 62—52:615.472.832.9

A Complex of Automated Apparatus for Quantitative Analysis of Tissues under Local Cooling / Kapreliants A. S., Galchansky V. P., Tkachenko S. I. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1984, iss. 15, p. 88—89.

The block diagram of the automated complex of equipment for conducting cryo-medical investigations represents a three-level system: a unit for cold effect, a preparation unit and an examination unit. Technical means that form the complex are described with respect to their purpose and structure. 1 fig. Refs: 2 titles.



1 р. 50 к.

НАУКОВА ДУМКА

Криобиология и криомедицина, 1984, вып. 15, 1—104.