ISSN 0130-26

# КРИОБИОЛОГИЯ И КРИОМЕДИЦИНА



7

1980

Матеріал, захищений авторським правом



Матеріал, захищений авторським правом

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ И КРИОМЕДИЦИНЫ

# КРИОБИОЛОГИЯ И КРИОМЕДИЦИНА

РЕСПУБЛИКАНСКИЙ МЕЖВЕДОМСТВЕННЫЙ СБОРНИК

Основан в 1975 г.

ВЫПУСК
7

КИЕВ «НАУКОВА ДУМКА» 1980

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043

В сборнике приведены результаты исследований по механизмам криоповреждений и криозащиты биологических структур различного уровня организации. Освещены проблемы холодового анабиоза, теоретические и практические вопросы криоконсервирования клеток и тканей с применением разных криопротекторов. Изложены данные по использованию холодового метода лечения в различных областях медицины и экспериментальной биологии.

Для широкого круга биологов и медиков, работников сельского хозяйства, а также специалистов, работающих в области криобиологии и криомедицины.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

Редакция межведомственных сборников

К $\frac{50500\text{-}424}{M221(04)\text{-}80}$ 465-80 4106000000

© Издательство «Наукова думка», 1980

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57:536.48.047

*Л. К. Лозина-Лозинский*

# МУЛЬТИФАКТОРНАЯ ТЕОРИЯ КРИОПОВРЕЖДЕНИЙ

В криобиологии широко распространено предположение о том, что клетки при охлаждении повреждаются либо в результате внутриклеточного замерзания воды, либо под воздействием кристаллов льда, образующихся вне клетки. При замерзании среды в определенных условиях охлаждения клетка теряет воду, избегая внутриклеточной кристаллизации, может быть повреждена в результате дегидратации, осмотического шока, потери некоторых веществ. При внутриклеточной кристаллизации воды могут протекать те же процессы, повреждающие мембраны и другие микроструктуры. Эти альтерации возникают во время замораживания или в связи с рекристаллизацией во время отогревания, но на фоне предыдущих изменений в клетке.

Для понимания причин криоповреждений недостаточно изучать только процессы, происходящие, согласно двухфакторной теории Мазура и др. [9], во время внеклеточного или внутриклеточного образования льда. Разделить действие обоих повреждающих факторов не всегда возможно, поскольку после замерзания среды и влияния кристаллов льда на клетку при некоторых условиях наступает внутриклеточная кристаллизация воды. Двухфакторная теория повреждения уделяет недостаточное внимание специфичности реагирования на низкие температуры различных живых объектов в связи с их генотипическими и фенотипическими особенностями, способностью адаптироваться и образовывать защитные вещества.

В некоторых клетках криоповреждения возникают под влиянием быстрого перепада температур или длительного медленного охлаждения до замерзания и продолжительного действия консервирующей температуры.

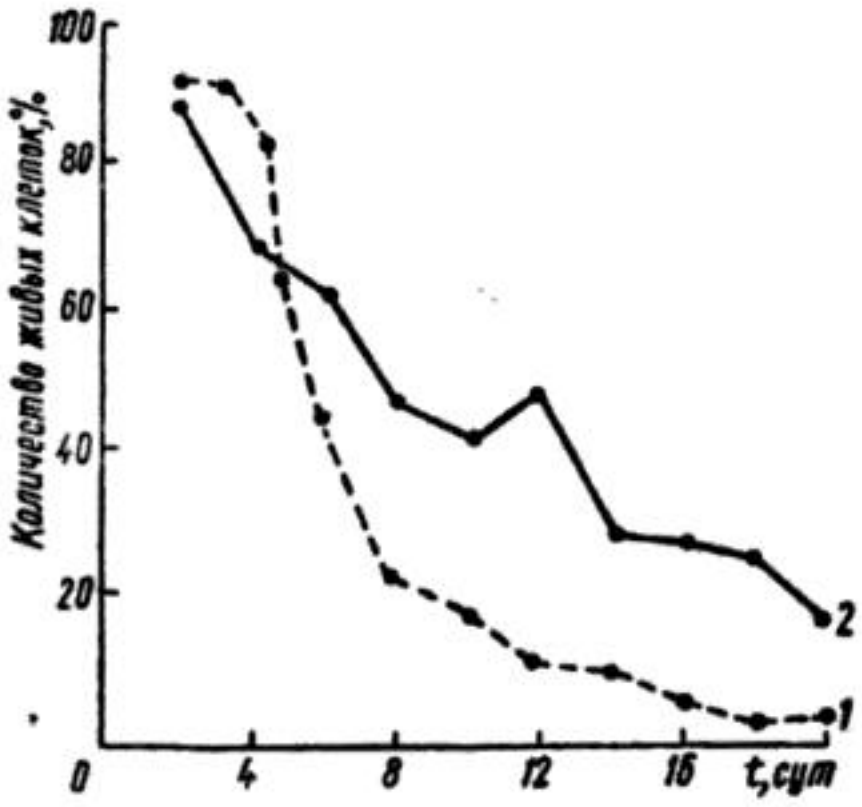
Двухфазная гипотеза криоповреждений проверялась Мазуром и сотр. на дрожжах и, по их мнению, применима и для других клеток. Экспериментальные данные, полученные Прибором [10] на эритроцитах человека, противоречат двухфакторной теории повреждения. Он указывает на то, что повреждаемость усиливается при увеличении времени нахождения клеток при температурах ниже 0° С в замерзшем состоянии, а также от других факторов. В связи с этим Прибор предложил мультифакторную теорию криоповреждений, основанную на взаимодействии защитных агентов и клеточных мембран и физических факторов. Он обратил внимание на то, что одни холодовые воздействия вызывают обратимые изменения в мембранах, другие — необратимые повреждения. Это зависит от типа клеточной мембраны и физических свойств повреждающих факторов.

Н. С. Пушкарь и сотр. [8] указали на то, что двухфакторная теория не объясняет роль отогревания и оттаивания в повреждении клетки. Помимо факторов, вызывающих замерзание среды и биологического объекта, многие организмы и их клетки повреждаются низкими темпе-



Матеріал, захищений авторським правом

ратурами как таковыми. Особенно опасным бывает переохлаждение, экологическая роль которого огромна. Так, зимовка многих беспозвоночных животных и даже позвоночных, а также рыб при отрицательных температурах в океане происходит в переохлажденном состоянии. Неадаптированные формы организмов, клетки животных на некоторых стадиях развития особенно чувствительны к переохлаждению [4]. Иногда переохлаждение воздействует на клетки сильнее, чем замерзание.




Изменение количества живых клеток Endomyces magnusii в зависимости от длительности охлаждения в переохлажденных (*1*) и замороженных (*2*) суспензиях [6].

На том же объекте (дрожжах), на котором Мазур [9] обосновал двухфакторную теорию криоповреждений, нами [6] показано, что в состоянии переохлаждения клетки Endomyces magnusii при —15°С повреждаются сильнее, чем тогда, когда они замерзают при —15° С и прочих равных условиях (рисунок). Число поврежденных клеток E. magnusii в переохлажденном состоянии растет значительно быстрее, чем в замерзшей суспензии. Клетки, взятые из замерзших суспензий, на протяжении многих дней сохраняют более высокую активность роста по сравнению с клетками, которые перенесли переохлаждение.

О том, что переохлаждение играет видную роль в повреждении различных клеток, свидетельствуют многочисленные данные [4]. Так, у инфузорий, яиц морского ежа и других объектов при переохлаждении происходит набухание клеток, которое кончается разрывом оболочки и вытеканием цитоплазмы. Факторами, препятствующими этим криоповреждениям, могут быть адаптация к холоду и повышенная концентрация некоторых солей, например хлористого кальция, в наших опытах [4]. Есть все основания считать, что при переохлаждении повреждается наружная мембрана клетки, увеличивается ее проницаемость для воды. У эритроцитов грызунов в результате переохлаждения происходит выход гемоглобина, который значительно выше у незимоспящих грызунов, чем у зимоспящих [2].

Под влиянием переохлаждения разрушаются хлоропласты эвглен [5] и некоторых высших растений [3], у которых они округляются, набухают и обесцвечиваются. Интересно отметить, что у таких клеток, как фибробласты и гистиоциты кроликов, в переохлажденном до —10° С состоянии происходит не набухание, а сжатие и уменьшение объема [1].

Явления холодового шока также не связаны с замерзанием среды или клетки, а вызываются резким перепадом температуры от оптимальной до максимального переохлаждения и нарушением функции мембран [7]. Поэтому выбор программы криоконсервации во многом зависит от чувствительности клеток к охлаждению до начала процесса замерзания.

Клетки, подвергающиеся охлаждению, испытывают большой комплекс воздействий, о чем можно судить по термограмме, на которой показана скорость охлаждения объекта до замерзания, время кристаллизации основной массы воды и скорость охлаждения до окончательной температуры. На каждом этапе клетки испытывают специфические нарушения в состоянии мембран и других микроструктур. В результате происходит наслаивание одних альтераций на другие и накопление повреждения. Изменение последовательности хода клеточных альте-



Матеріал, захищений авторським правом

раций может привести к повышению клеточной устойчивости, например при двухэтапном охлаждении, когда сначала действуют одни скорости охлаждения — до умеренно низкой температуры, а затем более высокие — до температуры, стабилизирующей клетку. Следовательно, сама система охлаждения — один из факторов, влияющих на состояние клетки.

Особенностью действия низких температур, в отличие от высоких, является специфичность реакции биологических объектов на те или иные участки температурной шкалы Кельвина. Прежде всего это можно обнаружить при сравнении действия низких и ультранизких температур. Наибольшая повреждаемость внеклеточной ДНК, фагов и одноклеточных организмов УФ-лучами ($\alpha$=254 нм) обнаружена при —78° С и значительно меньшая — при —30° С [4]. Нередко наиболее устойчивое состояние живых клеток наблюдается при —196° С и ниже. При этой температуре ДНК и живые объекты лучше переносят ультрафиолетовую и ионизирующую радиацию, чем при более высоких температурах. В этих условиях глубокого охлаждения, когда достигается настоящий анабиоз, т. е. полное прекращение метаболизма в клетке, отсутствуют факторы, нарушающие физиологические изменения. Вместе с тем при температурах ниже —180° С могут протекать особые физические процессы и, по современным данным, химические реакции, которые подчиняются законам квантовой механики [11].

Известно, что некоторые живые объекты, например эритроциты, теряют жизнеспособность при длительном хранении, так же как некоторые ферменты, в условиях глубокого холода. Мы предполагаем, что это связано с чисто физическими изменениями на молекулярном и субмолекулярном уровнях, но не с протеканием биологических процессов в клетке. Другим примером физических повреждений может служить выделение пузырьков газа во время отогревания клеток после быстрого замораживания с образованием в них мелкокристаллической структуры. В результате роста и слияния пузырьков газа происходит разрыв клеток и целых организмов [4]. Такое выделение газов под влиянием кристаллизации воды происходит и в небиологических объектах.

Прибор [10] справедливо указал на особую роль фактора времени, не учитываемого двухфакторной теорией криоповреждения. Время экспозиции при низких температурах модифицирует повреждения на всех этапах охлаждения-отогревания. Главная задача криоконсервации заключается в том, чтобы сократить время действия повреждающих факторов до наступления консервирующей температуры. Наши опыты с амебой (Amoeba proteus) показали, что главной причиной ее повреждения являются не глубина охлаждения в пределах до —60° С и скорость охлаждения, а продолжительность пребывания при температурах ниже 0° С. Например, под защитой 15%-ного ПЭО-4000 минутную экспозицию при —10 и —35° С в замерзшей суспензии выдерживает примерно одинаковое количество амеб: соответственно 51 и 48%. Это можно объяснить лишь тем, что продолжительность охлаждения от исходной температуры 20° до окончательной —10° при скорости охлаждения 0,4° С/мин равнялась 70 мин, а до окончательной (—35° С) при скорости 5° С/мин — всего 10 мин. Повышением скорости охлаждения, однако, добиться криоконсервации амеб не удалось (неопубликованные данные).

Реакции свободноживущих простейших на охлаждение и замораживание многообразны, и до сих пор не ясно, на каком этапе охлаждения возникают необратимые криоповреждения. При быстром охлаждении можно понизить повреждающее действие переохлаждения и дегидратации в случае замерзания среды, но когда в ней образуется лед, кристаллы быстро возникают внутри клетки простейших. Это очень важный фактор повреждения, однако в некоторых опытах инфузории



Матеріал, захищений авторським правом

и амебы (A. proteus) после оттаивания некоторое время оставались живыми, но затем у них наступал лизис [4]. Возможно, что повреждение возникло при отогревании.

При изучении криоповреждений приходится учитывать весь сложный комплекс процессов, происходящих при понижении температуры и фазовых переходах. Этот комплекс может быть выявлен лишь на основании признания мультифакторной теории криоповреждений. С позиций этой теории необходимо дальнейшее изучение причин, вызывающих криоповреждения, на основе того, что в течение всего процесса охлаждения-отогревания происходит смена факторов, воздействующих на клетку, роль которых различна и специфична. Выявление повреждающих факторов следует проводить на клетках оргазнимов, отличающихся по своей биологии, чтобы в итоге можно было моделировать их реакции и классифицировать типы криоповреждений и комплексы повреждающих факторов.


1. *Вольфензол Л. Г.* Влияние низких температур на клетки рыхлой соединительной ткани кроликов. I. Изменение размеров фибробластов и гистиоцитов. — В кн.: Реакция клеток на экстремальные воздействия. М.; Л., 1963. с. 66—74.
2. *Вольфензол Л. Г., Кесаманлы Н. В., Филов В. А., Андреева Е. В., Лозин-Лозинская Ф. Л.* Сравнительная устойчивость тканей некоторых зимоспящих и незимоспящих грызунов к охлаждению и переохлаждению. — В кн: Клетка и температура среды : Тр. Междунар. симпоз. по цитоэкологии. Л. : Наука, 1964. с. 88—89.
3. *Кислюк И. М.* Морфологические и функциональные изменения хлоропластов при охлаждении листьев Cucumis sativus L. — В кн.: Клетка и температура среды : Тр. Междунар. симпоз. по цитоэкологии. Л. : Наука, 1964, с. 47—49.
4. *Лозина-Лозинский Л. К.* Очерки по криобиологии. — Л. : Наука, 1972. — 288 с.
5. *Лозина-Лозинский Л. К., Заар Э. И.* Получение бесцветных клеток Euglena gracils кратковременным воздействием высоких и низких температур. — Цитология, 1961, 3, № 1, с. 103—105.
6. *Лозина-Лозинский Л. К., Румянцева В. М.* Сравнительное исследование действия переохлаждения и замораживания на дрожжевые клетки. — Цитология, 1978, 20, № 1, с. 74—79.
7. *Осташко Ф. И.* Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей. — Киев : Колос, 1968. — 248 с.
8. *Пушкарь Н. С., Белоус А. М., Иткин Ю. А., Вишневский В. И., Розанов Л. Ф.* Низкотемпературная кристаллизация в биологических системах. — Киев : Наук. думка, 1976. — 243 с.
9. *Mazur P., Leibo S. P., Chu E. H. V.* A two-factor hypothesis of freezing injury. — Exp. Cell. Res., 1972, **71**, p. 345—355.
10. *Pribor D. B.* Biological interaction between cell membranes and glycerol or DMSO.— Cryobiology, 1975, **12**, N 4, p. 309—320.
11. *Pullman B., Pullman A.* Quantum biochemistry. — New York; London, 1963. — 260 p.



Институт цитологии АН СССР



Поступила в редколлегию
10. 02. 79



УДК 57.536.48.047



***А. М. Голдовский***


## О СОСТОЯНИЯХ ОРГАНИЗМОВ НА СТАДИЯХ АНАБИОЗА

Организмы (их органы, ткани, клетки) могут находиться в разнообразных состояниях — от наибольшей интенсивности жизненных процессов при активной жизнедеятельности (биоз), ограничения и замедления этих процессов (гипобиоз) до их обратимого прекращения при анабиозе. При этом между гипобиозом и анабиозом имеется ряд промежуточных состояний (мезабиоз), ранее в биологии не учитывавшихся и впервые выделенных автором настоящей статьи [1, 2] как объект специального биологического исследования.

Согласно разработанной нами [5] классификации по основному признаку — наличию или отсутствию сочетания ассимиляции и диссимиляции, лежащего в основе жизнедеятельности, можно разграничи-




Матеріал, захищений авторським правом

вать соответственно состояния жизнедеятельные (гипербиоз, биоз, гипобиоз) и нежизнедеятельные (мезабиоз, анабиоз). В пределы этих групп входят разнообразные естественные и искусственно создаваемые состояния, различаемые в отдельных областях биологических и медицинских наук по другим, более частным признакам.

Многие состояния организмов связаны с их высыханием, поэтому представляется необходимым выделить новую область биологии, предметом которой должно быть рассмотрение состояний организмов при содержаниях воды в них ниже уровня, необходимого для активной жизнедеятельности. Эту область биологических наук можно назвать ксеробиологией (греч. xeros — сухой) аналогично криобиологии (kryos — холод), которую можно определить как науку, занимающуюся изучением состояний организмов при температурах ниже оптимальных для активной жизнедеятельности.

Разрабатываемое нами учение о состояниях организмов [5] составляет систему теоретических представлений, охватывающую весь «спектр» состояний организмов — от активной жизнедеятельности до анабиоза, и среди них состояния, устанавливающиеся при высыхании, охлаждении или при их сочетании. Таким образом, учение о состояниях организмов — теоретическая основа для ксеробиологии и криобиологии.

Одно из главных положений учения о состояниях организмов — представление о том, что основой процесса жизнедеятельности является взаимодействие жизнеспособных структур с водой [5]. Это иллюстрируется, например, переходом от анабиоза к жизнедеятельности при увлажнении (например, возвращение к движению и активной жизни высохшей тихоходки при смачивании водой или прорастание семян при набухании). Чем больше содержание свободной воды в клетках, тем интенсивнее и полнее жизнедеятельность. Например, развитие побега и цветка из покоящейся почки происходит при увеличении содержания воды в тканях. И, наоборот, понижение содержания свободной воды приводит к снижению и — за определенными пределами — прекращению жизнедеятельности. Таким образом, переход к гипобиозу и анабиозу при высушивании объясняется удалением воды из клеток, при охлаждении — связыванием воды в формах, подобных льду, или в других (наряду со снижением интенсивности химических процессов при понижении температуры), при сочетании высушивания и охлаждения — обоими явлениями. Во всех этих случаях так или иначе происходит выделение свободной, биологически активной воды при взаимодействии с жизнеспособными структурами.

Второе важное положение учения о состояниях организмов — представление о «безводном» строении жизнеспособных структур. По-видимому, в строение самых жизнеспособных структур вода не входит или входит в незначительном количестве [5, 6]. На это указывает возможность глубокого высыхания многих организмов без потери их жизнеспособности, т. е. способности возвратиться к жизнедеятельности при повышении содержания воды до необходимых величин и других благоприятных условиях. Многочисленные данные по этому вопросу приведены в других наших работах, в частности, были отмечены минимальные содержания воды для сухих микробных культур (0,4—1,5%), лишайников — около 2%, семян растений — до 1% (для некоторых видов даже до 0,4%). Здесь только упомянем данные из недавно опубликованных работ. В одной из них [10] изучалось несколько препаратов цист эмбрионов (покоящихся яиц) ракообразного Artemia salina, высушенных над сернокислым кальцием и сохранивших жизнеспособность. При этом содержание «остаточной воды» в цистах составило 1,37—1,73% (среднее 1,58), в их оболочках 0,58—0,96 (среднее 0,79) и в самих эмбрионах 1,56—1,93% (среднее 1,78%) сухой массы. В дру-



Матеріал, захищений авторським правом

гих работах [12, 13] показана возможность высушивания тихоходок Macrobiotus areolatus и нематод Aphelenchus avenae до содержания воды 2—3%. Наконец, недавно доказана [15] возможность глубокой лиофильной сушки спермы быка, в частности, до содержания воды 7—0% с сохранением оплодотворяющей способности сперматозоидов соответственно в 2 из 14 и в 1 из 3 опытов искусственного осеменения (опыты по сушке до 0% авторы предполагают еще продолжить).

Многие авторы считают воду неотъемлемой частью структур клеток (см., например, [9]). В связи с этим обсуждается [11] необходимость сохранения некоторых количеств воды для поддержания биологически активной конформации молекул биополимеров клеток. Для разъяснения этого вопроса принципиально важным являются некоторые факты, относящиеся к вирусам. Так, длительное хранение вирусов без потери их свойств лучше всего обеспечивается при содержании воды меньше 1%. Отмечаются минимальные влажности препаратов вирусов некоторых видов, достигаемые без потери их свойств, в одном случае до 0,03—0,04%, в других — до 0,15 и 0,21% [8]. Следовательно, структура биополимеров и нуклеиновых кислот вирусов, определяющая их биологические свойства, сохраняется при таком обезвоживании.

Таким образом, гибель клеток некоторых организмов при глубоком высушивании, по-видимому, является результатом неблагоприятных побочных процессов, повреждающих структуры, но не следствием прямого разрушения структур из-за отнятия воды. По-видимому, можно избежать таких побочных процессов. Для этого, разумеется, имеет значение способ удаления влаги. Так, например, в упомянутых опытах [12, 13] с тихоходками и нематодами быстрое высыхание в сухом воздухе приводило к их гибели. Между тем такие организмы, вначале высыхавшие при высокой относительной влажности воздуха, в результате чего содержание воды в них составило около 30%, могут быть затем перенесены в более сухой воздух так, что содержание воды снижалось, как отмечено до 2—3% при сохранении жизнеспособности.

В приведенном выше примере полного (или почти полного) высушивания сперматозоидов — половых клеток, совершенно неприспособленных к анабиозу в природных условиях, это достигалось путем сложной и длительной процедуры, состоящей из нескольких этапов [15]: вначале сперма, разбавленная в среде специально подобранного состава, охлаждалась до 5° С в течение 5 ч и замораживалась на твердой углекислоте в гранулах, которые затем сохраняли в жидком азоте. В дальнейшем гранулы подвергали лиофильной сушке в вакуумной камере в течение 6 сут при —50° С и остаточном давлении от 10 до 30 тысячным мм рт. ст.; температура конденсатора, охлаждаемого жидким азотом, составляла —196° С. В результате сушки содержание воды снижалось до 7%. После того как температура высушенной спермы за 2 сут повысилась от —50 до 20° С, сперма дополнительно подвергалась сушке на той же вакуум-установке при 20° С в течение еще 2 сут, причем влажность, по расчетам авторов, упала примерно до 0%.

Третье положение учения о состояниях организмов — представление о том, что свойство жизнеспособных структур изменять интенсивность их функционирования вплоть до его приостановки, т. е. переходить к анабиозу, и снова возвращаться к функционированию (жизнедеятельности) является их первичным и неотъемлемым свойством еще со времени возникновения указанных структур. Это представление, высказанное автором данной статьи в других работах [3—6], совпадает с соображениями Х. Хинтона [14] и мнением Л. К. Лозина-Лозинского о том, что способность к анабиозу относится к первичным свойствам жизни [7].

В основе указанного свойства жизнеспособных структур лежит способность их гелевого скелета терять воду при высыхании (или перено-



Матеріал, захищений авторським правом

сить превращение содержащейся воды в формы, подобные льду) и, наоборот, набухать до максимума без нарушения целостности скелета. Это свойство сохраняется и проявляется в тех организмах и их зародышах, в которых строение клеток приспособлено к деформациям при высыхании или глубоком охлаждении.

Изменения, происшедшие при возникновении клеточного строения и последующей дифференцировке клеток в ходе образования специализированных тканей и органов, наложились на первичное строение цитоплазмы, которая сама по себе была способна к анабиозу. Эти изменения приводят к тому, что клетки отдельных органов в природных условиях уже не могут переходить к анабиозу при глубоком высыхании и охлаждении из-за механических деформаций измененного внутриклеточного содержимого. Следует подчеркнуть, что в искусственно создаваемых условиях становится возможным анабиоз даже таких клеток, которые ввиду возникшей в ходе эволюции крайней специализации по характеру выполняемых функций в обычных условиях развития никогда не претерпевают анабиоз. Например, половые клетки — сперматозоиды млекопитающих, сравнительно давно удается приводить в анабиоз при глубоком охлаждении. После многих попыток в последние годы достигнут перевод в анабиоз сперматозоидов быка путем многоэтапной специальной подготовки и глубокой лиофильной сушки, о чем уже сказано выше. Итак, способность переходить в состояние анабиоза является общим, хотя в природных условиях не во всех организмах реализуемым, свойством жизнеспособных структур. Таким образом, представляется вполне перспективной работа по использованию «первичной» способности перехода к анабиозу путем создания условий, которые не дали бы возможности резко проявляться новым специфичным свойствам клеток, наслоившимся в ходе эволюции и подавляющим первичную способность к анабиозу, мешающим ее проявлению.

Как известно, анабиоз высшего организма в целом в природных условиях становится невозможным не только из-за трудностей перехода в анабиоз отдельных клеток, но и дополнительных (вероятно, еще больших) трудностей из-за нарушения связей между отдельными органами. На это указывает возможность более глубокого высушивания и охлаждения изолированных тканей и органов по сравнению с организмом в целом. В частности, успехи в области криоконсервирования (и, по-видимому, уже близкие успехи по ксероконсервированию) половых клеток связаны и с тем, что эти клетки, покидая родительский организм, на какой-то период становятся автономными.

Решение проблемы искусственного достижения глубокого гипобиоза и даже анабиоза сложных организмов и последующего возвращения к активной жизнедеятельности сводится к разработке такой техники проведения этих операций, при которой бы наряду с сохранением жизнеспособных структур клеток не нарушались и затем восстанавливались связи между отдельными клетками, тканями, органами.


1. *Голдовский А. М.* Теоретические вопросы производства растительных масел. — М.; Л. : Снабтехиздат, 1933. — 64 с.
2. *Голдовский А. М.* Анабиоз и общая проблема жизни. — Журн. общ. биологии, 1963, **24**, № 2, с. 81—97.
3. *Голдовский А. М.* О значении гипобиоза и анабиоза в арогенной эволюции. — В кн: Материалы годич. конф. Ленингр. отд-ния Сов. нац. об-ния истории и философии естествознания и техники. Л., 1970, с. 113—114.
4. *Голдовский А. М.* Учение о состояниях организмов и эволюционная теория. — В кн.: Проблемы эволюции. Новосибирск : Наука, 1975, т. 4, с. 15—23.
5. *Голдовский А. М.* Основы учения о состояниях организмов. — Л. : Наука, 1977. — 116 с.
6. *Голдовский А. М.* Анабиоз и проблема возникновения жизни. — Журн. эволюц. биохимии и физиологии, 1978, **14**, № 6, с. 517—519.
7. *Лозина-Лозинский Л. К.* Эволюционные аспекты анабиоза и гипобиоза. — В кн.:




Матеріал, захищений авторським правом

Науч. конф. Ин-та цитологии АН СССР, посвящ. 15-летию ин-та. Л., 1972, с. 56—57.
8. *Харрис Р.* Консервирование вирусов. — В кн.: Применение замораживания — высушивания в биологии. М.: Изд-во иностр. лит., 1956, с. 273—291.
9. *Burns M. E.* Cryobiology as viewed by the microbiologist. — Cryobiology, 1964, **1**, N 1, p. 18—39.
10. *Clegg J. S.* Interrelationships between water and cellular metabolism in Artemia salina cysts. I. Hydration-Dehydration trom the liquid and vapor phases. — J. Exp. Biol., 1974, **61**, N 2, p. 291—308.
11. *Crówe J. H.* Anhydrobiosis: an unsolved problem. — Amer. Naturalist, 1971, **105**, N 946, p. 563—573.
12. *Crowe J. H.* Evaporative water loss by tardigrades under controlled relative humidities. — Biol. Bull., 1972, **142**, N 3, p. 407—416.
13. *Crowe J. H., Madin K. A. C.* Anhydrobiosis in nematodes: Evaporative water loss and survival. — J. Exp. Zool., 1975, **193**, N 3, p. 323—334.
14. *Hinton H. E.* Reversible suspension of metabolism and the origin of life. — Proc. Roy. Soc., 1968, **171**, N 1022, p. 43—56.
15. *Larson E. V., Graham E. F.* Fertility of freeze-dried bovine spermatozoa. — In.: VIIIth Intern. congr. on animal reprod. and artificial inseminat. Cracow, 1976, p. 822—825.

Ленинградский институт советской торговли имени Ф. Энгельса

Поступила в редколлегию 22. 02. 79

УДК 57.043.591.463.1:612.014.462.2

***И. В. Смирнов***

# ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ГЛУБОКОГО ОХЛАЖДЕНИЯ СПЕРМЫ ЖИВОТНЫХ

Начальным толчком для бурного развития криобиологии послужили проводившиеся в сороковых — пятидесятых годах текущего столетия опыты по глубокому охлаждению спермы сельскохозяйственных животных. Поскольку главная цель этих опытов — разработка методов длительного хранения половых клеток для искусственного осеменения самок, можно считать, что в те годы возникло одно из наиболее перспективных направлений в криобиологии, которое можно назвать технологической криобиологией.

Впервые потомство животных (кроликов), осемененных спермой, перенесшей охлаждение до температур от —78 до —196° С, было получено автором настоящей статьи в 1947 г.; в 1950—1951 гг. таким способом были получены первые ягнята и телята. В настоящее время длительное хранение спермы быков в жидком азоте широко применяется во многих странах мира. Только на Украине в 1977 г. замороженной спермой осеменено около 75% коров. Успешно разрабатываются методы замораживания спермы баранов, хряков и жеребцов.

Тем не менее техника глубокого охлаждения спермы еще далека от совершенства. В производственных условиях около половины спермиев погибает в процессе обработки, хранения и оттаивания. Правда, спермии, оставшиеся в живых, сохраняют биологическую полноценность, доказательством чему является достаточно высокая оплодотворяющая способность и сохранение генетических свойств. Однако потеря значительного числа носителей ценнейшей наследственной информации наносит несомненный ущерб племенному делу и заставляет искать пути дальнейшего совершенствования методов замораживания и оттаивания спермы.

Для этого необходима, прежде всего, глубокая разработка теоретических основ длительного хранения спермы (и других биологических объектов). Как это ни парадоксально, общей теории глубокого охлаждения до сих пор нет. Методы замораживания разрабатывались, в основном, эмпирическим путем или на основе разрозненных, единичных теоретических предпосылок.



Матеріал, захищений авторським правом

В сороковых годах среди немногочисленных тогда ученых-криобиологов считалась общепринятой гипотеза Б. Лайета [8] о возможности витрификации биологических объектов. Согласно этой гипотезе, главная причина гибели клеток при замораживании — переход воды в твердое кристаллическое состояние. Кристаллы льда разрушают структуру протоплазмы; кроме того, вымерзание воды приводит к обезвоживанию и денатурации белков. При медленном охлаждении клетки могут погибать под действием гипертонических растворов сахаров и солей плазмы спермы (или крови), образующихся при частичном вымерзании воды.

Образование и рост кристаллов льда происходит особенно интенсивно в температурном интервале от 0 до —40 — —50° С (предположительно), а затем скорость кристаллизационных процессов падает. Поэтому следует охлаждать малые объемы спермы возможно быстрее, чтобы «проскочить» опасную температурную зону и достичь зоны витрификации, где протоплазма клеток затвердевает как единое целое, без нарушения ее структуры, вызываемого дегидратацией белков и образованием кристаллического льда. Витрифицированные объекты необходимо оттаивать с возможно большей скоростью, чтобы избежать рекристаллизации (девитрификации) в упомянутой опасной температурной зоне.

В начале пятидесятых годов Полдж, Роусон, Смит и др. предложили метод относительно медленного охлаждения спермы разбавленной средой с глицерином. Применение глицерина усложняет процессы, происходящие при замерзании спермы, в частности, способствует ее переохлаждению. В связи с этим появились сомнения в возможности витрифицировать протоплазму, а также в полезности быстрого охлаждения и оттаивания спермы. Многие ученые считают, что при глубоком охлаждении спермы происходит не витрификация, а мелкокристаллическое затвердевание протоплазмы. Указывалось также, что витрификация чистой воды возможна лишь при огромных скоростях охлаждения — порядка 5 000° С/С, такие скорости при глубоком охлаждении биологических объектов практически недостижимы. Кстати сказать, мы еще в 1946—1947 гг. обнаружили, что при сверхбыстром охлаждении малых объемов спермы (прямое погружение в жидкий азот) спермии погибают. Исключение представляли только некоторые образцы спермы жеребцов (а также человека).

В то же время нами получены данные, говорящие в пользу гипотезы Б. Лайета. Замораживая сперму кролика в тонкостенных (10 мкм) алюминиевых пакетиках, мы наблюдали возобновление движения спермиев лишь при быстром оттаивании в теплой (+38°) воде. При медленном оттаивании на воздухе все спермии неизменно погибали. Эту гибель в данном случае легче всего объяснить с позиции гипотезы витрификации. И. В. Смирнов и А. Е. Бруенко [7] установили, что при повышении скорости оттаивания гранул замороженной спермы (объем гранулы 0,1 мл) резко увеличивается процент спермиев, возобновляющих движение. Таких спермиев при температуре оттаивания 0° С было 19%, при 20° С — 30%, при 40° — 43,5%, при 50° — 50,5%, при 60° С — 58%, при 70° С — 65%. Чтобы устранить возможную гибель спермиев от перегрева, флаконы со спермой, не дожидаясь полного оттаивания гранул, переносили из «горячих» ванн в воду с температурой +30° С. Очевидно, при быстром нагреве удается избежать рекристаллизации витрифицированной спермы в температурной зоне, где скорость кристаллизационных процессов наиболее высока. Заметим, кстати, что эти данные свидетельствуют о том, что часть клеток погибает не в процессе замораживания, а при оттаивании.

Чтобы объяснить эти, казалось бы, противоречащие один другому факты, автор данной статьи еще в 1949 г. выдвинул предположение о возможности и (полезности) одновременного протекания процессов



Матеріал, захищений авторським правом

витрификации протоплазмы клеток и кристаллического замерзания воды в межклеточной жидкой среде. Предположение выдержало проверку временем, было дополнено новыми экспериментальными доказательствами и может быть представлено как первый набросок общей теории замораживания спермы. Согласно нашим представлениям, успех глубокого охлаждения зависит прежде всего от удаления из клетки свободной воды, легко образующей кристаллы льда. Особые свойства оставшейся в клетке связанной с белками и другими коллоидами воды позволяют с большим основанием предположить возможность ее витрификации (или, по крайней мере, мелкокристаллического замерзания, — сущность теории от этого не меняется).

Что частичное обезвоживание спермиев является в определенных условиях криозащитным фактором, известно давно. Так, Шаффнер, Гендерсон и Кард [9] успешно применили обработку спермиев петуха (перед замораживанием) гипертоническими растворами сахарозы, а Э. Я. Граевский [1] обрабатывал таким же образом сперму лягушки. И. В. Смирнов [3, 4] использовал гипертонические растворы глюкозы и фруктозы при замораживании спермы кролика и барана. Однако из-за стеносмотичности спермиев млекопитающих достичь достаточно больших степеней обезвоживания оказалось практически невозможным, поскольку при больших отклонениях от изотонии растворы действовали на спермиев губительно.

В 1975 г. опытами И. В. Смирнова [6] экспериментально доказано, что устойчивость спермиев к гипертоническим растворам значительно возрастает, если предварительно перевести их в состояние неполного анабиоза, охлаждая до температуры от +2 до —3° С. Выяснилось также, что повышению устойчивости спермиев к осмотическим сдвигам способствует введение в сперму яичного желтка. Кстати, желток проявляет свойства своеобразного «осмотического буфера» и при резком охлаждении спермы при температурах выше нуля: в присутствии желтка не происходит так называемый «холодовый удар» спермиев, который, согласно гипотезе Ф. И. Осташко, является результатом возникновения осмотического градиента на границе клетка—среда.

Учитывая высказанные соображения, можно представить процессы, происходящие при глубоком охлаждении спермы, в виде следующей схемы. При медленном охлаждении вся свободная или слабо связанная вода в межклеточной жидкости и внутри клеток затвердевает в виде крупных кристаллов льда, что приводит к гибели спермиев. Клетки погибают и при чрезмерно быстром охлаждении, поскольку для витрификации свободной воды необходимы очень высокие скорости охлаждения. Поэтому необходимо подбирать оптимальные (не слишком быстрые, но и не слишком медленные) режимы охлаждения. В этом случае в межклеточной жидкости начинается образование кристаллов льда. Вокруг клеток образуются концентрированные растворы сахаров и солей, под действием которых из спермиев извлекается свободная или слабо связанная вода и остается лишь связанная, переходящая в стеклообразное состояние.

Таким образом, наша схема предполагает одновременное (точнее, почти одновременное) протекание процессов кристаллического замерзания свободной воды в межклеточной жидкости, удаления свободной воды из клеток и витрификации последних. Согласно нашим представлениям, гипертонические растворы, образующиеся при замерзании спермы, в определенных условиях могут играть не отрицательную, а криозащитную роль. Пока еще приходится подбирать оптимальные режимы замораживания эмпирическим путем. Но, несмотря на это, предложенная нами схема в качестве методической основы может значительно облегчить совершенствование способов замораживания спермы.



Матеріал, захищений авторським правом

При подборе оптимальных скоростей охлаждения приходится учитывать разнообразные факторы, влияющие на процесс замораживания. В частности, скорость охлаждения, играющая первостепенную роль, зависит от: 1) температуры хладоагента (паров жидкого азота, фторопластовой пластины); 2) объема охлаждаемой спермы; 3) массы и тепловых свойств (теплоемкости и теплопроводности) вещества ампулы или капилляра, в которых заключена сперма. Важнейшее значение имеют состав и свойства разбавителя, содержащего криозащитные вещества — глицерин, ПЭО, желток, сахара и т. д.

Действие криозащитных веществ изучено недостаточно. Как известно, эти вещества делятся на экстрацеллюлярные и интрацеллюлярные. Вполне возможно, что глицерин и некоторые сахара, легко проникающие в клетку, обладают двойным действием, проявляя криозащитный эффект вне и внутри клетки.

Действие экстрацеллюлярных криозащитных веществ проявляется, по-видимому, в понижении точки замерзания спермы, благодаря чему кристаллическое замерзание межклеточной среды, образование вокруг спермиев незамерзших ячеек с гипертоническими растворами и удаление свободной воды из клеток происходит при минусовых температурах, когда спермии находятся в анабиотическом состоянии и могут успешно переносить обезвоживание. Переходу спермиев в такое состояние способствует и предварительная адаптация при температуре около 0° С. К тому же начинать быстрое замораживание спермы при нулевой температуре выгоднее в том отношении, что уменьшается вероятность холодового удара спермиев, происходящего только в жидкой среде.

При использовании глицерина в качестве криозащитного вещества следует учитывать динамику осмотических процессов в разбавленной сперме. По нашим данным, в первые секунды после разбавления глицерин создает в межклеточной среде избыточное осмотическое давление и разбавитель действует на спермиев (а также на эритроциты лошади и быка) как гипертоническая среда. Но затем глицерин проникает внутрь клеток и осмотический градиент сглаживается (а при определенных концентрациях глицерина внешняя среда может стать гипотонической).

От широко употребляемого термина «эквилибрация» (перед замораживанием спермы) придется, по-видимому, отказаться. По новейшим данным [2] глицерин проникает внутрь спермиев весьма быстро. Об «эквилибрации» можно было говорить разве что в те времена, когда в разбавители включали высокий процент глицерина и считалось необходимым подслаивание глицеринизированной среды под сперму. В этом случае медленное проникновение глицерина в сперму предохраняло спермиев от характерной деформации (перегиб в точке соединения «тела» с «хвостом»).

Криозащитное действие глицерина внутри клетки почти не изучено. По всей вероятности, оно связано с понижением точки замерзания воды в протоплазме, а также с изменением характера кристаллообразования.

В последние годы ведется разработка метода хранения спермы в высушенном состоянии. Одно из перспективных направлений — лиофильное высушивание предварительно замороженной спермы. В этом случае присутствие глицерина в сперме может создать серьезные препятствия для высушивания. Поэтому разработка методов замораживания спермы в средах без глицерина представляет особый интерес. Что такое замораживание возможно, показали опыты, проведенные нами еще в 1947—1951 гг. Часть спермиев кролика и жеребца сохраняла жизнеспособность после замораживания в растворах глюкозы и фруктозы, а спермии быка, барана и хряка — в средах с желтком, но без глицерина.



Матеріал, захищений авторським правом

Как уже говорилось, желток является своеобразным «осмотическим буфером». Роль желтка при охлаждении и замораживании спермы не менее важна, чем роль глицерина. Однако механизм криозащитного действия желтка изучен еще плохо. Детальное исследование этого вопроса было бы очень полезным в теоретическом и практическом отношении.

Чрезвычайно большое значение имеют режимы оттаивания замороженной спермы. В последние годы появилось много сообщений подтверждающих результаты наших опытов, доказавших полезность быстрого оттаивания спермы, замороженной в виде гранул или в пластмассовых капиллярах.

Необходимо обратить особое внимание на изучение видовых, породных и индивидуальных особенностей спермы, имеющих значение при ее замораживании, в частности, на различия в осмотическом давлении, на проницаемость оболочки спермиев для глицерина, солей, сахаров и других осмотически активных веществ. Глубокая разработка теории разбавления и замораживания спермы чрезвычайно важна для дальнейшего совершенствования технологических приемов ее обработки.


1. *Граевский Э. Я.* Стеклообразное состояние протоплазмы в условиях глубокого охлаждения. — Успехи соврем. биологии, 1948, **25**, № 2, с. 63—78.
2. *Кушнир В. М.* Действие осмотических факторов при замораживании спермы быков в средах с глицерином. — Плем. дело и биология размораживания с.-х. животных, 1974, вып. 6, с. 51—56.
3. *Смирнов И. В.* Сохранение спермы сельскохозяйственных животных посредством глубокого охлаждения. — Сов. зоотехния, 1949, № 4, с. 93—96.
4. *Смирнов И. В.* Глубокое охлаждение семени сельскохозяйственных животных. — Журн. общ. биологии, 1950, **11**, вып. 3, с. 185—197.
5. *Смирнов И. В.* Сохранение семени быка при температуре —78° С. -- Сов. зоотехния, 1952, № 1, с. 56—59.
6. *Смирнов И. В.* Влияние температуры на осмотическую устойчивость спермиев. — Животноводство, 1976, № 1, с. 61—64.
7. *Смирнов И. В., Бруенко А. Е.* О режиме оттаивания замороженной спермы быков. — Молоч. и мясное скотоводство, 1971, № 11, с. 45—46.
8. *Luyet B. J.* The vitreous state of matter and devitrification temperatures. — In.: Temperature. New York, 1941, p. 420—434.
9. *Schaffner C. S., Henderson E. W., Card C. G.* Viability of spermatozoa of the chicken under various environment conditions. — Poult. Sci., 1941, **20**, N 3, p. 81—84.



Украинская сельскохозяйственная академия



Поступила в редколлегию 05. 04. 78



УДК 57.043:577.15



***Е. В. Белоусова, Б. П. Сандомирский***


# ВЛИЯНИЕ МЕСТНОГО ОХЛАЖДЕНИЯ КОЖИ НА АКТИВНОСТЬ КРЕАТИНКИНАЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЕ БЕЛЫХ КРЫС

Действие низких температур успешно используется для лечения термических ожогов [1, 3, 9], кожных заболеваний [2], для деструкции новообразований [7]. Но, несмотря на это, многие стороны действия холода на течение биохимических процессов в зоне криовоздействия остаются неясными.

Креатинкиназа, являясь маркерным ферментом для мышечной ткани, появляется в сыворотке крови в результате повреждения миофибрилл после различных экстремальных воздействий на организм [6, 10]. Цель настоящей статьи — выяснение влияния местного охлаждения




Матеріал, захищений авторським правом

**Действие местного охлаждения кожи на активность креатинкиназы в сыворотке крови и скелетной мышце крыс**

| Исследуемый материал | | | | Контроль | Активность фермента, в мкг Р—н/мл сыворотки в 1 мин и в мкг Р—н мг белка в 1 мин в различные сроки после криовоздействия | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | 30 мин | 60 мин | 3 ч | 1 сут | 3 сут | 7 сут | 28 сут |
| Сыворотка | | | | 2,5±0,12 n=1 | 5,5±0,07 $p<0,001$ | 5,1±0,30 $p<0,001$ | 8,6±0,70 $p<0,001$ | 2,9±0,09 $p<0,05$ | 5,9±0,30 $p<0,001$ | 5,6±0,20 $p<0,001$ | 3,3±0,07 $p<0,001$ |
| Мышцы | Свободная активность | Зоны | I | 1,1±0.07 | 3,0±0,19 $p<0,001$ | 2,6±0,30 $p>0,05$ | 4,6±0,30 $p<0,002$ | 3,1±0,06 $p<0,001$ | 2,2±0,11 $p<0,001$ | 3,2±0,10 $p<0,001$ | 3,5±0,20 $p<0,001$ |
| | | | II | | 2,8±0,25 $p>0,05$ | 1,6±0,06 $p<0,001$ | 3,5±0,10 $p<0,002$ | 1,9±0,09 $p>0,05$ | 2,0±0,10 $p>0,05$ | 3,2±0,09 $p<0,001$ | 2,6±0,18 $p>0,01$ |
| | | | III | | 1,6±0,16 $p>0,05$ | 1,4±0,07 $p>0,05$ | 4,4±0,30 $p<0,001$ | 1,5±0,07 $p>0,05$ | 1,9±0,10 $p<0,001$ | 2,4±0,10 $p<0,001$ | 2,0±0,18 $p>0,05$ |
| | Дополнительная активность | Зоны | I | 5,4±0,16 | — | 3,9±0,16 $p<0,001$ | 6,5±0,40 $p<0,001$ | — | 3,7±0,10 $p<0,001$ | 1,0±0,20 $p<0,001$ | 3,6±0,10 $p<0,002$ |
| | | | II | | — | 3,9±0,12 $p<0,001$ | 4,1±0,30 $p>0,05$ | — | 3,2±0,10 $p<0,001$ | 1,1±0,02 $p<0,001$ | 5,9±0,30 $p>0,05$ |
| | | | III | | — | 3,8±0,16 $p>0,05$ | 3,8±0,30 $p>0,05$ | — | 4,2±0,04 $p>0,05$ | 0,7±0,02 $p>0,001$ | 5,7±0,10 $p>0,05$ |

Примечание: I — зона прямого действия холода; II — подлежащий слой; III — отдаленная зона.

на активность креатинкиназы в скелетной мышце и сыворотке крови в различные сроки после криовоздействия. Исследование выполнено на 80 беспородных половозрелых (вес 160—170 г) крысах-самцах. Криовоздействие производилось путем орошения парами жидкого азота 10% поверхности тела в области спины. В сыворотке, полученной после декапитации, исследовали активность креатинкиназы по методу Ф. Б. Левина и Т. Н. Березова. Активность фермента мышцы изучали в трех образцах ткани из разных участков: из зоны прямого воздействия холода, т. е. участка мышцы, лежащего под охлаждаемой кожей; из ткани, расположенной под зоной прямого действия, и из мышцы бедра, отдаленной от места криовоздействия.

Навеску ткани мышцы измельчали и растирали в фарфоровой ступке с 0,5 М *трис*-буфером (pH 7,4). Полученный таким образом 2,5%-ный гомогенат центрифугировали при 3500 об/мин в течение 10 мин и в надосадке исследовали активность фермента. Эту активность обозначали как свободную, соответствующую цитоплазматической. Оставшийся осадок обрабатывали 0,1%-ным раствором тритона *x*-100, повторно центрифугировали и в центрифугате определяли



Матеріал, захищений авторським правом

дополнительную активность креатинкиназы, которая составляла большую часть фермента, связанного с миофибриллами и клеточными органеллами.

Приведенные результаты (см. таблицу) являются усредненными данными из 6—15 опытов для каждой экспериментальной серии после статической обработки по методу Фишера—Стьюдента. Контрольную группу составляли животные, не подвергавшиеся никаким воздействиям. При определении активности креатинкиназы в скелетных мышцах контрольных животных установлено, что большая часть фермента находится в связанном состоянии и отношение свободной формы к связанной составляет 1 : 5. В сыворотке крови контрольных животных обнаружена невысокая активность фермента (2,5 мкг Р—н на 1 мг белка в 1 мин).

Через полчаса после криовоздействия свободная активность креатинкиназы в зоне прямого воздействия повышается и через 3 ч достигает максимума, превышая норму в четыре раза. К третьим суткам активность фермента несколько снижается, но, удерживаясь на таком уровне до седьмых суток, превышает норму почти в три раза. Даже к 28-м суткам после криовоздействия свободная активность фермента в этой зоне превышала норму в три раза.

В участке, лежащем под зоной прямого влияния холодом, также наблюдается достоверное повышение активности, но в меньшей степени. В отдаленном участке свободная активность фермента достоверно увеличивалась через 3 ч после криообработки, в остальные сроки мало отличалась от контрольной.

Дополнительная активность фермента уже в ранние сроки после воздействия проявляют тенденцию к уменьшению во всех трех исследуемых участках мышцы. Наиболее явным снижение активности было на 7-е сут после криообработки. К 28-м сут дополнительная активность в зоне прямого действия холодом была сниженной, а в подлежащей и отдаленной — в пределах нормы.

Увеличение свободной и уменьшение дополнительной активности в мышце сочеталось с повышением активности креатинкиназы в сыворотке крови. Установлено, что наиболее четкие отличия в активности фермента сыворотки крови наблюдаются в ранние сроки после местного охлаждения. Так, активность креатинкиназы сыворотки уже к 1-му ч после охлаждения была увеличена в два раза и к 3-м ч после воздействия была максимальной. Далее активность креатинкиназы в сыворотке крови медленно снижалась и к 28-м сут приближалась к норме. Динамика активности фермента в сыворотке крови наблюдалась на фоне изменений его активности в мышце, заключающихся в повышении свободной и снижении дополнительной активности.

Анализ полученных данных указывает на то, что местное криовоздействие вызывает выход креатинкиназы в кровь как следствие нарушения целостности мышечной ткани.


1. *Бурба Р. В.* Местная гипотермия в комплексном лечении ожогов : Автореф. дис. ...канд. мед. наук. — Вильнюс, 1969. — 21 с.
2. *Задорожный Б. А., Гень С. П., Кутасевич Я. Ф.* Криотерапия некоторых дерматозов. — В кн.: Юбил. науч.-практ. конф., посвящ. 50-летию Днепропетр. обл. кож.-венер. диспансера. Днепропетровск, 1973, с. 100—104.
3. *Лауцевичус Л. З.* Криотерапия хлорэтилом в лечении термических ожогов. — Клин. медицина, 1975, № 5, с. 55—57.
4. *Левин Ф. Б., Березов Т. Н.* Определение активности креатинкиназы в сыворотке крови. — Лаб. дело, 1973, № 4, с. 229—231.
5. *Остапець М. Г., Романська Н. М.* Метод одержання сиворотки крові. — В кн.: Практикум з біохімії. К. : Вища школа, 1974, с. 188.
6. *Панченко Н. И., Масленникова Н. К.* Активность креатинкиназы при ожогах. — В кн.: Острая ожоговая токсемия. Киев : Здоров'я, 1976, с. 55—56.
7. *Пачес А. И., Шантель В. В., Птуха Т. П. и др.* Криогенный метод лечения опухолей головы и шеи. — М. : Медицина, 1978. — 168 с.
8. *Пушкарь Н. С., Белоус А. М.* Введение в криобиологию. — Киев : Наук. думка. 1975. — 343 с.




Матеріал, захищений авторським правом

9. *Сандомирский Б. П., Пекарский Д. Е., Исаев Ю. И. и др.* Обоснование криохирургии термических ожогов в эксперименте. — Клин. хирургия, 1977, № 12, с. 3—7.
10. *Уваров Б. С., Сидоренко В. И., Хайкина Л. И.* Некоторые биохимические показатели при остром переохлаждении. — Анестезиология и реаниматология, 1977, № 3, с. 73—77.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
27.02.79

УДК 57:536.48.047

***В. И. Вишневский, А. Г. Душейко, О. П. Маркова***

# ЗАМОРАЖИВАНИЕ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА В УЛЬТРАЗВУКОВОМ ПОЛЕ

Исследования по оптимизации методов криоконсервирования костного мозга (подбор ряда криопротекторов, определение оптимальной концентрации этих веществ, выбор необходимых программ охлаждения и отогрева) позволили значительно улучшить морфо-функциональные характеристики реконсервируемых суспензий. Однако при всех известных методах консервирования неизбежно происходит потеря определенного количества ядросодержащих, в том числе живых, клеток костного мозга.

Поиск дальнейших путей повышения эффективности методов низкотемпературной консервации предопределил интерес к изучению возможностей индуцирования наилучших для консервации условий взаимодействия клеток со средой, повышению их резистентности к низким температурам, управлению процессами кристаллизации, улучшению условий отогрева.

Литературные данные свидетельствуют, что решению этих вопросов в значительной мере может способствовать использование в криобиологии ряда физических факторов. Одним из таких факторов является ультразвук. Так, озвучивание образцов спермы сельскохозяйственных животных в процессе ее замораживания позволило увеличить сохранность спермиев [2, 6], а сообщение пищевым продуктам и биопрепаратам высокочастотных колебаний во время охлаждения улучшало качество замораживания этих образцов [3].

В настоящей статье применено направленное воздействие ультразвуковых колебаний терапевтического диапазона частот (880 и 2640 кГц) на клетки костного мозга в процессе их замораживания. Цель исследований — изучение возможности повышения сохранности жизнеспособных ядросодержащих клеток при замораживании суспензий костного мозга с оптимальной концентрацией полиэтиленоксида молекулярной массы (Мм) 400 (ПЭО-400).

**Материалы и методика.** Исследования проводили на костном мозге человека (доноров) и лабораторных животных (крыс). Взвесь ядросодержащих клеток в растворе ЦОЛИПК-3 после прибавления ПЭО-400 в 15%-ной конечной концентрации выдерживали в течение 15 мин при комнатной температуре. Опытные и контрольные образцы замораживали в полиэтиленовых ампулах емкостью 1,5—2,0 мл до —196° С по двухэтапной программе. Первый этап — до —15° С со скоростью 1—2° С/мин, второй — до —196° С со скоростью 300—400° С/мин. Первый этап замораживания осуществляли в специальном замораживающем устройстве, позволяющем производить в необходимый момент времени озвучивание охлаждаемых опытных образцов. Ампулы с костным мозгом размещали на расстоянии 5—10 мм от ультразвукового преобразователя в зоне максимального излучения. На втором этапе замораживания опытные и контрольные образцы погружали в жидкий



Матеріал, захищений авторським правом

азот. Отогрев замороженных образцов производили в водяной бане при +40° С.

Сохранность ядросодержащих клеток оценивали по следующим показателям: подсчет количества ядросодержащих клеток в 1 мкл взвеси и определение процента живых ядросодержащих клеток костного мозга (эозиновая проба по Шреку). Процент сохранности живых ядросодержащих клеток после реконсервации вычисляли по формуле:

$$A = \frac{a_2 \cdot c_2}{a_1 \cdot c_1} \cdot 100\%,$$

где $a_1$ и $c_1$ — соответственно количество ядросодержащих клеток в 1 мкл и процент живых клеток до замораживания; $a_2$ и $c_2$ — соответствующие характеристики отогретого образца.

**Результаты и обсуждение.** Определение температурного интервала, представляющего интерес для озвучивания охлаждаемых образцов костного мозга, проводили с учетом требования выделить эффект влияния ультразвуковых колебаний на этапе перехода основной массы жидкой фазы клеточной суспензии в кристаллическое состояние. Приближение начала озвучивания охлаждаемой суспензии к началу ее кристаллизации позволяет уменьшить влияние ультразвука на клетки в интервале температур, предшествующих периоду льдообразования. С другой стороны, полное совмещение этих двух моментов нежелательно, так как ряд литературных данных свидетельствует о влиянии ультразвука на температуру кристаллизации охлаждаемых в ультразвуковом поле жидкостей [4]. С учетом этих положений, а также анализа термограмм замораживания костного мозга с 15%-ным ПЭО-400 и данных о том, что основная масса льда (80—90%) в растворах, содержащих криопротекторные вещества, в концентрациях, близких к концентрациям, применяемым в криобиологии, образуется сразу же после начала кристаллизации [1], озвучивание охлаждаемых образцов костного мозга проводили в температурном интервале от —7 до —15° С.

