

ISSN 0233-7673

КРИОБИОЛОГИЯ

3 | 86



283

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

EDITORIAL BOARD

V. I. GRISHCHENKO (Editor-in-Chief), A. M. BELOUS (Associated Editor), Yu. P. BLAGOJ, A. M. BRAZHNIKOV, R. G. BUTENKO, B. N. VEPRINTSEV, V. I. GOLDANSKY, V. I. LUGOVOJ, F. I. OSTASHKO, E. Ya. PANKOV, L. A. PIRUZYAN, N. S. PUSHKAR, B. P. SANDOMIRSKY, A. S. SNURNIKOV, K. M. SYTNIK, A. M. UTEVSKY, A. G. FEDOTENKOV, A. A. TSUTSAYEVA, V. I. SHUMAKOV, T. N. YURCHENKO

EDITORIAL COUNCIL

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

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

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

Сдано в набор 15.04.86. Подп. в печ. 23.06.86. БЦ 09306. Формат 70×108/16. Выс. печ. Усл. печ. л. 4,90. Уч. изд. л. 5,94. Усл. кр.-отт. 5,60. Тираж 1000 экз. Заказ № 6-162

Отпечатано с матриц Харьковской книжной фабрики им. М. В. Фрунзе в Харьковской городской типографии № 16. 310003, Харьков, Университетская, 16. Зак. 1153.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ОТДЕЛЕНИЕ ФИЗИОЛОГИИ

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ
И ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

КРИОБИОЛОГИЯ

3 1986

ВСЕСОЮЗНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ОСНОВАН В 1985 ГОДУ
ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

КИЕВ НАУКОВА ДУМКА 1986

СОДЕРЖАНИЕ

Афонькин С. Ю., Калинина Л. В. Генетические эффекты гипотермии	3
Кирпатовский В. И., Жукаускас Г. Ю., Игльвичюте Я. С., Онищенко Н. А. Бес- перфузионная гипотермическая консервация почек с использованием криопротекторов	6
Чайковский Ю. Б., Яценко В. П., Когут Г. И., Галич С. П. Криоконсервация периферических нервов и результаты экспериментальной аллонейропластики дефектов нервных стволов	11
Бабийчук Л. А., Спирин М. М., Белевич Г. В., Бондаренко В. А., Белоус А. М. Исследование влияния изменений тоничности среды на структуру мембраны цельных эритроцитов в интервале температур от 0 до 37 °С с помощью флуорес- центных зондов	14
✓ Нардид О. А., Моисеев В. А., Межидов С. Х. Исследование влияния низких тем- ператур на фазовое состояние цитозоля эритроцитов	18
Гордон Р. Я., Бочарова Л. С., Архипов В. И. Синтез РНК в мозге зимоспящих	20
Репко О. В. Динамика накопления иммуноглобулина G в тканях донора и реци- пиента при аллотрансплантации криоконсервированной роговицы	22
Мяделец О. Д., Суханов А. Ф. Роль тканевых базофилов дермы в изменении со- стояния капиллярного русла и водного обмена кожи белых крыс при общей глу- бокой гипотермии и в постгипотермическом периоде	25
Войтенко А. И. Оценка погрешности измерения размеров зоны замораживания в криохирургии методом ультразвуковой локации	29
Репин Н. В. Изучение вне- и внутриклеточной кристаллизации в эритроцитах человека при различных условиях охлаждения	31
Капрельянц А. С., Марченко Л. Н., Матяш И. П. Ультраструктурный анализ методом замораживания — замещения деструкции ткани печени при локальном замораживании	36
Павленко Р. А., Куденко Ю. А. Исследование действия высокого давления и тем- пературы на биологические объекты	39
Сидякина Т. М., Тараканчиков А. И., Чумакова М. Ю. Кассетная система для хранения микроорганизмов в жидком азоте в хранилищах ХБ-0,5	42

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Гордиенко В. М., Миляновский А. И., Муськин Ю. Н., Жарков Я. В., Сенчук А. Я., Мельничук В. Д. Характер цитологических изменений при эпи- телиальной дисплазии шейки матки после криотерапии	44
Дахно Ф. В., Долгина Р. Е., Каталевская Л. Г., Белоношко А. П. Сохранность ооцитов свиньи при кратковременном содержании их в фолликулах	45

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

This One



XOHN-AKL-2Z4P

<i>Кудогоцева О. В., Бальбердина Л. М.</i> Свойства дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i> в зависимости от условий криоконсервирования и воздействия физико-химических факторов	46
<i>Петренко А. Ю.</i> Взаимосвязь ионотранспортирующих систем в мембранах митохондрий после замораживания — отогрева	47
<i>Стрибуль Т. Ф.</i> Применение экспоненциальных режимов охлаждения при криоконсервировании биообъектов	48
<i>Коптелов В. А.</i> Структурные изменения плазматической мембраны изолированных гепатоцитов при замораживании	49

ХРОНИКА

III Всесоюзное научное совещание «Химия низких температур»	50
Научная конференция по проблеме «Холодовая травма»	51
Защита диссертаций	52

CONTENTS

<i>Afonkin S. Yu., Kalinina L. V.</i> Genetic effects of hypothermia	3
<i>Kirpatovsky V. I., Zhukauskas G. Yu., Iglyavichute Ya. S., Onishchenko N. A.</i> Non-perfusional hypothermic renal preservation using cryoprotectants	6
<i>Chaykovsky Yu. B., Yatsenko V. P., Kogut G. I., Galich S. P.</i> Cryopreservation of peripheral nerves and the results of experimental alloneuroplasty of nerve trunk gaps	11
<i>Babiyshuk L. A., Spirin M. M., Belevich G. V., Bondarenko V. A., Belous A. M.</i> Investigation of the effect of changing the medium tonicity on the membrane structure of intact erythrocytes in the temperature range of 0 to 37 °C using fluorescent probes	14
<i>Nardid O. A., Moiseyev V. A., Mezhydov S. Kh.</i> Investigation of the effect of low temperature on the phase state of erythrocyte cytosol	18
<i>Gordon R. Ya., Bocharova L. S., Arkhipov V. I.</i> Synthesis of RNA in hibernator brain	20
<i>Repko O. V.</i> The dynamics of accumulation of immunoglobuline G in donor and recipient tissues upon cryopreserved cornea allotransplantation	22
<i>Myadelets O. D., Sukhanov A. F.</i> The role of derm tissue basophils in changing the state of capillary bed and water exchange in skin of white rats subjected to deep hypothermia and in the post-hypothermia period	25
<i>Voytenko A. I.</i> Estimation of the freezing zone measurement error in cryosurgery by the method of ultrasonic location	29
<i>Repin N. V.</i> Investigation of extracellular and intracellular crystallization in human erythrocytes using various cooling regimens	31
<i>Kaprelyants A. S., Marchenko L. N., Matyash I. P.</i> Ultrastructural analysis of liver destruction using freeze — substitution upon cryoapplication	36
<i>Pavlenko R. A., Kudenko Yu. A.</i> Investigation of the effect of high pressure at sub-zero temperatures in biological systems	39
<i>Sidyakina T. M., Tarakanchikov A. I., Chumakova M. Yu.</i> A cassette unit for storage of microorganisms in liquid nitrogen refrigerators KH-B-0.5	42

SHORT COMMUNICATIONS

<i>Gordiyenko V. M., Milyanovsky A. I., Muskin Yu. N., Zharkov Ya. V., Senchuk A. Ya., Melnichuk V. D.</i> Cytologic changes in epithelial displasia cervix uteri after cryotherapy	44
<i>Dakhno F. V., Dolgina R. E., Katalevskaya L. G., Belonozhko A. P.</i> Preservation of pig oocytes upon short-term holding in folliculae	45
<i>Kudokotseva O. V., Balyberdina L. M.</i> Properties of yeasts <i>Saccharomyces cerevisiae</i> depending on cryopreservation conditions and physico-chemical factors	46
<i>Petrenko A. Yu.</i> Interrelationships of ion transporting systems in mitochondrial membranes after freeze — thawing	47
<i>Strybul T. F.</i> Using of exponential cooling regimens for cryopreservation of biological systems	48
<i>Koptelov V. A.</i> Structural changes in plasma membranes of isolated hepatocytes on freezing	49

CHRONICLE

The 3rd All-Union scientific conference 'Chemistry of Low Temperatures'	50
Scientific conference 'Cold Trauma'	51
Defense of theses	52

С. Ю. Афонькин, Л. В. Калинина

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ГИПОТЕРМИИ

Необходимость изучения генетических эффектов гипотермии диктуется следующими соображениями. Во-первых, с действием низких температур сталкивается большинство живых существ. Поэтому представляется важным с научной и практической точки зрения оценить роль холодового воздействия как возможного природного индуктора наследуемых изменений. Во-вторых, в настоящее время гипотермия очень широко используется для долгосрочного хранения микроорганизмов, простейших, половых и соматических клеток животных и человека, растительных объектов. При этом существует представление, что низкие температуры не вызывают существенных изменений в генетическом аппарате клеток [7]. Вместе с тем, результаты исследований последних лет, полученные криобиологами и генетиками, подтвердили предположение Н. К. Кольцова, что понижение температуры может усиливать мутационный процесс [3]. Генетические изменения, индуцированные холодом, описаны для организмов разного уровня организации [4, 5].

К числу наследуемых изменений, вызываемых гипотермией, относится полиплоидия, классифицируемая в современной литературе по генетике как геномная мутация, выражающаяся в изменении числа хромосом или хромосомных наборов. В 1890 году русский ботаник И. И. Герасимов получил особи зеленой водоросли *Spirogyra* с наследственно увеличенными размерами ядер после десятиминутного содержания метафазных клеток при -4°C [2]. Это были первые полиплоидные формы растительного происхождения, полученные экспериментально. Долгое время, вплоть до открытия митотических ядов, температурные воздействия являлись распространенным способом полиплоидизации у растений. Не раз предпринимались попытки получить с помощью холодовых шоков полиплоидные формы рыб [5].

В настоящей работе мы показали, что низкая температура может приводить к появлению полиплоидии эукариотических одноклеточных организмов *Amoeba proteus*, объекта современной экспериментальной биологии.

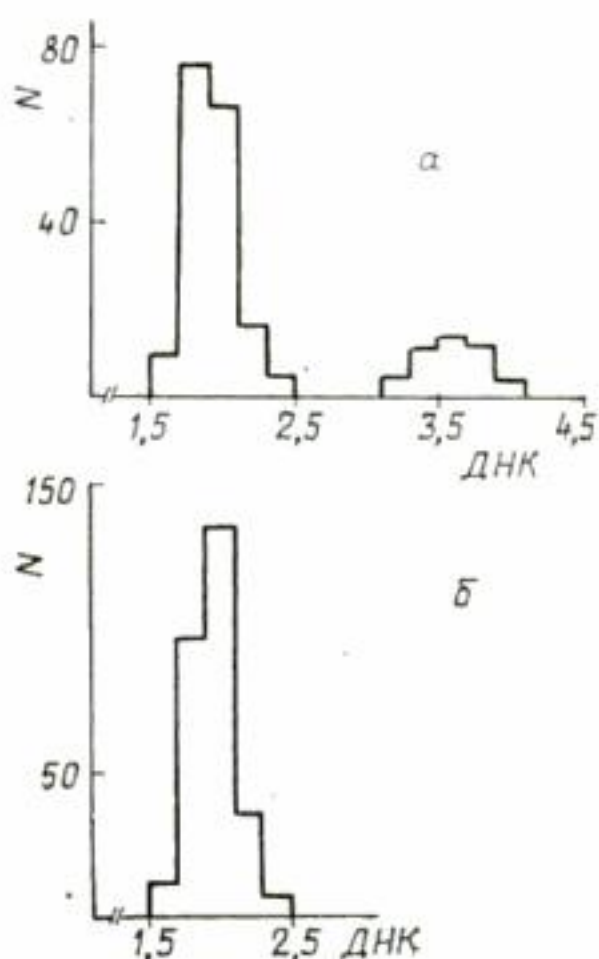
Работа выполнена на пресноводных свободноживущих *Amoeba proteus* (штамм *War*) из коллекции амёб Института цитологии АН СССР. Штамм получен в 1968 году из Варшавского университета. Культивирование и клонирование амёб проводили по методикам, описанным ранее [6]. В экспериментах использовали выборки двух типов: частично синхронизированные и синхронизированные по клеточному циклу. Ядра выделяли и измеряли в них содержание ДНК [6], которое выражали в условных единицах, принимая за 1 усл. ед. интенсивность флуоресценции ядер тетраплоидных гепатоцитов крысы. Так как средние значения содержания ДНК в ядрах одной партии клеток, нанесенных на разные стекла и окрашенных не одновременно, могут различаться, в работе сравниваются между собой только те значения, которые получены в результате измерений выборок ядер с одного и того же препарата.

Перед началом опытов в качестве контроля из массовой культуры *War* взяли 4 независимые выборки делящихся амёб по 50 в каждой (всего 200 клеток). В течение получасовой выдержки при 25°C ($83,0 \pm 2,3$ %) из них завершило деление, ($11,5 \pm 2,8$ %) оказались двуядерными и ($5,5 \pm 0,9$ %) — одноядерными. Доля нежизнеспособных, неделящихся при клонировании клеток штамма *War* составляла 1,7 % (три независимые

выборки по 60 амёб в каждой). Это позволяет предполагать, что группа одноядерных неразделившихся клеток в контроле могла состоять как из амёб, не завершивших кариокинез, так и из клеток, ошибочно принятых за делящиеся.

Первая серия опытов была поставлена для того, чтобы определить, возникают ли полиплоидные клетки после низкотемпературной обработки и, если возникают, какова их доля от общего числа охлажденных особей. Делящиеся при 25 °С клетки из массовой культуры небольшими партиями (5—10 амёб) переносили в лунки с культуральной средой, охлажденной до 4 °С. При этой температуре цитокинез полностью блокировался. Всего таким способом было составлено три независимые выборки организмов: 126, 95 и 125. Через 24 ч клетки были возвращены в нормальные условия (25 °С), в среду был добавлен корм. Небольшая доля их погибла (7 %). Оставшиеся в живых не делились как минимум в течение 24 часов. По истечении этого срока клетки были разрушены, и их ядра изолированы на препарат.

После холодовой обработки ($36,6 \pm 0,5$ %) клеток оказались одноядерными, что в 6,6 раза больше, чем в контроле. Мы предположили, что это клетки с кариокинезом, блокированным холодом. Для того, чтобы проверить это предположение, в ядрах последней выборки (120 единиц за вычетом погибших) было измерено содержание ДНК. Как и следовало ожидать, распределение полученных величин оказалось состоящим из



Распределение ядер амёб по содержанию ДНК после инкубации при 4 °С (а) и в контроле (б). По оси абсцисс — содержание ДНК в условных единицах; по оси ординат — число ядер

двух групп ядер: с меньшим и большим количеством ДНК (рисунок). Все 45 одноядерных клеток обладали в среднем в 1,87 раза большим содержанием ДНК, чем в 75 двуядерных амёбах.

В качестве контроля в опыте использовали содержание ДНК в ядрах трех независимых выборок простейших, синхронизированных по клеточному циклу и культивировавшихся после завершения деления в среде с кормом при 25 °С в течение 24 часов. Полученные средние величины ($1,92 \pm 0,02$; $1,96 \pm 0,02$; $1,94 \pm 0,02$ усл. ед.) достоверно не различались, поэтому все значения были объединены в одну совокупность (рисунок, б). Полученная сложная средняя достоверно не отличалась от средней величины содержания ДНК в ядрах двуядерных клеток опыта ($1,92 \pm 0,02$ и $1,92 \pm 0,01$ усл. ед. соответственно). Необходимо отметить, что среди ядер трех контрольных выборок было обнаружено восемь (2,8 %) с необычно большим содержанием ДНК (3,2—4,4 усл. ед.). Они достоверно не принадлежали к совокупностям и были отброшены при статистической обработке. Таким образом, показано, что в результате действия низкой температуры на делящиеся амёбы в 36,6 % случаев происходит блокирование кариокинеза, приводящее к увеличению содержания ДНК в ядрах клеток.

Во второй серии опытов клетки после холодового воздействия клонировались, чтобы определить долю полиплоидных, способных давать потомство. Большая часть клеток, подвергнутых действию холода во время деления, а затем переведенных снова в 25 °С, способна образовывать клоны. В общей сложности из 240 особей 41 (17,1 %) погибла, остальные возобновили деление. Для того, чтобы определить среди них долю полиплоидных, из каждого из 120 случайно отобранных клонов было взято по 5 ядер (не проводя специально синхронизацию) и измерено в них содержание ДНК. Получившееся распределение средних величин было представлено двумя группами ядер. В одной из них (87 клонов) средние лежали в пределах

от 1,09 до 1,66 усл. ед., в другой (33 клон) — от 2,38 до 3,63 усл. ед. Сложные средние второго порядка (1,47 и 3,01 усл. ед. соответственно) соотносились при этом как 1 : 2,04. Таким образом, доля жизнеспособных полиплоидных клонов составляла 27,5 %, т. е. $\frac{3}{4}$ всех клеток с заблокированным холодом кариокинезом способны давать клоны.

Для того, чтобы более точно оценить содержание ДНК в полиплоидных клонах, от каждого из них были получены три независимые выборки по 5 частично синхронизированных ядер. В качестве контроля использовали выборки из трех клонов, выращенных от двуядерных амёб, т. е. с заблокированным холодом цито-, но не кариокинезом. Три сложные средние значения содержания ДНК в контроле ($1,49 \pm 0,05$; $1,47 \pm 0,05$ и $1,52 \pm 0,06$ усл. ед.) достоверно не различались между собой, поэтому ядра всех контрольных клонов были объединены в одну совокупность. Полученную среднюю третьего порядка сравнивали со средними величинами количества ДНК в полиплоидных клонах. В среднем содержание в них ДНК было в $2,03 \pm 0,06$ раза больше, чем в контроле. Минимальное и максимальное отношения составляли 1,95 и 2,10. Учет ошибок средних величин и соответственно ошибок отношений позволяет считать, что и в этих случаях количество ДНК в полиплоидных клонах было вдвое больше нормы.

Свободноживущие пресноводные амёбы *Ameba proteus* способны существовать в широком диапазоне температур. С понижением температуры скорость деления клеток падает, среднее генерационное время возрастает. При 4 °С амёбы уже не способны делиться: ни цито-, ни кариокинез при этой температуре не происходит, а синтез ДНК протекает очень медленно. Действие низкой температуры на амёб обратимо: при перенесении их из 4 в 25 °С скорость синтеза ДНК резко возрастает, и клетки через некоторое время возобновляют деление [12].

В литературе имеются сведения о том, что низкая температура вызывает блок цитокинеза у *A. proteus* [8]. Раствад [11] получил большое количество двуядерных клеток, помещая делящихся амёб в 6 °С на 4 часа. Одноядерные клетки им не исследовались. Рот нашел, что низкие температуры вызывают деполимеризацию микротрубочек веретена деления у *A. proteus* [10], т. е. молекулярный механизм действия низкой температуры сходен с механизмом действия митотических ядов. Показано, что полиплоидные клетки *A. proteus* можно получить, блокируя кариокинез колхицином, инъецируемым на стадии деления [6]. Исходный уровень плоидности вида *A. proteus* неизвестен, условно его можно принять за диплоидный. Число хромосом в ядре велико: несколько сотен [9], и из-за мелких размеров их точный подсчет невозможен. Поэтому полиплоидизацию клеток *A. proteus* регистрируют по увеличению содержания ДНК в ядрах.

Инъекции колхицина в делящиеся клетки штамма *A. proteus* приводили в 38 % случаев к появлению тетраплоидных особей [6]. Как показали данные настоящей работы, практически такую же долю (36,6 %) составляют клетки штамма *War*, у которых после низкотемпературной обработки происходит блок кариокинеза. По всей вероятности, среди отбираемых для опыта «сфер деления» 36—38 % клеток находится на стадии профазы.

Как показывают измерения, количество ДНК в ядрах клонов, полученных от клеток *War* с заблокированным холодом митозом, увеличено вдвое по сравнению с контролем. Следовательно, эти клоны можно рассматривать как тетраплоидные. Вместе с тем, количество ДНК в ядрах клеток сразу после полиплоидизации (24 ч при 4 °С и последующее 24-часовое культивирование при 25 °С) оказалось лишь в 1,87 раза больше, чем у амёб, завершивших цитокинез (рисунок, а). Этот факт можно объяснить гипотетическим изменением отношения объема ядра к его поверхности, которое должно происходить в результате блока кариокинеза. Не исключено, что вследствие этого скорость синтеза ДНК падает. Это отношение может затем нормализоваться вследствие увеличения площади ядерной мембраны. В природных водоемах свободноживущие простейшие, несомненно, сталкиваются с резкими перепадами температур. Возможно, полиплоидизация амёб про-

исходит и в естественных условиях. В предыдущих публикациях была высказана гипотеза, что процесс спонтанной полиплоидизации и регистрируемая иногда деплоидизация клеток полиплоидных клонов могут играть определенную роль в генетической изменчивости агамно размножающихся амёб типа *A. proteus* [6]. Можно предположить, что полиплоидные клетки амёб отличаются от диплоидных по физиологическим показателям, как это было показано для некоторых видов растений [1]. Например, они могут быть более устойчивыми к действию экстремальных факторов. В таком случае полиплоиды могут отчасти выполнять функцию цист — у данного вида цистообразование отсутствует. Эта гипотеза в настоящее время подвергается экспериментальной проверке.

Результаты нашего исследования, а также упоминавшиеся данные других авторов, изучавших мутагенное действие гипотермии, свидетельствуют о том, что низкая температура может являться генетически активным фактором. Это необходимо учитывать при ее использовании в практических целях, прежде всего при холодовой консервации биологических объектов.

1. Бреславец Л. П. Полиплоидия в природе и опыте. — М.: Изд-во АН СССР, 1963. — 364 с.
2. Герасимов И. И. Некоторые замечания о функции клеточного ядра // Бюл. МОНП. — 1890. — № 1. — С. 548—554.
3. Кольцов Н. К. О возможности планомерного создания новых геномов путем кариокластических воздействий // Биол. журн. — 1938. — № 7. — С. 679—697.
4. Сытник К. М., Мануильский В. Д., Моргун В. В., Ларченко Е. А. Наследственные изменения растений при действии ультранизких температур // Докл. АН УССР. Сер. Б. — 1980. — № 9. — С. 80—92.
5. Тихомирова М. Н. Потенциальные повреждения хромосом в мутационном процессе, индуцированном радиацией: Дис. ... д-ра биол. наук. — Л., 1979. — 506 с.
6. Afonkin S. Yu. Production of *Amoeba proteus* clones with increased nuclear DNA content // Acta Protozool. — 1984. — 23, N 1. — P. 35—54.
7. Ashwood-Smith M., Friedeman F. G. Lethal and chromosomal effects of freezing, thawing, storage time and X-irradiation on mammalian cells preserved at -196°C in dimethyl sulfoxide // Cryobiology. — 1973. — 16, N 2. — P. 132—140.
8. Daniel G. E., Chalkley H. W. The influence of temperature upon the process of division in *Amoeba proteus* (Leidy) // J. Cell. Comp. Physiol. — 1933. — N 2. — P. 311—327.
9. Gromov D. B. Ultrastructure of mitosis in *Amoeba proteus* // Protoplasma. — 1985. — 126, N 1. — P. 130—139.
10. Roth H. E. Electron microscopy of mitosis in amoeba. III. Cold and urea treatment: a basis for tests of direct effects of mitotic inhibitors on microtubule formation // J. Cell. Biol. — 1967. — 34, N 1. — P. 47—59.
11. Rustad R. C. Preparation of binucleate *Amoeba proteus* by low temperature treatment // J. Protozool. — 1960. — 7, N 1. — P. 25.
12. Sopina V. A., Afonkin S. Yu., Kudryavtsev B. N. Nuclear DNA content in *Amoeba proteus* cultured at different temperatures // Acta Protozool. — 1982. — 21, N 2. — P. 203—212.

Ин-т цитологии АН СССР,
г. Ленинград

Поступила 24.09.85

УДК 612.46 : 615.361.014.41

В. И. Кирпатовский, Г. Ю. Жукаускас, Я. С. Игльвичюте, Н. А. Онищенко

БЕСПЕРФУЗИОННАЯ ГИПОТЕРМИЧЕСКАЯ КОНСЕРВАЦИЯ ПОЧЕК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КРИОПРОТЕКТОРОВ

При трансплантации трупных почек одним из методов консервации, принятым в СССР и ряде других стран, является их хранение в гипотермических условиях после инициальной перфузии консервирующим раствором внутриклеточного типа. Однако данные последних лет свидетельствуют, что гипотермия, наряду с положительным влиянием на консервируемый орган, обладает еще и отрицательным действием, которое «замаскировано» общим снижением интенсивности метаболизма и замедлением развития ишемического повреждения [2, 3]. При длительном гипотермическом хранении изолированных органов вклад расстройства метаболизма под дей-

ствием низкой температуры в итоговую потерю жизнеспособности трансплантата значительно увеличивается, и, возможно, это является основной причиной того, что пока не удастся продлить срок гипотермической перфузионной консервации почек более 72 ч, а бесперфузионной консервации — более 48 ч [5]. Механизм повреждающего действия гипотермии на клетки консервируемого органа связан с индукцией фазовых переходов в клеточных макромолекулах, изменением их конформации и белково-липидных связей в клеточных мембранах, следствием чего является нарушение барьерных свойств биомембран, неравномерное изменение активности ряда ферментов энергетического и пластического обмена, прогрессирующая дискоординация метаболических процессов и в итоге — тканевая гипоксия [2].

Мы пытались уменьшить повреждающее действие гипотермии на органы во время консервации с помощью криопротекторов, которые снижают температуру фазовых переходов и сглаживают изменения, вызываемые ими. Для исследований был выбран диметилсульфоксид (ДМСО), как наиболее полно исследованный препарат, хорошо проникающий в клетку.

Опыты проводили на почках белых беспородных крыс (24 эксперимента) и беспородных собак (37 экспериментов). Под гексеналовым наркозом у крыс выделяли обе почки блоком с аортой и нижней полую вену, канюлировали дистальный конец аорты и отмывали почки 10—15 мл холодного консервирующего раствора НИИТиО-2 следующего состава (г/л):

NaCl	0,85	Na цитрат	0,03
KH ₂ PO ₄	1,02	Na сукцинат	0,06
K ₂ HPO ₄	3,80	АТФ	0,001
NaHCO ₃	0,84	Глюкоза	48,0

Раствор использовали с добавлением различных концентраций ДМСО или без него при осмолярности 290—300 мосм/л, рН 7,4. После отмывания почки удаляли, помещали в тот же раствор и хранили 24 ч при 4 °С. В опытах на собаках консервации подвергали левую почку, отмывку которой проводили через почечную артерию. Условия консервации были такими же, как в опытах на крысах. После 24 ч консервации проводили аутотрансплантацию консервированной почки в правую подвздошную область по стандартной методике. Перед подшиванием почек их промывали 20 мл консервирующего раствора для оценки сохранности по показателям, приведенным ниже. Одновременно с трансплантацией проводили нефрэктомии контрлатеральной почки. Поскольку одним из наиболее эффективных методов фармакологического воздействия на метаболизм консервируемого органа является предварительное введение препаратов в организм донора, мы также исследовали влияние введения ДМСО донору в дозе 0,5 г/кг за 3 ч до начала эксперимента.

Показателями эффективности консервации служили: тканевое содержание аденин-нуклеотидов (АТФ, АДФ, АМФ), лактата (определяли набором реактивов фирмы Boehringer) и электролитов (исследовали методом пламенной фотометрии), концентрация молочной кислоты и активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в консервирующем растворе (оценивали с помощью набора реактивов фирмы Boehringer). Эти показатели определяли до и после 24 ч консервации, а некоторые из них — через 48 ч консервации. После аутотрансплантации регистрировали изменение почечного кровотока (электромагнитным флоуметром фирмы Nihon Kohden) и величину тургора почек [1]. Показателями функционального состояния органов служили динамика креатинина плазмы крови и выжи-

Таблица 1. Влияние добавления ДМСО в консервирующий раствор на показатели сохранности почки крысы, консервированной 24 ч при температуре от 0 до 4 °С

Показатель	До консервации	После консервации			
		Концентрация ДМСО в растворе, %			
		1	2	3	4
Концентрация лактата в ткани, мкмоль/г	91±7	218 ± 22	181 ± 14	237 ± 32	200 ± 13
Концентрация лактата в консервирующем растворе, ммоль/л	0	15,8±1,1	15,6±1,4	14,8±1,7	11,0±0,7*
Активность ЛДГ в консервирующем растворе, МЕ/г/л	0	456 ± 51	314±30*	299 ± 63	221±31**

Примечание. Достоверность разницы результатов по отношению к опытам без добавления ДМСО: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

ваемость собак в течение двух недель после аутотрансплантации. Все результаты обработаны статистически. Достоверность разницы результатов оценивали по критерию Стьюдента.

В опытах на крысах было установлено, что добавление ДМСО в консервирующий раствор в концентрации 2—6 % улучшало показатели сохранности консервированных почек. Через 24 ч бесперфузионного гипотермического хранения содержание лактата в ткани увеличивалось при-

Таблица 2. Влияние добавления ДМСО в консервирующий раствор и его предварительного введения донору на выживаемость собак и функцию почки, пересаженной после 24 ч консервации при температуре от 0 до 4 °С

Введение ДМСО	Кол-во опытов	Кол-во выживших собак	День гибели собак после пересадки	Уровень креатинина плазмы выживших собак, мкмоль/л					
				День после пересадки					
				0	1	2	3	7	14
Контроль (без ДМСО)	6	3 (50 %)	3, 4, 4	159±18	442±27	557±71	645±70	229±9	177±17
В раствор, %									
5	4	0	3, 3, 5, 5	124±20	362±16*	575±69	813±106	—	—
1	4	0	3, 3, 8, 10	164±27	283±25*	530±53	902±97	937±141*	—
0,5	4	0	3, 3, 6, 8	150±18	354±35	522±71	798±27	990	—
0,1	8	6 (75 %)	4, 5	177±8	341±24*	430±54	371±53*	229±27	202±16
Донору	6	4 (67 %)	6, 7	159±20	407±18	513±62	442±55	194±10	179±9

Примечание. Достоверность разницы результатов по отношению к контролю: * $p < 0,05$.

Таблица 3. Показатели метаболизма почек собак, консервированных в растворе НИИТиУО-2 без ДМСО и с добавлением 0,5 % ДМСО

Показатель	До консервации		После 24 ч консервации		После 48 ч консервации	
	без ДМСО	с 0,5 % ДМСО	без ДМСО	с 0,5 % ДМСО	без ДМСО	с 0,5 % ДМСО
Тканевое содержание адениннуклеотидов, мкмоль/г						
АТФ	2,61±0,18	2,25±0,16	1,25±0,10	0,56±0,07*	0,42±0,04	0,75±0,04**
АДФ	0,82±0,02	0,86±0,03	0,26±0,02	0,25±0,01	0,14±0,01	0,25±0,02*
АМФ	1,04±0,03	0,97±0,03	1,43±0,02	1,58±0,02*	1,13±0,03	1,08±0,02
Сумма АН	4,47±0,38	4,08±0,31	2,94±0,15	3,39±0,29*	1,69±0,07	2,08±0,09*
АТФ/АДФ	3,18	2,50	4,81	6,24	3,00	3,00
Тканевая концентрация лактата, мкмоль/г	67±6	71±8	150±8	128±9*	145±7	140±9
Тканевая концентрация электролитов, мэкв/кг						
K ⁺	84±2	100±8*	75±3	72±2	—	—
Na ⁺	58±4	51±5	46±4	41±3	—	—
Активность ЛДГ перфузата, МЕ/г/л	0	0	166±10	86±7*		

Примечание. Достоверность разницы результатов по отношению к опытам без добавления ДМСО: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

мерно одинаково в контрольной и опытных группах, а выход молочной кислоты и ЛДГ в перфузат достоверно уменьшался (табл. 1). Это свидетельствует о сохранности барьерных свойств клеточных мембран и меньшей степени повреждения при консервации с введением ДМСО в консервирующий раствор.