Анализ данных табл. 1 показывает, что уровень сохранности живых ядросодержащих клеток в образцах костного мозга, замороженных в ультразвуковом поле, выше, чем в контрольных. Сохранность живых ядросодержащих клеток повышается по мере увеличения интенсивности ультразвуковых колебаний, достигая максимального значения в области интенсивностей 0,8—0,9 Вт/см². Наибольшая разница между уровнями сохранности живых клеток в опытных и контрольных образцах составляет 11,7% для частоты 880 кГц и 9,0% — для 2640 кГц. В обоих случаях $p<0{,}05$. При дальнейшем увеличении интенсивности ультразвукового излучения процент сохранившихся живых клеток уменьшается. Это, по-видимому, объясняется тем, что влияние ультразвуковых колебаний на криобиологические процессы носит двойственный характер. С одной стороны — положительное влияние, помогающее клеткам переносить экстремальные условия при кристаллизации образца, и с другой — повышенное повреждающее действие ультразвукового излучения при наличии в охлаждаемом образце кристаллической фазы [5]. В области средних интенсивностей (1,5—2,0 Вт/см²) повреждающее действие ультразвука, вероятно, начинает превосходить его положительное влияние и по мере увеличения интенсивности ультразвуковых колебаний результирующий эффект снижается.

Сравнение показателей сохранности живых клеток костного мозга, замороженного в ультразвуковом поле различной частоты, показывает, что оптимальная интенсивность для колебаний повышенной частоты увеличивается.

Положительное влияние ультразвукового излучения более выражено при замораживании костного мозга крыс (см. табл. 2). В области оптимальных интенсивностей ультразвуковых колебаний частоты



Матеріал, захищений авторським правом

Таблица 1

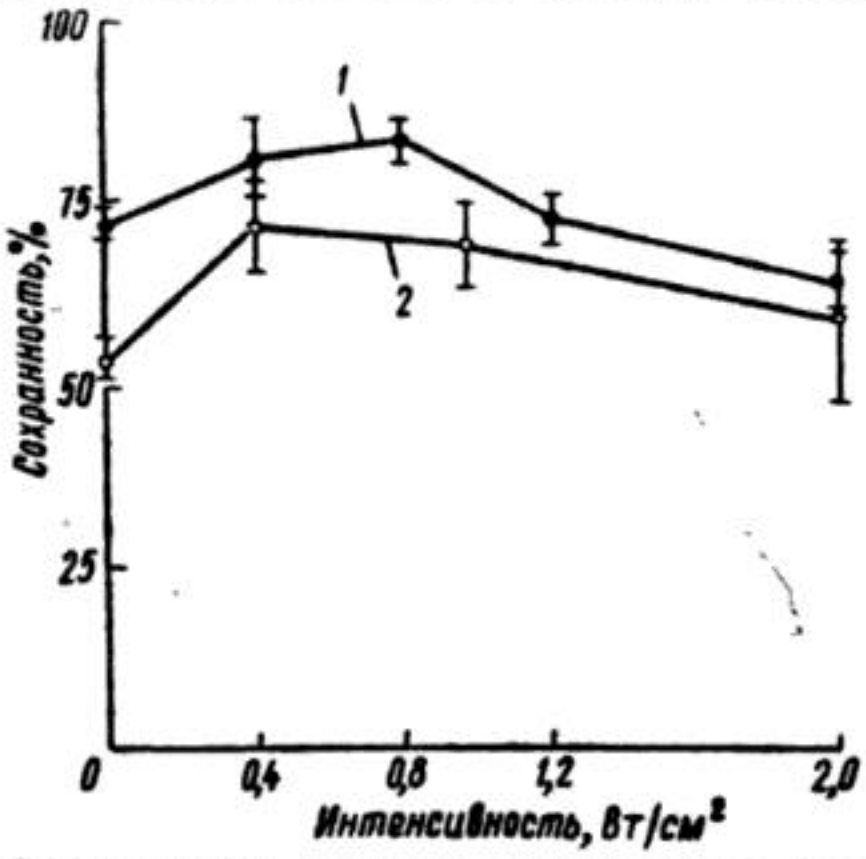
**Общее количество и процент живых клеток реконсервированного костного мозга доноров, замороженного в ультразвуковом поле**

| Донор | Характеристика костного мозга | Контроль | | Интенсивность ультразвука, Вт/см² | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | До замораживания | после отогрева | 0,4 | | 0,8 | 0,9 | 1,2 | | 2,0 | |
| | | | | Частота ультразвука, кГц | | | | | | | |
| | | | | 880 | 2640 | 880 | 2640 | 880 | 2640 | 880 | 2640 |
| В | Количество ЯК в 1 мкл | 13000 | 9500 | 10750 | 9800 | 11300 | 11500 | 9200 | 10800 | 8000 | 10200 |
| | Эозиновая проба, % | 100 | 100 | 100 | 98 | 99 | 96 | 98 | 96 | 99 | 97 |
| | Сохранность ЯК, % | 100 | 73 | 82,5 | 74 | 86 | 85 | 69,4 | 80 | 61 | 76 |
| Г | Количество ЯК в 1 мкл | 7900 | 6050 | 7200 | 6600 | 6900 | 6750 | 6400 | 6550 | 5900 | 6200 |
| | Эозиновая проба, % | 98 | 94 | 96 | 95 | 93 | 92 | 96 | 94 | 93 | 91 |
| | Сохранность ЯК, % | 100 | 73,5 | 88,3 | 80 | 82 | 79 | 78,5 | 78,5 | 70 | 72 |
| Б | Количество ЯК в 1 мкл | 6000 | 4200 | 4500 | 4550 | 5200 | 4900 | 4150 | 4900 | 3800 | 4050 |
| | Эозиновая проба, % | 100 | 95 | 93 | 93 | 92 | 93 | 97 | 94 | 86 | 92 |
| | Сохранность ЯК, % | 100 | 66,5 | 70 | 71 | 80 | 76 | 67,3 | 77 | 54,5 | 62 |
| $M \pm m$ | Сохранность ЯК, % | 100 | $71 \pm 2,3$ | $80,3 \pm 5,4$ | $75 \pm 2,6$ | $82,7 \pm 1,8$ | $80 \pm 2,6$ | $71,7 \pm 3,4$ | $78,5 \pm 1,0$ | $61,8 \pm 4,5$ | $70 \pm 4,2$ |



Матеріал, захищений авторським правом

880 кГц сохранность живых ядросодержащих клеток костного мозга крыс в озвученных при замораживании образцах выше на 17,9% ($p<0,05$). Различие в величине положительного влияния озвучивания замораживаемых с одинаковой концентрацией ПЭО-400 образцов костного мозга человека и крыс свидетельствует, по-видимому, о наличии зависимости величины влияния ультразвуковых колебаний от резистентности клеток к низким температурам, что, на наш взгляд, связано с видовыми особенностями клеток.




Зависимость уровня сохранности живых клеток костного мозга, замороженного в ультразвуковом поле, от интенсивности ультразвука:

*1* — костный мозг доноров; *2* — костный мозг крыс.

На рис. 1 приведено сравнение кривых зависимости сохранности живых клеток костного мозга человека и крыс, замороженного в ультразвуковом поле, от интенсивности ультразвуковых колебаний. Нетрудно заметить, что максимум положительного влияния ультразвука на сохранность ядросодержащих клеток при замораживании образцов костного мозга крыс сдвинут в область меньших интенсивностей ультразвуковых колебаний. Это положение позволяет предположить, что ядросодержащие клетки костного мозга крыс более подвержены сочетанному разрушающему действию ультразвука и низких температур, чем клетки костного мозга человека. В пользу этого предположения свидетельствует и наличие у клеток костного мозга человека большей резистентности к низким температурам: сохранность ядросодержащих клеток костного мозга крыс в контрольных образцах на 12,9% меньше, чем сохранность ядросодержащих клеток костного мозга человека.

Положение максимума эффекта влияния ультразвука на охлаждаемые образцы костного мозга в исследованном интервале интенсивностей для каждого донора индивидуально. Это свидетельствует об индивидуальной чувствительности ядросодержащих клеток костного мозга к действию ультразвуковых колебаний при замораживании.

Таблица 2

**Общее количество и процент живых клеток реконсервированного костного мозга крыс, замороженного в ультразвуковом поле ($f_{уз}=880$ кГц)**

| Характеристика костного мозга | Контроль | | Интенсивность ультразвука, Вт/см² | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | до замораживания | после отогрева | 0,4 | 1,0 | 2,0 |
| Количество ЯК в 1 мкл | 21000 | 18100 | 19200 | 17500 | 17300 |
| Эозиновая проба,% | 96 | 63 | 74 | 91 | 61 |
| Сохранность ЯК, % | 100 | 56,5 | 70,3 | 79 | 52,4 |
| Количество ЯК в 1 мкл | 21000 | 15000 | 18200 | 18000 | 19200 |
| Эозиновая проба,% | 96 | 73 | 83 | 65 | 96 |
| Сохранность ЯК, % | 100 | 54,2 | 74,6 | 58 | 91,2 |
| Количество ЯК в 1 мкл | 15000 | 12000 | 16700 | 13000 | 12000 |
| Эозиновая проба,% | 99 | 79 | 82 | 84 | 70 |
| Сохранность ЯК, % | 100 | 63,6 | 92 | 71,5 | 56,6 |
| $M\pm m$, сохранность ЯК, % | 100 | 58,1±2,8 | 79±6,6 | 69,5±6,1 | 66,7±12 |



Матеріал, захищений авторським правом

Результаты исследования позволяют сделать следующие выводы.

1. Замораживание клеточных суспензий костного мозга в ультразвуковом поле способствует повышению сохранности ядросодержащих клеток.

2. Величина положительного влияния озвучивания в процессе замораживания образцов костного мозга зависит от резистентности клеток к низким температурам.


1. *Вишневский В. И.* Электрометрия биофизических процессов в сперме быков-производителей при замораживании : Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Харьков, 1970. — 30 с.
2. *Вишневский В. И., Марющенко А. В.* А. с. 494163 (СССР). Способ консервирования биологических жидкостей. — Опубл. в Б. И., 1975, № 45, с. 12.
3. *Илюхин В. В., Цюпа В. И., Титов Е. И., Ермаков Ю. П.* А. с. 395060 (СССР). Способ замораживания пищевых продуктов и биопрепаратов. — Опубл. в Б. И., 1973, № 35, с. 9.
4. *Капустин А. П.* Влияние ультразвука на кинетику кристаллизации— М. : Изд-во АН СССР, 1962. — 108 с.
5. *Рикберг А. Б., Андрейченко В. И., Бакай Э. А. и др.* К вопросу об использовании воздействия низких температур и ультразвука в онкологии. — В кн.: Ультразвук в физиологии и медицине : Тез. докл. XI Всесоюз. науч. конф., 23—25 сент. 1975 г.— Ульяновск, 1975, с. 92—94.
6. *Vishnevsky V. I.* Use of ultra-sonic oscoillations on freezing. — In: Fifteenth annual meet., Soc. cryobiol., Aug., 1978. Tokyo : Nippon Toshi Center, 1978, p. 20.



Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР



Поступила в редколлегию
08. 02. 79



УДК 611.77—018:612.014.43



***В. В. Волина, Е. Я. Панков***


# ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ РЯДА ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ В КОЖЕ КРЫС ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ТЕМПЕРАТУРНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ

Данные литературы о применении холода в комбустиологической практике [1, 4, 6, 16, 19] свидетельствуют о хороших терапевтических и косметических результатах лечения ожогов. Несмотря на это, криохирургия не нашла еще широкого распространения в комбустиологии из-за отсутствия четких представлений о механизме действия низких температур на кожу, недостаточного изучения развития и течения поражений кожного покрова при криовоздействии и происходящих при этом патоморфологических изменений, что не позволяет в достаточной степени научно обосновать показания к криохирургии.

Кроме того, изучение процессов мофрогенеза заживления ран, образующихся при разных экстремальных температурных воздействиях, имеет не только практическое, но и большое теоретическое значение, поскольку касается важных и недостаточно изученных вопросов особенностей течения репаративных процессов при термопоражениях и способах их регуляции. Последнее положение связано с анализом метаболических процессов в клетке, среди которых одно из основных мест занимает энергетический обмен. Многие исследователи [8, 9, 12, 17, 18] считают энергетический обмен решающим фактором, определяющим направление и характер различных физиологических и патологических процессов. В связи с этим в последние годы интенсивно изучается активность ферментов, связанных с энергетическим обменом при многих заболеваниях, в том числе разных дерматозах [2, 3, 7, 10]. Нарушение ферментативных процессов эти авторы рассматривают в качестве одного из важнейших звеньев в патогенезе возникающих состояний.




Матеріал, захищений авторським правом

В этой связи задачей настоящего исследования явилось изучение динамики ферментативных процессов в нормальной и патологически измененной в результате термического ожога коже при действии низких температур с целью выяснения роли изменений ферментативной активности в патогенезе поражения кожи и в репаративных процессах после криовоздействия.

Эксперимент проведен на 230 белых крысах-самцах весом 160—180 г. Поставлены три серии опытов. В 1-й серии опытов животным на участке спины с выстриженной шерстью под эфирным наркозом наносилось стандартное криовоздействие температурой от —185 до —190° С с помощью аппликатора диаметром 12 мм. Время контакта 2 мин. Во 2-й серии опытов тем же криоаппликатором наносилось криовоздействие на предварительно обожженную термоаппликатором кожу сразу после ожога. Диаметр термоаппликатора равнялся 11 мм, температура 100° С. Время воздействия — по 2 мин каждым аппликатором. 3-я серия опытов, в которой с помощью термоаппликатора вызывали стандартные ожоги, служила контролем ко 2-й серии опытов.

При морфологическом изучении препаратов интактной и патологически измененной кожи, подвергнутой действию низких температур, учитывались данные термометрии под кожей в месте приложения аппликаторов и на расстоянии 4 и 8 мм от их края. В соответствии с этим участок поражения был условно разделен на зоны:

I — зона контакта кожи с аппликаторами, II — зона, граничащая с I, и III — зона, удаленная от I на 8—10 мм.

Анализ морфологических изменений показал различную степень повреждения кожи в каждой из зон, причем в III зоне эти изменения были незначительными.

На свежезамороженных криостатных срезах толщиной 8—10 мкм проведено гистохимическое определение активности ряда окислительно-восстановительных ферментов: сукцинатдегидрогеназы (СДГ) [14], лактатдегидрогеназы (ЛДГ) [13], НАД- и НАДФ-диафораз [15]. Активность этих ферментов выражалась в интенсивности реакции, обусловленной степенью связывания солей тетразолия и образования диформазана, и оценивалась по пятибалльной системе. Вычислялся средний гистохимический коэффициент (СГК) на каждые 100 клеток [11]. Динамика ферментативных реакций через 1 ч, 1, 7, 14 и 28 сут после различных температурных воздействий была прослежена в следующих структурных компонентах кожи: в базальных клетках росткового слоя эпидермиса, фибробластах, клетках концевого отдела сальных желез, эпителии корня волос, в эндотелии стенок кровеносных сосудов и в мышечных волокнах собственной мышцы кожи. Статистическая обработка полученных результатов производилась по методу Стьюдента—Фишера.

При гистоэнзимологическом исследовании состояния ферментативной активности в интактной и патологически измененной коже, подвергнутой низкотемпературному воздействию, было установлено, что в зоне некротических изменений кожи (I) изучаемые ферменты не выявлялись при всех примененных температурных воздействиях, поэтому гистоэнзимологический анализ проводили в двух зонах: в зоне II, окружающей место контакта с аппликаторами, и в III — периферической.

Через 1 сут после криовоздействия на интактную кожу в зонах II и III наблюдается угнетение активности НАД- и НАДФ-диафораз в фибробластах и эндотелии стенок кровеносных сосудов, а в последующем активность этих ферментов в названных структурах к 28-м сут возвращается к исходному уровню, за исключением активности НАДФ-диафоразы в эндотелии сосудов (рис. 1). В базальных клетках росткового слоя эпидермиса, в эпителии корней волос, в клетках сальных желез и мышечных волокнах собственной мышцы кожи активность



Матеріал, захищений авторським правом

НАД- и НАДФ-диафораз на протяжении всех сроков наблюдения оставалась на высоком, близком к нормальному, уровне. Обращает на себя внимание увеличение СГК указанных ферментов в эпителии корней волос, наступающее после криовоздействия и сохраняющееся в течение первой недели, что свидетельствует об активизации энергетических процессов в этих структурах.

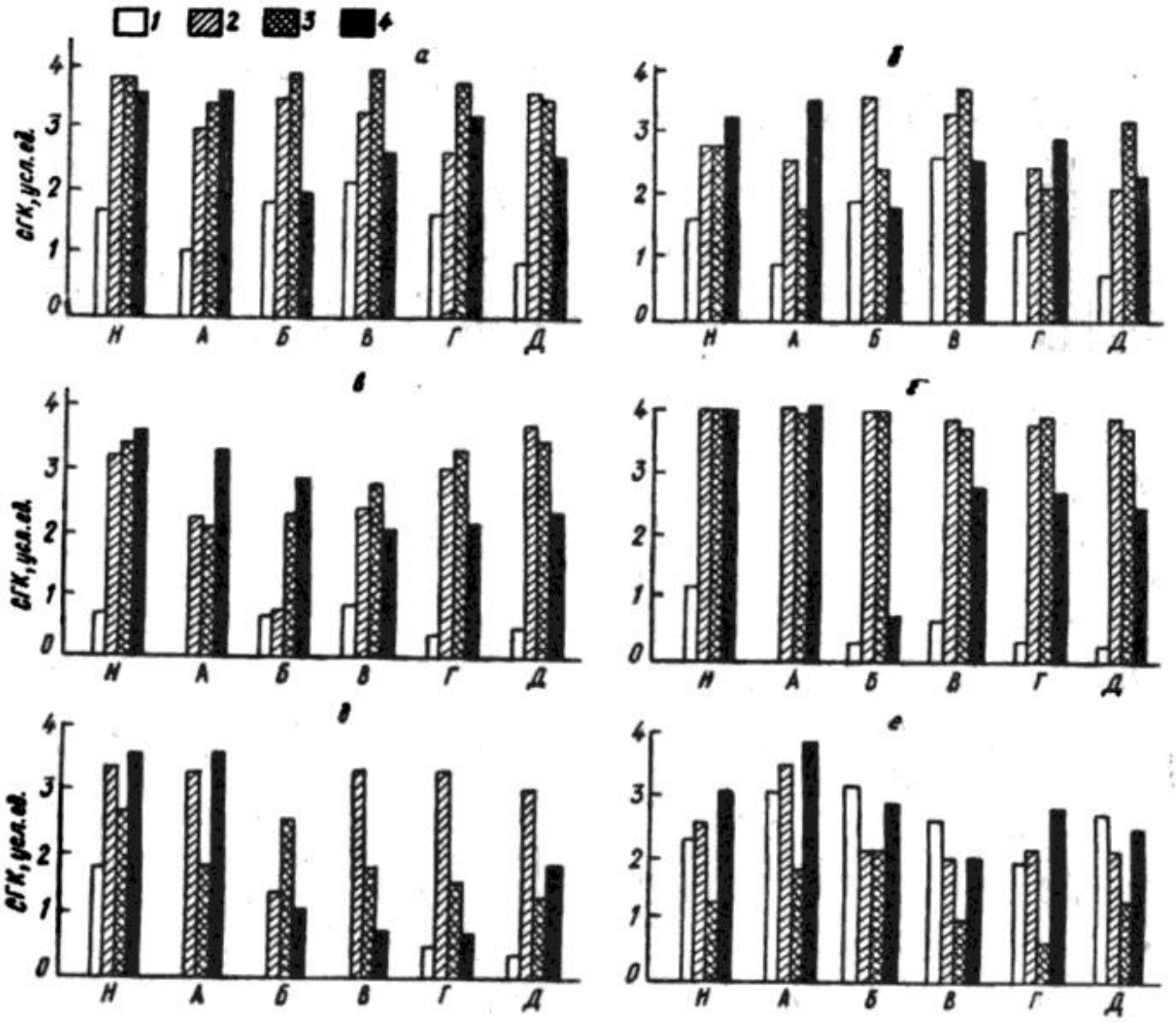



Рис. 1. Изменение ферментативной активности в коже крыс после криовоздействия (II зона):

*а* — в базальных клетках росткового слоя эпидермиса; *б* — в эпителии корня волоса; *в* — в фибробластах; *г* — в клетках сальных желез; *д* — в эндотелии стенок кровеносных сосудов; *е* — в мышечных волокнах собственной мышцы кожи. *Н* — норма. Сроки после воздействия: *А* — 1 ч; *Б* — 1 сут; *В* — 7 сут; *Г* — 14 сут; *Д* — 28 сут; *1* — активность СДГ; *2* — активность НАД-диафоразы; *3* — активность НАДФ-диафоразы; *4* — активность ЛДГ.

В эти же сроки наблюдения (на 1—7-е сут) после криовоздействия наблюдается повышение СДГ-активности в базальных клетках росткового слоя эпидермиса, эпителии корня волос и в мышечных волокнах собственной мышцы кожи, однако к 28-м сут активность СДГ в этих структурных компонентах кожи, исключая собственную мышцу, становится ниже исходного уровня. В клетках сальных желез и эндотелии сосудов криовоздействие приводит к снижению активности СДГ во все сроки наблюдения.

Активность ЛДГ во всех структурных компонентах кожи несколько снижалась к 28-м сут наблюдения. Наиболее криолабильными по ЛДГ-активности оказались: эндотелий кровеносных сосудов, клетки сальных желез и фибробласты.

Через 1 ч (а в клетках сальных желез и в 1-е сут) после ожога (рис. 2) НАД-, НАДФ-диафоразы и ЛДГ во всех структурных элементах кожи в зоне II не выявляются либо отличаются резким снижением активности, особенно НАД-диафораза и ЛДГ в собственной мышце



Матеріал, захищений авторським правом

кожи. К 14—28-м сут активность ферментов остается преимущественно несколько ниже исходного уровня.

При ожоге с последующей криообработкой (рис. 3) НАД-диафораза не выявляется в зоне II ни в ранние, ни в более поздние сроки, появляясь на 14-е сут везде, кроме мышечных волокон собственной мышцы кожи, и возвращаясь к исходному уровню лишь к 28-м сут. В зоне III активность этого фермента остается на высоком уровне, близком к норме.

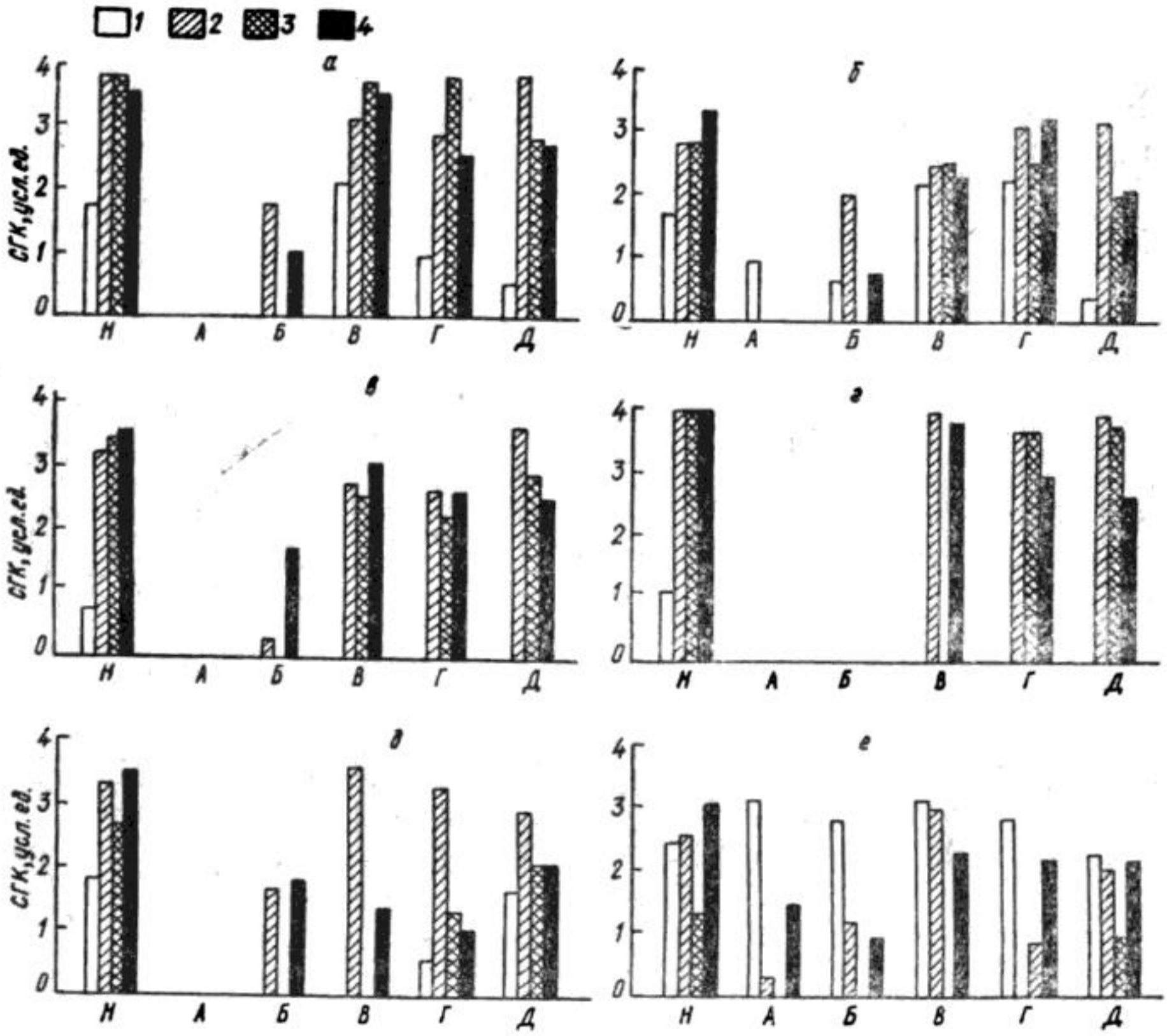



Рис. 2. Изменение ферментативной активности в коже крыс после ожога (II зона). Обозначения те же, что на рис. 1.

НАДФ-диафораза и ЛДГ при ожоге с криовоздействием выявляются в обеих зонах. Их активность, снижаясь в ранние сроки наблюдения, возвращается к исходному уровню к 14-м сут в базальных клетках росткового слоя эпидермиса и сальных железах, причем активность ЛДГ снижается снова к 28-м сут во всех структурных компонентах кожи.

После ожога активность СДГ в ранние сроки наблюдения (1—24 ч) отсутствует во всех структурных компонентах кожи, кроме эпителия корня волос и мышечных волокон собственной мышцы кожи. К 1—7-м сут активность СДГ в этих структурных компонентах кожи и в базальных клетках росткового слоя эпидермиса становится выше исходного уровня и к 28-м сут снова понижается на 70% (см. рис. 2). В эндотелии сосудов ее активность приближается к исходной. Однако в собственной мышце кожи на первые—четырнадцатые сутки СДГ активизируется ($p<0{,}001$).

При ожоге с криовоздействием прослеживается та же динамика изменения СДГ-активности, с той только разницей, что в III зоне, а к



Матеріал, захищений авторським правом

28-м сут и во II в фибробластах, и эндотелии кровеносных сосудов этот фермент выявляется, однако активность его очень низка. В собственной мышце кожи к 28-м сут постепенно снижается активность СДГ.

Таким образом, из представленных данных видно, что наиболее устойчивыми к действию низких температур оказались базальные клетки росткового слоя эпидермиса, эпителий корня волос, сальные железы, т. е. в основном эпителиальные клетки, филогенетически подготовленные к термовоздействиям. Менее сохранны клетки соедини-

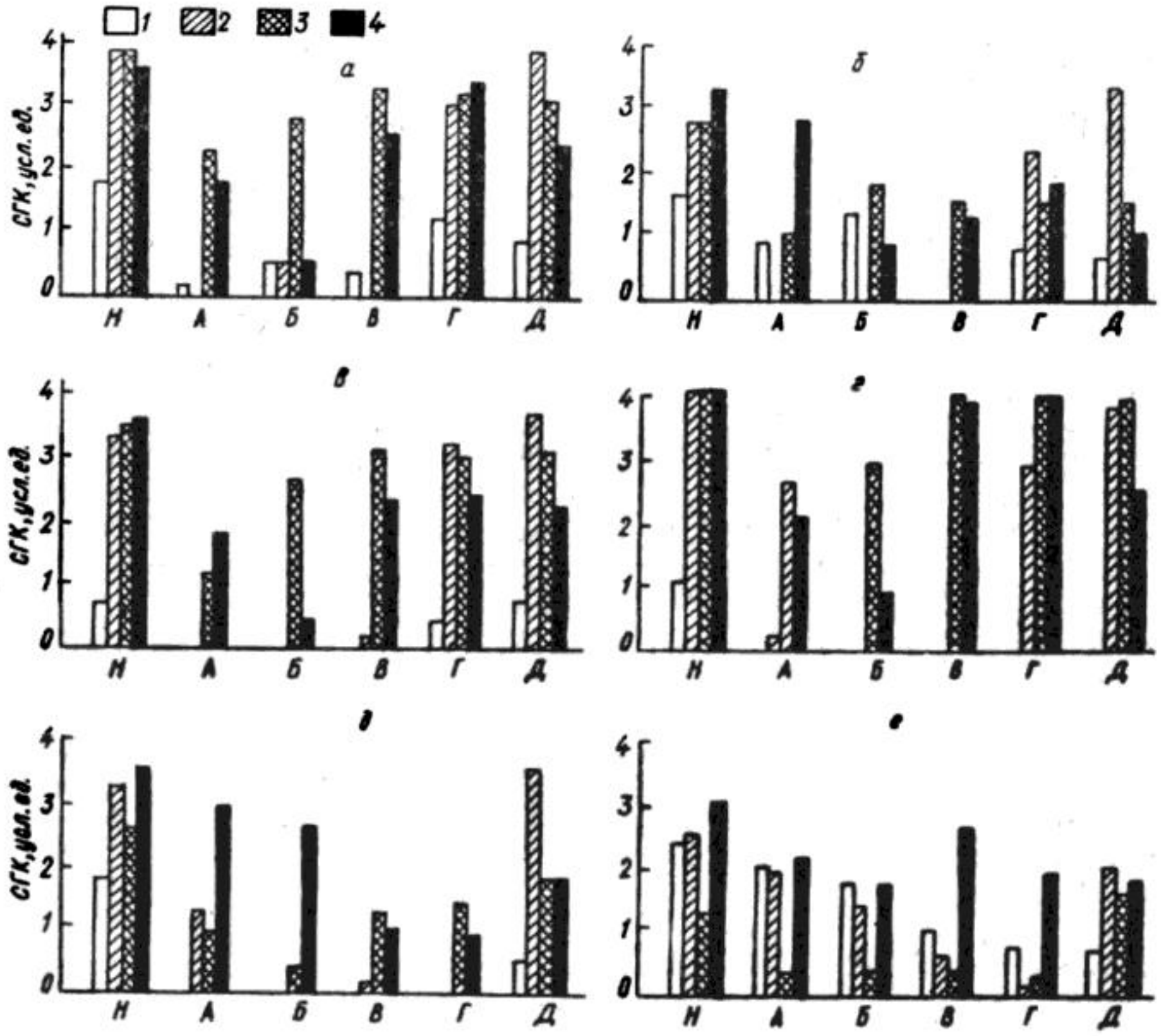



Рис. 3. Изменение ферментативной активности в коже крыс после ожога с последующим криовоздействием (II зона).
Обозначения те же, что на рис. 1.

тельной ткани, ткани внутренней среды, существующей в условиях температурного гомеостаза, — фибробласты и эндотелий капилляров. Мышечные волокна собственной мышцы кожи проявили высокую сохранность ферментативной активности при криовоздействии, что можно было бы связать с большей удаленностью их от повреждающего фактора и более высоким уровнем кровоснабжения.

Из изученных ферментов наиболее криостабильными оказались НАД- и НАДФ-диафоразы, являющиеся комплексными показателями состояния активности вне- и внутримитохондриальных дегидрогеназ. Очевидно, за счет внемитохондриальных дегидрогеназ активность этих ферментов сохраняется на достаточно высоком уровне, несмотря на то что сами митохондрии являются криолабильными структурами. Это подтверждается тем, что СДГ — дегидрогеназа, локализованная в митохондриях, является, по нашим данным, криолабильным ферментом.

Из данных литературы известно, что в нормальной коже процессы гликолиза преобладают над процессами окислительного фосфорилиро-



Матеріал, захищений авторським правом

вания [7]. Это иллюстрируется тем, что активность СДГ во всех структурных элементах кожи в норме находится на более низком уровне по сравнению с активностью ЛДГ (исключение составляет собственная мышца кожи как ткань высокоэнергетическая).

Нами получены данные, свидетельствующие о том, что в ранние сроки после криовоздействия активность СДГ в коже снижена или равна нулю, что может являться следствием кратковременных нарушений микроциркуляции (отсутствие кровоснабжения). При этом угнетаются процессы окислительного фосфорилирования, тогда как процессы гликолиза активизируются (эпителий волос и мышечные волокна собственной мышцы кожи) или остаются в норме. Наблюдаемое на 1—7-е сут улучшение кровоснабжения вокруг очага поражения, вероятно, активизирует процессы окислительного фосфорилирования (повышение активности СДГ во II и III зонах) с одновременным угнетением гликолиза (снижение активности ЛДГ), о чем свидетельствует рис. 1. Это позволяет предположить, что криовоздействие вызывает лишь кратковременные нарушения микроциркуляторного русла (до 24 ч), сменяющиеся усилением кровоснабжения, а затем его нормализацией.

На рис. 1, 2 и 3 видно, что процессы, происходящие в коже и выражающиеся в изменении активности изучаемых ферментов, имеют волнообразный характер, сохраняющийся при всех видах температурных воздействий. Снижение активности некоторых ферментов к 28-м сут свидетельствует о том, что процессы восстановления тканей еще не закончены. По всей видимости, волнообразный характер репаративного процесса в коже после криовоздействия отражает общебиологическую закономерность, проявляющуюся также при пролиферации эпителия, окружающего кожную рану [5].

Активность ферментов изучалась в двух зонах — во II, окружающей зону контакта кожи с аппликаторами, которая интересовала нас как источник ее репарации, и в III, периферической зоне, которая испытывала на себе влияние со стороны поврежденных тканей и неповрежденной кожи. Отмечено, что во II и III зонах волнообразность процессов не совпадает по времени, что иллюстрирует смещение волн гистоэнзимологической активности. Это свидетельствует о перераспределении активности ферментов и, очевидно, является одним из механизмов, определяющих различия в степени повреждаемости и сроках репарации тканевых структур в изучаемых зонах кожи.

Следует отметить, что при гистологическом исследовании III зоны в ранние сроки (до 3-х сут) изменения структурных компонентов кожи при всех видах воздействий выражены незначительно. В те же сроки активность НАДФ-диафоразы, СДГ и ЛДГ снижена в III зоне по-разному в различных структурах кожи при ожоге и ожоге с криовоздействием. Таким образом, гистоэнзимологические исследования дают возможность выявить ранние и скрытые изменения энергетического обмена и в зоне, отдаленной от очага поражения.

Как видно из проведенных исследований, сохранность и восстановление ткани при сочетанном воздействии высоких и низких температур на кожу проявляются сильнее, чем при ожоге. Несмотря на однотипность характера восстановления активности окислительно-восстановительных ферментов при обоих видах воздействий, значение их СГК в изученные сроки ближе к исходному при действии низких температур на обожженную кожу (рис. 2, 3). Полученные результаты свидетельствуют о снижении повреждающего влияния высоких температур на кожу при последующем криовоздействии.

1. *Бурба Р. Б.* Местная гипотермия хлорэтилом в комплексном лечении термических ожогов : Автореф. дис. ...канд. мед. наук. — Вильнюс, 1969. — 21 с.
2. *Задорожный Б. А., Гень С. П., Кутасевич Я. Ф.* Криотерапия некоторых дерма-



Матеріал, захищений авторським правом

тозов. — В кн.: Юбил. науч.-практ. конф., посвященная 50-летию Днепропетровского ОКВД. — Днепропетровск, 1973, с. 100—104.
3. *Задорожный Б. А., Яковцова А. Ф., Питенько Н. Н., Шевченко В. П.* Белковый обмен и окислительно-восстановительные ферменты при псориазе. — В кн.: Патогенез и лечение распространенных и важнейших дерматозов. Харьков, 1974, с. 40—46. (Сб. тр. Харьк. мед. ин-та; Вып. 109).
4. *Кочетыгов Н. И., Белянин В. Л.* О значении быстрого охлаждения тканей при ожогах. — Сов. медицина, 1964, № 4, с. 112—114.
5. *Красникова Н. А.* О пролиферации эпителия, окружающего кожную рану, у безволосых мышей при воздействии хлорофиллина натрия. — Бюл. эксперим. биологии и медицины, 1973, **76**, № 10, с. 99—102.
6. *Лауцевичус Л. З.* Криотерапия хлорэтилом в лечении термических ожогов. — Клин. медицина, 1975, № 5, с. 55—57.
7. *Лягушкина М. П.* Сравнительные гистохимические исследования кожи больных псориазом взрослых и детей : Автореф. дис. ...канд. мед. наук. — М., 1974. — 19 с.
8. *Райхлин Н. Т.* Окислительно-восстановительные ферменты в опухолях. — М. : Медицина, 1967. — 215 с.
9. *Струков А. И., Лушников Е. Ф.* Гистохимическое изучение окислительно-восстановительных процессов в патологической анатомии. — Арх. патологии, 1962, **24**, № 11, с. 3—22.
10. *Цераидис Г. С., Бавыкина Е. А.* Активность некоторых окислительно-восстановительных ферментов кожи человека в норме и при хронической пузырчатке. — Арх. патологии, 1972, **34**, № 7, с. 72—78.
11. *Astaldi G., Verga J.* The glucogen content of the cells of lymphatic leucaemia. — Acta haematol., 1957, **17**, N 3, p. 129—135.
12. *Burstone M. S.* [*Бэрстон М.*] Гистохимия ферментов. — М. : Мир, 1965. — 962 с.
13. *Hess R., Scarpelli D. G., Pearse A. G.* — Приводится по: Пирс Э. Гистохимия. — М. : Изд-во иностр. лит., 1962, с. 845—846.
14. *Nachlas M. M., Tsou K.-C., Sonza E. de, Cheng C.-S., Seligman A. M.* — Приводится по: Пирс Э. Гистохимия. — М. : Изд-во иностр. лит., 1962, с. 844—845.
15. *Nachlas M. M., Walker W. H., Seligman A. M.* — Приводится по: Пирс Э. Гистохимия. — М. : Изд-во иностр. лит., 1962, с. 843—844.
16. *Ofeigsson O. J., Mitchell R., Patrick R. S.* Observations of the cold water treatment of cutaneous burns. — J. Pathol., 1972, **108**, N 2, p. 145—150.
17. *Pearse E.* [Пирс. Э.] Гистохимия. — М. : Изд-во иностр. лит., 1962. — 962 с.
18. *Rapoport S.* [Рапопорт С. М.] Медицинская биохимия. — М. : Медицина, 1966. — 892 с.
19. *Reynolds G. E., Brown C. R., Price P. B.* Effects of local chilling in the treatment of burns. — Surgical forum, 1955, N 6, p. 85—87.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
08. 02. 79

УДК 541.49:576.3:57.083

***Т. А. Глушко, О. П. Маркова***

# ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК В КУЛЬТУРЕ ТКАНИ ПОСЛЕ ИНКУБАЦИИ С ПЭО-400

В ряде работ показано, что после недолгого (5—15 мин) инкубирования некоторых клеток с ПЭО-400 в различных концентрациях обнаруживалось снижение активности некоторых окислительно-восстановительных ферментов, интенсивности потребления кислорода, ингибирование синтеза белка и ДНК [1—4]. Отмечается также, что добавление ДМСО различной концентрации в среду инкубирования Hela снижает до полного угнетения (с повышением концентрации) пролиферативную активность этих клеток [5]. Из приведенных данных видно, что вещества, используемые в качестве криопротекторов, при контакте с клетками вызывают у них различные изменения метаболизма, влияющие на способность к их дальнейшей пролиферации.

В связи с этим целью настоящей статьи явилось изучение пролиферативной активности культуры клеток китайского хомячка после инкубирования с ПЭО-400. Работа выполнена на перевиваемой линии фибробластоподобных клеток китайского хомячка (клон 237). Клетки



Матеріал, захищений авторським правом

инкубировали с ПЭО-400 в течение 30 мин и 4 ч. Всего было проведено четыре серии опытов. В I и II серии использовали ПЭО-400 в 2,5%-ной конечной концентрации, в III—IV сериях — в 5%-ной конечной концентрации.

Клеточную суспензию рассеивали по 2 мл с плотностью $2\times10^5$ клеток в 1 мл в пенициллиновые флаконы с покровными стеклами. Культуру выращивали при температуре 37° С в среде Игла с 10%-ной сывороткой крупного рогатого скота с добавлением ПЭО-400 в 2,5 и 5%-ной конечной концентрации. После 30-минутной и 4-часовой инкубации покровные стекла с осевшими на них клетками тщательно отмывали в растворе Хенкса и переносили в свежую среду, продолжая инкубировать их при той же температуре. Фиксацию материала проводили в спиртуксусной кислоте (3 : 1) через 2 и 24 ч роста после отмывания. Контрольные культуры подвергали той же обработке, но без добавления ПЭО-400. На препаратах, окрашенных гематоксилином Караччи, определяли митотический индекс (МИ) в промилле. В каждый срок просчитывали не менее 5 000 клеток, результаты обрабатывали статистически по методу Фишера—Стьюдента.

| Концентрация ПЭО-400, % | Длительность инкубирования | Митотическая активность | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Через 24 ч после отмывания от ПЭО-400 | | Через 24 ч после отмывания от ПЭО-400 | |
| | | Процент общий | Процент к контролю | Процент общий | Процент к контролю |
| 2,5 | Контроль | 26,0±0,50 | | 36,3±1,89 | |
| | 30 мин | 26,3±2,52 | 101 | 32,0±2,73 | 88 |
| | Контроль | 28,0±1,25 | | 39,3±2,54 | |
| | 4 ч | 24,0±3,12 | 85 | 33,3±2,40 | 85 |
| 5 | Контроль | 25,4±3,12 | | 39,3±1,68 | |
| | 30 мин | 18,8±1,25 | 74 | 34,2±1,75 | 87 |
| | Контроль | 22,8±2,94 | | 41,6±2,87 | |
| | 4 ч | 10,8±1,25 | 47 | 34,4±3,00 | 83 |

В таблице представлены результаты изменения митотической активности культуры клеток китайского хомячка после разных сроков инкубирования с ПЭО-400. Как видно из таблицы, через 2 ч после отмывания митотическая активность культуры клеток, инкубированных в течение 30 мин с ПЭО-400 2,5%-ной концентрации, не отличается от контроля, после 4 ч инкубации наблюдается тенденция к снижению МИ (на 15%, $p>0,05$). При культивировании клеток на протяжении 30 мин с ПЭО 5%-ной концентрации отмечается снижение МИ от 26% к уровню контроля ($p<0,1$) до значительного после 4-часового инкубирования: количество делящихся клеток не превышает 50% ($p<0,01$). Через 24 ч роста после отмывания ПЭО-400 во всех опытных культурах МИ значительно повышался и приближался к контролю.

Наряду с изменениями митотической активности отмечены и цитопатические нарушения в опытных культурах во все сроки наблюдения: клетки приобретали более округлую форму, отмечалась вакуолизация ядер и цитоплазмы (особенно выраженная в культурах, инкубированных с ПЭО-400 в 5%-ной концентрации после 30 мин и 4-часового контакта, а также с 2,5%-ной концентрацией после 4 ч). Встречались клетки с пикнотическими ядрами, с явлением кариорексиса. Кроме того, обнаруживались некоторые формы патологии клеточного деления, особенно при длительном инкубировании после 2 ч роста культуры. Через 24 ч роста выявлена способность клеток китайского хомячка восстанавливать морфологию и митотическую активность.



Матеріал, захищений авторським правом

Таким образом, приведенные данные позволяют считать, что использованные концентрации ПЭО-400 не вызывают необратимых нарушений пролиферации исследуемых клеток.


1. *Пономарев Ю. И., Гулевский А. К., Обозный Э. П., Чеканов В. П.* Влияние полиэтиленоксида с молекулярным весом 400 и температурного режима инкубации на синтез белка и потребления кислорода тканью ксенокланапов аорты. — Криобиология и криомедицина, 1976, вып. 2, с. 79—81.
2. *Пушкарь Н. С., Шраго М. И., Белоус А. М., Калугин О. В.* Криопротекторы. — Киев : Наук. думка, 1978. — 204 с.
3. *Сафонова Т. С., Микулинский Ю. Е.* Изучение действия низких температур и криофилактика на выживаемость и метаболическую активность некоторых видов бактерий. — В кн.: Современные вопросы криобиологии. Киев : Наук. думка, 1976, с. 69—70.
4. *Шенберг М. Г.* К механизму действия полиэтиленоксида. — В кн.: Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины. Киев : Наук. думка, 1974, с. 34—37.
5. *Yasukawa M., Terasima T., Yamada M., Matsamura T.* Inactivation of proliferative capaciti of cultured mammalian cells by liquid nitrogen storege procedure. — Cryobiology, 1974, 11, N 6, p. 493—499.



Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР



Поступила в редколлегию
28. 02. 79



УДК 57.043.616:419.089.843:612.119



***А. Н. Гольцев, О. А. Дроздова***


# ТОПОГРАФИЯ РАССЕЛЕНИЯ ДЕКОНСЕРВИРОВАННЫХ И НАТИВНЫХ МИЕЛОКАРИОЦИТОВ В ОРГАНИЗМЕ ОБЛУЧЕННЫХ РЕЦИПИЕНТОВ

Результаты экспериментальных исследований свидетельствуют о том, что клетки донорского нативного костного мозга приживляются и пролиферируют в миелоидных и лимфоидных органах и тканях летально облученных реципиентов [3—7]. Наряду с этим не выяснен вопрос относительно топографии расселения деконсервированных миелокариоцитов в организме реципиентов, облученных различными дозами ионизирующей радиации. Особый интерес представляет изучение возможности деконсервированных миелокариоцитов приживляться и пролиферировать в лимфоидных органах реципиента с последующей дифференцировкой в клетки лимфоидного пула. К тому же данные о топографии расселения нативных миелокариоцитов в лимфоидных органах облученных реципиентов не однозначны и требуют дальнейшего уточнения или подтверждения.

На основании изложенного выше цель настоящей статьи — изучение топографии расселения и пролиферативной активности деконсервированных и нативных миелокариоцитов в организме облученных реципиентов, в частности, времени их появления, интенсивности пролиферации в миелоидных и лимфоидных органах и тканях.

**Материалы и методы.** В экспериментах использовали мышей линии СВА/Н — реципиенты и СВА/$T_6T_6$ — доноры костного мозга. Получение, замораживание и оттаивание костного мозга проводили по методу, описанному в литературе [2]. Реципиентов облучали в дозе 800 Р на установке РУМ-11. Хромосомный анализ выполнен в соответствии с известным методом [4]. Гистологические исследования разных органов проводили на серийных срезах толщиной 3—5μ, окрашенных гематоксилин-эозином. Результаты экспериментов обработаны статистически [1].

**Результаты экспериментов.** Полученные данные свидетельствуют о том, что донорские нативные миелокариоциты на протяжении всего срока наблюдения (с 5-х по 60-е сут) составляли более 90% делящейся




Матеріал, захищений авторським правом

популяции в костном мозге и селезенке облученных реципиентов (группа А). При трансплантации деконсервированных миелокариоцитов клетки донорского типа также преобладали в костном мозге и селезенке реципиентов в течение всего срока эксперимента (группа Д), однако на 5-е сут процент их был достоверно ниже, чем у мышей группы А (71±6,2% : 92±5,1% — костный мозг и 80±3,9% : 95±3,5% — селезенка; $p<0,05$). К 8-м сут число клеток деконсервированного

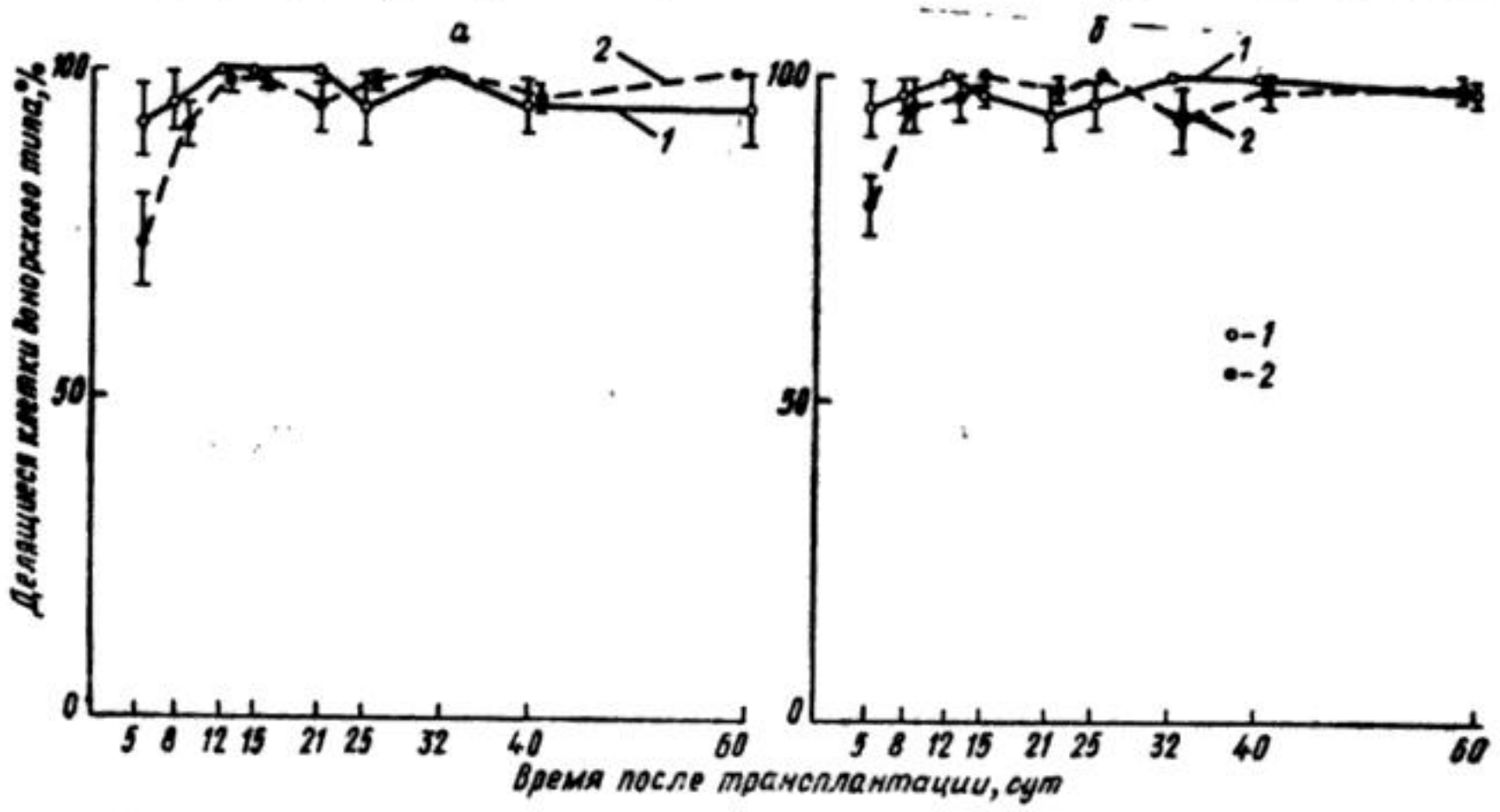



Рис. 1. Динамика расселения донорских нативных (*1*) и деконсервированных (*2*) миелокариоцитов в костном мозге (*а*) и селезенке (*б*) мышей, облученных в дозе 800 Р.

трансплантата увеличивалось, составляя 92±2,8 и 96±3,2% делящейся популяции в костном мозге и селезенке. Во все последующие сроки наблюдения существенных различий в процентном содержании клеток донорского типа в костном мозге и селезенке реципиентов групп А и Д не отмечалось (рис. 1).

Результаты гистологических исследований показали, что на 5-е сут число колоний, а также митотическая активность клеточных элементов в них были в большей степени выражены в селезенках реципиентов группы А (митотический индекс в группе Д составлял 68,7% от митотического индекса в группе А). Однако уже к 8-м сут митотическая активность клеточных элементов в колониях, образованных деконсервированными стволовыми клетками, повышалась по сравнению с 5-ми сут.

Репопуляция лимфоидных фолликулов относительно слабо выражена вплоть до 21-х сут и только к 5-й неделе у большинства мышей обеих групп селезенка была представлена нормальной гистологической картиной.

В тимусе реципиентов групп А и Д пролиферирующие клетки донорского типа не обнаруживались до 12-х сут. В этот период (5, 8 и 12-е сут) на фоне общего значительного снижения клеточности на препаратах отмечались лишь единичные клетки в митозе, причем значительное их число относилось к клеткам реципиента. С этого времени процент клеток донорского типа быстро увеличивался, достигая к 15-м сут 70%, а к концу 3-й недели — более 85% делящейся популяции (рис. 2, *а*). В дальнейшем абсолютное большинство делящихся клеток в тимусе обеих групп было представлено клетками донорского типа.

При гистологическом исследовании установлено, что в ранние сроки после облучения (5, 8-е сут) в тимусе реципиентов обеих опытных групп отмечалась значительная гибель лимфоцитов, подавление мито-

Матеріал, захищений авторським правом

тической активности и массовый выход лимфоцитов из тимуса, что приводило к стиранию границ между корковым и мозговым веществом. В период с 15-х по 21-е сут начинало увеличиваться количество лимфоцитов в кортикальной зоне, причем данный процесс протекал более интенсивно в тимусе мышей группы А. У мышей данной группы гистологическая структура тимуса приближалась к норме к 32-м сут, в то время как у мышей группы Д — только к 40-м.

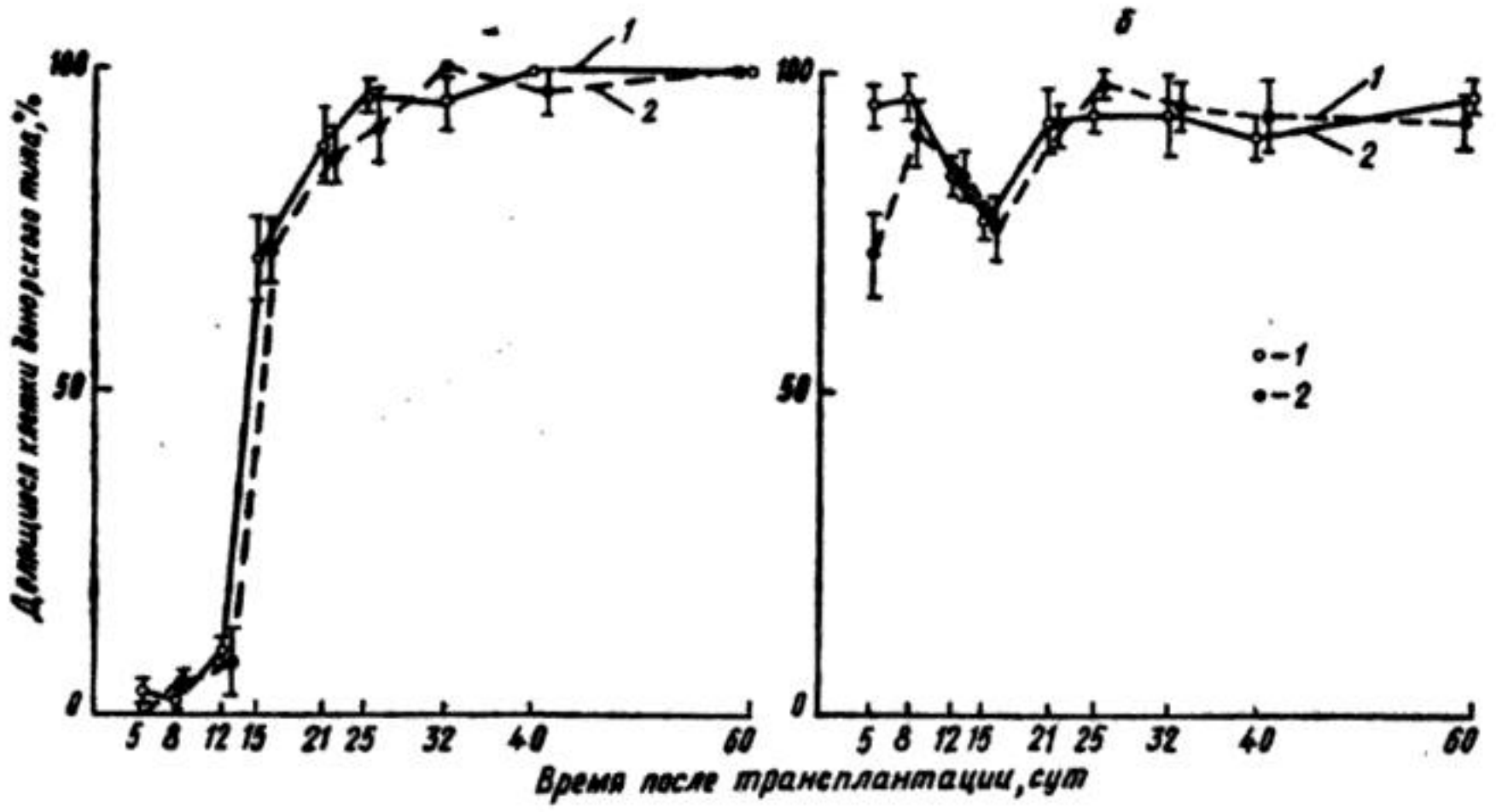



Рис. 2. Динамика расселения донорских нативных (*1*) и деконсервированных (*2*) миелокариоцитов в тимусе (*а*) и лимфатических узлах (*б*) мышей, облученных в дозе 800 Р.

В лимфоузлах митозы клеток нативного и деконсервированного костного мозга отмечались уже на первой неделе после трансплантации (рис. 2, *б*). Однако на 5-е сут процент клеток донорского типа был достоверно ниже в лимфоузлах реципиентов группы Д ($72\pm5{,}8\%$ : : $95\pm3{,}2\%$; $p<0{,}05$). К 8-м сут содержание деконсервированных клеток в делящейся популяции увеличивалось до $90\pm4{,}5\%$, достоверно не отличаясь в этот и все последующие сроки наблюдения от аналогичного показателя у мышей группы А.

При гистологическом изучении в лимфоузлах реципиентов обеих групп отмечается значительное снижение общего числа лимфоцитов в период с 5-х по 8-е сут. В дальнейшем клеточный состав лимфоузлов постепенно восстанавливается. Начиная с 21-х сут наблюдается восстановление герминативных центров, причем пролиферация клеток в герминативных центрах в большей степени выражена у мышей группы А. На 21-е сут вокруг вторичных фолликулов начинала формироваться периферическая зона, однако малые лимфоциты располагались в ней рыхло и только к 30-м сут наблюдалась гиперплазия ее малыми и средними лимфоцитами. Репарация паракортикальной зоны лимфоидными элементами отмечалась у мышей обеих групп к 40-м сут.

Полученные результаты позволяют заключить, что деконсервированные миелокариоциты, как и нативные, приживляются и пролиферируют в организме облученных реципиентов, дифференцируясь в дальнейшем не только в миелоидный, но и в лимфоидный росток кроветворения. Топография расселения деконсервированных миелокариоцитов не отличается от аналогичных свойств нативных миелокариоцитов, однако в ранние сроки (5-е сут) процент клеток донорского типа значительно ниже в костном мозге, селезенке и лимфоузлах реципиентов с трансплантатом деконсервированного костного мозга. В этот же срок



Матеріал, захищений авторським правом

в указанных органах и тканях отмечалось снижение митотической активности клеток деконсервированного трансплантата.

Учитывая, что число делящихся клеток донорского типа зависит от степени пролиферативной активности введенных клеток, можно предположить, что указанные различия в процентном содержании делящихся клеток у мышей групп А и Д обусловлены более низкой пролиферативной активностью деконсервированных миелокариоцитов в ранние сроки после трансплантации.


1. *Ашмарин И. П., Воробьев А. А.* Статистические методы в микробиологических исследованиях. — Л. : Медгиз, 1962. — 181 с.
2. *Пушкарь Н. С., Даценко Б. М., Иткин Ю. А., Щелокова А. В.* Глубокое охлаждение как метод консервирования и длительного хранения костного мозга. — Клин. хирургия, 1967, № 12, с. 25—26.
3. *Хаитов Р. М.* Экспериментальный анализ практически значимых проблем трансплантации кроветворных тканей облученным реципиентам : Автореф: дис. ...д-ра мед. наук. — М., 1972. — 34 с.
4. *Ford C. E., Hamerton J. L., Barnes D. M.* Cytological identification of radiation chimeras. — Nature, 1956, 177, p. 452—454.
5. *Micklem H. S., Loutit J. F.* Tissue grafting and radiation. — New York : Acad. press., 1966. — 387 p.
6. *Micklem H. S., Ford C. E., Evans E. P., Ogden D. A.* Compartment and cell flows within the mouse haemopoietic system. — Cell. Tissue Kinet.. 1975, N 8, p. 219—322.
7. *Takada A., Takada Y.* Proliferation of bone marrow and thymus cell in the myeloid and lymphoid organs of irradiated syngeneic host mice. — J. Exp. Med., 1972, 51, N 2, p. 474—479.



Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР



Поступила в редколлегию
05. 03. 78



УДК 577.158.1.612.26.547.422



***А. Д. Гордиенко, Е. В. Кудокоцева***


# ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ МИТОХОНДРИЙ В КЛЕТОЧНЫХ СУСПЕНЗИЯХ, ЭКСПОНИРОВАННЫХ В РАСТВОРЕ КРИОПРОТЕКТОРА

Клетки в суспензиях, полученных из тканей, — удобный объект для изучения их функционального состояния. Однако постановка таких экспериментов может быть корректной только в том случае, если экспериментатор уверен в том, что изначально клетки в суспензии были морфологически и функционально полноценны и методы их получения не повлияли на указанные свойства.

Согласно существующим данным [2], одним из довольно чувствительных методов оценки жизнеспособности клеток является функциональное состояние митохондрий, которые играют важную роль в жизнедеятельности клетки [3].

Цель настоящей работы — исследование дыхания и окислительного фосфорилирования тканевых лимфоцитов и гепатоцитов и влияния на эти процессы полиэтиленгликоля с молекулярной массой 400 (ПЭГ-400).

**Материалы и методика.** Лимфоциты выделяли из тимуса крысы и суспендировали в охлажденном до +4° С Рингер-фосфатном буфере ($РФ_б$): NaCl — 145 мМ, KCl — 5,6 мМ, $NaH_2PO_4 \times 2H_2O$ — 6 мМ, pH 7,4 с 1 мМ ЭДТА в слабо притертом гомогенизаторе. Полученную суспензию лимфоцитов фильтровали через четыре слоя нейлона и хранили в холодильнике при температуре от +2 до +4° С.

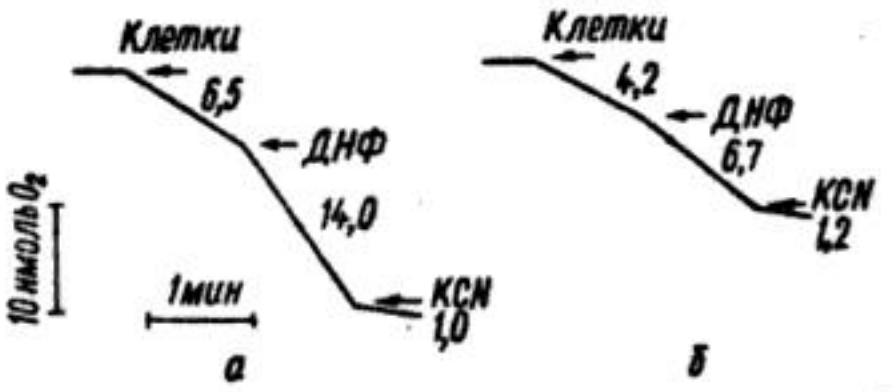
Изолированные клетки из печени крысы получали с помощью комплексона ЭДТА [1]. Клетки суспендировали в среде, содержащей 250 мМ сахарозы; 5 мМ KCl; 0,4 мМ $KH_2PO_4$; 0,4 мМ $NaH_2PO_4$; 2 мМ




Матеріал, захищений авторським правом

дитиотреитола; 2мМ ЭДТА; 0,8 мМ $MgCl_2$; 1% альбумина pH 7,4. Дыхание регистрировали платиновым электродом типа Кларка. Объем полярографической ячейки составлял 0,5 мл. При работе с лимфоцитами в ячейку вносили $5\times10^7$ клеток. Инкубационной средой служил $РФ_6$, измерения проводили при +37° С.

Измерение дыхания гепатоцитов проводили в среде суспендирования клеток при +30° С, в ячейку вносили $2\times10^6$ клеток. Для исследования влияния полиэтиленгликоля-400 (ПЭГ-400) на дыхательную активность его инкубировали с клетками при +4° С в течение 15 и 30 мин. Жизнеспособность клеток дополнительно оценивали с помощью окраски 0,2%-ным трипановым синим.




Дыхание изолированных лимфоцитов (*а*) и гепатоцитов на эндогенных субстратах (*б*).

Инкубационная смесь для лимфоцитов содержала $РФ_6$, pH 7,4. Добавки: клетки — $5\cdot10^7$, ДНФ — 20 мкМ, KCN — 1 мМ. Инкубационная смесь для гепатоцитов содержала среду суспендирования клеток, pH 7,4. Добавки: клетки — $1\cdot10^6$, ДНФ — 120 мкМ, KCN — 1 мМ.
Масштаб по горизонтали 1 мин; по вертикали — 10 нмоль кислорода. Цифры над кривыми обозначают скорость поглощения кислорода клетками, нмоль/мин.

**Результаты и их обсуждение.** Количество жизнеспособных лимфоидных клеток и гепатоцитов в суспензиях по данным суправитального красителя составляла 95—98%. Клетки были округлой формы с отчетливо контурированными ядрами.

При использовании в качестве среды выделения $РФ_6$ с 1 мМ ЭДТА можно получить лимфоциты, эндогенное дыхание которых стимулируется при добавлении 2,4-динитрофенола (ДНФ) в 2,0—2,5 раза. Стимуляция дыхания разобщителем в клетках сохраняется на том же уровне в течение 8 ч после их выделения. Изолированные клетки печени при добавлении к ним эффективной концентрации ДНФ потребляют кислород в 1,6—1,7 раза быстрее, чем на эндогенных субстратах. Стимуляция дыхания разобщителем мало изменяется при варьировании температуры среды в ячейке от +30 до +37° С. Скорость потребления кислорода и ответ на действие ДНФ суспензией свежевыделенных лимфоцитов в $РФ_6$, среде 199 и $РФ_6$ +20% инактивированной сыворотки почти одинаковы. Возможно, это объясняется тем, что дыхательная цепь митохондрий лимфоцитов находится в условиях полного насыщения эндогенными субстратами, а также непроницаемостью плазматической мембраны лимфоцитов для экзогенных субстратов.

Добавление 100—500 мкМ АДФ почти не влияет на дыхание свежевыделенных лимфоцитов и гепатоцитов, что указывает на низкую проницаемость клеточной оболочки для этого вещества. Выявленное нами окисление эндогенных субстратов в лимфоцитах и гепатоцитах свидетельствует в пользу митохондриального дыхания, поскольку в опытах клетки оказались чувствительны к KCN (рисунок).

Измерение эндогенного дыхания клеток и степени сопряженности окисления и фосфорилирования — довольно чувствительный тест оценки степени жизнеспособности клеток. Так, в работе Баур и др. [2] показано, что при хранении клеточной суспензии в течение 21 ч при температуре 0° С наблюдается уменьшение дыхательной активности. Данные, полученные нами при хранении лимфоидных клеток в $РФ_6$ при температуре от 2 до 4° С и гепатоцитов в среде суспендирования при температуре от 2 до 4° С показывают, что ко 2-м сут развиваются процессы, ведущие к нарушению активности для изолированных клеток (понижение степени сопряжения окисления и фосфорилирования), хотя потребление кислорода лимфоцитами остается высоким еще и на 3-и сут после выделения.

Исследование влияния 15-минутной инкубации клеток с 10%-ным



Матеріал, захищений авторським правом

ПЭГ-400 при температуре +4° С на дыхание и окислительное фосфорилирование клеток показало (таблица), что криопротектор не оказывает существенного влияния на скорость потребления кислорода суспензиями клеток. Вместе с тем снижение уровня ответа на 2,4-ДНФ при инкубации клеток с криопротектором в течение 30 мин вызывает снижение отношения $V_{ДНФ}/V_0$, что свидетельствует о разобщении дыхания и окислительного фосфорилирования в митохондриях лимфоцитов и гепатоцитов.

**Влияние 10%-ного ПЭГ-400 на дыхательную активность лимфоцитов и гепатоцитов ($M \pm m$; $n = 4$)**

| Вариант опыта | Потребление кислорода, нмоль | | | Ответ на ДНФ | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | эндогенное дыхание | после инкубации клеток с ПЭГ-400, 15 мин | после инкубации клеток с ПЭГ-400, 30 мин | после эндогенного дыхания | после инкубации клеток с ПЭГ-400, 15 мин | после инкубации клеток с ПЭГ-400, 30 мин |
| Лимфоциты, $5 \cdot 10^7$ клеток | 6,5±0,5 | 6,4±0,5 | 6,4±0,5 | 2,0±0,1 | 2,0±0,1 | 1,65±0,1 |
| Гепатоциты, $1 \cdot 10^6$ клеток | 4,2±0,3 | 4,1±0,3 | 3,9±0,2 | 1,6±0,1 | 1,6±0,1 | 1,3±0,05 |

Следовательно, ПЭГ-400 в 10%-ной концентрации оказывает токсическое действие на митохондрии клеток при инкубировании их с криопротектором более чем 15 мин при температуре +4° С.

Таким образом, используемые нами методы позволяют получить суспензии клеток из лимфоидных органов и печеночной ткани, которые можно применять для исследования энергетических процессов в них при действии на клетки низких температур и криопротекторов.

1. *Канàева И. П., Карякин А. В., Аленичева Т. В. и др.* Дыхание и окислительное фосфорилирование в изолированных клетках печени. — Цитология, 1975, 17, № 5, с. 545—551.
2. *Baur H., Kasperek S., Pfaff E.* Criteria of viability of isolated liver cells. — Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem., 1975, **356**, N 6, p. 827—838.
3. *Sherman J. K.* Viability assay of tissue and organs. — Cryobiology, 1967, **4**, N 3, p. 137—139.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
28. 02. 79

УДК 57.043.615.9

***В. М. Гучок***

# СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТОКСИЧНОСТИ ЭТИЛЕНГЛИКОЛЯ, ПЭО-400 И ПЭО-1500 ДЛЯ КРЫС И МЫШЕЙ В РАННЕМ ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ

Этиленгликоль и его оксиэтильные производные — полиэтиленоксиды со средней молекулярной массой 400 и 1500 (ПЭО-400 и ПЭО-1500) являются активными криопротекторами. Полиэтиленоксиды широко используются в медико-биологической и фармацевтической практике. Так, ПЭО-400 применяется для криоконсервирования ядросодержащих клеток крови и костного мозга человека и животных [6, 8, 10], а перспектива широкого применения ПЭО-1500 обусловлена его высокой криозащитной активностью при криоконсервировании эритроцитов человека [11, 12].



Матеріал, захищений авторським правом

Важно отметить, что ПЭО-400 и ПЭО-1500 не требуют отмывания перед введением размороженных клеточных суспензий в организм. Размороженные клетки крови и костного мозга с криопротектором можно вводить взрослым и детям. Однако в доступной литературе не удалось найти данных о токсичности ПЭО-400 и ПЭО-1500 для молодых животных и детей. Вместе с тем известно, что молодые животные и дети младшего возраста, как правило, более чувствительны к действию лекарств, чем взрослые. Известны также выраженные морфологические особенности и различия физиологических функций животных и детей на разных этапах их постнатального развития.

Все это послужило основанием для настоящего исследования, посвященного сравнительному изучению токсичности этиленгликоля, ПЭО-400 и ПЭО-1500 для животных ранних периодов постнатального развития и взрослых особей, результаты которого должны быть использованы при обосновании безопасных для детей доз указанных препаратов.

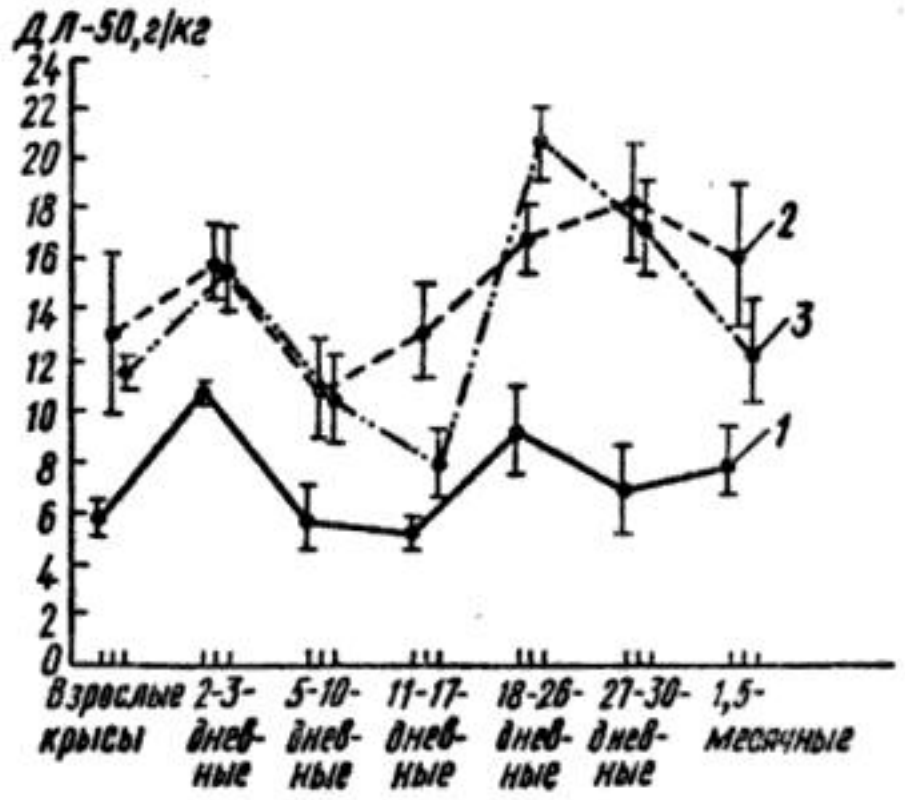



Рис. 1. Изменение токсичности этиленгликоля, ПЭО-400 и ПЭО-1500 для крыс в постнатальном онтогенезе:

*1* — этиленгликоль; *2* — ПЭО-400; *3* — ПЭО-1500.

**Методы исследования.** Опыты проведены на беспородных белых крысах и мышах обоего пола различных возрастов (от новорожденных до половозрелых). В соответствии с рекомендациями И. А. Аршавского [1], Д. У. Эрматовой [15], В. Д. Розановой [13] и других исследователей, все животные были разделены на указанные в табл. 1 — 3 группы. Всего использовано 529 крысят, 650 мышат, 88 половозрелых крыс и 85 половозрелых мышей.

Этиленгликоль, ПЭО-400 и ПЭО-1500 вводили внутрибрюшинно однократно в 20%-ных растворах, приготовленных на 0,9%-ном растворе NaCl. В качестве интегрального показателя токсичности, отражающего всю совокупность развивающихся морфофункциональных изменений, учитывали гибель животных и ее сроки в течение 2-недельного наблюдения.

Верхние параметры токсичности определяли методом пробит-анализа по В. Б. Прозоровскому [7]. Кроме того, для всех возрастных групп животных вычисляли показатель функции угла наклона (S) по Литчфилду и Уилкоксону [16], суммарный показатель опасности по формуле $\frac{1}{\text{ДЛ-50}\cdot S}$ [14] и коэффициент видовой чувствительности.

**Результаты и их обсуждения.** Из сравнительных данных табл. 1—3 и рис. 1 видно, что изменения токсичности этиленгликоля, ПЭО-400 и ПЭО-1500 для крыс в период их раннего постнатального развития носят волнообразный и практически однотипный характер.

Острая токсичность этих криопротекторов для новорожденных крысят уступает соответственно в 1,56; 1,2 и 1,33 раза ее уровню, установленному для взрослых животных.

Заслуживает внимания заметное усиление токсичности изученных веществ к 5—17-дневному возрасту крысят, когда она в большей или меньшей мере приближается к уровню, свойственному взрослым крысам и даже превосходит его. К 18—26-дневному периоду развития животных степень токсичности исследуемых криопротекторов вновь снижается соответственно в 1,56; 1,26 и 1,75 раза по сравнению с ее уров-



Матеріал, захищений авторським правом

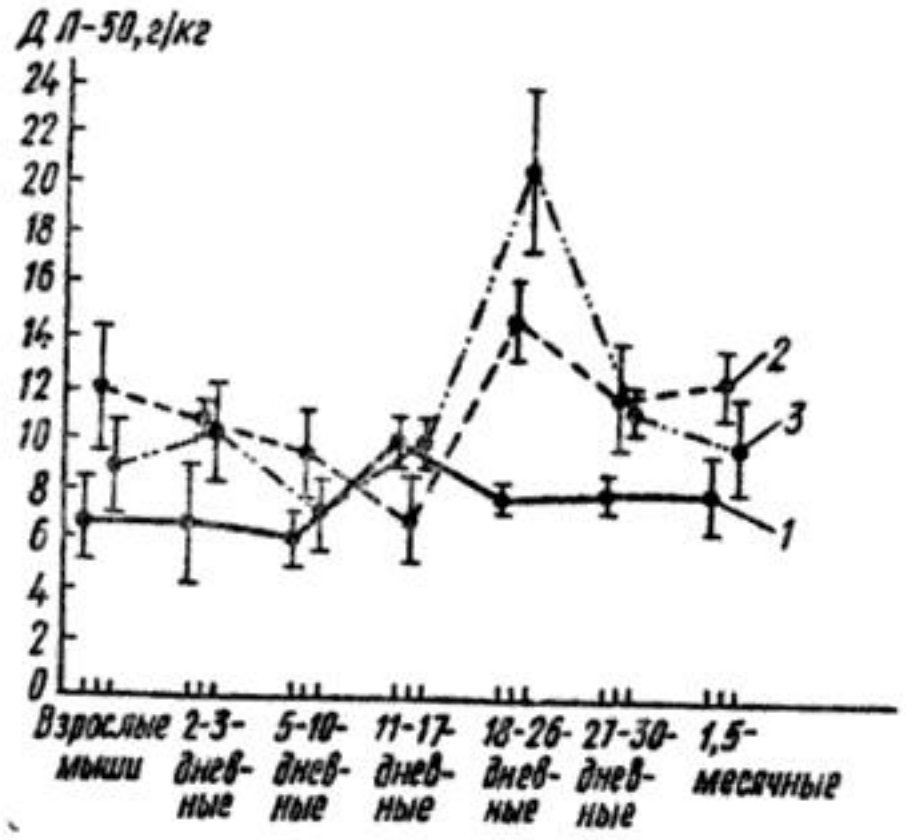



Рис. 2. Изменение токсичности этиленгликоля, ПЭО-400 и ПЭО-1500 для мышей в постнатальном онтогенезе:

*1* — этиленгликоль; *2* — ПЭО-400; *3* — ПЭО-1500.

нем для взрослых особей. В дальнейшем токсичность постепенно повышается и к 1,5-месячному периоду развития животных среднесмертельные дозы всех веществ не выходят за пределы доверительных границ ДЛ-50, установленных для взрослых крыс. Важно отметить, что наибольшая выносливость крысят к ПЭО-400 и ПЭО-1500 наблюдается в 3—4-недельном возрасте.

Данные, полученные в опытах на другом виде грызунов, — мышатах (табл. 1—3, рис. 2) показывают, что изменения токсичности этиленгликоля, ПЭО-400 и ПЭО-1500 в период раннего постнатального развития этих животных также носят фазный характер.

Отличительная особенность динамики изменений токсичности этиленгликоля, ПЭО-400 и в меньшей мере ПЭО-1500 для мышат (см. рис. 2) — отсутствие характерного пика повышения выносливости но-

Таблица 1

**Данные о токсичности этиленгликоля для крыс и мышей в раннем постнатальном онтогенезе**

| Вид, возраст и пол животных | Токсичность, г/кг | | | Другие критерии опасности развития острого смертельного отравления | | Коэффициент видовой чувствительности |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | $ДЛ_{16}$ | $ДЛ_{50}$ и ее доверительные границы | $ДЛ_{84}$ | $\frac{1}{ДЛ_{50} \cdot S}$ | S | |
| Крысы, взрослые самцы | 4,99 | 5,75 (5,03— 6,46) | 6,49 | 0,1525 | 1,14 | 1,19 |
| Крысята 2—3-дневные | 10,33 | 10,72(10,33—11,06) | 11,1 | 0,0900 | 1,03 | 1,62 |
| Крысята 5—10-дневные | 4,86 | 5,62 (4,28— 6,97) | 6,39 | 0,1546 | 1,15 | 1,08 |
| Крысята 11—17-дневные | 4,22 | 5,08 (4,35— 5,81) | 15,93 | 0,1661 | 1,18 | 1,97 |
| Крысята 18—26-дневные | 6,58 | 8,99 (7,11—10,87) | 11,40 | 0,0844 | 1,31 | 1,14 |
| Крысята 27—30-дневные | 4,76 | 6,70 (4,86— 8,54) | 8,63 | 0,1108 | 1,35 | 1,19 |
| Крысята 1,5-месячные | 6,06 | 7,70 (6,23— 9,17) | 9,33 | 0,1047 | 1,24 | 1,04 |
| Мыши, взрослые самцы | 4,78 | 6,87 (5,00— 8,74) | 8,95 | 0,1062 | 1,37 | 1,19 |
| Мышата 2—3-дневные | 2,68 | 6,61 (4,08— 9,14) | 10,55 | 0,0745 | 2,03 | 1,62 |
| Мышата 5—10-дневные | 4,74 | 6,06 (4,93— 7,19) | 7,37 | 0,1320 | 1,25 | 1,08 |
| Мышата 11—17-дневные | 9,05 | 10,02 (8,97—11,07) | 10,99 | 0,0906 | 1,10 | 1,97 |
| Мышата 18—26-дневные | 6,57 | 7,84 (7,23— 8,45) | 9,10 | 0,1081 | 1,18 | 1,14 |
| Мышата 27—30-дневные | 6,86 | 7,98 (7,14— 8,92) | 9,12 | 0,1089 | 1,15 | 1,19 |
| Мышата 1,5-месячные | 6,20 | 8,01 (6,38— 9,64) | 9,83 | 0,0990 | 1,26 | 1,04 |

Матеріал, захищений авторським правом

ворожденных животных к этим веществам, выявленного в опытах на крысах. Более того, отмечена тенденция к усилению токсичности этиленгликоля и ПЭО-400 для новорожденных мышат с дальнейшим постепенным ее нарастанием для всех изученных веществ к 5—10-дневному периоду развития животных.

Таблица 2

**Данные о токсичности ПЭО-400 для крыс и мышей в раннем постнатальном онтогенезе**

| Вид, возраст и пол животных | Токсичность, г/кг | | | Другие критерии опасности развития острого смертельного отравления | | Коэффициент видовой чувствительности |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | $ДЛ_{16}$ | $ДЛ_{50}$ и ее доверительные границы | $ДЛ_{84}$ | $\frac{1}{ДЛ_{50} \cdot S}$ | S | |
| Крысы, взрослые самцы | 7,7 | 13, 0( 9,84—16,16) | 18,2 | 0,0499 | 1,54 | 1,08 |
| Крысята 2—3-дневные | 13,35 | 15,59(14,02—17,16) | 17,83 | 0,0558 | 1,15 | 1,44 |
| Крысята 5—10-дневные | 8,67 | 10,71( 8,66—12,76) | 12,74 | 0,0772 | 1,21 | 1,13 |
| Крысята 11—17-дневные | 11,60 | 12,90(10,97—14,83) | 14,21 | 0,0700 | 1,10 | 1,86 |
| Крысята 18—26-дневные | 14,51 | 16,41(14,97—17,84) | 18,32 | 0,0544 | 1,12 | 1,11 |
| Крысята 27—30-дневные | 14,74 | 17,78(15, 4—20,15) | 20,82 | 0,0473 | 1,19 | 1,50 |
| Крысята 1,5-месячные | 11,66 | 15,62(12,85—18,38) | 17,49 | 0,0520 | 1,23 | 1,26 |
| Мыши, взрослые самцы | 9,59 | 12, 0( 9,41—14,59) | 16,21 | 0,0641 | 1,30 | 1,08 |
| Мышата 2—3-дневные | 10,19 | 10,79(10,01—11,57) | 11,38 | 0,0877 | 1,05 | 1,44 |
| Мышата 5—10-дневные | 7,36 | 9,47( 7,67—11,27) | 11,57 | 0,0845 | 1,25 | 1,13 |
| Мышата 11—17-дневные | 4,35 | 6,93( 5,05— 8,80) | 9,51 | 0,0975 | 1,48 | 1,86 |
| Мышата 18—26-дневные | 12,96 | 14,76(13,09—16,43) | 16,68 | 0,0599 | 1,13 | 1,11 |
| Мышата 27—30-дневные | 9,76 | 11,84( 9,74—13,94) | 13,92 | 0,0707 | 1,19 | 1,50 |
| Мышата 1,5-месячные | 10,25 | 12,35(10,87—13,83) | 14,45 | 0,0680 | 1,19 | 1,26 |

Заслуживает внимания наблюдающееся достоверное ($p<0,05$) повышение в 1,75 раза токсичности ПЭО-400 и в 1,5 раза — ПЭО-1500 соответственно для мышат и крысят 11—17-дневного возраста.

Наибольшая выносливость мышат и крысят к ПЭО-1500 и ПЭО-400 наблюдается в 18—26-дневном возрасте животных. К этому сроку токсичность ПЭО-400 и ПЭО-1500 уменьшается в 1,23 и 2,29 раза по сравнению с ее уровнем для взрослых мышей. Выносливость 1,5-месячных мышей к изученным криопротекторам существенно не отличается от выносливости взрослых животных. Гибель крысят, мышат и взрослых животных после введения исследуемых веществ наступает примерно в одни и те же сроки.

Приведенные выше экспериментальные данные позволяют считать, что изученные криопротекторы при однократном введении в организм во все периоды раннего постнатального онтогенеза крыс и мышей проявляют себя как малотоксичные вещества.

Известно, что сравнение опасности действия веществ только по величинам среднесмертельных доз может привести к ошибочным выводам. Проведенное в связи с этим исследование некоторых других пока-



Матеріал, захищений авторським правом

зателей опасности развития острого смертельного отравления при однократном введении больших доз этиленгликоля, ПЭО-400 и ПЭО-1500 (см. табл. 1—3) показало, что степень риска отравления крысят и мышат хорошо согласуется с изменениями среднесмертельных доз веществ, обусловленными ранним постнатальным развитием животных.

Таблица 3

**Данные о токсичности ПЭО-1500 для крыс и мышей в раннем постнатальном онтогенезе**

| Вид, возраст и пол животных | Токсичность, г/кг | | | Другие критерии опасности развития острого смертельного отравления | | Коэффициент видовой чувствительности |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | $ДЛ_{16}$ | $ДЛ_{50}$ и ее доверительные границы | $ДЛ_{84}$ | $\frac{1}{ДЛ_{50} \cdot S}$ | S | |
| Крысы, взрослые самцы | 9,9 | 11,52(10,86—12,18) | 13,4 | 0,0746 | 1,16 | 1,28 |
| Крысы, взрослые самки | 10,15 | 11,50( 9,71—13,29) | 12,75 | 0,0776 | 1,12 | 1,28 |
| Крысята 2—3-дневные | 12,98 | 15,35(13,62—17,07) | 17,72 | 0,0557 | 1,17 | 1,49 |
| Крысята 5—10-дневные | 9,1 | 10,33( 8,51—12,15) | 11,56 | 0,0861 | 1,12 | 1,45 |
| Крысята 11—17-дневные | 6,02 | 7,69( 6,19— 9,19) | 9,36 | 0,1040 | 1,25 | 1,29 |
| Крысята 18—26-дневные | 18,66 | 20,20(18,65—21,74) | 21,72 | 0,0458 | 1,08 | 1,02 |
| Крысята 27—30-дневные | 14,26 | 16,72(14,80—18,64) | 19,18 | 0,0515 | 1,16 | 1,49 |
| Крысята 1,5-месячные | 9,03 | 12,01( 9,98—14,07) | 14,99 | 0,0646 | 1,29 | 1,21 |
| Мыши, взрослые самки | 7,5 | 9, 0( 6,97—11,03) | 10,5 | 0,0941 | 1,18 | 1,28 |
| Мышата 2—3-дневные | 7,18 | 10,29( 8,25—12,33) | 13,44 | 0,0709 | 1,37 | 1,49 |
| Мышата 5—10-дневные | 5,93 | 7,14( 5,56— 8,72) | 8,34 | 0,1177 | 1,19 | 1,45 |
| Мышата 11—17-дневные | 8,57 | 9,96( 8,92—10,99) | 11,58 | 0,0864 | 1,16 | 1,29 |
| Мышата 18—26-дневные | 10,49 | 20,68(17,24—24,14) | 30,88 | 0,0279 | 1,73 | 1,02 |
| Мышата 27—30-дневные | 9,6 | 11, 2(10,23—12,26) | 12,80 | 0,0770 | 1,15 | 1,49 |
| Мышата 1,5-месячные | 7,11 | 9,91( 7,94—11,88) | 12,71 | 0,0754 | 1,34 | 1,21 |

Наиболее опасным для крысят и взрослых крыс в изученном ряду является этиленгликоль. Коэффициенты видовой чувствительности всех изученных веществ во все возрастные периоды животных не превышали 1,01—1,97 (см. табл. 1—3), что, по данным И. В. Саноцкого и И. П. Улановой [14], свидетельствует о невыраженности ее различий. Этот факт также представляется важным моментом в характеристике динамики изменений токсичности изученных криопротекторов для животных в периоде их раннего постнатального онтогенеза.

Мы не изучали причин выявленных колебаний выносливости экспериментальных животных к изученным криопротекторам в период их раннего постнатального развития. Однако правомерно предположить, что в их основе лежит комплекс изученных многими исследователями [1, 2, 13, 15] морфологических особенностей и различий физиологических функций и их регуляторных механизмов, свойственных животным ранних периодов постнатального развития, а также различия химической структуры веществ.



Матеріал, захищений авторським правом

Выявленная нами малая токсичность ПЭО-400 и ПЭО-1500 при однократном введении в организм животных во все периоды их раннего постнатального развития, отсутствие при этом выраженных видовых различий выносливости подопытных грызунов к веществам и хорошая корреляция между степенью риска отравления молодых животных, установленной по суммарному показателю опасности [14], к величинам функции угла наклона (S) и опасностью, вытекающей из среднесмертельных доз веществ, а также учитывая ранее установленные данные о малой токсичности веществ на низком уровне воздействия [3—5, 9] позволяют прийти к выводу о возможности применения ПЭО-400 и ПЭО-1500 в детской клинической практике. Вместе с тем в связи с выявленными колебаниями токсичности этих веществ с периодами достоверного повышения ее важно отметить необходимость проявления определенной осторожности при обосновании безопасных доз для детей.

В заключение можно сделать ряд выводов.

1. Выносливость белых крыс и мышей к этиленгликолю, ПЭО-400, ПЭО-1500 варьирует и зависит от вида животных, периодов постнатального развития и особенностей химической структуры веществ.
2. ПЭО-400, ПЭО-1500 и этиленгликоль при однократном введении крысам и мышам во все периоды их раннего постнатального онтогенеза проявляют себя как малотоксичные вещества.
3. Видовые различия выносливости крыс и мышей к ПЭО-400, ПЭО-1500 и этиленгликолю во все возрастные периоды не выражены.
4. Установленные колебания токсичности ПЭО-400 и ПЭО-1500 должны учитываться при использовании веществ в экспериментальной и детской клинической практике, в том числе при определении безопасных доз для детей.


1. *Аршавский И. А.* Очерки по возрастной физиологии. — М. : Медицина, 1967. — 476 с.
2. *Гинецинский А. Г.* Физиологические механизмы водно-солевого равновесия. — М.; Л. : Изд-во АН СССР, 1963. — 427 с.
3. *Гучок М. М., Верховский Б. А., Козлова В. Ф. и др.* О токсичности полиэтиленоксида-1500. — В кн.: Тез. докл. 3-го съезда фармакологов УССР. Винница, 1977, с. 52—54.
4. *Гучок М. М., Верховский Б. А., Мазалов В. К. и др.* О влиянии полиэтиленоксида молекулярного веса 1500 на функции печени и свертываемость крови. — Криобиология и криомедицина, 1978, вып. 4, с. 71—73.
5. *Козлова В. Ф., Гучок М. М., Щетинский И. М., Верховский Б. А.* Патоморфологическая оценка влияния криопротектора — полиэтиленоксида молекулярного веса 1500 на организм животных. — Криобиология и криомедицина, 1978, вып. 4.
6. *Полякова А. И., Цуцаева А. А., Иткин Ю. А.* Оценка сохранности клеток лейкоконцентрата при низкотемпературной консервации (—196° С) под защитой полиэтиленоксида. — Цитология и генетика, 1974, 3, № 2, с. 211—215.
7. *Прозоровский В. Б.* Использование метода наименьших квадратов для пробит-анализа кривых летальности. — Фармакология и токсикология, 1962, № 1, с. 115—119.
8. *Пушкарь Н. С., Белоус А. М., Цуцаева А. А. и др.* Консервирование клеток костного мозга под защитой полиэтиленоксидов. — В кн.: Низкотемпературное консервирование костного мозга. Киев, 1976, с. 118—145.
9. *Пушкарь Н. С., Василенко Н. М., Лабунская В. В. и др.* Токсикологическая характеристика отечественного криофилактика полиэтиленоксида с молекулярным весом 400. — Врачеб. дело, 1972 ,№ 5, с. 120—122.
10. *Пушкарь Н. С., Иткин Ю. А., Зимин В. В. и др.* А. с. 395054 (СССР). Способ консервирования костного мозга. — Опубл. в БИ., 1973, № 35.
11. *Пушкарь Н. С., Шраго М. И., Бредихина Л. П. и др.* А. с. 560613 (СССР). Способ консервирования эритроцитов. — Опубл. в БИ., 1977, № 21.
12. *Пушкарь Н. С., Шраго М. И., Белоус А. М., Калугин Ю. В.* Криопротекторы. — Киев : Наук. думка, 1978. — 204 с.
13. *Розанова В. Д.* Очерки по экспериментальной возрастной фармакологии. — Л. : Медицина, 1968. — 323 с.
14. *Саноцкий И. В., Уланова И. П.* Критерии вредности в гигиене и токсикологии при оценке опасности химических соединений. — М. : Медицина, 1975. — 328 с.
15. *Эрматова Д. У.* К анализу коррелятивных соотношений между интенсивностью энергетических затрат, деятельностью дыхательной и сердечно-сосудистой систем у крыс и кроликов в процессе постнатального развития : Автореф. дис. ...канд. мед. наук. — М., 1965. — 16 с.




Матеріал, захищений авторським правом

16. *Litchfield J., Wilcoxon Jr.* and *F.* A simplified method of evaluating dose-effect experiments. — J. Pharmacol. and Exp. Ther., 1949, **96**, N 2, p. 99—113.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
16. 02. 79

УДК 57:536.48.047:542.65

***Л. Г. Кулешова, Л. Ф. Розанов***

# ИЗУЧЕНИЕ КИНЕТИКИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА С КРИОПРОТЕКТОРАМИ И СОЛЯМИ

На различных этапах низкотемпературного консервирования клетки подвергаются действию высококонцентрированных веществ. Это прежде всего имеет место на этапе добавления к клеткам защитной среды и затем — на этапе фазового перехода. В настоящей статье исследована кинетика взаимодействия эритроцитов человека с криопротекторами (глицерин, ПЭО-100, ПЭО-400, ПЭГ-1500) и солями (NaCl, лимоннокислый натрий) разной концентрации, и, таким образом, моделирован ряд явлений (осмотический шок, гиперконцентрация солей), сопровождающих консервирование клеточных суспензий, а также оценено состояние формы и размера клетки после такого взаимодействия. Исследования проведены методом фазово-контрастной микроскопии с использованием инвертированного микроскопа МБИ-13. В эксперименте к тонкому слою суспензии эритроцитов, расположенному на покровном стекле, добавляли большую каплю исследуемого раствора при температуре +22° С. pH растворов предварительно доводили до 7,0±0,2. Осмотические свойства криопротекторов и солей изучали криоскопическим методом. Как следует из представленных на рис. 1 данных, клетки подвергались действию гипотонических, изоосмотических и гипертонических растворов. Кинетику взаимодействия клеток с растворами регистрировали на кинопленку 35 мм в течение 3 мин с интервалами между кадрами 3 с, что позволяло наблюдать реакцию максимум через 2—2,5 с после ее начала.

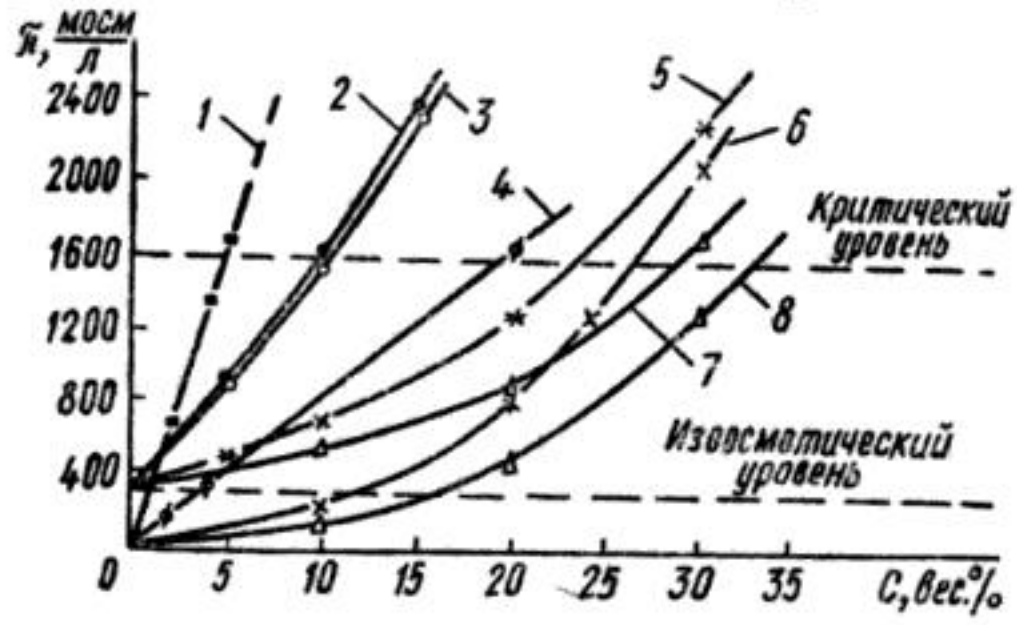


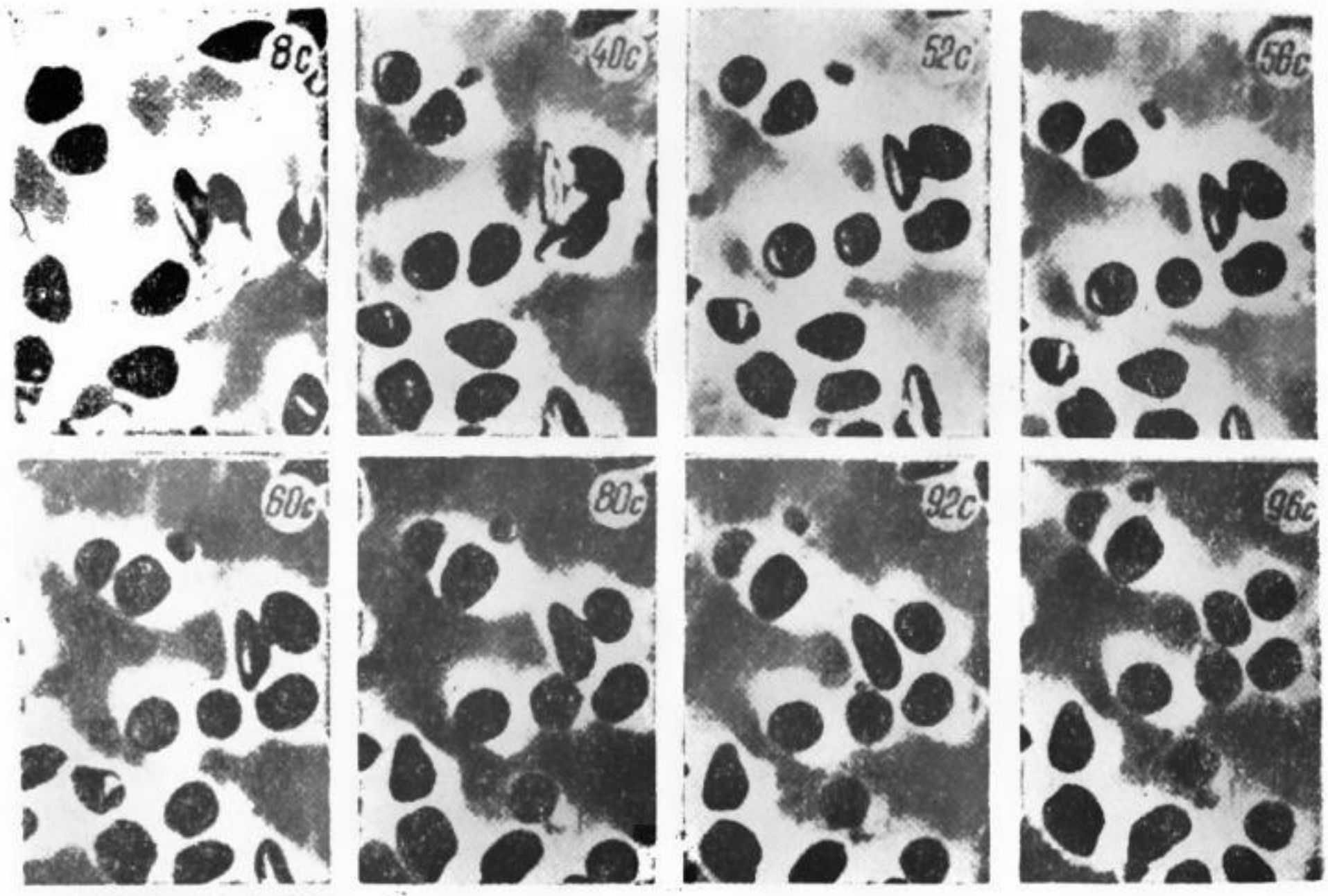

Рис. 1. Зависимость осмотического давления от концентрации криопротектора, соли в растворе:

*1* — NaCl; *2* — глицерин; *3* — ПЭО-100; *4* — лимоннокислый Na; *5* — ПЭО-400; *6* — ПЭО-1500; *7* — ПЭГ-1500 (на физиологическом растворе); *8* — ПЭГ-1500.

**Результаты и обсуждение.** *Реакция эритроцитов на введение* NaCl. При добавлении к суспензии эритроцитов 2%-ного NaCl (688 мосм/л) изменение формы клеток развивалось во времени и проявлялось в возникновении тутовидности на тороидальном ободке. Центральная ямка при этом сохранялась. Введение 4%-ного и 5%-ного NaCl (соответственно 1306 и 1623 мосм /л) сопровождалось быстрым сжатием клеток (менее чем за 1 с), при котором мембрана принимала складчатую форму. В течение экспозиции она расправлялась, однако деформация оставалась значительной. Взаимодействие эритроцитов с 10%-ным NaCl (более 2000 мосм/л) завершалось стабилизацией обезвоженного состояния. При добавлении к суспензии 20%-ного NaCl клетки принимали вытянутую форму, которая через 40 с резко трансформировалась в не-



Матеріал, захищений авторським правом




*а*

Рис. 2. Развитие гипертонического гемолиза при взаимодействии эритроцитов человека с 20%-ным раствором NaCl:

*а* — трансформация эритроцитов; *б* — зависимость величины гипертонического гемолиза от времени взаимодействия.

полную, а затем полную сферу, после чего наблюдалось образование теней (рис. 2, *а*). Время перехода обезвоженных клеток в сферическую форму для каждой отдельной клетки составляло 30 с. Обесцвечивание, связанное с выходом гемоглобина, наблюдалось в течение 20 с. На рис. 2, *б* приведена зависимость величины гипертонического гемолиза эритроцитов от времени взаимодействия с 20%-ным раствором NaCl.

*Реакция эритроцитов на введение лимоннокислого* Na. Введение в суспензию 2%-ного лимоннокислого Na (172 мосм/л) приводило к образованию клеток чашевидной формы. Затем образовывались выпячивания на мембране и проявлялась сферическая шиповидность. Существенных изменений формы клеток при добавлении 4 и 5%-ного цитрата Na (соответственно 306 и 360 мосм/л) не было (рис. 3). В присутствии 10%-ного лимоннокислого Na обезвоживание сопровождалось значительным уплощением эритроцитов с сохранением двояковогнутой формы. В период экспозиции восстановление исходного состояния не наблюдалось. Введение в суспензию 20%-ного лимоннокислого Na (1596 мосм/л) приводило к образованию вытянутых форм эритроцитов, сохраняемых в течение экспозиции.

*Реакция эритроцитов на введение глицерина.* При добавлении к суспензии эритроцитов 5 и 10%-ного растворов глицерина (соответ-



Матеріал, захищений авторським правом

ственно 881, 1559 мосм/л) наблюдалась незначительная деформация клеток с последующим полным восстановлением (в течение 30—40 с) исходной формы. В 20%-ном растворе глицерина (более 2000 мосм/л) эритроциты сильно уплощались. Восстановление двояковогнутой формы происходило в среднем за 1,2 мин. В 30 и 40%-ном глицерине эритроциты принимали вытянутые формы. Восстановление исходного состояния при этом наблюдалось через 1,5—2 мин.

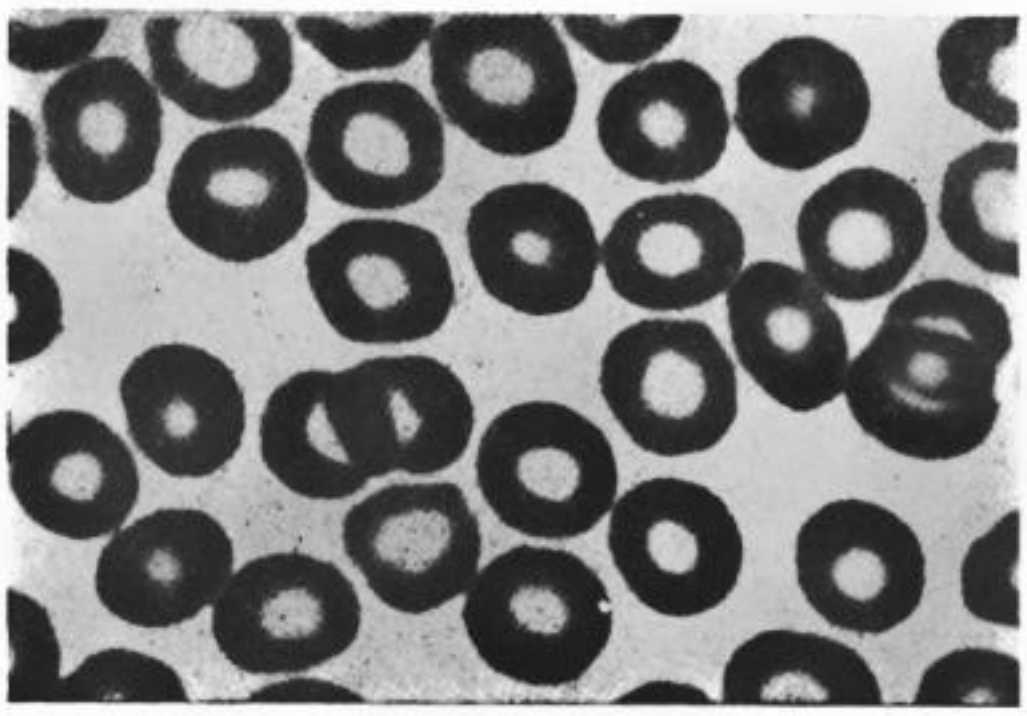


Рис. 3. Форма эритроцитов человека в изотонической среде (4%-ный лимоннокислый Na).

*Реакция эритроцитов на введение ПЭО-100.* Добавление к суспензии эритроцитов 5%-ного раствора ПЭО-100 (881 мосм/л) вызывало незначительное изменение формы клеток, полностью восстанавливаемой в течение 20—30 с. Реакция клеток на введение 10%-ного ПЭО-100 (1436 мосм/л) сопровождалась образованием чашевидных или куполообразных форм эритроцитов. В течение экспозиции частично восстанавливалось исходное состояние. При добавлении 20, 30, 40%-ного растворов ПЭО-100 клетки в результате обезвоживания принимали вытянутые формы, постепенно трансформируемые в чашевидные. Однако полное восстановление исходной формы не наблюдалось.

*Реакция эритроцитов на введение ПЭО-400.* Взаимодействие эритроцитов с 5 и 10%-ным (соответственно 452 и 661 мосм/л) растворами ПЭО-400 приводило к уплощению клеток. В течение экспозиции возникала симметричная шиповидность тороидального ободка и отмечалась трансформация клеток в сферические шиповидные формы. При введении в суспензию 20 и 30% ПЭО (соответственно 1177 и 2253 мосм/л) клетки в результате реакции принимали вытянутые чечевидные формы, которые сохранялись в течение экспозиции; 40%-ная концентрация ПЭО-400 вызывала значительную деформацию мембраны, принимающей складчатую форму. Наблюдалось также восстановление исходного состояния.

*Реакция эритроцитов на введение ПЭО-1500.* Реакция эритроцитов на введение 5%-ного водного раствора ПЭО-1500 (100 мосм/л) сопровождалась набуханием клеток и образованием теней. Объем эритроцитов в результате набухания увеличивался в среднем в 2,1 раза. При добавлении к теням эритроцитов 40%-ного водного раствора ПЭО-1500 наблюдалось их обезвоживание с уменьшением объема ниже максимального обезвоживания эритроцитов (рис. 4). При взаимодействии клеток с 10%-ным водным раствором ПЭО-1500 (204 мосм/л) также наблюдалось набухание, однако в течение экспозиции гемолиз не проявлялся. Реакция с 20%-ным водным раствором ПЭО-1500 (825 мосм/л) сопровождалась уплощением эритроцитов с сохранением двояковогнутой формы. Отмечается тенденция к агглютинации. При добавлении к суспензии 30%-ного и 40%-ного водных растворов ПЭО-1500 (2010 мосм/л) клетки сильно деформировались и принимали вытянутые формы. Наблюдалась значительная агглютинация клеток.