Оценку влияния добавления ДМСО в консервирующий раствор на функциональное состояние почек, консервированных 24 ч, провели в опытах по аутотрансплантации консервированных почек у собак. При введе-

нии в консервант 0,5—5 % ДМСО все собаки погибли с явлениями уремии, а в контроле выжило 50 % животных (табл. 2). Были проведены опыты по оценке метаболического состояния почек собак в конце периода консервации с 0,5 % ДМСО и после аутотрансплантации. Оказалось, что добавление 0,5 % ДМСО в консервант повышает степень сохранности почек: лучше сохраняется уровень АТФ и суммарное содержание адениннуклеотидов в ткани почки, меньше накапливается молочной кислоты и уменьшается выход ЛДГ в перфузат (табл. 3). После аутотрансплантации органов, консервированных 24 ч без ДМСО в составе консерванта, кровотока и тургор почек достоверно снижались (рис. 1, 2), тогда как при добавлении в консервирующий раствор 0,5 % ДМСО эти значения сразу после пересадки были значительно выше, чем в контрольной группе. Эти данные подтверждают лучшую сохранность клеток паренхимы в процессе консервации, поскольку отсутствие значительного снижения кровотока и тургора после пересадки консервированных почек отражают их лучшую функциональную и метаболическую сохранность [1]. Однако через 30 мин после аутотрансплантации в опытах с добавлением в консервант 0,5 % ДМСО кровоток резко снижался, тогда как в контрольных опытах он слегка увеличивался.

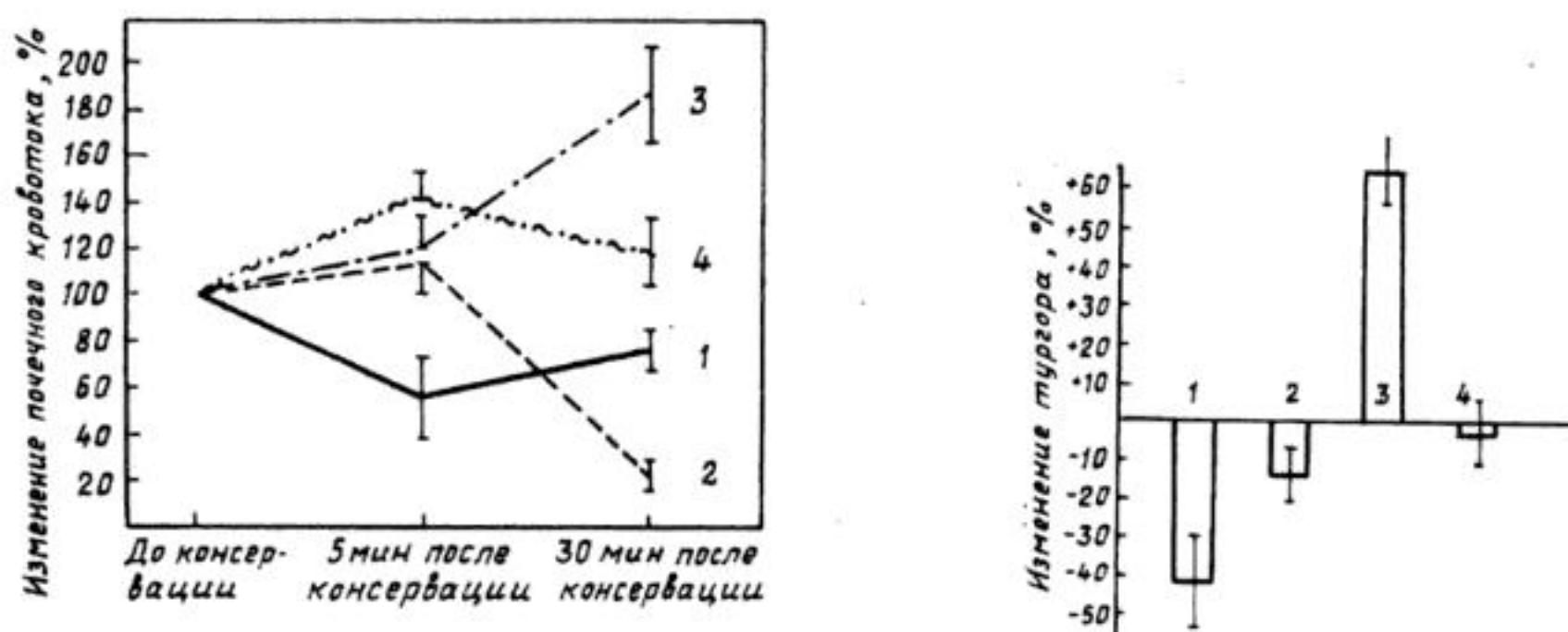


Рис. 1. Изменение почечного кровотока после аутотрансплантации почек собак, консервированных 24 ч при температуре от 0 до 4 °С: 1 — контроль; 2 — добавление 0,5 % ДМСО в консервирующий раствор; 3 — добавление 0,1 % ДМСО в консервирующий раствор; 4 — введение ДМСО донору (0,5 г/кг за 3 ч)

Рис. 2. Изменение тургора почек собак, пересаженных через 24 ч консервации при температуре от 0 до 4 °С. Условные обозначения те же, что и на рис. 1

Основываясь на этих данных, мы пришли к выводу, что добавление ДМСО в консервирующий раствор улучшает энергетическое состояние консервированных почек, лучше сохраняет барьерные свойства клеточных мембран, что благоприятно сказывается на почечной гемодинамике в первые минуты после восстановления кровотока. Последующее резкое снижение почечного кровотока, вероятно, связано с замедлением вымывания ДМСО, проникшего в клетку, и относительным повышением осмолярности внутриклеточной среды с развитием отека эндотелия сосудов и паренхимы. Неадекватность кровоснабжения пересаженных почек и является основной причиной их последующей функциональной недостаточности. Замедленное вымывание ДМСО из клеток может быть обусловлено его связыванием с внутриклеточными белками, как, например, происходит при добавлении ДМСО к раствору альбумина [6]. Подтверждают правильность этого мнения данные о том, что, хотя при добавлении 0,5—5 % ДМСО в раствор все собаки погибали, уровень креатинина плазмы в первый день после пересадки был достоверно ниже, чем в контроле (табл. 2). Часть собак (одна при добавлении 5 % ДМСО, две — 1 % ДМСО и две — 0,5 % ДМСО) погибли в более поздние сроки, чем собаки контрольной группы. Для ликвидации неблагоприятных последствий задержки ДМСО в ткани консервированных почек мы применили два подхода: снижение концентрации ДМСО

в консервирующем растворе и предварительное введение этого препарата в организм донора с полным его удалением из консервирующего раствора. Оба эти подхода дали положительные результаты. При добавлении ДМСО в консервирующий раствор в концентрации 0,1 % после аутотрансплантации почек, консервированных 24 ч, выжило 75 % оперированных животных, тогда как в контроле выживаемость составила лишь 50 %. Динамика креатинина сыворотки крови также была более благоприятной (табл. 2). Изменение почечного кровотока и тургора почек после аутотрансплантации также свидетельствовали о более высокой эффективности консервации с добавлением ДМСО в раствор, чем в контрольных опытах (рис. 1, 2). Предварительное введение ДМСО в организм донора также улучшило функциональное состояние консервированных почек после пересадки. Выживаемость собак составила 67 %. Значения кровотока и тургора почек практически не отличались от нормальных. Таким образом, применение ДМСО при гипотермической консервации почек улучшало их метаболическое и функциональное состояние после хранения в течение 24 часов.

Механизм выявленного защитного действия может быть связан с двумя факторами. Во-первых, ДМСО, являясь классическим криопротектором, проникающим в клетку, способствует снижению температуры фазовых переходов клеточных компонентов. Примененные нами концентрации препарата были слишком малы, чтобы вызвать существенное снижение точки фазового перехода, например воды, но они являются вполне достаточными для изменения физико-химических свойств липидов или белков. Подтверждением этому служат работы [4, 8], в которых показано, что ДМСО меняет конформационную структуру и каталитическую активность мембранных АТФаз и не связанного с мембранами фермента пероксидазы. Кроме того, анализ температурной зависимости К-Na-АТФазы в присутствии ДМСО и без него показал, что этот препарат снижает температуру фазового перехода мембранных липидов [4]. Наши предварительные результаты исследования фазовых переходов липидов, выделенных из почек, свидетельствуют о том, что введение донору ДМСО сдвигает область фазовых переходов в сторону более отрицательных температур. Эти изменения способствуют лучшей переносимости клетками низких температур. По имеющимся данным [10], уменьшение температуры хранения почек от 0 до -4°C резко ухудшает их функциональные показатели, даже если не происходит кристаллизации воды. При добавлении криопротекторов (глицерина, пропиленгликоля), правда, в значительно более высоких концентрациях, чем в наших опытах, разницы в функциональном состоянии почек, хранившихся при 0 и -4°C , не было. Показано также, что добавление в перфузат глицерина или пропиленгликоля улучшает функциональное состояние почек после 4—24 ч перфузии [7]. Другим возможным механизмом защитного действия ДМСО при гипотермической консервации почек является способность этого препарата тормозить развитие ишемического повреждения. Это свойство продемонстрировано при тепловой ишемии сердца и почек и при гипоксии миокарда [9]. В этом случае защитный эффект связывали с антиоксидантным и мембраностабилизирующим действием.

Таким образом, при защите от ишемического повреждения и при уменьшении повреждающего действия гипотермии эффект используемых растворов ДМСО во многом связан, очевидно, с сохранением физико-химических свойств клеточных мембран и с поддержанием их функциональной активности. Важным показателем действия препарата, независимо от того, какое действие реализуется, противоишемическое или противогипотермическое, является также хорошая сохранность фонда адениннуклеотидов, меньшее накопление молочной кислоты и сниженный выход внутриклеточных ферментов во внеклеточную среду. Логично предположить, что оба эффекта препарата реализуются по одним и тем же путям неспецифической адаптации к стрессорным воздействиям.

1. Клейза В. Ю., Игльвичуте Я. С., Жукаускас Г. Ю., Дапшис К. Л. Тургор почки как критерий ее жизнедеятельности // Хирургия.— 1984.— № 10.— С. 113—115

2. *Онищенко Н. А.* Медикаментозная противоишемическая защита почек при трансплантации: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук.— М., 1983.— 42 с.
3. *Шумаков В. И., Онищенко Н. А., Курпатовский В. И.* Фармакологическая защита трансплантата.— М.: Медицина, 1983.— 232 с.
4. *Barnett R. E.* The effects of dimethyl sulfoxide and glycerol on Na-K-ATPase and membrane structure // *Cryobiology*.— 1978.— 15, N 2.— P. 227—229.
5. *Belzer F. O.* Organ preservation // *Dial. a. Transplant.*— 1978.— 7, N 1.— P. 128—137.
6. *Clark P., Fahy G. M., Karrow A. M.* Factors influencing renal cryopreservation. II. Toxic effects of three cryoprotectants in combination with three vehicle solutions in non-frozen rabbit cortical slices // *Cryobiology*.— 1984.— 21, N 3.— P. 274—284.
7. *Collins G. M., Wicomb W. N., Halasz N. A.* Beneficial effect of low concentrations of cryoprotective rabbit kidney agents on short-term rabbit kidney perfusion // *Ibid.*— 1984.— 21, N 3.— P. 246—249.
8. *Duran N., Baesa J., Freer J. et al.* Dimethyl sulfoxide as chemical and biological probe: conformational effect on peroxidase system // *Biochem. Biophys. Res. Comm.*— 1981.— 103, N 1.— P. 131—138.
9. *Shlafer M., Kane P. F., Kirsh M. M.* Effects of dimethyl sulfoxide on the globally ischemic heart: possible general relevance to hypothermic organ preservation // *Cryobiology*.— 1982.— 19, N 1.— P. 61—69.
10. *Wicomb W. N., Halasz N. A., Collins G. M.* Damaging effect of subzero temperature (-4°C) on renal rabbit function // *Ibid.*— 1984.— 21, N 1.— P. 6—12.

НИИ трансплантологии и
искусственных органов МЗ СССР,
г. Москва,

Поступила 10.10.85.

Республиканская Н-Вильнянская психиатрическая
больница,
г. Вильнюс

УДК 57.043 : 616.833—089.843

Ю. Б. Чайковский, В. П. Яценко, Г. И. Козут, С. П. Галич

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ НЕРВОВ И РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ АЛЛОНЕЙРОПЛАСТИКИ ДЕФЕКТОВ НЕРВНЫХ СТВОЛОВ

Проблема криоконсервации периферических нервов представляет теоретический и практический интерес в связи с необходимостью применения в клинике аллонеуротрансплантатов для пластики поврежденных нервных стволов. Показано, что аллопластика может быть методом выбора при обширных дефектах как одного нерва, так и при сочетанных травмах нескольких крупных нервных стволов, а также при повторных нейропластических операциях [2].

Как свидетельствуют данные литературы, неудачи в использовании консервированных различными способами нервов связаны преимущественно с гибелью нейролеммоцитов вследствие воздействия на них неблагоприятных условий консервации. Пересадка жизнеспособного аллонеуротрансплантата улучшает результаты восстановления поврежденного нерва, так как перестройка имплантата создает благоприятные условия для регенерации новообразованных нервных волокон [1].

В экспериментах на кроликах установлено, что многие нейролеммоциты сохраняют жизнеспособность при замораживании нерва до температуры твердой углекислоты (-79°C) в криозащитной среде, содержащей глицерин [3]. Установлено, что активная перестройка трансплантата, связанная с разрушением в нем предсуществующих нервных волокон переживающими нейролеммоцитами, увеличивает скорость прорастания его регенерирующими аксонами, улучшая конечные результаты восстановления поврежденного нерва.

Целью данной работы явилось изучение возможности повышения числа жизнеспособных нейролеммоцитов в нерве путем усовершенствования метода консервирования, а также изучение в эксперименте на более крупных животных особенностей де- и регенерации поврежденных нервов при замещении их дефектов криоконсервированными аллонейротрансплантатами.

Эксперименты выполнены на 30 собаках. Трех животных (1-я группа доноров) умерщвляли при помощи внутривенного введения гексенала. Их седалищные нервы иссекали в условиях асептики и антисептики и инкубировали при 4° С в течение 1 часа в криозащитной среде следующего состава: 15 % глицерина, 15 % сыворотки крови 70 % среды 199. После этого нервы переносили в пакеты из алюминиевой фольги, заполненные небольшим количеством аналогичной среды. Пакеты герметизировали и погружали в жидкий азот (—196 °С). Трех животным (2-я группа доноров) через брюшную аорту в седалищные нервы делали инъекции охлажденного до 4 °С раствора, содержащего диметилсульфоксид (100 г), глюкозу (50 г), гидрокортизон (60 мг), инсулин (60 ед.), физиологический раствор (до 1000 мл). Затем нервы иссекали и инкубировали при 4 °С в течение 1 ч в среде, содержащей глицерин (150 г), сыворотку крови (150 мл), глюкозу (50 г), гидрокортизон (60 мг), инсулин (60 ед.), среду 199 (до 1000 мл). Нервы замораживали в пакетах из алюминиевой фольги, заполненных аналогичной средой, при температуре жидкого азота (—196 °С).

Через 3—4 мес хранения нервы размораживали путем быстрого отогревания в водяной бане (42 °С), отмывали в растворе Хэнкса дважды в течение 30—40 мин и их отрезки имплантировали, используя микрохирургическую технику, в дефекты седалищных нервов 24-х собак. Двенадцати животным (1-я группа опытов) создавали дефект длиной 3—4 см и пересаживали отрезки нервов 1-й группы доноров. Во 2-й группе экспериментов у животных (12 собак) создавали дефект одноименного нерва длиной 5—6 см и имплантировали отрезки нервов от 2-й группы доноров.

Подопытных животных умерщвляли внутривенным введением гексенала через 14, 30, 90 и 180 сут после операции. Трансплантаты и прилежащие участки центрального и периферического отрезков нервов реципиентов изучали с помощью общегистологических, инъекционных и импрегнационных методов исследования. С целью количественной оценки сохранения жизнеспособности нейролеммоцитов и в трансплантатах производили подсчет числа овоидов «дегенерации», образующихся на месте предсуществующих нервных волокон через 14 сут после операции, по отношению к фрагментам нервных волокон, подвергшихся деструкции без участия нейролеммоцитов.

В ранние сроки эксперимента (на 14—30 сут после операции) в трансплантатах отмечены явления уоллеровской дегенерации предсуществующих

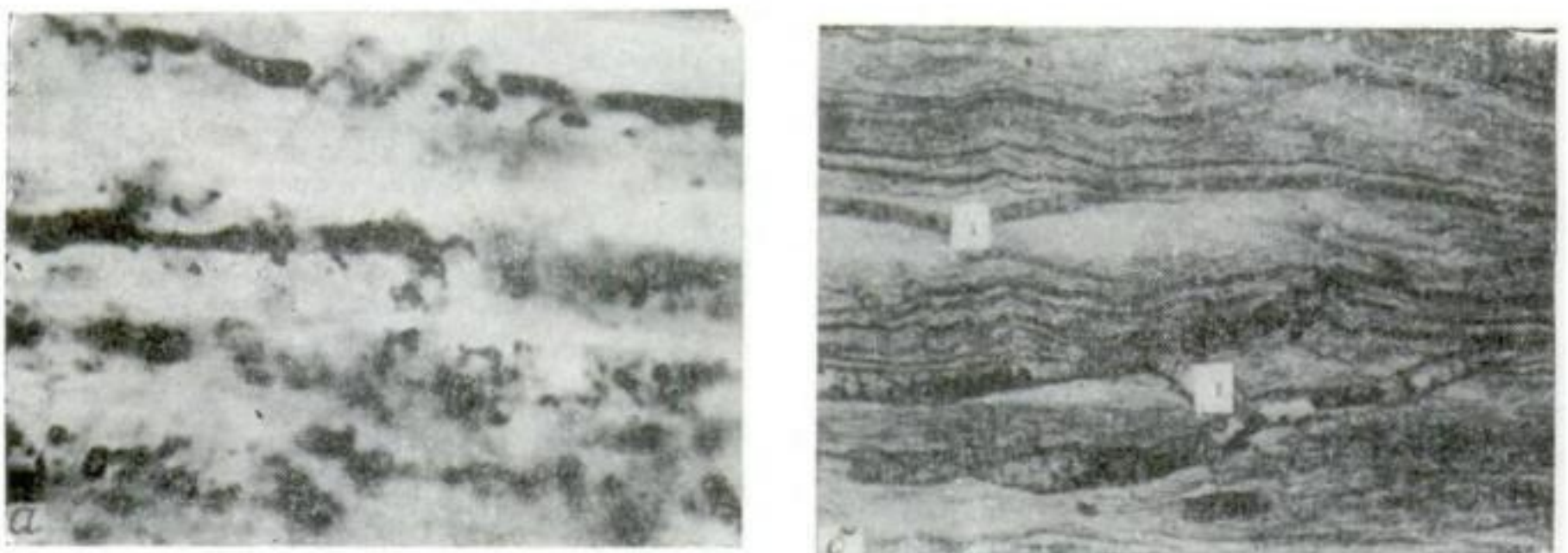


Рис. 1. Аутолиз осевых цилиндров в аллотрансплантате седалищного нерва собаки через 1 мес после операции (а). Импрегнация азотнокислым серебром. $\times 480$. Регенерирующие нервные волокна и кровеносные сосуды (1) в аллотрансплантате седалищного нерва собаки через 1 мес после операции (б). Инъекция тушь-желатином, импрегнация азотнокислым серебром. $\times 80$

щих нервных волокон, большинство которых было разделено на овоиды. Однако в 1-й группе опытов в большем количестве, чем во 2-й, встречались осевые цилиндры в состоянии расчленения на крупные, подвергающиеся аутолизу гиперимпрегнированные фрагменты (рис. 1, а). Наряду с этим в 1-й группе опытов встречались круглоклеточные инфильтраты на месте гибели тканевых элементов трансплантата. Подсчет количества нейролеммоцитов, образовавших овоиды, показал, что в 1-й группе число сохранивших жизнеспособность нейролеммоцитов составило $(55,0 \pm 0,9) \%$,

во 2-й — $(71,0 \pm 1,4) \%$. Через 14 сут после операции отмечены явления регенерации нервных волокон, врастающих в трансплантат со стороны центрального отрезка поврежденного нерва и достигающих периферического отрезка к 30 сут после операции. Однако во 2-й группе экспериментов число осевых цилиндров в трансплантате было большим, чем в первой (рис. 1, б). При этом у животных первой группы многие регенерирующие аксоны были снабжены задержанными колбами роста. По-видимому, это было связано с тем, что в трансплантатах 1-й группы опытов находилось значительно большее число препятствующих регенерации крупных фрагментов предсуществующих нервных волокон, подвергающихся деструкции по типу аутолиза.

В отдаленные сроки эксперимента (3—6 мес после операции) отмечено завершение невротизации трансплантатов. Продукты распада предсуществующих нервных волокон в последних уже не обнаруживались. В области анастомозов трансплантата с отрезками нервов реципиентов преимущественная часть новообразованных осевых цилиндров имела упорядоченное расположение. К указанному сроку наблюдалась активная невротизация периферического отрезка поврежденного нерва. Однако в 1-й группе опытов значительное количество нервных волокон в трансплантате и в пери-

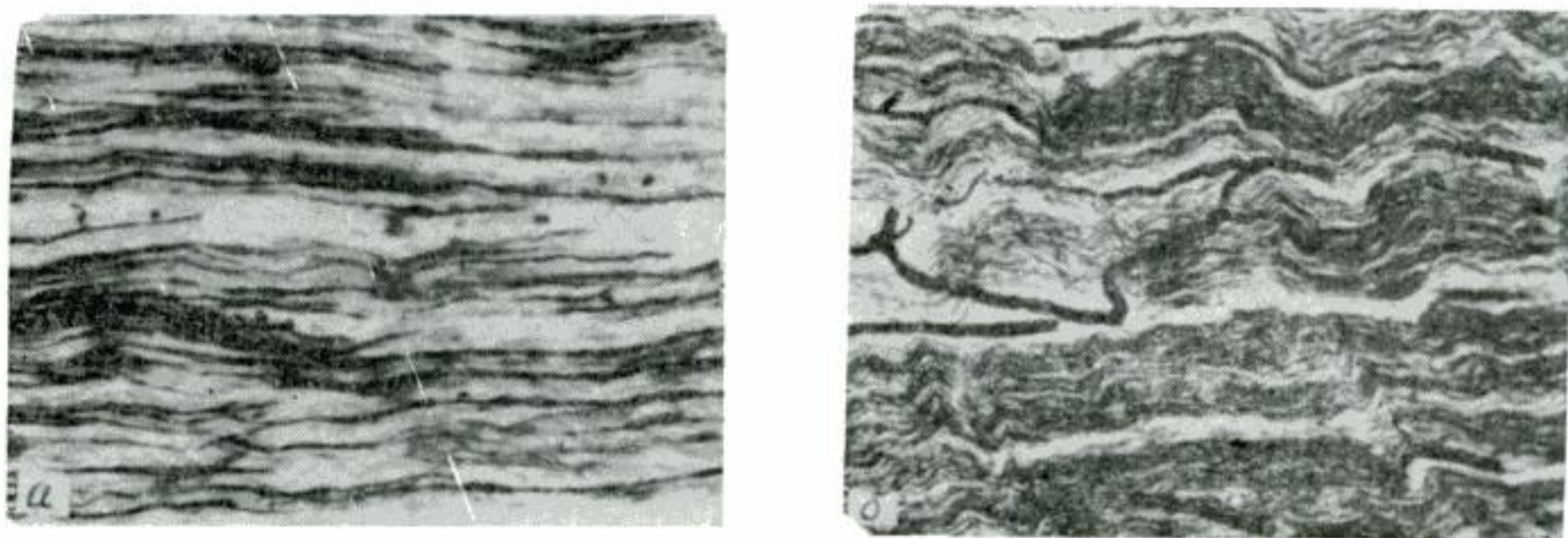


Рис. 2. Явления раздражения новообразованных нервных волокон в аллотрансплантате седалищного нерва собаки через 6 мес после операции (а). Импрегнация азотно-кислым серебром. $\times 80$. Компактный тип невротизации аллотрансплантата седалищного нерва собаки через 6 мес после операции (б). Инъекция тушь-желатином, импрегнация азотнокислым серебром. $\times 80$

ферическом отрезке располагалось рыхло. Многие новообразованные аксоны были реактивно изменены (рис. 2, а). Во 2-й группе наблюдений трансплантат и периферический отрезок поврежденного нерва невротизировались преимущественно по компактному типу (рис. 2, б).

Таким образом, консервация периферических нервов с предварительной инъекцией и последующим замораживанием при температуре жидкого азота (-196°C) в модифицированной криозащитной среде позволяет сохранить жизнеспособность более 70 % нейролеммоцитов. В условиях трансплантации последние осуществляют активную перестройку трансплантата, создавая временно адаптированные для регенерирующих нервных волокон условия микроокружения. Улучшение результатов пластики криоконсервированных нервов путем увеличения в трансплантате количества жизнеспособных нейролеммоцитов подтверждает существование нейротропизма со стороны переживающих клеток глии и продуктов перерождения предсуществующих нервных волокон и находит подтверждение в современных исследованиях [4].

1. Громова Б. А. Регенерация периферического нерва при замещении его дефекта у кролика «свежим» гомо- и гетеротрансплантатом // Тр. АМН СССР.— 1952.— Вып. 19.— С. 49—62.
2. Дрюк Н. Ф., Галич С. П., Лисайчук Ю. С. и др. Ауто- и аллонеуропластика периферических нервов // Клин. хирургия.— 1984.— № 12.— С. 14—16.

3. Яценко В. П. К вопросу о сравнительной оценке результатов замещения дефекта периферического нерва гомотрансплантатом с различным биологическим состоянием // Науч. конф. Ин-та протезирования, ортопедии и травматологии МЗ УССР, посвящ. 80-летию М. И. Ситенко. — Харьков: Б.и., 1965. — С. 130—132.
4. Lundborg G., Dahlin L. B., Danielsen N. et al. Nerve regeneration in silicone chambers: influence of gap length and of distal stump components // Exp. Neurol. — 1982. — 76, N 2. — P. 361—375.

Киевский государственный ин-т
усовершенствования врачей

Поступила 08.07.85

УДК 57.043 : 611.018.51 : 577.352

**Л. А. Бабийчук, М. М. Спирин, Г. В. Белевич,
В. А. Бондаренко, А. М. Белоус**

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ИЗМЕНЕНИЙ ТОНИЧНОСТИ СРЕДЫ НА СТРУКТУРУ МЕМБРАНЫ ЦЕЛЬНЫХ ЭРИТРОЦИТОВ В ИНТЕРВАЛЕ ТЕМПЕРАТУР ОТ 0 ДО 37 °С С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ

Охлаждение эритроцитов от 37 до 0 °С в условиях гиперосмолярности среды приводит к лизису клеток [7]. Однако предварительная инкубация при 0 °С повышает устойчивость эритроцитов к охлаждению (эффект «закаливания») [1]. Что происходит с мембраной эритроцита при этом? Для ответа на вопрос мы попытались применить флуоресцентные зонды. Как было показано ранее [5], зонды пирен, оксистирил-*N*-тетрадецилпиридиний (ОСП-14), диметиламиностирил-*N*-додецилпиридиний (ДСП-12), 1-анилино-нафталин-8-сульфонат (АНС) связываются с цельными эритроцитами, локализуясь в мембране. Эти зонды позволяют оценить различные параметры физической структуры белок-липидной мембраны.

Использовали эритроциты донорской крови человека, заготовленной на консерванте ЦОЛИПК 76. Из отмытой эритромаксы готовили 50 %-ную суспензию клеток на фосфатном буфере, содержащем 0,15 М NaCl (рН 7,4). Эту суспензию микропипеткой вносили в растворы, находящиеся при заданной температуре. Конечная объемная концентрация эритроцитов в суспензии составляла 2 %. Рабочую суспензию эритроцитов подвергали следующим температурным воздействиям: I при 37 °С 10 мин; II при 37 °С 10 мин → 0 °С 10 мин; III при 37 °С 10 мин → 0 °С 10 мин → 37 °С 10—60 мин; IV при 0 °С 10 мин → 37 °С 10 мин → 0 °С 10 минут. После каждого режима температуру суспензии доводили до комнатной (23 ÷ 25 °С) и проводили исследования.

Регистрацию флуоресценции проводили на спектрофлуориметре Hitachi MPF-4 в плоской кварцевой кювете с расстоянием между стенками 0,1 см. Кювету ставили по диагонали прямого угла, образуемого оптическими осями монохроматоров [4]. Считали, что интенсивность «мембранной» флуоресценции зонда $F = F_1 - F_2$, где F_1 — сигнал в суспензии эритроцитов с зондом, F_2 — «подсветка» клеток в условиях измерения сигнала. Контрольные эксперименты в растворе чистого гемоглобина показали, что «подсветка» обусловлена именно гемоглобином, при этом гидрофобные зонды пирен, ОСП-14 и ДСП-12 не связываются с белком, а константа связывания АНС с ним на порядок ниже, чем с эритроцитами. Охлаждение раствора гемоглобина не приводит к изменению взаимодействия зондов с белком. Таким образом, флуоресценция зондов в эритроцитах несет информацию о структуре мембраны.

Влияние охлаждения на поведение зондов в эритроцитах в изотонических условиях (0,15 М NaCl). Пирен — гидрофобное соединение, он хорошо связывается с клеточными мембранами в суспензии цельных эритроцитов и эксимеризуется в них [5]. На рис. 1, А показана зависимость степени эксимеризации зонда от его концентрации. Видно, что охлаждение эритроцитов (с последующей реверсией к комнатной температуре) не влияет на эксимеризацию пирена. По-видимому, это свидетельствует о том, что липидная фаза мембран, в которой диффундируют молекулы зонда [2], сама по себе не претерпевает существенных изменений в результате кратковременного охлаждения. В то же время изменяется другой параметр: эффективность тушения пиреном флуоресценции триптофановых остатков мемб-

ранных белков (рис. 1). В основе тушения лежит явление безызлучательного переноса энергии с триптофанилов на пирен, и этот процесс весьма чувствителен к перестройкам белково-липидной композиции [2]. Из рис. 1, Б, на котором представлено тушение только доступных триптофанилов, видно, что эффективность переноса (тангенс угла наклона прямой) после охлаждения возрастает почти в 1,4 раза, что свидетельствует о более тесном взаимодействии белков и липидов в мембране [2].

Как было показано ранее [5], ОСП-14 и ДСП-12, имеющие алифатические цепочки (соответственно из 14 и 12 звеньев [4]), встраиваются в мембрану эритроцитов до молярного отношения зонд — липид 1 : 40. Эта величина близка полученным в случае других мембран [6]. Оказалось, что охлаждение клеток не приводит к изменению концентрации мембранных центров связывания обоих зондов, что подтверждает предположение об устойчивости липида как фазы к кратковременному охлаждению. В паре ОСП-14 → ДСП-12 в мембранах происходит безызлучательный перенос энергии, эффективность которого при заданной концентрации акцептора (ДСП-12) зависит от взаимной упаковки белков и липидов на поверхности мембраны [2]. Из рис. 2 видно, что после охлаждения перенос энергии в паре этих зондов идет в 1,5—1,6 раза менее эффективно, чем в интактных эритроцитах. Таким образом, донорно-акцепторная пара ОСП-14 → ДСП-12, так же как и пара белок — пирен, позволяет зарегистрировать перестройки белок-липидных комплексов эритроцитарных мембран в результате их охлаждения.

На рис. 3 в двойных обратных координатах представлены данные по связыванию отрицательно заряженного зонда АНС с эритроцитами. Константа связывания зонда с интактными клетками составляет 10^4 M^{-1} . Эта величина близка к таковым в случае других мембран [2]. Охлаждение практически не приводит к изменению характера взаимодействия АНС с эритроцитами (ср. кривые 1 и 2 на рис. 3).

Влияние высокой ионной силы (1,2 М NaCl) на структурные параметры, оцениваемые с помощью зондов. Как при физиологической концентрации соли (0,15 М NaCl), так и при ее повышении до 1,2 М пирен связывается с эритроцитами, но его взаимодействие с компонентами мембраны меняется. Так, эксимеризация зонда в липидах ухудшается на $30 \pm 5\%$ по сравнению с эксимеризацией при 0,15 М NaCl. Ухудшается и перенос энергии с белков на зонд: предельная доля тушащейся белковой флуоресценции равна 9—10 %, в то время как при изотонии эта величина составляет около 20 %. В дальнейшем мы будем пользоваться именно этой величиной — долей тушащейся флуоресценции, так как она измеряется в данном случае намного точнее, чем наклон кривой тушения. Охлаждение гипертонической суспензии эритроцитов (режим II) приводит к таким же качественным эффектам, как и в случае «изотонических» клеток: эксимеризация пирена достоверно не меняется, а перенос с белка на зонд улучшается, так как доля тушимой флуоресценции возрастает до 15—19 %.