*Реакция эритроцитов на введение ПЭГ-1500.* Данная серия экспериментов была приготовлена на основе физиологического раствора. Добавление к эритроцитам 5%-ного раствора ПЭГ-1500 (400 мосм/л) не приводило к заметным изменениям формы клеток. Увеличение концентрации ПЭГ-1500 до 10% (510 мосм/л) вызывало незначительное

Матеріал, захищений авторським правом

уплощение. При добавлении к эритроцитам 20 и 30%-ного ПЭГ-1500 (соответственно 850 и 1645 мосм/л) обезвоживание клеток, выраженное в их уплощении, возрастало, однако деформация мембраны не отмечалась. Реакция клеток на введение 40%-ного раствора ПЭГ-1500 отличалась резким изменением формы и выраженной агглютинацией. Анализ полученных результатов показал, что поведение эритроцитов человека соответствует осмолярности действующих на них растворов криопротекторов и солей. Так, в 2%-ном растворе лимоннокислого Na (172 мосм/л), в 5%-ном растворе ПЭО-1500 и 10%-ном ПЭО-1500 (соответственно 100 и 204 мосм/л) клетки набухают. В 5%-ном растворе ПЭО-1500 в результате набухания объем эритроцитов становится больше критического, что приводит к выходу гемоглобина из клеток. При внеклеточной осмотичности выше 172 мосм/л условия для выхода гемоглобина не возникают. В растворах, осмолярность которых близка к изоосмотическому уровню (300—310 мосм/л), значительных изменений размеров и формы клеток не наблюдается. Гипертонические растворы всех изученных веществ обезвоживают клетки. Малое время обезвоживания (меньше 1 с) свидетельствует о большой проницаемости мембраны эритроцитов для молекул воды. Объем и форма обезвоженных клеток полностью восстанавливаются только в растворах глицерина. Время проникновения глицерина в клетку в наших опытах не превышало 1—2 мин. Эти данные согласуются с данными Мазура и др. [2], которые исследовали проницаемость человеческих эритроцитов для одно- и двухмолярного растворов глицерина путем измерения времени 50%-ного гемолиза в этих растворах, гипотоничных по NaCl, а также путем измерения времени проявления осмотического шока клеток при быстром разбавлении. Ими показано, что 90%-ная равновесная концентрация глицерина достигается через 1,2 мин при 0° С и через 0,6 мин при 20° С, а по отношению к внутриклеточным непроникающим растворенным веществам — за 7 мин при 0° С и за 3,2 мин при 20° С. Стабилизация формы клеток в результате обезвоживания в остальных исследуемых растворах свидетельствует об отсутствии способности их молекул проникать в клетку за время экспозиции. О повреждающей роли обезвоживания известна концепция Меримена [3], согласно которой повреждение клеток при замораживании может происходить

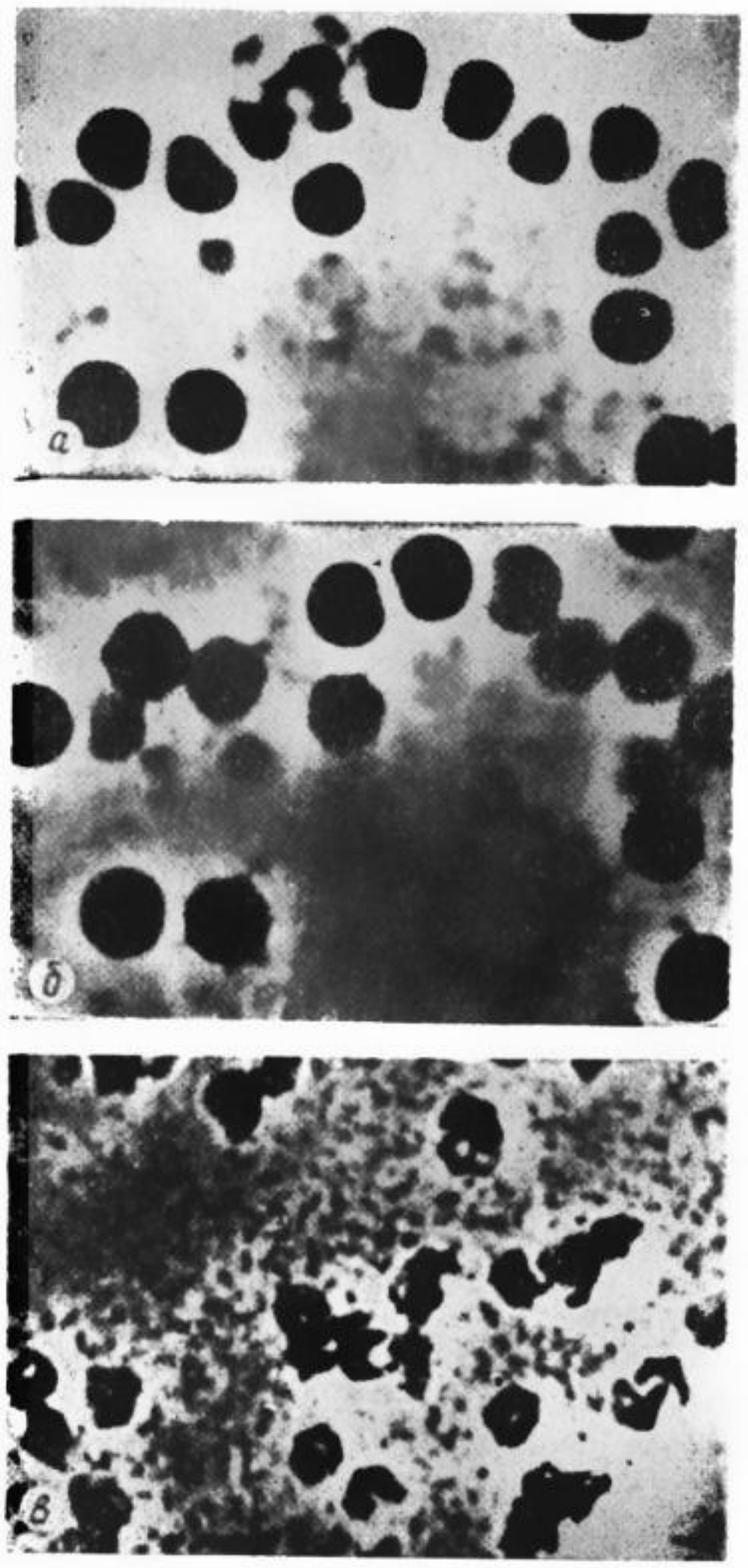



Рис. 4. Развитие гипотонического гемолиза при взаимодействии эритроцитов человека с 5%-ным раствором ПЭО-1500:
*а* — через 4 с; *б* — через 72 с; *в* — обезвоживание теней 40%-ным ПЭО-1500.



Матеріал, захищений авторським правом

в результате достижения ими минимального критического объема. По оценкам Меримена, эритроцит может уменьшиться только на 1/3, после чего сжатие клетки прекращается, а нескомпенсированный осмотический градиент приводит к нарушению полупроницаемости ее мембраны. Существование минимального объема объясняют особыми свойствами мембраны и осмотическими свойствами гемоглобина. Поскольку под действием внеклеточных реагентов может нарушаться упорядоченность плазматических структур, большое количество молекул переходит в свободнорастворимое состояние, что повышает осмотическую активность внутриклеточного содержимого. В эритроцитах основную роль в этом процессе, очевидно, играет распад упорядоченной упаковки молекул гемоглобина. Известно, что разрыв связей гема с глобином повышает молекулярную концентрацию в пять раз [1]. При значительных осмотических давлениях внеклеточных растворов сложность геометрической формы поверхности мембраны, возникающей в результате обезвоживания, затрудняет количественную оценку объема клетки. Однако проведенные нами эксперименты по обезвоживанию теней (рис. 4) подтверждают возможность изложенного выше. Относительно повреждающей роли возникающего на мембране клетки осмотического градиента мы полагаем, что для проявления повреждения мембраны необходимо определенное время его действия, причем это время тем меньше, чем сильнее выражен действующий градиент осмотического давления. В пользу данной точки зрения свидетельствует тот факт, что в течение экспозиции в гипертонической среде гемолиз наблюдался только в 20%-ном NaCl — наиболее осмотически активном. Возникающая на поверхности клеток шиповидность в 2%-ном растворе NaCl и 2%-ном лимоннокислом Na различалась по месту локализации, что связано с разной реакцией клеток на внеклеточную осмотичность.

Таким образом, на основании проведенных исследований установлено, что поведение эритроцитов человека и приобретаемая ими форма при взаимодействии с растворами криопротекторов и солей зависит от осмотических свойств реагентов. Реакция эритроцитов на введение гипертонических растворов состоит из двух стадий: первая — быстрое сжатие клеток, связанное с их обезвоживанием, протекающем менее чем на 1 с; вторая стадия, которая зависит от уровня гипертоничности и вида реагента, в результате которой возможно: 1) полное или частичное восстановление исходного состояния (для растворов глицерина и ПЭО-100); 2) стабилизация обезвоженного состояния (для растворов ПЭО-400, ПЭГ-1500, ПЭО-1500), разрушение клеток (для 20%-ного раствора NaCl).


1. *Гительзон И. И., Терсков И. А.* О механизме гемолиза. — Вопросы биофизики, биохимии и патологии эритроцитов, Красноярск, 1961, вып. 2, с. 3—5.
2. *Mazur P., Robert H.* Miler. Permeability of human erytrocytes to glycerol in 1 and 2M solutions at 0 or 20° C. — Cryobiology, 1976, **13**, N 5, p. 507—522.
3. *Meryman H. T.* Freezing injury and its prevention in living cells. — Ann. Rev. Biophys. and Bioeng., 1974, **3**, p. 341—363.



Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР



Поступила в редколлегию
28. 02. 79



Матеріал, захищений авторським правом

УДК 576.311.34.591.044.3

*В. И. Луговой, Л. П. Кравченко, О. А. Семенченко*

# ВЛИЯНИЕ КРИОПРОТЕКТОРОВ И МЕМБРАНСТАБИЛИЗИРУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ НА ЛИЗОСОМЫ ПРИ ЗАМОРАЖИВАНИИ

Авторы настоящей статьи, а также ряд других [1, 2, 4, 7, 8, 9, 11] установили значительную криолабильность лизосом, а также показали роль лизосомальных гидролаз в развитии клеточных повреждений при низкотемпературном консервировании различного биологического материала [3, 5, 10]. Поэтому поиски путей стабилизации лизосом при действии низких температур представляются полезными в теоретическом и практическом отношении.

В настоящей статье изучалась эффективность криопротекторов глицерина и оксиэтилированного глицерина при охлаждении по разным программам изолированных лизосом, используя при этом в качестве показателя целостности органелл уровень неседиментируемой активности кислых гидролаз в среде замораживания. Кроме того, исследовалась возможность усиления защитного действия криопротекторов при сочетанном их применении со стероидными гормонами гидрокортизоном и дексаметазоном, которые, согласно имеющимся данным [6, 12], способны оказывать стабилизирующее влияние на лизосомальную мембрану.

Выделение фракции лизосом из печени белых крыс, определение неседиментируемой активности лизосомальных гидролаз (кислых РНК-азы, ДНК-азы, фосфатазы, катепсина Д) проводилось согласно методикам, описанным в предыдущих работах [1, 2]. В работе применялся глицерин отечественного производства, химически чистый, ГОСТ 6259-68; оксиэтилированный глицерин (ОЭГ), степень полимеризации $n=10$ — синтезирован в лаборатории криопротекторов Института проблем криобиологии и криомедицины АН УССР. Криопротекторы добавлялись к суспензии лизосом (0,15 М раствор хлористого натрия) из расчета 10%-ной конечной концентрации. При комбинированном применении криопротекторов и стабилизирующих добавок (конечная концентрация $10^{-4}$ М), осадок лизосом ресуспендировали в 0,15 М растворе хлористого натрия, содержащего соответствующее количество гормонов, а затем, через 15 мин, в полученную суспензию вводили 50%-ный раствор криопротекторов (по каплям), слегка помешивая. Замораживание проб проводилось по следующим программам: 1) замораживание до —196° С со скоростью 300—400° С/мин, отогрев при +37° С в водяном термостате; 2) — замораживание до —196° С со скоростью 300—400° С/мин, отогрев при +18° С на воздухе.

С целью более объективной сравнительной характеристики криозащитных свойств криопротекторов в отношении стабилизации лизосом при замораживании-отогреве рассчитывали показатель эффективности криозащиты этих веществ (ПК), который вычислялся как разность сумм (в процентах) снижения неседиментируемой активности ферментов с учетом только статистически достоверных величин по отношению к контрольному уровню этих ферментов. Аналогичным образом рассчитывался показатель эффективности стабилизации (ПС) для изучавшихся в работе мембранстабилилизирующих веществ. Приведенные результаты — усредненные данные семи—девяти опытов, которые обработаны статистически по методу Фишера—Стьюдента.

После инкубации суспензии лизосом в 10%-ных растворах изучавшихся криопротекторов при +20° С в течение 30 мин было установлено, что глицерин и ОЭГ не вызывают дополнительной солюбилизации гид-



Матеріал, захищений авторським правом

ролаз и, следовательно, не оказывают лабилизирующего влияния на мембраны лизосом. Более того, в присутствии глицерина в среде инкубации лизосом отмечалось снижение уровня неседиментируемой активности катепсина Д и кислой фосфатазы, а ОЭГ способствовал снижению уровня неседиментируемой активности РНК-азы, ДНК-азы и катепсина Д. Криопротекторы в применявшейся концентрации не оказывали влияния также на активность солюбилизированных гидролаз при инкубации их в указанных выше условиях.

Таблица 1

**Уровень неседиментируемой активности кислых гидролаз при замораживании лизосом в присутствии глицерина и оксиэтилированного глицерина**

| Среда замораживания | Активность ферментов | | | | ПК |
|---|---|---|---|---|---|
| | РНК-аза | ДНК-аза | Катепсин Д | Фосфатаза | |
| **Программа 1** | | | | | |
| 0,15 М NaCl (контроль) | 76±7 | 54±5 | 63±2 | 63±6 | |
| 0,15 М NaCl+глицерин | 49±6 | 45±9 | 47±5 | 31±7 | |
| *p* | <0,002 | >0,05 | <0,01 | <0,01 | 26 |
| 0,15 М NaCl+ОЭГ | 46±4 | 34±6 | 33±5 | 40±5 | 34 |
| *p* | <0,002 | <0,002 | <0,001 | <0,002 | |
| **Программа 2** | | | | | |
| 0,15 М NaCl (контроль) | 1000 | 100 | 100 | 100 | |
| 0,15 М NaCl+глицерин | 46±5 | 47±6 | 50±5 | 42±4 | 53 |
| *p* | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | |
| 0,15 М NaCl+ОЭГ | 36±5 | 33±5 | 30±3 | 47±4 | 64 |
| *p* | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | |

Примечание. Активность ферментов дана в процентах от общей активности. Значение *p* дано в сравнении с контролем.

При замораживании суспензии лизосом в присутствии глицерина по программе 1 отмечалось (табл. 1) снижение уровня неседиментируемой активности РНК-азы, катепсина Д и фосфатазы, а в присутствии ОЭГ — снижение этого показателя для всех ферментов. При замораживании лизосом по программе 2 оба криопротектора уменьшали степень солюбилизации всех изученных гидролаз. Однако наиболее высокий относительный показатель эффективности криозащиты отмечается, как и в случае программы 1, для оксиэтилированного глицерина.

При сочетанном применении глицерина и гидрокортизона в условиях замораживания лизосом по программе 1 наблюдалось снижение неседиментируемой активности ДНК-азы, а в присутствии дексаметазона — РНК-азы и ДНК-азы. Замораживание лизосом по программе 2 в присутствии глицерина и гидрокортизона способствовало снижению солюбилизации всех ферментов, тогда как дексаметазон вызывал уменьшение солюбилизации из лизосом РНК-азы и ДНК-азы (табл. 2). Необходимо отметить, что показатель эффективности стабилизации для дексаметазона в сочетании с глицерином приблизительно равный при замораживании лизосом по программе 1 и по программе 2. Гидрокортизон в сочетании с глицерином эффективен при замораживании лизосом по программе 2.

Сочетанное применение ОЭГ и гидрокортизона при замораживании лизосом по программе 1 приводило к снижению уровня неседиментируемой активности РНК-азы и ДНК-азы, а использование дексаметазона способствовало уменьшению этого показателя для всех ферментов. В условиях замораживания лизосом по программе 2 добавки к ОЭГ гидрокортизона и дексаметазона приводили к снижению солюбилиза-



Матеріал, захищений авторським правом

ции всех ферментов (табл. 3). Наиболее высокий показатель эффективности стабилизации отмечен для дексаметазона в сочетании с ОЭГ при замораживании лизосом по обеим программам.

На основании изложенного можно сделать следующие выводы.

Таблица 2

**Комбинированное действие глицерина и стероидных соединений на уровень неседиментируемой активности кислых гидролаз при замораживании лизосом**

| Среда замораживания | Активность ферментов | | | | ПС |
|---|---|---|---|---|---|
| | РНК-аза | ДНК-аза | Катепсин Д | Фосфатаза | |
| **Программа 1** | | | | | |
| Глицерин 10%-ный (контроль) | 0,70±0.06 | 0,51±0,06 | 3,55±0,42 | 0,48±0,07 | |
| Глицерин 10%-ный+гидрокортизон | 0,60±0,04 | 0,23±0,03 | 2,70±0,51 | 0,39±0,05 | 5 |
| *p* | >0,05 | <0,05 | >0,05 | >0,05 | |
| Глицерин 10%-ный+дексаметазон | 0,45±0,04 | 0,26±0,02 | 3,43±0,10 | 0,77±0,04 | 13 |
| *p* | <0,01 | <0,05 | >0,05 | >0,05 | |
| **Программа 2** | | | | | |
| Глицерин 10%-ный (контроль) | 0,80±0,07 | 0,56±0,07 | 4,00±0,51 | 0,50±0,07 | |
| Глицерин 10%-ный+гидрокортизон | 0,50±0,06 | 0,17±0,02 | 2,40±0,35 | 0,30±0,01 | |
| *p* | <0,01 | <0,001 | >0,05 | <0,01 | 17 |
| Глицерин 10%-ный+дексаметазон | 0,40±0,03 | 0,21±0,01 | 3,41±0,30 | 0,50±0,05 | 10 |
| *p* | <0,01 | <0,001 | >0,05 | >0,05 | |

Примечание. Значение *p* дано в сравнении с контролем. Активность ферментов выражена в микрограммах соответствующего субстрата, расщепленного при +37° С в мин на 1 мг белка.

Таблица 3

**Комбинированное действие оксиэтилированного глицерина и стероидных соединений на уровень неседиментируемой активности кислых гидролаз при замораживании лизосом**

| Среда замораживания | Активность ферментов | | | | ПС |
|---|---|---|---|---|---|
| | РНК-аза | ДНК-аза | Катепсин Д | Фосфатаза | |
| **Программа 1** | | | | | |
| ОЭГ 10%-ный (контроль) | 0,65±0,06 | 0,41±0,04 | 2,63±0,04 | 0,47±0,07 | |
| ОЭГ 10%-ный+гидрокортизон | 0,43±0,03 | 0,17±0,03 | 2,30±0,45 | 0,25±0,05 | 20 |
| *p* | <0,01 | <0,05 | >0,05 | <0,05 | |
| ОЭГ 10%-ный+дексаметазон | 0,25±0,04 | 0,15±0,01 | 1,69±0,07 | 0,13±0,02 | 50 |
| *p* | <0,001 | <0,002 | <0,002 | <0,002 | |
| **Программа 2** | | | | | |
| ОЭГ 10%-ный (контроль) | 0,50±0,05 | 0,38±0,04 | 2,38±0,25 | 0,52±0,05 | |
| ОЭГ 10%-ный+гидрокортизон | 0,30±0,05 | 0,12±0,03 | 1,75±0,03 | 0,13±0,02 | 27 |
| *p* | <0,002 | <0,002 | <0,01 | =0,01 | |
| ОЭГ 10%-ный+дексаметазон | 0,35±0,04 | 0,13±0,02 | 1,35±0,07 | 0,14±0,04 | 48 |
| *p* | <0,05 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | |

Примечание. Значение *p* дано в сравнении с контролем.



Матеріал, захищений авторським правом

1. Глицерин и оксиэтилированный глицерин предохраняют лизосомы от повреждающего действия низких температур, причем относительный показатель эффективности криозащиты выше у последнего как при замораживании органелл по программе 1, так и по программе 2.

2. Дексаметазон в сочетании с оксиэтилированным глицерином был более эффективен при замораживании лизосом до —196° С — относительный показатель эффективности стабилизации составлял более 50%.


1. *Кравченко Л. П., Луговой В. И., Белоус А. М.* Значение концентрационных факторов в криоповреждении лизосом. — Укр. биохим. журн., 1976, **48**, № 1, с. 11—15.
2. *Луговой В. И., Кравченко Л. П.* О механизмах криоповреждения лизосом. — В кн.: Структура и функция лизосом. М., 1976, с. 85—86.
3. *Покровский А. А., Тутельян В. А.* Лизосомы. — М.: Наука, 1976. — 380 с.
4. *Dajian G., Fowe A.* Activation of lysosomes in human platelets during cryopreservation. — Cryobiology, 1970, **6**, p. 579.
5. *Gorin N., Duhamel G.* La congelation de moelle osscuse. — Rev. frah. transfus., 1975, **18**, N 3, p. 289—300.
6. *Ignarro L.* Effects of anti-inflammatory drugs on the stability of rat river lysosomes in vitro. — Biochem. and Pharmacol., 1974, **20**, N 10, p. 2847—2860.
7. *Lotke R., Schwartz S.* Studies on the functional and biochemical changes during kidney preservation. — Surgery, 1970, **67**, N 3, p. 488—492.
8. *Osborne J., Morris G., Lee D.* Freezing of rat liver lysosomes to —196° C in the presence and absence of dimethylsulphoxide. — Eur. J. Biochem., 1973, **35**, p. 445—449.
9. *Persidsky M.* Lysosomes as a first target of cryoinjury. — Cryobiology, 1971, **6**, N 8, p. 482—488.
10. *Persidsky M., Ellett M.* Lisosomes and cell cryoinjury. — Cryobiology, 1971, **6**, N 8, p. 345—349.
11. *Tappel A.* Effects of low temperatures and treezing on enzymes and enzyme systems. — In: Cryobiology / Ed. H. F. Meryman, New York; London: Acad. press., 1966, p. 163—176.
12. *Weissmann G.* Effects of corticosteroids on the stability and fusion of biochemical membranes. — In: Asthma: Physiol., Immunopharmacol. and Treatment. New York; London, 1975, p. 221—230.



Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР



Поступила в редколлегию
23. 02. 79



УДК 57:536.48.047:547.96



***А. Б. Митряев, И. В. Столяров, А. М. Белоус***


# ДЕЙСТВИЕ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР (—196° С) НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ТРАНСКРИБИРУЮЩЕГО КОМПЛЕКСА ЯДЕР

Влияние низких температур на структурно-функциональное состояние транскрибирующего комплекса клеток эукариот изучено недостаточно [2]. Вместе с тем важность изучения этого вопроса объясняется той ролью, которую играет указанный комплекс в хранении и реализации генетической информации, протекающей с участием РНК-полимераз [6]. Эти процессы, происходящие в ядре клетки, определяются, с одной стороны, функциональным состоянием матрицы, с другой — РНК-полимеразы. Несмотря на ряд имеющихся в литературе данных о влиянии холода на физико-химические свойства ДНК [4], остается практически не ясным, какие изменение под влиянием низких температур происходят в более сложных комплексах (ДНП, хроматин), а также на уровне регуляции процессов транскрипции. В связи с этим цель данной статьи — изучение влияния замораживания на физико-химические свойства хроматина и матричную активность ДНК из клеток печени крыс.

В опытах использовали печень белых крыс-самцов весом 140—180 г. Выделение и очистку РНК-полимераз осуществляли как опи-




Матеріал, захищений авторським правом

сано нами ранее [5]. ДНК выделяли по методу Мармура [11], хроматин — по Аксель [10]. Матричную активность ДНК исследовали в РНК-полимеразной системе [1]. Изучение матричной активности хроматина проводилось без дополнительного внесения в систему in vitro РНК-полимераз, что позволяло судить о состоянии функционирования естественного фермент-матричного комплекса. Замораживание препаратов ДНК и хроматина производили в полиэтиленовых ампулах объемом 1,5 мл со скоростью 0,5—1,5° С/мин (медленно) и 300—400° С/мин (быстро). Поглощение ультрафиолетового света хроматином регистрировали при λ, равной соответственно 320, 260 и 230 нм.

Известно, что скорость замораживания и отогрева биологического материала в процессе криоконсервирования играет важную роль в сохранении нативности макромолекул, внутриклеточных органелл, клеток, тканей и органов [8]. Для выяснения механизма зависимости изменений физико-химических параметров ДНК и хроматина от скоростей замораживания нами исследовалось влияние медленного и быстрого охлаждения на некоторые свойства этих макромолекул.

**Матричная активность ДНК, подвергнутой замораживанию с различной скоростью охлаждения, имп/мин на пробу**

| РНК-полимераза | Контроль | Скорость охлаждения, °С/мин | |
|---|---|---|---|
| | | 300—400 | 0,5—1,5 |
| Ia | 1785±70 | 1832±139 | 1685±164 |
| Iв | 1518±226 | 1673±109 | 1465±243 |
| II | 1295±106 | 1376±98 | 1307±162 |

Примечание. Инкубационная проба содержала нативную РНК-полимеразу Ia, Iв и II соответственно в количестве 6, 5 и 9 ед. В каждую пробу вносили по 20 мкг ДНК, подвергнутой замораживанию со скоростью 300—400 или 0,5—1,5° С/мин. В контролях использовали нативные РНК-полимеразу и ДНК.

Как видно из таблицы, уровень синтеза РНК в системе с ДНК, подвергнутой замораживанию, и нативной РНК-полимеразой при медленном и быстром режимах замораживания до температуры —196° С практически одинаков. Активность ядрышкового и нуклеоплазматического ферментов на нативной и замороженной ДНК не изменялась. Полученные данные могут свидетельствовать об устойчивости ДНК к действию повреждающих факторов, развивающихся в системе при фазовом переходе вода—лед. Эти результаты коррелируют с данными других авторов, изучавших физико-химические свойства ДНК, подвергавшейся замораживанию и хранению в самых широких температурных интервалах [4, 9].

Таким образом, изучение матричной активности ДНК подтверждает устойчивость этой макромолекулы к повреждающему действию замораживания-отогрева.

Одним из затруднений, связанных с объяснением изменения синтеза РНК in vivo на основании результатов исследования РНК-полимеразной реакции с ДНК, является то, что в клетках эукариотов матрица представлена комплексом белок—ДНК.

Данные спектрального анализа хроматина, подвергнутого быстрому замораживанию до температуры —196° С в изолированном виде в различных концентрациях показывают, что при этом режиме замораживания происходит выраженное повышение оптической плотности образцов при $\lambda=260$ нм ($ОЕ_{260}$), что соответствует 25 мкг/мл ДНК хроматина. Выявленный гиперхромизм — линейно убывающая функция концентрации хроматина в логарифмических координатах. Полное исчезновение наблюдаемого эффекта происходит при концентрации хроматина выше 2,0 $ОЕ_{260}$ (т. е. 100 мкг/мл ДНК хроматина). При оценке концентрационной зависимости гиперхромного эффекта необходимо учитывать, что истинное содержание хроматина в растворе в три раза выше концентрации, определяемой по содержанию ДНК, поскольку в исследуемых нами препаратах соотношение белок—ДНК составляет



Матеріал, захищений авторським правом

2—2,6. Из этого следует, что феномен гиперхромизма исчезает при концентрации хроматина порядка 0,3 мг/мл. Этот эффект по ряду параметров отличается от гиперхромизма, вызываемого плавлением и агрегацией хроматина, и, кроме того, не наблюдается при диссоциации хроматина в высокой концентрации соли.

Исследование хроматина, используемого в качестве матрицы без дополнительного внесения в систему in vitro РНК-полимеразы, показало, что после замораживания уменьшается его матричная активность в системе синтеза РНК, осуществляемого за счет эндогенного фермента. Так, если в контроле активность фермента составляет 986± ±148 имп/мин на пробу, то после замораживания до температуры —196° С она уменьшается более чем в два раза и равняется лишь 415±96 имп/мин.

Как известно [7], в результате замораживания биологических объектов происходит резкое 30—50-кратное увеличение концентрации солей в окружающей среде, особенно выраженное в зоне эвтектики. Поэтому можно ожидать, что в этих условиях будет происходить отщепление белков от хроматина. Кроме того, не исключена возможность перераспределения белков вдоль молекулы после отогрева, что может изменить количество мест, доступных для инициации синтеза РНК. И, наконец, увеличение концентрации ионов двухвалентных металлов и нефизиологические температуры могут приводить к ошибкам «считывания» с матрицы [3].

Таким образом, в результате проведенных нами исследований установлено, что замораживание изолированной ДНК не приводит к изменению ее матричной активности, что свидетельствует об устойчивости этой макромолекулы к действию холода. Вместе с тем глубокое замораживание изолированного хроматина из ядер клеток печени крыс нарушает его структурно-функциональную целостность.


1. *Адлер В. В., Поверенный А. М., Подгородниченко В. Н., Шапот В. С.* Изучение процесса транскрипции с использованием антител к ДНК. — Молекуляр. биология 1973, **7**, вып. 2, с. 203—208.
2. *Белоус А. М., Луговой В. И., Гулевский А. К.* Актуальные вопросы современной криобиологии. — Криобиология и криомедицина, 1975, вып. 1, с. 8—14.
3. *Гиневская В. А., Скарлат И. В., Калинина Н. О., Агол В. И.* О точках транскрипции в бесклеточных системах из клеток животных. — Молекуляр. биология, 1971, **5**, вып. 1, с. 132—138.
4. *Колобов А. В., Вайнберг Ю. П.* Исследование стабильности физико-химических параметров ДНК при длительном хранении. — Бюл. эксперим. биологии и медицины, 1976, **31**, с. 309—311.
5. *Митряев А. Б., Белоус А. М.* Изменение активности ДНК-зависимых РНК-полимераз из печени крыс под влиянием глицерина, диметилсульфоксида и полиэтиленгликоля 400. — Биохимия, 1978, **43**, вып. 7, с. 1157—1161.
6. *Столяров И. В., Лиходед В. С., Паскевич И. Ф.* ДНК-зависимая РНК-полимераза эукаритов. — Успехи соврем. биологии, 1976, **81**, вып. 3, с. 323—340.
7. *Пушкарь Н. С. Белоус А. М.* Введение в криобиологию. — Киев : Наук. думка, 1974. — 343 с.
8. *Тимошенко Ю. П., Лобынцева Г. С., Полякова А. И. Тимченко В. Г.* Исследование процесса размораживания клеточных суспензий. — Криобиология и криомедицина, 1978, вып. 4, с. 64—67.
9. *Шарова Э. Г.* Физико-химическое состояние ДНК при длительном хранении. — Укр. биохим. журн., 1977, **49**, № 1, с. 45—49.
10. *Marmur J.* A procedure for the isolation of DNA from microorganism. — J. Mol. Biol. 1966, **15**, N 1, c. 160—164.
11. *Axel R.* Cleavage of DNA in nuclei and chromatin with staphylococcol nuclease. — Biochemistry, 1975, **14**, N 3, p. 2921—2925.



Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР



Поступила в редколлегию
26.02.79





Матеріал, захищений авторським правом

УДК 574.96:543.42:541.49

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

# ВЛИЯНИЕ ГИПЕРКОНЦЕНТРАЦИЙ СОЛЕЙ НА КОНФОРМАЦИОННОЕ СОСТОЯНИЕ ИММУНОГЛОБУЛИНА ЛОШАДИ

В настоящее время считают, что один из главных факторов криоповреждения биомакромолекул в клетках — гиперконцентрация электролитов, вызванная фазовым переходом вода—лед. Поэтому цель данной статьи — исследование влияния значительных концентраций нейтральных солей (NaCl, KCl, NaBr) на конформацию иммуноглобулина лошади (IgG).

Были использованы препараты IgG лошади, выделенные по методу Баумстарка [4]. Оптическую плотность белка приняли равной 13,6 ед. опт. плотн. на длине волны 280 нм для 1% белка в стандартной (1 см) кювете [3]. Спектры поглощения снимали на спектрофотометре «Пай Уникам СП-8000» в термостатированной кювете. Как отмечалось нами ранее, в диапазоне температур от 20 до 30° С наблюдается структурный переход Ig G, описываемый в рамках теории двух состояний. При температурах ниже 20° С конформация белка становится стабильной, поэтому исследования проводили при 18° С.

Нами исследованы спектры поглощения IgG в растворах, содержащих различные соли (NaCl, KCl, NaBr) в концентрациях до нескольких молей. Все измерения с солями проведены в буферных растворах с молярностью 0,2—0,5 М, причем молярность буфера подбиралась так, чтобы после добавления соли до требуемой концентрации pH белково-солевого раствора отличалось от начального значения не более чем на 0,5—0,7 единиц pH. Для измерения выбраны области pH ниже и выше изоэлектрической точки белка (pI=7,4), где IgG спектрофотометрически достаточно стабилен.

При высоких концентрациях солей параметры спектров поглощения при различных pH становятся характерными для необратимо денатурированного белка: резко увеличивается светорассеяние, наблюдается сдвиг $\lambda_{max}$ спектров поглощения. Для исследованных солей характерен сдвиг $\lambda_{max}$ поглощения в коротковолновую сторону от 277—278 нм до 275 нм. Однако процесс денатурации носит характер двух- или трехступенчатого процесса. По мере повышения концентрации соли в растворе Ig G испытывает обратимые, а затем необратимые конформационные превращения. Характеристики денатурационных и преддена-турационных переходов зависят от исследуемой соли и pH раствора.

Для NaCl при разных pH наблюдается обратимый конформационный переход, предшествующий необратимому, сопровождающемуся коротковолновым сдвигом $\lambda_{max}$ поглощения до 275 нм и значительным увеличением оптической плотности растворов. Концентрация NaCl в точке полуперехода $U_{1/2}$ при pH=5,5 соответствует 8,5—8,7% соли в весовых процентах w/w) для обратимого перехода; необратимые изменения наступают при концентрации соли более 18%. Ширина перехода при обратимых конформационных изменениях составляла 10% соли. При pH 8,7 ширина перехода ($\Delta U$) для обратимого перехода с $U_{1/2}$ =2,5÷2,7% соли составляла 5% соли, необратимые изменения наступали при концентрации соли более 12—15% $^{w}/_{w}$.

Изменения оптической плотности при концентрациях NaCl до 5—6% в растворах IgG сравнимы с изменениями оптической плотности растворов аминокислот, соответствующих по концентрации полностью и частично доступным растворителю аминокислотным остаткам белка в используемых белковых растворах.



Матеріал, захищений авторським правом

Наши данные совпадают с данными Кяйвяряйнен [2], который не наблюдал значительных спектрофотометрически регистрируемых конформационных изменений белка при концентрации NaCl 1,2 М и наблюдал денатурированный белок в 2,5 М NaCl.

Как видим, стабильность белковых растворов при добавлении NaCl заметно зависит от pH раствора, причем с увеличением суммарного отрицательного заряда стабильность растворов уменьшается.

Для NaBr наблюдаются, по-видимому, также два конформационных перехода с точками полупереходов $U_{1/2}=26$ и 35% $^{w}/_{w}$ при pH 6,3, причем переход с $U_{1/2}=35\%$ сопровождается значительным увеличением светорассеяния растворов. Изменения положения $\lambda_{max}$ не наблюдалось. При pH 8,3 $U_{1/2}=23$ и 33,5%, т. е. как и в случае NaCl, при pH выше изоэлектрической точки белка устойчивость белковых растворов уменьшается. Ширина перехода при pH выше и ниже изоэлектрической точки белка составляла около 10%.

В присутствии гиперконцентраций KCl изменение оптической плотности растворов носит сложный характер. Возможно, не все наблюдаемые изменения оптической плотности связаны с конформационными изменениями белка, поскольку в некоторых случаях ультрафиолетовые спектры могут изменяться даже без значительных структурных перестроек. Необратимые изменения при pH 6,8 наблюдаются при концентрациях соли более 14—16% $^{w}/_{w}$, ему предшествует, по-видимому, предденатурационный переход с $U_{1/2}=9\div10\%$ $^{w}/_{w}$ и $\Delta U=4{,}6\%$. Изменения оптической плотности при меньших концентрациях соли связаны, прежде всего, с возмущающим действием KCl на доступные растворителю ароматические остатки белка. Немонотонный характер изменения оптической плотности при концентрации 1—6% KCl дает возможность предположить, что небольшие концентрации этой соли, вероятно, оказывают, какое-то возмущающее действие на конформацию полипептидной цепи белка вблизи хромофора.

При pH 8,8 наблюдается переход при $U_{1/2}=8\div11\%$ с $\Delta U=5\div7\%$ и необратимый при концентрации KCl более 16% $^{w}/_{w}$, т. е. изменение pH не оказывает значительного дестабилизирующего действия на белок в растворе данной соли.

Следовательно, для KCl, в отличие от NaCl, гораздо менее заметно изменение стабильности структуры IgG с изменением pH. Таким образом, установлены значения гиперконцентраций солей, при которых происходят конформационные переходы IgG; показано, что действие NaCl и NaBr отличается от действия KCl на белок при изменении заряда молекулы с изменением pH. Предполагается, что NaCl и NaBr сильнее влияют на электростатические взаимодействия в белке, чем KCl.


1. *Капланас Р. И., Буколова Т. Г., Бурштейн Э. А.* Флуоресценция лактоглобулина АВ в различных физико-химических условиях, — Молекуляр. биология, 1975, **9**, № 6, с. 795—805.
2. *Кяйвяряйнен А. И.* Влияние возмущающих агентов на динамические свойства иммуноглобулиновых фрагментов. — Биофизика, 1978, **23**, № 4, с. 595—602.
3. *Окулов В. И.* Применение спектрофотометрии в ультрафиолете для исследования белков. — Успехи биол. химии, 1971, **12**, № 3, с. 28—62.
4. *Baymstark J. S., Laffin B. J., Bardawil W. A.* A preparative method for separation of 7S-gamma globulin from human plasma. — Arch. Biochem. and Biophys., 1964, **108**, N 3, p. 514—517.



Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР



Поступила в редколлегию
27. 02. 79





Матеріал, захищений авторським правом

УДК 615.832.9:616.3

*О. Е. Писанный, Е. Д. Хворостов,*
*А. М. Мхитарьянц, Б. П. Сандомирский*

# ЭНДОСКОПИЧЕСКАЯ КРИОДЕСТРУКЦИЯ ПОЛИПОВ ВЕРХНЕГО ОТДЕЛА ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

В доступной литературе нами не выявлены сообщения о применении криовоздействия с лечебной целью при полипах верхнего отдела желудочно-кишечного тракта. Для проведения криодеструкции полипов и дозированной криотерапии ряда заболеваний верхнего отдела желудочно-кишечного тракта нами разработан специальный криоэлектрокоагулятор в виде зонда, который проводится через фиброскоп, что позволяет под контролем зрения и впаянной в наконечник термопары проводить регулируемое криовоздействие на соответствующую зону. В качестве хладагента используется фреон-12.

При проведении 2 345 эндоскопических исследований у больных в возрасте от 15 до 85 лет в 63 случаях выявлены полипы верхнего отдела желудочно-кишечного тракта. У 20 из них произведена электрокоагуляция и электроэксцизия полипов через фиброскоп по общепринятой методике. Дефекты слизистой оболочки, возникающие после удаления полипов, эпителизировались у большинства больных в течение месяца. В шести случаях проведено криовоздействие на полипы по следующей методике.

Через фиброгастроскоп на протяжении 2—4 мин производится охлаждение фреоном-12, подаваемым через специальный зонд, что через 2—3 мин снижает температуру в глубине полипа до —28° С. Спонтанный отогрев через 2 мин приводит к повышению температуры до 37° С. Контрольная эндоскопия и повторное криовоздействие производится через пять-шесть дней. Нами отмечено быстрое уменьшение размеров полипов, подвергавшихся охлаждению. При гистологическом изучении прицельно взятого биопсийного материала наблюдается краевой некроз ткани.

Примером может служить больной Г., у которого эндоскопически в антральном отделе желудка по большой кривизне выявлены два рядом расположенных полипа конусовидной формы, высотой 7—8 мм. При гистологическом изучении прицельно взятого материала — аденоматозный полип. 24. 01. 79 г. произведено криовоздействие на полипы в течение 3 мин. Температура в глубине полипа через 1 мин 26 с достигла —28° С. После прекращения подачи хладагента через 1 мин 48 с температура достигла +34° С. Полипы непосредственно после манипуляции уменьшились в размере и приобрели темно-вишневую окраску. Кровотечения не наблюдалось. После проведения трех сеансов через каждые семь дней при контрольном исследовании 14. 02. 79 г. в антральном отделе желудка по большой кривизне отличаются едва заметные два рядом расположенных возвышения размером 1 мм. При гистологическом исследовании биопсийного материала отмечается краевой некроз ткани. Самочувствие больного удовлетворительное.

Осложнений после криодеструкции полипов нами не наблюдалось.

Полученные предварительные данные позволяют считать, что метод холодового лечения полипов верхнего отдела желудочно-кишечного тракта является весьма перспективным и нуждается в дальнейшем совершенствовании и изучении.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР,
Первая клиническая больница
Ордена Ленина южной железной дороги

Поступила в редколлегию
09. 02. 79

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043:612.112—085.23

*А. И. Полякова, И. А. Вотякова*

# ИЗУЧЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ЛЕЙКОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА НА РАЗЛИЧНЫХ ЭТАПАХ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО КОНСЕРВИРОВАНИЯ МЕТОДОМ МОНОСЛОЙНЫХ КУЛЬТУР. I. ВЫБОР ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ

В проблеме консервирования кроветворной ткани выбор тестов, определяющих биологические свойства клеток, сложен, и каждый из методов обладает известными недостатками. Цель настоящей статьи — изучить морфологическое состояние ядросодержащих клеток периферической крови человека, консервированных замораживаним, с помощью метода монослойных культур. Данный метод — один из наиболее простых способов культивирования кроветворной ткани. В монослойных культурах можно не только следить за изменением морфологии клеток, но и проводить количественный анализ изменения состава эксплантированной клеточной популяции.

Первый этап наших исследований — изучение особенностей монослойной культуры лейкоцитов крови в течение 2-недельного культивирования в различных питательных средах и выбор оптимальных условий культивирования. В каждом опыте использовали один флакон суточной донорской крови группы А(II), консервированной на растворе ЦОЛИПК-7б. Всего проведено 20 серий экспериментов. Лейкоцитарную массу получали путем спонтанного отстаивания снятой лейкопленки в течение 45 мин при температуре 37° С. Полученный отстой центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин. Лейкоцитарный осадок разводили питательной средой до концентрации 1,5—2 млн. клеток в 1 мл. Полученную взвесь разливали по 2 мл в пенициллиновые флаконы, на дно которых были помещены покровные стекла. Флаконы плотно закрывали резиновыми пробками, и взвесь лейкоцитов инкубировали при 37° С. Среду меняли через каждые 3—4 сут. На 3, 7, 10 и 14-е сут стекла с растущими на них клетками вынимали, высушивали на воздухе, фиксировали и окрашивали по Нохту. Изучали морфологию клеток и подсчитывали количество фибробластоподобных элементов на 500 мононуклеаров. В качестве питательных сред опробованы среды следующих составов:

I — 70% среды 199, 20% сыворотки АВО, инактивированной нагреванием в течение 30 мин при 56° С, 10% аминопептида;
II — 70% среды Игла, 20% сыворотки АВО, 10% аминопептида;
III — 35% среды 199, 35% гидролизата лактальбумина, 20% сыворотки АВО, 10% аминопептида;
IV — 35% среды Игла, 35% гидролизата лактальбумина, 20% сыворотки АВО, 10% аминопептида;
V — 35% среды 199, 35% среды Игла, 20% сыворотки АВО, 10% аминопептида.

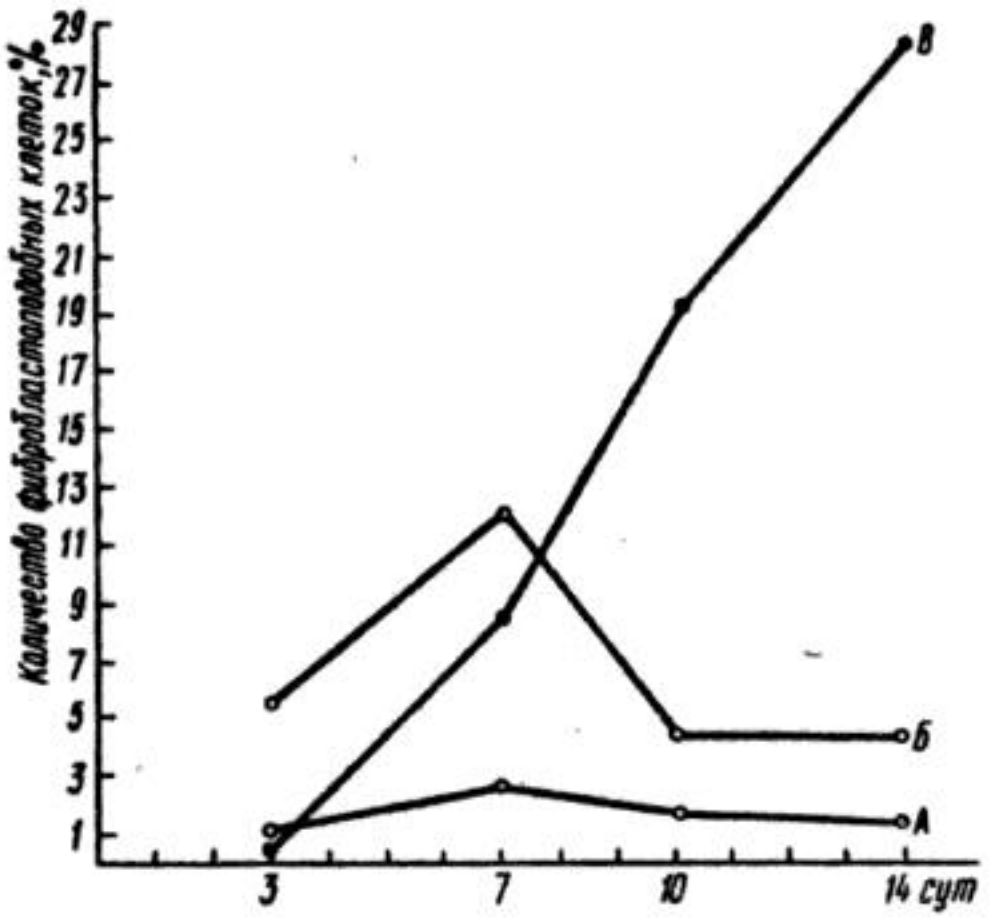
Во все среды добавляли пенициллин и стрептомицин по 50 ед на 1 мл среды.

Изучение морфологии монослойной культуры крови, культивируемой в питательной среде I, показало, что через 3 сут на стекле преобладают округлые клетки типа лимфоцитов и моноцитов, а также многочисленные гистиоциты-макрофаги — клетки округлой формы, превышающие размеры лейкоцитов, с крупным ядром и пенистой базофильной цитоплазмой, которые фагоцитируют обломки форменных элементов крови. По всему полю зрения видны дегенерирующие гранулоциты. В процессе культивирования морфология растущих на стекле клеток меняется. На 7—10-е сут преобладают большие клетки округлой фор-



Матеріал, захищений авторським правом

мы, границы некоторых клеток имеют нечеткие очертания. Цитоплазма становится менее пенистой; базофилия сохраняется на 7-е сут, но уменьшается к 10-м сут, приобретая нежно-голубой оттенок. Видно четкое разграничение экто- и эндоплазмы. Ядра клеток больших размеров, чаще всего расположены эксцентрично, содержат ядрышки. Мелкосетчатая структура хроматина ядер клеток на 7-е сут в процессе культивирования становится более компактной. Встречаются немногочисленные 2—3-ядерные гигантские клетки типа симпластов. В значительном количестве в этот период в культуре встречаются клетки вытянутой, веретенообразной формы (фибробластоподобные клетки). Эктоплазма этих клеток расположена на обоих концах в виде резко расширенных участков цитоплазмы, с помощью которых клетка прикрепляется к стеклу. Через 14 сут культура представлена круглыми или овальными клетками больших и средних размеров. Ядра компактные, содержат одно или два ядрышка. Цитоплазма голубая, четко разграничены экто- и эндоплазма. Часто встречаются гигантские многоядерные клетки, образующие в некоторых местах сплошной монослой. В эти же сроки может наблюдаться деление клеток, чаще всего происходящее по типу амитозов.




Изменение количества фибробластоподобных клеток в монослойной культуре лейкоцитов в трех сериях экспериментов (*А, Б, В*). Питательная среда I.

Количество фибробластоподобных клеток в разные сроки культивирования сильно варьирует. При статистической обработке экспериментальных данных мы вынуждены были разбить полученные результаты на три группы. Так, в первой группе на 3-и сут количество фибробластоподобных клеток в монослойной культуре составляло 0,9±0,11%; через 7 сут количество их увеличивалось до 2,55±1,9%; к 14-м сут число их снова постепенно снижалось до уровня 3-суточной культуры и составило 1,65±0,5% (на 10-е сут) и 1,35±0,1% (на 14-е сут) (рисунок, *А*). Такая же конфигурация кривой изменения количества фибробластоподобных клеток получена и в другой группе опытов, но с более высокими цифровыми показателями (рисунок, Б). Так, на 3-и сут количество фибробластоподобных клеток составило 5,4±1,4%, на 7-е сут число их возросло до 12,0±1,99%, а к концу двухнедельного культивирования опять снизилось до 4,3±1,6%.

В третьей группе опытов кривая изменения количества фибробластоподобных клеток меняла свой характер (рисунок *В*). В этой серии экспериментов количество фибробластоподобных клеток резко возрастало в течение всего срока культивирования и составляло на 3-и сут 0,33±0,12%, на 7-е сут — 8,33±1,98%, на 10-е сут — 19,25±5,75% и на 14-е сут — 28,3±6,99%.

Так как условия экспериментов во всех опытах были одинаковы, то объяснить полученные результаты можно, вероятно, только индивидуальными особенностями донорской крови. Следует также отметить, что фибробластоподобные клетки в наших исследованиях отличались по морфологии от фибробластов, полученных А. Ф. Панасюк и соавт. [1] при культивировании костного мозга человека. Согласно наблюдениям этих авторов, фибробласты имеют более светлое, крупное ядро,



Матеріал, захищений авторським правом

цитоплазма клеток без четких границ, клетки формируют дискретные очаги, располагаясь параллельно одна другой своими вытянутыми осями. В наших опытах фибробластоподобные клетки не образовывали крупных очагов, а равномерно располагались на стекле между различными клеточными формами.

При культивировании лейкоцитов в питательных средах II и IV через 3 сут монослойная культура была представлена гистиоцитами-макрофагами, лимфоидными клетками и дегенерирующими нейтрофилами. По морфологии эти клетки были идентичны клеткам, описанным выше. Фибробластоподобные элементы в культуре лейкоцитов, растущей на питательной среде II, составляли $0{,}66 \pm 0{,}11\%$; монослой в питательной среде IV фибробластоподобных клеток не содержал.

На 7-е сут на стеклах в культуре, растущей на питательной среде II, наблюдалось небольшое количество мононуклеаров, по размерам несколько уступающим подобным клеткам, растущим в питательной среде I. В цитоплазме этих клеток отчетливо виден фагоцитированный клеточный детрит. В остальном морфология клеток не отличается от описанных ранее. Фибробластоподобные клетки составляли $2{,}9 \pm 0{,}6\%$. В процессе дальнейшего культивирования клеток в питательной среде II на стеклах обнаруживались единичные клетки, сохранившие свою структуру. Большинство клеточных элементов было деструктировано.

Изучение морфологии монослойной культуры лейкоцитов крови, культивируемых в питательной среде III, показало, что на 3-и сут монослой представлен в основном дегенерирующими нейтрофилами, лимфоидными клетками разной степени зрелости, на фоне которых расположены немногочисленные макрофаги типичной структуры. Фибробластоподобные клетки составляют $1{,}1 \pm 0{,}3\%$. Примерно такая же картина наблюдается на 3-и сут культивирования лейкоцитов в питательной среде V, но с еще меньшим количеством сохранившихся клеточных элементов. Число фибробластоподобных элементов составляло в данном случае $0{,}33 \pm 0{,}1\%$. На 7—10-е сут культивирования в обоих случаях преобладают клетки средней величины, овальной или круглой формы. Цитоплазма клеток сильно вакуолизирована, сохраняет выраженную базофилию. Многие клетки фагоцитируют детрит. Ядра округлой формы, с мелкосетчатой структурой хроматина, содержат ядрышки; встречаются клетки с компактными ядрами (питательная среда III). Монослойная культура в питательной среде V содержит незначительное количество многоядерных клеток. Количество фибробластоподобных клеток в культурах лейкоцитов в питательных средах III и V составляло на 7-е сут $8{,}4 \pm 2{,}1\%$ и $3{,}75 \pm 0{,}25\%$; на 10-е сут — соответственно $10{,}5 \pm 0{,}20\%$ и $13{,}3 \pm 2{,}7\%$.

На 14-е сут в монослойной культуре лейкоцитов в питательной среде III обнаруживаются крупные мононуклеарные клетки с нежно-голубой пенистой цитоплазмой, отчетливо видна граница экто- и эндоплазмы, ядра содержат ядрышки. Встречается незначительное количество многоядерных гигантских клеток и большое число гистиоцитов. Фибробластоподобные клетки составляют $22{,}9 \pm 4{,}7\%$. В монослойной культуре лейкоцитов, растущих на питательной среде V, на 14-е сут роста клеток не наблюдалось, происходила полная деструкция всех клеточных элементов.

Таким образом, при двухнедельном культивировании лейкоцитов периферической крови человека в монослойной культуре с различными питательными средами нами выявлены изменения, заключающиеся в трансформации их в крупные клетки макрофагальной природы, которые в процессе культивирования увеличиваются в размере и образуют сплошной рост, а также в фибробластоподобные клетки.

Монослойные культуры служат хорошим тестом определения жизнеспособности исследуемого материала, которая заключается в способ-



Матеріал, захищений авторським правом

ности клеток прикрепляться к покровным стеклам, оставаться фиксированным на них в течение нескольких суток, воспринимать красители и подвергаться трансформации в макрофагальные и фибробластоподобные клетки [2]. В связи с этим метод монослойных культур может явиться наиболее перспективным тестом для определения жизнеспособности лейкоцитов крови, подвергнутых низкотемпературному консервированию.

Лучшей питательной средой для монослойной культуры лейкоцитов оказалась среда, состоящая из 70% среды 199, 20% человеческой инактивированной сыворотки АВО и 10% аминопептида.

1. *Панасюк А. Ф., Лурия Е. А., Фриденштейн А. Я., Кулагина Н. Н., Герасимов Ю. В., Смирнов А. Н.* Культуры фибробластоподобных клеток костного мозга человека. — Пробл. гематологии, 1972, **17**, № 8, с. 34—39.
2. *Степаненко С. Б., Маликова Л. П., Волченскова Л. В.* Изучение жизнеспособности костного мозга, консервированного замораживанием, методом монослойных культур. — В кн.: Материалы Всесоюз. симпоз. по вопр. консервирования, культивирования и типирования кост. мозга. М., 1971, с. 33—35.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
05. 03. 78

УДК 57.043:612.014.424.5

***Ю. П. Тимошенко, П. Л. Пахомов***

# РАЗМОРАЖИВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ СВЧ-ЭНЕРГИЕЙ
## VII. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА ПЛАВЛЕНИЯ

Один из недостатков СВЧ-метода размораживания биообъектов — возможность их повреждения в результате перегрева жидкой фазы с высоким значением $\varepsilon''$, образующейся в ходе процесса плавления. Кроме того, процесс нагрева становится почти неуправляемым. В связи с этим разработка контролируемого и возможно более равномерного процесса плавления биообъекта — основная задача при практическом осуществлении СВЧ-размораживания. Наряду с этим необходимо также иметь количественные критерии, определяющие режим процесса, в частности, уровень поглощаемой в объекте СВЧ-мощности.