Гиперконцентрация соли не влияет на связывание ОСП-14 и ДСП-12 с эритроцитарной мембраной: концентрация центров связывания, как

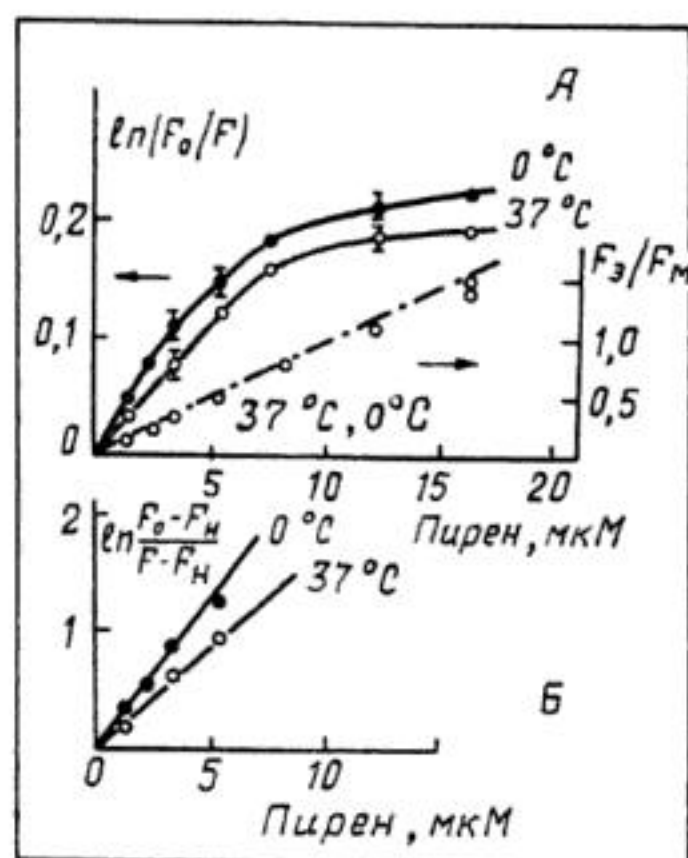


Рис. 1. Эксимеризация пирена в эритроцитах (А) и тушение белковой флуоресценции эритроцитов пиреном (Б). F_0 и F — интенсивность флуоресценции соответственно в отсутствие и в присутствии пирена. Флуоресценцию белка возбуждали при 283 нм, регистрировали при 350 нм. F_n — интенсивность нетушащейся флуоресценции белка. $F_э$ и F_m — интенсивность флуоресценции соответственно эксимеров и мономеров пирена. Флуоресценцию пирена возбуждали при 338 нм и регистрировали при 470 нм ($F_э$) и 370 нм (F_m).

и при 0,15 М NaCl, остается равной 7—8 мкМ при 2 %-ной концентрации суспензии. Охлаждение клеток (режим II) не влияет на эти параметры.

Из рис. 3 видно, что гиперконцентрация соли не влияет на константу связывания АНС с эритроцитами при 37 °С, но приводит к двукратному увеличению числа мест связывания зонда. Последующее охлаждение клеток, по сравнению с клетками при 37 °С, приводит и к резкому уменьшению константы связывания при сохранившейся концентрации мест связывания (ср. кривые 3 и 4 на рис. 3). Это свидетельствует о значительных структурных перестройках в мембране при совместном действии двух повреждающих факторов — гиперконцентрации соли и охлаждения.

Обратимость структурных перестроек, вызванных охлаждением (температурный режим III). Флуоресцентные зонды позволили зарегистрировать структурные перестройки в мембране эритроцита при охлаждении. Возможную интерпретацию этих нарушений обсудим в соответствующем разделе. Здесь же исследовали, насколько обратимы некоторые повреждения. Поскольку

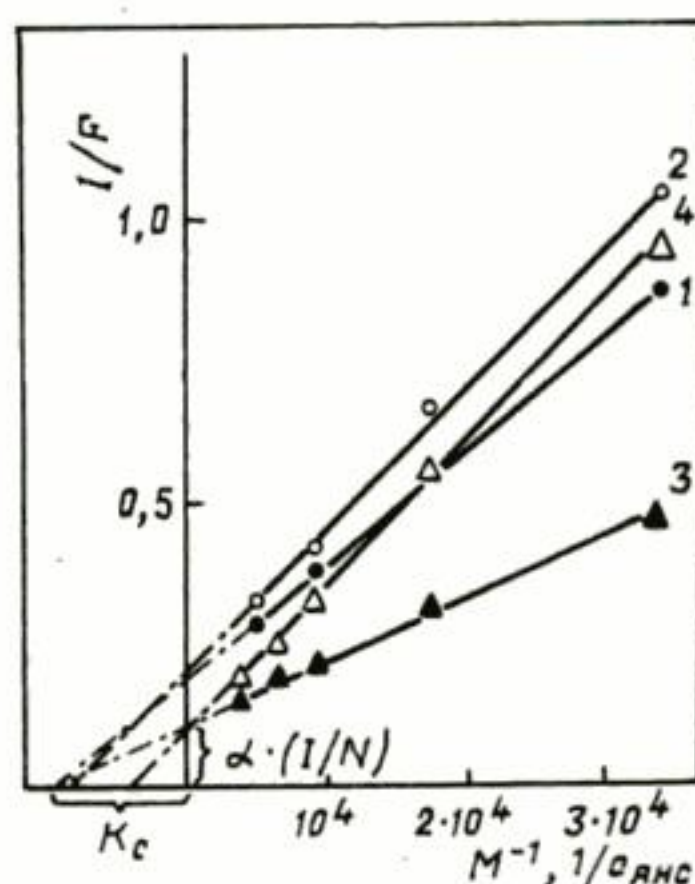
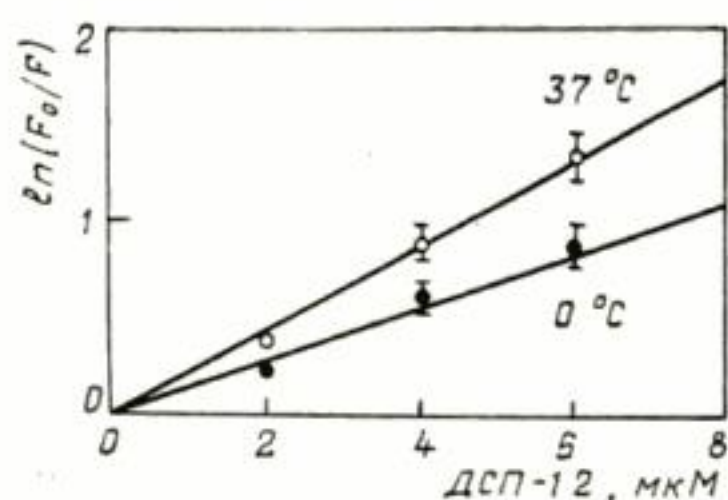


Рис. 2. Тушение флуоресценции ОСП-14 зондом ДСП-12 в эритроцитах. F_0 и F — интенсивность флуоресценции ОСП-14 соответственно в отсутствие и в присутствии ДСП-12. Флуоресценцию возбуждали при 380 нм, регистрировали при 500 нм. Концентрация ОСП-14 — 4 мкМ.

Рис. 3. Связывание зонда АНС с эритроцитами: F — интенсивность флуоресценции АНС при 480 нм (возбуждение при 360 нм); c — концентрация зонда; 1 — 0,15 М NaCl, 37 °С; 2 — 0,15 М NaCl, 0 °С; 3 — 1,2 М NaCl, 37 °С; 4 — 1,2 М NaCl, 0 °С. Отрезок, отсекаемый на оси $1/c$, равен константе связывания. Отрезок, отсекаемый на оси $1/F$, обратно пропорционален числу мест связывания (N).

измерения должны были вестись довольно часто в течение некоторого промежутка времени (мы выбрали 1 ч), пришлось отобрать лишь быстро-изменяемые параметры. Добавив к эритроцитам пирен в концентрации, которая тушит предельно возможную долю белковой флуоресценции, можно в течение 2—3 мин оценить 2 параметра: а) какова эта доля; б) какова эксимеризация пирена в мембране. Мы проводили такие опыты с 1,2 М NaCl, т. е. тогда, когда могут измениться оба параметра. Доля тушимой белковой флуоресценции при 37 °С составляла $9 \pm 1\%$, при 0 °С — $17 \pm 1\%$, а после переноса клеток обратно в 37 °С через 10 мин она оставалась высокой — $16 \pm 1\%$, через 20 мин — $14 \pm 1\%$, через 30 мин — $12 \pm 1\%$, через 40 мин и далее — $9,5 \pm 1\%$, т. е. практически такой же, как и в начале опыта.

Как и при переходе 37 → 0 °С, при обратной реверсии к 37 °С степень эксимеризации пирена достоверно не изменяется.

«Закалка» эритроцитов предварительной инкубацией при 0 °С (температурный режим IV). Регистрировали те же параметры, что и в режиме III. Если провести эритроциты через режим IV, то это не предохраняет их мембрану от тех нарушений, которые регистрируются при режиме 37 → 0 °С. Так, при концентрации соли 1,2 М NaCl пирен тушит в обоих случаях $17 \pm 1\%$ белковой флуоресценции. Эксимеризация же в ходе опыта остается неизменной. Таким образом, если «закалка» и есть, то она

проявляется не на том уровне, который «чувствуют» флуоресцентные зонды.

Нарушение структуры мембран при охлаждении в условиях изотонии. Данные по эксимеризации пирена и связыванию зондов с алифатической цепочкой (ДСП-12 и ОСП-14) свидетельствуют о том, что липидная фаза эритроцитарной мембраны сама по себе устойчива к действию охлаждения. Не меняется и доля белка, флуоресценция которого доступна для тушения пиреном. Однако в результате охлаждения увеличивается эффективность переноса энергии с белка на пирен, а перенос в паре ОСП-14 → ДСП-12 идет хуже, чем в интактных эритроцитах. Причиной обоих эффектов может служить распад белковых агрегатов. Действительно, в этом случае: а) улучшается взаимодействие пирена с внутриагрегатными остатками триптофана — пирен эффективней тушит их флуоресценцию; б) более мелкие белки ухудшают перенос энергии в паре зонд → зонд по сравнению с большими белковыми агрегатами [3]. В то же время субъединицы распавшегося белка, по-видимому, не претерпевают серьезных повреждений: АНС, который связывается и с белками, и с липидами [2], практически одинаково взаимодействует с интактными и охлажденными клетками. Таким образом, хотя липид и белок в отдельности устойчивы к охлаждению при физиологической концентрации соли, изменения претерпевают белок-липидные взаимодействия.

Влияние гипертонии на структуру мембран. Охлаждение эритроцитов в гипертонических условиях. Несомненно, гипертония ведет к значительным перестройкам структуры эритроцитарной мембраны: меняются почти все измеряемые параметры. Так, ухудшается эксимеризация пирена, это может быть вызвано как «отверждением» липидной фазы, так и изменением белок-липидного взаиморасположения [2]. По-видимому, предпочтение следует отдать второй возможности, так как, судя по связыванию ОСП-14 и ДСП-12, количество липидных центров связывания не изменилось, следовательно, и упаковка липидных молекул не нарушилась.

Резкое (в 2 раза) снижение доли доступного для тушения пиреном белка говорит о том, что гипертония вызывает дополнительное удаление (вымещение) белка за пределы зоны толщиной $1,2R_0$ по обе стороны липидного бислоя (R_0 — критическое расстояние переноса энергии с белка на пирен, $1,2R_0$ — «зона тушения» донора акцептором [3]), т. е. белок «уходит» от липидного бислоя. При этом в белке появляются дополнительные центры связывания АНС (рис. 3). На фоне этих повреждений охлаждение «гипертонических» эритроцитов приводит к дополнительным изменениям: а) доля тушимой белковой флуоресценции возрастает (причем до величины, характерной для «изотонических» клеток); б) константа связывания АНС резко уменьшается. Формально эти факты свидетельствуют о «возвращении» белка в положение, характерное для физиологических условий, но этот белок конформационно изменен.

Обратимость структурных перестроек, вызванных охлаждением. Судя по результатам, изменения, возникающие при действии охлаждения на мембраны «гипертонических» клеток, не являются необратимыми. По крайней мере, доля мембранных и примембранных белков, флуоресценция которых доступна для тушения пиреном, при обратном переходе к 37 °С со временем восстанавливается до величины, характерной для клеток с 1,2 М NaCl при 37 °С.

Таким образом, данные, полученные с помощью флуоресцентных зондов, свидетельствуют о том, что изменения температурных и осмотических параметров среды в условиях, когда эритроциты подвергаются холодовому шоку, проявляются в модификации характера взаимодействия липидов и белков мембраны. Возможно, что первичные процессы, индуцирующие сенсibilизацию клеток к охлаждению, развиваются на уровне белкового цитоскелета, ассоциированного как с частью мембранных липидов, так и с некоторыми интегральными белками. Об этом, в частности, свидетельствует медленная обратимость обнаруженных изменений.

1. Белоус А. М., Бондаренко В. А., Бабийчук Л. А. и др. Единый механизм повреждения клетки при термальном шоке, замораживании и постгипертоническом лизисе // Криобиология. — 1985. — № 2. — С. 25—32.
2. Добрецов Г. Е. Исследование пространственной структуры мембран и липопротеинов флуоресцентными зондами // Укр. биохим. журн. — 1984. — 56, № 2. — С. 211—222.
3. Добрецов Г. Е., Чекрыгин О. В. Анализ синглет-синглетного переноса энергии в мембранах. II. Перенос с точечного белка на флуоресцентный зонд, расположенный на двух поверхностях липидного бислоя // Биофизика. — 1981. — 26, № 2. — С. 375.
4. Добрецов Г. Е., Дубур Г. Я., Дубуре Р. Р. и др. Флуоресцентные зонды — производные пиридина для исследования конструкции биологических мембран // Журн. прикладной спектроскопии. — 1983. — 39, № 6. — С. 957—960.
5. Спириин М. М., Белевич Г. В., Добрецов Г. Е. и др. Исследование собственной зондовой флуоресценции в суспензии эритроцитов человека // Биофизика. — 1985. — 30, № 1. — С. 178.
6. Dubur G. Ya., Dobretsov G. E., Deme A. K. et al. Fluorescent probes on styrylpyridinium derivatives: optical properties and membrane binding // J. Biochem. Biophys. Methods. — 1984. — 10, N 1. — P. 123—134.
7. Green F. A., Yung C. Y. Cold-induced hemolysis in a hypertonic milieu // J. Membr. Biol. — 1977. — 33, N 3—4. — P. 249—262.

Ин-т проблем криобиологии и
криомедицины АН УССР, г. Харьков,
НИИ физико-химической медицины
МЗ РСФСР, г. Москва,
II МОЛГМИ им. Н. И. Пирогова,
г. Москва

Поступила 02.09.85

УДК 57.043+612.115.38

О. А. Нардид, В. А. Моисеев, С. Х. Межидов

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР НА ФАЗОВОЕ СОСТОЯНИЕ ЦИТОЗОЛЯ ЭРИТРОЦИТОВ

В криобиологии для анализа возможных механизмов криоповреждения и криозащиты представляет определенный интерес информация о фазовом состоянии внутриклеточного содержимого при понижении температуры. Исследованию данного вопроса посвящены единичные работы, которые освещают только некоторые его стороны. Так, сообщалось об обнаружении в цитозоле как кристаллической, так и стеклообразной фаз в зависимости от скорости замораживания [2, 5, 6]. В настоящей работе изучали процессы, происходящие в цитозоле при замораживании суспензии клеток, в частности при температурах ниже температуры стеклования цитозоля.

Нами использован метод ЭПР спинового зонда для исследования цитозоля [5], согласно которому эритромаassa эквilibрируется в растворе, содержащем 0,1 моль/л Ni^{2+} , 10^{-3} моль/л иминоксильного радикала 2,2,6,6-тетраметил-4-оксиперидин-1-оксила. При этом зонд свободно диффундирует через мембраны клеток, распределяясь преимущественно вне и внутри клеток. Ионы никеля не проходят через мембраны и приводят к уширению и полному исчезновению сигнала ЭПР от спиновых зондов, находящихся во внеклеточном растворе. Это позволяет наблюдать спектры ЭПР зондов, которые находятся в цитозоле. При разрушении клеток сигнал ЭПР зондов исчезает полностью, это доказывает, что зонд находится в цитозоле. Если бы зонд распределялся между белком и водой, мы наблюдали бы суперпозицию двух спектров, так как микровязкость воды и белков различна. В данном случае имеется один вид спектра.

В наших опытах использовались эритроциты 2—4 сут хранения при 4 °C. Для создания высокой концентрации эритроцитов в образце их подвергали центрифугированию при 3000 об/мин в течение 30 мин. К полученной эритромассе добавляли раствор радикала и NiSO_4 с конечными концентрациями соответственно 10^{-3} моль/л и 0,1 моль/л. Спектры снимались на спектрометре Bruker ER-100 D (ФРГ) со стандартной температурной приставкой (точность поддержания температуры $\pm 0,5$ °C). Измерения проводили в тонкостенных стеклянных капиллярах с внутренним диаметром 500 мкм. Для кристаллизации внеклеточной воды капилляр с образцом помещали в криостат с точностью поддержания температуры $\pm 0,5$ °C. Образцы, не со-

держащие глицерин, кристаллизовали при температуре $(-2 \pm 0,5)^\circ\text{C}$, а содержащие глицерин — при $(-17 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. Фазовый переход внеклеточной воды вызывали перемешиванием содержимого капилляра. Затем капилляр с образцом переносили в резонатор спектрометра ЭПР, где предварительно устанавливали температуру, соответствующую температуре образца. Затвердевание образца определяли тремя способами: визуально, зондированием содержимого капилляра и по изменению параметров резонатора спектрометра ЭПР по сравнению с жидким образцом. Образец охлаждали со скоростью $0,5 \div 1^\circ\text{C}/\text{мин}$. Анализ спектров проводили по методу, описанному ранее [3].

В результате проведенных исследований было установлено, что при понижении температуры после кристаллизации внеклеточной воды происходит постепенное уширение линии ЭПР спектра иминоксильного радикала. При этом температура, при которой начиналось уширение, зависела от исходной концентрации зонда при одной и той же концентрации Ni^{2+} . Так, при концентрации зонда 10^{-3} моль/л уширение проявляется при $(-3 \pm 0,5)^\circ\text{C}$, а при концентрации зонда $6,5 \cdot 10^{-3}$ моль/л — сразу после

Ширина центральной компоненты ΔH спектра иминоксильного радикала

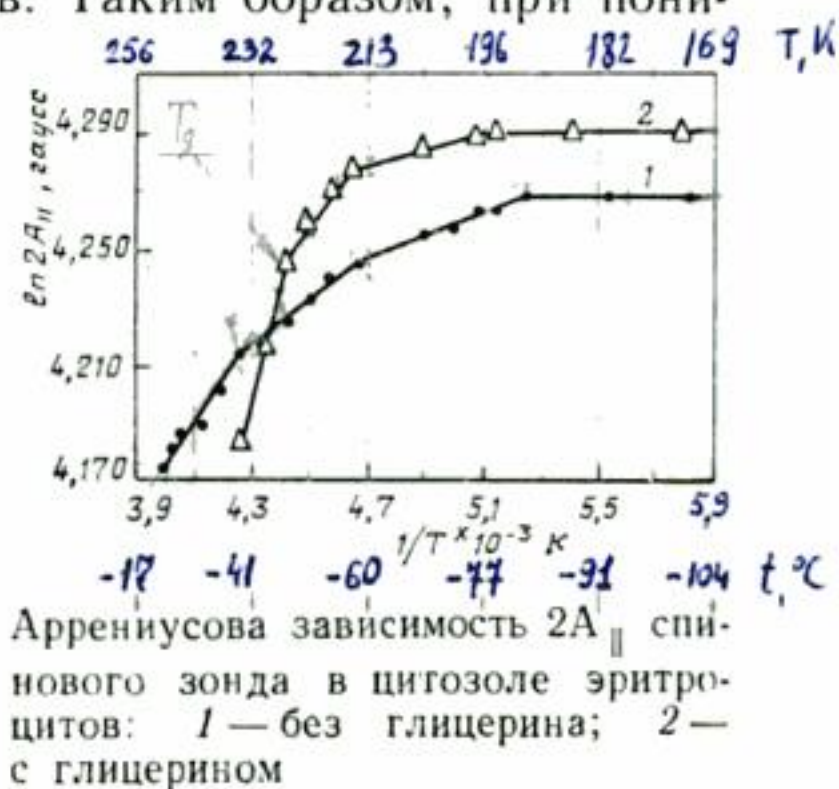
Пара-метр	Концентрация зонда								
	10^{-3} моль/л			$6,5 \cdot 10^{-3}$ моль/л			10^{-3} моль/л, 30 % глицерина		
ΔT^* , $^\circ\text{C}$	Конт-роль	2	5	Конт-роль	2	5	Конт-роль	2	5
ΔH^{**}	$2,8 \pm 0,2$	$3,0 \pm 0,2$	$5,3 \pm 0,2$	$2,8 \pm 0,2$	$3,4 \pm 0,2$	$9,6 \pm 0,2$	$3,0 \pm 0,2$	$3,2 \pm 0,2$	$3,8 \pm 0,2$

* Переохлаждение относительно температуры плавления. ** Ширина измерялась в гаусах по точкам перегиба первой производной спектра ЭПР.

кристаллизации внеклеточной воды (таблица). Это свидетельствует о концентрировании зонда в цитозоле эритроцитов. Таким образом, при понижении температуры ниже точки кристаллизации внеклеточной воды происходит направленная диффузия молекул воды через мембрану с достройкой каркаса льда, появившегося снаружи клеток. Этот процесс, вызывающий постепенное затормаживание подвижности зонда, наблюдается вплоть до температуры -38°C . При этой температуре зависимость параметра $2A_{\parallel}$, характеризующего упорядоченность окружения зонда, в аррениусовых координатах претерпевает излом (рисунок). Это связано, по-видимому, со стеклованием цитозоля эритроцитов, так как вид спектра зонда характерен для медленно вращающихся,

не взаимодействующих между собой и равномерно распределенных в стеклообразном цитозоле зондов. Второй излом наблюдается при -54°C . Он, вероятно, обусловлен кооперативными структурными перестройками гидратированных макромолекул гемоглобина. Ранее методом фосфоресцентных меток было показано [1], что в водных растворах гемоглобина человека сдвиг максимума спектра фосфоресценции происходит в районе -50°C , что объяснялось вымораживанием основной массы связанной с гемоглобином воды. При дальнейшем понижении температуры происходило постепенное затормаживание подвижности зонда, так что при температуре ниже -82°C параметр $2A_{\parallel}$ не изменялся. Это обусловлено постепенным вымораживанием связанной с компонентами клетки воды вплоть до температуры -82°C . Наличие воды в биообъектах до -70°C и ниже подтверждается исследованиями, проведенными методом ЯМР [4].

Исследования показали, что добавление в суспензию эритроцитов глицерина в 30 %-ной концентрации существенно влияет на фазовое состоя-



ние цитозоля при указанных выше температурах. При понижении температуры ниже точки затвердевания внеклеточной среды концентрирование зонда происходит в меньшей степени по сравнению с суспензией клеток без криопротектора при одном и том же переохлаждении (таблица). Это свидетельствует о меньшей дегидратации цитозоля, связанной с кристаллизацией внеклеточной воды. Температура стеклования цитозоля смещается в сторону более низких температур и совпадает с эвтектической точкой смеси вода — глицерин (рисунок). Второй излом аррениусовой зависимости наблюдается также при более низкой температуре, -58°C . Вымораживание связанной с компонентами клетки воды завершается при температуре -78°C , т. е. более высокой по сравнению с суспензией клеток без криопротектора.

На основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы. При медленном замораживании в цитозоле происходят изменения, обусловленные стеклованием, структурными перестройками гидратированных макромолекул гемоглобина и вымораживанием связанной с компонентами клетки воды вплоть до -82°C . Наличие в суспензии эритроцитов глицерина приводит к изменению температур соответствующих перестроек.

1. Гаврилова И. И. Изучение влияния низкой температуры и криопротекторов на структурно-конформационные переходы в некоторых белках и мембранах эритроцитов // Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Харьков, 1982.— 29 с.
2. Репин Н. В. Электронно-микроскопическое изучение характера кристаллизации при замораживании водных растворов и некоторых клеток // Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Харьков, 1984.— 27 с.
3. Лихтенштейн Г. И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии.— М.: Наука, 1974.— 256 с.
4. Скрыпин В. И. Исследование повреждений модельных и биологических мембран при замораживании — оттаивании радиоспектроскопическими методами // Тез. докл. Всесоюз. симпоз. «Магнитный резонанс в биологии и медицине».— 1981.— С. 71.
5. Gavrilova I. I., Ivanov L. V., Moiseyev V. A. Investigation of the membrane integrity of human erythrocytes at low temperatures using spin probes // Cryo-Letters.— 1981.— 2, N 2.— P. 197—200.
6. Rapatz G., Luyet B. Electron microscopic study of erythrocytes in rapidly frozen frog's blood // Biodynamica.— 1961.— 8, N 2.— P. 295—315.

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

Поступила 08.10.85

УДК 577.123+591.481.1+591.543.42

Р. Я. Гордон, Л. С. Бочарова, В. И. Архипов

СИНТЕЗ РНК В МОЗГЕ ЗИМОСПЯЩИХ

Известно, что во время холодового оцепенения у зимоспящих животных резко снижается электрическая активность мозга, уменьшается потребление кислорода нервной тканью [3], падает содержание РНК и белков [1]. Обеднение мозга РНК и белками в определенной мере обусловлено общим угнетением биосинтетической активности и снижением уровня энергетического обеспечения в результате снижения температуры животных до $5-6^{\circ}\text{C}$. Кроме того, во время зимней спячки имеет место длительное и генерализованное торможение функциональной активности мозга, которое в момент пробуждения сменяется резкой активацией, причем и возбуждение, и торможение охватывают почти весь мозг. Это делает зимоспящих удобным объектом изучения влияния функциональной активности на метаболизм мозга [1].

В данной работе определялось влияние энергетических факторов на метаболизм РНК при снижении температуры и функциональной активности мозга у сусликов в состояниях холодового оцепенения и пробуждения от спячки.

Работа выполнена на крапчатых сусликах *Citellus suslicus*, в одном случае использовали полярного суслика. Опыты проводились в январе — феврале, когда животные находились в состоянии холодового оцепенения. Для определения интенсивности синтеза РНК подопытным с помощью микрошприца вводили в мозг ^3H -уридин по 20 мкл в желудочек (активность 1 мКю/мл, удельная активность 26 Кю/мМ). Через 2 ч после инъекции уридина сусликов декапитировали, извлекали мозг и через 40 мин отмывки в ледяном физиологическом растворе обрабатывали гомогенат холодной 0,5N хлорной кислотой для извлечения кислоторастворимой фракции. РНК и ДНК в гомогенате разделяли по стандартному методу Шмидта и Таннгаузера [2]. Определение содержания РНК и нуклеотидов в кислоторастворимой фракции проводили спектрофотометрически по Спирину [2]. Включение ^3H -уридина измеряли методом прямого счета радиоактивности с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика.

Через некоторое время после введения меченого нуклеотида метка распределяется между тремя фракциями: часть ^3H -уридина остается в межклеточном пространстве и может быть извлечена при отмывке ледяным физиологическим раствором; большая часть поглощается клетками, где уридин фосфорилируется, превращаясь в уридиновые нуклеотиды, клеточный пул экстрагируется кислотой; часть меченого уридинтрифосфата включается в синтезируемую РНК.

В параллельной серии опытов, выполненной на белых крысах, мы определили, что извлечение ^3H -уридина из межклеточного пространства в нуклеотидный пул клеток устанавливается на стационарном уровне уже к 30 мин после введения. Включение в РНК между 1,5 и 3 ч после введения уридина сохраняется на постоянном уровне. При этом относительная интенсивность мечения РНК, отношение включения ^3H -уридина в РНК к радиоактивности нуклеотидного пула, составляет 9—10 %. В качестве контрольных показателей, характеризующих скорость и интенсивность накопления меченых нуклеотидов и РНК у активных животных, были использованы данные, полученные на крысах. При этом исходили из допущения, что поскольку по содержанию в мозге РНК, ($2,30 \pm 0,06$) и ($2,20 \pm 0,07$) мкг/мг, и нуклеотидов, ($2,72 \pm 0,30$) и ($2,63 \pm 0,07$) мкг/мг живого веса, мозг крыс и сусликов не отличается, то и по интенсивности синтеза РНК крысы и бодрствующие суслики не должны отличаться. Радиоактивность нуклеотидного пула у сусликов в состоянии холодового оцепенения через 2 ч после введения в мозг ^3H -уридина составляет 1822 имп/мин/мг ткани и не отличается от активности пула у активных крыс, 1750—1850 имп/мин/мг ткани.

Известно, что проницаемость клеточной мембраны для уридина контролируется интенсивностью фосфорилирования нуклеозида в уридин монофосфат и поэтому зависит от энергетического состояния клетки. Тот факт, что в мозге сусликов, имеющих температуру тела около 5°C , накопление уридина в пуле предшественников идет с той же интенсивностью, что и у активных крыс, указывает на то, что, по крайней мере, первое фосфорилирование у них не нарушено и, следовательно, клетки не находятся в состоянии значительного энергетического дефицита. Это не исключает возможности снижения фосфорилирования меченого предшественника при образовании уридин ди- или трифосфатов.

Изменение включения меченого предшественника не всегда является отражением изменения скорости синтеза РНК. Часто включение в РНК является следствием изменения накопления метки в нуклеотидном пуле. Неоднократно показано, что в мозге увеличение или уменьшение включения в РНК может повторять соответствующие изменения активности нуклеотидного пула [4]. В нашем случае в мозге сусликов в состоянии холодового оцепенения, при нормальном объеме нуклеотидного пула, включение в РНК, измеренное как отношение счета РНК к счету пула, падает до 1 % против 10 % у крыс, т. е. в 10 раз. Следовательно, во время зимней спячки в мозге происходит многократное снижение синтеза РНК. Интересно, что в мозге летучих мышей во время зимней спячки резкое подавление синтеза РНК развивается на фоне повышенного уровня включения метки в нуклеотидный пул.

Весьма существенно, что и по литературным данным, и по нашим наблюдениям при десятикратном уменьшении скорости синтеза содержание РНК в мозге спящих и активных сусликов отличаются мало: $(2,28 \pm 0,02)$ и $(2,20 \pm 0,07)$ мкг/мг ткани. Правда, когда определение содержания РНК было сделано не для мозга в целом, а цитофотометрически на отдельных нервных клетках, выявлено снижение концентрации РНК, но оно не превышало 50 %. Вероятно, во время зимней спячки в мозге сусликов происходит не только предельное угнетение синтеза РНК, но и резкое замедление обмена РНК, что и позволяет сохранять в клетках количество РНК, необходимое для поддержания их жизненно важных функций. В обычных условиях рибосомальная РНК, составляющая основную массу РНК клетки, обменивается в мозге млекопитающих со скоростью около 5 % в сутки. Такое предположение хорошо согласуется с тем фактом, что в состоянии зимней спячки созревание рибосомальной РНК в ядрах сильно замедляется.

Пробуждение сусликов сопровождается резкой активацией синтеза РНК в мозге. Если за 2 ч после введения ^3H -уридина животные разогревались и просыпались, то включение в РНК за это время увеличивалось от 1 до 7 % активности пула. Характерно, что поступление ^3H -уридина в нуклеотидный пул слегка уменьшается и составляет 1570 имп/мин/мг ткани против 1820 имп/мин/мг ткани у холодных сусликов. При этом заметно больше ^3H -уридина остается неиспользованным в межклеточном пространстве. Это видно по снижению отношения счета пула к активности отмываемого уридина с $4,2 \pm 0,3$ у зимоспящих сусликов до $2,4 \pm 0,2$ у проснувшихся. Очевидно, в мозге в результате сильного возбуждения создается некоторый энергетический дефицит, не позволяющий клеткам расходовать прежнее количество энергии на накопление предшественников.

Следовательно, увеличение включения ^3H -уридина в РНК в момент пробуждения сусликов отражает истинное возрастание синтеза РНК. Полученные данные показывают, что в случае общего торможения или резкой активации мозга во время зимней спячки и при пробуждении сусликов происходят резкие, многократные изменения РНК, зависящие от функциональной активности нервной ткани.

1. Палладин А. В. Вопросы биохимии нервной системы.— Киев : Наук. думка, 1965.— 184 с.
2. Химия и биохимия нуклеиновых кислот / Под ред. И. Б. Збарского и С. С. Дебова.— Л. : Медицина, 1968.— 429 с.
3. Штарк М. Б. Мозг зимоспящих.— Новосибирск : Наука, 1970.— 130 с.
4. Dewar A. J. Changes in incorporation of ^{14}C uridine into uridine nucleotides in rat visual cortex during first exposure to light // Exptl. Neurol.— 1974.— 45, N 1.— P. 134—140.