Для построения математической модели примем следующую упрощенную картину процесса размораживания биообъекта. В зоне фазовых переходов вблизи $T_{пл}$ в массе образца возникают многочисленные «зародыши плавления» — микроскопические включения жидкой фазы, содержащие концентрированные растворы солей и поэтому обладающие высоким значением $\varepsilon''$. Интенсивный нагрев указанных включений СВЧ-полем приводит к их росту за счет продвижения микроскопических фронтов плавления от включений. После слияния этих фронтов процесс размораживания заканчивается.

Проведенные криомикроскопические исследования подтвердили правильность данной модели: плавление объекта в основном происходит за счет разрастания и слияния имеющихся хаотически расположенных зародышей жидкой фазы, новые включения при этом практически не возникают. Количество, размеры и форма зародышей зависят от химического состава объекта и скорости его охлаждения при замораживании. Учитывая, что отношение поверхности к объему ($S/V$) для тел простой геометрической формы составляют $6/D$ — для шара, $4/D$ — для длинного цилиндра, $6/a$ — для куба и т. д., введем средний размер включений $l$ и положим для них $S/V \approx 5/l$.



Матеріал, захищений авторським правом

Уравнение теплового баланса для отдельного включения запишем в виде

$$CmdT+Qdm=PVd\tau, \tag{1}$$

где $C$ — удельная теплоемкость, $m$ — масса, $V$ — объем включения, $P$ — СВЧ-мощность, поглощаемая в единице объема жидкой фазы, $Q$ — удельная теплота плавления.

Учитывая, что $S/V=5/\bar{l}$, а прирост массы жидкой фазы $dm=\rho dV=$ $=\rho Sd\bar{l}$ ($\rho$ — плотность жидкой фазы), вместо (1) можно написать:

$$C\rho\frac{dT}{d\tau}+5Q\rho\frac{1}{\bar{l}}\frac{d\bar{l}}{d\tau}=P. \tag{2}$$

Условия теплового баланса для фронта плавления имеет следующий вид:

$$\lambda\frac{T-T_{пл}}{\bar{l}}=Q\rho\frac{\bar{d}\bar{l}}{d\tau}, \tag{3}$$

где $\lambda$ — теплопроводность жидкой фазы.

Находя отсюда температуру включения $T$ и подставляя ее в (2), получим дифференциальное уравнение для $\bar{l}$ сложного вида, не поддающееся аналитическому решению. Однако в силу требования ограничения роста температуры жидкой фазы (допустимый перегрев $\theta_m=T_m-T_{пл}$ — не более 40°) нас интересует лишь такой режим процесса, при котором $\Delta T\ll\frac{5Q}{C}\frac{\Delta\bar{l}}{\bar{l}}$, где $\frac{5Q}{C}\approx 400$ К. Отсюда находим, что в уравнении (2) $C\rho\frac{dT}{d\tau}\ll 5Q\rho\frac{d\bar{l}}{\bar{l}d\tau}$, и вид уравнения существенно упрощается. В этих условиях решение (2) принимает вид

$$\bar{l}=\bar{l}_0\exp\left(\frac{P}{5Q\rho}\tau\right), \tag{4}$$

где $\bar{l}_0$ — начальный размер зародышей жидкой фазы.

При этом величина перегрева в конце процесса (при $\bar{l}=\bar{l}_к$, $\tau=\tau_к$) достигает, согласно (3, 4) следующей величины:

$$\Theta=T_к-T_{пл}=\frac{P\bar{l}_0^2}{5\lambda}\exp\left(\frac{2P}{5Q\rho}\tau_к\right)=\frac{P\bar{l}_к^2}{5\lambda}. \tag{5}$$

Длительность процесса размораживания $\tau_к$ определяем из (4):

$$\tau_к=\frac{5Q\rho}{P}\ln\frac{\bar{l}_к}{l_0}. \tag{6}$$

Конечный размер включений $\bar{l}_к$ определится, согласно описанной выше схеме процесса, условием их слияния

$$\bar{l}_к=L\Big/\sqrt[3]{N}, \tag{7}$$

где $L$ — характерный размер биообъекта, $N$ — число зародышей, которые считаются постоянными. Из формулы (5) находим предельно допустимый уровень мощности $P_m$, при котором перегрев жидкой фазы $\theta$ не превышает допустимого значения $\theta_m=40°$ С:

$$P_m=\frac{5\lambda\theta_m}{\bar{l}_к^2}. \tag{8}$$



Матеріал, захищений авторським правом

Проведем оценку длительности процесса $\tau_к$ и допустимой поглощаемой мощности $P_m$ при $L=10^{-2}$ м; $N=10^3$; $l_к=10^{-3}$ м; $C\approx 4180\ \frac{Дж}{кг\cdot к}$. При $\lambda=0{,}6\ \frac{Вт}{м\cdot к}$ из (8) получим $P_m\approx 1{,}2\cdot 10^8$ Вт/м³. При $l_0=10^{-6}$ м $\cdot\rho=$ $=10^3\ \frac{кг}{м^3}$; $Q=3{,}3\cdot 10^5\ \frac{Дж}{кг}$ формула (6) дает: $\tau_к\approx 95$ с.

Рассмотрим один из возможных способов улучшения равномерности и регулируемости процесса СВЧ-размораживания — введение в биообъект до его замораживания проводящих частиц, например, коллоидного раствора серебра. Примем следующие допущения: а) ввиду малых размеров проводящих частиц и относительно небольшой величины $\varepsilon''_{ж}$ жидкой фазы включений электромагнитное поле считаем равномерным по всему объему образца, со средней напряженностью поля $\bar{E}$; б) потери мощности на нагрев самих частиц малы ввиду их малых размеров, так что вся выделяемая в них мощность идет на плавление твердой фазы образца; в) движение фронта плавления считаем медленным, так что распределение температуры в жидкой фазе квазистационарно. Процесс плавления вновь представляем как движение микроскопических фронтов плавления от каждой частицы вплоть до их слияния. Нагрев этих частиц в СВЧ-поле приводит к появлению тепловых потоков от частиц с плотностью $q=\frac{P_1V_1}{S_1}=\frac{\sigma\bar{E}^2R}{3}$, где $P_1$ — мощность, поглощаемая в единице объема частицы, $V_1$ — объем частицы. Распределение температуры в жидкой фазе описывается уравнением Пуассона:

$$a^2\Delta T+\frac{P_{ж}}{C\rho}=0,\ \text{т. к.}\ \frac{dT}{d\tau}=0, \tag{9}$$

где $a^2=\lambda/C\cdot\rho$; $P_{ж}=\varepsilon_0\omega E^2\varepsilon''_{ж}$.

Решение уравнения (9) при граничных условиях

$$T\Big|_{r=\xi(\tau)}=T_{пл};\quad \frac{dT}{dr}\Big|_{r=R}=-q/\lambda, \tag{9 а, б}$$

(где $\xi(\tau)$ — координата $r$ фронта плавления, $R$ — радиус проводящей частицы) имеет вид

$$T=\frac{C_1}{r}+C_2-\frac{P_{ж}r^2}{6\lambda}. \tag{10}$$

Условие для фронта плавления имеет вид, сходный с (3):

$$\frac{dT}{dr}\Big|_{r=\xi(\tau)}=-\frac{Q\rho}{\lambda}\frac{d\xi}{d\tau}. \tag{11}$$

Из граничного условия (9б) находим

$$C_1=\frac{qR^2}{\lambda}-\frac{P_{ж}}{3\lambda}R^3=\frac{qR^2}{\lambda}\left(1-\frac{\varepsilon''_{ж}}{\varepsilon''_{кол}}\right). \tag{11а}$$

Из (10) и (11) получаем дифференциальное уравнение для $\xi(\tau)$

$$\frac{C_1}{\xi^2(\tau)}+\frac{P_{ж}}{3\lambda}\xi(\tau)=\frac{Q\rho}{\lambda}\frac{d\xi}{d\tau}. \tag{12}$$

Его решение при начальном условии $\xi_{(\tau=0)}=R$ имеет вид:

$$\xi(\tau)=\sqrt[3]{\left(\frac{3\lambda}{P_{ж}}C_1+R^3\right)e^{P_{ж}\tau/Q\rho}-\frac{3\lambda}{P_{ж}}C_1}. \tag{13}$$



Матеріал, захищений авторським правом

Из граничного условия (9а) находим:

$$C_2 = T_{пл} - \frac{C_1}{\xi(\tau)} + \frac{P_ж}{6\lambda}\xi^2(\tau). \qquad (13а)$$

При этом температура жидкой фазы у поверхности частицы $T|_{r=R}$ растет со временем, согласно формуле (10), по закону

$$T = T_{пл} + C_1\left(\frac{1}{r} - \frac{1}{\xi(\tau)}\right) + \frac{P_ж}{6\lambda}\left[\xi^2(\tau) - r^2\right]. \qquad (14)$$

Наиболее опасным является повышение температуры жидкой фазы у поверхности нагреваемой частицы ($r=R$). Величина перегрева определяется следующим выражением:

$$\Theta = T|_R - T_{пл} = \frac{qR^2}{\lambda}\left(1 - \frac{\varepsilon''_ж}{\varepsilon''_{кол}}\right)\left(\frac{1}{R} - \frac{1}{\xi(\tau)}\right) +$$

$$+ \frac{q}{2\lambda R}\frac{\varepsilon''_ж}{\varepsilon''_{кол}}\left[\xi^2(\tau) - R^2\right]. \qquad (15)$$

Поскольку в конце процесса (при $\tau=\tau_к)\,\xi_к(\tau_к) \gg R$, то предельная величина перегрева равна

$$\Theta_к \approx \frac{qR}{\lambda} + \frac{q}{2\lambda R}\frac{\varepsilon''_ж}{\varepsilon''_{кол}}\xi^2_к(\tau_к). \qquad (16)$$

При заданном допустимом перегреве $\Theta=\Theta_m$ ($\approx 40°$ С) находим максимальную величину теплового потока:

$$q_m = \frac{\lambda\Theta_m}{R + \frac{1}{2R}\frac{\varepsilon''_ж}{\varepsilon''_{кол}}\xi^2_к(\tau_к)}. \qquad (17)$$

Условием окончания процесса, как и выше, считаем слияние фронтов плавления, поэтому для конечного значения $\xi_к(\tau_к)$ получим формулу, сходную с (7)

$$\xi_к(\tau_к) \approx \frac{L}{\sqrt[3]{N}} \approx \sqrt[3]{\frac{V_0}{N_к}} \approx \sqrt[3]{\frac{m_0}{\rho N_к}}, \qquad (18)$$

где $m_0$ — масса, $V_0$ — объем, $L$ — характерный размер образца, $N_к$ — число введенных коллоидных частиц.

Тогда с помощью выражения (13) находим длительность процесса $\tau_к$ (при $\xi(\tau) \gg R$), с учетом условия (17) для $q_m$:

$$\tau_к \approx \frac{Q\rho R}{3q}\frac{\varepsilon''_{кол}}{\varepsilon''_ж}\ln\left(1 + \frac{\varepsilon''_ж}{\varepsilon''_{кол}}\frac{\xi^3_к(\tau_к)}{R^3}\right). \qquad (19)$$

Величина длительности процесса плавления с учетом вклада от разрастания включений жидкой фазы (формула 19) будет существенно ниже величины $\tau_к$, определяемой нагревом только частиц, (при $\varepsilon''_ж \to 0$ формула (19) имеет вид $\tau_к \approx \frac{Q\rho\xi^3_к(\tau_к)}{3q_mR^2}$), при условии $\ln(1+x) > x$, где



Матеріал, захищений авторським правом

$x = \frac{\varepsilon''_{ж}}{\varepsilon''_{кол}} \xi_к^3(\tau_к)/R^3$. Из данных таблиц находим, что это условие выполняется при $x > 0{,}2$. Сделаем сравнительную оценку величин. Полагаем $N_к = 10^6$; $\theta_m = 40°$; $m_0 = 0{,}1$ кг; $R = 10^{-5}$ м. При этих параметрах находим, что $\xi_к(\tau_к) = 5 \cdot 10^{-4}$ м, а величина $\xi_к(\tau_к)/R \approx 50$. Отношение $\varepsilon''_{кол}/\varepsilon''_{ж} \approx \approx 3 \cdot 10^6$, с учетом максимально допустимой величины коэффициента диэлектрических потерь жидкой фазы включения. Таким образом, мы видим, что условие не выполняется. Это означает, что процесс плавления твердой фазы образца определяется величиной тепла, поступающего от введенных проводящих частиц. Длительность процесса размораживания может быть оценена по следующей приближенной формуле:

$$\tau_к \approx \frac{Qm_0}{3\lambda\Theta N_к R}. \qquad (20)$$

При заданных величинах $\tau_к$ составляет 45 с.

Регулирование скорости нагрева в данном случае можно осуществлять за счет изменения концентрации и размера вводимых частиц. Сравнительный анализ выражений (17) и (20) показывает, что лучшим способом уменьшения длительности процесса плавления является увеличение числа частиц ($N$), так как с увеличением $R$ наряду с уменьшением длительности процесса возрастает опасность перегрева ($\Theta$), что требует уменьшения допустимой величины теплового потока.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
15. 04. 78

УДК 57.043.577.15:576.347

***А. М. Утевский, В. А. Чуйко, Л. А. Назарова***

# ВЛИЯНИЕ ОХЛАЖДЕНИЯ НА АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ МОНОАМИНОКСИДАЗЫ СЕРДЦА БЕЛЫХ КРЫС

Биогенные моноамины (БМА), играющие исключительно важную роль в регуляции и ауторегуляции процессов и функций, подвергаются в клетках животного организма многообразным ферментативным превращениям. Среди ферментов, участвующих в метаболизме БМА, существенное значение имеет митохондриальная моноаминоксидаза (МАО), моноамин — $O_2$-оксидоредуктаза (дезаминирующая), под влиянием которой БМА, в частности катехоламины (КА) и индолалкиламины (5-окситриптамин, 5-ОТ), дезаминируются и дают начало «аминогенным альдегидам», которые подвергаются дальнейшему превращению в соответствующие гликоли или кислоты.

Учитывая, что БМА — активные участники множества биологических процессов, а МАО — один из основных факторов их обмена, большой интерес представляло изучение влияния на этот фермент предварительного охлаждения содержащих его биологических объектов — клеток, тканей, органов.

Цель настоящей статьи — изучение активности МАО в митохондриях сердца белых крыс, подвергнутого предварительно выдерживанию в течение 60 мин при положительных и умеренно низких температурах.

Была исследована активность МАО при температурах +37; +20; +4; 0; —10 и —20° С. Контролем служила активность МАО сердец, не подвергавшихся предварительному воздействию различных температур. Активность МАО изучалась по отношению к различным субстратам — тирамину, серотонину, бензиламину.



Матеріал, захищений авторським правом

*Метод исследования.* Из навески ткани сердца 2—4 г (5—10 крыс) получали 10%-ный гомогенат в 0,25М сахарозе на *трис*-буфере (все операции проводили на холоду). Митохондрии получали методом дифференциального центрифугирования (12 тыс. об. в 1 мин), промывали 0,01 М фосфатным буфером. Митохондрии суспендировали из расчета 3—5 мг белка на пробу. Инкубацию проводили в сосудах, содержащих 0,5 мл фосфатного буфера, 1,0 мл митохондрий, 0,5 мл субстрата в течение 50 мин при температуре 37° С. Реакцию останавливали 20%-ной трихлоруксусной кислотой, от белка освобождались центрифугированием при 1,5 тыс. об/мин. Количество аммиака определяли по Конвею с последующей несслеризацией.

Обнаружено, что активность МАО в сердце крыс при +37° С составляет 1,01±0,26 по отношению к тирамину, 1,8±0,36 по отношению к серотонину; 0,5±0,14 по отношению к бензиламину (табл. 1). Эти данные соответствуют имеющимся в литературе.

Таблица 1

**Активность МАО в сердце крыс при различных температурах**

| Температура, °С | Тирамин | Серотонин | Бензиламин |
|---|---|---|---|
| Контроль | $\bar{x}=1{,}14\pm0{,}36$ | $\bar{x}=1{,}68\pm0{,}52$ | $\bar{x}=0{,}48\pm0{,}16$ |
| +37 | $\bar{x}=1{,}01\pm0{,}26$ * | $\bar{x}=1{,}8\ \pm0{,}36$ * | $\bar{x}=0{,}5\ \pm0{,}14$ * |
| +20 | $\bar{x}=1{,}4\ \pm0{,}24$ * | $\bar{x}=1{,}8\ \pm0{,}41$ * | $\bar{x}=0{,}38\pm0{,}14$ * |
| + 4 | $\bar{x}=1{,}58\pm0{,}62$ * | $\bar{x}=2{,}54\pm0{,}42$ * | $\bar{x}=0{,}36\pm0{,}09$ * |
| + 0 | $\bar{x}=1{,}72\pm0{,}96$ * | $\bar{x}=2{,}23\pm0{,}74$ * | $\bar{x}=0{,}32\pm0{,}71$ * |
| −10 | $\bar{x}=3{,}23\pm0{,}87$ $p<0{,}05$ | $\bar{x}=3{,}82\pm0{,}72$ $p<0{,}002$ | $\bar{x}=0{,}23\pm0{,}03$ * |
| −20 | $\bar{x}=2{,}53\pm0{,}523$ $p<0{,}05$ | $\bar{x}=4{,}2\ \pm0{,}74$ $p<0{,}02$ | $\bar{x}=0{,}78\pm0{,}12$ * |

* Статистически недостоверные различия по отношению к 37° С.

При выдерживании сердца крыс при температуре 0° С отмечается статистически недостоверное повышение активности МАО по отношению к тирамину и серотонину, а в то время как по отношению к бензиламину этот показатель несколько уменьшается. Существенным образом изменяется активность МАО при выдерживании сердца крыс при температурах от —10 до —20° С. Но указанные изменения проявляются только по отношению к тирамину и серотонину. Показатель активности МАО по отношению к бензиламину сохраняется неизменным. Характерная особенность при всех исследуемых температурах — сохранение соотношения активности фермента при действии его на различные субстраты. Наиболее высокая активность МАО по отношению к серотонину, промежуточная к тирамину и наиболее низкая — к бензиламину.

В связи с увеличением активности МАО в сердце крыс, развивающейся при выдерживании органов при пониженной температуре, представляло интерес выяснить, в какой мере изменения, вызванные низкими температурами, могут быть предотвращены при использовании криопротектора, в частности, полиэтиленоксида молекулярной массы 400 (ПЭО-400), широко применяемого в криобиологии. Вначале исследовалось непосредственное влияние ПЭО-400 в концентрации 5% на уровень активности МАО в сердце. Отмечено статистически недостоверное повышение активности МАО по отношению к тирамину и серотонину при сохранении той же активности по отношению к бензиламину.

При охлаждении сердца крыс до —10° С, предварительно обработанного 5%-ным раствором ПЭО-400, и выдерживании его при такой



Матеріал, захищений авторським правом

температуре в течение 60 мин обнаружено статистически достоверное повышение активности МАО по сравнению с материалом, обработанным ПЭО-400 и не подвергнутым замораживанию. Указанное повышение активности МАО отмечено в отношении всех исследуемых субстратов — тирамина, серотонина, бензиламина (табл. 2).

Таблица 2

**Влияние криопротектора ПЭО-400 на активность МАО (нМ $NH_3$), мг/мин**

| Условия опыта | Субстраты | | |
|---|---|---|---|
| | Тирамин | Серотонин | Бензиламин |
| Контроль, 5%-ный ПЭО-400 | $\bar{x}=1{,}66\pm0{,}346$ | $\bar{x}=2{,}5\ \pm0{,}115$ | $\bar{x}=0{,}3\ \pm0{,}1$ |
| Замораживание с 5%-ным ПЭО-400 | $\bar{x}=2{,}98\pm0{,}285$ | $\bar{x}=4{,}02\pm0{,}526$ | $\bar{x}=0{,}58\pm0{,}02$ |
| $p$ | $<0{,}02$ | $<0{,}02$ | $<0{,}02$ |

Представленные данные свидетельствуют о том, что непосредственное охлаждение сердца крыс до температуры —10° и —20° С без применения криопротектора, так и с предварительным использованием ПЭО-400 сопровождается возрастанием активности МАО. Другими словами, криопротектор ПЭО-400 не оказывает стабилизирующего эффекта при низких температурах в отношении моноаминоксидазы в сердце крыс. Вместе с тем следует отметить, что исследуемые свойства МАО довольно устойчивы в границах положительных температур +37° С→ →+20°→+4°→0° С и лишь замораживание, сопровождающееся образованием кристаллов льда, приводит к изменению этих свойств — повышению активности моноаминоксидазы. Это позволяет допустить, что низкие температуры через определенные механизмы, возможно, за счет повреждения мембран митохондрий, способствуют выходу фермента из органелл и увеличению ее активности.

Проведенные эксперименты дают возможность сформулировать следующее положение. Моноаминоксидаза изменяет свою активность под влиянием замораживания, однако это изменение не носит ингибирующего характера. Сам по себе фермент криостабилен и сохраняет свою активность при замораживании сердца крыс до —10 и —20° С при действии на исследуемые субстраты — тирамин, серотонин и бензиламин. При этом сохраняется соотношение чувствительности к субстратам, характерное для обычных температур.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
04. 04. 78

УДК 616.155.3:615.014.41:616—001.28

***А. А. Цуцаева, Н. Н. Попов***

# ВЛИЯНИЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ АЛЛОГЕННЫХ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ ОБЛУЧЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Изучалось влияние трансплантации аллогенных криоконсервированных клеток лимфатических узлов, спленоцитов, тимоцитов на 60-дневную выживаемость животных, облученных в среднелетальной и летальной дозах.

*Материал и методика.* Эксперименты проведены на мышах-гибридах (СВА×С57Bl)$F_1$. Животных облучали на установке РУМ-11 в до-



Матеріал, захищений авторським правом

зах 650 Р (ЛД 50/30) и 950 Р (ЛД 100/15), при мощности дозы 90 Р/мин. Животным, облученным в дозе 650 Р, лимфоидные клетки трансплантировали per se, животным, облученным в дозе 950 Р, аллогенные лимфоидные клетки трансплантировали в сочетании с сингенным криоконсервированным костным мозгом. Трансплантацию лимфоцитов проводили через 24 ч с момента облучения и на 10-е сут, когда в селезенке имелись уже сформированные гемопоэтические колонии. Клетки лимфатических узлов, спленоциты, тимоциты трансплантировали в следующих количествах: $10 \cdot 10^6$, $1 \cdot 10^6$, $0{,}1 \cdot 10^6$, $0{,}01 \cdot 10^6$. Клетки костного мозга трансплантировали в терапевтической дозе ($1 \cdot 10^7$) через 6—8 ч после облучения.

Опытные группы животных были следующие: при облучении ЛД 50/30: первая — получившие клетки лимфатических узлов, вторая — получившие спленоциты, третья — получившие тимоциты, контроль — облученные животные. При облучении ЛД 100/15: первая — получившие клетки костного мозга и клетки лимфатических узлов, вторая — получившие клетки костного мозга и спленоциты, третья — получившие клетки костного мозга и тимоциты, контроль — животные, которым вводили только клетки костного мозга.

Клетки лимфатических узлов, селезенки, тимуса получали от мышей линии BAlB с путем гомогенизации органов в *трис*-HCl-буфере (pH 7,1). Лимфоциты селезенки концентрировали по методу, описанному Пушкарем и др. [2]. Клетки костного мозга вымывали из бедренных костей раствором ЦОЛИПК-3. Замораживание клеток костного мозга и лимфоцитов проводили до —196° С под защитой ПЭО-400. Клетки костного мозга охлаждали по разработанному методу. [1]. Для замораживания лимфоцитов применяли следующую программу: I этап — 1° С/мин до температуры —28° С с тридцатиминутной экспозицией клеток при этой температуре; II этап —400° С/мин до температуры —196° С. Деконсервировали при температуре +41° С.

Таблица 1

**60-дневная выживаемость (в %) животных, облученных ЛД 50/30, при трансплантации аллогенных криоконсервированных лимфоцитов**

| Трансплантируемые клетки | Дозы клеток | | | |
|---|---|---|---|---|
| | $10 \cdot 10^6$ | $1 \cdot 10^6$ | $0{,}1 \cdot 10^6$ | $0{,}01 \cdot 10^6$ |
| Клетки лимфоузлов | 0* / 26 | 10 / 40 | 64 / 56 | 42 / 43 |
| Спленоциты | 0 / 34 | 20 / 42 | 61 / 55 | 41 / 44 |
| Тимоциты | 20 / 40 | 62 / 54 | 49 / 45 | 43 / 42 |
| Клетки не вводили (контроль) | 42 | — | — | — |

* Над чертой — показатель выживаемости животных при трансплантации лимфоцитов через 24 ч после облучения; под чертой — при трансплантации лимфоцитов на 10-е сут с момента облучения.

*Результаты и обсуждение.* В проведенных исследованиях установлено, что трансплантация через 24 ч с момента облучения $0{,}1 \cdot 10^6$ аллогенных криоконсервированных клеток лимфатических узлов и спленоцитов $1 \cdot 10^6$ аллогенных криоконсервированных тимоцитов повышает 60-дневную выживаемость животных, облученных ЛД 50/30, на 19—22%; животных, облученных ЛД 100/15, защищенных сингенным криоконсервированным костным мозгом, — на 18—23%, по сравнению с животными, которым лимфоциты не вводили (табл. 1, 2). Трансплантация криоконсервированных клеток лимфатических узлов и спленоцитов в дозе $0{,}01 \cdot 10^6$, криоконсервированных тимоцитов в дозах $0{,}01 \cdot 10^6$, $0{,}1 \cdot 10^6$ не оказывала значительного эффекта на выживаемость животных, а дозы криоконсервированных клеток лимфатических узлов и спленоцитов, равные $1 \cdot 10^6$, $10 \cdot 10^6$, криоконсервированных тимоцитов $10 \cdot 10^6$, напротив, снижали выживаемость животных.

Матеріал, захищений авторським правом

Таблица 2

**60-дневная выживаемость (в %) животных облученных ЛД 100/15, при трансплантации сингенных криоконсервированных клеток костного мозга в комбинации с аллогенными криоконсервированными лимфоцитами**

| Трансплантируемые клетки | Дозы клеток | | | |
|---|---|---|---|---|
| | $10 \cdot 10^6$ | $1 \cdot 10^6$ | $0{,}1 \cdot 10^6$ | $0{,}01 \cdot 10^6$ |
| Клетки костного мозга + клетки лимфоузлов | 0* / 20 | 28 / 53 | 84 / 71 | 69 / 61 |
| Клетки костного мозга + спленоциты | 0 / 37 | 39 / 56 | 81 / 73 | 62 / 62 |
| Клетки костного мозга + тимоциты | 20 / 62 | 79 / 74 | 67 / 64 | 63 / 61 |
| Клетки костного мозга per se (контроль) | 61 | — | — | — |

* Над чертой — показатель выживаемости животных при трансплантации лимфоцитов через 24 ч после облучения; под чертой — при трансплантации лимфоцитов на 10-е сут с момента облучения.

Снижение выживаемости животных при трансплантации лимфоцитов в таких дозах, по-видимому, обусловлено развитием феномена инактивации несингенных стволовых клеток и их потомков.

Из полученных данных видно, что различия в терапевтической эффективности трансплантации облученным животным клеток лимфатических узлов, спленоцитов, тимоцитов не существенны. При трансплантации аллогенных криоконсервированных клеток лимфатических узлов, спленоцитов, тимоцитов на 10-е сут с момента облучения обнаружено повышение выживаемости животных, облученных в среднелетальной и летальной дозах на 11—14% и 10—15% по сравнению с контролем (табл. 1, 2). При этом терапевтически эффективными оказались упомянутые дозы клеток (для клеток лимфатических узлов и спленоцитов — $0{,}1 \cdot 10^6$, для тимоцитов — $1 \cdot 10^6$), другие дозы клеток были не эффективны.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о терапевтической целесообразности трансплантации аллогенных криоконсервированных лимфоцитов при лучевой патологии.

Обнаруженное в экспериментах повышение выживаемости животных при трансплантации аллогенных криоконсервированных лимфоцитов мы связываем со стимуляцией функциональной активности гемопоэтических клеток, сохранившихся при облучении ЛД 50/30, и введенных донорских клеток при облучении ЛД 100/15, и неспецифической активацией защитных сил организма. Это действие может быть опосредовано через колониеобразующую активность, продукция которой наблюдается в таких иммуноконфликтных ситуациях, как GVH-реакция [6], в смешанной культуре лимфоцитов [6, 7], при действии митогенных факторов [4, 7]. Роль введенных лимфоцитов может также сводиться к обеспечению клеток метаболитами, необходимыми для их пролиферации и репарации, такими как прекурсоры нуклеиновых кислот [5], или стимуляция репаративных процессов в поврежденных тканях продуктами жизнедеятельности, как это было отмечено при трансплантации костномозговых клеток [3]. Нельзя исключить также и другие возможные пути и механизмы воздействия лимфоидных клеток на кроветворную и другие системы.

1. *Пушкарь Н. С., Даценко Б. М., Иткин Ю. А., Щелокова А. В.* Глубокое охлаждение как метод консервации и длительного хранения костного мозга. — Клин. хирургия, 1967, № 12, с. 25—26.



Матеріал, захищений авторським правом

2. *Пушкарь Н. С., Полякова А. И., Цуцаева А. А., Иткин Ю. А.* Низкотемпературная консервация лимфоцитов. — Пробл. гематологии и переливания крови, 1974, № 7, с. 23—26.
3. *Рябуха Н. И., Резвая А. П.* К вопросу о механизме лечебного действия пересадок кроветворных тканей при лучевых поражениях. — Докл. АН УССР, Сер. Б, 1970, № 1, с. 244—246.
4. *Cline M. J., Golde D. W.* Production of colony stimulating activity by human lymphocytes. — Nature, London, 1974, **248**, N 5450, p. 703—704.
5. Mediatores of cellular immunity / Ed. M. Lawrence Landy. — New York : Acad. press, 1969. — 469 p.
6. *McNeill T. A.* Release of bone marrow colony stimulating activity during immunological reactions in vitro. — Nature (New Biol.), 1973, **244**, N 1, p. 175—176.
7. *Parker J. W., Metcalf D.* Production of colony stimulating factors in mitogen stimulates lymphocyte cultures. — J. Immunol., 1974, **112**, N 2, p. 502—510.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
28.02.79

УДК 616.155.3:615.014.41:616—001.28

***А. А. Цуцаева, Н. Н. Попов***

# ВОССТАНОВЛЕНИЕ ИММУННЫХ РЕАКЦИЙ В ОБЛУЧЕННОМ ОРГАНИЗМЕ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ АЛЛОГЕННЫХ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ЛИМФОЦИТОВ

В экспериментах, проведенных in vitro и in vivo, показано, что аллогенные лимфоциты способны усиливать гуморальные и клеточные иммунные реакции [1, 2, 7, 10, 12, 13] стимулировать миелогенез [14].

Цель данной работы — изучение эффективности применения аллогенных криоконсервированных лимфоидных клеток в восстановлении иммуногенеза у облученных животных.

*Материал и методика.* Эксперименты проведены на мышах-гибридах (СВА×С57Bl) $F_1$. Облучение проводили на установке РУМ-11 в дозе 950 Р при мощности дозы 90 Р/мин. Облученным животным через 6—8 ч трансплантировали $1\times10^7$ сингенных криоконсервированных костномозговых клеток и через 24 ч $0{,}1\times10^6$ аллогенных криоконсервированных клеток лимфатических узлов, спленоцитов, $1\times10^6$ тимоцитов. Аллогенные клетки получали от мышей линии BA1B/c.

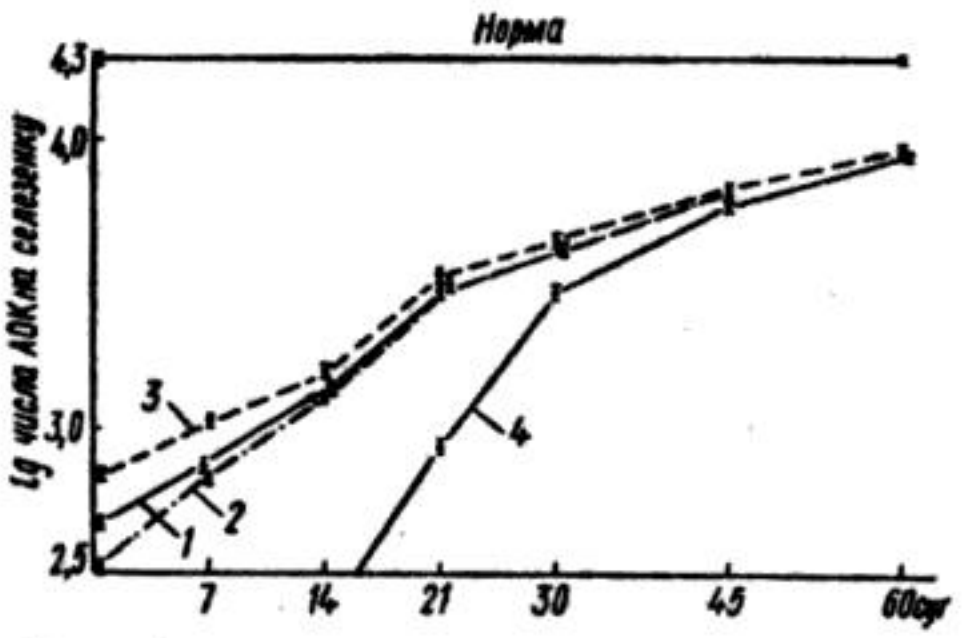
Опытные группы были следующие: первая — животные, которым вводили криоконсервированные клетки костного мозга и криоконсервированные клетки лимфатических узлов; вторая — животные, которым вводили криоконсервированные клетки костного мозга и криоконсервированные спленоциты; третья — животные, которым вводили криоконсервированные клетки костного мозга и криоконсервированные тимоциты. Контролем были животные, которым вводили только сингенные криоконсервированные клетки костного мозга.

О влиянии трансплантации аллогенных лимфоцитов на восстановление иммуногенеза у облученных животных судили по уровню гуморальных и клеточных реакций в различные сроки после облучения, по сравнению с животными, которым лимфоциты не вводили. Реакции гуморального иммунитета оценивали по величине накопления антителообразующих клеток (АОК) в селезенке животных в ответ на иммунизацию эритроцитами барана на 1, 7, 14, 21, 30, 45, 60-е пострадиационные сутки, клеточные иммунные реакции по скорости отторжения пересаженных в эти сроки аллогенных лоскутов кожи (мышей линии А). Число антителообразующих клеток определяли по Ерне [11] на 5-е сут с момента иммунизации. Лоскуты кожи пересаживали по Билинхам [6].



Матеріал, захищений авторським правом

Костный мозг вымывали из бедренных костей раствором ЦОЛИПК-3. Замораживали до —196° С под защитой ПЭО-400 по двухэтапной программе [3]. Клетки лимфатических узлов, селезенки, тимуса получали путем гомогенизации органов в *трис*-HCl-буфере (pH 7,1). Лимфоциты селезенки концентрировали по методу, описанному Н. С. Пушкарем. [4]. Замораживание клеток проводили до —196° С под защитой ПЭО-400 в 10%-ной концентрации по следующей программе: первый этап —1° С/мин до —28° С с 30-минутной экспозицией клеток при этой температуре; второй этап —400° С/мин до —196° С. Оттаивали клетки на водяной бане при +41° С.




Восстановление антителообразующей активности у облученных животных под влиянием трансплантации криоконсервированного костного мозга в сочетании с аллогенными криоконсервированными лимфоцитами:

*1* — костный мозг + спленоциты; *2* — костный мозг + тимоциты; *3* — костный мозг + клетки лимфатических узлов; *4* — костный мозг per se (контроль).

*Результаты и обсуждение.* Проведенные исследования показали, что введение сингенного криоконсервированного костного мозга в комбинации с аллогенными криоконсервированными клетками лимфатических узлов, спленоцитами, тимоцитами значительно повышает иммунореактивность животных, сообщает им способность с первого дня после облучения реализовать гуморальные и клеточные иммунные реакции. Уровень антителообразующей активности животных и динамика восстановления антителогенеза к норме под влиянием трансплантации костного мозга совместно с аллогенными лимфоидными клетками приведена на рисунке.

Как видно из рисунка, у животных, получивших криоконсервированные костномозговые клетки и аллогенные тимоциты и спленоциты, в первые три недели после облучения уровень иммунной реакции на эритроциты барана был в четыре—восемь раз выше такового у животных, которым лимфоциты не вводили. У животных, получивших костномозговые клетки и клетки лимфатических узлов, иммунный ответ в этот период был выше, чем у контрольных животных, в 5—10 раз. К 30-м сут различия в уровне иммунного ответа между животными, получившими аллогенные лимфоциты, и контрольными животными несколько нивелировались, а к концу второго пострадиационного месяца исчезали ($p > 0{,}05$). Антителообразующая активность животных, которым вводили криоконсервированные клетки костного мозга и аллогенные криоконсервированные клетки лимфатических узлов, спленоциты, тимоциты к 60-м сут составляли 50% нормы, животных контрольной группы — 48% нормы.

Трансплантационная активность животных при введении сингенных криоконсервированных костномозговых клеток совместно с аллогенными криоконсервированными клетками лимфатических узлов и спленоцитами повышалась с 7-х пострадиационных суток; при введении костного мозга совместно с тимоцитами — с 14-х пострадиационных суток, по сравнению с животными, которым вводили только клетки костного мозга, и оставалась достоверно выше весь период изучения до достижения нормальных величин.

Восстановление трансплантационных реакций к норме у животных опытных групп происходило к 21-м пострадиационным суткам, у животных контрольной группы — к 30 сут. Напряженность трансплантационных реакций в разные сроки после облучения у животных, полу-



Матеріал, захищений авторським правом

чивших сингенный криоконсервированный костный мозг per se и совместно с аллогенными лимфоцитами, приведена в таблице.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что введение аллогенных криоконсервированных лимфоцитов облученным животным, защищенным сингенным костным мозгом, значительно усиливает гуморальные и клеточные иммунные реакции организма.

**Скорость отторжения (в днях) аллотрансплантатов кожи летально облученными животными, получившими криоконсервированные костномозговые клетки в сочетании с аллогенными криоконсервированными лимфоцитами**

| Трансплантируемые клетки | Дни трансплантации кожи с момента облучения | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 7-й | 14-й | 21-й | 30-й |
| Клетки костного мозга+клетки лимфоузлов | 24,1±0,7 | 17,3±0,6 | 12,8±0,5 | 12,0±0,7 |
| Клетки костного мозга+спленоциты | 24,7±0,8 | 17,9±0,6 | 12,6±0,4 | 12,0±0,6 |
| Клетки костного мозга+тимоциты | >25 | 18,4±0,7 | 13,0±0,6 | 11,9±0,8 |
| Клетки костного мозга per se (контроль) | >25 | 21,4±0,7 | 17,2±0,4 | 12,1±0,8 |

Время отторжения аллотрансплантатов кожи необлученными животными составляло 11,9±0,8 дней.

В экспериментах установлено, что стимулирующее действие аллогенных лимфоцитов на иммуногенез проявляется только в первый пострадиационный месяц. Наблюдаемое нами повышение иммуногенеза у облученных животных под влиянием трансплантации аллогенных криоконсервированных лимфоцитов, вероятно, имеет неспецифический характер и обусловлено факторами, выделяемыми Т-клетками, активированными антигенами гистосовместимости. Механизмы, приводящие к усилению иммуногенеза при аллогенной комбинации клеток, хорошо обсуждены в литературе [5, 8, 9]. Отсутствие стимулирующего эффекта аллогенных лимфоцитов на иммуногенез во второй пострадиационный месяц, по-видимому, объясняется тем, что к концу первого пострадиационного месяца происходит восстановление лимфоидной ткани из введенных сингенных костномозговых клеток и элиминацией образовавшимися иммунокомпетентными клетками введенных аллогенных донорских лимфоцитов.


1. *Манько В. М., Петров Р. В.* Взаимодействие аллогенных лимфоцитов и клеток предшественников при первичном и вторичном иммунном ответе. — Онтогенез, 1976, № 2, с. 123—130.
2. *Михайлова А. А., Петров Р. В., Захарова Л. А.* Синтез иммуноглобулинов при совместном культивировании лимфоидных клеток различного гистологического происхождения. — В кн.: Вопросы радиационной иммунологии и микробиологии: (Тез. VIII конф.). М., 1972, с. 36—37.
3. *Пушкарь Н. С., Даценко Б. М., Иткин Ю. А., Щелокова А. В.* Глубокое охлаждение, как метод консервации и длительного хранения костного мозга. — Клин. хирургия, 1967, № 12, с. 25—26.
4. *Пушкарь Н. С., Полякова А. И., Цуцаева А. А., Иткин Ю. А.* Низкотемпературная консервация лимфоцитов. — Пробл. гематологии и переливания крови, 1974, № 7, с. 23—26.
5. *Basten A., Miller J. F. A. P.* Cellular interactions in the immune response. — In. Cell communication. New York, 1974, p. 187—216.
6. *Billingham R. E., Medawar P. B.* The technique of free skin grafting in mammals. — J. Exp. Biol., 1951, **28**, N 3, p. 385—402.
7. *Feldman M., Basten A.* Cell interactions in the immune response in vitro. IV. Comparison of the effects of antigen-specific and allogenic thymus-derived cell factors. — J. Exp. Med., 1972, **136**, N 4, p. 722—736.
8. *Feldman M.* Cell to cell interactions in the immune response. — Cell Haematol., 1974, 7, N 4, p. 593—609.




Матеріал, захищений авторським правом

9. *Gottlib A. A.* Interactions between lymphoid cells. — In: Development lymphocytes cellular. Biology. Clevelend (Ohio), 1974, p. 1—25.
10. *Hamaka T., Osborne D. N., Katz D. H.* Cell interactions between histoincompatible T and B lymphocytes. Allogenic effect by irradiated host T-cells on adoptively transferred histoincompatible B-lymphocytes. — J. Exp. Med., 1973, **137**, N 6, p. 1393—1404.
11. *Jerne N. K., Nordin A. A.* Plaque-formation in agar by single antibody producing cells. — Science, 1963, **140**, p. 405—406.
12. *Katz D. H.* Interactions between T and B lymphocytes in immune responses. — J. Investig. dermatol., 1975, **65**, N 4, p. 347—352.
13. *Tadakuma T., Mitsuma T., Ishikawa H., Saito K.* In vitro reconstitution of anti-sheep erythrocyte antibody response of T-cell depleted spleen cells by allogeneic T-cells or by factor derived from them. — Jap. J. Microbiol., 1975, **19**, N 4, p. 287—298.
14. *Vitale B., Burek V., Plavljenic D., Slamberger S.* The influence of bone marrow T-lymphocytes on the proliferative activity of bone marrow cells injected into lethally irradiated recipient. — Period. biologorum, 1976, **78**, suppl. 1, p. 113—119.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
28. 02. 79

УДК 57.043.612.1

***М. И. Шраго, П. А. Пустовойт***

# ВЛИЯНИЕ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ КРИОПРОТЕКТОРОВ НА РЕОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КРОВИ

К числу факторов, оказывающих влияние на кровоток, относятся прежде всего физико-химические свойства самой крови, а именно: количество эритроцитов в единице объема, взаимодействие их между собой, эластичность плазматической мембраны, форма и объем клеток, отношение к сосудистой стенке, вязкость плазмы и цельной крови и т. д. Комплекс перечисленных свойств получил название реологических, изучение которых находит применение при различных патологических состояниях. Особое значение приобретают эти показатели в трансфузиологии при внутривенном введении крови, препаратов крови и кровезаменителей, способных воздействовать на текучесть среды. В таких клинических ситуациях сведения о реологических свойствах крови необходимы для обоснования рациональных лечебных мероприятий.

Однако определение реологических свойств крови in vivo в настоящее время представляется практически невозможным и потому суждение о ее текучести составляется на основании данных, получаемых при моделировании определенных условий кровотока in vitro, для характеристики которых приняты следующие параметры: вязкость, текучесть, показатель агрегации, минимальное напряжение сдвига, характеризующие структуру крови.

Настоящая статья посвящена изучению некоторых показателей реологических свойств крови, содержащей полиэтиленоксиды (ПЭО) молекулярной массы 400, 1500, 2000 и ОЭГ *n*-30. Предпосылкой к постановке таких исследований являются клинические ситуации, возникающие при переливаниях размороженных клеточных взвесей (эритроцитов, лейкоцитов, миелокариоцитов), содержащих криопротекторы, не требующие предварительного отмывания клеток.

Установлено, что ПЭО — вещества низкой токсичности как на клеточном, так и на организменном уровне, поэтому допускается их внутривенное введение. Однако возможное влияние их на реологические свойства крови при этом не учитывались. В то же время известно, что внутривенное введение полимерных соединений, например кровезаменителей: полиглюкина, поливинилпирролидона и других, вызывают изменение показателей текучести крови [1—3].

Таким образом, исследование этих показателей при применении растворов криопротекторов дополнит общее представление о влиянии



Матеріал, захищений авторським правом

полимерных соединений на реологические свойства крови и расширит круг сведений о действии криопротекторов в организме реципиента.

Изучение реологических свойств крови мы начали с исследования влияния водных растворов криопротекторов группы ПЭО и ОЭГ *n*-30 на динамическую вязкость и скорость оседания эритроцитов.

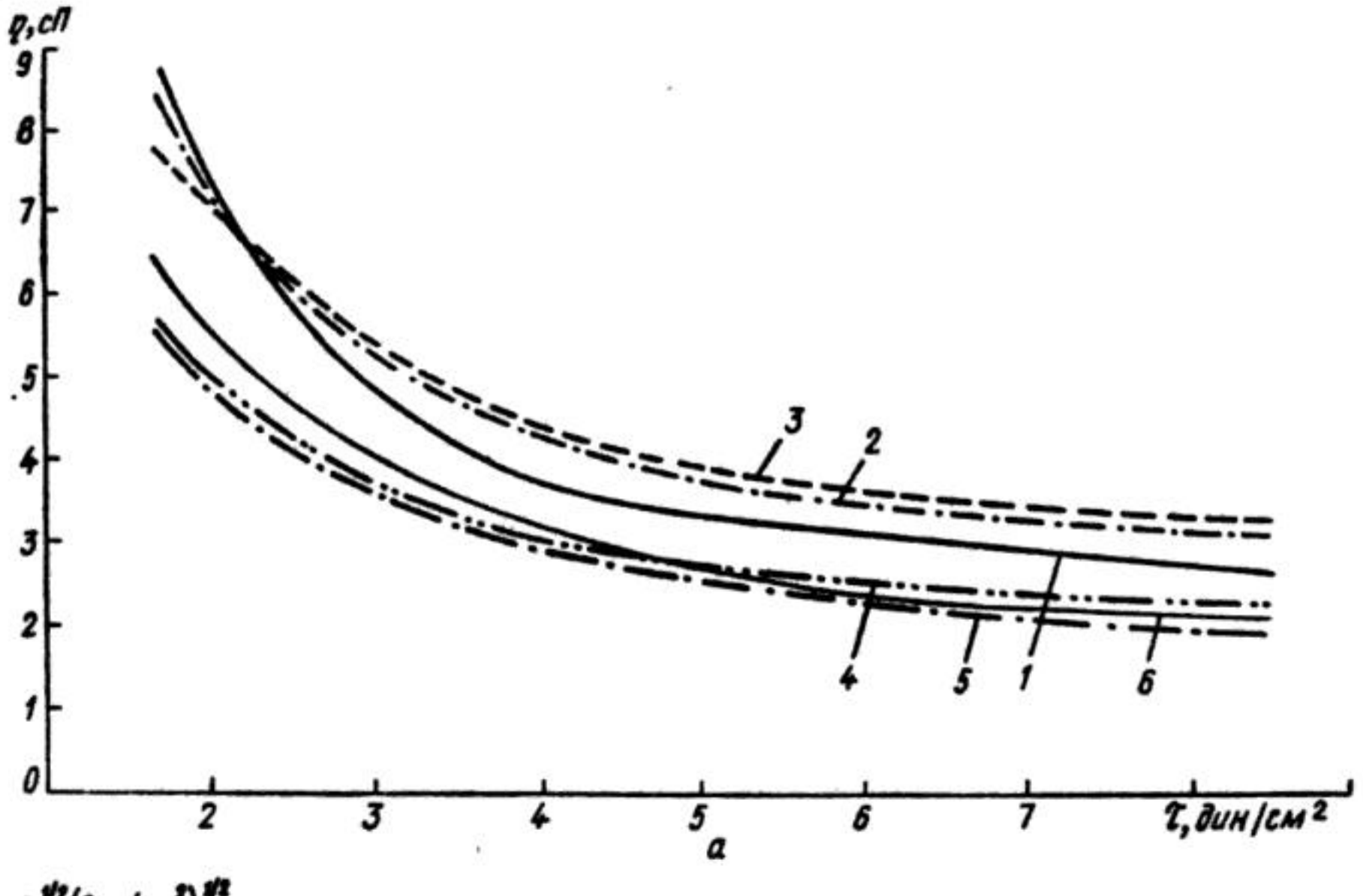



Рис. 1. Зависимость вязкости η от напряжения сдвига τ для крови и ее смесей с водными растворами криопротекторов в соотношении 10 : 1 (*а*) и отношение напряжения сдвига к скорости сдвига для крови и ее смесей с водными растворами криопротекторов в соотношении 10 : 1 (*б*):

*а*: *1* — цельная кровь, *2* — с ПЭО-2000, *3* — с ОЭГ (*n*=30), *4* — с ПЭО-1500, *5* — с ПЭО-400, *6* — с нативной плазмой; *б*: *1* — цельная кровь, *2* — с ПЭО-2000, *3* — с ОЭГ (*n*=30), *4* — с ПЭО-1500, *5* — с ПЭО-400, *6* — с нативной плазмой.

Объектом исследования была консервированная донорская кровь (на консерванте ЦОЛИПК-7б). Исследовались системы: кровь — 20%-ные водные растворы криопротекторов (ПЭО с молекулярной массой 400, 1500, 2000 и ОЭГ $n=30$ в соотношении 10 : 1 и 4 : 1). Контролем эффекта разведения служила система «кровь—нативная плазма» в тех же соотношениях.

Разведение крови в соотношении 10 : 1 — аналог трансфузии среднего объема взрослому человеку, когда трансфузионная среда составляет 10% к общему объему циркулирующей крови. Разведение крови в соотношении 4 : 1 может служить подобием массивного переливания. Определяли динамическую вязкость и скорость оседания эритроцитов консервированной донорской крови с гематокритом 50%, а также систем с теми же образцами крови и 20%-ми водными растворами криопротекторов.



Матеріал, захищений авторським правом

Реологические свойства крови, ее динамическую вязкость η, зависимость скорости сдвига $\bar{U}$ от напряжения сдвига τ исследовали на капиллярном рамочном вискозиметре. Применяющиеся в настоящее время вискозиметры типа Гесса, например ВК-4, дают возможность оценить вязкость крови только при определенных, довольно больших напря-

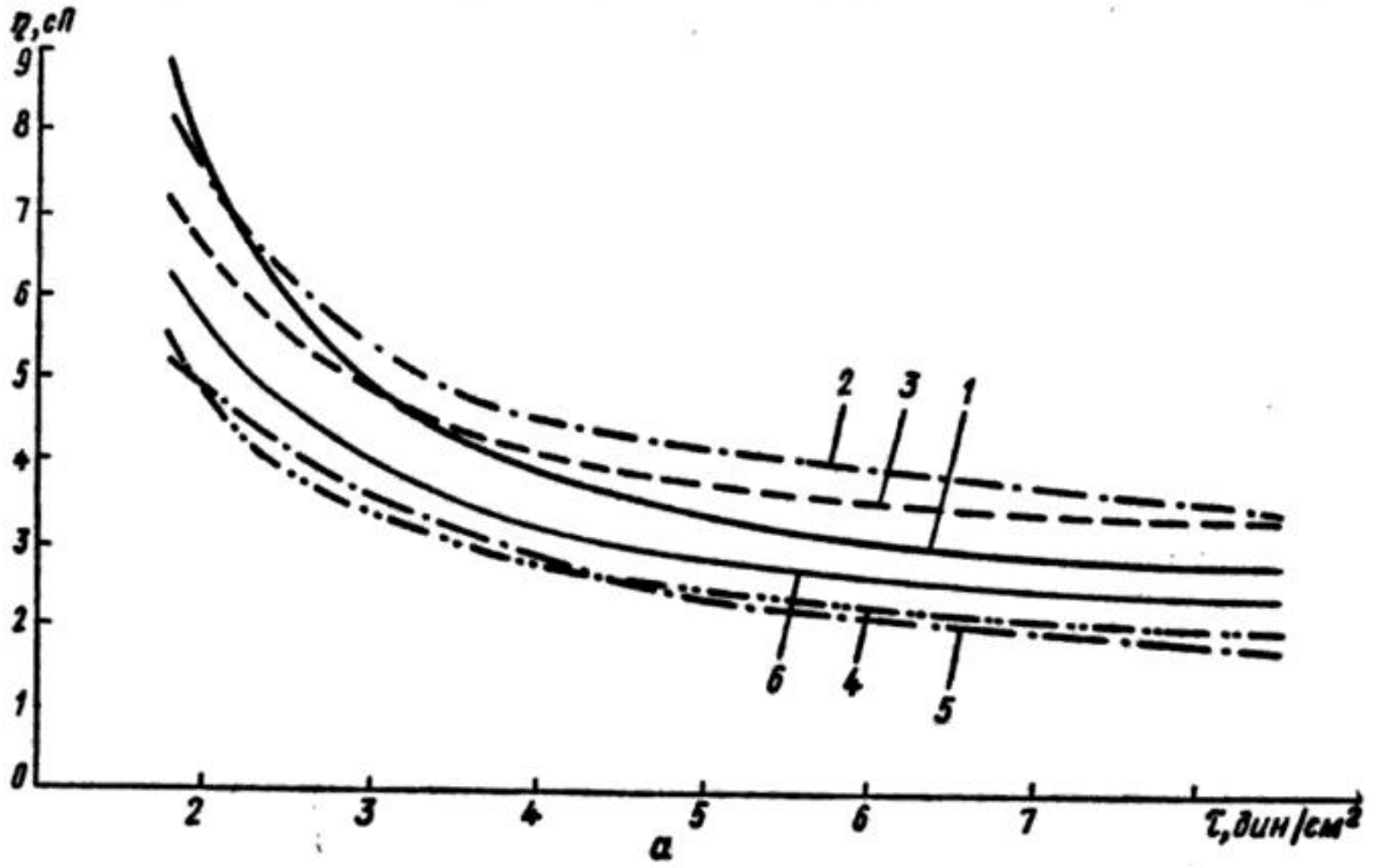



Рис. 2. Зависимость вязкости η от напряжения сдвига τ для крови и ее смесей с водными растворами криопротекторов в соотношении 4 : 1 (*а*) и отношение напряжения сдвига к скорости сдвига для крови и ее смеси с водными растворами криопротекторов (*б*).

Обозначения те же, что на рис. 1.

жениях (скоростях) сдвига в зоне ньютоновского ее поведения без термостатирования и регуляции напряжения сдвига, и поэтому мало пригодны для определения динамической вязкости.

Измерения, выполняемые на лабораторной установке, дали возможность смоделировать капиллярное русло с различной скоростью движения крови при градиенте давления от 50 до 10 мл. вод. ст. Скорость течения и вязкость крови определяли при напряжениях сдвига 1,69; 2,54; 3,39; 5,09, 6,79; 8,49 дин/см², что соответствует участкам сосудистого русла диаметром до 0,7 мм. Все измерения проводили при постоянной температуре +37° С. В тех же пробах определяли скорость оседания эритроцитов (СОЭ) по Панченкову. Результаты статистически обработаны и оценены по критерию Стьюдента.