Ин-т биофизики АН СССР,
г. Пущино

Поступила 12.05.83

УДК 617.713—089.843 : 612.017.1—092.9

О. В. Репко

ДИНАМИКА НАКОПЛЕНИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНА G В ТКАНЯХ ДОНОРА И РЕЦИПИЕНТА ПРИ АЛЛОТРАНСПЛАНТАЦИИ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ РОГОВИЦЫ

Экспериментальные и клинические наблюдения над результатами приживления трансплантатов роговицы, консервированной по методу, разработанному в Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР [2], выявили высокий показатель прозрачного приживления (75 %) этой донорской ткани [3]. Морфофункциональные и гистохимические ис-

следования роговой оболочки человека и некоторых животных, консервированной при -196°C под защитой полиэтиленоксида с молекулярной массой 400, продемонстрировали структурно-функциональную сохранность ткани и позволили применить ее в клинической практике как для послойной, так и для сквозной кератопластики [3].

Для выяснения основных закономерностей местного проявления гуморальной иммунной реакции на криоконсервированный аллотрансплантат изучалось содержание иммуноглобулина класса G (IgG) в ткани роговицы с прозрачными трансплантатами в различные сроки послеоперационного периода.

Экспериментальное исследование проведено на 60 кроликах породы шиншилла массой 1800—2000 г. Частичную заднюю сквозную кератопластику выполняли на одном глазу кролика под общим наркозом тиопентал-натрием. Для местной анестезии ретробульбарно вводили 2 %-ный раствор новокаина и инстиллировали дикаин. Выкраивание трансплантата роговицы осуществляли трепаном ФМ-3 диаметром 6,5 мм, поверхностный лоскут фиксировали 6—8 узловыми швами толщиной 42 мкм (капрон). Через 1, 3, 7, 14, 20 сут, 1, 3, 6 мес после операции животных забивали воздушной эмболией, в каждом сроке наблюдения исследовали 6 кроликов.

Иммуноглобулин G выявляли в слоях роговой оболочки с помощью прямого метода люминесцирующих антител [5]. Для повышения специфичности реакции был использован элюат чистых моноспецифических антител к IgG кролика, меченный флюоресцентном изотиоцианатом. Элюат был получен из ослиной антикроличьей сыворотки в Институте эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи АМН СССР. Чистые антитела выделяли из сыворотки, используя для приготовления иммуносorbента глютаровый альдегид [4]. Криостатные срезы роговицы толщиной 4—5 мкм обрабатывали люминесцирующими антителами в разведении 1 : 8. Контроль специфичности реакции проводили путем предварительной обработки срезов немеченым препаратом антител, а затем — люминесцирующими антителами. Отсутствие специфического свечения после предварительной ингибиции свидетельствовало о специфичности основной реакции. Изучение и морфометрию люминесцентных препаратов проводили на микроскопе МЛ-2, учитывая интенсивность свечения в 20 полях зрения для каждой структуры роговицы (собственное вещество, задний эпителий, передний эпителий). Максимальная интенсивность свечения оценивалась в 4 балла, минимальная — 0,5 балла. Результаты иммуноморфологического исследования обрабатывались статистически на ЭВМ по методу Фишера—Стьюдента с принятым уровнем достоверности 95 %.

Гистологическое исследование роговиц проводилось с помощью окраски гематоксилином и эозином, а также метиловым зеленым — пиронином по Унна-Папенгейму (реакция Браше) [1].

Динамику накопления IgG после аллотрансплантации криоконсервированной роговой оболочки исследовали в слоях роговицы реципиента, в трансплантате, а также в роговице неоперированного глаза реципиента. В качестве контроля использовали роговицу здорового интактного кролика.

В раннем послеоперационном периоде (1—3 сут) определялось существенное различие в характере накопления IgG собственным веществом криоконсервированного трансплантата и окружающей его роговицы реципиента (табл. 1). В ткани реципиента, преимущественно в околомимбальной области, через 1 сут

после кератопластики наблюдалось резкое увеличение содержания IgG, почти в 2 раза большее, чем в собственном веществе трансплантата. Макси-

Т а б л и ц а 1. Динамика накопления IgG в собственном веществе роговицы донора и реципиента в течение послеоперационного периода, балл

Срок после операции	Исследуемая ткань		
	Трансплантат	Роговица реципиента	Роговица неоперированного глаза реципиента
Контроль	0,88 ± 0,04	0,88 ± 0,04	0,88 ± 0,04
Сутки	1	1,98 ± 0,08	3,75 ± 0,04
	3	2,51 ± 0,05	3,53 ± 0,03
	7	3,50 ± 0,01	3,63 ± 0,02
	14	3,60 ± 0,02	3,81 ± 0,02
	20	3,53 ± 0,02 →	3,57 ± 0,02
Месяцы	1	2,80 ± 0,01	2,78 ± 0,02
	3	2,10 ± 0,01	2,17 ± 0,02
	6	0,97 ± 0,02	1,03 ± 0,03

Примечание. Стрелкой указана недостоверность различия между соседними показателями.

мальная активность иммунолюминесцентной реакции в обеих сравниваемых структурах проявлялась через 7—20 сут после операции, а в последующие сроки наблюдения содержание *IgG* в собственном веществе донора и реципиента постепенно снижалось и к 6 мес характеризовалось количествен-

Таблица 2. Динамика накопления *IgG* в заднем эпителии роговицы донора и реципиента в течение послеоперационного периода, балл

Срок после операции	Исследуемая ткань		
	Трансплантат	Роговица реципиента	Роговица неоперированного глаза реципиента
Контроль	$0,93 \pm 0,02$	$0,93 \pm 0,02$	$0,93 \pm 0,02$
1	$2,82 \pm 0,02$	$3,80 \pm 0,03$	$2,32 \pm 0,02$
3	$3,08 \pm 0,01$	$3,56 \pm 0,02$	$2,42 \pm 0,02$
7	$3,62 \pm 0,03 \rightarrow$	$3,68 \pm 0,03$	$2,94 \pm 0,02$
14	$3,83 \pm 0,03 \rightarrow$	$3,83 \pm 0,02$	$3,10 \pm 0,06$
20	$3,72 \pm 0,06$	$3,56 \pm 0,03$	$2,92 \pm 0,04$
1	$2,73 \pm 0,02$	$2,83 \pm 0,03$	$2,03 \pm 0,04$
3	$1,93 \pm 0,01$	$2,31 \pm 0,02$	$1,63 \pm 0,02$
6	$1,03 \pm 0,02 \rightarrow$	$1,07 \pm 0,03$	$0,99 \pm 0,02$

Примечание. Стрелкой указана недостоверность различия между соседними показателями.

Таблица 3. Динамика накопления *IgG* в переднем эпителии роговицы донора и реципиента в течение послеоперационного периода, балл

Срок после операции	Исследуемая ткань		
	Трансплантат	Роговица реципиента	Роговица неоперированного глаза реципиента
Контроль	$0,45 \pm 0,03$	$0,45 \pm 0,03$	$0,45 \pm 0,03$
1	$0,51 \pm 0,03$	$1,06 \pm 0,06$	$0,91 \pm 0,03$
3	$0,73 \pm 0,02$	$1,24 \pm 0,04$	$0,92 \pm 0,02$
7	$1,59 \pm 0,03$	$1,72 \pm 0,03$	$1,13 \pm 0,06$
14	$1,90 \pm 0,05 \rightarrow$	$2,00 \pm 0,08$	$1,23 \pm 0,02$
20	$1,83 \pm 0,02$	$1,92 \pm 0,03$	$1,01 \pm 0,03$
1	$0,92 \pm 0,01$	$1,08 \pm 0,02$	$0,9 \pm 0,01$
3	$0,50 \pm 0,02$	$0,56 \pm 0,02 \rightarrow$	$0,55 \pm 0,02$
6	$0,49 \pm 0,01 \rightarrow$	$0,50 \pm 0,02 \rightarrow$	$0,54 \pm 0,02$

Примечание. Стрелкой указана недостоверность различия между соседними показателями.

чениями на 14—20 сут после операции. В последующие сроки наблюдения содержание *IgG* в этом слое уменьшалось и достигало контрольного уровня к 6 мес послеоперационного периода. Распределение *IgG* в переднем эпителии характеризовалось свечением цитоплазмы эпителиальных клеток. В ядрах свечение отсутствовало. Во все сроки наблюдения была отмечена более интенсивная реакция в участках, прилегающих к лимбу (табл. 3).

Проведенное гистологическое изучение препаратов оперированных роговиц показало, что клеточная реакция в виде периваскулярной инфильтрации мононуклеарами с единичными плазмócитами определяется в норм-

ными показателями, близкими к контрольным. Распределение *IgG* в собственном веществе характеризовалось линейным свечением межуточного вещества по ходу коллагеновых волокон. Была зафиксирована более высокая интенсивность реакции в области лимба во все сроки наблюдения.

В заднем эпителии роговицы реципиента в ранние сроки после кератопластики также наблюдался достоверно более высокий уровень содержания *IgG*, чем в трансплантате (табл. 2). Самые высокие показатели реакции в заднем эпителии донора и реципиента определялись на 7—20 сут, причем на 14 сут интенсивность реакции была одинаковой по всему заднему эпителию оперированного глаза. Начиная с 1 мес послеоперационного периода содержание *IgG* в заднем эпителии достоверно уменьшалось, достигая контрольных значений к 6 мес. Специфическая реакция в заднем эпителии характеризовалась свечением на черном поле зрения с глыбками светящегося вещества, расположенного соответственно местам локализации ядер клеток.

В переднем эпителии криоконсервированного трансплантата и окружающей его ткани реципиента наблюдалось постепенное нарастание интенсивности иммунолюминесцентной реакции начиная с 1 сут с максимальными зна-

в области лимба, заметно усиливается после аллотрансплантации криоконсервированной роговицы с увеличением количества плазматических клеток и наиболее выражена через 7—20 сут после кератопластики.

Полученные данные об изменении содержания *IgG* в различных слоях криоконсервированного аллотрансплантата и окружающей его ткани реципиента, а также об усилении круглоклеточной инфильтрации с увеличением количества плазмоцитов свидетельствуют об активном участии гуморального иммунного фактора в процессе приживления такой донорской ткани. В связи с тем, что выявленная местная реакция сопровождается прозрачным приживлением криоконсервированного аллотрансплантата роговицы, можно предположить защитную роль местной гуморальной иммунной реакции.

Полученные результаты свидетельствуют, что более выраженное повышение концентрации *IgG* в структурах роговицы реципиента по сравнению с трансплантатом в ранние сроки после операции обусловлено близостью лимба и лимбальной конъюнктивы, богатой сосудами и содержащей круглоклеточные элементы и плазмоциты. Наиболее высокие показатели содержания *IgG* во всех структурах ткани реципиента и трансплантата определялись в период между 7 и 20 сут после кератопластики. Повышение содержания *IgG*, выявленное в роговице неоперированного глаза реципиента, может являться одним из факторов, сопровождающих развитие симпатической реакции.

1. Меркулов Г. А. Курс патологогистологической техники.— Л.: Медгиз, 1961.— 340 с.
2. Чередниченко В. М., Юрченко Т. Н., Шарлай Т. М. К методике низкотемпературной консервации тканей глаза // Трансплантация органов и тканей.— Рига: Б.и., 1972.— С. 493—494.
3. Юрченко Т. Н. Гипотермическая и низкотемпературная консервация роговицы и течение восстановительного периода после трансплантации: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук.— Харьков, 1982.— 37 с.
4. Avrameas S., Ternink T. The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoabsorbents // *Immunochemistry*. — 1969.— 6, N 1.— P. 53—66.
5. Coons A. H., Kaplan M. H. Localization of antigen in tissues and cells // *J. Exp. Med.*— 1950.— 91, N 1.— P. 1—13.

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

Поступила 24.10.83

УДК 612.112.93 : 612.135+612.014.461.3 : 616—089.583.29—092.4/.9

О. Д. Мяделец, А. Ф. Суханов

РОЛЬ ТКАНЕВЫХ БАЗОФИЛОВ ДЕРМЫ В ИЗМЕНЕНИИ СОСТОЯНИЯ КАПИЛЛЯРНОГО РУСЛА И ВОДНОГО ОБМЕНА КОЖИ БЕЛЫХ КРЫС ПРИ ОБЩЕЙ ГЛУБОКОЙ ГИПОТЕРМИИ И В ПОСТГИПОТЕРМИЧЕСКОМ ПЕРИОДЕ

Общая глубокая гипотермия организма до сих пор является в основном экспериментальной моделью. Одной из причин, препятствующих широкому применению ее в клинике, является то, что общее глубокое охлаждение приводит к резко выраженным изменениям в системе микроциркуляции, а это, в свою очередь, вызывает метаболические нарушения [8]. Настоящее исследование посвящено изучению роли тканевых базофилов и щелочной фосфомоноэстеразы гемокапилляров дермы в динамике изменений гемокапиллярного русла и содержания воды в коже при общей глубокой гипотермии и после нее.

Эксперименты выполнены на 190 белых крысах обоего пола. Проведены три серии опытов. В первой серии охлаждению подвергались неполовозрелые крысы в возрасте 16 сут (58 крыс опытных и 36 контрольных), во второй — половозрелые (120 сут жизни, соответственно 54 и 6 крыс), а в третьей серии — животные двухлетнего возраста (старые, соответственно 30 и 6 животных). Состояние общей глубокой гипотермии достигали по методу В. А. Борисова и Б. С. Базеко [1]. Время охлаждения животных до ректальной температуры 18 °С составляло 1,5 ч, время нахождения их при данной температуре было равно 10 мин, согревание от 18 до 37 °С проводилось в течение 1,5 ч. Общая продолжительность эксперимента составляла 3 ч 10 мин. Животных первой и второй серий забивали на глубине охлаждения (18 °С в прямой кишке), сразу после согревания (при температуре тела 37 °С), а также через 6, 24 ч, 3, 7, 15, 30 и 60 сут. Крысы третьей серии были забиты на глубине охлаждения, через 6, 24 ч, 3, 7 и 30 сут после гипотермии. Контролем служили интактные крысы, причем для первой серии использовали несколько групп контрольных животных разного возраста в соответствии с возрастом экспериментальных крыс в момент забоя. Кожу межлопаточной области фиксировали в спирт-формалине и заливали в парафин. Срезы толщиной 6 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, а также 0,1 %-ным раствором толундинового синего в 30 %-ном этаноле. В криостатных срезах по методу Берстона [2] выявляли активность щелочной фосфомоноэстеразы в эндотелиоцитах гемокапилляров дермы и оценивали ее по пятибальной системе. При увеличении микроскопа 400 в сосочковом слое дермы производили подсчет тканевых базофилов в одном поле зрения, по 150 подсчетов на каждый срок. При этом же увеличении микроскопа после окраски гематоксилином и эозином и постановки реакции на щелочную фосфомоноэстеразу подсчитывали число поперечных срезов гемокапилляров сосочкового слоя дермы в одном поле зрения (по 150 полей на срок). Содержание серотонина в тканевых базофилах выявляли по методу Фалька [6] в модификации [7]. Количество его в одной клетке определяли фотометрически, используя люминесцентный микроскоп ЛЮАМ И-2 с фотометрической насадкой ФМЭЛ. Необходимую длину волны выделяли фильтром возбуждения УФС-6-3 и запирающим фильтром ЖС-18 + ЖЗС-19, а также светофильтром фотонасадки с максимумом пропускания 525 нм. При фотометрировании учитывали рекомендации Н. А. Гавришевой и А. С. Леонтьева [3]. Определяли также содержание в коже общей воды по методу М. С. Трашлиевой и В. Г. Леонтьева [10]. Все цифровые данные обработаны статистически с использованием критерия Вилкоксона-Манна-Уитни [4].

Изменения в коже неполовозрелых крыс при гипотермии и в постгипотермическом периоде отражены в табл. 1. Как видно из таблицы, выра-

Таблица 1. Влияние общей глубокой гипотермии на содержание в коже неполовозрелых крыс воды, динамику тканевых базофилов, содержание в них серотонина, плотность гемокапилляров дермы и активность щелочной фосфомоноэстеразы

Показатель	Срок наблюдения (гипотермия и постгипотермический период)														
	Контроль (16 сут)	18 °С	37 °С	6 ч	24 ч	Контроль (19 сут)	3 сут	Контроль (23 сут)	7 сут	Контроль (31 сут)	15 сут	Контроль (46 сут)	30 сут	Контроль (76 сут)	60 сут
Общая вода, %	70,6	73,6	68,3	63,0	66,0	63,2	64,6	69,2	67,3	69,6	69,2	59,3	60,6	68,3	67,0
Тканевые базофилы, ед. в поле зрения	9,6	5,2**	8,1	9,3	5,0**	14,8	9,1*	11,6	13,9*	10,0	13,2*	4,5	7,4**	3,7	3,5
Серотонин тканевых базофилов, усл. ед.	2,2	2,0	1,0*	0	0	11,8	8,8*	7,8	11,0	13,4	14,0	17,0	18,2	15,2	16,5
Гемокапилляры, ед. в поле зрения	2,1	2,6*	2,6*	2,2	2,0	2,2	2,0	2,2	2,4	2,0	2,0	1,9	2,0	2,3	2,1
Щелочная фосфомоноэстераза гемокапилляров, усл. ед.	3,3	3,4	2,4	2,9*	2,8	2,3	2,4	2,8	3,0	2,7	2,8	1,8	2,3*	2,3	2,2

Примечание: Здесь и далее достоверность показана по отношению к контролю * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

женное снижение численности популяции тканевых базофилов наблюдалось на глубине охлаждения, а также через 24 ч и 3 сут после него. В последующем, до 30 сут постгипотермического периода, этот показатель превышал контрольные значения. Содержание серотонина в тканевых базофилах было снижено в течение 3 сут после согревания, причем в первые сутки постгипотермического периода серотонин вообще не выявлялся. Показатель содержания в коже общей воды не претерпевал существенных изменений на протяжении всего периода наблюдения. Плотность гемакпиллярного русла сосочкового слоя дермы увеличивалась на глубине охлаждения и сразу после согревания, а в последующем от контроля не отличалась. Не выявлено также существенных изменений со стороны активности щелочной фосфомоноэстеразы гемакпилляров дермы.

Таблица 2. Влияние общей глубокой гипотермии на содержание в коже половозрелых крыс воды, динамику тканевых базофилов, содержание в них серотонина, плотность гемакпилляров дермы и активность щелочной фосфомоноэстеразы

Показатель	Срок наблюдения (гипотермия и постгипотермический период)									
	Конт-роль	18°C	37°C	6 ч	24 ч	3 сут	7 сут	15 сут	30 сут	60 сут
Общая вода, %	54,0	59,2*	62,1*	58,8	60,4*	57,6*	56,0	59,2*	60,0*	63,6*
Тканевые базофи- лы, ед. в поле зре- ния	3,7	2,6**	1,9*	1,2**	1,1**	1,1*	2,3*	1,5*	3,2	3,0
Серотонин ткане- вых базофилов, усл. ед.	15,3	3,0**	2,8**	2,0**	3,6**	3,8*	5,6*	4,7*	14,2	14,8
Гемакпилляры, ед. в поле зрения	1,9	2,5*	2,3*	2,2	1,5*	2,0	1,6	1,6	1,9	1,8
Щелочная фосфо- моноэстераза гемо- капилляров, усл. ед.	2,8	2,1*	1,8*	1,8*	2,4	1,9*	2,2*	2,4	2,8	2,6

Примечание. Здесь * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

В коже половозрелых крыс (табл. 2) общая глубокая гипотермия вызывала более выраженные изменения. Так, популяция тканевых базофилов уменьшалась на глубине охлаждения за счет разрушения части клеток. Эти изменения нарастали в течение 3 сут после гипотермии, а последующее восстановление популяции шло медленно. Содержание серотонина в тканевых базофилах снижалось при гипотермии и в первые часы после нее, а восстанавливалось лишь на 30 сут. Показатель содержания в коже общей воды достоверно превышал контрольные величины на протяжении всего периода наблюдения, но через 6 ч и 7 сут после гипотермии от них не отличался. Более продолжительными (в течение 1 сут) были изменения плотности гемакпилляров сосочкового слоя дермы. Активность щелочной фосфомоноэстеразы гемакпилляров была достоверно снижена на глубине охлаждения и в течение 6 ч после него, а также на 3—7 сут постгипотермического периода.

У старых крыс (табл. 3) на глубине охлаждения численность тканевых базофилов снижалась, но недостоверно, а после согревания и в течение 7 сут постгипотермического периода была достоверно выше контрольного значения. Содержание серотонина в тканевых базофилах после снижения на глубине охлаждения нормализовалось к 7 сут постгипотермического периода. Плотность капиллярного русла дермы увеличивалась на глубине охлаждения и оставалась на этом уровне в течение 1 сут. Содержание в коже общей воды на глубине охлаждения существенно повышалось, а после него быстро нормализовалось, хотя на 3 сут отмечалось некоторое снижение показателя. Активность щелочной фосфомоноэстеразы возрастала

Таблица 3. Влияние общей глубокой гипотермии на содержание в коже старых крыс воды, динамику тканевых базофилов, содержание в них серотонина, плотность гемакпиллярного русла дермы и активность щелочной фосфомоноэстеразы

Показатель	Срок наблюдения (гипотермия и постгипотермический период)						
	Конт-роль	18°C	6 ч	24 ч	3 сут	7 сут	30 сут
Общая вода, %	59,2	70,0*	57,3	60,0	54,0*	58,0	59,2
Тканевые базофилы, ед. в поле зрения	1,8	1,3	3,0*	2,9*	4,2*	3,8*	2,1
Серотонин тканевых базофилов, усл. ед.	14,0	8,0*	7,1*	6,8*	6,8*	11,9	11,7
Гемакпилляры, ед. в поле зрения	1,4	1,7*	1,7*	1,6*	1,6	1,4	1,3
Щелочная фосфомоноэстераза гемакпилляров, усл. ед.	2,3	3,5*	2,7	2,5	2,5	2,3	2,4

Примечание. Здесь $*P < 0,05$.

на глубине охлаждения, в последующем ее изменения были недостоверными.

Таким образом, нами показано, что при общей глубокой гипотермии в коже имеется определенная взаимосвязь между изменениями в популяции тканевых базофилов, с одной стороны, и динамикой плотности гемакпиллярного русла дермы, активности в нем щелочной фосфомоноэстеразы и содержанием в коже общей воды, с другой. Можно утверждать, что скорость восстановления нарушений гемакпиллярного русла, активности в нем щелочной фосфомоноэстеразы и содержания в коже воды зависит от скорости восстановления популяции тканевых базофилов дермы. Выявлены возрастные различия в реакции кожи на общее глубокое охлаждение организма. Так, в коже неполовозрелых крыс она выражена слабо. Несмотря на существенное снижение у этих животных численности тканевых базофилов сосочкового слоя дермы на глубине охлаждения, в последующем популяция этих клеток быстро восстанавливалась, очевидно, вследствие перераспределения их в слоях дермы [5]. В более поздние сроки постгипотермического периода число тканевых базофилов в сосочковом слое дермы увеличивалось за счет появления молодых клеток. Известно [9], что дегрануляция тканевых базофилов приводит к микроциркуляторным нарушениям и отеку тканей. С другой стороны, нормальное функционирование их должно поддерживать физиологический уровень микроциркуляции. Щелочная фосфомоноэстераза гемакпилляров, играющая важную роль в процессах трансмембранного транспорта, у неполовозрелых крыс также не претерпевала изменений. Всем сказанным объясняется отсутствие существенных изменений со стороны гемакпиллярного русла дермы и содержания в коже воды у неполовозрелых животных. У половозрелых крыс общая глубокая гипотермия вызывала более выраженные изменения. Существенно снижались количество тканевых базофилов и активность щелочной фосфомоноэстеразы. Эти изменения сопровождались нарушениями водного обмена и протекали на фоне увеличения плотности гемакпиллярного русла, а обратное развитие их происходило значительно медленнее. У старых крыс изменения в коже при гипотермии носили иной характер. Прежде всего обращает на себя внимание нерезко выраженное снижение количества тканевых базофилов на глубине охлаждения. В постгипотермическом периоде численность их значительно возрастала. Можно предполагать, что в первые сутки это увеличение происходило в результате перераспределения клеток между слоями дермы, а в более поздние сроки постгипотермического периода — за счет появления молодых клеток, которые обнаруживались в это время. Интересно также отметить, что активность щелочной фосфомоноэстеразы у старых животных на глубине охлаждения не

снижалась, а повышалась, не отличаясь в дальнейшем от контроля. Этими двумя процессами, а именно хорошо выраженными компенсаторными возможностями популяции тканевых базофилов и отсутствием нарушений активности щелочной фосфомоноэстеразы мы объясняем тот факт, что после значительного изменения содержание воды в коже довольно быстро возвращалось к норме.

1. Борисов В. А., Базеко Б. С. Возможность оживления животных после достижения критической температуры // Материалы 27 науч. сессии и 27 студ. конф. Витебск. мед. ин-та.—Витебск: Б. и.— 1969.— С. 287—289.
2. Берстон М. Гистохимия ферментов.— М.: Мир, 1965.— 464 с.
3. Гавришова Н. А., Леонтьев А. С. Метод количественной цитофлуориметрической оценки содержания серотонина в тучных клетках / Арх. патологии.— 1983.— 45, № 8.— С. 95.
4. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях.— М.: Медицина, 1973.— 128 с.
5. Колодезникова Е. Д. Реакция тучных клеток на длительное охлаждение // Медико-биологические аспекты адаптации.— Новосибирск: Наука, 1975.— С. 160—162.
6. Луппа Х. Основы гистохимии.— М.: Мир, 1980.— 343 с.
7. Сахарова А. В., Сахаров Д. А. Модификация метода Фалька для выявления биогенных аминов // Цитология.— 1968.— 10, № 11.— С. 1460—1463.
8. Сумбатов Л. А. Искусственная гипотермия.— М.: Медицина, 1985.— 84 с.
9. Юрина Н. А., Радостина А. И. Тучные клетки и их роль в организме.— М.: Изд-во Ун-та Дружбы Народов, 1977.— 76 с.
10. Трашлева М. С., Леонтьев В. Г. Исследования концентрации ионов натрия и калия в коже здоровых людей // Вестн. дерматологии.— 1974.— № 8.— С. 29—33.

Витебский мед. ин-т

Поступила 25.10.85

УДК 53.082.4 : 53.088.23

А. И. Войтенко

ОЦЕНКА ПОГРЕШНОСТИ ИЗМЕРЕНИЯ РАЗМЕРОВ ЗОНЫ ЗАМОРАЖИВАНИЯ В КРИОХИРУРГИИ МЕТОДОМ УЛЬТРАЗВУКОВОЙ ЛОКАЦИИ

При криохирургических операциях необходимо знать размеры замороженной зоны вокруг наконечника криоинструмента. Визуально такой контроль неосуществим из-за непрозрачности биологической ткани. Определение размеров промораживания по показаниям термодатчиков также имеет недостатки, например необходимость введения их на требуемую глубину до начала операции, неточность установки и т. п. В этой ситуации представлялось достаточно простым измерение размеров исследуемой зоны при помощи ультразвуковой локализации фронта замораживания [2]. При этом фактически проводилось лоцирование глубины незамороженной области, а требуемый параметр определялся вычитанием измеренного расстояния из базисного. Как известно, скорость ультразвука в среде зависит от температуры. Сравнительно небольшой (до 44 °С) перепад температур привел к тому, что достаточная точность измерения достигалась, если скорость ультразвука v_0 считалась постоянной, в частности погрешность была минимальной, если значение реперной скорости v_0 выбиралось для 0 °С. Однако в криохирургии целесообразнее конструктивно совмещать излучатель-приемник ультразвука с криоинструментом. При этом локализация фронта производится со стороны зоны замораживания. Здесь интервал температур может быть весьма широким, от нуля до ~ -160 °С, так как хладагентом служит жидкий азот с температурой -196 °С.

Целью данной работы является оценка погрешности измерения размеров зоны замораживания, получаемой при пренебрежении зависимостью скорости распространения ультразвука в среде от температуры.

Рассмотрим стационарное температурное поле, установившееся в однородной изотропной полуорганической модельной среде вокруг криохирур-

гического аппликатора с радиусом R_p и температурой T_p . В имеющейся литературе нет данных о требуемых параметрах ткани в необходимом интервале температур. Поскольку вода составляет большую часть ткани, а работа носит оценочный характер, будем считать, что параметры модельной среды совпадают с параметрами льда. Так как теплообменом свободной поверхности среды с окружающим пространством можно пренебречь [4], то введение системы координат сплюснутого эллипсоида вращения вокруг оси OZ [3] позволяет легко получить уравнение, описывающее распределение температуры T вдоль оси OZ в пределах зоны замораживания ($0 \leq z \leq L$):

$$\frac{d}{dz} \left[\lambda (1 + z^2) \frac{dT}{dz} \right] = 0. \quad (1)$$

Мощность внутренних источников тепла здесь полагается равной нулю. Коэффициент теплопроводности среды λ в интервале температур от 0 до -165°C равен (λ , Вт/м·К; T , $^\circ\text{C}$) [1]:

$$\lambda(T) = 2,1725 - 3,403 \cdot 10^{-3}T + 9,085 \cdot 10^{-5}T^2. \quad (2)$$

Краевыми условиями уравнения (1) являются: на фронте зоны замораживания $T(z=L) = 0^\circ\text{C}$, а на поверхности аппликатора $T(z=0) = T_p$.

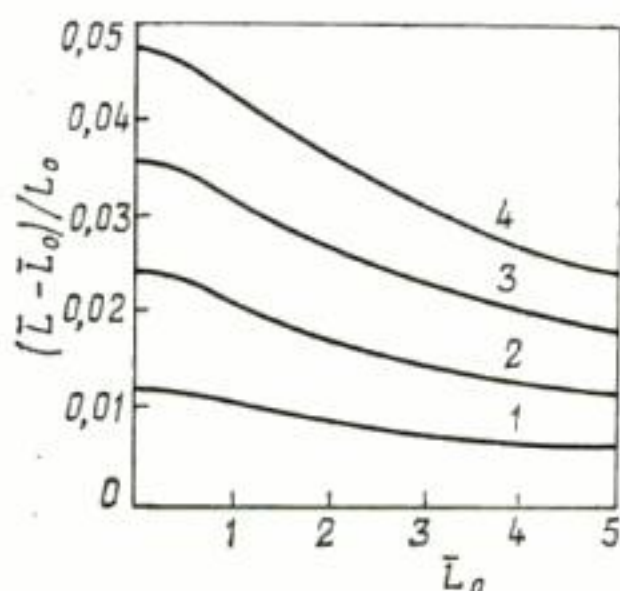
Ультразвуковая локация фронта $z=L$ производится от центра рабочей поверхности аппликатора вдоль оси OZ . Время запаздывания отраженного от фронта зоны эхо-сигнала по сравнению с зондирующим составляет на излучателе

$$2t = 2 \int_0^L \frac{dz}{v}, \quad (3)$$

где скорость ультразвука в среде v должна определяться с учетом температурного распределения (1). Если задаться некой постоянной реперной

скоростью v_0 , то вычисленная глубина зоны будет равна $L_0 = v_0 t$ и отличаться от реального значения L . Выражение для относительной погрешности измерения получается тривиально и в безразмерных величинах $\bar{L} = L/R_p$, $\bar{L}_0 = L_0/R_p$, $\bar{z} = z/R_p$ и $\bar{v} = v[T(z)]/v_0$ имеет вид:

$$\varepsilon_{v_0} \equiv \frac{\bar{L} - \bar{L}_0}{\bar{L}_0} = \bar{L} \left/ \int_0^{\bar{L}} \frac{d\bar{z}}{\bar{v}} \right. - 1. \quad (4)$$



Относительная погрешность измерения глубины заморозки при различных температурах криоаппликатора: -40°C (1), -80°C (2), -120°C (3) и -160°C (4)

В литературе нет данных по температурной зависимости $v(T)$ скорости ультразвука в мелкокристаллическом льду в нужном интервале температур. Поэтому в качестве $v(T)$ была взята зависимость для монокристаллического льда в интервале $-30 \div -210^\circ\text{C}$ [5] и проведена ее линейная [1] экстраполяция в интервале от 0 до -30°C . Такой выбор не будет, по-видимому, давать большие расхождения при вычислении относительной погрешности измерения (4). Для v_0 было взято экстраполированное значение $v(T)$ при $T = 0^\circ\text{C}$ ($v_0 \approx 3,86 \cdot 10^3$ м/с).

На рисунке показаны зависимости ε_{v_0} от $\bar{L}_0$, «измеренной» в предположении $v_0 = \text{const} = v(T = 0^\circ\text{C})$ при различных значениях T_p . При малых $\bar{L}_0$ температурное поле в замороженной зоне стремится к получаемому между параллельными плоскостями. Легко показать, что при такой геометрии задачи относительная погрешность измерения (4), связанная с пренебрежением зависимостью $v(T)$, не зависит от расстояния между плоскостями. Этим и объясняется изгиб приведенных на рисунке зависимостей при малых $\bar{L}_0$.

Зная L_0 при соответствующей T_p , легко получить правильное значение $L = L_0(1 + \varepsilon_{v_0})$. Вычисленная согласно (4) средняя абсолютная погрешность измерения глубины зоны замораживания при типичных параметрах криовоздействия и самих криоинструментов составляет порядка 1 мм. Такое значение, по-видимому, может быть зафиксировано в эксперименте. Погрешность ε_{v_0} может быть уменьшена, по сравнению с приведенными на рисунке результатами, выбором другого реперного значения v_0 . При этом пересчет погрешности осуществляется по формуле:

$$\varepsilon_{v_0'} = \frac{v_0}{v_0'} (1 + \varepsilon_{v_0}) - 1, \quad (5)$$

где v_0' — новое реперное значение скорости ультразвука в среде. Для каждой пары параметров $(\bar{L}_0, T_p)$ может быть выбрано такое значение v_0' , при котором $\varepsilon_{v_0'} = 0$. Однако в процессе криохирургического воздействия эти параметры будут изменяться и, следовательно, равенство $\varepsilon_{v_0'}$ нулю нарушаться (этого не произойдет при плоской геометрии задачи). С другой стороны, для любого набора пар $(\bar{L}_0, T_p)$ легко определить v_0' , дающую минимальную погрешность, и решить, достаточно ли мала эта погрешность, чтобы не принимать во внимание температурную зависимость скорости ультразвука в среде и считать ее равной v_0' . Для ответа на этот вопрос необходимо знать реальные зависимости $\lambda(T)$ и $v(T)$. Оценки, проведенные для модельных зависимостей, которые использовались в данной работе, показали, что абсолютная погрешность измерения L , обусловленная предположением $v_0' = \text{const}$, при изменении T_p в диапазоне температур от 0 до -160°C и $\bar{L}_0$ в диапазоне от 0 до 5 мм все же имеет величину порядка 1 мм при любом выборе v_0' . При сложении с погрешностями другой природы может получиться довольно большое суммарное значение, не пригодное для контроля криовоздействий. Во всяком случае, ε_{v_0} является систематической погрешностью, которую легко учесть.

1. Богородский В. В., Гаврило В. П. Лед. Физические свойства. Современные методы гляциологии. — Л.: Гидрометеиздат, 1980. — 384 с.
2. Бэйли Дж., Дьюла А. Исследование скорости затвердевания с помощью акустического метода // Приборы для науч. исслед. — 1967. — № 4. — С. 71—74.
3. Корн Г., Корн Т. Справочник по математике. — М.: Наука, 1978. — 832 с.
4. Эпштейн В. Г., Вишневский В. И., Сандомирский Б. П. О воспроизведении температурного поля, создаваемого криохирургическим аппликатором // Мед. техника. — 1978. — № 1. — С. 14—16.
5. Proctor T. M. Low temperature speed of sound in single-crystal ice // J. Acoust. Soc. Amer. — 1966. — 39, N 5. — P. 972—977.

Ин-т физики АН УССР,
г. Киев

Поступила 10.12.85

УДК 57.043 : 612.111 : 548 : 537.533.35

Н. В. Репин

ИЗУЧЕНИЕ ВНЕ- И ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ КРИСТАЛЛИЗАЦИИ В ЭРИТРОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ ОХЛАЖДЕНИЯ

Образование внутриклеточного льда в биологических объектах рассматривается как основной повреждающий фактор при быстром замораживании [9]. Повреждение носит прежде всего механический характер и проявляется в виде нарушения целостности плазматических мембран образующимися кристаллами льда [6]. Возникающие в местах прямого контакта поверхности клеток с кристаллами льда мембранные дефекты могут служить местами выхода внутриклеточного содержимого при отогреве. В оценке повреждающей роли внеклеточного льда не существует единой точки

зрения. Долгое время этот вопрос практически не обсуждался в литературе, так как считалось доказанным, что внеклеточные кристаллы в присутствии криопротектора не действуют непосредственно на клетки [1]. В то же время имеются сообщения, указывающие, что характер нарушения их структуры при быстром замораживании невозможно объяснить только образованием внутриклеточных кристаллов [9]. Представляет несомненный интерес мнение о необходимости пересмотра роли вне- и внутриклеточной кристаллизации в повреждении биологических объектов [8]. Существует точка зрения [5] о том, что решающее значение в этом процессе имеет не размер внутриклеточных кристаллов, а общее количество льда в клетке.

В связи с этим целью данной работы явилось изучение роли вне- и внутриклеточной кристаллизации в повреждении клеток при различных условиях охлаждения.

В качестве объекта исследования были взяты эритроциты, полученные из донорской крови, хранившейся 1—3 дня, троекратно отмытой в Na-фосфатном буфере (рН 7,2) центрифугированием при 3000 об/мин в течение 5 мин. Центрифугат объемом 0,5 мл смешивали в соотношении 1 : 1 с буфером. В полученный 1 мл суспензии эритроцитов в фосфатном буфере добавляли медленно по каплям равный объем криопротектора концентрацией вдвое больше требуемой. Суммарное разбавление эритроцитовой массы составляло 1 : 4. Таким образом получали клетки, эквивилиброванные в 10, 20 и 30 %-ном растворе глицерина. С помощью светового микроскопа проводили контроль за изменением формы клеток после отмывки от плазмы в норме и после добавления криопротектора.

Каплю суспензии эритроцитов объемом 0,025 мл помещали на специальный объектодержатель и замораживали со скоростью 200 °С/мин (используемая в практике низкотемпературного консервирования), 2000 °С/мин (соответствует интервалу оптимальных значений скоростей охлаждения эритроцитов) и 50000 °С/мин (максимально возможная при охлаждении данного объема). Измерение скоростей охлаждения осуществляли с помощью термопары, фиксированной в центре образца. Кривую скорости охлаждения записывали на самопишущем приборе КСП-4 при медленном замораживании и осциллографе С-1-69 при быстром замораживании. Реплики сколотых объектов получали по общепринятой методике на изготовленной нами установке [2]. Температура скалывания —100 °С, время травления образца 1—2 мин при —100 °С, рабочий вакуум $2 \cdot 10^{-4}$ Па, напыляющие устройства — электронно-лучевые испарители. Просмотр проводили в ЭМВ-100 БР.

Медленное замораживание (200 °С/мин) эритроцитов без криопротектора приводило к образованию больших (10—15 мкм) внеклеточных кристаллов, плотно прилегающих к поверхности клеток (рис. 1, а). Отсутствие внутриклеточных кристаллов, значительное изменение формы и частичное сморщивание поверхности клеток свидетельствуют об их обезвоженности. При скорости охлаждения 2000 °С/мин во внеклеточном пространстве образовывались кристаллы размером до 4—5 мкм, плотно окружающие клетки. Примерно у 15 % клеток наблюдалось присутствие внутриклеточных кристаллов, расположенных, как правило, в центре клетки и имеющих размеры от 0,3 до 0,8 мкм. Основная масса клеток была лишена внутриклеточных кристаллов.

Более быстрое (6000—7000 °С/мин) охлаждение эритроцитов приводило к появлению кристаллов внутриклеточного льда, размеры которых уменьшались от периферии клетки к центру, причем примембранные области были свободны от кристаллических структур. Контакта мембраны эритроцитов с кристаллами внутриклеточного льда в этих условиях мы не наблюдали (рис. 1, б). Это связано с частичным обезвоживанием клеток во время замораживания [1]. Такой характер распределения кристаллов в эритроците можно объяснить совместным влиянием температурных и концентрационных градиентов в них.

При скорости охлаждения 50000 °С/мин наблюдалось образование внутриклеточных кристаллов размером от 0,05 до 0,1 мкм, равномерно распределенных во внутриклеточном объеме. Отмечался плотный контакт кристаллов внеклеточного льда с клеточной поверхностью.

Таким образом, для всех режимов замораживания отсутствие криопротектора в клеточной суспензии приводило к захвату клеток кристал-

лами внеклеточного льда, что сопровождалось сжатием их в межкристаллическом пространстве, вызывающем при медленном охлаждении появление везикул на клеточной поверхности. Во всех случаях величина гемолиза была высокой, составляя более 90 % при скорости охлаждения 200 °С/мин

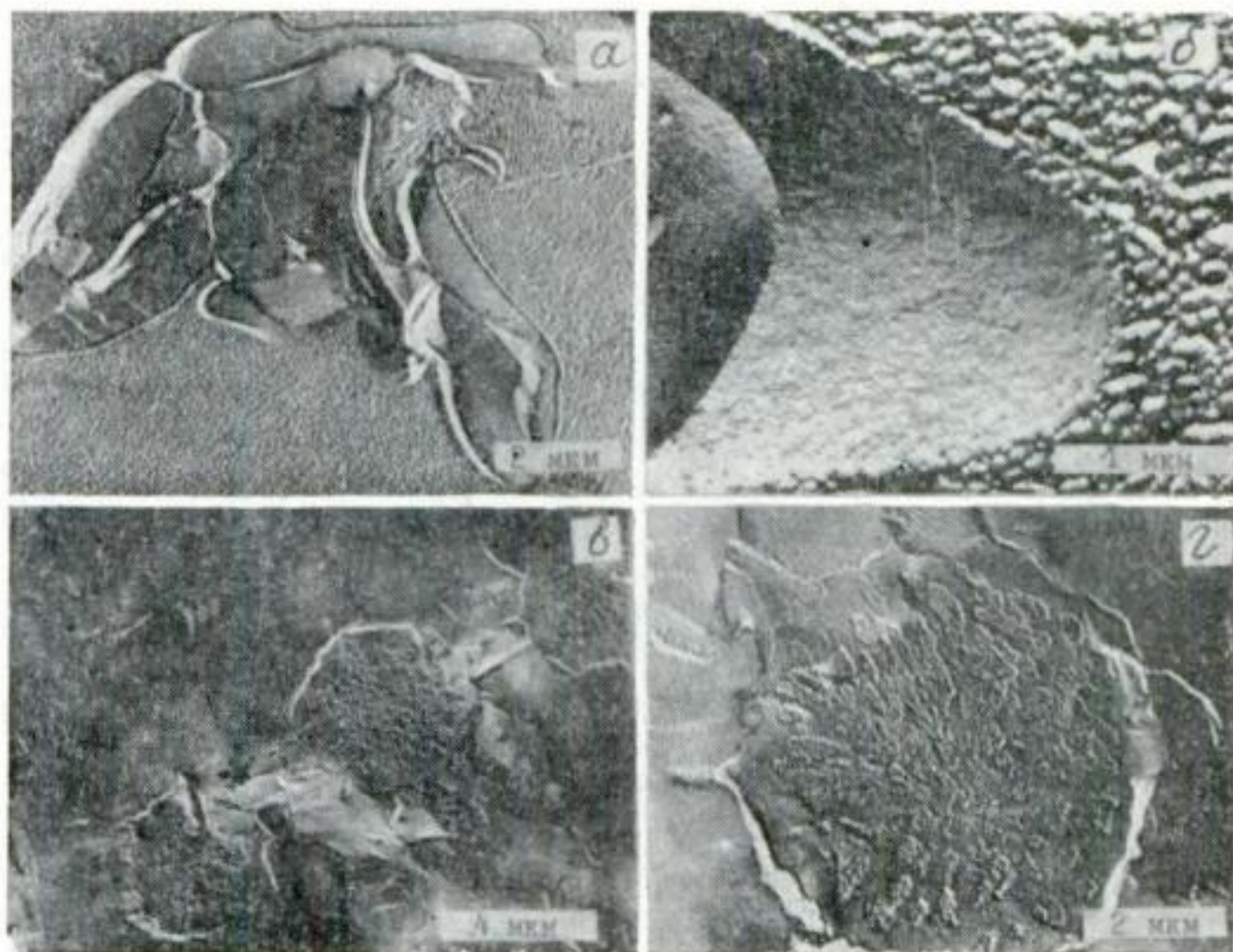


Рис. 1. Морфологическое состояние эритроцитов, охлажденных в среде без криопротектора со скоростями: а, б — 200 °С/мин, б — участок внутренней Р-поверхности мембраны эритроцитов; в, г — 6000 °С/мин, распределение внутриклеточных кристаллов

и уменьшаясь до 50—60 % при более высоких скоростях охлаждения (рис. 2). Столь высокий гемолиз коррелирует с наблюдаемыми морфологическими изменениями клеток: захватом и сжатием их кристаллами внеклеточного льда, вызывающим деформацию поверхности и образование в отдельных случаях везикул (рис. 1, а), а также обезвоживанием клеток при медленном и появлении внутриклеточных кристаллов льда при быстром режиме замораживания (рис. 1, г). Добавление глицерина к клеточной суспензии приводило к выраженному разделению фаз на чередующиеся кристаллические области льда и эвтектики.

Проведенные исследования показали, что медленное замораживание эритроцитов в присутствии 10, 20 и 30 %-ной концентрации глицерина не вызывает образования в них внутриклеточных кристаллов, что согласуется с данными литературы [9]. Внеклеточная среда при всех концентрациях криопротектора представлена кристаллическими структурами, разделенными сетью каналов, вдоль которых располагались эритроциты (рис. 3, а, б). Различия заключались лишь в размерах кристаллических структур и ширине каналов, которая была меньше размеров клеток для 10 %, сравнима для 20 % и больше для 30 % глицерина. Величина гемолиза эритроцитов после отогрева от -196°C составляла соответственно $(22,3 \pm 3,4)$, $(13,6 \pm 2,9)$ и $(11,5 \pm 2,5)$ % для 10, 20 и 30 %-ной концентрации (рис. 2).

Увеличение скорости охлаждения до 2000 °С/мин приводило к каче-

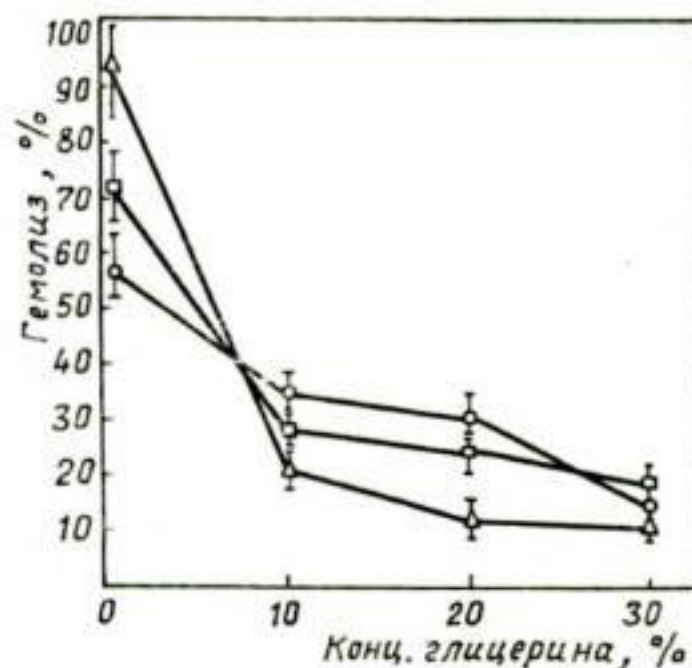


Рис. 2. Зависимость величины гемолиза эритроцитов, замороженных с различными скоростями, от концентрации глицерина: $\triangle$ — 200 °С/мин; $\square$ — 2000 °С/мин; $\circ$ — 50000 °С/мин

ственному изменению морфологической картины клеток и внеклеточной среды. Эритроциты, замороженные с этой скоростью в присутствии 10—30 %-ного глицерина, не содержали кристаллов внутриклеточного льда (рис. 3). Во внеклеточной

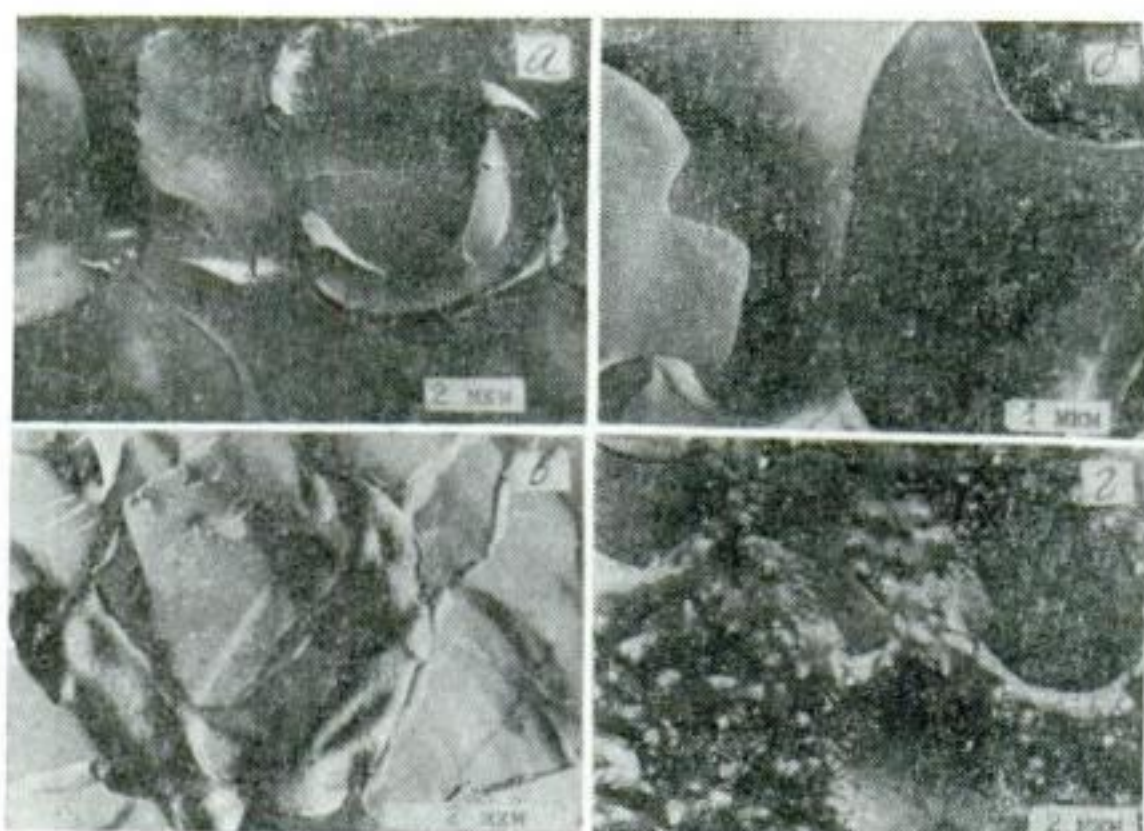


Рис. 3. Морфологическое состояние эритроцитов, охлажденных с разной скоростью в присутствии глицерина разной концентрации: а — 200 °C/мин, 20 %; б — 200 °C/мин, 10 %; в — 50000 °C/мин, 10 %; г — 50000 °C/мин, 20 %

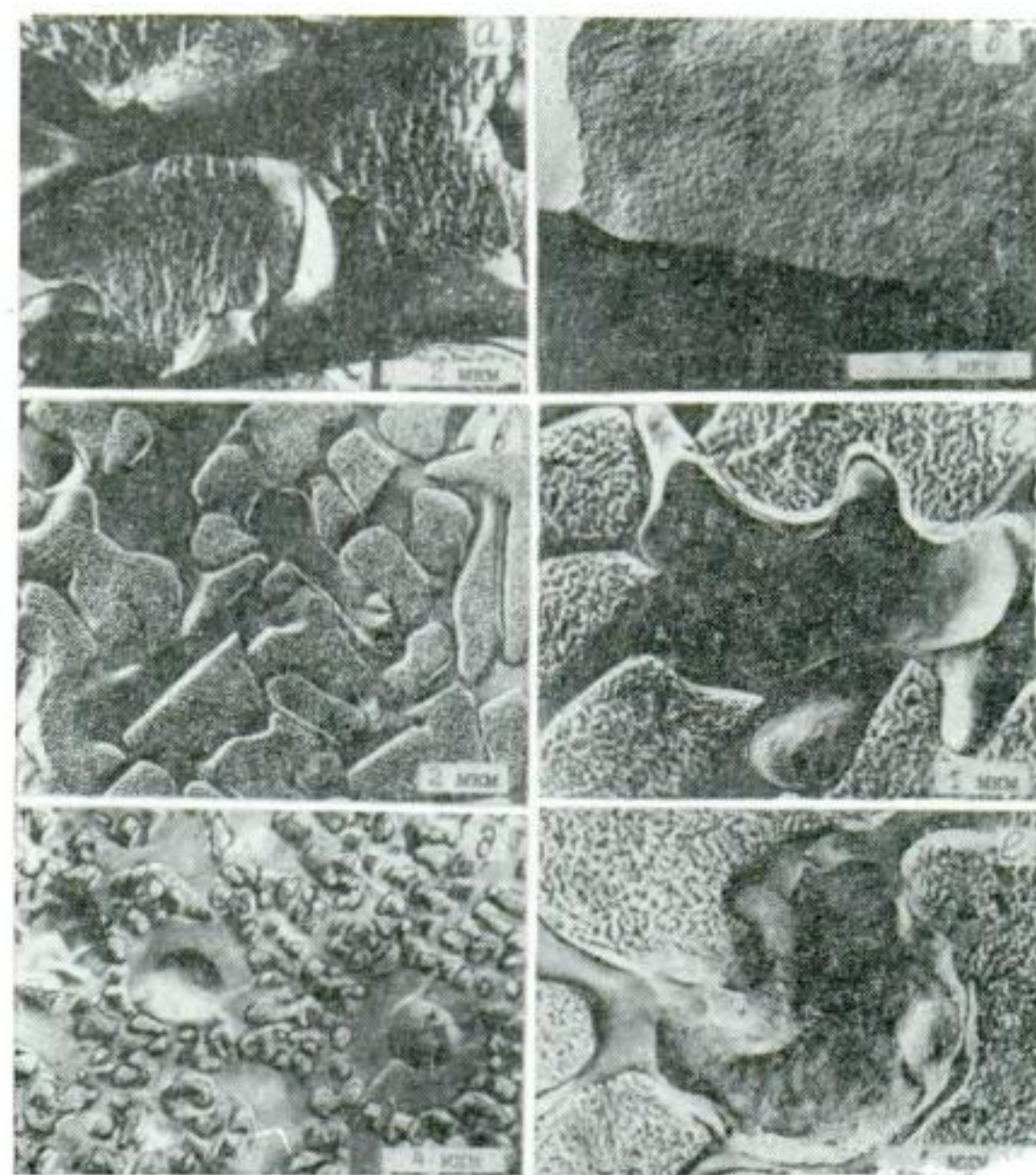


Рис. 4. Характер кристаллизации суспензии эритроцитов, замороженных со скоростью 2000 °C/мин в присутствии глицерина разной концентрации: а — 10 %, б — 20 %, участок Р-поверхности мембраны; в, г — 20 %; д — 30 %; е — 20 %, ультраструктура мембраны эритроцита (Р-поверхность) в местах контакта с кристаллами внеклеточного льда

глицерина наблюдалось образование внутриклеточных кристаллов, равномерно распределенных по всему объему клетки. Размеры их варьировали в пределах 0,01—0,07 мкм (рис. 3, г). Клетки сохраняли свою естествен-

(рис. 4). Во внеклеточной среде наблюдалось формирование каналов эвтектики, однако ширина их была в десятки раз меньше размеров клеток (рис. 4, в, г, д). Особенностью внеклеточного кристаллообразования при быстром замораживании явилось также формирование кристаллов льда с изрезанными контурами. В результате клетки значительно сдавливались в узких каналах, что неизбежно приводило к деформации клеточной поверхности кристаллами внеклеточного льда. На поверхности эритроцитов наблюдалось появление вмятин, размеры которых соответствовали размерам «ветвей» прилегающих внеклеточных кристаллов (рис. 4, г, д).

Некоторое отличие в структуре внеклеточного льда было отмечено при замораживании эритроцитов с большими скоростями в присутствии 30 %-ного глицерина. Во внеклеточном пространстве с большей вероятностью образовывались кристаллы льда в виде микросферулитов размерами от долей микрона до 1—2 мкм, хаотически распределенных в аморфном матриксе, которые также деформировали поверхность эритроцитов. Величина гемолиза при скорости охлаждения 2000 °C/мин составляла $(28,2 \pm 3,9)$, $(25,6 \pm 3,7)$ и $(18,8 \pm 3,2)$ % для 10, 20 и 30 %-ной концентрации глицерина.

При охлаждении эритроцитов со скоростью 50000 °C/мин для всех указанных выше концентраций

ную форму. Мы наблюдали множественный контакт кристаллов внеклеточного льда с поверхностью клеток, что приводило к появлению на ней вмятин, размеры которых также соответствовали размерам выступов прилегающих кристаллов (рис. 3, в, г). Значение гемолиза для данной скорости охлаждения составляло $(35,5 \pm 5,6)$, $(31,8 \pm 4,2)$ и $(15,8 \pm 3,9)$ % соответственно для 10, 20 и 30 % глицерина. Необходимо отметить, что увеличение концентрации глицерина до 30 % вызывало уменьшение размеров кристаллов, образующихся в клетках, в 2—3 раза, однако значительного снижения гемолиза быстро замороженных эритроцитов при этих условиях не наблюдалось, т. е. отсутствовала корреляция между размерами внутриклеточных кристаллов и степенью повреждения эритроцитов, что также отмечалось ранее [9].

Одной из характеристик мембран, выявленных методом замораживания-скалывания, является распределение белковых компонентов на внутренней поверхности мембраны — внутримембранных частиц (ВМЧ), которые в неповрежденных эритроцитах распределены равномерно [4]. Известно, что для эритроцитов, не обработанных криопротектором, охлаждение со скоростью менее $1800^\circ\text{C}/\text{мин}$ приводит к появлению на внутренней поверхности мембраны свободных от ВМЧ участков [7]. В наших экспериментах для всех режимов охлаждения ВМЧ были распределены равномерно (рис. 4, б), кроме эритроцитов, замороженных в физрастворе со скоростью $200^\circ\text{C}/\text{мин}$, у которых наблюдалась агрегация ВМЧ (рис. 1, б). Таким образом, эквilibрация эритроцитов в глицериновом растворе вплоть до 30 %-ной концентрации не вызывала ультраструктурных изменений в их мембране: мембранные белки были распределены хаотически (рис. 4, б), что является их нормальным физиологическим состоянием [4].

Несмотря на большое число исследований, направленных на выяснение роли кристаллов внутриклеточного льда в повреждении клетки и потере ею жизнеспособности, несколько в стороне остался вопрос о повреждающей роли внеклеточных кристаллов на этапе замораживания — отогрева. Считалось доказанным, что в присутствии криопротекторов кристаллы внеклеточного льда не могут действовать на клетки [1, 6]. По данным криомикроскопии присутствие криопротекторов и медленное охлаждение позволяют сформироваться кристаллам льда, как правило, дендритного типа [3]. Клетки оттесняются гранями растущего кристалла в образующиеся каналы эвтектики. Также установлено, что до некоторых скоростей охлаждения наблюдается примерное равенство ширины канала и размеров клетки, и наличие в замораживаемой среде, к примеру, 5 %-ного глицерина достаточно, чтобы это соответствие выполнялось [3].

Проведенное нами электронно-микроскопическое изучение кристаллизации в суспензии эритроцитов при различных скоростях охлаждения показало, что формирование внеклеточного льда существенно различается при медленных и быстрых режимах замораживания. Общей особенностью медленных режимов замораживания (меньше $200^\circ\text{C}/\text{мин}$) клеточных суспензий в присутствии глицерина до 30 %-ной концентрации явилось образование кристаллических структур дендритного типа с контурами в виде гладкой кривой. Увеличение концентрации глицерина от 10 до 30 % не вызывало качественного изменения в характере кристаллизации внеклеточной среды, а сказывалось лишь на размерах кристаллических структур и ширине каналов эвтектики, которая составляла в среднем $0,8\text{—}2,0$ мкм, т. е. наблюдалось примерное соответствие размеров клеток и ширины каналов. Морфологических нарушений клеток мы при этом не отмечали. Клетки располагались вдоль каналов эвтектики. В случае больших скоростей охлаждения ($2000^\circ\text{C}/\text{мин}$ и больше) наблюдалось качественное изменение морфологии внеклеточного льда, заключающееся в формировании мелкокристаллических структур дендритного типа с многочисленными ветвями и изрезанными контурами, что сказывалось и на характере взаимодействия кристаллов внеклеточного льда с клетками. Мелкокристаллический харак-

тер кристаллизации, а также утончение каналов эвтектики до 0,1—1,0 мкм приводили к уменьшению соотношения ширины канала и размера клетки в десятки раз. Это неизбежно приводило к сжатию клеток внеклеточными кристаллами и деформации их поверхности (рис. 4, д). Наблюдался множественный плотный контакт между клеточной поверхностью и гранями кристаллов, приводящий в отдельных случаях к выдавливанию части клеточного объема в прилегающие микроканалы (рис. 4, з).

Известно, что мембрана клетки является первым структурным элементом, подвергающимся действию внеклеточной кристаллизации. Было показано, что в местах ее контакта с кристаллами льда происходит деформация липидного бислоя [6, 9]. Представленные на рис. 4 электронограммы иллюстрируют различия в ультраструктурной организации мембраны эритроцитов, не подвергшихся действию кристаллов (рис. 4, б), и в местах ее контакта с внеклеточным льдом (рис. 4, е).

Таким образом, при быстром замораживании клеточных суспензий в присутствии криопротектора глицерина наблюдается неоднородное деформирующее сжатие поверхности клеток кристаллами внеклеточного льда, являющееся, по нашему мнению, повреждающим фактором, что необходимо учитывать при разработке быстрых режимов замораживания.

1. Иткин Ю. А., Гордиенко Е. А., Бронштейн В. Л. Физико-математический анализ механизмов криоповреждения и криозащиты клеток // Актуальные проблемы криобиологии. — Киев : Наук. думка, 1981. — С. 300—329.
2. Репин Н. В., Скорняков Б. А. Методические особенности и техническое обеспечение электронно-микроскопического метода замораживания-скалывания // Криобиология и криомедицина. — 1982. — Вып. 10. — С. 89—92.
3. Розанов Л. Ф. Криомикроскопическое изучение процессов замораживания и отогрева клеточных суспензий : Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Киев, 1977. — 23 с.
4. Фарант Д. Пересмотр некоторых криобиологических концепций // Криобиология и криомедицина. — 1977. — Вып. 3. — С. 12—20.
5. Черницкий Е. А., Воробей А. В. Структура и функции эритроцитарных мембран. — Минск : Наука и техника, 1981. — 216 с.
6. Fujikawa S. Freeze-fracture and etching studies on membrane damage in human erythrocytes caused by formation of intracellular ice // Cryobiology. — 1980. — 17, N 4. — P. 351—362.
7. Fujikawa S. The effect of various cooling rates on the membrane ultrastructure of frozen human erythrocytes and its relation to the extent of haemolysis after thawing // J. Cell Sci. — 1981. — 49, N 4. — P. 369—382.
8. Mazur P., Rall W. F., Rigopoulos N. Relative contributions of the fraction of unfrozen water and of salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes // Biophys. J. — 1981. — 36, N 3. — P. 653—675.
9. Nei T. Freezing injury to erythrocytes. I. Freezing patterns and post-thaw hemolysis // Cryobiology. — 1976. — 13, N 3. — P. 278—286.

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

Поступила 02.08.85

УДК 57.043 : 611.36—076.4

А. С. Капрельяц, Л. Н. Марченко, И. П. Матяш

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОМ ЗАМОРА ЖИВАНИЯ—ЗАМЕЩЕНИЯ ДЕСТРУКЦИИ ТКАНИ ПЕЧЕНИ ПРИ ЛОКАЛЬНОМ ЗАМОРАЖИВАНИИ

Одним из главных вопросов, связанных с выяснением механизмов деструкции тканей при проведении криохирургических операций, является вопрос о локализации льда и характере его распределения в клетке и ткани. Исследовать этот процесс можно методом замораживания—замещения [3, 4]. Однако из-за отсутствия специальной аппаратуры для реализации этого метода возникают трудности при использовании его в практике [1].

Целью настоящей работы является изучение ультраструктуры печени при локальном замораживании (243 К) с помощью метода замораживания — замещения.