Из рис. 1 видно, что вязкость крови, разведенной водными растворами криопротекторов ПЭО и ОЭГ, отличается от вязкости цельной



Матеріал, захищений авторським правом

крови. Вязкость систем «кровь—криопротектор» при малых напряжениях сдвига (до 3 дин/см²) меньше с ПЭО-400, 1500 ($p<0{,}01$) и достоверно не изменялась с ПЭО-2000 и ОЭГ $n$-30 ($p>0{,}5$) по сравнению с цельной кровью. При увеличении напряжения сдвига до 8,49 дин/см² вязкость систем также изменяется, причем характер изменений зависит от молекулярной массы ПЭО: понижается с ПЭО-400, достоверно не изменяется с ПЭО-1500 ($p<0{,}5$) и повышается с ПЭО-2000 и ОЭГ $n=30$ ($p<0{,}05$, $p<0{,}001$) по сравнению с цельной кровью.

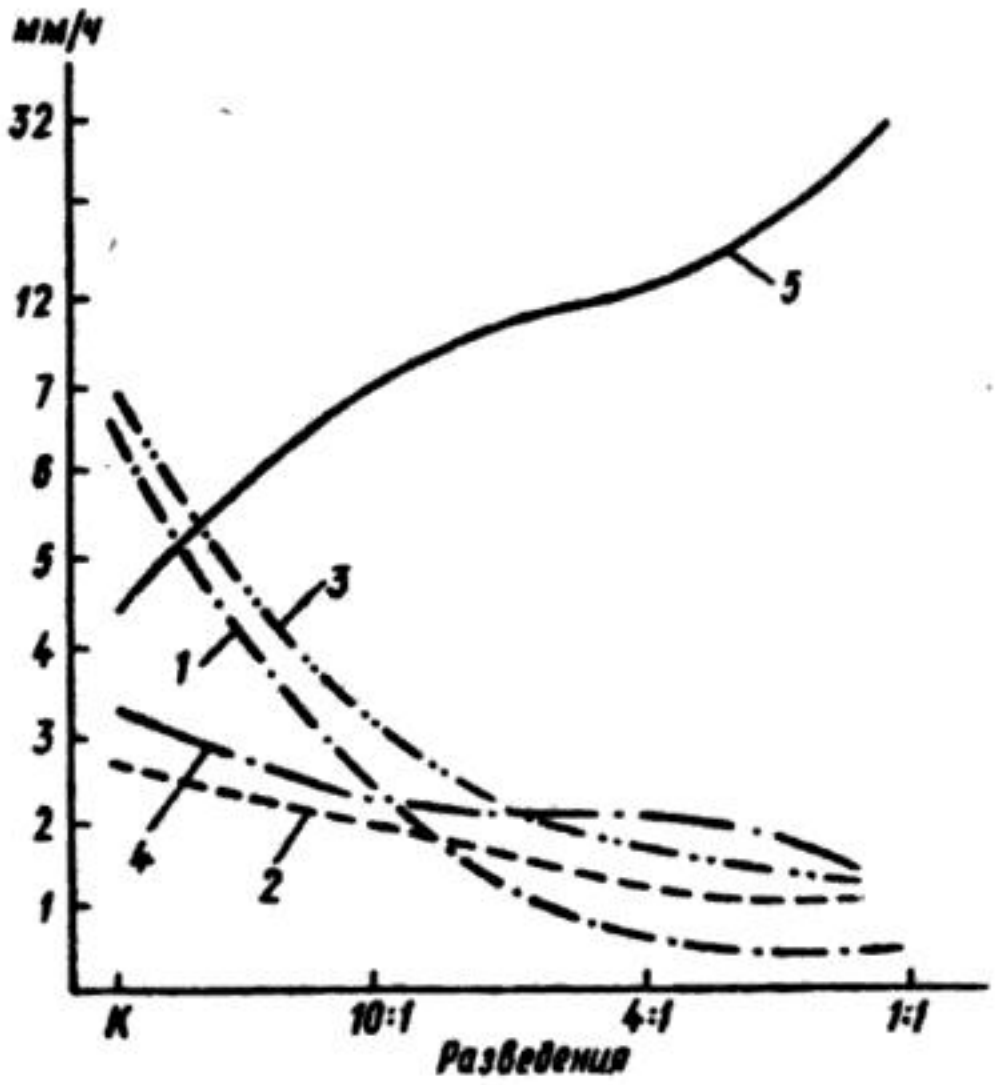



Рис. 3. Влияние водных растворов ПЭО на СОЭ:
*К* — цельная кровь; *1* — с ПЭО-2000; *2* — с ПЭО-1500; *3* — с ПЭО-400; *4* — с ОЭГ ($n=30$); *5* — с нативной плазмой.

Вязкость системы «кровь—нативная плазма» при тех же разведениях и напряжениях сдвига не меняется по сравнению с данными систем «кровь—ПЭО-400», «кровь—ПЭО-1500».

Для определения такого важного показателя как предельное напряжение сдвига использовали другое построение, которое предложил Кассон [4] для характеристики реологических свойств технических жидкостей, отражающее зависимость напряжения сдвига $\tau$ от скорости сдвига $\bar{U}$ при данной вязкости. В дальнейшем Мэррил [5] показал принципиальную возможность приложения уравнения Кассона для характеристики реологических свойств крови быка и человека. Эта реологическая величина считается важным критерием, определяемым структурными особенностями крови.

Прямая, отражающая зависимость напряжения сдвига $\tau$ от скорости сдвига ($\bar{U}$) при данной вязкости, относящаяся к крови (рис. 1 — *1*, *а*) лежит выше, чем прямые для крови, разведенной водными растворами криопротекторов ПЭО и ОЭГ. Это позволяет думать о том, что течение крови, разведенной водными растворами криопротекторов, при одинаковых напряжениях сдвига происходит с большей скоростью, чем цельной крови.

На рис. 2 показаны кривые, характеризующие вязкость системы «кровь—криопротектор», разведенной в соотношении 4 : 1. Они аналогичны кривым вязкости при разведении системы 10 : 1. Изменение вязкости систем «кровь—ПЭО-2000» и «кровь—ОЭГ $n=30$» при малых напряжениях сдвига (до 3 дин/см²) не достоверно относительно контроля, и достоверно повышается ($p<0{,}001$, $p<0{,}02$) относительно контроля на разведение.

При этих же разведениях вязкость систем «кровь—ПЭО-400» и «кровь—ПЭО-1500» достоверно понижается относительно контроля ($p<0{,}001$). При дальнейшем увеличении напряжения сдвига или скорости сдвига вязкость систем «кровь—ПЭО-2000» и «кровь—ОЭГ $n=30$» увеличивается относительно контроля и контроля на разведение ($p<0{,}001$). Вязкость системы «кровь—ПЭО-400» уменьшается ($p<0{,}01$), а вязкость системы «кровь—ПЭО-1500» изменяется недостоверно относительно контроля ($p>0{,}5$).

Скорость оседания эритроцитов в системах «кровь—водные растворы криопротекторов» (рис. 3) понижается относительно цельной крови

Матеріал, захищений авторським правом

(Ht=50%), в то время как разведение крови плазмой вызывает значительное ускорение оседания клеток.

В заключение можно сделать следующие выводы.

В модельных опытах изучено влияние водных растворов криопротекторов ПЭО и ОЭГ на показатели текучести крови. При этом обнаружено, что введение 20%-ных водных растворов ПЭО-400, 1500, 2000 и ОЭГ $n=30$ в систему «кровь—криопротектор» в соотношении 10 : 1 и 4 : 1 не вызывает повышения вязкости при малых напряжениях (скоростях) сдвига. При дальнейшем увеличении напряжения сдвига вязкость систем изменяется и зависит от молекулярной массы олигомера и содержания его в крови.

Скорость оседания эритроцитов зависит от молекулярной массы и содержания криопротектора в крови. Чем выше молекулярная масса криопротектора и больше его содержание в крови, тем меньше скорость оседания эритроцитов.


1. *Ваньков Д. Е.* Влияние некоторых кровезаменителей на реологические свойства крови. — Пробл. гематологии и переливания крови, 1971, № 1, с. 31—35.
2. *Кавешников А. И., Сетт А. В., Уратков Е. Ф. и др.* Изменение вязкости крови при разведении ее различными кровезаменителями в условиях гипотермии. — Патол. физиология и эксперим. медицина, 1971, № 1, с. 70—74.
3. *Чернух А. М., Александров П. Н., Алексеев О. В.* Микроциркуляция. — М. : Медицина, 1975. — 455 с.
4. *Casson N.* Rheology of disperse systems. — New York, 1959. — 184 p.
5. *Merrill E. W., Cokelet G.* — Приводится по: Селезнев С. А., Вашетина С. М., Мазуркевич Г. С. Комплексная оценка кровообращения в экспериментальной патологии. — Л. : Медицина, 1975, с. 73.



Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР



Поступила в редколлегию
28. 02. 79



УДК 57.043.616.127—005.8:616.832.9



***Г. А. Бабийчук, И. Ю. Микляев, В. В. Королев, В. Н. Задорожная, И. К. Латогуз, В. К. Дьяченко***


# СОСТОЯНИЕ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА И ГИПОТЕРМИИ

Ишемическая болезнь сердца и инфаркт миокарда — одна из наиболее актуальных проблем современной медицинской науки. При инфаркте миокарда в ряде случаев формируется недостаточность функционального состояния сердечно-сосудистой системы и развивается гипоксия с последующими, порою необратимыми изменениями метаболизма паренхиматозных органов.

Поэтому вполне обоснованы поиски средств для создания условий, при которых нарушенное кровообращение являлось бы адекватным искусственно сниженному кислородному запросу организма. Методом, повышающим устойчивость организма к кислородному голоданию, может быть снижение температуры тела и уменьшение тем самым уровня обмена веществ, повышение порога переносимости гипоксии, что может задержать и ограничить процессы формирования некроза миокарда на время, которое необходимо для энергичного фармакологического воздействия на нарушенный кровоток в коронарных сосудах [1, 3, 6].

Известно, что возникновение и течение инфаркта миокарда тесно связано с состоянием микроциркуляции — фундаментальным процессом, обеспечивающим обмен веществ и адекватное функционирование органов и тканей [2, 7].




Матеріал, захищений авторським правом

При тяжелом шоке судьба больного решается именно на микроциркуляторном уровне, где происходит развитие механического микроциркуляторного блока — основной причины декомпенсации функции паренхиматозных органов [4].

В связи с этим важная роль в проблеме комплексной оценки биологических эффектов гипотермии при остром инфаркте миокарда принадлежит динамическому изучению состояния микроциркуляции.

Изложенные факты явились предпосылкой для проведения исследований микроциркуляции при экспериментальном инфаркте миокарда, гипотермии и их сочетании. Объектом для изучения микроциркуляции явилось сосудистое русло конъюнктивы склеры. Состояние сосудистого русла конъюнктивы склеры изучено у 75 собак, в том числе у 32 животных, которым моделировался некроз миокарда, у 32 животных, которым проводилась кранио-церебральная гипотермия, и у 11 животных с ишемией миокарда и кранио-церебральной гипотермией. Инфаркт миокарда моделировался путем перевязки нисходящей ветви левой коронарной артерии.

Кранио-церебральную гипотермию проводили с помощью аппаратуры, разработанной в конструкторском бюро Института проблем криобиологии и криомедицины АН УССР, дающей возможность программированного охлаждения с автоматической регистрацией температуры тела в шести точках.

При биомикроскопии сосудов бульбарной конъюнктивы здоровых собак наблюдали гомогенный, быстрый кровоток во всех отделах микроциркуляторного русла. Соотношение диаметров артериол и соответствующих им венул составило в среднем 1 : 2—1 : 3. Артериолы и венулы представляли собой параллельно расположенные конусы, вершинами обращенные к капиллярам. Обнаруживались неравномерность калибра сосудов, меандрическая извилистость венул, образования сосудистых клубочков. Важно отметить, что в процессе контрольной торакотомии конъюнктивальный кровоток не претерпевал существенных изменений.

Исследование конъюнктивальной микроциркуляции в динамике послеоперационного периода позволило установить периферическую, преимущественно артериолярную вазоконстрикцию, развивающуюся в первые часы наложения лигатуры на левую коронарную артерию, ограничение капиллярного кровотока. Продолжительность констрикторной реакции варьировала в широких пределах (от двух-трех часов до суток).

Соотношение диаметров артериол и соответствующих венул составляло в период вазоконстрикции 1 : 4—1 : 5, что подтверждает преимущественное вовлечение артериол в процесс системного сосудистого спазма. Первые сутки послеоперационного периода сопровождались преимущественно вазомоторными микрососудистыми реакциями (артериальная констрикция, внекапиллярный сброс крови, уменьшение и замедление капиллярного кровотока в системе микроциркуляции).

В дальнейшем (на 2—3-и сут) выраженность вазомоторных нарушений уменьшалась и на первый план в патологической картине конъюнктивальной микрогемоциркуляции выступали реологические нарушения, среди которых наиболее важное место принадлежит внутрисосудистой агрегации эритроцитов — так называемому сладж-феномену. На рис. 1 показано развитие внутрисосудистой патологии в венулах и капиллярах в динамике экспериментального некроза миокарда.

Внутрисосудистые агрегаты эритроцитов локализовались преимущественно в венуло-капиллярном секторе сосудистого русла, умеренно замедляя местный кровоток. Как правило, к 4—5-м сут некроза миокарда количество агрегатов нарастало, они укрупнялись, иногда закупоривали конъюнктивальные микрососуды на несколько секунд, вызывая



Матеріал, захищений авторським правом

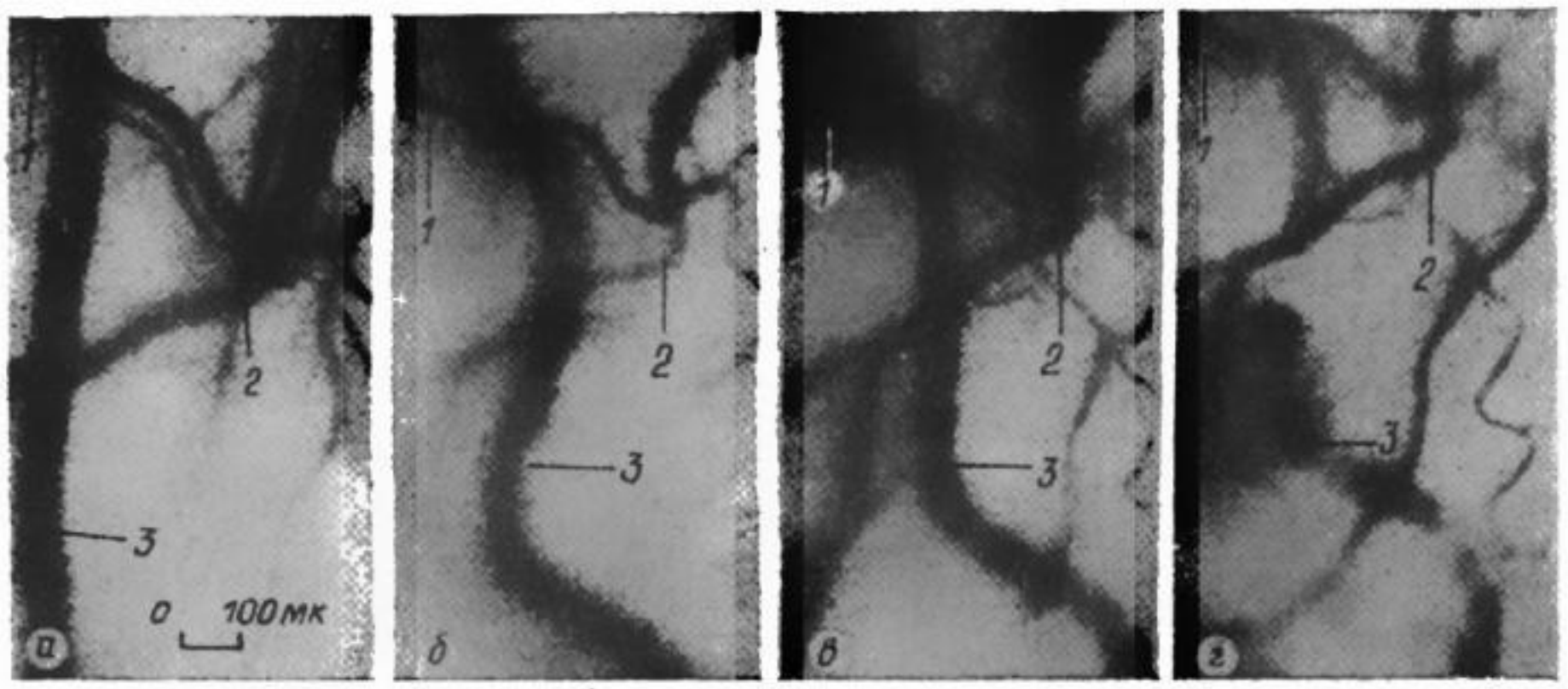



Рис. 1. Динамические изменения конъюнктивальной микрогемоциркуляции при инфаркте миокарда:

*а* — исходное состояние; *б* — первые часы после перевязки ЛКА — артериолярная констрикция; *в* — 2-е сут после инфаркта миокарда — исчезновение вазоконстрикции, появление признаков агрегации эритроцитов; *г* — 3-и сут инфаркта миокарда — выраженный сладж-феномен; *1* — артериола; *2* — венула; *3* — собирательная венула; ×700.

тем самым кратковременные локальные эритростазы. К 7—10-м сут эксперимента выраженность внутрисосудистых изменений уменьшалась. Следует отметить нарушения сосудистой проницаемости, характерные для острого периода экспериментального некроза миокарда, проявляющиеся выраженным в различной степени периваскулярным отеком. Последний является следствием транссудации плазмы крови в периваскулярные пространства, что происходит в условиях повышенной порозности сосудистой стенки и может сопровождаться также диапедезом форменных элементов, скопления которых в интерстициальной ткани конъюнктивы классифицировались нами как конъюнктивальные микрогеморрагии.

На рис. 2 показано изменение конъюнктивальной микроциркуляции у собаки № 11 с явлениями кардиогенного шока. Для экспериментального кардиогенного шока характерно сочетание выраженных вазомоторных и реологических нарушений микроциркуляции, заключающихся в длительной вазоконстрикции с уменьшением и замедлением кровотока, локальными эритростазами и прогрессирующем сладже. В терминальной стадии шока в системе микроциркуляции развивались процессы внутрисосудистой коагуляции с образованием множественных микротромбов и механическим блокированием капиллярной сети.



Рис. 2. Состояние микроциркуляции при экспериментальном кардиогенном шоке. Ограничение капиллярной перфузии, сладж-синдром, стазы, микротромбоз или периваскулярный отек; ×700.

Таким образом, исследования конъюнктивальной микроциркуляции, проведенные в динамике экспериментального некроза миокарда, свидетельствуют о значительных вазомоторных и реологических нарушениях, которые могут существенно влиять на течение и исход заболевания. Данные, полученные при изучении конъюнктивальной микроциркуляции, не противоречат фактам, установленным при иссле-



Матеріал, захищений авторським правом

довании других объектов (брыжейки, миокарда), что свидетельствует о достоверности результатов, полученных в наших экспериментах.

Кранио-церебральная гипотермия на интактных животных сопровождалась достаточно закономерными динамическими изменениями в микроциркуляторном русле бульбарной конъюнктивы, степень которых зависела от глубины и продолжительности гипотермического воздействия.

Понижение температуры тела до 34—32° С сопровождалось начальными изменениями в виде умеренной дилятации венуло-капиллярного сектора. Дальнейшее охлаждение животных до 30—28° С приводило к возрастанию тонуса артериол. Это сопровождалось дальнейшим уменьшением соотношения диаметров артериал и соответствующих им венул до 1 : 5—1 : 6. Наряду с этим появлялись признаки замедления венуло-капиллярного кровотока, в некоторых посткапиллярных венулах обнаруживались мелкозернистые агрегаты эритроцитов. Охлаждение тела животных до 27—25° С приводило к наиболее существенным изменениям конъюнктивальной микроциркуляции. Усугублялась артериальная констрикция, замедлялся конъюнктивальный кровоток (рис. 3), нарастала степень внутрисосудистой агрегации эритроцитов вплоть до развития аморфного сладжа крови.

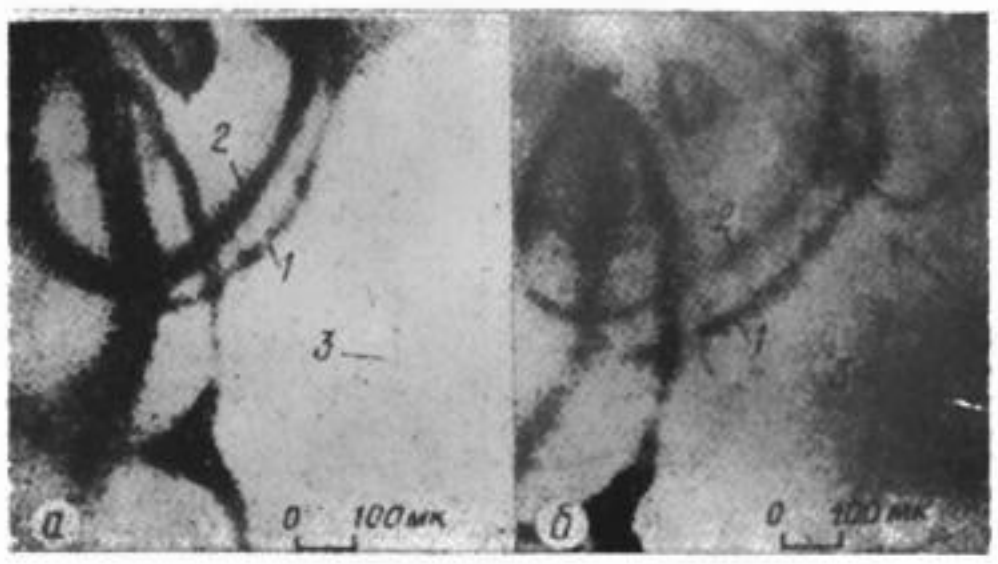



Рис. 3. Динамика конъюнктивальной микроциркуляции при сочетании инфаркта миокарда и гипотермии:

*а* — до перевязки ЛКА и гипотермии, гомогенный кровоток в микрососудах, уменьшение количества функционирующих капилляров; *б* — 1-е сут инфаркта миокарда после гипотермического воздействия; выраженная крупнозернистая агрегация эритроцитов во всех отделах микроциркуляторного русла, локальные стазы; ×700. Обозначения *1, 2, 3* те же, что и на рис. 1.

Анализ конъюнктивальных ангиограмм, выполненных у животных с экспериментальной ишемией и инфарктом миокарда в динамике кранио-церебральной гипотермии, свидетельствует об определенных различиях в реакции микроциркуляторного русла в зависимости от срока, прошедшего с момента наложения лигатуры на коронарную артерию до сеанса охлаждения.

У большинства собак кранио-церебральная гипотермия была начата через 1 ч после оперативного моделирования острой коронарной недостаточности. Особенностью исходного состояния микроциркуляции в данной группе животных была вазомоторная патология разной степени выраженности, заключающаяся в повышении тонуса артериол, ограничении капиллярного кровотока и активации функции артериоло-венулярных анастомозов. В этих условиях при снижении температуры тела до 34—32° С происходит уменьшение тонуса мелких венул и замедление конъюнктивального кровотока. В отличие от интактных животных мелкозернистые агрегаты эритроцитов появляются преимущественно в посткапиллярных венулах уже на этой начальной стадии охлаждения. Дальнейшее снижение температуры приводит к нарастанию синдрома агрегации, имеющего обратимый характер. Конъюнктивальный кровоток замедляется, появляются признаки повышения сосудистой проницаемости и выхода плазмы в периваскулярные пространства, что приводит к периваскулярному отеку.

При температуре тела 27—25° С конъюнктивальная микроциркуляция носит явно патологический характер. Наблюдается выраженное сужение артериол, расширение венул, переполнение кровью немногочисленных функционирующих капилляров, крупнозернистая агрегация

Матеріал, захищений авторським правом

эритроцитов в венуло-капиллярном секторе, локальные эритростазы, периваскулярный отек.

В этот период гемодилюция реополиглюкином не позволяет купировать наступившие нарушения. При согревании животного микроциркуляция не возвращается к исходному состоянию, однако внутрисосудистая агрегация эритроцитов приобретает мелкозернистый характер.

Проведенные исследования микроциркуляции сосудов бульбарной конъюнктивы свидетельствуют о выраженных патологических изменениях гемореологии, особенно в сочетании инфаркта миокарда с последующей гипотермией.

1. *Лабори А.* Регуляция обменных процессов : Пер. с фр. — М. : Медицина, 1970. — 363 с.
2. *Лукомский П. Е.* Инфаркт миокарда. — Кардиология, 1972, № 5, с. 128—140.
3. *Майстрах Е. В.* Патологическая физиология охлаждения человека. — М. : Медицина, 1975. — 215 с.
4. *Малая Л. Т., Лазарева С. А.* Нейро-гуморальные аспекты инфаркта миокарда и его осложнений. — Кардиология, 1974, **14**, № 4, с. 39—46.
5. *Малая Л. Т., Микляев И. Ю., Кравчук П. Г.* Микроциркуляция в кардиологии. — Харьков : Высш. школа, 1977. — 248 с.
6. *Мурский Л. И.* Формирование инфаркта миокарда в условиях краниоцеребральной гипотермии. — В кн.: Экспериментальный инфаркт миокарда в условиях гипотермии. Владимир, 1974, вып. 3, с. 204—218.
7. *Чазов Е. И.* Проблемы терапии кардиогенного шока. — Кардиология, 1970, **10**. № 7, с. 5—12.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР,
Харьковский медицинский институт МЗ СССР

Поступила в редколлегию
08. 04. 79

УДК 57.043:611.718.4:616—001—19

***Г. А. Бабийчук, Е. Я. Панков, В. А. Македонская, О. Н. Кошелева, А. И. Жигун***

# ИЗМЕНЕНИЕ СТРУКТУРЫ БЕДРЕННОЙ КОСТИ ПОСЛЕ КРИОВОЗДЕЙСТВИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Быстрое распространение криохирургического метода в медицине связано с рядом преимуществ его применения при определенной патологии. Метод дает возможность получать локальные некрозы тканей, обезболивает оперативные вмешательства в связи с быстрой блокадой чувствительных нервных окончаний, обладает гемостатическим эффектом, сравнительно безопасен для больного, сокращает время хирургического вмешательства и время пребывания больного на койке, при ряде заболеваний может быть применен в амбулаторных условиях.

Марков Р. К. и Хикей К. Х. [2—5], проводя эксперименты по влиянию азотных температур (—196° С) на костную ткань, изучали процессы декструкции, что дало им возможность обосновать показания, а затем применить в клинике метод криохирургии для лечения злокачественных опухолей кости. Имеются сообщения о попытках криохирургического лечения гигантоклеточных опухолей, фиброзных остеодисплазий [1, 5]. Однако использование сверхнизких температур не нашло достаточно широкого применения для лечения патологий опорно-двигательного аппарата, не связанных с опухолевыми процессами, из-за отсутствия обоснования к их применению.

Одна из задач наших исследований — изучение процессов криодеструкции и регенерации тканей опорно-двигательного аппарата. В данной статье представлены материалы наблюдений за изменением структуры головки бедренной кости после криовоздействия у крыс, которым вскрывали тазобедренный сустав, вывихивали головку бед-



Матеріал, захищений авторським правом

ренной кости, после чего с помощью аппарата АСК-6 парожидкостной струей в течение 30 с на расстоянии 30 мм производили криовоздействие на хрящ головки. Поставлено шесть серий экспериментов по восемь животных в каждой серии. Животных первой группы забивали сразу после криовоздействия. Во второй серии материал для морфологических исследований забирали через неделю после охлаждения головки бедра, в третьей — через две недели, в четвертой — через три недели, в пятой — через месяц, в шестой — через два месяца после криовоздействия.

Микроскопически на гистотопограммах обнаруживалось, что головка бедра во все сроки исследования сохранила обычные топографические отношения с вертлужной впадиной, за исключением трех случаев, когда в результате лизиса на уровне шейки произошло смещение культи шейки проксимально от головки, оставшейся в вертлужной впадине.

При исследовании микроструктуры головки бедренной кости через неделю после криовоздействия установлено, что почти на всем протяжении суставного хряща основное вещество с преимущественно слабооксифильной окраской, а хондроциты только контурируются в капсулах. В краевых отделах суставной хрящ переходит в суставную капсулу с утолщенной стенкой за счет пролиферации фибробластов и диффузной лимфоидной инфильтрации. На протяжении всей капсулы обнаруживаются расширенные и заполненные кровью сосуды. В межбалочных пространствах субхондральной костной пластинки определяется увеличение количества остеобластов на поверхности костных балочек и костных элементов в межбалочных пространствах, которые окружают расширенные и заполненные кровью сосуды. На остальном протяжении эпифизов в межбалочных пространствах обнаруживается кроветворный костный мозг. Суставной хрящ вертлужной впадины с узкой поверхностной зоной неокрашивающихся хондроцитов.

Таким образом, под воздействием паров жидкого азота (—196° С) происходят некротические изменения хондроцитов суставного хряща без деструктивных изменений структуры основного хряща, реактивные изменения в суставной капсуле и слабо выраженные некротические изменения в поверхностной зоне суставного хряща вертлужной впадины. Глубже замыкательной костной пластинки суставного хряща головки бедра некротические изменения не определяются.

На протяжении последующих сроков наблюдения (две, три, четыре и восемь недель) объем некротических изменений не только не увеличивался, а даже сократился за счет прорастания фибробластов в краевые отделы суставного хряща. Основное вещество суставного хряща приобрело более выраженную оксифильную окраску, хондроциты не определялись в капсулах на протяжении всего криоизмененного хряща, однако связь суставного хряща с замыкательной пластинкой не нарушалась. Через две недели в базальных отделах хряща определялась узкая зона из базофильных хондробластов, которые отделяли криоизмененный хрящ от замыкательной костной пластинки. Расширение этой зоны обнаруживалось в течение трех, четырех и восьми недель, однако и к последнему сроку она составляла не более 1/3 толщины суставного хряща. В суставной капсуле уменьшалась лимфоидная инфильтрация и количество фибробластов, несколько увеличивалось количество коллагеновых волокон в глубоких слоях.

Узкая зона некротических изменений в поверхностных слоях суставного хряща вертлужной впадины не определялась с четырех недель.

Таким образом, на протяжении сроков наблюдения от двух до восьми недель криоизмененный хрящ не подвергался существенным изменениям и не отторгался. В краевых отделах обнаруживалось все

Матеріал, захищений авторським правом

увеличивающееся прорастание хрящевого вещества фибробластами, а на границе хряща и замыкательной пластинки формирование слоя новообразованного хряща.


1. *Писаревский А. А., Быкова Н. А., Войтына С. В. и др.* Особенности применения криогенного метода в полостной хирургии и ортопедии. — В кн.: Тр. 29-го Всесоюз. съезда хирургов (3—7 июня 1974 г., Киев). Киев, 1975, с. 226—229.
2. *Héckey C. H., Jacobs P. A.* Experience with closed cryosurgecal technique. — J. Bone Joint Surg. A, 1976, **58**, N 5, p. 735.
3. *Marcove R. C.* The treatment of primary and metastatic localized bone tumors by cryosurgery. — Surg. Clin. N. Amer., 1969, **49**, p. 421—430.
4. *Marcove R. C., Lyden J. P., Huvos A. G. et al.* Giant-cell tumors treated by cryosurgery. A report of twenty five cases. — J. Bone and Joint. Surg. A, 1973, **55**, N 8, p. 1633—1644.
5. *Marcove R. C., Miller T. R.* Treatment of primary and metastatic bone tumors by cryosurgery. — JAMA, 1969, **207**, N 10, p. 1890—1894.



Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР



Поступила в редколлегию
15. 02. 79



УДК 57:536.48:048:622.234.6



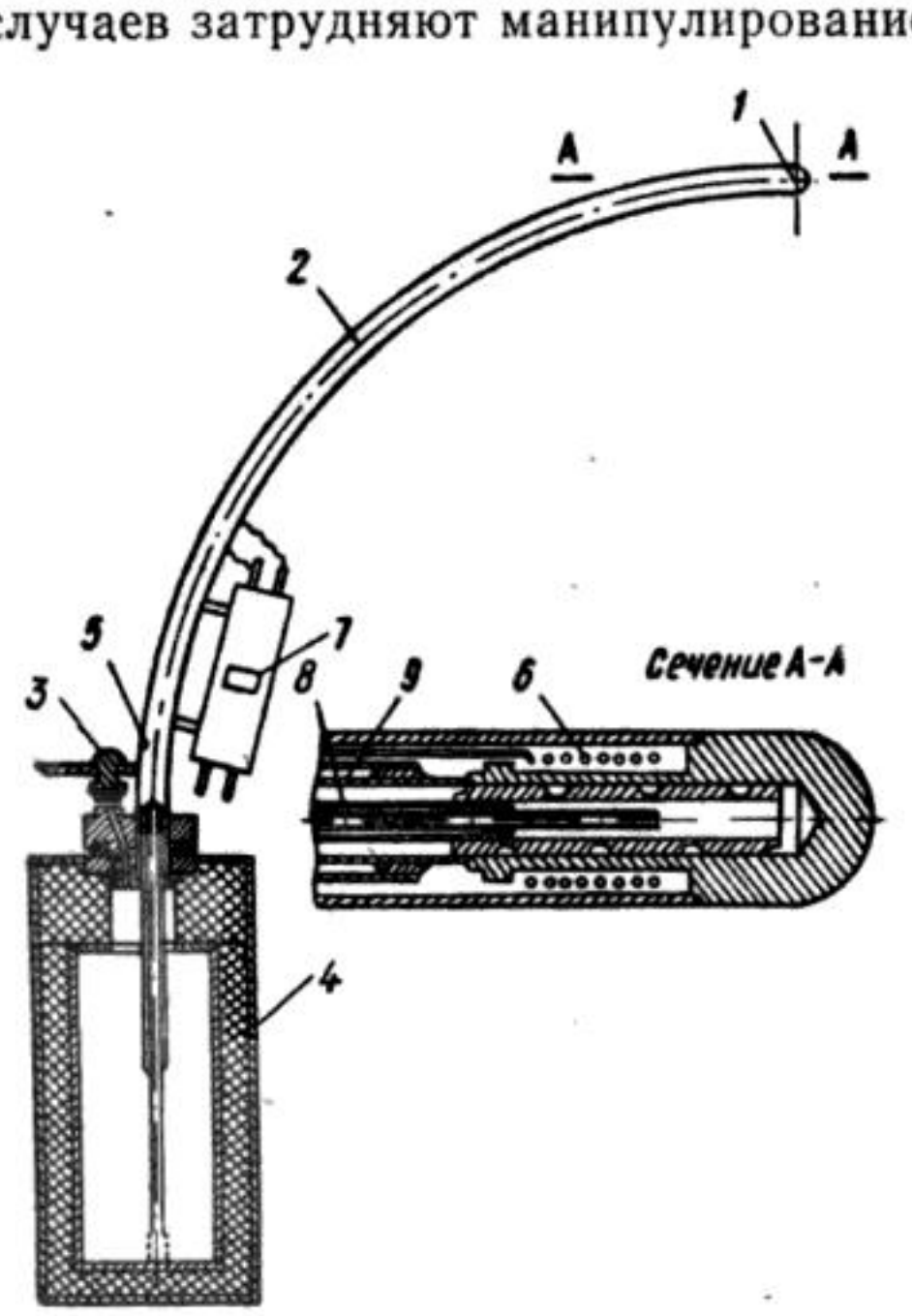
***Н. И. Гладкий, А. М. Шевченко, В. Д. Зинченко, В. Д. Яковенко, Ю. М. Рудько***


# ПРИБОР ДЛЯ КРИОДЕСТРУКЦИИ НЕБНЫХ МИНДАЛИН

За последние годы криохирургический метод нашел значительное применение [1—10]. В орториноларингологии он все более широко распространяется на лечение хронического тонзиллита и ряда других заболеваний. Однако громоздкость и сложность универсальной аппаратуры, ее несовершенство в ряде случаев затрудняют манипулирование инструментом в глотке, при этом излишне травмируются ткани, не подлежащие криовоздействию, возникают трудности в правильности определения длительности холодового воздействия. Это побуждает к созданию новой аппаратуры или совершенствованию существующей.

Цель нашего предложения — использование для лечения хронического тонзиллита портативного прибора, снабженного нагревателем для отогрева охлажденного наконечника.

Прибор (см. рисунок) состоит из трех основных узлов: охлаждаемого наконечника *1*, трубопровода *2* и теплоизолированного резервуара *4* для хладоагента, в качестве которого могут быть использованы жидкий азот или жидкий воздух. Охлаждаемый наконечник (сечение *А—А*) изготовляется из никеля и состоит из двух частей, образующих спиралеобразную полость, в которой кипит хладоагент. Для впрыскивания хладоагента применен жик-




Конструктивная схема прибора для криодеструкции небных миндалин:

*1* — охлаждаемый наконечник; *2* — трубопровод; *3* — клапан; *4* — теплоизолированный резервуар; *5* — отверстие; *6* — нагреватель; *7* — кнопочный выключатель; *8* — трубка подачи; *9* — трубка отвода отработанного хладагента.




Матеріал, захищений авторським правом

лер, установленный на подающей трубке. Нагреватель *6* обеспечивает быстрый нагрев наконечника. Трубопровод *2* состоит из концентрично расположенных двух двойных трубок для подачи хладоагента и отвода его паров и защитной наружной трубки, что гарантирует достаточную теплоизоляцию и герметизацию трубопровода. Резервуар *4* объемом 200 см³ представляет собой двухстенную цилиндрическую конструкцию с пенопластовой теплоизоляцией в межстенном пространстве. Резервуар снабжен клапаном *3* для отвода паров хладагента в атмосферу.

Прибор работает следующим образом. Перед операцией резервуар прибора заполняется жидким азотом. Клапан *3* при этом открыт. Когда мы приступаем к замораживанию, клапан *3* закрывается, давление в резервуаре поднимается и жидкий азот поступает по трубопроводу в охлаждаемый наконечник. Удаление паров происходит через отверстие *5*. После замораживания ткани для отделения ее от наконечника производится его нагрев включением нагревателя *6* с помощью кнопочного выключателя *7*.

Конструкция прибора позволяет дезинфицировать его наконечник в обычном сухожарком шкафу или дезрастворах. Испытания прибора показали его работоспособность: для замораживания одной миндалины достаточно контакта с наконечником в течение 2—3 мин. Отогрев продолжается до 0,5 мин.

Использование прибора в клинике для криодеструкции небных миндалин у 16 больных с хроническим тонзиллитом показало его надежность в работе. Осложнений, связанных с его использованием, не было.


1. *Бородай В. П., Веркин Б. И.* Классификация инструментов для криохирургии. — Мед. техника, 1971, № 4, с. 34—36.
2. *Веркин Б. И., Медведев Н. А.* Усовершенствованная модель криораспылителя. — Мед. техника, 1976, № 3, с. 40—41.
3. *Зубашич В. Ф.* Криохирургическое устройство с регулируемой хладопроизводительностью. — Мед. техника, 1973, № 3, с. 44—47.
4. *Комаров Б. А.* Криоаппликатор для воздействия на небные миндалины. — Мед. техника, 1974, № 6, с. 36—39.
5. Криохирургия / Под ред. *Э. И. Канделя* — М.: Медицина, 1974. — 302 с.
6. *Писаревский А. А.* Криохирургические инструменты. — Мед. техника, 1972, № 5, с. 44—46.
7. *Потапов И. И., Тарлычева Л. С., Рудня П. Г.* О криовоздействии на небные миндалины при хроническом тонзиллите. — Вестн. оториноларингологии, 1974, № 4, с. 12—15.
8. *Рудня П. Г.* О возможности использования низких температур при лечении хронического тонзиллита: (Эксперим.-клин. исслед.): Автореф. дис.... канд. мед. наук. — М., 1971. — 21 с.
9. *Шальников А. И., Чирешкин Д. Г., Зюкин Н. А.* Инструмент для криохирургии в отоларингологии. — Мед. техника, 1970, № 2, с. 53—55.
10. *Шустер М. А., Фотин А. В., Рейдман Л. Б.* Применение метода локального замораживания при некоторых отоларингологических заболеваниях. — В кн.: Актуальные вопросы клинической и экспериментальной медицины. М., 1972, с. 63—65.



Украинский институт
усовершенствования врачей МЗ СССР,
30-я городская клиническая больница
(г. Харьков),
Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР



Поступила в редколлегию
10. 02. 79



Матеріал, захищений авторським правом

УДК [618.14—005.1:615.832.9—08]:612.015

*О. В. Грищенко*

# ИЗМЕНЕНИЯ НЕКОТОРЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ У ЖЕНЩИН С ДИСФУНКЦИОНАЛЬНЫМИ МАТОЧНЫМИ КРОВОТЕЧЕНИЯМИ ПОД ВЛИЯНИЕМ ВЛАГАЛИЩНОЙ ГИПОТЕРМИИ

Дисфункциональные маточные кровотечения занимают важное место в структуре гинекологических заболеваний и относятся к наиболее часто встречающейся в повседневной практике патологии. Частота данного заболевания, по данным [3], составляет от 4 до 18% ко всем гинекологическим заболеваниям. По материалам [11], дисфункциональные маточные кровотечения наблюдали у 15—25% больных, находящихся в гинекологическом стационаре.

Этиология и патогенез дисфункциональных маточных кровотечений разнообразны, изменениям подвергаются функции многих органов и систем. Механизм расстройств овариально-менструального цикла касается различных уровней многозвеньевой цепи нейроэндокринных регуляторных аппаратов, однако наиболее часто нарушению подвергаются циклические процессы продукции гормонов в гипоталамо-гипофизарной системе.

В литературе имеется ряд работ, посвященных изучению изменений в свертывающей системе крови при этой патологии. По данным литературы [1, 15] у этих больных снижаются агрегационные свойства тромбоцитов на 10—30%, особенно у больных климактерического возраста, что на фоне тромбоцитопении и гипоэстрогении может вызывать кровотечения.

Различные авторы отмечают тот факт, что при дисфункциональных маточных кровотечениях происходит нарушение функции печени. Так, во время кровотечения выявлены нарушения в секреторной, а у части больных в секреторной и экскреторной ее функции [17]. При этом в плазме крови у этих больных уменьшалось содержание альбуминов и возрастало содержание фракции глобулинов. Авторы отмечают тот факт, что в процессе лечения и остановки кровотечения указанные показатели нормализуются.

Несмотря на большое количество исследований, посвященных поискам рациональных способов лечения дисфункциональных маточных кровотечений, до настоящего времени практика не располагает достаточно эффективными методами. Наиболее распространена комплексная терапия, центральное звено которой — широкое применение гормональных препаратов. Но их использование может иметь нежелательные последствия. В связи с этим в последние годы особое место в терапии дисфункциональных маточных кровотечений заняли разные методы рефлекторной терапии с точками приложения воздействий на различные звенья центрального и периферического отделов регуляторных аппаратов, контролирующих функции женской половой сферы. К ним относятся электростимуляция рецепторов шейки матки, вакуум-стимуляция ареолярной области, воздействие лазерным излучением на рецепторы шейки матки и точки акупунктуры [6, 7, 14].

При анализе различных методов терапии большое внимание уделяется показателям свертывающей системы крови. У больных, страдающих дисфункциональными маточными кровотечениями, отмечается возрастание фибринолитической активности, снижение содержания фибриногена, повышение толерантности плазмы к гепарину, уменьшение времени рекальцификации [4, 5, 9, 10, 12]. Наиболее выраженными эти изменения бывают при ювенильных кровотечениях или у больных,



Матеріал, захищений авторським правом

длительное время страдающих дисфункциональными маточными кровотечениями. В изменениях остальных показателей коагулограммы закономерности не выявлено. При исследовании белкового состава сыворотки крови отмечена диспротеинемия, выражаемая в уменьшении альбуминовой фракции, снижении коэффициента альбумины/глобулины, происходит повышение γ и β-глобулиновых фракций. Описанные выше изменения некоторых биохимических показателей крови в процессе лечения и достижения гемостаза нормализуются.

Учитывая недостаточную эффективность обычных методов терапии дисфункциональных маточных кровотечений, мы решили изучить терапевтические возможности нового в гинекологической практике метода лечения данной патологии — влагалищной гипотермии, а также проанализировать некоторые биохимические изменения в организме женщин в процессе лечения.

В основу метода положено существование шеечно-гипоталамо-гипофизарного рефлекса, сущность которого определяется эффектом переключения нервных импульсов в секреторные на уровне нейросекреторных субстанций гипоталамуса, вследствие чего происходит выброс дополнительных количеств ФСГ и ЛГ гормонов, что приводит к овуляции. Кроме того, известно, что влагалищная гипотермия приводит к усилению маточных сокращений при родах [13]. Следовательно, были основания рассчитывать, что охлаждение в области влагалища наряду с нормализацией нарушенных процессов регуляции овариально-менструального цикла будет вызывать повышенный выброс окситоцина из его депо [2], тем самым способствуя остановке кровотечения.

Влагалищная гипотермия осуществлялась с помощью холодильного аппарата, созданного в Физико-техническом институте низких температур АН УССР. Аппарат состоит из двух холодильных фреоновых агрегатов, обеспечивающих охлаждение жидкости, циркулирующей в замкнутой системе. Часть последней представляет внутривлагалищный стеклянный охладитель, предложенный А. А. Лошковым и Х. М. Рза-Кулиевой (1960), с помощью которого осуществлялась гипотермия влагалища до 4°—5° С. Ранее нами проведены острые опыты на животных, которые показали, что мышца матки отвечает максимальными сокращениями при воздействии на влагалище холодонесущей жидкостью, охлажденной до 3°—5° С, в результате чего был выработан данный температурный режим [14]. Сеанс гипотермии длился 30—40 мин. Процедуры проводились ежедневно до остановки кровотечения, не более четырех—пяти раз. Все женщины переносили воздействие спокойно, неблагоприятных последствий выявлено не было.

Мы располагаем 40 наблюдениями применения влагалищной гипотермии для лечения дисфункциональных маточных кровотечений. По возрастным группам больные распределились следующим образом: до 20 лет было пять, от 21 до 25 лет — шесть, от 26 до 30 лет — семь, от 31 до 40 — семь, от 41 до 50 лет — 15 женщин. Из сопутствующей патологии имели место эрозии шейки матки — пять, гипоплазии женских половых органов, — четыре, хронический воспалительный процесс гениталий — 11, диэнцефальный синдром — два, остаточные явления энцефалита — три.

Гемостатический эффект достигнут у 30 больных после проведения двух—пяти сеансов. В 12 случаях этот эффект был нестойким и кровотечения в последующем повторились. У 10 женщин не удалось достичь гемостаза влагалищной гипотермией. В трех из этих случаев кровотечения сопровождались хроническим воспалительным процессом в гениталиях, у двух больных имело место выраженное нарушение гормонального профиля. Гипотермия обычно применялась в комплексе с общеукрепляющей, седативной терапией. Гормональные препараты не применялись. В случаях тяжелых, плохо поддающихся терапии кро-



Матеріал, захищений авторським правом

вотечений гипотермию усиливали назначением гемостатических, а в ряде случаев и утеротонических средств.

В процессе лечения всем больным было проведено общеклиническое обследование, бимануальное и зеркальное исследования. До и после лечения больные подвергались биохимическому и кольпоцитологическому обследованию. Общий белок определяли по биуретовой реакции. Изучение белковых фракций производилось методом электрофореза на бумаге. Протромбиновый индекс определяли по Квику, фибриногеннефелометрическим методом Подмора, тромботест — по методу Фуэнта, рекальцификацию — по Бергергофу и Року, толерантность плазмы к гепарину — по Поллеру. Уровень прогестерона в крови изучался радиоиммунологическим методом.

В результате проведенных исследований нами были получены следующие результаты. При анализе данных состояния свертывающей системы крови по изучению коагуллограмм значительных отклонений от нормы выявлено не было. У большинства больных до начала лечения отмечено повышение протромбинового индекса до 106,9%, в то время как после лечения он снижался и составлял 96,02%. Имело место повышение содержания фибриногена после лечения до 268 мг·% по сравнению с данными до лечения (250,2 мг·%). На 1 ч 16 мин уменьшилось время фибринолитической активности, что является статистически достоверным ($p<0,005$).

Из сопоставления данных исследования белкового состава крови видно, что после остановки кровотечения в некоторой степени нормализовался белковый состав крови. На 0,75 г·% в среднем увеличилось содержание общего белка. Возросла плотность альбуминовой фракции — объемная доля ее составляет от 56,2 до 60,3%, увеличился коэффициент А/Г от 1,32 до 1,54.

Кроме того, мы провели изучение содержания прогестерона в сыворотке крови и исследование влагалищных мазков до применения воздействия и после остановки кровотечения. Всего определение прогестерона проведено у 15 женщин. Уровень его до лечения составил 5,21 пг/мл, а в процессе лечения имелась тенденция к увеличению до 6,3 пг/мл, что статистически значимо ($p<0,005$). Поскольку это исследование проводится из одноразовой порции крови и отражает суточные колебания концентрации прогестерона в крови, мы брали у больных мазки из влагалища для исследования по клеткам эпителия функционального состояния половой сферы обследуемых женщин. При изучении кольпоцитограмм до лечения нами выявлены различные типы гормонального профиля. Чаще имел место гипогормональный двуфазный цикл. В мазках, взятых после проведенного лечения, обнаружены признаки лютеинизации — клетки влагалищного эпителия полигональной формы со светлой цитоплазной и зрелым ядром, часть клеток с завернутыми краями — клетки прогестеронового влияния. Полученные нами данные позволяют сделать следующие выводы.

1. Влагалищная гипотермия не оказывает неблагоприятного воздействия на организм женщин.

2. У большинства больных нами получен стойкий гемостатический эффект с последующей нормализацией овариально-менструального цикла.

3. В процессе лечения происходит нормализация в свертывающей системе крови и в ее белковом составе, что согласуется с имеющимися литературными данными.

4. На основании исследования содержания прогестерона в сыворотке крови и данных кольпоцитограмм можно заключить, что в организме нормализуется процесс овуляции в яичниках, который способствует гемостазу.



Матеріал, захищений авторським правом

1. *Гоцадзе Г. Г.* К патогенезу дисфункциональных маточных кровотечений : Автореф. дис. ...д-ра мед. наук. — Баку, 1970. — 29 с.
2. *Грищенко В. И.* Гипотермия и криохирургия в акушерстве и гинекологии. — М. : Медицина, 1974. — 280 с.
3. *Добротина А. Ф., Загрядская Л. П., Хамадьянов У. Р.* Дисфункциональные маточные кровотечения. — М. : Медицина, 1972. — 159 с.
4. *Исаева Л. Д., Васильева В. В., Гринченко Е. С.* Нарушение свертывающей и противосвертывающей системы крови при ювенильных маточных кровотечениях в зависимости от функционального состояния вегетативной нервной системы. — В кн.: Система свертывания крови и фибринолиз : IV Всесоюзн. конф. Саратов, 1975, с. 586—587.
5. *Исаева А. Д., Гринченко Е. С., Васильева В. В.* Вегетативная нервная система и коагуляционные свойства крови при юношеских меноррагиях. — Охрана здоровья детей и подростков, 1974, вып. 6, с. 68—73.
6. *Литинская Б. Г.* Опыт лечения дисфункциональных маточных кровотечений электростимуляцией шейки матки. — Тр. Ленингр. ин-та усовершенствования врачей, 1970, вып. 81, с. 236—239.
7. *Паращук Ю. С., Грищенко В. И., Медведев В. В., Северин Н. Ф.* О терапевтической эффективности применения лазера при дисфункциональных маточных кровотечениях. — Акушерство и гинекология, 1977, № 9, с. 26—29.
8. *Пухальская К. П.* Изменения функции печени у больных функциональными маточными кровотечениями. — Акушерство и гинекология, 1967, № 9, с. 25—28.
9. *Токина И. А., Стегний Н. А., Цибизова С. А., Желудкова Г. И.* Коагуляционные свойства крови при гинекологических кровотечениях. — Избр. вопр. акушерства и гинекологии, Новокузнецк, 1971, **6**, с. 217—223.
10. *Саруханов Г. Е.* К генезу кровотечений при некоторых гинекологических заболеваниях : Автореф. дис. ...канд. мед. наук. — Душанбе, 1970. — 21 с.
11. *Сольский Я. П., Михедко В. П., Фердман Т. Д., Борин А. Л.* Гинекологическая эндокринология. — Киев : Здоров'я, 1976. — 240 с.
12. *Столярова Л. С.* Состояние свертывающей системы крови у больных дисфункциональными маточными кровотечениями в климактерическом периоде. — Тр. Горьк. мед. ин-та, 1974, вып. 54, с. 80—85.
13. *Сухина Н. П.* Применение внутривлагалищной гипотермии при слабости родовой деятельности и преждевременном излитии околоплодных вод : Автореф. дис. ...канд. мед. наук. — Харьков, 1975. — 21 с.
14. *Сухина Н. П., Грищенко О. В.* Влияние холодового раздражителя влагалища и матки на сократительную функцию миометрия. — Акушерство и гинекология, 1973, № 3, с. 62—64.
15. *Хейфец С. Н., Брусенцов И. Г.* Недостаточность агрегационной функции тромбоцитов в патогенезе климактерических маточных кровотечений. — Акушерство и гинекология, 1974, № 10, с. 6—9.
16. *Швец С. М.* Вакуум стимуляция как метод лечения дисфункциональных маточных кровотечений. — В кн.: Труды III съезда акушеров-гинекологов РСФСР. М., 1973, с. 255—257.
17. *Jakubov J., Sachariewa Z.* Leberfunktionsuntersuchungen der funktionellen Gebärmutterblutungen. — Zbl. Gynäkol., 1976, **96**, N 22, p. 694—700.

Украинский институт
усовершенствования врачей МЗ СССР

Поступила в редколлегию
20. 02. 79

УДК 618.14—005.1—089:615.832.9:618.7

***Д. А. Курмангалиева, В. И. Грищенко, В. Б. Моргулян, Б. Н. Муринец, М. Е. Носов***

# ОСТАНОВКА ГИПОТОНИЧЕСКИХ И АТОНИЧЕСКИХ КРОВОТЕЧЕНИЙ В РАННЕМ ПОСЛЕРОДОВОМ ПЕРИОДЕ С ПОМОЩЬЮ КРИОКОАГУЛЯТОРА

До настоящего времени акушерские кровотечения в послеродовом и раннем послеродовом периодах остаются одной из основных причин смертности рожениц [1—4, 7, 9, 10].

Для борьбы с кровотечениями предложено много методов, имеющих целью вызвать или стимулировать контрактильную активность матки медикаментозными средствами в сочетании с механическими способами (прижатие аорты, массаж матки, клеммирование параметриев



Матеріал, захищений авторським правом

и др.) и такие методы остановки гипо- и атонических кровотечений, как электротонизация матки, применение метрогемостата, вакуум-метрогемостата [5, 6, 8], пока не всегда эффективные, особенно в случаях атонических состояний матки.

При быстрых и массивных кровопотерях даже хирургические методы гемостаза (перевязка маточных сосудов или калечащие женщину операции удаления послеродовой матки), требующие определенного времени на подготовку операции, применение обезболивания, часто бывают запоздалыми или проводятся у агонирующих женщин. Указанные трудности заставляют искать новые, более эффективные пути борьбы с ранними послеродовыми кровотечениями.

Успехи внедрения в различные отрасли медицины криотерапии, позволяющей локально воздействовать глубоким холодом на отдельные органы человека, в том числе и на матку, дали основание предпринять попытку использовать криовоздействие на послеродовую матку для получения стойкого сокращения матки действием механического и температурного факторов и остановки кровотечений в раннем пуэрперальном периоде.

В своей работе мы пользовались сконструированным во ФТИНТ АН УССР криокоагулятором, конструкция которого подвергалась совершенствованию. В нем был уменьшен объем сферической части, вводимой в матку. Аппарат приспособлен для доступного в медицинских учреждениях хладагента — закиси азота. В основу конструкции аппарата положены инструменты с криозондом — инструментом с охлаждаемым наконечником. Подача хладагента обеспечивается из баллона. Криокоагулятор имеет грушевидную форму с различными диаметрами сферической части (от 70 до 65 и 60 мм), общей длиной 150 мм.

Мы успешно применили данный метод при гипотоническом и атоническом кровотечении у 11 родильниц 20—42 лет. Две родильницы — первородящие, остальные девять — повторнородящие. У четырех женщин беременность осложнилась токсикозом второй половины различной степени, у одной — в сочетании с двойней. У семи женщин беременность протекала нормально. У девяти родильниц в связи с гипотоническим кровотечением произведены ручные обследования полости матки, у двух из них удалены задержавшиеся части плаценты. У одной роженицы кровотечение началось в послеродовом периоде; проведено ручное отделение интимно прикрепленной плаценты. В связи с продолжающимся кровотечением и гипотонией матки у 10 родильниц произведен массаж матки на кулаке. Поскольку получен только временный эффект, остановили кровотечение с помощью криовоздействия. Кровопотеря до криовоздействия у шести родильниц составила 600—700 мл, у трех — 1000 мл, у двух — 1700 мл. Нарушение свертывающей системы крови в виде гипофибриногенемии отмечено у одной родильницы с кровопотерей 1700 мл.

*Методика применения.* После обработки наружных половых органов шейка матки обнажалась в зеркалах, передняя губа фиксировалась щипцами Мюзо или абортцангом. Для обезболивания чаще всего применялся сомбревин, 10,0—20,0 мл внутривенно. Под контролем руки, находящейся во влагалище, в матку вводили криокоагулятор. После размещения его в полости матки он подключался к шлангу, подведенному к баллону с закисью азота. Закись азота пропускали в течение 1,5—2 мин под давлением 45—50 атм до примерзания тканей к криокоагулятору; отмечалось стойкое сокращение матки, плотно охватывающей инструмент. Оттаивание аппарата происходило в течение 3—5 мин, после чего он осторожно извлекался из полости матки.

После остановки кровотечения и извлечения криокоагулятора из матки в течение последующего 2—4-часового наблюдения кровопотеря



Матеріал, захищений авторським правом

составила не более 75—100 мл. Ни в одном наблюдении затруднений при извлечении криокоагулятора не встретилось. Разрыв шейки матки первой степени отмечен у одной родильницы, он диагносцирован до введения криокоагулятора и ушит после его извлечения. Каких-либо болей во время данной операции и после извлечения криокоагулятора не было. Четыре родильницы отметили ощущение холода внизу живота. Отмечалось снижение артериального давления на 10—15 мм рт. ст., побледнение кожных покровов и учащение пульса у пяти родильниц, показатели гемодинамики улучшились после восполнения кровопотери, у остальных родильниц кровопотеря не отразилась на общем состоянии, явлений шока не было ни у одной женщины.

В послеродовом периоде профилактически назначили антибиотики двум родильницам, всем родильницам проводилась антианемическая терапия. Нами отмечены более обильные серозно-кровянистые выделения из матки до пятого дня послеродового периода у наблюдаемых женщин по сравнению со здоровыми родильницами. Все 11 родильниц были выписаны в удовлетворительном состоянии со здоровыми детьми на седьмой-восьмой день после родов.

Отдаленные результаты изучены у восьми женщин после криовоздействия. Менструальная функция восстановилась через четыре-пять месяцев у пяти женщин, через шесть месяцев — у трех. Нарушений овариально-менструальной функции не отмечалось. Кормили детей грудью три женщины до двух-трех месяцев; три — до шести месяцев и две — до года. От беременности предохранялось пять женщин, три не предохранялись, из них две забеременели. У одной из них беременность развивается нормально, у другой по желанию женщины искусственно прервана.

Наш небольшой опыт остановки гипотонических и атонических кровотечений с применением криовоздействия свидетельствует об эффективности данного метода. Основой терапевтического эффекта, по-видимому, является то, что резкое охлаждение матки, с одной стороны, является сверхсильным раздражителем матки, что ведет к повышению ее сократительной способности, с другой — замерзание тканей и крови также способствует остановке кровотечения.


1. *Абдушукурова Х. М.* Основные причины материнской смертности и мероприятия по ее снижению по республике. — Здравоохранение Таджикистана, 1974, № 2, с. 40—42.
2. *Каюпова Н. А.* Кровотечение в родах как причина материнской смертности. — Здравоохранение Казахстана, 1976, № 10, с. 20—22.
3. *Ландау Я. М.* Применение местной гипотермии для уменьшения величины кровопотери в последовом и раннем послеродовом периодах. — Акушерство и гинекология, 1971, № 1, с. 76—79.
4. *Персианинов Л. С.* Акушерский семинар. — Минск : Госиздат, 1957. — Т. 1. 372 с.
5. *Пирумов Н. Х.* Новый способ остановки гипотонических и атонических маточных кровотечений. — Акушерство и гинекология, 1968, № 10, с. 67—69.
6. *Роговин В. Е.* Новый аппарат для борьбы с послеродовыми атоническими маточными кровотечениями. — Акушерство и гинекология, 1962, № 5, с. 102—107.
7. *Сперанская Е. М.* Патоморфологические изменения в стенке матки при атонических кровотечениях и родах. — Акушерство и гинекология, 1962, № 6, с. 29—32.
8. *Чиладзе З. А.* Способ электротонизации атонической матки для остановки кровотечения : Автореф. дис. ...д-ра мед. наук. — Тбилиси, 1964. — 32 с.
9. *Fuhrmann L.* Die mütterliche Mortalität an der Frauenklinik der Medizinischer Akademie Magdeburg nach dem 2. Weltkrieg (1945—bis 1959). — Zbl. Gynäkol., 1961, 83, N 14, S. 540—548.
10. *Szendi B. L. Die* Müttersterblichkrit von 90000 Geburten Lacatos J in den letzten 10. Jahren im landwirtschafts bezirk Benes. — Zbl., Gynäkol., 1961, 83, N 2, S. 64—76.



Харьковский медицинский институт
МЗ СССР,
Физико-технический институт
низких температур АН УССР



Поступила в редколлегию
28.02.79





Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043

*Г. Маттес, Х. А. Хаккензелльнер, Х. Р. Хаммершмид*

# НИЗКОТЕМПЕРАТУРНАЯ КОНСЕРВАЦИЯ ИЗОЛИРОВАННЫХ ХРЯЩЕВЫХ КЛЕТОК КРЫС

В исследовательской и клинической практике вновь стали усиленно заниматься проблемами трансплантации нативных клеток кости и хрящевых тканей [1, 2, 10]. В связи с этим возрос интерес к проблемам консервации указанных тканей.

Применение изолированных хрящевых клеток с учетом сохранения их иммунологической переносимости или выбора донорского трансплантата может быть осуществлено путем накопления в банках тканей, где ткани и клетки подвергают низкотемпературной консервации при температуре —196° С, обеспечивающей возможность практически неограниченного срока их хранения при сохранении биологических свойств.

Трансплантации хрящевых тканей в восстановительной хирургии (в частности, в ортопедии) придается большое значение. Оказалось, что после аллотрансплантации изолированных хрящевых клеток в благоприятных условиях они способны созидать настоящую хрящевую ткань [3]. За последние годы многие исследователи предпринимали попытки изолировать хрящевые клетки и применить их в чистом виде или суспендированными в среде носителя для восполнения костных дефектов [4—8].

На основе разработанного нами метода выделения хрящевых клеток взрослых крыс мы исследовали оптимальные параметры их низкотемпературной консервации. Хрящевые клетки выделяли из проксимальных концов ребер и processus xiphoideus, которые предварительно были фрагментированы и помещены в сбалансированный солевой раствор (ССР) (табл. 1).

Таблица 1

**Состав сбалансированных солевых растворов (1—3) для выделения хрящевых клеток**

| Ионный состав, мэкв/л | 1 | 2 | 3 |
|---|---|---|---|
| $Na^+$ | 76,0 | 76,0 | 142,0 |
| $K^+$ | 17,0 | 17,0 | 6,0 |
| $Ca^{2+}$ | 5,0 | 9,0 | 5,0 |
| $Mg^{2+}$ | 4,0 | 60,0 | 4,0 |
| $Cl^-$ | 72,0 | 76,0 | 127,0 |
| $SO_4^{2-}$ | 4,0 | 60,0 | 4,0 |
| $H_2PO_4^-$ | 2,0 | 2,0 | 2,0 |
| $HCO_3^-$ | 25,0 | 25,0 | 25,0 |
| Глюкоза, ммоль/л | 5,0 | 5,0 | 5,0 |

Эти растворы обрабатывали газовой смесью (95% $O_2$ и 5% $CO_2$) и поддерживали pH = 7,4 ± 0,05. Выделение клеток осуществляли по следующей схеме. К 0,2 г хрящевой ткани добавляли 4,5 мл папаина и 1,5 ч инкубировали при +37° С, перемешивая образцы через каждые 10 мин. После трехкратной промывки проб по 10 мл ССР добавляли 4,0 мл коллагеназы и 1,5 ч инкубировали при температуре +37° С. На следующем этапе пробы обрабатывали трипсином в течение 2,5 ч при +37° С. Пробы доводили до 10 мл $ССР_2$ (табл. 1) и центрифугировали 3 мин при 800 об/мин, а затем 3 мин при 1800 об/мин. Надосадочную жидкость декантировали и добавляли 1,0 мл сыворотки теленка к клеточному осадку.

Проверку на жизнеспособность осуществляли путем окраски клеток трипановым синим. При замораживании к 1,5 мл суспензии хрящевых клеток добавляли 0,5 мл охлажденного ССР (семь частей $ССР_1$ и три части 8%-ного ДМСО) и разливали по 0,2 мл в стеклянные ампулы объемом по 2,0 мл, выдерживая их 10 мин, а затем смесь охлаждали до +4° С и экспонировали либо 10, либо 30 мин. Ампулы с клетками замораживали до —25° С и хранили 30 мин. После этого пробы быстро



Матеріал, захищений авторським правом

погружали в жидкий азот (—196° С) и хранили не менее суток. Отогрев проб осуществляли на водяной бане при температуре +37° С. После отогрева к пробам добавляли $ССР_3$ до 10 мл и центрифугировали 3 мин при 800 об/мин, а затем 3 мин при 1800 об/мин. Надосадочную жидкость декантировали, прибавляли 1,0 мл сыворотки теленка и окрашивали трипановым синим.

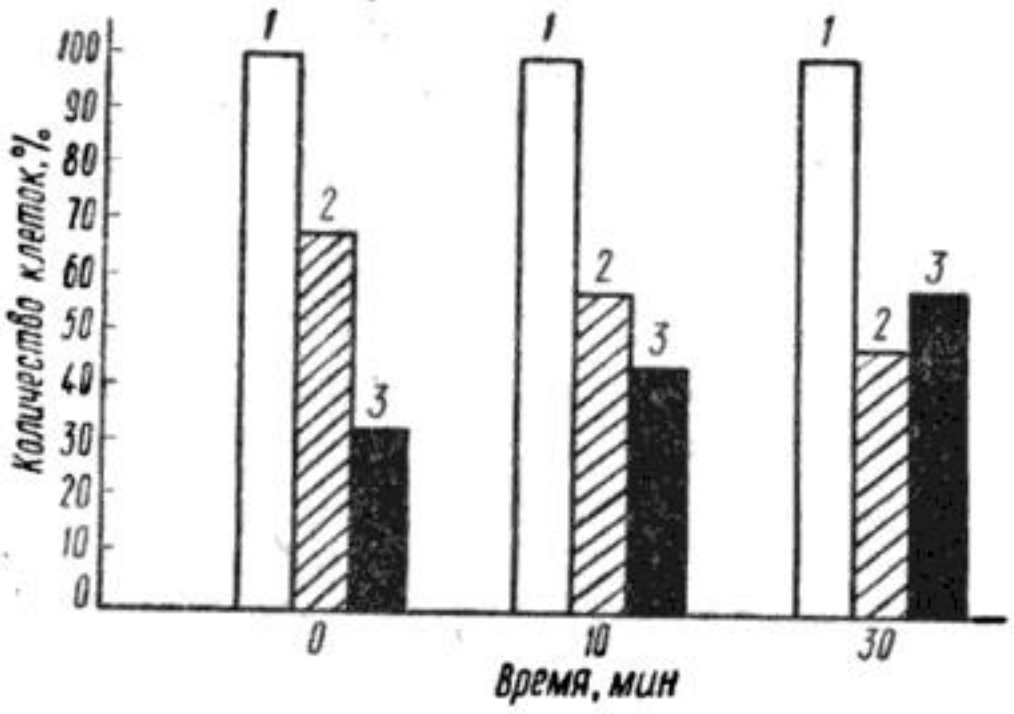



Рис. 1. Влияние 8%-ного ДМСО на выживание изолированных хрящевых клеток взрослых крыс в зависимости от времени инкубации:

*1* — общее число клеток; *2* — число жизнеспособных клеток; *3* — число мертвых клеток.

Как видно, выделение из костей хрящевых клеток производилось нами при использовании трех различных протеолитических ферментов (табл. 2). Активированный раствор папаина применялся на первой стадии обработки, поскольку хрящевые клетки простой обработкой коллагеназой и трипсином с трудом выделяются из хрящевых фрагментов взрослых животных [8]. Папаин представляет собой смесь собственно папаина, химотрипсина и папайялизоцима и обладает свойством гидролизовать мукополисахариды матрицы кости и хряща. Под действием восстанавливающих веществ растворы папаина активируются [9]. Для активации мы применяли DL-цистеингидрохлорид. В результате последующей обработки энзимами коллагеназой и трипсином дополнительно деполимеризуются межклеточные вещества, в результате чего хрящевые клетки полностью выделяются из ткани.

Таблица 2

**Состав растворов и протеолитических ферментов для выделения хрящевых клеток**

| Раствор | Состав протеолитической смеси | | |
|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 |
| $ССР_1$ | 4,0 мл | 4,0 мл | 4,0 мл |
| Концентрированный раствор папаина (1 г папаина, 100 мл $ССР_2$) | 0,4 мл | — | — |
| Раствор DL-цистеингидрохлорида $ССР_1$ (1,85 г, 100 мл) | 0,1 мл | — | — |
| Коллагеназа | — | 0,008 г | 0,008 г |
| Трипсин | — | — | 0,008 г |

На рис. 1 приведены результаты влияния криозащитной среды в зависимости от длительности инкубации на жизнеспособность изолированных хрящевых клеток. Как видно, в более высоких концентрациях ДМСО является токсичным для клетки веществом [11]. Его токсичность может быть уменьшена путем снижения температуры, хотя в результате этого увеличивается время эквилибрации ДМСО с клеткой.

Так, при инкубации клеток с ДМСО в течение 30 мин сохраняется лишь 70% их исходного уровня. Сокращение времени инкубации до 10 мин, напротив, действует более положительно на число выживших клеток.

В табл. 3 приведены результаты низкотемпературной консервации хрящевых клеток под защитой ДМСО после предварительного их эквилибрирования при +4° С в течение 30 и 10 мин. Инкубирование клеток

Матеріал, захищений авторським правом

с ДМСО на протяжении 30 мин позволило сохранить после программного замораживания до —196° С всего 9,8% клеток. При сокращении времени эквилибрации до 10 мин число жизнеспособных клеток после деконсервирования достигало 36,4%. Эти результаты исследований совпадают с литературными данными [8, 12, 13]. Однако они показывают, что данный метод криоконсервирования не вполне удовлетворителен и должен в дальнейшем модифицироваться.

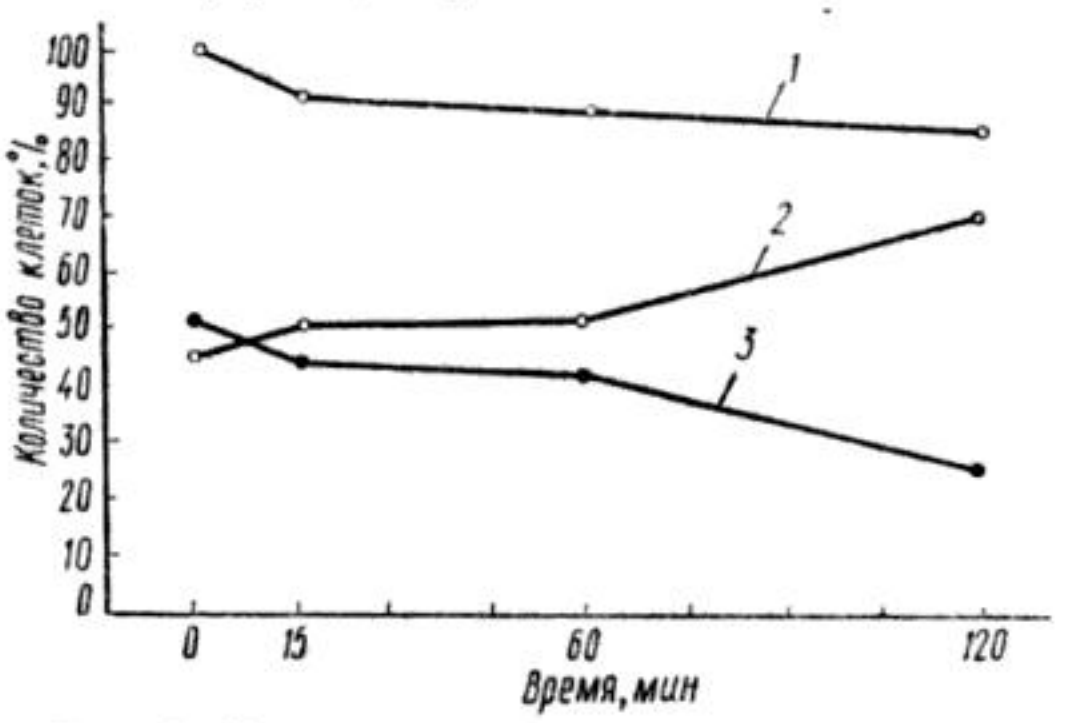



Рис. 2. Влияние времени хранения на жизнеспособность консервированных хрящевых клеток после их оттаивания:
*1* — общее число клеток; *2* — число мертвых клеток; *3* — число живых клеток.

Таким образом, проблема низкотемпературной консервации изолированных хрящевых клеток взрослых животных будет оставаться и далее предметом наших исследований. При этом особое внимание будет уделено уменьшению токсического влияния криопротекторов и уменьшению повреждений при замораживании-оттаивании. В связи с этим важным является то, что на результаты низкотемпературной консервации хрящевых клеток значительное влияние оказывают процедуры протеолитической обработки хряща и кости, из которых выделяют изолированные клетки, как это показано в работе [13].

Таблица 3

**Результаты криоконсервирования изолированных хрящевых клеток взрослых крыс под защитой ДМСО**

| Выделенные клетки | Инкубационный период | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 30 мин ($n=5$) | | 10 мин ($n=20$) | |
| | Количество | Процент | Количество | Процент |
| Общее число | $3,15\pm0,66\cdot10^6$ | 100,0 | $4,17\pm0,53\cdot10^6$ | 100,0 |
| Живые | $1,93\pm0,68\cdot10^6$ | 61,4 | $2,89\pm0,46\cdot10^6$ | 68,6 |
| Мертвые | $1,22\pm0,57\cdot10^6$ | 38,6 | $1,31\pm0,66\cdot10^6$ | 31,4 |
| Криоконсервация | | | | |
| Общее число | $1,51\pm0,70\cdot10^6$ | 100,0 | $3,29\pm1,52\cdot10^6$ | 100,0 |
| Живые | $0,19\pm0,18\cdot10^6$ | 12,6 | $1,04\pm0,78\cdot10^6$ | 31,6 |
| Мертвые | $1,32\pm0,85\cdot10^6$ | 87,4 | $2,25\pm1,03\cdot10^6$ | 68,4 |
| Отношение процента живых клеток после деконсервации к живым клеткам после выделения | — | 9,8 | — | 36,4 |

Результаты криоконсервирования клеток зависят также от условий хранения их после деконсервирования. На рис. 2 показано влияние хранения деконсервированных хрящевых клеток при комнатной температуре (+25°) в зависимости от времени хранения (15, 60 и 120 мин). После первоначального снижения количества жизнеспособных клеток до 85% после 15 мин хранения их количество остается почти постоянным в течение 60 мин. Однако уже после 120 мин хранения обнаруживается лишь 50% живых клеток к исходному уровню.

Консервированные при низких температурах хрящевые клетки взрослых крыс могут быть использованы в клинико-экспериментальных ис-



Матеріал, захищений авторським правом

следованиях и в целях трансплантации. Эти клетки могут найти применение для исследовательских целей, например, изучения биохимических характеристик хрящевой ткани под воздействием различных веществ и условий (процессы дифференцировки, обмена веществ, действие гормонов и т. д.). Точно так же криоконсервированные хрящевые клетки можно было бы использовать в качестве моделей в гистохимии, особенно в количественной гистохимии, а также в качестве объектов для фармакологических исследований.


1. *Bentley G., Greer R. B.* Isolated chondrocytes allografts into joint surfaces. — J. West. Pacif. Orthoped. Assoc., 1971, **8**, N 1, p. 71—79.
2. *Bentley G., Greer R. B.* Homotransplantation of isolated epiphyseal and articular cartilage chondrocytes into joint surfaces of rabbits. — Nature, 1971, **230**, N 3548, p. 385—387.
3. *Chestermann P. J., Smith A. U.* Homotransplantation of articular cartilage and isolated chondrocytes. An experimental study in rabbits. — J. Bone Joint Surg. B, 1968, **50**, N 2, p. 184—197.
4. *Farrant J.* Pharmacological actions and toxicity of DMSO and other compounds wich protect smooth muscle during freezing and thawing. — J. Pharm. and Pharmocol., 1964, **16**, N 5, p. 472—476.
5. *Hackensellner H. A.* Zur Position und Terminologie der Tieftemperaturkonservierung von Zellen, Geweben und Organen. — Probl. Hämatol. Transf., Transpl., 1976, **3**, N 1, S. 120—132.
6. *Hellinger J.* Experimentelle und klinische Aspekte der vilaten Gelenkknorpel-und Halbgelenktransplantation. — Zbl. Chir., 1977, **102**, N 12, S. 945—951.
7. *Heyner S.* Growth of embryonic mammalian cartilage after freezing. — Nature, 1961, **189**, N 3085, p. 1027—1029.
8. *Laurence M., Smith A. U.* Experiments in chondrocyte homografting in the rabbit. — J. Bone Joint Surg. B, 1969, **50**, N 3, p. 226—228.
9. *Lowe C., Smith A. U.* Isolation, freezing and storage of rabbit growth plate chondrocytes. — Lab. Parct, 1975, **24**, p. 511—514.
10. *McDowell F.* The free living bone graft. — Plast. reconstr. Surg., 1975, **55**, p. 612—613.
11. *Ptasinska-Urbanska M., Moskalewski S., Kaminski M. et al.* Intrasoleral introduction of isolated allogeneic chondrocytes capable of cartilage reformation in rabbits; possible procedure in treatment of detachment of the retina. — Exp. Eye Res., 1977, **24**, N 4, p. 241—247.
12. *Smith A. U.* Survival of frozen chondrocytes isolated from cartilage of adult mammals. — Nature, 1965, **205**, N 3761, p. 782—784.
13. *Tsaltas T. T.* Papain-induced changes in rabbit cartilage. — J. Exp. Med., 1958, **108**, p. 507—509.



Берлинский университет
им. Гумбольдта



Поступила в редколлегию
8. 02. 79



УДК 612.79.085.23



***Б. П. Сандомирский, Н. А. Волкова, И. А. Морозов***


# ИССЛЕДОВАНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ТРУПНОЙ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА В ОРГАННОЙ КУЛЬТУРЕ

Результаты пересадок консервированной аллогенной трупной кожи связаны не только со сложными иммуно-биологическими процессами, происходящими в трансплантате и организме реципиента, не только с надежностью способа консервирования, но и с уровнем жизнеспособности биологического материала, взятого для консервирования и последующей трансплантации.

Изучение жизнеспособности трансплантационного материала проводится различными способами, но наиболее убедительна из всех лабораторных тестов оценка с помощью культуры ткани [2—4]. Нашими исследованиями, проведенными на аутологичном материале, показана прямая тесная корреляционная связь между фибробластическим ростом кожи в органной культуре и ее приживлением при трансплантациях.




Матеріал, захищений авторським правом

Цель настоящего исследования — изучение качества трупной кожи человека по ее состоянию в органной культуре и определение допустимого срока гипотермического хранения взятого материала перед его консервированием.

Материалом исследования послужила кожа трупов, взятая через 4—8 ч после скоропостижной смерти и хранившаяся до эксплуатации в культуру от 30 мин до 40 ч при +4° С.

Причиной смерти доноров посмертной кожи были в 18 случаях сердечно-сосудистая недостаточность и гипертоническая болезнь, в 11 — отравление алкоголем и его суррогатами, в 7 — повешение и асфиксия, в 1 — тупая травма головы.

Возраст доноров колебался от 19 до 84 лет. Всего в культуре выращен материал от 37 трупов (31 мужчина и 6 женщин), что составило 37 серий эксплантатов.

Обработка и посев трупной кожи, как и метризованная оценка состояния культивированных фрагментов ткани, производилась по описанному ранее нами для нативной донорской кожи способу, при котором ведущим признаком является наличие и уровень фибробластического роста [1].

Морфологически картина изменений трупной кожи в органной культуре такова. К концу 1-х сут пребывания in vitro примерно из 50% эксплантатов мигрировали ядросодержащие эпителиоподобные клеточные элементы; на периметре некоторых кусочков появились фибробластические лучи-клетки. Из отдельных эксплантатов выселились клетки одного из указанных типов, из других — обоих типов сразу.

Вторые сутки характеризовались увеличением общего числа активно растущих эксплантатов. Максимального развития культура достигала на 3-и—4-е сут: более 90% образцов на 3-и сут жизни в культуре проявили признаки роста, причем подавляющее большинство кусочков имело на периметре фибробластические элементы либо фибробласты и эпителиоподобные клетки, хотя отдельные серии в этот срок фибробластического роста еще не давали.

Дальнейшее культивирование приводило к некоторому усилению фибробластического роста, продолжался и выход эпителиоподобных клеток. Для 50-х сут пребывания эксплантатов в условиях культивирования характерно дальнейшее выселение фибробластических элементов в большинстве случаев, хотя отмечена частичная дегенерация зоны роста отдельных образцов, причиной которой могли явиться их индивидуальные качества и особенности методики культивирования.

**Влияние длительности хранения на рост эксплантатов трупной кожи человека в культуре**

| Условия опыта | Срок хранения при +4°С, ч | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | до 6 | 6—12 | 12—24 | 24—30 | 36 |
| Количество серий | 6 | 8 | 13 | 4 | 6 |
| Интенсивность роста в баллах | 4,17±0,5 | 7,38±0,8 | 8,0±0,88 | 8,0±0,49 | 4,38±0,29 |
| *p** | — | <0,001 | >0,1 | >0,1 | <0,001 |

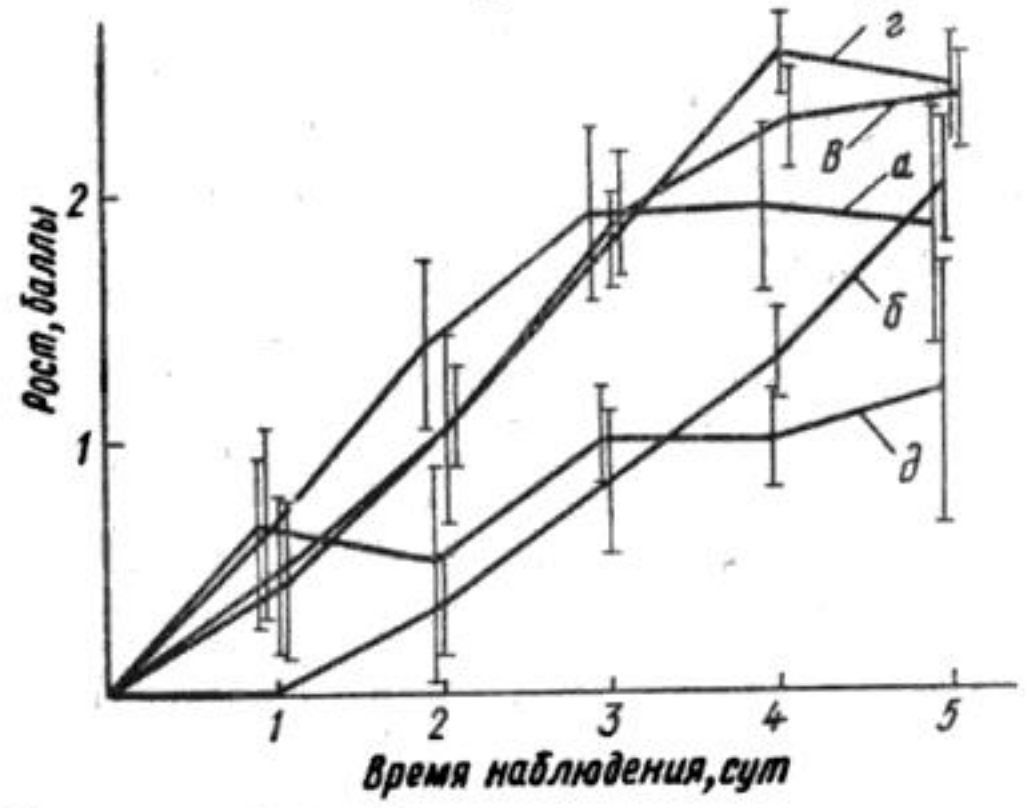
* Сравнение серий производилось последовательно.

В целом рост трупной кожи в органной культуре очень сходен с таковым у нативной донорской: наиболее характерным является выселение фибробластических элементов, возникающее на 1—2-е сут и достигающее максимума, в основном, на 3-и—4-е сут. Однако имеются и отличительные черты трупной кожи, а именно: не отмечено ни в



Матеріал, захищений авторським правом

одной из серий образование эпителиального вала на периферии эксплантата, предшествующее фибробластическому росту, как это наблюдалось в культуре нативной донорской кожи; выявлена ослабленность фибробластического роста в количественном отношении и отставание появления его во времени. Подтверждением сказанному является то, что ни один из образцов кадаверной кожи не дал подобия фибробластического синцития, часто наблюдаемого при культивировании материала от живых доноров. Максимальный расцвет фибробластического роста в эксплантированных образцах трупной кожи наступал на 1—2 дня позже, чем в донорских.




Динамика фибробластического роста в органной культуре в зависимости от длительности гипотермического хранения нативной трупной кожи человека:

*а* — 30 мин — 6 ч; *б* — 6—12 ч; *в* — 12—24 ч; *г* — 24—30 ч; *д* — более 36 ч.

Наблюдаемая неоднородность в появлении и развитии роста эксплантатов трупной кожи в органной культуре потребовала сравнения роста образцов, хранившихся различное время при +4° С с момента взятия до эксплуатации в культуру. Как видно из таблицы, интенсивность фибробластического роста зависит от времени хранения.

Быстрый перенос фрагментов кожи в условия культивирования не гарантирует хорошего роста in vitro, интенсивность его достоверно ниже, чем у образцов, выдержанных некоторое время при гипотермии. Следует отметить также, что появление признаков роста у образцов, попавших в культуру через 1—6 ч после взятия, отстает во времени: к концу 1-х сут фибробластический рост не обнаруживался, через 3 сут культивирования на периферии у 67% эксплантатов имелся слабый фибробластический рост, постепенно усиливавшийся к 5-м сут (рис. 1).

Кожа, попавшая в условия культивирования через 6—12 ч после операции взятия, вела себя иначе: фибробластический рост появлялся к концу 1-х сут после посева и достигал наибольших значений в 3—4-м сут, что по тенденции близко росту нативной донорской кожи (рис. 1, *б*).

Хранение кожи в течение 12—30 ч не снижало интенсивность фибробластического роста, наибольшее развитие его наблюдалось на 4—5-е сут (рис. 1, *в*, *г*). Хранение трупной кожи при +4° С более 36 ч существенно ухудшало ее способность к фибробластическому росту (рис. 1, *д*).

Влияние возраста доноров постмортальной кожи и причин смерти на показатели роста фрагментов кожи в органной культуре не выявлено.

В заключение можно сделать ряд выводов.

Жизнеспособность трупной кожи человека может быть оценена по ее фибробластическому росту в органной культуре.

Гипотермическое хранение (+4° С) нативной трупной кожи на протяжении 6—30 ч обеспечивает высокие показатели ее роста в органной культуре и пригодность к последующему консервированию.

1. *Волкова Н. А., Сандомирский Б. П., Бронштейн В. Л., Панков Е. Я.* Оценка криоконсервирования кожи методом органной культуры. — Ортопедия и травматология, 1978, № 1, с. 58—60.
2. *Лівшиць В. Л.* Анабіотична консервація шкіри і її гомопластика при опіках. — К.: Здоров'я, 1970. — 196 с.



Матеріал, захищений авторським правом

3. *Лопухин Ю. М., Коган Э. М.* Критерии жизнеспособности органов и тканей перед трансплантацией. — М. : Медицина, 1975. — 280 с.
4. *Рудых О. Д., Кейсевич Л. В.* Достоверные и условные критерии жизнеспособности при оценке эффективности консервирования тканей замораживанием. — В кн.: Трансплантация органов и тканей. Горький, 1970, с. 497.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР,
Харьковская областная станция
переливания крови

Поступила в редколлегию
19. 02. 79

УДК 57.043.531.62:13.62:218.2

***Р. В. Точиловская***

# ОТДАЛЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ КРИОТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКИХ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ЭРОЗИЙ, ЯЗВ, ТРЕЩИН СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА И ГУБ

Разработанные методы криотерапии различных заболеваний слизистой оболочки полости рта и красной каймы губ в настоящее время находят широкое применение в практической стоматологии.

На кафедре терапевтической стоматологии Украинского института усовершенствования врачей разработан, экспериментально и клинически апробирован метод криотерапии хронических неспецифических эрозий, язв, трещин слизистой оболочки полости рта и красной каймы губ.

С помощью капиллярной парожидкостной струи азота, воспроизводимой криооросителем азотным стоматологическим КАС-01, проведено лечение 104 больных, из которых у 52 диагностирован абразивный преканцерозный хейлит Манганотти, у 23 — хронические трещины, у 29 — хронические язвы. Возраст больных колебался от 19 до 75 лет.

Наблюдения за больными проводили в течение 3,5 лет. Непосредственные результаты лечения были положительными у 101 больного (у двух больных с хронической эрозией и у одного с хронической трещиной улучшения не наступило).

Отдаленные результаты (до 2—3 лет) прослежены у 96 больных. Положительные результаты определялись у 93 человек. У этих больных на месте бывших элементов поражения определялась соответственно нормальная слизистая оболочка полости рта или красная кайма губ. На месте обширных поражений на губах у некоторых больных наблюдалось небольшое западение. Рецидивы возникли у одного больного с абразивным преканцерозным хейлитом Манганотти, и у двух с хроническими трещинами губ.

Анализ рецидивов заболевания показал, что они возникли у людей старше 70 лет, причем давность заболевания у них превышала 10 лет. Кроме того, эти хронические процессы развивались на фоне сопутствующих заболеваний (у двух человек на фоне сахарного диабета, у одного больного — на фоне патологии прикуса). В этих случаях, очевидно, обязательно комплексное лечение.

Обобщая данные, полученные на основании длительного наблюдения за больными после криотерапии хронических неспецифических эрозий, язв, трещин, можно сказать, что разработанный метод прост в выполнении, не требует обезболивания, не вызывает осложнений общего и местного характера, что позволяет применять его у людей с сопутствующей патологией и старшей возрастной группы. Раны заживают без рубцов, что исключает возможность рецидивов и малигнизации и дает отличный косметический эффект.



Матеріал, захищений авторським правом

Проведенный анализ свидетельствует, таким образом, о высокой эффективности метода криотерапии при хронических неспецифических эрозиях, язвах, трещинах слизистой оболочки полости рта и губ.

Украинский институт
усовершенствования врачей МЗ СССР

Поступила в редколлегию
28. 02. 79

УДК 57.043

*Х. А. Хаккензелльнер, Й. Каде, Л. Шиммак*

# ИММУНОГЕННОСТЬ ТРАНСПЛАНТАЦИОННОГО МАТЕРИАЛА, КОНСЕРВИРОВАННОГО РАЗЛИЧНЫМИ МЕТОДАМИ

Известно, что независимо от метода консервации иммуногенность тканей, консервированных в нежизнеспособном состоянии, ниже таковой жизнеспособных тканей. Очевидно, с потерей жизнеспособности происходит потеря иммуногенности, обусловленной разницей в системах совместимости тканей. В этой связи иммуногенность нежизнеспособного биологического трансплантационного материала можно объяснить лишь сравнительно менее значительной иммуногенностью сывороточных белков, растворимых тканевых белков и структурных белков (особенно кислых структурных протеинов и коллагена) и (или) антигенностью продуктов распада и модификациями этих белков, обусловленных консервацией.

Недостаточно выяснен вопрос, как долго сохраняется иммуногенность тканей, консервированных в нежизнеспособном состоянии. На основании имеющихся по этому вопросу данных [1, 3, 5, 6] невозможно составить представление о зависимости между иммуногенностью и жизнеспособностью консервируемого материала.

В своих исследованиях по этой проблеме в качестве экспериментальной модели мы выбрали трансплантацию консервированной различными методами кожи мышей, при этом донорами служили мыши A, а реципиентами — мыши BIOLP. Эта комбинация характеризуется в наиболее важном для совместимости или несовместимости локусе $H=2^a$ у мышей A и $H=2^b$ у мышей BIOLP. Иммуногенность кожи определяли путем обнаружения лимфоцитотоксичных антител после трансплантации. Подробная методика содержится в более ранних публикациях [1, 3, 5, 6]. Учитывая лишь данные, которые оценивались как точно положительные в тесте на лимфоцитотоксичность (+++=51—75%, +++++=76—100% мертвых лимфоцитов), мы получили результаты, представленные в табл. 1. Образования лимфоцитотоксичных антител не наблюдалось после хранения кожи при —38° С в течение четырех недель. После трансплантации кожи, консервированной в формальдегиде, у двух из девяти животных на 7-й и 9-й день после трансплантации обнаруживались антитела. Четкая сенсибилизация наблюдалась после трансплантации замороженно-высушенной, выдерживавшейся в течение одного дня при —38° С кожи, хранившейся в течение четырех недель без криозащиты в

Таблица 1

**Результаты определения лимфоцитотоксичности при трансплантации кожи, консервированной различными способами (контроль — реакции лимфоцитотоксичности при пересадке нативной кожи)**

| Метод консервации | Реакция, % | |
|---|---|---|
| Свежая (нативная) кожа (контроль) | 9 | 100 |
| —196° С, 4 недели | 10 | 81,2 |
| —38° С, 1 день | 10 | 55,6 |
| Лиофилизация, 4 недели | 10 | 38,5 |
| Формальдегид (4%), 4 недели | 9 | 9,4 |
| —38° С, 3 недели | 10 | — |



Матеріал, захищений авторським правом

жидком азоте, а также, конечно, после трансплантации свежей кожи, служившей в качестве контроля, к которой отнесены содержащейся в табл. 1 результаты групп опытов.

В новой представленной здесь впервые серии опытов мы занимались выяснением значения времени хранения при —38° С для иммуногенности консервированной кожи. При этом мы сравнивали время хранения, равное 2, 5, 7, 12 и 28 дням. В качестве контроля служила свежая кожа. Результаты представлены в табл. 2, в которой содержатся также значения первого и двадцать первого дней из описанной выше серии. В то время как после одно- и двухдневного хранения в замороженном состоянии можно было отметить еще явно положительную реакцию в тесте на лимфоцитотоксичность, в случае хранения кожи в течение пяти и более дней не удавалось больше получить надежный результат.

Таблица 2

**Результаты определения лимфоцитотоксичности после трансплантации кожи, хранившейся в течение разного времени при —38° С, отнесенные к реакции после трансплантации свежей кожи**

| Время хранения, дни | Реакция, % | |
|---|---|---|
| (1)* | (10) | (55,6) |
| 2 | 10 | 42,7 |
| 5 | 10 | — |
| 7 | 10 | — |
| 12 | 10 | 2,6 |
| (21) | (10) | (—) |
| 28 | 10) | 2,6 |

* Значения в скобках взяты из первой серии опытов (табл. 1).

На основании наших двух серий опытов по изучению иммуногенности трансплантационного материала, консервированного с помощью хранения в морозильнике или лиофилизации, можно сделать следующие выводы.

1. Кратковременное хранение мертвой ткани при температуре от —20 до —40° С в течение 1—2 дней не влияет на ее иммуногенность; хранение при указанных температурных режимах в течение пяти или более дней приводит к потере иммуногенности трансплантационного материала.

2. Замораживание до —196° С (без криозащиты) и лиофилизация непосредственно или вскоре после получения трансплантационного материала обеспечивают сохранение иммуногенности (по крайней мере на четыре недели).

3. Если необходимо избежать иммунизации при пересадке тканей, то подвергнутый низкотемпературному хранению материал не должен применяться ранее чем через пять дней его хранения, а материал, предусмотренный для лиофилизации, должен предварительно храниться в течение не менее пяти дней в морозильнике, прежде чем он будет подвергаться окончательной консервации, лиофилизации.


1. *Friedlaender G. E.* The antigenicity of preserved allografts. — Transpl. Proc., 1976, **8**, Suppl. 1, p. 195—200.
2. *Kaden I., Hachkensellner H. A., Schimmak L., Tran The Thy-Cha.* Untersuchungen zur Antigenität unterschiedlich konsrevierter Haut. — Z. Exp. Chir., 1976, **9**, p. 74—83.
3. *Langer F., Czitrom A., Pritzker K. P.* The immunogenicity of fresh and frozen allogeneic bone marrow. — J. Bone Joint Surg. A, 1975, **57**, p. 216—220.
4. *Schimmak L., Kaden I., Hackensellner H. A.* Induction lymphozytotoxische Antikörper durch Transplantation konservierter allogener Haut bei Mäusen. — Z. Exp. Chir., 1977, **10**, S. 275—284.
5. *Sell K. W., Friedlaender G. E., Strong D. M.* Immunogenicity and freezedrying. — Cryoimmunologie, 1977, **62**, p. 187—197.
6. *Strong D. M., Friedlander G. E., Ahmed A., Sell K. W.* Immunogenicity of freeze-dried and deep-frozen bone allografts. — Cryoimmunologie, 1977, **62**, p. 209—215.



Берлинский университет им. Гумбольдта



Поступила в редколлегию
08. 02. 79





Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043

*Х. А. Хаккензелльнер, Г. Маттес*

# УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДА КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ МЫШЦЫ СЕРДЦА

К основным факторам, влияющим на результат криоконсервирования биоматериалов, относятся режимы охлаждения и отогревания, а также природа криозащитной среды, ее состав и характер взаимодействия с клетками во время инкубации и после деконсервирования. Необходимо строго учитывать также скорости (быстрая или медленная) и характер (непрерывный или этапный) охлаждения и отогревания замороженного препарата и температуры хранения. Криозащитные среды как правило состоят из двух составных частей: основной среды и собственно криопротектора [1]. Основной средой служат обычно растворы электролитов, иногда с коллоидными и питательными добавками, либо полусинтетические или полностью синтетические среды, используемые при хранении тканевых культур. Криопротектор, входящий в состав защитной среды, — это химическое соединение, обладающее способностью снижать повреждения при замораживании и оттаивании. В качестве необязательных добавок к замораживающей среде применяются другие защитные лекарственные вещества со специфическим действием (например, антиметаболиты, стабилизаторы мембран, антиоксиданты).

В настоящее время большинство исследователей по криоконсервированию биоматериалов ориентировано используют эти принципы, разрабатывая, с одной стороны, криозащитные среды, а с другой — режимы их охлаждения — замораживания и оттаивания-нагревания [5, 9—11]. Криозащитная среда как целое, особенно изменения состава основной среды, и защитные лекарственные вещества, не классифицируемые как криопротекторы, при этом почти не учитываются. Мы в последнее время занимаемся разработкой составных частей криозащитной среды [2, 3, 5—8].

В данной статье представлены данные исследования влияния замораживания (—196° С) на фрагменты сердечной мышцы взрослых крыс [6] в присутствии 3,1 М раствора ДМСО. Охлаждение проб осуществляли по 3-этапной программе.

На первой — охлаждение до 4° С на протяжении 30 мин, что позволяло достигнуть полного периода эквилибрирования материала. На второй — пробы замораживали до —25° С в течение 20 мин. На третьей — пробы быстро погружали до температуры —196° С и при этой температуре хранили. Через 24 ч пробы отогревали на водяной бане при температуре +40° С. Жизнеспособность размороженных проб исследовали в специальной перфузионной камере [4]. При этом регистрировали самопроизвольные и электрически индуцированные (прямоугольные) импульсы, 12 В; 2 мс сокращения, которые кроме этого спустя 20 мин после начала измерения стимулировались добавкой адреналина к перфузионной среде ($1 \cdot 10^{-6}$ г/л). Наблюдения вели на протяжении 80 мин после оттаивания.

Результаты исследований показали, что при применении в качестве основной среды раствора Кребса-Хензеляйта (см. вывод) свою функцию сохраняет 21% фрагментов. По сравнению с этим модифицированный раствор Кребса-Хензеляйта, обогащенный $K^+$, $Ca^{2+}$ и $M^{2+}$ позволял сохранять свойства фрагментов сердечной мышцы в 38% случаев [6—8]. Еще лучше результаты были при введении в защитную среду 160 мМ глюкозы [6—8], аденозина, ксилита, пировиноградной кислоты и АТФ [3]. Изменение начального значения pH среды с 7,4 до 6,8 также приводило хотя и к незначительному, но четкому улучшению



Матеріал, захищений авторським правом

| Криозащитная среда | Число сокращающихся фрагментов, % |
|---|---|
| Раствор Кребса-Хензеляйта | 21,0 |
| Раствор Кребса-Хензеляйта, обогащенный $K^+$, $Ca^{2+}$, $Mg^{2+}$ | 38,0 |
| Раствор Кребса—Хензеляйта+5,5 ммоль глюкозы | 38,0 |
| Раствор Кребса-Хензеляйта+160 ммоль глюкозы | 60,0 |
| Раствор Кребса-Хензеляйта+5 ммоль аденозина+30 ммоль пируват+30 ммоль ксилита | 60,0 |
| Раствор Кребса-Хензеляйта, обогащенный 1 ммоль АТФ | 35,0 |
| | 69,0 |
| Раствор Кребса-Хензеляйта с pH 7,4 | 30,0 |
| Раствор Кребса-Хензеляйта с pH 6,8 | 37,0 |
| Буферный раствор фосфата калия с pH 7,4 | 80,0 |
| Буферный раствор фосфата калия с pH 6,8 | 95,0 |

результатов [7, 8]. При этом предварительная обработка крыс на протяжении трех дней физиологическим раствором хлорида натрия позволяла получить 35% функционально активных фрагментов сердца, а после введения $2 \cdot 10^{-6}$ г/кг веса тела селенита натрия — 56% ($p<0,05$). Полная замена раствора Кребса-Хензеляйта 0,041 М буферным раствором фосфата калия дала максимальное увеличение процента сокращаемости фрагментов сердца при условии, если pH среды было равно 6,8. Интересные результаты получены также после предварительной обработки животных-доноров селенитом натрия, который обладает антиоксидантными свойствами. Очевидно, этот эффект обусловлен стабилизирующими, точнее антиоксидантными, свойствами микроэлемента селена [3].

Анализ результатов охлаждения фрагментов сердца соответственно до +4—25° С и —196° С показал, что улучшение результатов криоконсервирования при использовании комбинированных сред можно объяснить введением в среду специальных защитных лекарственных веществ, обладающих частично метаболическим или криозащитным селективными эффектами (таблица).

**Эффект различных составных частей криозащитной среды на сохранение свойств сердечной мышцы**

| Природа составных частей криозащитной среды | Метаболический эффект | Селективный криозащитный эффект |
|---|---|---|
| Электролиты ($K^+$, $Ca^{2+}$, $Mg^{2+}$) | +++ | +++ |
| Буферный раствор | +++ | + |
| pH | +++ | + |
| Субстраты (глюкоза, аденозин, ксилит) | +++ | + |
| Антиметаболиты | +++ | — |
| Стабилизаторы мембраны | — | +++ |
| Антиоксиданты | + | +++ |

Примечание: +++ — выраженный эффект; + — слабо выраженный эффект.

Применяя определенные электролиты и буферные растворы или уменьшая значения pH, можно получить эффекты, снижающие обмен веществ, например, на основе их деполяризующего действия, либо криозащитный эффект путем влияния на процессы кристаллизации перфузата и внутриклеточной жидкой фазы. Субстраты, добавленные в защитную среду, способствуют стимуляции обмена вещества в клетках, прежде всего на стадии их инкубации и во время деконсервирования. Эти вещества могут действовать и как криозащитные, как например глюкоза, концентрация которой в среде повышена в 30 раз. Основная эффективность стабилизаторов мембран клетки или антиоксидантов, как например селенита натрия или витамина Е, проявляется во время замораживания и оттаивания. Очевидно, они стабилизируют структуру мембраны клетки благодаря своим антиоксидантным свойствам.

В заключение считаем необходимым отметить, что при консервировании биоматериалов основное внимание должно уделяться не только криопротекторам, но и собственно среде в целом, в которую входят



Матеріал, захищений авторським правом

различные компоненты. При учете этого обстоятельства можно ожидать существенного улучшения малоудовлетворительных до сих пор результатов в консервировании ядросодержащих клеток, включая клетки крови и костного мозга.


1. *Hackensellner H. A.* Zur Position und Terminologie der Tieftemperaturkonservierung von Zellen, Geweben und Organen. Probl. Hämatol. Trasf. Transplant., 1976, **3**, N 1, S. 120—132.
2. *Hackensellner H. A., Krietsch P., Matthes G.* Actual situation and problems in cryopresservation of organs. — Acta med. polon., 1978, **19**, N 1—2, p. 189—194.
3. *Hackensellner H. A., Matthes G., Oehme P., Jentzsch K.-D.* Sodium selenite — an agent supporting cryoprotection. — Acta. biol. med. germ., 1978, **37**, N 6, p. 1787—1789.
4. *Krietsch P., Brasellmann H.* Einfacher Aufbau zum Prüfen der Kontraktionsfähigkeit von Herzmuskelfragmenten. — Z. med. Labortechnik, 1974, **15**, N 5, S. 343—346.
5. *Leibo S. P., Farrant J., Mazur P. et al.* Effects of freezing on marrow stem sell suspensions. Interactions of cooling and warming rates in the presence of PVP, sucrose or glycerol. — Cryobiology, 1970, **6**, N 5, p. 315—332.
6. *Matthes G., Hackensellner H. A., Hartwig A.* Successful cryopreservation of auricle fragments from rat hearts at —196° C. — Experientia, 1978, **34**, N 3, p. 1024—1025.
7. *Matthes G., Hackensellner H. A., Krietsch P.* Untersuchungen zum Einfluss der Elektrolytzusammensetzung und des pH-Wertes auf die Kontraktilität von Herzmuskelfragmenten nach dem Wiederauftauen. — Probl. Hämatol. Transf. Transpl., 1976, **3**, S. 381—383.
8. *Matthes G., Hackensellner H. A., Krietsch P.* Some results in cryopreservation of rat heart fragments. — Cryoimmunologie, 1976, **62**, p. 399—406.
9. *Mazur P., Farrant J., Leibo S. P., Chu E. H. Y.* Survival of hamster tissue culture cells after freezing and thawing. Interactions between protective solutes and cooling and warming rates. — Cryobiology, 1969, **6**, N 1, p. 1—9.
10. *McGann L. E., Farrant J.* Survival of tissue culture cells frozen by a two-step procedure to 196° C. Holding temperature and time. — Cryobiology, 1976, **13**, N 4, p. 261—268.
11. *Meryman H. T., Williams R. J., Douglas S.* Freezing injury from «solution effects» and its prevention by natural or artificial cryoprotection. — Cryobiology, 1977, **14**, N 4, p. 287—302.



Берлинский университет им. Гумбольдта



Поступила в редколлегию
08. 02. 79



УДК 57:577.151/158.577.152



***М. А. Хенох, В. П. Першина***


# ОБРАЗОВАНИЕ ГИБРИДНЫХ ФЕРМЕНТОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ ГЛУБОКОГО ОХЛАЖДЕНИЯ

Действие низких и сверхнизких температур на биополимеры представляет существенный интерес для криобиологии. Из имеющегося литературного материала следует, что некоторые реакции ускоряются при замораживании водных систем [2, 6]. Например, показана возможность более быстрого протекания цепных реакций в твердой фазе [6]. В растворах белков при этом происходит ряд изменений. Так, замораживание-оттаивание вызывает изменение структуры белков, что выражается в падении растворимости, увеличении асимметрии молекулы, возрастании активности некоторых ферментов, росте АТФ-азной активности у актомиозина [1, 7, 8, 11, 14]. Электрофоретически установлена криогибридизация лактатдегидрогеназы [3, 10, 12].

Задача настоящей статьи — выяснить действие замораживания-оттаивания на изменение структуры и возможность взаимодействия ферментов при криолизе их смеси.

В опытах ампулы, содержащие по 3 мл водных растворов панкреатической рибонуклеазы [2, 7, 16], куриного лизоцима [3, 2, 1, 17], а также их смеси подвергали замораживанию при —78° С. Скорость замораживания — 6,5 град/мин. Оттаивание происходило при комнатной температуре обычно в течение 15 мин, после чего растворы анали-




Матеріал, захищений авторським правом

зировали. Гельфильтрацию белков и их смесей проводили на колонке 1,5×75 см с сефадексом G=200, элюент — 0,1 М ацетатный буфер с 0,1 М NaCl, pH 5,7. Скорость элюции — 6 мл/ч. На колонку наносили 1 мг белка. Концентрацию белков определяли по методу Лоури и микро-Кьельдалю. Полученные фракции исследовали на ферментативную активность и содержание SH-групп. Каталитическое действие РНК-азы определяли по [13], лизоцима, как описано в [4], содержание SH-групп — по методу [9]. Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) проводили по описанию в [5] в трубках 0,6×10 см. Опыты воспроизводились не менее 15 раз. Использовали ферменты фирмы «Реанал».