Эксперименты проводились на ткани печени белых крыс массой 200—220 г, которые наркотизировались тиопенталом натрия (4 мг на 100 г массы). После срединной лапаротомии криоаппликацию печени осуществляли криозондом (КИИ-1) с диаметром рабочей части наконечника 10 мм и температурой 243 К в течение 120 с, иссекали охлажденным инструментом кусочки находящейся под криозондом ткани размером не более 1 мм³ и быстро помещали их в среду замещения (ацетон с 3 %-ным глутаральдегидом и 0,5 %-ным уранилацетатом). Замещение длилось 8 ч при температуре 243 К, затем образцы отогревали до комнатной температуры, промывали два раза по 15 мин в 100 %-ном ацетоне и заливали в эпон-аралдит. В качестве контроля

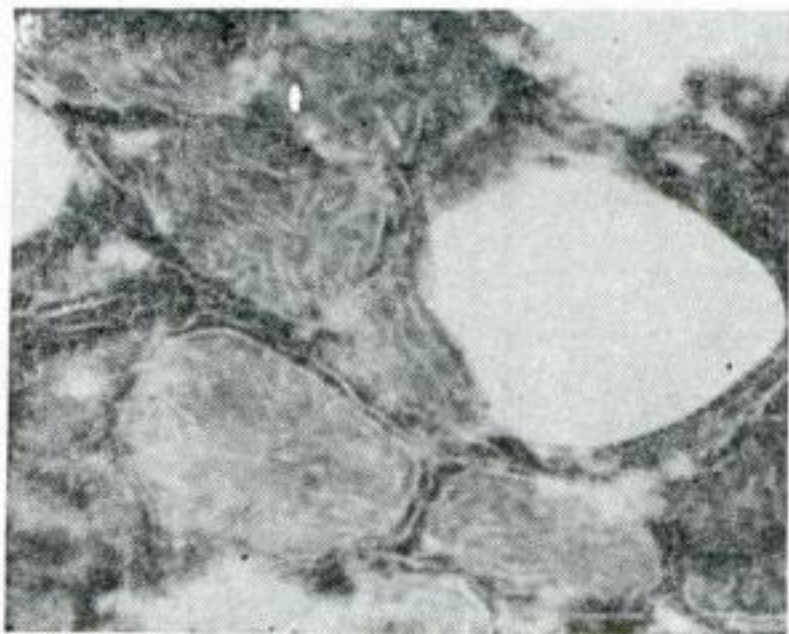


Рис. 1

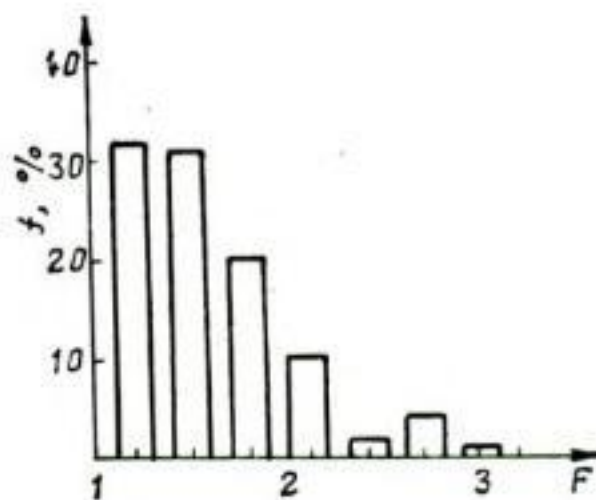


Рис. 2.

Рис. 1. Органоиды гепатоцитов (митохондрии, цистерны ЭПР, рибосомальные комплексы) в замороженной ткани печени (243 К) после замещения в замороженном состоянии. Места локализации льда определяются в виде светлых полос. $\times 30\,000$

Рис. 2. Гистограмма распределения фактора формы кристаллов (F) в ткани печени (f — частота в %, $n = 100$)

Рис. 3. Участок микроциркуляторного русла печени с эритроцитами и ядерными клетками крови $\times 9\,000$

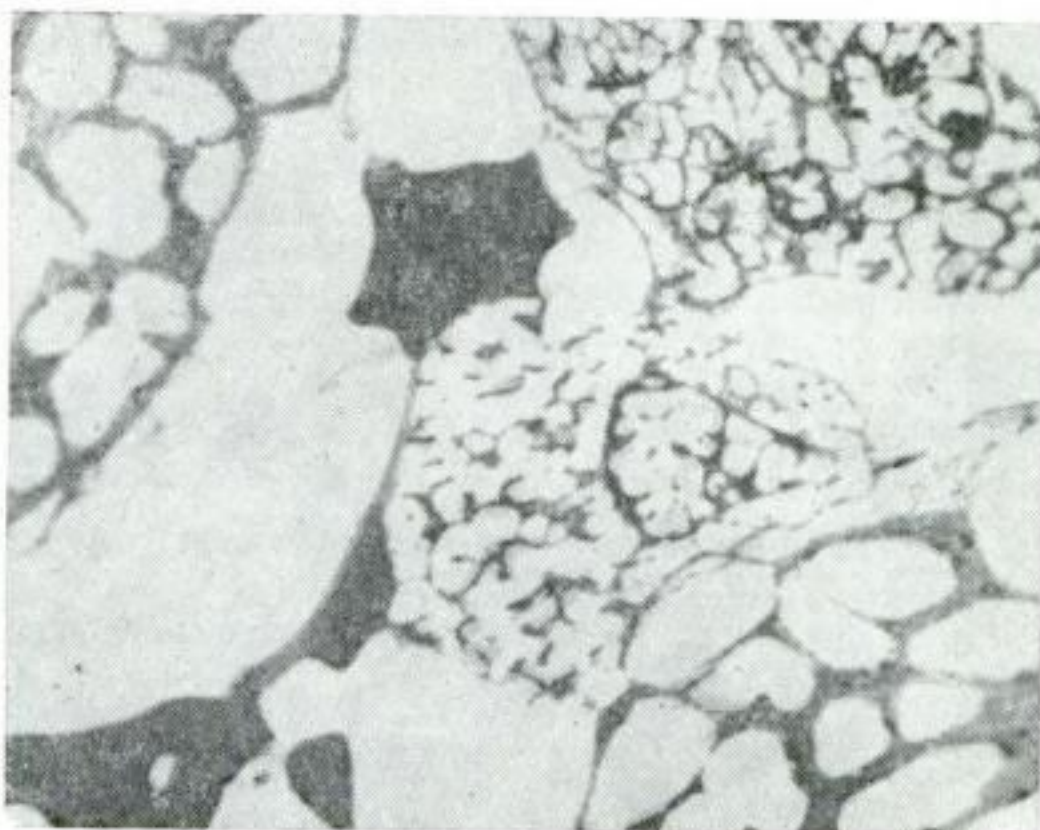


Рис. 3

использовались образцы, выдержанные в среде замещения при комнатной температуре, а также кусочки ткани после охлаждения и отогрева, препарированные традиционным методом ультратонких срезов.

Для реализации метода замораживания — замещения использовался оригинальный автоматизированный прибор (УЗЗ), который состоит из камеры замораживания — замещения, сосуда Дьюара с жидким азотом, блока управления и регистрирующего прибора. Камера замораживания — замещения представляет собой сосуд Дьюара с герметически закрывающейся крышкой, внутри которого расположена емкость для замещающей жидкости, куда помещается вращающийся сетчатый контейнер для образцов. Рядом расположен температурный датчик, связанный с блоком управления и обеспечивающий автоматическую термостабилизацию в камере в диапазоне температур от 293 до 113 К. Температура индицируется на цифровом индикаторе блока управления и записывается на самопишущем приборе КСП-4 [5].

Для электронно-микроскопического анализа ткани печени из блоков, залитых в эпоксидную смолу, изготавливались ультратонкие срезы на ультрамикротоме УМТП-4. Просмотр и фотографирование объектов проводили на электронном микроскопе ЭМ-10 (фирмы «ОПТОН», ФРГ) при ускоряющем напряжении 60 кВ. Количественная характеристика кристаллов в плоскости среза осуществлялась путем вычисления «фактора формы» — отношения максимальной хорды фигуры к ее максимальному размеру в перпендикулярном направлении.

При анализе замороженной ткани печени обнаружены места локализации кристаллов льда в виде светлых полостей разной формы и размеров. Клетки ткани печени имеют «ячеистый вид», при этом субклеточные элементы сильно сжаты и деформированы кристаллами льда с повреждением ультраструктуры органоидов (рис. 1). Количественный анализ формы мест локализации кристаллов льда в замороженной ткани показал преобладание структур округлой формы, «фактор формы» которых соответствует значениям 1,2—1,5 (рис. 2). Характер пространственного распределения кристаллов в замороженной зоне ткани печени в целом приближается к равномерному, захватывая практически все клеточные элементы ткани. Однако размеры отдельных кристаллов, находящихся в клетках разного типа, не одинаковы (рис. 3). Так, светлые полости, определяемые в гепатоцитах, были большего размера, чем в ядерных клетках крови мик-

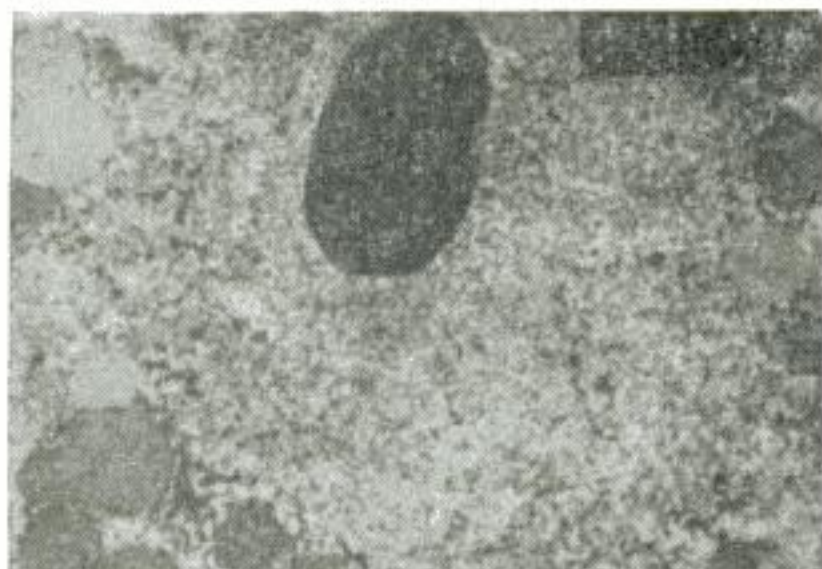
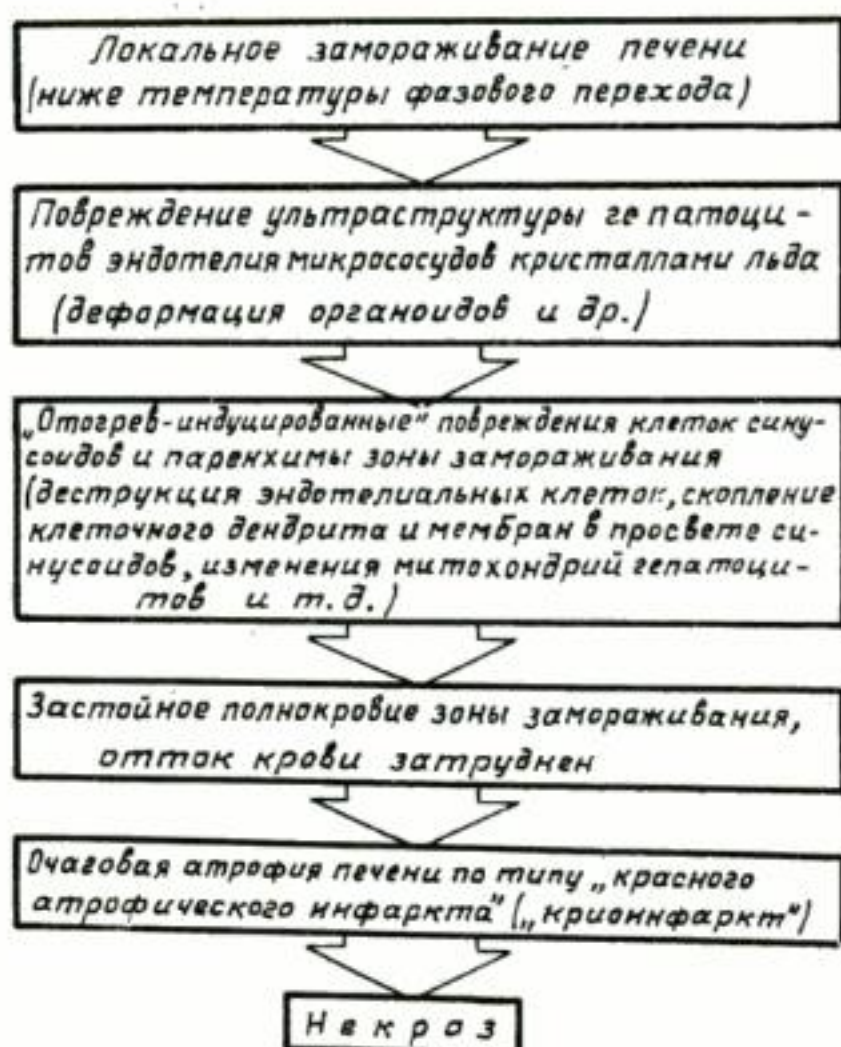


Рис. 4. Синусоид печени после охлаждения (243 К) и отогрева. Ультраструктура эндотелиальных клеток разрушена, синусоид заполнен клеточным дендритом, проходимость затруднена. $\times 10\,000$

Рис. 5. Схема развития летальных субклеточных повреждений печени после локального замораживания и отогрева



рососудистого русла, а в эритроцитах почти не обнаруживались. Различный характер кристаллообразования в различных клетках анализируемого микроучастка ткани указывает на их различную «криорезистентность» к одинаковому температурному воздействию. Предложенная методика особенно информативна при сопоставительном анализе ультраструктуры в замороженном состоянии и после отогрева ткани, которая макроскопически сразу после оттаивания имеет темно-вишневый цвет. Электронно-микроскопический анализ зоны замораживания ткани печени после охлаждения, проведенный с помощью традиционного метода ультратонких срезов, показал наличие выраженных повреждений клеток печеночного синуса, центральных венул и гепатоцитов. Эндотелиальные клетки синусоидов разрушены, плазматическая мембрана повреждена, а в ряде случаев отсутствует (рис. 4). Просвет синусоидов заполнен обрывками мембран, скоплением клеточного дендрита и т. д. Прилежащие участки плазматической мембраны гепатоцитов изменены, нарушена ультраструктура митохондрий, гладкого и шероховатого ЭПР. В цитоплазме встречаются светлые полости, очевидно, обусловленные локальным лизисом гиалоплазмы. Изменено пространство Диссе. Центральные венулы заполнены скоплениями эритроцитов, тромбами и обрывками клеток. Таким образом, фаза отогрева ткани индуцировала образование деструктивных изменений паренхиматозных клеток и звеньев микроциркуляторной системы, что привело к застойным явлениям в зоне криовоздействия и последующим атрофическим изменениям клеток печени по типу «красного атрофического инфаркта», описанного в клинической морфологии при некоторых заболеваниях печени [2].

Проведенные нами ранее исследования охлажденной до 243 К печени свидетельствуют о том, что в зоне замораживания спустя несколько суток возникают некротические явления. При данных условиях охлаждения деструктивные изменения проходят ряд последовательных этапов и заканчиваются формированием некроза (рис. 5). Вероятно, описанный характер ультраструктурных повреждений ткани имеет место в тех случаях, когда происходит охлаждение ниже температуры фазового перехода с образованием внутриклеточных кристаллов льда.



С. Введение в электронно-микроскопическую технику исследований.— Киев : Наук. думка, 1982.—

...ническая морфология печени.— М. : Медицина,

and principles of fixation by freeze-substitution // 1958.— 4, N 5.— P. 593—609.

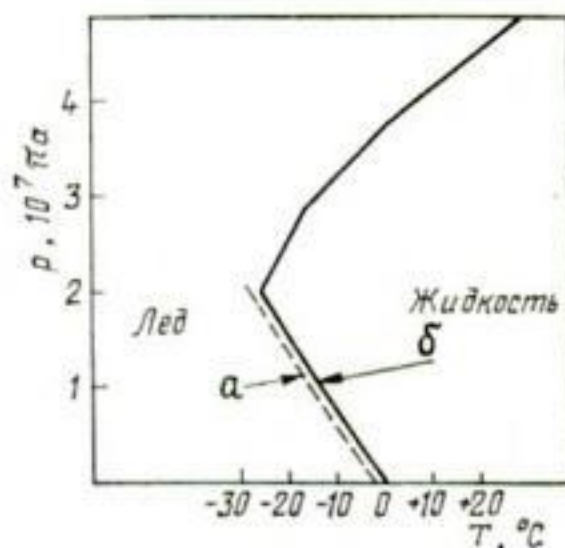
...structure and ice location in frozen organs and tissue and related techniques // Cryobiology.— 1983.—

...freezing-substitution method for visualization of // Proc. Eighth Europ. Congr. on Electron Microscopy.— 1984.— P. 1807—1808.

Поступила 24.10.83

ИССЛЕДОВАНИЯ ВЫСОКОГО ДАВЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОБЪЕКТЫ

При высоком давлении температура замерзания воды понижается. В частности, из диаграммы фазового равновесия для воды (pT диаграммы) следует, что при давлении от 0 до $-26,5^\circ\text{C}$ вода находится в жидком состоянии [6, 8] сравнительно долго при хранении в течение от 24—36 ч до момента смерти (при давлении 1 Па) существует, при этих условиях исследовано было исследование крови, хранившейся при 0°C в условиях высокого давления. Определение оптимальной температуры, при которой давление было бы минимальным.



Фазовая pT диаграмма воды, плазмы: а — вода, б — плазма

...нального интервала нами была предварительно плазмы крови методом дифференциально-термическим анализом. Выяснилось, что она подобна диаграмме воды, но сдвинута на $2,5^\circ\text{C}$ в сторону низких температур (рисунок). С учетом этого сдвига нами исследовалась степень разрушения эритроцитов в диапазоне давлений до $19,6 \cdot 10^7$ Па при температурах 22°C , 4°C и отрицательных, при которых плазма находится в жидком состоянии. Число разрушенных клеток определялось фотометрически [2], соответствующие данные в диапазоне давлений $(9,8 \div 19,6) \cdot 10^7$ Па представлены в табл. 1. Из таблицы видно, что понижение температуры уменьшает количество разрушен-

$$*) 1_{\text{ат}} = 1 \frac{\text{кг}}{\text{см}^2} = 10 \frac{\text{г}}{\text{мм}^2} \approx 10^5 \text{ Па}.$$

$$20 \cdot 10^7 \text{ Па} \approx 2 \cdot 10^3 \text{ ат} \cdot \left(= 2 \cdot 10^4 \frac{\text{г}}{\text{мм}^2} \right).$$

ных эритроцитов. Исследование степени их разрушения в диапазоне давлений $(7,84 \div 1,96) \cdot 10^7$ Па (табл. 2) показало, что при $(3,92 \pm 0,49) \cdot 10^7$ Па и $-(4 \div 5)^\circ\text{C}$ они минимальны, а к 28 сут составили $(2 \pm 0,6) \%$. При давлении $1,96 \cdot 10^7$ Па степень разрушения крови не уменьшается, а при $5,88 \cdot 10^7$ Па к концу четвертой недели она в 10 раз выше, чем при $3,92 \cdot 10^7$ Па. Таким образом, нами найден оптимальный интервал давления $(3,92 \pm 0,49) \cdot 10^7$ Па и температуры $-(4 \div 5)^\circ\text{C}$. Ниже приведены данные, полученные при исследовании функциональной полноценности эритроцитов, хранившихся в оптимальном интервале.

В экспериментах использовали контейнеры, представляющие собой силиконовые трубки с фторопластовыми пробками или стеклянные с подвижными поршеньками, позволяющие бесконтактно передавать давление внешней среды биологическим образцам, помещенным внутрь контейнера [3]. Материалом исследований служила кровь здоровых доноров, взятая

Таблица 1. Зависимость числа разрушенных эритроцитов от условий хранения, %

10^7 Па	$T, ^\circ\text{C}$	Время хранения	Число разрушенных клеток, %
19,6	22	15 мин	0,0
19,6	22	60 мин	$65 \pm 5,0$
19,8	-5	40 мин	$14 \pm 2,5$
15,7	22	90 мин	$8 \pm 1,6$
9,8	4	4 сут	$55 \pm 2,0$
9,8	-10	4 сут	$10 \pm 2,0$
9,8	-10	28 сут	$70 \pm 2,6$

Таблица 2. Зависимость числа разрушенных эритроцитов от условий хранения, %

10^7 Па	$T, ^\circ\text{C}$	Время хранения, сут			
		7	14	21	28
7,84	$-9 \pm 0,1$	$20 \pm 2,0$	$80 \pm 4,1$	96,0	100,0
5,88	$-7 \pm 0,1$	$5,0 \pm 1,7$	$7,0 \pm 1,9$	$10 \pm 2,5$	23 ± 3
3,92	$-5 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,5$	$0,5 \pm 0,5$	$1,0 \pm 0,5$	$2,0 \pm 1,0$
1,96	$-3 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,5$	$1,0 \pm 0,6$	$2,2 \pm 0,7$	$5,0 \pm 1,2$

ределяли P_{50} и концентрацию MetHb [4], а также выход K^+ в плазму методом пламенной фотометрии и морфологию клеток. Всего было проведено 100 опытов, по 5—7 на каждый срок хранения. Результаты экспериментов статистически обрабатывали, сравнения проводили по критерию Стьюдента. При исследовании кислотной стойкости эритроцитов сравнивали эритрограммы крови, хранившейся в оптимальном интервале и при 4°C с консервантом цитроглюкофосфатом (ЦГФ). Обнаружена несколько пониженная стойкость эритроцитов, хранившихся при -4°C , так как максимум эритрограммы к концу третьей недели хранения был сдвинут в сторону уменьшения стойкости на 1,5 минут. Оксигенацию гемоглобина исследовали путем снятия спектров гемолизата, полученного из консервированной по общепринятой методике крови [4]. Из приведенных в табл. 3

Таблица 3. Изменение уровня P_{50} (в мм рт. ст.) и MetHb (в %) в гемолизате крови, хранившейся при -4°C и давлении $3,92 \cdot 10^7$ Па, в сравнении с хранившейся при 4°C в течение разных периодов времени

Режим хранения	Показатель	Контроль	Время хранения, сут			
			7	14	21	28
4°C ЦГФ	P_{50}	$24 \pm 1,6$	$21,5 \pm 0,5$	$14,4 \pm 1,0$	$11,5 \pm 2,0$	$9,0 \pm 2,0$
	MetHb	$2,56 \pm 0,2$	$7,5 \pm 0,5$	$9,0 \pm 1,2$	$15,2 \pm 2,0$	$20,0 \pm 3,0$
-4°C $3,92 \cdot 10^7$ Па	P_{50}	$24,0 \pm 2,0$	$18,0 \pm 2,0$	$17,0 \pm 2,0$	$16,0 \pm 2,5$	$15,2 \pm 1,8$
	MetHb	$3,0 \pm 0,4$	$3,69 \pm 0,3$	$4,0 \pm 0,7$	$4,3 \pm 1,8$	$5,0 \pm 2,0$

данных видно, что P_{50} крови, хранящейся в оптимальном интервале, к концу четвертой недели хранения выше, а содержание Met Hb ниже, чем клеток, хранившихся с ЦГФ. Это свидетельствует о лучшей сохранности гемо-

глобина в оптимальном интервале давления и температуры. Достоверных различий между результатами исследования выхода K^+ в крови, хранившейся с консервантами ЦНИИГПК 76 и ЦНИИГПК 12 при 4 °С и под давлением в течение трех недель, не выявлено. К концу четвертой недели выход K^+ в крови, хранившейся под давлением, на 20 % превышает уровень выхода этих ионов в крови, консервированной при 4 °С.

Исследование морфологии клеток показало, что к концу первой недели хранения эритроциты сохранили способность складываться в монетные столбики. Шиповидные эритроциты появились на второй неделе хранения, к концу третьей их число составило 10 %. Данные о кислотной стойкости, выходе K^+ и оксигенации гемоглобина для хранящейся под давлением крови позволяют предположить, что комплексное действие высокого давления и низкой температуры поддерживает сохранность белковых структур лучше, чем липидных компонентов мембран. Исследование фагоцитарной активности консервированных нейтрофильных гранулоцитов хемилюминесцентным методом показало, что интенсивность свечения нейтрофилов, хранящихся в течение 7, 14 и 21 сут при температуре — (4 ÷ 5) °С и давлении $(3,92 \pm 0,49) \cdot 10^7$ Па составляет соответственно 80, 70 и 55 %. При этом жизнеспособность хранившихся нейтрофилов, окрашенных трипановым синим, была на 12 % выше, чем при исследовании этого параметра хемилюминесцентным методом.

Предварительные эксперименты по хранению под давлением клеток костного мозга мышей линии СБА на протяжении 9 сут позволили установить, что жизнеспособность клеток, хранившихся в растворе Хенкса при указанных выше условиях достоверно не отличается от таковой нативного костного мозга. Совместные с В. Н. Власовой (кафедра зоологии Красноярского педагогического института) эксперименты по хранению под давлением нервно-мышечных препаратов лягушки и крыс свидетельствуют, что электровозбудимость указанных препаратов, хранившихся под давлением $3,92 \cdot 10^7$ Па при температуре 22, 4 и —4 °С, сохраняют свою активность вдвое дольше, чем при атмосферном давлении. При —4 °С и повышенном давлении активность препаратов была значительно выше, чем при 4 °С без давления, в то время как в контроле без давления при —4 °С они погибали. Таким образом, использование комплексного воздействия высоким давлением и температурой ниже 0 °С, соответствующей жидкофазному состоянию плазмы, может оказаться перспективным для разработки методов хранения клеток крови, тканей и других биологических объектов.

1. Берг Л. Г. Введение в термографию.— М.: Наука, 1969.— 350 с.
2. Воробьев А. И. Подсчет эритроцитов на фотоэлектрокалориметре типа ФЭК-М // Лаб. дело.— 1959.— № 3.— С. 3—8.
3. А.с. 1124974 СССР, МКИ⁴ А 61k 36/14. Способ хранения крови/Ю. А. Куденко, А. Г. Звегинцев, И. И. Гительзон и др.— Оpubл. 20.11.84, Бюл. № 42.
4. Кушаковский М. С. Клинические формы повреждения гемоглобина.— Л.: Медицина, 1968.— 324 с.
5. Нефедов В. П. Об автоматической регистрации кинетики кислотной стойкости популяций эритроцитов // Бюл. эксперим. биологии и медицины.— 1970.— № 9.— С. 122—125.
6. Jessiman A. G., Walter C. W. Observation on low temperature and high pressure as a means toward better red blood cell preservation // Surg. Forum.— 1950.— 36, N 5.— P. 529.
7. Hermans K. Pressure effects on biochemical systems // High Pressure Chemistry.— London: Reidel, 1978.— P. 600.
8. Lorant A. Storage of blood below 0 °C in liquid state // J. Clin. Invest.—1953.— 33, N 10.— P. 1005—1012.

Ин-т биофизики СО АН СССР,
г. Красноярск

Поступила 21.07.25

Т. М. Сидякина, А. И. Тараканчиков, М. Ю. Чумакова

КАССЕТНАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ХРАНЕНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ В ЖИДКОМ АЗОТЕ В ХРАНИЛИЩАХ ХБ-0,5

Компактная и удобная система хранения биологических объектов в жидком азоте нужна для повышения эффективности работы низкотемпературных банков. В коллекциях микроорганизмов, насчитывающих в своем фонде тысячи культур, желательно снизить затраты на хранение одного штамма за счет увеличения содержания возможного числа культур в тех же габаритах хранилищ и уменьшения расхода жидкого азота. При использовании хранилищ ХБ-0,5 емкостью 500 л жидкого азота во Всесоюзной коллекции микроорганизмов ИБФМ АН СССР возникла необходимость в переработке конструкции хранилищ и разработке кассетной системы с держателями ампул. Обычно для консервирования коллекционных куль-

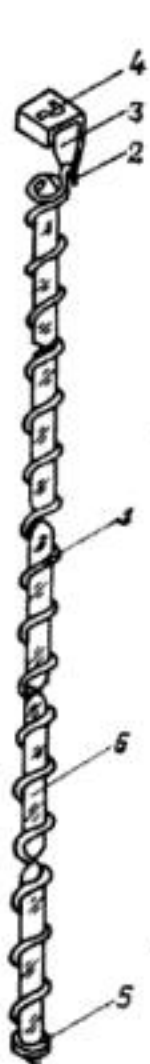


Рис. 1

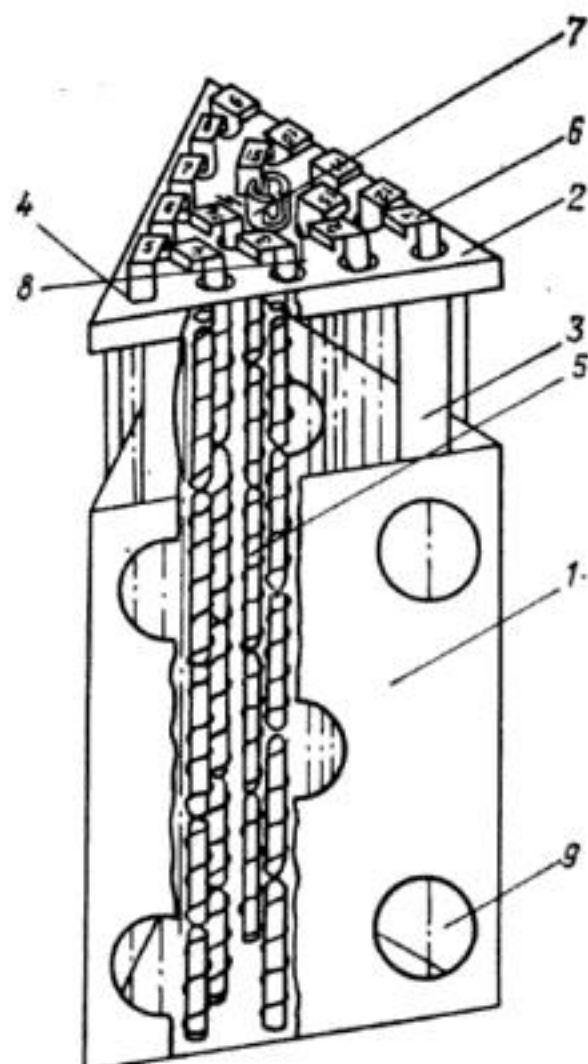


Рис. 2

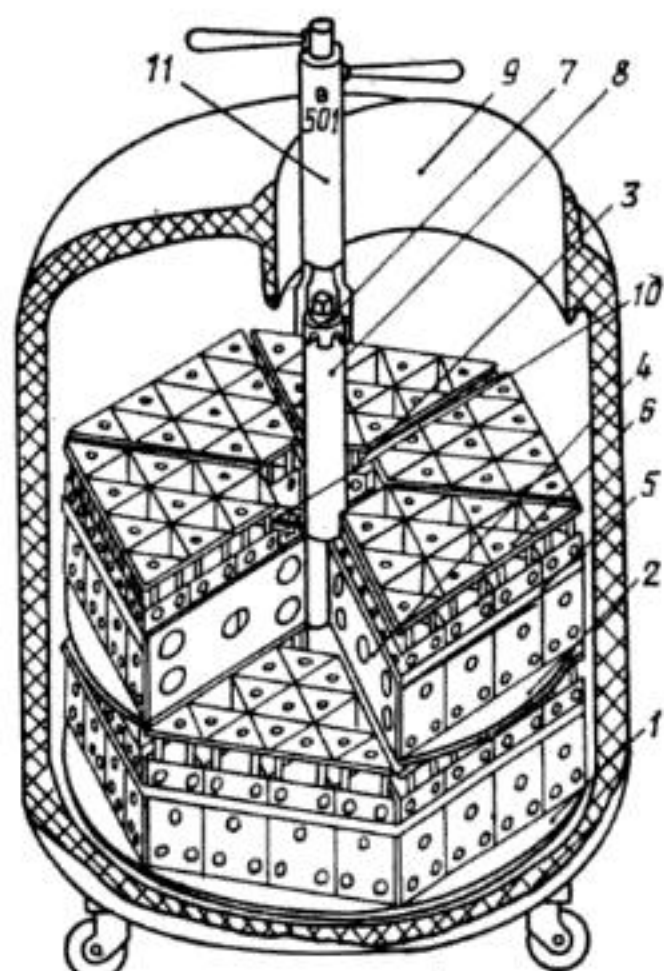


Рис. 3

Рис. 1. Держатель: 1 — спираль из нержавеющей проволоки диаметром 1,2 мм; 2 — крючок; 3 — подвеска; 4 — порядковый номер держателя; 5 — заглушка; 6 — ампулы с культурами микроорганизмов

Рис. 2. Кассета: 1 — корпус из нержавеющей стали; 2 — крышка; 3 — соединительные пластины; 4 — отверстия под держатель; 5 — держатели с ампулами; 6 — подвески держателей; 7 — втулка с фасонным вырезом для извлечения кассеты из хранилища; 8 — порядковый номер кассеты; 9 — отверстия для циркуляции жидкого азота

Рис. 3. Хранилище ХБ-0,5 с кассетной системой: 1 — нижняя платформа; 2 — верхняя платформа; 3 — секция; 4 — перегородка; 5 — опора; 6 — кассета; 7 — вал; 8 — труба; 9 — горловина хранилища; 10 — указатель номера секции; 11 — поворотный ключ

тур микроорганизмов в жидком азоте или его парах используются стеклянные или пластмассовые ампулы объемом 1,5—2 мл. Применение отдельного заводского контейнера, поставляемого в комплекте биохранилищ ХБ-0,5 для хранения ампул одного штамма, невыгодно из-за малого количества культур микроорганизмов, которые могут быть размещены в хранилище (в случае заводского варианта — всего 288 штаммов в хранилище емкостью 500 л жидкого азота). Использование же всего объема контейнеров для хранения большого количества ампул разных штаммов делает затруднительным извлечение из хранилища ампулы с нужной культурой.

Нами разработана кассетная система с держателями ампул объемом 2 мл, которая может быть использована на всех этапах криоконсервирова-

ния культур, включая программный замораживатель, переносные сосуды, хранилища биопродуктов ХБ-0,5 и размораживатель.

Держатель (рис. 1) изготовлен из нержавеющей проволоки диаметром 1,2 мм и состоит из корпуса 1, выполненного в виде спирали, в верхнем конце которой за крючок 2 крепится подвеска 3 с выбитой на ней цифрой 4, порядковым номером держателя. Нижний конец держателя заглушен последними витками спирали 5. Пять ампул 6 устанавливаются в держатель через верхний конец, который при повороте подвески 3 на крючке 2 раскрывается. Из держателя ампулы извлекаются таким же образом. В вертикальном положении устанавливаются 15 держателей в кассете (рис. 2), которая изготовлена из листовой нержавеющей стали и состоит из корпуса 1 и крышки 2, соединенных пластинами 3. Крышка имеет 15 отверстий 4, в которые вставляются держатели 5 на подвесках 6. В ее центре находится втулка 7 с фасонным вырезом для специального захвата, с помощью которого устанавливаются и извлекаются кассеты из хранилища. Для лучшей циркуляции азота в кассете сделаны отверстия 9.

В хранилище ХБ-0,5 размещены два вертикально расположенных блока кассет. Каркас блока (рис. 3) изготовлен из листовой нержавеющей стали и состоит из нижней 1 и верхней 2 платформ, разделенных на шесть секций 3 с помощью перегородок 4. Нижний блок состоит из шести секций, а верхний — из пяти, каждый из них независимо поворачивается на оси барабана.

Округление верхней части кожуха хранилища и небольшой диаметр горловины не позволяют полностью загрузить верхние секции, поэтому в каждой нижней секции устанавливается 13 кассет 6, а в каждой верхней — 9 кассет. На верхней платформе имеется одна свободная секция, через которую извлекаются кассеты из нижней платформы. Каждая секция имеет свой номер 10. Нижняя платформа 1 крепится на валу 7, а верхняя — на трубе 8, надетой подвижно на этот вал. Платформы, разделенные на секции, вращаются относительно друг друга и подводятся к горловине хранилища 9 с помощью специального комбинированного поворотного ключа 11.

Как видно из таблицы, использование кассетной системы с держателями позволяет увеличить возможное число хранящихся в одном хранилище ХБ-0,5 штаммов в семь раз по сравнению с применением заводского варианта.

Кассетная система с держателями для хранилища ХБ-0,5 была изготовлена в Опытном производстве ИБФМ АН СССР и эксплуатируется в низкотемпературном банке Всесоюзной коллекции микроорганизмов. Испытания показали, что она проста и надежна в эксплуатации, сокращает время на загрузку и извлечение необходимых ампул, улучшает условия обслуживания хранилищ ХБ-0,5, обеспечивает достаточную загрузку хранилищ культурами, существенно сокращает расходы на хранение одного штамма микроорганизмов, повышает надежность хранения коллекционных культур микроорганизмов. Разработанная кассетная система с держателями может быть рекомендована к использованию в низкотемпературных банках для хранения биологических объектов в небольших объемах — микроорганизмов, вирусов, клеточных культур и других.

Сравнение вариантов заполнения хранилища ХБ-0,5

Вариант заполнения	Количество штаммов	Количество ампул
Система с контейнерами по 5 ампул	288	1440
Система с кассетами на 18 держателей по 5 ампул	2214	11070

Всесоюз. коллекция микроорганизмов,
Ин-т биохимии и физиологии
микроорганизмов АН СССР,
г. Москва

**В. М. Гордиенко, А. И. Миляновский, Ю. Н. Муськин, Я. В. Жарков,
А. Я. Сенчук, В. Д. Мельничук**

ХАРАКТЕР ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ПРИ ЭПИТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСПЛАЗИИ ШЕЙКИ МАТКИ ПОСЛЕ КРИОТЕРАПИИ

Снижение числа онкологических заболеваний шейки матки и полная ликвидация запущенных форм, составляющих все еще большой процент, зависит от своевременного выявления и соответствующего лечения предопухолевых состояний. Для лечения различных форм эпителиальных дисплазий шейки матки широко применяется метод криотерапии. Эффективность криотерапии в каждом случае требует контрольных исследований, среди которых особое место занимает цитологический метод. Целью исследования явилось изучение цитологической картины отделяемого из цервикального канала и пораженной поверхности влагалищной части шейки матки при диспластических процессах до и после проведения криолечения.

Под наблюдением находилось 325 больных в возрасте от 18 до 35 лет с давностью заболевания в среднем 3—5 лет. Диагноз был установлен на основании кольпоскопического, кольпоцервикоскопического исследования и цитологического изучения мазков по методу Папаниколау в модификации А. В. Руденко и Л. К. Куницы или по Романовскому. В соответствии с характером микроскопической картины мазков и учетом фазы менструального цикла цитологический диагноз отражал не только наличие или отсутствие диспластического процесса, но и тип дисплазии по схеме Папаниколау [1]. В зависимости от тяжести и характера патологического процесса решался вопрос о показаниях к криотерапии и методике ее проведения. После лечения цитологическое исследование повторялось через 4 и 8 недель, а также через 3 месяца.

Наши исследования показали, что у большинства наблюдаемых больных с клиническим диагнозом эпителиальная дисплазия шейки матки чаще имела место умеренная дисплазия (тип III а) и реже — тяжелая дисплазия (тип III б). Слабая или умеренно выраженная дисплазия проявлялась прежде всего увеличением размеров ядер эпителиальных клеток промежуточного слоя, а также парабазальных клеток. Ядра характеризовались гиперхромностью, хроматин их становился грубозернистым, а в цитоплазме клеток появлялись многочисленные мелкие вакуоли. Довольно часто в мазках появлялись сегментоядерные нейтрофилы и мононуклеары, среди которых преобладали малые, реже средние, лимфоциты. Встречались также единичные моноциты и плазмцитоподобные клетки. При тяжелой форме дисплазии (тип III б) в мазках выявлялись клетки всех слоев эпителия, а нередко и базальные клетки с описанными выше, но более резко выраженными изменениями ядер, а также единичные многоядерные клетки. Атипичных клеток при диспластическом процессе, как типа III а, так и III б не наблюдалось. После проведенной криотерапии клинически наблюдался выраженный эффект у 316 больных (97,2 % случаев).

Контрольные цитологические исследования большинства больных показали, что клеточный состав мазка либо соответствовал слабовыраженной дисплазии, либо не отличался от нормы. Ядра клеток промежуточного слоя, если и оставались несколько увеличенными в размерах, то становились менее гиперхромными, а хроматин мелкоглыбчатым, исчезали базальные и парабазальные клетки, не определялись многоядерные клетки. В ряде наблюдений, особенно в ранние сроки после криотерапии (4 недели), в мазках обнаруживались некротически измененные эпителиальные клетки, дистрофически и некротически измененные лейкоциты, иногда массы детрита. Однако в более поздние сроки наблюдения (3 и 6 мес) этих изменений не было. У отдельных больных (2,8 % случаев) криотерапия, несмотря на улучшение самочувствия, не приводила к полной нормализации цитограммы, хотя степень выраженности диспластических проявлений в клетках уменьшалась.

Таким образом, криотерапия дисплазии шейки матки является эффективным методом лечения и приводит к клиническому выздоровлению больных в 97,2 % случаев. Цитологические исследования до лечения помогают ориентироваться в выборе оптимального режима лечения и дифференцировать начальные формы рака шейки матки.

1. Ганина К. П., Коханевич Е. В., Мельник А. Н. Диагностика предопухолевых и опухолевых процессов шейки матки. — Киев : Наук. думка, 1984. — 180 с.

Киевский мед. ин-т

Поступило 24.12.85

Ф. В. Дахно, Р. Е. Долгина, Л. Г. Каталевская, А. П. Белоножко

СОХРАННОСТЬ ООЦИТОВ СВИНЬИ ПРИ КРАТКОВРЕМЕННОМ СОДЕРЖАНИИ ИХ В ФОЛЛИКУЛАХ

Первые успехи оплодотворения *in vitro* ооцитов млекопитающих, проблема сохранения генофонда редких и исчезающих видов, а также задачи селекционной работы с сельскохозяйственными животными делают актуальными вопросы низкотемпературного консервирования гамет и эмбрионов млекопитающих и человека. По сравнению с другими клетками ооциты имеют значительный объем, содержат большее количество воды, в то время как дегидратация клетки перед криовоздействием невозможна из-за потери ею функциональной активности. Это вынуждает искать нестандартные методы криоконсервации ооцитов. Определенные результаты достигнуты при многоступенчатом криоконсервировании, причем от степени сохранности биоматериала на подготовительных этапах, когда возникает необходимость кратковременного хранения ооцитов в зоне положительных температур, зависит успех всего процесса [2]. Исследование ооцитов человека и многих видов моноовулирующих млекопитающих чрезвычайно затруднительно из-за малого количества исследуемого материала, поэтому в качестве биологической модели удобно использовать ооциты полиовулирующих животных (например, свиньи).

В данной работе изучали влияние температуры хранения яичников свиньи на жизнеспособность фолликулярных ооцитов во время их суточной инкубации при следующих температурах: 37, 20, 8 и -8°C . Выбор таких режимов объясняется тем, что температура 20°C соответствует комнатной, при которой производятся все манипуляции по забору яичников и выделению ооцитов, исследования при 8°C и 37°C позволяют провести сравнение жизнеспособности ооцитов при температуре тела и небольшом охлаждении в зоне положительных температур, а -8°C примерно соответствует началу внутриклеточной кристаллизации.

В работе исследовано 835 ооцитов, полученных из 42 яичников свиньи. Яичники транспортировали и хранили до начала исследования в изотоническом (0,9 %) растворе NaCl при температуре 37°C в течение 40 мин [1]. Затем в условиях стерильного бокса образцы помещали в чашки Петри и хранили при указанных температурах. Ооциты получали методом иссечения ткани яичников. В опытах использовали стереомикроскоп МБС-9 с 28-кратным увеличением. Жизнеспособность ооцитов оценивали с помощью суправитального окрашивания трипановым синим.

Дисперсионный анализ [3] результатов исследования жизнеспособности ооцитов показал, что влияние температуры от общего действия всех внешних факторов составляет всего 7—8 % и, хотя оно является достоверным ($p \geq 0,999$), выделить его трудно. При изучении опосредованного действия температуры на сохранность ооцитов в яичниках выявлено, что фактор температуры является ведущим и обуславливает 52—65 % от суммарного изменения ооцитов ($p \geq 0,95$). При оценке жизнеспособности ооцитов, полученных из яичников, которые хранились при выбранных температурах, показано, что жизнеспособность их при 20°C составляет $(63 \pm 2,3) \% (n = 397)$, в то время как при 8°C ($n = 142$) она составляет $(32 \pm 3,0) \%$ и $(36 \pm 5,4) \%$ соответственно.

Таким образом, оптимальной для кратковременного (до 24 ч) хранения ооцитов в фолликулах яичников является комнатная температура, при которой отмечено максимальное число жизнеспособных ооцитов. На этапе подготовки ооцитов к криоконсервированию необходимо учитывать температуру, как один из ведущих факторов, влияющих на жизнеспособность ооцитов, хранящихся в фолликулах яичника.

1. Курило Л. Ф., Леонов Б. В., Лукин В. А. Некоторые данные об оогенезе, оплодотворении и возможности культивирования *in vitro* яйцеклеток человека // Акуш. и гинекол.— 1981.— № 6.— С. 7—11.
2. Курило Л. Ф. Развитие техники оплодотворения ооцита вне организма и трансплантация эмбрионов // Там же.— 1984.— № 1.— С. 7—10.
3. Лакин Г. Ф. Биометрия.— М.: Высш. школа, 1968.— 288 с.

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

Поступило 24.12.85

О. В. Кудокоцева, Л. М. Балыбердина

СВОЙСТВА ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УСЛОВИЙ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ И ВОЗДЕЙСТВИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

Первые работы по изучению действия низких температур на микроорганизмы показали, что дрожжи можно успешно сохранять в замороженном состоянии. О влиянии низких температур на сохранность морфофункциональных свойств рас дрожжей известно мало, а имеющиеся литературные данные противоречивы [4, 5]. Целью настоящей работы явилось исследование основных морфофункциональных свойств дрожжей различных рас при криоконсервировании и воздействии физико-химических факторов, неизбежно сопровождающих этапы замораживания — оттаивания [2]. Объектом исследования служили дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* расы ЛО-2 и расы Л-1 дрожжевая, находящиеся в стационарной фазе роста. Замораживание проводили по одноэтапным программам со скоростями 0,4, 4, 40 и 400 °С/мин и по медленной двухэтапной программе [3]. Отогревали образцы при 30 °С. Жизнеспособность дрожжевых клеток определяли чашечным методом, сохранность — по прокрашиванию метиленовым синим. Дыхание определяли полярографическим методом, зимазную и мальтазную активности — газометрическим методом, подъемную силу — стандартным методом, использующимся при контроле качества дрожжей в пищевой промышленности [1].

Нами установлено, что характер изменений морфофункциональных свойств дрожжей зависит от скорости охлаждения. При скорости замораживания 400 °С/мин наблюдалась максимальная гибель клеток обеих рас дрожжей с резким снижением активности ферментов и интенсивности эндогенного дыхания. Для расы ЛО-2 наиболее оптимальной оказалась медленная двухэтапная программа замораживания. При криоконсервировании по данной программе клеток расы Л-1 дрожжевая резко снижалась их жизнеспособность, изменялись исследуемые морфофункциональные свойства. Оптимальной для дрожжей этой расы была одноэтапная программа замораживания со скоростью 0,4 °С/мин. Изучение влияния некоторых физико-химических факторов низкотемпературного консервирования на дрожжевые клетки показало, что исследуемые клетки достаточно устойчивы к холодовому шоку, изменению *pH* суспензионной среды в интервале 2,5—8,5 и гипотоническому шоку. Гипертонический шок в растворах NaCl вызывал резкое уменьшение количества жизнеспособных клеток обеих рас дрожжей. Клетки расы Л-1 дрожжевая оказались более чувствительными к длительной инкубации в растворах NaCl с нарастающей концентрацией до 4,5 М, о чем свидетельствовало значительное снижение их жизнеспособности и дыхательной активности. Увеличение концентрации сахарозы в растворе до 2 М достоверно уменьшало интенсивность эндогенного дыхания и не влияло на содержание жизнеспособных клеток в суспензии. Полученные данные свидетельствуют о том, что для криоконсервирования клеток дрожжей необходимо применять медленные скорости замораживания с подбором индивидуальных программ для клеток каждой расы. Одним из повреждающих факторов криоконсервирования можно считать гипертонический шок, который наблюдается при быстром охлаждении в результате кристаллообразования.

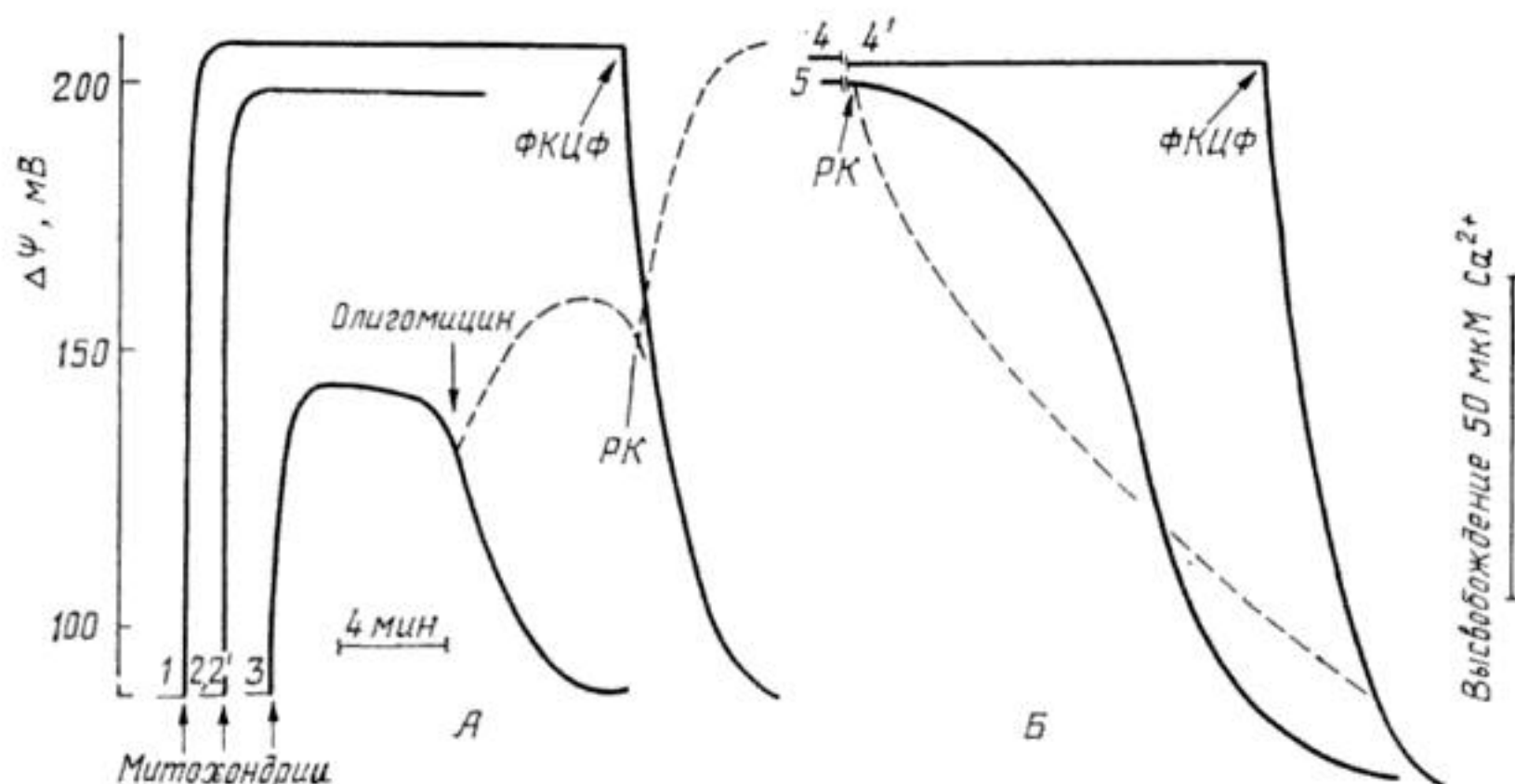
1. Афанасьева О. В. Микробиологический контроль хлебопекарного производства. — М.: Пищевая промышленность, 1976. — 144 с.
2. Актуальные проблемы криобиологии / Под общ. ред. Н. С. Пушкаря и А. М. Белоуса. — Киев: Наук. думка, 1981. — 608 с.
3. А.с. 1082363 СССР, МКИ⁴ А 01N 1/02. Способ криоконсервирования дрожжей вида *Saccharomyces cerevisiae* и *Saccharomyces telluris* Y-71 / А. А. Цуцаева, Ю. А. Иткин, И. П. Высеканцев и др. — Опубл. 30.03.84, Бюл. № 12.
4. Hubalek L., Kockova—Kratochvilova A. Long-term preservation of yeast cultures in liquid nitrogen // Folia Microbiol. — 1982. — 27, N 4. — P. 242—244.
5. Wellman A. M., Stewart G. G. Storage of brewing yeast by liquid nitrogen refrigeration // Appl. Microbiol. — 1973. — 26, N 4. — P. 577—583.

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

Поступило 02.04.85

ВЗАИМОСВЯЗЬ ИОНТРАНСПОРТИРУЮЩИХ СИСТЕМ В МЕМБРАНАХ МИТОХОНДРИЙ ПОСЛЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ-ОТОГРЕВА

Индукция ионного транспорта является одной из основных причин нарушения функциональной активности биообъектов после их замораживания — отогрева [2]. В связи с этим целью настоящей работы явилось изучение характера изменений транспорта ионов калия и кальция в нативных и замороженно-отогретых митохондриях. Митохондрии выделяли из печени крыс-самцов стандартным методом дифференциаль-



Изменение трансмембранного потенциала ($\Delta\Psi$, А) и транспорт ионов Ca^{2+} (Б) в нативных и замороженно-отогретых митохондриях. Среда инкубации: 250 мМ сахарозы, 30 мМ трис-НСl, 10 мМ KH_2PO_4 , 10 мМ сукцината, рН 7,5, 1 мкМ ТФФ⁺. 1 — одновременно с замороженно-отогретыми митохондриями в среду инкубации внесен олигомицин; 2', 4' — нативные митохондрии; 3, 5 — замороженно-отогретые митохондрии без добавок; 2 — замороженно-отогретые митохондрии в среде с рутениевым красным (РК); 4 — замороженно-отогретые митохондрии в среде с олигомицином. Добавки: митохондрии — 1 мг белка; олигомицин — 2 мкг; ФКЦФ (3-фторметоксикарбонилцианид-фенилгидразон) — 1 мкМ, РК — 1 мкг. Объем ячейки 1 мл. Температура 26 °С. Приведены результаты одного опыта, характерного для серии из 6 — 7 экспериментов

ного центрифугирования в среде, содержащей 300 мМ сахарозы, 10 мМ трис-НСl, 0,25 мМ ЭДТА, рН 7,4. Полученную суспензию быстро замораживали со скоростью 400—500 °С/мин до —196 °С и затем отогревали с начальной скоростью 400—500 °С/мин. Дыхательную активность митохондрий исследовали полярографически, а транспорт катионов изучали с помощью K^+ -, Ca^{2+} -селективных электродов. Изменение мембранного потенциала определяли по распределению проникающего катиона тетрафенилфосфия (ТФФ⁺) между матриксом и средой инкубации при помощи ТФФ⁺-селективного электрода. Среда инкубации содержала 250 мМ сахарозы, 30 мМ трис-НСl, 10 мМ KH_2PO_4 , 10 мМ сукцината (рН 7,5).

Установлено, что нативные митохондрии способны генерировать мембранный потенциал (около 200 мВ) и удерживать эндогенные катионы K^+ , Ca^{2+} в течение 30 мин инкубации в среде, содержащей сукцинат и фосфат (рисунок). После замораживания — отогрева в митохондриях возникают трансмембранные потоки ионов K^+ , Ca^{2+} , что сопровождается падением величины трансмембранного потенциала и увеличением скорости окисления субстрата в состоянии 4. Ингибитор транспорта ионов Ca^{2+} в митохондрии, рутениевый красный, увеличивает начальную скорость высвобождения этого катиона в среду инкубации (рисунок). Этот факт свидетельствует о том, что разобщение митохондрий, наблюдаемое после замораживания — отогрева, обусловлено активацией «кальциевого цикла», включающего электрогенный транспорт Ca^{2+} внутрь митохондрий и электронейтральный выход за счет $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$ -обмена [4]. Ингибирование «кальциевого цикла» рутениевым красным приводит к быстрому росту трансмембранного потенциала до величины, характерной для нативных митохондрий, а также предотвращает выход ионов K^+ и ускорение дыхания. Ингибиторы АТФазы (олигомицин, дициклогексилкарбодимид) подавляют транспорт ионов, наблюдаемый в условиях эксперимента (рисунок). Это свидетельствует о возникновении H^+ -проводимости через протонный канал АТФ-синтетазного ферментного комп-

лекса, которая эффективно подавляется олигомицином и дициклогексилкарбодимидом [2].

Таким образом, в настоящей работе было выявлено две системы ионного транспорта, индуцирующихся в мембранах замороженно-отогретых митохондрий: система циклического транспорта ионов Ca^{2+} и H^{+} -проводимость через протонный канал АТФ-синтезы. Учитывая, что ионы K^{+} транспортируются в митохондриях электрогенно, а освобождаются по $\text{K}^{+}/\text{H}^{+}$ -обменному механизму [3], можно предположить, что циклический транспорт этого катиона также вовлекается в разобщение митохондрий, наблюдаемое после их замораживания — отогрева. Результаты проведенных исследований также свидетельствуют и о взаимосвязи этих ионотранспортирующих систем. Действительно, внесение ингибиторов АТФазы или рутениевого красного в начальный момент времени приводит к полному подавлению всех систем ионного транспорта. Для предотвращения транспорта ионов после начала разобщения необходимо одновременное или последовательное добавление вышеуказанных соединений. Проведенные исследования позволяют предположить, что активность ионотранспортирующих систем в мембранах замороженно-отогретых митохондрий регулируется величиной мембранного потенциала. В нативных митохондриях, когда величина мембранного потенциала составляет около 200 мВ, индукции систем транспорта ионов не наблюдается. После замораживания — отогрева на мембране митохондрий возникает потенциал меньшей величины (100—130 мВ). При этом развиваются процессы, приводящие к индукции циклического транспорта ионов и H^{+} -проводимости через протонный канал АТФ-синтетазного комплекса. Синхронная реализация этих ионотранспортирующих систем приводит к разобщению митохондрий (т. е. мембранный потенциал неустойчив и снижается во времени, а скорость дыхания в состоянии 4 увеличивается). При внесении ингибиторов отдельных ионотранспортирующих систем одновременно с замороженно-отогретыми митохондриями мембранный потенциал достигает своего теоретического предела, что, очевидно, является обязательным условием для стабилизации митохондриального метаболизма после действия низких температур.

1. Новгородов С. А., Маршанский В. Н., Ягужинский Л. С. Регуляция ионного транспорта в митохондриях ферментами дыхательной цепи и АТФазы // Биохимия. — 1984. — 49, № 2. — С. 185—192.
2. Петренко А. Ю., Белоус А. М., Лемешко В. В. Влияние скорости замораживания и отогрева на функциональное состояние и ионную проницаемость митохондрий печени крыс // Там же. — 1982. — 47, № 4. — С. 626—633.
3. Diwan J. J. Dependence of mitochondrial K^{+} flux on pH // Biochem. Soc. Trans. — 1981. — 9, N 1. — P. 6—7.
4. Heaton G. M., Nicholls D. G. The calcium conductance of inner membrane of rat liver mitochondria and the determination of calcium electrochemical gradient // Biochem. J. — 1976. — 156, N 3. — P. 635—646.

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

Поступило 02.04.85

УДК 57.043

Т. Ф. Стрибуль

ПРИМЕНЕНИЕ ЭКСПОНЕНЦИАЛЬНЫХ РЕЖИМОВ ОХЛАЖДЕНИЯ ПРИ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИИ БИООБЪЕКТОВ

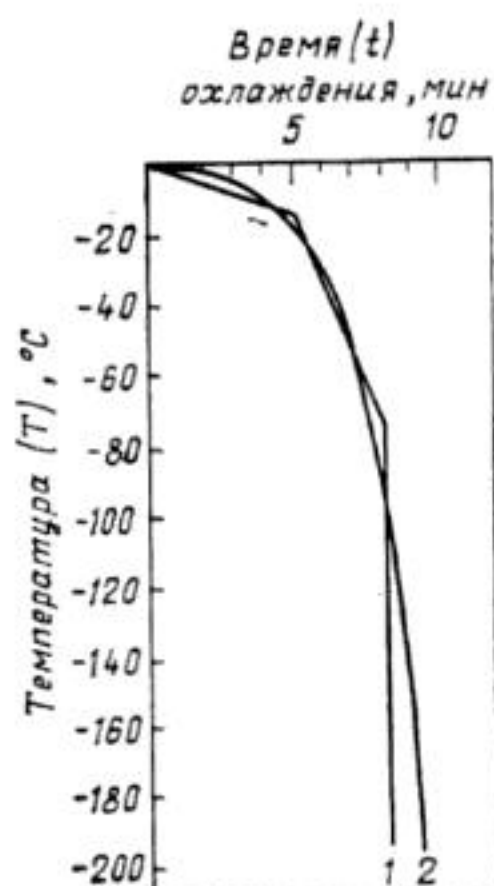
Выбор оптимальных программ замораживания и отогрева является необходимым условием для успешного осуществления процесса низкотемпературного консервирования биологических объектов. До настоящего времени при замораживании клеточных суспензий в основном применялись линейные режимы замораживания с медленной скоростью охлаждения на начальном этапе замораживания и с более быстрой — на последующих этапах. Учитывая то, что все физико-химические процессы, протекающие при низкотемпературном консервировании биообъектов, носят нелинейный характер, мы попытались подобрать режимы замораживания, в которых изменение скорости охлаждения описывается нелинейными зависимостями. Для этого была проведена аппроксимация линейных экспериментальных, ранее оптимизированных, режимов несколькими нелинейными функциями, из которых наиболее подходящей оказалась экспоненциальная. Нами проведено сравнение эффективности низкотемпературного консервирования спермы карпа по линейному (оптимизированному) и экспоненциальному режиму. Линейный режим криоконсервирования осуществлялся в три этапа: на первом этапе образцы охлаждали в интервале температур от 0 до

—15 °С со скоростью 3 °С/мин, на втором этапе — от —15 до —75 °С со скоростью 20 °С/мин, затем биообъект погружали в жидкий азот (рисунок, кривая 1). Экспоненциальный режим (рисунок, кривая 2) описывается уравнением:

$$T = -e^{nt} + 1,$$

где T — температура охлаждения, °С; t — время охлаждения, мин; n — показатель степени экспоненты (для данного режима $n = 0,58$).

В опытах была использована сперма карпа с исходной жизнеспособностью 60 %. После замораживания ее по линейному режиму получено 11,5 % жизнеспособности, а по экспоненциальному режиму — 39,2 %. Реализация экспоненциальных режимов охлаждения на практике осуществляется с помощью замораживателя типа «Лед» в полуавтоматическом режиме по ломаной кривой, максимально вписанной в искомую экспоненту. Применение экспоненциальных режимов имеет и то преимущество, что требует задания лишь одной величины — показателя степени экспоненты, тогда как для корректного задания линейного режима необходимо как минимум четыре величины (скорость охлаждения на первом этапе замораживания, температура перехода на второй этап, скорость охлаждения на втором этапе, температура перехода на третий этап). Оптимизация таких режимов является очень трудоемким процессом из-за большого количества эксперимен-



Аппроксимация линейного режима охлаждения экспоненциальным; 1 — линейный режим; 2 — экспоненциальный режим

тов. Таким образом, экспоненциальные режимы охлаждения обеспечивают лучшую сохранность криоконсервированной спермы карпа и проще оптимизируются.

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

Поступило 02.04.85

УДК 57.043 : 577.152

В. А. Коптелов

СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ ИЗОЛИРОВАННЫХ ГЕПАТОЦИТОВ ПРИ ЗАМОРАЖИВАНИИ

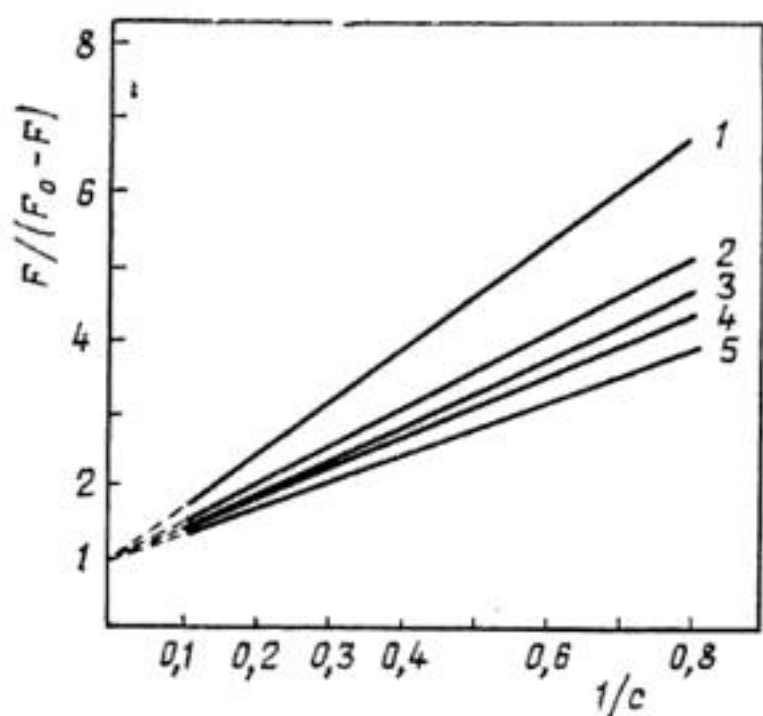
Известно, что замораживание — оттаивание оказывает повреждающее действие на многие растворимые и мембраносвязанные ферменты, которые обеспечивают метаболизм клеток и тканей [1]. Хотя в настоящее время имеются значительные успехи в выяснении механизмов криоповреждения растворимых ферментов [2], проблемы, касающиеся вклада различных факторов, и в первую очередь изменений структурной организации мембраны, в нарушение функционирования мембраносвязанных ферментов при замораживании — оттаивании биологических объектов, остаются во многом неясными.

В связи с этим в настоящей работе с помощью метода флуоресцентного зондирования изучены перестройки белков относительно липидной фазы плазматических мембран изолированных гепатоцитов при их замораживании — оттаивании по различным программам.

Плазматическая мембрана изолированных нативных и замороженных — оттаянных гепатоцитов выделялась путем последовательного низкоскоростного при 1500 g и высокоскоростного центрифугирования при 75000 g в прерывистом градиенте сахарозы. Процедура замораживания — оттаивания проводили в пластмассовых ампулах объемом 8,0 мл по четырем программам. Рабочая концентрация мембран составляла 0,2 мг белка. Оптические измерения проводили при 23—25 °С. Флуоресценцию мембранных белков возбуждали светом с длиной волны 285 нм, регистрировали при 342 нм. Флуоресценцию пирена возбуждали при 330 нм, регистрировали при 390 нм (мономеры пирена) и 470 нм (эксимеры пирена). Степень эксимеризации зонда оценивали по отношению интенсивности флуоресценции эксимеров к интенсивности флуоресценции мономеров.

При возбуждении флуоресценции мембранных белков наблюдается перенос энергии с остатков триптофана на пирен, который в данном случае выступает в качестве акцептора энергии. Эффективность переноса оценивается по тушению флуорес-

пении триптофанилов в присутствии возрастающих концентраций зонда. На рисунке представлены данные по тушению триптофановой флуоресценции мембранных белков изолированных гепатоцитов: нативных (кривая 1) и после замораживания — оттаивания (кривые 2—5). Видно, что все кривые дают равную отсечку на оси ординат, что свидетельствует об одинаковой доле белков, доступных для тушения пиреном. Однако наклоны кривых отличаются: после замораживания — оттаивания угол наклона уменьшается по сравнению с таковым нативных мембран, причем наибольшее снижение имеет место при медленном замораживании и медленном оттаивании.



Тушение флуоресценции мембранных белков изолированных гепатоцитов: F_0 и F — интенсивность флуоресценции белков соответственно в отсутствие и в присутствии пирена; C — концентрация пирена, мкМ; 1 — нативные гепатоциты; 2 — быстрое замораживание и быстрое оттаивание; 3 — быстрое замораживание и медленное оттаивание; 4 — медленное замораживание и быстрое оттаивание; 5 — медленное замораживание и медленное оттаивание

Этот факт свидетельствует, что процедура замораживания — оттаивания повышает эффективность переноса энергии с триптофановых групп белков на пирен.

Одновременно проводилась оценка степени эксимеризации пирена в плазматической мембране изолированных гепатоцитов. Известно, что пирен локализован в липидной фазе мембраны и степень его эксимеризации определяется физическим состоянием мембранного бислоя липидов. Проведенные эксперименты показали, что замораживание — оттаивание приводит к увеличению степени эксимеризации пирена. Поскольку образование эксимеров пирена происходит только в жидкой мембране, обнаруженное увеличение степени эксимеризации указывает на снижение микровязкости липидного бислоя плазматических мембран изолированных гепатоцитов после замораживания — оттаивания.

Принимая во внимание возможные причины изменения эффективности переноса энергии с белков на пирен [3], а также учитывая установленное снижение микровязкости липидов, можно предположить, что наиболее вероятным результатом действия низких температур на мембрану изолированных гепатоцитов является дезагрегация мембранных белков или транслокация их после криовоздействия в липидный матрикс мембраны.

Таким образом, полученные данные позволяют сделать вывод о нарушении нативной структуры плазматической мембраны изолированных гепатоцитов после замораживания — оттаивания. Обнаруженные нарушения выражаются в изменении пространственной организации белково-липидных комплексов мембраны, что отражается на функционировании мембраносвязанных ферментов, в частности аденилатциклазного комплекса, чувствительность которого к регулируемому действию адренергических агентов в данных экспериментальных условиях снижается.

1. Влияние низких температур на растворимые ферменты / В. И. Луговой, В. А. Моисеев // Итоги науки и техники ВИНТИ. Сер. Биофизика. — 1978. — Т. 9. — С. 53—78.
2. Луговой В. И. Криповреждение ферментов и ферментных систем // Актуальные проблемы криобиологии. — Киев: Наук. думка, 1981. — С. 15—40.
3. Спирин М. М., Пучков Е. О., Лапшин Е. Н. и др. Перестройки белково-липидных комплексов в результате замораживания с последующим отогревом: обнаружение по переносу энергии с белка на флуоресцентный зонд / Ред. журн. «Биофизика». — М., 1981. — 14 с. — Деп. в ВИНТИ 01.06.81, № 5121-81.

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

Поступило 02.04.85

ХРОНИКА

III ВСЕСОЮЗНОЕ НАУЧНОЕ СОВЕЩАНИЕ «ХИМИЯ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР»

В Москве состоялось III Всесоюзное научное совещание по химии низких температур, в котором приняло участие 30 институтов и предприятий из 17 городов страны. Были заслушаны доклады по теоретическим основам криохимии, в частности теории реакционной способности молекул при низких температурах. В этой области советские ученые традиционно занимают ведущее положение в мировой науке. На

совещании были доложены новые результаты, полученные при исследовании автоволновых процессов в твердофазных системах (И. М. Баркалов, В. А. Бендерский, П. Г. Филиппов, В. И. Гольданский, Е. Я. Мисочко, Д. П. Кирюхин, А. М. Занин) и особенностей влияния упругих деформаций матрицы на кинетику протекающих в ней химических превращений (А. А. Овчинников).

Участники совещания ознакомились с работами по изучению кинетики и механизма химических реакций при низких температурах. С новыми результатами в этой области, полученными в основном в лаборатории химии низких температур МГУ, познакомил Г. Б. Сергеев. Этим же вопросам были посвящены сообщения В. В. Смирнова, Б. М. Сергеева, И. А. Леенсона, В. А. Толкачева и других исследователей. На совещании обсуждалось исследование кинетики и механизма химических реакций в жидкокристаллических матрицах (В. А. Батюк), которые моделируют некоторые особенности процессов в структурированных средах при низких температурах.

Большое внимание уделено исследованиям, посвященным низкотемпературному синтезу. Практическое значение работ по криохимическому синтезу твердофазных материалов отметили в своих докладах А. П. Можаяев, Ю. Д. Третьяков, В. П. Шабатин. Подчеркивалась возможность получения уникальных по своим свойствам материалов: ферритов, керамики, твердых электролитов, которые могут найти широкое применение при изготовлении печатных плат, полупроводниковых схем, искусственных препаратов с повышенной биологической активностью, новых магнитных материалов. Обсуждались вопросы применения низких температур в химической технологии (В. А. Легасов, Н. Н. Олейников, Ю. Д. Третьяков, В. П. Шабатин, А. М. Таскер, В. Е. Покровский) и биохимии (Ю. П. Благоев, А. Ю. Иванов, С. Г. Степаньян, В. А. Батюк).

Сделаны сообщения о современных экспериментальных методах криохимии. Детально обсуждены методы матричной изоляции (А. К. Мальцев, О. М. Нефедов), которые позволяют изучать неустойчивые при обычных температурах промежуточные продукты реакций. Рассмотрены исследования низкотемпературных реакций методами оптической спектроскопии (М. О. Буланин, Я. М. Кимерфельд), рэлеевского рассеяния мессбауэровского излучения (В. И. Гольданский), рентгеновской дифрактометрии (М. Ю. Антипин, Р. П. Озеров, Ю. Т. Стручков), хемилюминесценции (С. В. Лотник). Обращалось внимание на необходимость развития методов определения физико-механических свойств твердофазных матриц, испытывающих химические превращения.

На совещании отмечено, что исследования по химии низких температур имеют как фундаментальное, так и прикладное значение. Реализация многих низкотемпературных химических технологий позволяет снизить выход побочных продуктов, исключить затраты на их утилизацию, обеспечить охрану окружающей среды, создать безотходные варианты производства мономеров, растворителей полупродуктов, новых материалов для промышленности. Исследования в области криохимии открывают эффективные пути низкотемпературной консервации биологических систем.

А. И. Осецкий

НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ ПО ПРОБЛЕМЕ «ХОЛОДОВАЯ ТРАВМА»

В Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова состоялась первая научная конференция по проблеме «Холодовая травма». Накопленный опыт консервативного и сберегательно-восстановительного лечения холодовых поражений явился предметом обсуждения и обмена мнениями. Исследования, проведенные в последние годы при лечении отморожений, были направлены, главным образом, на выяснение патогенетической роли микроциркуляторных расстройств и изменений реологических свойств крови. Для выяснения патогенеза отморожений у человека определяют состояние сосудистого тонуса, реологических свойств крови, системы гемостаза, иммунологических реакций. Получили развитие некоторые новые направления исследований, в частности изучение гомеостаза, выраженности и природы интоксикации, репаративных возможностей организма, а также патоморфологии холодовой травмы.

На конференции обсуждались диагностические методы и способы объективизации результатов лечения. Вопрос о диагностике глубины отморожения в первые часы и сутки после травмы до настоящего времени остается нерешенным. Это связано с тем, что существующая классификация отморожений построена на патоморфологическом принципе, т. е. в ее основе лежит глубина некроза тканей. Длительное время применяли быстрое согревание отмороженных конечностей в теплой воде с целью сокращения продолжительности тканевой гипотермии и более быстрого восстановления кровообращения в тканях. С середины 60-х годов начали использовать метод оказания первой помощи путем теплоизоляции отмороженной конечности для ликвидации сосудистого спазма, при этом кровообращение и обменные процессы восстанавливаются параллельно, что обеспечивает предупреждение необратимых изменений. Медикаментозная терапия отморожений в настоящее время основана на использовании средств сосудорасширяющего, фибринолитического, дезагрегантного действия. Относитель-

но новым является фармакологическое воздействие на клеточные мембраны, применение антиоксидантов и антигипоксантов.

Предлагаются разные пути введения лекарственных средств — внутрикостное и сочетания внутривенных и внутриаптериальных инфузий. Помимо различных инфузионно-трансфузионных программ в лечении отморожений используют электростимуляцию, лучевую терапию, длительные блокады, оксигенотерапию. При оперативном лечении отморожений стараются сохранить максимальную длину культ конечности и кожные покровы. Широко применяются кожно и костнопластические реконструктивные оперативные вмешательства, протезирование.

До последнего времени изучением холодовой травмы занимаются преимущественно хирурги, однако практика показывает, что решать проблему поражений холодом возможно при участии гематологов, криобиологов, химиков-органиков и представителей других специальностей. Только всесторонний подход к выяснению механизмов гибели тканей организма при низкотемпературном воздействии позволит найти реальные эффективные меры профилактики и лечения этого вида патологии. Непременным условием успеха должна быть координация всех исследований.

Б. С. Вихриев, Ю. Р. Скворцов

ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИЙ

В специализированном совете при Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР в 1985 г. защищены диссертации.

В представленной работе В. А. Моисеева на соискание ученой степени доктора биологических наук «Молекулярные механизмы криоповреждения и криозащиты белков и биологических мембран» показано, что охлаждение биологических систем до температуры кристаллизации воды приводит к обратимым структурным изменениям. Фазовый переход вода — лед вызывает необратимые структурные перестройки, криопротекторы образуют сольватную оболочку вокруг макромолекул и биомембран, а также комплексы с биологически важными ионами, предохраняя биосистемы от криоповреждения.

Докторская диссертация В. И. Лугового «Механизмы повреждающего действия замораживания на растворимые и мембраносвязанные ферменты» посвящена исследованию первичных механизмов криоповреждения каталитических белков, возникающих в цикле замораживания-оттаивания в диапазоне температур от 0 до -196°C . Установлено, что нарушения структурно-функциональных свойств растворимых ферментов происходят в интервале доэвтектических температур и детерминированы влиянием на их молекулы комплекса криоповреждающих факторов, среди которых важную роль играют концентрационные лиотропные эффекты ионов и изменения pH среды. Доказано значение нарушений проницаемости мембран, физико-химических свойств липидных компонентов и липид-белковых взаимодействий в изменении функциональных характеристик при замораживании-оттаивании. Доказана возможность использования ряда мембранотропных фармакологических веществ и соединений, охраняющих энергетический потенциал клетки для стабилизации мембран и коррекции ферментных нарушений в условиях замораживания.

Защищены диссертации на соискание степени кандидата биологических наук. В работе А. Г. Душейко «Влияние ультразвуковых колебаний на замораживание и отогрев клеток костного мозга» установлено, что ультразвуковая обработка костного мозга во время экспозиции его с ПЭО-400 и в процессе замораживания повышает сохранность клеток при криоконсервировании.

А. Л. Марковский в исследовании «Влияние факторов криоконсервации на гидратацию глобулярных белков» методами диэлектрической и оптической спектроскопии показал, что замораживание сывороточных альбуминов и иммуноглобулинов до -196°C вызывает образование белковых ассоциатов и частичную потерю связанной воды глобулярными белками.

Б. Н. Леонов в диссертации «Влияние состава растворителя и замораживания — отогрева на конформацию сывороточного альбумина в растворе» с помощью методов УФ- и ИК-спектроскопии установил, что наиболее повреждающим режимом при консервации бычьего сывороточного альбумина является двухэтапное замораживание.

На основании исследования важнейших метаболитов эритроцитов, характеристики гликолиза и изучения барьерных и структурных свойств мембран клеток после криоконсервирования М. М. Лоевский в диссертационной работе «Влияние глицерина (пропантриола) и 1,2-пропандиола на структурно-функциональные характеристики криоконсервированных эритроцитов» пришел к выводу о том, что экспозиция размороженных клеток после криоконсервирования на основе глицерина и 1,2-пропандиола позволяет значительно увеличить срок хранения эритроцитов в гипотермических условиях.

Л. А. Бабийчук изучала влияние охлаждения на структуру и осмотические свойства эритроцитов человека. В работе на эту тему результаты исследования изменений объема, формы, проницаемости и структурных характеристик мембраны позволили обосновать целесообразность дозированного введения в среду замораживания криопротектора ПЭО-1500 при низких положительных температурах.

РЕФЕРАТЫ

УДК 57.043

Генетические эффекты гипотермии / Афонькин С. Ю., Калинина Л. В. // Криобиология.— 1986.— № 3.— С. 3—6.

Делящиеся клетки *Amoeba proteus* штамма War переносили из 25 в 4 °С на 24 часа. Деление прекращалось, каркинез блокировался в 36,6 % случаев. После перенесения амеб снова в 25 °С от $\frac{2}{3}$ клеток с заблокированным каркинезом удается вырастить клоны. Содержание в них ядерной ДНК вдвое больше нормы. Показано, что резкое понижение температуры среды, в которой происходит деление амеб, может вызвать полиплоидизацию значительной доли клеток. Низкая температура может приводить к наследуемым изменениям в эукариотических клетках. Обсуждается возможность обусловленной снижением температуры полиплоидизации в природных условиях и ее биологическое значение.

Ил. 1. Библиогр.: 11 назв.

УДК 612.46:615.361.014.41

Бесперфузионная гипотермическая консервация почек с использованием криопротекторов / Кирпатовский В. И., Жукаускас Г. Ю., Игльвичуте Я. С., Онищенко Н. А. // Криобиология.— 1986.— № 3.— С. 6—11.

Добавление в консервирующий раствор НИИТиО-2 криопротектора диметилсульфоксида (ДМСО) в концентрации 0,1 % или его введение донору в дозе 0,5 г/кг за 3 ч до опыта увеличивает выживаемость собак после аутотрансплантации почек, консервированных в течение 24 ч бесперфузионным методом при 4 °С, соответственно до 75 и 67 %. При этом лучше сохраняется энергетическое состояние консервированных почек и барьерная функция клеточных мембран. Вероятно, благоприятное действие ДМСО осуществляется путем модификации клеточных мембран и индукции неспецифической перестройки клеточного метаболизма.

Ил. 2. Табл. 3. Библиогр.: 10 назв.

УДК 57.043:616.833—0.89.843

Криоконсервация периферических нервов и результаты экспериментальной аллонейропластики дефектов нервных стволов / Чайковский Ю. Б., Яценко В. П., Когут Г. И., Галич С. П. // Криобиология.— 1986.— № 3.— С. 11—14.

Предварительная инъекция в нервные стволы раствора, содержащего диметилсульфоксид и вещества, стабилизирующие цитомембраны, и последующая инкубация трансплантатов в криозащитной среде с глицерином и стабилизаторами клеточных мембран обеспечивает сохранение жизнеспособности более 70 % нейролеммоцитов в периферических нервах, консервированных при температуре жидкого азота (—196 °С). Пересадка криоконсервированных аллонейротрансплантатов в травматические дефекты нервных стволов улучшает результаты пластики, что создает предпосылки для их клинического применения.

Ил. 2. Библиогр.: 4 назв.

УДК 57.043:611.018.51:577.352

Исследование влияния изменений тоничности среды на структуру мембраны цельных эритроцитов в интервале температур от 0 до 37 °С с помощью флуоресцентных зондов / Бабийчук Л. А., Спирин М. М., Белевич Г. В., Бондаренко В. А., Белоус А. М. // Криобиология.— 1986.— № 3.— С. 14—18.

С помощью флуоресцентных зондов (пирен, АНС, ОСП-14, ДСП-12) в суспензии цельных эритроцитов изучали изменения структурного состояния клеточной мембраны, вызванные охлаждением и повышением тоничности среды, и их обратимость. Показано, что изменения температуры и осмолярности среды приводят к пространственной реорганизации белок-липидных комплексов эритроцитарной мембраны.

Ил. 3. Библиогр.: 7 назв.

УДК 57.043.612.115.38

Исследование влияния низких температур на фазовое состояние цитозоля эритроцитов / Нардид О. А., Монсеев В. А., Межидов С. Х. // Криобиология.— 1986.— № 3.— С. 18—20.

Методом ЭПР спинового зонда исследовано фазовое состояние цитозоля эритроцитов при низких температурах. Показано, что после стеклования цитозоля происходят изменения, обусловленные перестройками гидратированных макромолекул гемоглобина и вымораживанием воды, связанной с компонентами клетки, вплоть до -82 °С. Наличие в суспензии эритроцитов глицерина приводит к изменению температуры соответствующих перестроек.

Ил. 1. Табл. 1. Библиогр.: 6 назв.

УДК 577.123 + 591.481.1 + 591.543.42

Синтез РНК в мозге зимоспящих / Гордон Р. Я., Бочарова Л. С., Архипов В. И. // Криобиология. — 1986. — № 3. — С. 20—22.

Изучали влияние холодового оцепенения и возбуждения в момент пробуждения от зимней спячки на включение ^3H -уридина в нуклеотидный пул и РНК в мозге сусликов. Показано, что во время спячки активность нуклеотидного пула уменьшается вдвое, а интенсивность синтеза — в десять раз по сравнению с активными животными. Через 2 ч после пробуждения от спячки объем нуклеотидного пула не увеличивается, а синтез РНК поднимается в шесть раз. Обсуждается роль энергетических факторов и функциональной активности мозга в регуляции синтеза РНК.
Библиогр.: 4 назв.

УДК 617.713—089.843:612.017.1—092.9

Динамика накопления иммуноглобулина G в тканях донора и реципиента при аллотрансплантации криоконсервированной роговицы / Репко О. В. // Криобиология. — 1986. — № 3. — С. 22—25.

Методом иммунолюминесценции с использованием моноспецифических антител к JgG кролика, меченных флюоресцеином изотиоцианатом, установлено, что в раннем послеоперационном периоде при прозрачном приживлении криоконсервированного частичного сквозного аллотрансплантата роговицы уровень содержания JgG повышался более интенсивно в ткани реципиента, чем в структурах трансплантата. Наиболее высокие показатели содержания JgG как в области трансплантата, так и в ткани реципиента определялись через 7—20 сут после кератопластики. Гистологическое исследование показало усиление круглоклеточной и плазмочитарной инфильтрации в области лимба, наиболее выраженное через 7—20 сут после операции.
Табл. 3. Библиогр.: 5 назв.

УДК 612.112.93:612.135 + 612.014.461.3:616—089.583.29—092.4/9

Роль тканевых базофилов дермы в изменении состояния капиллярного русла и водного обмена кожи белых крыс при общей глубокой гипотермии и в постгипотермическом периоде / Мяделец О. Д., Суханов А. Ф. // Криобиология. — 1986. — № 3. — С. 25—29.

При общей глубокой гипотермии в коже наблюдается взаимосвязь между изменениями в популяции тканевых базофилов и динамикой плотности гемокапиллярного русла дермы, активности в нем щелочной фосфомоноэстеразы и содержанием в коже общей воды.
Табл. 3. Библиогр.: 10 назв.

УДК 53.082.4:53.088.23

Оценка погрешности измерения размеров зоны замораживания в криохирургии методом ультразвуковой локации / Войтенко А. И. // Криобиология. — 1986. — № 3. — С. 29—31.

Рассмотрена модельная задача определения размеров зоны замораживания биологической ткани вокруг криохирургического аппликатора при помощи ультразвуковой локации фронта зоны со стороны криоинструмента. С помощью численного решения показано, что для правильного вычисления размеров зоны, согласующихся с экспериментом, необходимо учитывать температурную зависимость скорости ультразвука в среде.
Ил. 1. Библиогр.: 5 назв.

УДК 57.043:612.111:548:537533.35

Изучение вне- и внутриклеточной кристаллизации в эритроцитах человека при различных условиях охлаждения / Репин Н. В. // Криобиология. — 1986. — № 3. — С. 31—36.

Проведено электронно-микроскопическое изучение роли вне- и внутриклеточной кристаллизации в повреждении эритроцитов человека при различных режимах охлаждения. Показано, что для всех режимов замораживания отсутствие криопротектора в клеточной суспензии приводило к захвату клеток кристаллами внеклеточного льда, сжатием их в межкристаллическом пространстве. Отмечено существенное различие в характере взаимодействия кристаллов льда с клетками при быстром и медленном замораживании в присутствии криопротектора. Показано, что неоднородное деформирующее сжатие клеток кристаллами внеклеточного льда является повреждающим фактором быстрого замораживания.
Ил. 4. Библиогр.: 9 назв.

УДК 57.043:611.36—076.4

Ультраструктурный анализ методом замораживания-замещения деструкции ткани печени при локальном замораживании / Капрельянц А. С., Марченко Л. Н., Матяш И. П. // Криобиология.— 1986.— № 3.— С. 36—39.

С помощью метода трансмиссионной электронной микроскопии изучена локализация льда в ткани печени в замороженном состоянии, а также субклеточных структур печени после отогрева. Показаны особенности криодеструкции микрососудистого русла печени. Обнаружены механизмы развития криоповреждения ткани.

Ил. 5. Библиогр.: 5 назв.

УДК 612.11/12

Исследование действия высокого давления и температуры на биологические объекты / Павленко Р. А., Куденко Ю. А. // Криобиология.— 1986.— № 3.— С. 39—41.

Показана перспективность использования комбинированного действия высокого давления и температуры ниже 0 °С, соответствующей жидкофазному состоянию плазмы, для разработки методов хранения клеток крови, тканей и других биологических объектов.

Ил. 1. Табл. 3. Библиогр.: 8 назв.

УДК 57.043

Кассетная система для хранения микроорганизмов в жидком азоте в хранилищах ХБ-0,5 / Сидякина Т. М., Тараканчиков А. И., Чумакова М. Ю. // Криобиология.— 1986.— № 3.— С. 42—43.

Описывается эффективная кассетная система с держателями стеклянных и пластмассовых ампул объемом 2 мл для хранения микроорганизмов в жидком азоте. Использование разработанной кассетной системы позволяет увеличить возможное число хранящихся культур.

Ил. 3. Табл. 1.

ABSTRACTS

UDC 57.043

Genetic effects of hypothermia / Afonkin S. Yu., Kalinina L. V. // Kriobiologiya.— 1986.— N 3.— P. 3—6.

Dividing cells of *Amoeba proteus* of the *War* strain were transferred from 25 to 4 °C for 4 hr, as a result the division and karyokinesis stopped in 36.6 % cases. When amoebae were transferred back to 25 °C two-thirds' cells with suppressed karyokinesis gave clones. The content of DNA in these cells was two times larger than in control cells. Sharp increase in temperature of the division medium is shown to induce polyploidization in most of cells. Low temperature may cause genetic changes in eucaryotic cells. Natural polyploidization due to low temperatures and its biological significance are discussed.

1 fig. Refs.: 11 titles

UDC 612.46:615.361.014.41

Nonperfusional hypothermic renal preservation using cryoprotectants / Kirpatovsky V. I., Zhukauskas G. Yu., Iglyavichute Ya. S., Onishchenko N. A. // Kriobiologiya.— 1986.— N 3.— P. 6—11.

Cryoprotectant dimethylsulfoxide (DMSO) in a 0.1 % concentration added to the NIITiO-2 preservation solution or injected to donors in a dose of 0.5 g/kg 3 hr before the experiment appeared to increase survival of dogs subjected to autotransplantation of kidneys stored for 24 hr at 4 °C without perfusion up to 75 and 67 %, respectively, with the energy state of stored kidneys and the barrier function of cellular membranes being better preserved. The favourable effect of DMSO seems to be realized through modification of cellular membranes and induction of nonspecific changes in the cell metabolism.

2 figs. 3 tables. Refs.: 10 titles

UDC 57.043:616.833 -089.845

Cryopreservation of peripheral nerves and the results of experimental alloneuroplasty of nerve trunk gaps / Chaykovsky Yu. B., Yatsenko V. P., Kogut G. I., Galich S. P. / Kriobiologiya.— 1986.— N 3.— P. 11—14.

Preliminary administration of solution containing dimethylsulfoxide and cytomembrane stabilizers into nerve trunks followed by incubation of grafts in a cryopreservation medium with glycerol and stabilizers provides for more than 70 % viability of neurolemmocytes of peripheral nerves stored at -196°C . Transplantation of cryopreserved alloneurografts into nerve trunk gaps improves the results of plasty, thus making it useful for clinical application.

2 fig. Refs.: 4 titles

UDC 57.043:611.018.51:577.352

Investigation of the effect of changing the medium tonicity on the membrane structure of intact erythrocytes in the temperature range of 0 to 37°C using fluorescent probes / Babiychuk L. A., Spirin M. M., Belevich G. V., Bondarenko V. A., Belous A. M. // Kriobiologiya.— 1986.— N 3.— P. 14—18.

Structural changes in cellular membranes caused by cooling and increasing the medium tonicity and their reversibility were studied in suspensions of intact erythrocytes using fluorescent probes, namely pyrene, ANS, OSP-14, and DSP-12. Changes in temperature and osmolarity were shown to induce spatial reorganization of protein-lipid complexes of the erythrocyte membrane.

3 figs. Refs.: 7 titles

UDC 57.043.612.115.38

Investigation of the effect of low temperature on the phase state of erythrocyte cytosol / Nardid O. A., Moiseyev V. A., Mezhydov S. Kh. // Kriobiologiya.— 1986.— N 3.— P. 18—20.

The phase state of erythrocyte cytosol at low temperatures was studied using spin probe EPR. After the cytosol vitrification alterations were shown to occur down to -82°C due to reconstructions of hydrated haemoglobin macromolecules and freezing-out of water bound to cellular components. Temperature at which reconstructions took place depended on the presence of glycerol in erythrocyte suspensions.

1 fig. 1 table. Refs.: 6 titles

UDC 577.123 + 591.481.1 + 591.543.42

Synthesis of RNA in hibernator brain / Gordon R. Ya., Bocharova L. S., Arkhipov V. I. // Kriobiologiya.— 1986.— N 3.— P. 20—22.

The effect of cold torpor and excitement during arousal on the incorporation of ^3H uridine into the nucleotide pool and RNA of ground squirrel brain was studied. During hibernation the nucleotide activity was shown to decrease two-fold and the RNA synthesis was ten times smaller than in active animals. Two hours after arousal the nucleotide pool remained unchanged and the RNA synthesis increased six-fold. The role of energetic factors and brain functional activity in the regulation of RNA synthesis is discussed.

Refs.: 4 titles

UDC 617.713—089.843:612.017.1—092.9

The dynamics of accumulation of immunoglobuline G in donor and recipient tissues upon cryopreserved cornea allotransplantation / Repko O. V. // Kriobiologiya.— 1986.— N 3.— P. 22—25.

As shown by the method of immunoluminescence using monospecific antibodies to rabbit IgG labelled with fluoresceine isoacetate, the content of IgG in the recipient tissue increased to a greater extent than in the graft immediately after operation in cases of transparent taking of cryopreserved continuous partial corneal allograft. The highest contents of IgG both in the graft region and in the recipient tissue were found in 7 to 20 days after keratoplasty. Histologic analysis demonstrated intensification of infiltration of round cells and plasmocytes into the limb region which was pronounced in 7 to 20 days after operation.

3 tables. Refs.: 5 titles

UDC 612.112.93:612.135 + 612.014.461.3:616—089.583.29—092.4/9

The role of derm tissue basophils in changing the state of capillary bed and water exchange in skin of white rats subjected to deep hypothermia and in the post-hypothermia period / Myadelets O. D., Sukhanov A. F. // Kriobiologiya.— 1986.— N 3.— P. 25—29.

Interrelationships between changes in the population of tissue basophils, the dynamics of derm hemocapillary bed density, the activity of alkaline phosphomonoesterase, and the content of water were observed in white rat skin under deep hypothermia.

3 tables. Refs.: 10 titles

UDC 53.082.4:53.088.23

Estimation of the freezing zone measurement error in cryosurgery by the method of ultrasonic location / Voytenko A. I. // Kriobiologiya.— 1986.— N 3.— P. 29—31.

A model problem dealing with measuring the frozen zone dimensions in biological tissue around a cryoprobe by the method of ultrasonic location of the zone front at the side of cryoprobe is considered. It has been shown numerically that for correct calculation of the frozen zone dimensions which are in agreement with the experimental data the temperature dependence of the ultrasonic velocity in the medium should be taken into account.

1 fig. Refs.: 5 titles

UDC 57.043:612.111:548:537 533.35

Investigation of extracellular and intracellular crystallization in human erythrocytes using various cooling regimens / Repin N. V. // Kriobiologiya.— 1986.— N 3.— P. 31—36.

The role of extracellular and intracellular crystallization in injury of human erythrocytes under different cooling conditions was studied using electron microscopy. Uptake of cells by extracellular ice crystals and their compression were observed in cell suspensions frozen without cryoprotectants by all the freezing regimens used. A marked difference in the character of interactions between ice crystals and cells upon rapid and slow freezing in the presence of cryoprotectant was noted. Heterogeneous deforming compression of cells by extracellular ice crystals was shown to be a cause of injury upon rapid freezing.

4 figs. Refs.: 9 titles

UDC 57.043:611.36—076.4

Ultrastructural analysis of liver destruction using freeze-substitution upon cryoapplication / Kaprelyants A. S., Marchenko L. N., Matyash I. P. // Kriobiologiya.— 1986.— N 3.— P. 36—39.

The localization of ice in frozen liver tissue as well as subcellular liver structures after thawing were studied using transmission electron microscopy. Peculiarities of cryodestruction of the hepatic microvessel bed are shown. Mechanisms of the development of tissue cryoinjury are suggested.

5 figs. Refs.: 5 titles

UDC 612.11/12

Investigation of the effect of high pressure and temperature on biological systems / Pavlenko R. A., Kudenko Yu. A. // Kriobiologiya.— 1986.— N 3.— P. 39—41.

The perspectivity of using a complex action of high pressure and subzero temperature corresponding to the liquid-phase plasma state for developing methods of preservation of blood cells, tissues and other biological systems is shown.

1 fig. 3 tables. Refs.: 8 titles

UDC 57.043

A cassette unit for storage of microorganisms in liquid nitrogen refrigerators KH-B-0.5 / Sidiyakina T. M., Tarakanchikov A. I., Chumakova M. Yu. // Kriobiologiya.— 1986.— N 3.— P. 42—43.

An effective cassette unit with holders for 2 ml glass or plastic ampoules for storage of microorganisms in liquid nitrogen is described. The unit provides for a large number of cultures to be stored.

3 figs. 1 table

66 121

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

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

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

Выписывайте журнал «Криобиология»!

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

Издательство «НАУКОВА ДУМКА»

Управление «СОЮЗПЕЧАТЬ» Министерства связи УССР

Наукова думка

Криобиология. — 1986. — № 3. — С. 1 — 56