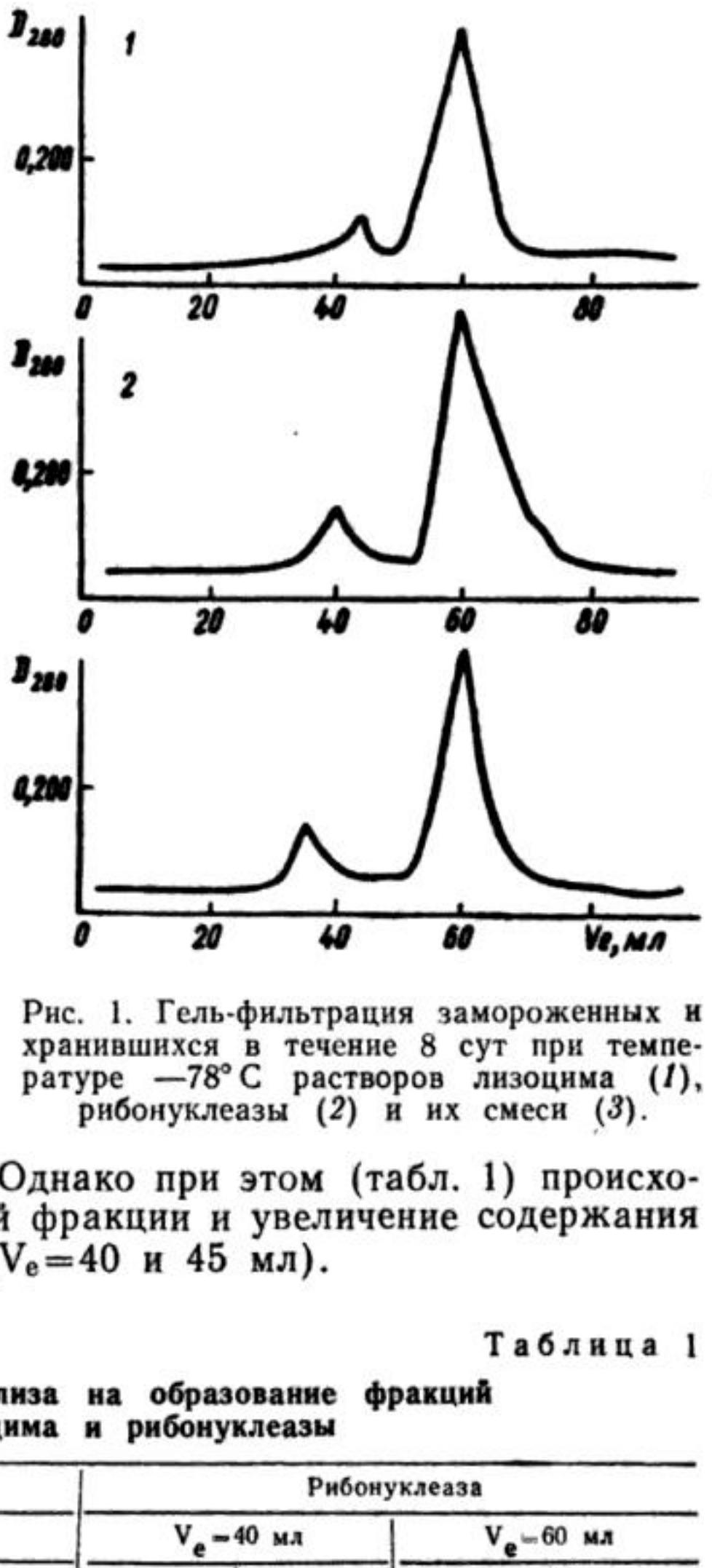



Рис. 1. Гель-фильтрация замороженных и хранившихся в течение 8 сут при температуре —78° С растворов лизоцима (*1*), рибонуклеазы (*2*) и их смеси (*3*).

Кривые элюции замороженных РНК-азы, лизоцима (белков, близких по молекулярному весу) и их смеси представлены на рис. 1. При замораживании растворов лизоцима и РНК-азы происходило образование новой более высокомолекулярной фракции с объемом элюции ($V_e$) соответственно 45 мл и 40 мл. Опыты показали, что воздействие холода на растворы ферментов в пределах от 5 до 20 сут не вызывало изменения в количестве фракций. Однако при этом (табл. 1) происходило уменьшение белка в основной фракции и увеличение содержания белка во вновь образовавшихся ($V_e$=40 и 45 мл).

Таблица 1

**Влияние длительности криолиза на образование фракций и активность лизоцима и рибонуклеазы**

| Длительность замораживания, сут | Лизоцим | | | | Рибонуклеаза | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $V_e$=45 мл | | $V_e$=60 мл | | $V_e$=40 мл | | $V_e$=60 мл | |
| | Выход, % | Остаточная активность, % | Выход, % | Остаточная активность, % | Выход, % | Остаточная активность, % | Выход, % | Остаточная активность, % |
| 4 | 0,0 | — | 100,0 | 40,0 | 0,0 | — | 100,0 | 55,0 |
| 8 | 7,5 | 63,0 | 90,0 | 79,0 | 4,0 | 69 | 95,7 | 66,0 |
| 12 | 27,0 | 73,0 | 75,0 | 83,0 | 29,9 | 71 | 72,0 | 76,0 |
| 18 | 60,0 | 78,8 | 35,0 | 88,0 | 35,0 | 86 | 60,0 | 83,0 |

Из табл. 1 следует также, что действие замораживания вызывает падение активности ферментов, наиболее заметное в начале криолиза. Влияние холода в течение 75 сут приводило в замороженных растворах белка к образованию фракций: в лизоциме — $V_e$=26 мл, $V_e$=38 мл, $V_e$=58 мл, а в РНК-азе $V_e$=32 мл, $V_e$=46 мл и $V_e$=64 мл. Наибольшее количество белка (0,7 мг) содержалось в лизоциме с $V_e$=38 мл, а в РНК-азе — с $V_e$=46 мл. Интересно, что фракция лизоцима с $V_e$=26 мл



Матеріал, захищений авторським правом

при этом полностью утратила активность, тогда как элюаты с $V_e$=38 мл и $V_e$=58 мл были активны (соответственно 30 и 45%). Во фракциях белков не обнаружено свободных SH-групп.

Замораживание раствора, содержащего смесь ферментов — лизоцим и РНК-азу, вызывало появление фракции с $V_e$=36 мл. Белок этой фракции имел двойную ферментативную активность: расщепление полимерной РНК и лизис Micrococcus lysodeikticus. Результаты электрофореза ферментов, фракционированных и не фракционированных на сефадексах, представлены на рис. 2. Видно, что РНК-аза и лизоцим хорошо разделяются в ПААГ (№ 3). Образовавшиеся фракции легко обнаруживаются (№ 7, 8, 9). При электрофоретическом разделении замороженной смеси лизоцима и РНК-азы (№ 6) образуется зона, подвижность которой равна подвижности фракции смеси с $V_e$=36 мл (№ 9). Результаты исследований показывают, что под влиянием глубокого охлаждения в растворах, содержащих смесь белков, между макромолекулами образуются новые химические связи, — возникает гибрид ($V_e$==36 мл). Двойная ферментативная активность криогибрида сохраняется и при длительном воздействии холода (табл. 2). При этом, однако, происходит инактивация, резко выраженная в первые сутки криолиза. После 75-суточного хранения при температуре —78° С инактивация криогибрида как по РНК-азной, так и по лизоцимной активности возросла более чем на 80%. Отметим, что оптимум действия гибрида от pH среды по лизоцимной и РНК-азной активности сохранялся таким же, как и у индивидуальных белков. Спонтанного образования гибрида при температуре 4° С в растворах смеси белков не происходило.

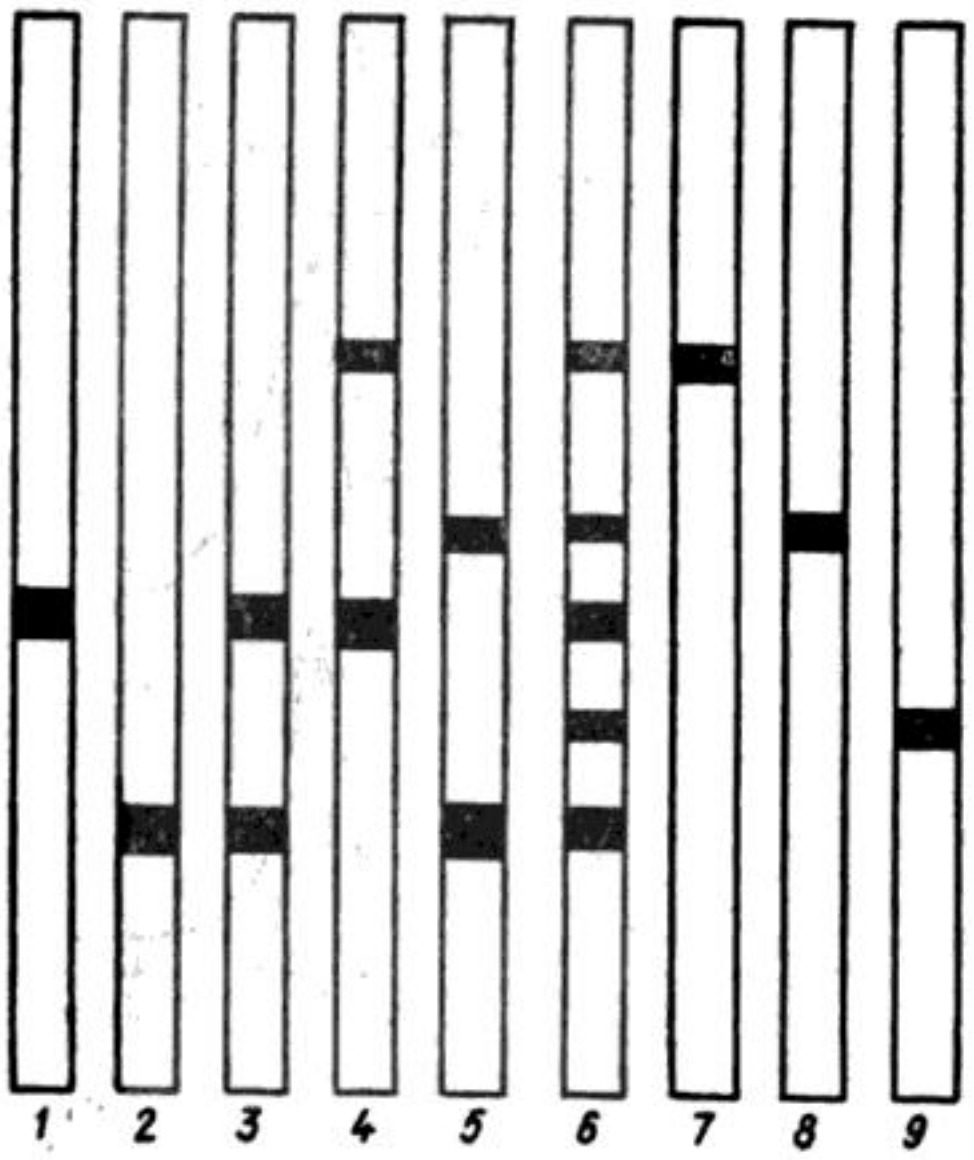



Рис. 2. Электрофорез замороженных и хранившихся в течение 10 сут при температуре —78° С растворов лизоцима, рибонуклеазы и их смеси.

Ток — 3 мА, на трубку, напряжение — 80 В. Нативные ферменты: *1* — рибонуклеаза; *2* — лизоцим; *3* — лизоцим + рибонуклеаза. Криолизованные белки: *4* — рибонуклеаза; *5* — лизоцим; *6* — смесь. Высокомолекулярные фракции криолизованных белков: *7* — рибонуклеазы; *8* — лизоцима, *9* — смеси.

Выяснение характера связей, участвующих в образовании «сшивок» между белками, проводили на криогибриде лизоцима и РНК-азы. Выделенная фракция с $V_e$=36 мл (с двойной ферментативной функцией) обрабатывалась 8М мочевиной. Установлено, что мочевина не оказывала влияния на электрофоретическое поведение криогибрида. Очевидно, водородные связи не были ответственны за его образование. Однако после воздействия 1%-ного меркаптоэтанола гибрид распадался

Таблица 2

**Влияние длительности криолиза на образование и активность выделенного криогибрида**

| Длительность воздействия холода, сут | Выход криогибрида, % | Остаточная активность, % | |
|---|---|---|---|
| | | Расщепление РНК | Лизис Micrococcus lysodeikticus |
| 4 | 6 | 43,5 | 31,0 |
| 8 | 15 | 35.0 | 28,0 |
| 12 | 28 | 30,0 | 26,0 |
| 18 | 30 | 26,0 | 27.2 |
| 30 | 34 | 19,5 | 16.0 |
| 75 | 40 | 17,0 | 11,0 |



Матеріал, захищений авторським правом

на лизоцим и РНК-азу. Последнее может указывать на то, что в образовании криогибрида принимали участие —S—S-связи.

Химические процессы, происходящие в водных растворах полимеров при криолизе, обусловлены силами, развиваемыми при изменении агрегатного состояния воды. При этом происходит разрыв цепи макромолекул с образованием свободных радикалов. При дефростации макрорадикалы рекомбинируют и возникают новые вещества, отличающиеся от исходных продуктов [1].

В наших опытах, по-видимому, такая рекомбинация происходила с образованием новых дисульфидных связей, что косвенно подтверждается распадом гибрида при обработке меркаптоэтанолом. Полученные нами данные показывают, что под влиянием глубокого охлаждения происходят реакции, вызывающие усложнение структуры ферментов. Подобные процессы могут, по-видимому, протекать при замораживании биоматериалов.


1. *Берлин А. А.* Исследования в области механохимии полимеров. О некоторых биологических проблемах механохимии природных полимеров. — Биофизика, 1963, № 8, с. 28—33.
2. *Гольданский В. И.* Явление квантового низкотемпературного предела скорости химических реакций. — Успехи химии, 1975, **44**, с. 2121—2149.
3. *Луговой В. И., Моисеев В. А.* Действие низких температур на растворимые ферменты. — В кн.: Биофизика. М., 1978, с. 53—79. (Итоги науки и техники; Т. 9).
4. *Максимов В. И., Осипов В. И., Каверзнева Е. Д.* О подавлении склонности к агрегации γ-облученного лизоцима после обработки меркаптоэтанолом. — Радиобиология, 1969, № 9, с. 355—358.
5. *Сафонов В. И., Сафонова М. П.* Исследование белков и ферментов растений методом электрофореза в полиакриламидном геле. — В кн.: Биохимические методы в физиологии растений. М.: Наука, 1971, с. 113—136.
6. *Сергеев Г. В., Батюк В. А.* Криохимия. — М.: Химия, 1978. — 295 с.
7. *Хенох М. А., Першина В. П., Лапинская Е. М.* Влияние глубокого замораживания на белковые растворы. — Цитология, 1966, № 8, с. 769—772.
8. *Хенох М. А., Пинаев Г. П., Ковалова Е. А.* Действие криолиза и ультразвуковых колебаний на растворы актомиозина. — В кн.: Реакция клеток и их белковых компонентов на экстремальные воздействия. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1963, с. 6—10.
9. *Boyer P. D.* Spectrophotometric study of the reaction on protein groups with organic mercurials. — J. Amer. Chem. Soc., 1954, **17**, p. 4330—4334.
10. *Chilson O. P., Costello L. A., Kaplan N. O.* Effect of freezing on enzymes. — Fed. Proc., 1965, **24**, N 2, Supl. 15, p. S55—S56.
11. *Khenokh M. A., Pershina V. P.* The effect of extreeme cooling on globular fibrillar proteins. — In: Life science and space Res. Amsterdam: North-Holland co, 1968, p. 123—129.
12. *Market C. L.* Lactate Dehydrogenase Isozymes: Dissotiation and recombination of subunits. — Science, 1963, **140**, N 3573, p. 1329—1330.
13. *McDonald A.* Ribonucleases. — In: Methods in enzymol. London; New York: Acad. press, 1955, **11**, p. 427—437.
14. *Tsushiva T., Tsushiva V., Nonomura Y., Matsumoto T. T.* Prevention of freeze denaturation of carp actomyosin by Sodium Glutamate. — J. Biochem., 1975, **77**, p. 835—861.



Институт цитологии АН СССР



Поступила в редколлегию
28. 02. 79



Матеріал, захищений авторським правом

## СОДЕРЖАНИЕ


*Лозина-Лозинский Л. К.* Мультифакторная теория криоповреждений . . . 3
*Голдовский А. М.* О состояниях организмов на стадиях анабиоза . . . . 6
*Смирнов И. В.* Теоретические основы глубокого охлаждения спермы животных . 10
*Белоусова Е. В., Сандомирский Б. П.* Влияние местного охлаждения на активность креатинкиназы в сыворотке крови и скелетной мышце белых крыс . 14
*Вишневский В. И., Душейко А. Г., Маркова О. П.* Замораживание клеток костного мозга в ультразвуковом поле . . . . . 17
*Волина В. В., Панков Е. Я.* Изменение активности ряда окислительно-восстановительных ферментов в коже крыс при различных температурных воздействиях . . . . . 21
*Глушко Т. А., Маркова О. П.* Пролиферативная активность клеток в культуре ткани после инкубации с ПЭО-400 . . . . . 27
*Гольцев А. Н., Дроздова О. А.* Топография расселения деконсервированных и нативных миелокариоцитов в организме облученных реципиентов . . 29
*Гордиенко А. Д., Кудокоцева Е. В.* Изучение функционального состояния митохондрий в клеточных суспензиях, экспонированных в растворе криопротектора . . . . . 32
*Гучок В. М.* Сравнительное исследование токсичности этиленгликоля, ПЭО-400 и ПЭО-1500 для крыс и мышей в раннем постнатальном онтогенезе . . 34
*Кулешова Л. Г., Розанов Л. Ф.* Изучение кинетики взаимодействия эритроцитов человека с криопротекторами и солями . . . . . 40
*Луговой В. И., Кравченко Л. П., Семенченко О. А.* Влияние криопротекторов и мембранстабилизирующих веществ на лизосомы при замораживании . 45
*Митряев А. Б., Столяров И. В., Белоус А. М.* Действие низких температур (—196° С) на структурно-функциональное состояние транскрибирующего комплекса ядер . . . . . 48
*Моисеев В. А., Морозова Т. Ф., Микулинский Ю. Е.* Влияние гиперконцентрации солей на конформационное состояние иммуноглобулина лошади . . . 51
*Писанный О. Е., Хворостов Е. Д., Мхитарьянц А. М., Сандомирский Б. П.* Эндоскопическая криодеструкция полипов верхнего отдела желудочно-кишечного тракта . . . . . 53
*Полякова А. И., Вотякова И. А.* Изучение жизнеспособности лейкоцитов периферической крови человека на различных этапах низкотемпературного консервирования методом монослойных культур. I. Выбор питательной среды . . . . . 54
*Тимошенко Ю. П., Пахомов П. Л.* Размораживание биологических объектов СВЧ-энергией. VII. Исследование процесса плавления . . . . . 57
*Утевский А. М., Чуйко В. А., Назарова Л. А.* Влияние охлаждения на активность митохондриальной моноаминоксидазы сердца белых крыс . . . . . 61
*Цуцаева А. А., Попов Н. Н.* Влияние трансплантации аллогенных криоконсервированных лимфоидных клеток на выживаемость облученных животных . 63
*Цуцаева А. А., Попов Н. Н.* Восстановление иммунных реакций в облученном организме при трнасплантации аллогенных криоконсервированных лимфоцитов . . . . . 66
*Шраго М. И., Пустовойт П. А.* Влияние водных растворов криопротекторов на реологические свойства крови . . . . . 69
*Бабийчук Г. А., Микляев И. Ю., Королев В. В., Задорожная В. Н., Латогуз И. К., Дьяченко В. К.* Состояние микроциркуляции при экспериментальном инфаркте миокарда и гипотермии . . . . . 73
*Бабийчук Г. А., Панков Е. Я., Македонская В. А., Кошелева О. Н., Жигун А. И.* Изменение структуры бедренной кости после криовоздействия в эксперименте . . . . . 77
*Гладкий Н. И., Шевченко А. М., Зинченко В. Д., Яковенко В. Д., Рудько Ю. М.* Прибор для криодеструкции небных миндалин . . . . . 79




Матеріал, захищений авторським правом

*Грищенко О. В.* Изменения некоторых биохимических показателей крови у женщин с дисфункциональными маточными кровотечениями под влиянием влагалищной гипотермии . . . . . 81
*Курмангалиева Д. А., Грищенко В. И., Моргулян В. Б., Муринец Б. Н., Носов М. Е.* Остановка гипотонических и атонических кровотечений в раннем послеродовом периоде с помощью криокоагулятора . . . . . 84
*Маттес Г., Хаккензелльнер Х. А., Хаммершмид Х. Р.* Низкотемпературная консервация изолированных хрящевых клеток крыс . . . . . 87
*Сандомирский Б. П., Волкова Н. А., Морозов И. А.* Исследование жизнеспособности трупной кожи человека в органной культуре . . . . . 90
*Точиловская Р. В.* Отдаленные результаты криотерапии хронических неспецифических эрозий, язв, трещин слизистой оболочки полости рта и губ . . 93
*Хаккензелльнер Х. А., Каде И., Шиммак Л.* Иммуногенность трансплантационного материала, консервированного различными методами . . . . . 94
*Хаккензелльнер Х. А., Маттес Г.* Усовершенствование метода криоконсервирования мышцы сердца . . . . . 96
*Хенох М. А., Першина В. П.* Образование гибридных ферментов под влиянием глубокого охлаждения . . . . . 98

Матеріал, захищений авторським правом

## CONTENTS


*Lozina-Lozinsky L. K.* Multifactor Theory of Cryolesion . . . . . 3
*Goldovsky A. M.* On States of Organisms at the Anabiosis Stages . . . . 6
*Smirnov I. V.* Theoretical Grounds of Deep Cooling of Animals Sperm . . . 10
*Belousova E. V., Sandomirsky B. P.* Effect of Skeen Local Cooling on the Activity of Creatine Kinase in Blood Serum and Skeletal Muscles of Albino Rats . 14
*Vishnevsky V. I., Dusheyko A. G., Markova O. P.* Bone Marrow Cells Freezing in the Supersound Field . . . . . 17
*Volina V. V., Pankov E. Ya.* Change in the Activity of a Number of Redox Enzymes in the Rat Skin under Different Temperature Effects . . . . . 21
*Glushko T. A., Markova O. P.* Proliferative Activity of Cells in the Tissue Culture after Incubation with PEO-400 . . . . . 27
*Gol'tsev A. N., Drozdova O. A.* Topography of Deconserved and Native Myelokaryocytes Migration in the Organism of Lethally Irradiated Recipients . . 29
*Gordienko A. D., Kudokotseva E. V.* Study of Functional State of Mitochondria in the Cell Suspensions Exposed to Cryoprotectant Solution . . . . . 32
*Guchok V. M.* Comparative Study of Ethylene Glycol, PEO-400 and PEO-1500 Toxicity for Rats and Mice in Early Postnatal Ontogenesis . . . . . 34
*Kuleshova L. G., Rozanov L. F.* Study on Kinetics of Human Erythrocytes Interaction with Cryoprotectants and Salts . . . . . 40
*Lugovoy V. I., Kravchenko L. P., Semenchenko O. A.* Effect of Cryoprotectants and Membrane Stabilizing Substances on Lysosomas under Freezing . . . 45
*Mitryaev A. B., Stolyarov I. V., Belous A. M.* Effect of Low Temperatures (—196°) on Structural and Functional State of Transcribing Nuclei Complex . . . 48
*Moiseev V. A., Morozova T. F., Mikulinsky Yu. E.* Effect of Salts Hyperconcentrations on the Conformation State of Horse Immunoglobulin . . . . . 51
*Pisanny O. E., Khvorostov E. D., Mkhitaryants A. M., Sandomirsky B. P.* Endoscopic Cryodestruction of Polyps in the Upper Part of Gastroenteric Tract 53
*Polyakova A. I., Votyakova I. A.* Study of Viability of Human Peripheral Blood Leucocytes at Different Stages of Low Temperature Preservation by the Method of Monolayer Cultures. Selection of Nutrient Medium . . . . . 54
*Timoshenko Yu. P., Pakhomov P. L.* Microwave Thawing of Biological Systems VII. Study of the Process of Thawing . . . . . 57
*Utevsky A. M., Chuyko V. A., Nazarova L. A.* Effect of Cooling on the Activity of Mitochondrial Monoaminozidase of Albino Rat Hearts . . . . . 61
*Tsutsaeva A. A., Popov N. N.* Effect of Transplantation of Allogenic Cryopreserved Lymphoid Cells on Survival of Irradiated Animals . . . . . 63
*Tsutsaeva A. A., Popov N. N.* Restoration of Immunic Responses in the Irradiated Organism under Transplantation of Allogenic Cryoconserved Lymphocytes 66
*Shrago M. I., Pustovoyt P. A.* Effect of Cryoprotectants Water Solutions on Rheological Properties of Blood . . . . . 69
*Babiychuk I. A., Korolev V. V., Miklyaev I. Yu., Latoguz I. K., Dyachenko V. K., Zadorozhnaya V. N.* Microcirculation State under Experimental Myocardium Infarction and Hypothermia . . . . . 73
*Babiychuk G. A., Pankov E. Ya., Makedonskya V. A., Zhygun A. I., Kosheleva O. N.* Changes in Femur Structure after Cryoeffect in the Experiment . . . . . 77
*Gladky N. I., Shevchenko A. M., Zinchenko V. D., Yakovenko V. D., Rud'ko Yu. M.* Device for Cryodestruction of Palatine Tonsils . . . . . 79
*Grishchenko O. V.* Changes of Certain Biochemical Blood Indices in Women with Disfunctional Uterine Bleeding Under Effect of Vaginal Hypothermia . . 81
*Kurmangalieva D. A., Grishchenko V. I., Morgulyan V. B., Murinets B. N., Nosov M. E.* Arrest of Hypotonic and Atonic Bleedings in Early Postnatal Period by Means of Cryocoagulator . . . . . 84
*Mattes G., Hackenseliner H. A., Hammeschmid H. R.* Low-temperature Preservation of Isolated Cartilage Cells in Rats . . . . . 87




Матеріал, захищений авторським правом

*Sandomirsky B. P., Volkova N. A., Morozov I. A.* Study of Viability of Human Cadaverous Skin in Organ Culture . . . . . 90
*Tochilovskaya R. V.* Remote Results of Cryotherapy of Chronic Nonspecific Erosions, Ulcera, Fissures of Mucous Membrane in Mouth Cavity and Lips . 93
*Hackensellner H. A., Kaden I., Schimmak L.* Immunogeneity of Transplantation Material Preserved by Different Methods . . . . . 94
*Hackensellner H. A., Matthes G.* Improvement of the Method of Myocardium Cryopreservation . . . . . 96
*Khenokh M. A., Pershina V. P.* Formation of Hybrid Enzymes under Effect of Deep Cooling . . . . . 98



Матеріал, захищений авторським правом

КРИОБИОЛОГИЯ И КРИОМЕДИЦИНА. ВЫПУСК 7

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

Редакторы *Е. Т. Тальнова, А. И. Гукова.* Художественный редактор *А. В. Косяк.*
Технический редактор *А. М. Капустина.* Корректор *Т. Я. Чорная.*

Информ. бланк № 3700

Сдано в набор 25. 12. 79. Подп. в печ. 28. 08. 80. БФ 00150. Формат 70×108/16.
Бумага типогр. № 3. Лит. гарн. Выс. печ. Усл. печ. л. 10,5. Уч.-изд. л. 10,66. Тираж 1000 экз.
Заказ 3030. Цена 1 руб. 60 коп.

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

Областная книжная типография Львовского областного управления по делам издательств, полиграфии и книжной торговли. Львов, Стефаника, 11.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.536.48.047

**Мультифакторная теория криоповреждения** / Лозина-Лозинский Л. К. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 7, с. 3—6.

Рассматривается роль сочетаний различных физических факторов (вне и внутриклеточной кристаллизации, переохлаждения и его продолжительности и др.) с биологическими характеристиками клеток и простейших, определяющих в итоге резистентность к холоду. Подчеркивается, что в течение всего процесса охлаждения-отогревания происходит смена факторов, воздействующих на клетку.

Высказанные положения следует учитывать при изучении механизмов криоповреждения.

Ил. 1. Библиогр.: 11 назв.

УДК 57:536.48.047

**О состояниях организмов на стадиях анабиоза** / Голдовский А. М. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 7, с. 6—10.

Излагаются основные теоретические положения учения о состояниях организмов и делаются выводы об их отношении к криобиологии.

Библиогр.: 15 назв.

УДК 57.043.591.463.1:612.014.462.2

**Теоретические основы глубокого охлаждения спермы животных** / Смирнов И. В. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 7, с. 10—14.

Предлагается оригинальная теория глубокого охлаждения спермы животных, в основе которой лежит представление о возможности и полезности одновременного (точнее, почти одновременного) протекания процессов кристаллического замерзания и витрификации (или мелкокристаллического затвердевания) в охлаждаемой сперме. При оптимальных (не слишком быстрых, но и не слишком медленных) режимах охлаждения в межклеточной жидкости начинается образование кристаллов льда. Вокруг клеток образуются неразмерзшие ячейки, содержащие концентрированные растворы солей и сахаров, под действием которых из спермиев извлекается свободная и слабо связанная вода и остается лишь связанная, переходящая в стеклообразное состояние. Экспериментально доказано, что при переходе спермиев в анабиотическое состояние значительно возрастает их устойчивость к гипертоническим растворам.

Библиогр.: 9 назв.

УДК 57.043:577.15

**Влияние местного охлаждения кожи на активность креатинкиназы в сыворотке крови и скелетной мышце белых крыс** / Белоусова Е. В.,Сандомирский Б. П. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 7, с. 14—17.

Статья посвящена выяснению действия низких температур на активность креатинкиназы в мышцах и сыворотке крови. Установлено, что наиболее четкие различия в активности фермента выявляются в ранние сроки после воздействия. Увеличение свободной активности фермента в мышце сочетаются со снижением дополнительной активности и выходом креатинкиназы в кровь. Обсуждается повреждающее действие холода.

Табл. 1. Библиогр.: 10 назв.

УДК 57:536.48.047

**Замораживание клеток костного мозга в ультразвуковом поле** / Вишневский В. И., Душейко А. Г., Маркова О. П. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 7, с. 17—21.

Изучалось направленное воздействие ультразвуковых колебаний терапевтического диапазона частот (соответственно 880 и 2640 кГц) на клетки костного мозга человека и крыс в процессе их замораживания. Показано, что замораживание клеточных суспензий костного мозга в ультразвуковом поле способствует повышению сохранности живых ядросодержащих клеток. Выявлена оптимальная область интенсивностей ультразвука (0,4—1,0 Вт/см$^2$).

Ил. 1. Табл. 2. Библиогр.: 6 назв.



Матеріал, захищений авторським правом

УДК 611.77—018:612.014.43

**Изменение активности ряда окислительно-восстановительных ферментов в коже крыс при различных температурных воздействиях** / Волина В. В., Панков Е. Я. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 7. с. 21—27.

Статья посвящена вопросу изучения динамики ферментативных процессов в нормальной и патологически измененной в результате термического ожога кожи при действии низких температур.

Установлено, что наиболее устойчивыми к действию низких температур являются эпителиальные клетки. Менее сохранны клетки соединительной ткани — фибробласты и эндотелий капилляров. Из изученных ферментов наиболее криостабильными оказались НАД- и НАДФ-диафоразы.

Ил. 3. Библиогр.: 19 назв.

УДК 541.49:576.3:57.083

**Пролиферативная активность клеток в культуре ткани после инкубации с ПЭО-400** / Глушко Т. А., Маркова О. П. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 7. с. 27—29.

Изучали пролиферативную активность культуры клеток китайского хомячка после 30 мин и 4 ч инкубации с ПЭО-400 в 2,5 и 5%-ной конечной концентрации. Анализ показал, что через 2 ч роста клеток после 30 мин инкубации митотический индекс (МИ) достоверно снижался в культурах только после контакта с ПЭО-400 в 5%-ной концентрации. После 4 ч инкубации МИ значительно снижался в культурах, культивируемых как с 2,5%-ным так и с 5%-ным ПЭО-400. Через 24 ч роста после отмывания клетки китайского хомячка восстанавливали митотическую активность.

Делается вывод, что использованные в работе концентрации ПЭО-400 не вызывают необратимых нарушений пролиферации клеток.

Табл. 1. Библиогр.: 5 назв.

УДК 57.043.616:419.089.843:612.119

**Топография расселения деконсервированных и нативных миелокариоцитов в организме облученных реципиентов** / Гольцев А. Н., Дроздова О. А. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 7, с. 29—32.

Проведено изучение топографии расселения и пролиферативной активности деконсервированных и нативных миелокариоцитов в организме летально облученных реципиентов. Показано, что деконсервированные миелокариоциты, как и нативные, приживляются и пролиферируют в организме летально облученного реципиента, дифференцируясь в миелоидный и лимфоидный росток кроветворения. Топография расселения деконсервированных миелокариоцитов не отличалась от аналогичных свойств нативных, хотя в ранние сроки (5 сут) процент клеток донорского типа был ниже в костном мозге, селезенке, лимфоузлах реципиентов с деконсервированным трансплантатом. что, по-видимому, связано с более низкой пролиферативной активностью деконсервированных миекариоцитов в ранние сроки после пересадки.

Ил. 2. Библиогр.: 7 назв.

УДК 577.158.1.612.26.547.422

**Изучение функционального состояния митохондрий в клеточных суслензиях, экспонированных в растворе криопротектора** / Гордиенко А. Д., Кудокоцева Е. В. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 7, с. 32—34.

Полярографическим методом проведено сравнительное изучение дыхательной активности на эндогенных и экзогенных субстратах суспензии лимфоидных клеток и изолированных клеток печени. Показано, что при хранении суспензий клеток при температуре от +2 до +4° С ко 2-м сут развиваются процессы, ведущие к нарушению дыхательной активности клеток (понижение степени сопряжения окисления и фосфорилирования); 15-минутная инкубация клеток с 10%-ным ПЭГ-400 в конечной концентрации не оказывает существенного влияния на дыхательную активность этих клеток.

Ил. 1. Табл. 1. Библиогр.: 3 назв.



Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043.615.9

**Сравнительное исследование токсичности этиленгликоля, ПЭО-400 и ПЭО-1500 для крыс и мышей в раннем постнатальном онтогенезе** / Гучок В. М. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 7, с. 34—40.

Установлено, что ПЭО-400, ПЭО-1500 и этиленгликоль при однократном введении крысам и мышам во все периоды их раннего постнатального онтогенеза проявляют себя как малотоксичные вещества. ДЛ-50 ПЭО-400 и ПЭО-1500 для крыс и мышей в зависимости от возраста колеблется в диапазоне соответственно 7,69 — 20,2 г/кг и 6,93—20,68 г/кг, этиленгликоля — 5,75—10,72 г/кг. Изменения выносливости животных к изученным веществам носят фазный характер и находятся в зависимости от периодов их постнатального развития и особенностей химической структуры криопротекторов. Видовые различия выносливости остаются невыраженными.

Выявленные колебания токсичности ПЭО-400 и ПЭО-1500 с фазами снижения и повышения ее должны учитываться при использовании веществ в детской клинической практике и экспериментальных исследованиях.

Ил. 2. Табл. 3. Библиогр.: 16 назв.

УДК 57:536.48.047:542.65

**Изучение кинетики взаимодействия эритроцитов человека с криопротекторами и солями** / Кулешова Л. Г., Розанов Л. Ф. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 7, с. 40—44.

Методом световой микроскопии с использованием кинематографической регистрации процессов изучена кинетика взаимодействия криопротекторов (глицерин, ПЭО-100, ПЭО-400, ПЭГ-1500, ПЭО-1500) и солей (NaCl, лимоннокислый Na) различной концентрации с эритроцитами человека. Показано, что размер и форма эритроцитов зависят от вида и осмотических свойств исследуемых растворов. Установлено, что реакция клеток на введение гипертонических растворов состоит из двух стадий.

Ил. 4. Библиогр.: 3 назв.

УДК 576.311.34.591.044.3

**Влияние криопротекторов и мембранстабилизирующих веществ на лизосомы при замораживании** / Луговой В. И., Кравченко Л. П., Семенченко О. А. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 7, с. 45—48.

Статья посвящена вопросу изучения эффективности криопротекторов глицерина и оксиэтилированного глицерина на стабильность лизосом при замораживании. Исследовалась также возможность усиления защитного действия криопротекторов путем сочетанного их применения со стероидными гормонами. Установлено, что наиболее высоким показателем эффективности криозащиты обладает оксиэтилированный глицерин. Из изученных мембранстабилизирующих соединений дексаметазон в сочетании с ОЭГ более эффективен при замораживании лизосом до —196° С.

Табл. 3. Библиогр.: 12 назв.

УДК 57:536.48.047:547.96

**Действие низких температур (—196° С) на структурно-функциональное состояние транскрибирующего комплекса ядер** / Митряев А. Б., Столяров И. В., Белоус А. М. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 7, с. 48—50.

Исследовано действие медленного (0,5—1,5° С/мин) и быстрого (300—400° С/мин) режимов замораживания на структурно-функциональные свойства изолированной ДНК и хроматина. Показано, что замораживание ДНК не приводит к изменению ее матричной активности в РНК-полимеразной системе при обоих режимах замораживания. В то же время быстрое замораживание до температуры —196° С вызывает нарушение структурно-функциональной целостности хроматина, выражающейся в изменении оптических свойств этих макромолекул и угнетении матричной активности.

Табл. 1. Библиогр.: 11 назв.

УДК 574.96:543.42:541.49

**Влияние гиперконцентраций солей на конформационное состояние иммуноглобулина лошади** / Моисеев В. А., Морозова Т. Ф., Микулинский Ю. Е. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 7, с. 51—52.

Методами спектрофотометрии изучалось влияние гиперконцентрации солей на конформационное состояние иммуноглобулина лошади. Установлены значения гиперконцентраций солей, при которых происходят конформационные переходы иммуноглобулина. Обсуждены особенности влияния различных солей на состояние иммуноглобулина.

Библиогр.: 4 назв.



Матеріал, захищений авторським правом

УДК 615.832.9:616.3

**Эндоскопическая криодеструкция полипов верхнего отдела желудочно-кишечного тракта** / Писанный О. Е., Хворостов Е. Д., Мхитарьянц А. М., Сандомирский Б. П. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 7, с. 53.

Описывается методика и положительный эффект применения криодеструкции полипов верхнего отдела желудочно-кишечного тракта специальным устройством через фиброгастроскоп.

УДК 57.043:612.112—085.23

**Изучение жизнеспособности лейкоцитов периферической крови человека на различных этапах низкотемпературного консервирования методом монослойных культур. I. Выбор питательной среды** / Полякова А. И., Вотякова И. А. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 7, с. 54—57.

Для оценки биологической полноценности клеток, подвергнутых замораживанию-оттаиванию, одним из наиболее перспективных тестов является культивирование ткани. Изучение особенностей монослойной культуры лейкоцитов крови в течение двухнедельного культивирования в различных питательных средах позволило выбрать оптимальную среду, которая состоит из 70% среды 199, 20% инактивированной человеческой сыворотки АВО и 10% аминопептида.

Ил. 1. Библиогр.: 2 назв.

УДК 57.043:612.014.424.5

**Размораживание биологических объектов СВЧ-энергией. VII. Исследование процесса плавления** / Тимошенко Ю. П., Пахомов П. Л. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 7, с. 57—61.

Изложены результаты приближенной оценки продолжительности процесса размораживания биообъектов. Рассмотрен способ улучшения равномерности нагрева в области плавления вещества и регулируемости процесса размораживания путем введения проводящих частиц. Показано, что управление процессом лучше осуществлять путем регулирования числа вводимых частиц.

УДК 57.043.577.15:576.347

**Влияние охлаждения на активность митохондриальной моноаминоксидазы сердца белых крыс** / Утевский А. М., Чуйко В. А., Назарова Л. А. — Криобилогия и криомедицина, 1980, вып. 7, с. 61—63.

Исследована активность по отношению к тирамину, 5-окситриптамину, и бензиламину митохондриальной моноаминоксидазы сердца белых крыс после его предварительного выдерживания в течение 60 мин при различных температурах (37; 20; 4; 0; —10; —20° С). Показано, что экспозиция при —10° С и —20° С приводит к значительному активированию фермента по отношению к тирамину и 5-окситриптамину, но не бензиламину. Добавление в качестве криопротектора ПЭО-400 при замораживании не предотвращает активирования моноаминоксидазы.

Табл. 2.

УДК 616.155.3:615.014.41:616—001.28

**Влияние трансплантации аллогенных криоконсервированных лимфоидных клеток на выживаемость облученных животных** / Цуцаева А. А., Попов Н. Н. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 7, с. 63—66.

В экспериментах на мышах-гибридах (СВА×С57BL)$F_1$, облученных ЛД 100/15, защищенных сингенным криоконсервированным костным мозгом, показано, что трансплантация аллогенных криоконсервированных лимфоцитов значительно усиливает гуморальные и клеточные иммунные реакции организма.

Табл. 2. Библиогр.: 7 назв.

УДК 616.155.3:615.014.41:616—001.28

**Восстановление иммунных реакций в облученном организме при трансплантации аллогенных криоконсервированных лимфоцитов** / Цуцаева А. А., Попов Н. Н. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 7, с. 66—69.

В экспериментах на мышах-гибридах (СВА×С57BL)$F_1$, облученных ЛД 100/15, защищенных сингенным криоконсервированным костным мозгом, показано, что трансплантация аллогенных криоконсервированных лимфоцитов значительно усиливает гуморальные и клеточные иммунные реакции организма.

Ил. 1. Табл. 1. Библиогр.: 14 назв.



Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043.612.1

**Влияние водных растворов криопротекторов на реологические свойства крови** / Шраго М. И., Пустовойт П. А. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 7, с. 69—73.

Основным преимуществом полиэтиленоксида, обеспечивающим возможность его широкого применения как криопротектора, наряду с выраженными криозащитными свойствами является низкая токсичность.

Влияние 20%-ных водных растворов криопротекторов на вязкость систем «кровь + водный раствор криопротектора» зависит от скорости течения, молекулярной массы и содержания его в крови. Водные растворы криопротекторов с большой молекулярной массой (ПЭО-2 000, ОЭГ, $n=30$) при увеличении напряжения (скорости) сдвига (от 3 до 8,49 дин/см$^2$) увеличивают вязкость систем, низкомолекулярные — понижают ее относительно контроля. При малых напряжениях сдвига (до 3 дин/см$^2$) высокомолекулярные криопротекторы (ПЭО-2 000, ОЭГ, $n=30$) не увеличивают, низкомолекулярные (ПЭО-400) понижают вязкость систем в резведениях 10 : 1, 4 : 1.

С увеличением молекулярной массы криопротектора и его содержания в крови замедляется скорость оседания эритроцитов.

Ил. 3. Библиогр.: 5 назв.

УДК 57.043.616.127—005.8:616.832.9

**Состояние микроциркуляции при экспериментальном инфаркте миокарда и гипотермии** / Бабийчук Г. А., Микляев И. Ю., Королев В. В., Задорожная В. Н., Латогуз И. К., Дьяченко В. К. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 7, с. 73—77.

Представлены результаты исследований сосудистого русла конъюнктивы склеры при экспериментальном инфаркте миокарда, гипотермии и их сочетании. Показано, что при сочетании сформировавшегося инфаркта миокарда и гипотермии (30—28° С) возникают существенные изменения микроциркуляторного русла, приводящие к сосудистой проницаемости, эритростазам в венозных отрезках, образованию плотных агрегаций эритроцитов. Выявлена необходимость применения при экспериментальном инфаркте миокарда гипотермии в сочетании с фармакологической коррекцией нарушений микроциркуляторного русла.

Ил. 3. Библиогр.: 7 назв.

УДК 57.043:611.718.4:616—001—19

**Изменение структуры бедренной кости после криовоздействия в эксперименте** / Бабийчук Г. А., Панков Е. Я., Македонская В. А., Кошелева О. Н., Жигун А. И. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 7, с. 77—79.

Представлены изменения структуры бедренной кости крыс после воздействия парами жидкого азота (—196° С) через 1—8 недель. Через неделю после криовоздействия происходили некротические изменения хондроцитов, не распространяющиеся глубже замыкательной костной пластинки. На протяжении сроков наблюдения от 2 до 8 недель криоизмененный хрящ не подвергался существенным изменениям, не отторгался, а определялось прорастание фибробластами хрящевого вещества и формирование слоя новообразованного хряща.

Библиогр.: 5 назв.

УДК 57:536.48:048:622.234.6

**Прибор для криодеструкции небных миндалин** / Гладкий Н. И., Шевченко А. М., Зинченко В. Д., Яковенко В. Д., Рудько Ю. М. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 7, с. 79—80.

Приводится описание конструкции прибора для криодеструкции небных миндалин у больных хроническим тонзиллитом. Особенностью прибора является его автономность наличие в охлаждаемой действующей части наконечника нагревателя для быстрого отделения от замороженной ткани. Клинические испытания, проведенные у 16 больных с хроническим тонзиллитом, показали его надежность в работе. Для замораживания одной миндалины достаточно контакта с наконечником в течение 2—3 мин, отогрев продолжается до 30 с.

Ил. 1. Библиогр.: 10 назв.



Матеріал, захищений авторським правом

УДК [618.14—005.1:615.832.9—08]:612.015

**Изменения некоторых биохимических показателей крови у женщин с дисфункциональными маточными кровотечениями под влиянием влагалищной гипотермии** / Грищенко О. В. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 7, с. 81—84.

Изучены терапевтические возможности нового в гинекологической практике метода лечения дисфункциональных маточных кровотечений влагалищной гипотермией. Анализировалась динамика показателей свертывающей системы крови, белкового состава сыворотки, а также уровень в ней прогестерона. Установлено, что влагалищная гипотермия не оказывает неблагоприятного воздействия на организм. У большинства больных достигнут стойкий гемостатический эффект, происходит нормализация показателей коагулограмм и протеинограмм. На основании исследования уровня прогестерона в крови и данных кольпоцитограмм в динамике, можно заключить, что в организме нормализуется процесс овуляции в яичниках, который способствует гемостазу.

Библиогр.: 17 назв.

УДК 618.14—005.1—089:615.832.9:618.7

**Остановка гипотонических и атонических кровотечений в раннем послеродовом периоде с помощью криокоагулятора** / Курмангалиева Д. А., Грищенко В. И., Моргулян В. Б., Муринец Б. Н., Носов М. Е. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 7, с. 84—86.

Приведены данные успешной борьбы с гипотоническим и атоническим кровотечением у 11 родильниц с помощью криокоагулятора. В качестве хладагента использована закись азота. Так как общепринятые методы остановки кровотечения (ручное обследование полости матки, массаж матки на кулаке) дали временный эффект, то окончательная остановка кровотечения наступила после криовоздействия на матку. В последующем отмечены благоприятные ближайшие и отдаленные результаты, нарушений овариально-менструальной и детородной функций у женщин не было.

Библиогр.: 10 назв.

УДК 57.043

**Низкотемпературная консервация изолированных хрящевых клеток крыс** / Маттес Г., Хаккензелльнер Х. А., Хаммершмид Х. Р. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 7, с. 87—90.

Представлена методика выделения изолированных хрящевых клеток из костей крыс и их консервирование под защитой ДМСО, позволившая получить 36,4% жизнеспособных клеток. Указывается необходимость дальнейшего усовершенствования методики замораживания хрящевых клеток, которые могут быть использованы для экспериментальных и клинических целей.

Ил. 2. Табл. 3. Библиогр.: 13 назв.

УДК 612.79.085.23

**Исследование жизнеспособности трупной кожи человека в органной культуре** / Сандомирский Б. П., Волкова Н. А., Морозов И. А. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 7, с. 90—93.

Изучались показатели роста трупной кожи человека в органной культуре как критерий жизнеспособности исходного материала. Установлено, что гипотермическое хранение (+4°) нативной трупной кожи на протяжении 6—30 ч обеспечивает хорошие показатели ее роста в культуре.

Ил. 1. Табл. 1. Библиогр.: 4 назв.

УДК 57.043.531.62:13.62:218.2

**Отдаленные результаты криотерапии хронических неспецифических эрозий, язв, трещин слизистой оболочки полости рта и губ** / Точиловская Р. В. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 7, с. 93—94.

Прослежены отдаленные (до 3 лет) результаты криотерапии хронических неспецифических эрозий, язв, трещин слизистой оболочки полости рта и губ. Под наблюдением находилось 96 больных. Всем больным лечение проводилось с помощью криооросителя КАС-01. Положительные результаты наблюдались у 93 человек, что свидетельствует о высокой эффективности данного метода при лечении указанной патологии.



Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043

**Иммуногенность трансплантационного материала, консервированного различными методами** / Хаккензелльнер Х. А., Каде И., Шиммак Л. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 7, с. 94—95.

В экспериментах на линейных мышах изучали зависимость иммуногенности деконсервированной кожи от ее жизнеспособности. Выяснены условия консервирования, обеспечивающие сохранение жизнеспособности, а также режимы консервации, снижающие иммуногенность.

Табл. 2. Библиогр.: 6 назв.

УДК 57.043

**Усовершенствование метода криоконсервирования мышцы сердца** / Хаккензелльнер Х. А., Маттес Г. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 7, с. 96—98.

Исследовано влияние замораживания фрагментов сердечной мышцы взрослых крыс до —196° С под защитой 3,1 М раствора ДМСО. Модифицированная среда Кребса—Хензеляйта, обогащенная $K^+$, $Ca^{2+}$, $M^{2+}$, позволяет сохранять свойства фрагментов на 38%; среда, содержащая глюкозу, аденозин, ксилит, пируват, АТФ и селенит натрия сохраняла еще более высокий процент сокращающихся фрагментов. Обращается внимание на то, что при замораживании играют роль не только криопротекторы, но и состав среды.

Табл. 1. Библиогр.: 11 назв.

УДК 57:577.151/158.577.152

**Образование гибридных ферментов под влиянием глубокого охлаждения** / Хенох М. А., Першина В. П. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 7, с. 98—101.

Сообщаются результаты, полученные при действии глубокого охлаждения (—78° С) на водные растворы ферментов: лизоцима, РНК-азы, а также их смеси. Показано, что при замораживании отдельных белков образуется высокомолекулярная фракция, сохраняющая ферментативную активность. При замораживании смеси белков происходила их гибридизация. Был получен гибрид: лизоцим — РНК-аза. Гибрид сохранял активность входящих в него компонентов. Установлено, что в образовании криогибрида принимали участие —S—S-связи.

Ил. 2. Табл. 2. Библиогр.: 14 назв.

UDC 57.536.48.047

**Multifactor Theory of Cryolesion** / Lozina-Lozinsky L. K. — Kriobiologia i kriomeditsina, 1980, iss. 7, p. 3—6.

The paper deals with the role of different physical factor combinations (extra- and intracellular crystallization, supercooling and its duration, etc.) with biological characteristics of cells and Protozoa determining cold resistance. It is emphasised that during the whole proces of freezing and thawing the factors affecting the cell are alternating.

The expressed propositions should be considered when studying the mechanisms of cryolesion.

1 fig. Refs: 11 titles.

UDC 57:536.48.047

**On States of Organisms at the Anabiosis Stages** / Goldovsky A. M. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1980, iss. 7, p. 6—10.

The main theoretical suppositions of the teaching on the organism states are presented and the conclusions are made on their relation to cryobiology.

Refs: 15 titles.

UDC 57.043.591.463.1:612.014.462.2

**Theoretical Grounds of Deep Cooling of Animals Sperm** / Smirnov I. V. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1980, iss. 7, p. 10—14.

An original theory of animal sperm deep cooling is suggested based on the idea on the possibility and usefulness of simultaneous (or almost simultaneous) proceeding of the processes of crystal freezing and vitrification (or fine-crystalline solidification) in the sperm under cooling. Under optimal (not too rapid and not too slow) conditions of cooling there occurs ice crystal nucleation in the intercellular fluid. The frozen alveoles are formed around the cells, they contain concentrated solutions of salts and sugars under effect of which the free and weakly bound water is extracted from sperm and only bound water remains turning into vitreous state. It is proved experimentally that with sperm transition to anabiotic state their stability to hypertonic solutions considerably increases.

Refs: 9 titles.



Матеріал, захищений авторським правом

UDC 57.043:577.15

**Effect of Skin Local Cooling on the Activity of Creatine Kinase in Blood Serum and Skeletal Muscles of Albino Rats** / Belousova E. V., Sandomirsky B. R. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1980, iss. 7, p. 14—16.

The paper is devoted to finding out the effect of low temperatures on the creatine kinase activity in muscles and blood serum. It is established that the most pronounced distinctions in the enzyme activity are revealed in the early time after the action. The enzyme free activity in the muscle increases with the decrease of additional activity and creatine kinase entering into blood. The damaging effect of cold is discussed.

1 table. Refs: 10 titles.

UDC 57:536.48.047

**Bone Marrow Cells Freezing in the Supersound Field** / Vishnevsky V. I., Dusheyko A. G., Markova O. P. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1980, iss. 7, p. 17—21.

The directed effect of supersound vibrations of therapeutic frequency range (880 and 2640 kHz) on the human and rat bone marrow cells was studied in the process of freezing. It is shown that freezing of bone marrow cell suspensions in the supersound field promotes increasing preservation of living nucleus-containing cells. The optimal range of supersound intensities (0.4-1.0 Wt/cm$^2$) is found.

1 fig., 2 tables. Refs: 6 titles.

UDC 611.77—018:612.014.43

**Change in the Activity of a Number of Redox Enzymes in the Rat Skin under Different Temperature Effects** / Volina V. V., Pankov E. Ya. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1980, iss. 7, p. 21—27.

Dynamics of enzymic processes occurring in normal skin and in that pathologically changed as a result of thermal burn was studied under effect of low temperatures. It is established that the epithelial cells are most stable to the effect of low temperatures. The cells of connective tissue, fibroblasts and capillary endothelium, are less preservable. NAD and NADP-diaphorases proved to be most cryostable among the studied enzymes.

3 figs. Refs: 19 titles.

UDC 541.49:576.3:57.083

**Proliferative Activity of Cells in the Tissue Culture after Incubation with PEO-400/** Clushko T. A., Markova O. P. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1980, iss. 7, p. 27—29.

Proliferative activity of Chinese hamster cell culture was studied after 30 min- and 4 hrs-incubation with PEO-400 in 2.5 and 5% finite concentration. The analysis showed that in 2 hrs of cells growth after 30 min-incubation MI decreased reliably in the cultures only after the contact with PEO-400 in 5% concentration. After 4 hrs-incubation MI considerably decreased in the cultures cultivated with both 2.5% concentration of PEO-400 and with 5% one. 24 hrs of growth after washing out the cells of Chinese hamster restored their mitotic activity. A conclusion is made that the PEO-400 concentrations used in the work do not evoke irreversible damages in cells proliferation.

1 table. Refs: 5 titles.

UDC 57.043.616:419—089.843:612.119

**Topography of Deconserved and Native Myelokaryocytes Migration in the Organism of Lethally Irradiated Recipients** / Gol'tsev A. N., Drozdova O. A. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1980, iss. 7, p. 29—32.

The topography of migration and proliferative activity of deconserved and native myelokaryocytes were studied in the organism of lethally irradiated recipients.

The results of the investigations showed that both deconserved and native myelokaryocytes get implanted and proliferate in the organism of the lethally irradiated recipient differentiating into myeloid and lymphoid types of hemopoiesis. The topography of deconserved myelokaryocytes migration did not differ from the analogous properties of native ones though in the early time (5 days) the percentage of the donor type cells was lower in the bone marrow, spleen, lymph nodes of recipients with deconserved transplant, which is apparently a result of the low proliferative activity of deconserved myelokaryocytes in early time after implantation.

2 figs. Refs: 7 titles.



Матеріал, захищений авторським правом

UDC 577.158.1.612.26.547.422

**Study of Functional State of Mitochondria in the Cell Suspensions Exposed to Cryoprotectant Solution** / Gordienko A. D., Kudokotseva E. V. — Kriobiologia i kriomeditsina, 1980, iss. 7, p. 32—34.

A comparative study of respiratory activity was carried out by polarographic method on endogenic and exogenic substrates of suspension of lymphoid cells and isolated liver cells. It is shown that when preserving cells suspensions at the temperature of 2—4° C the processes leading to the destruction of cells respiratory activity (the decrease in the conjugation degree of oxidation and phosphoryllation) develop by the 2nd day. The 15-minute cell incubation with 10% PEO-40 in final concentration has no essential effect on the respirative activity of these cells.

1 fig. 1 table. Refs: 3 titles.

UDC 57.043.615.9

**Comparative Study of Ethylene Glycol, PEO-400 and PEO-1500 Toxicity for Rats and Mice in Early Postnatal Ontogenesis** / Guchok V. M. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1980, iss. 7, p. 34—40.

It is estblished that PEO-400, PEO-1500 and ethylene glycol with a single introduction to rats and mice postnatal ontogenesis manifest themselves as substances of low toxicity. LD-50 of PEO-400 and PEO-1500 for rats and mice varies depending on the age within the range of 7.69-20.2 and 6.93-20.68 g/kg. respectively, that of ethylene glycol — 5.75-10.72 g/kg. Changes in animals entolerance to the studied substances are of phase character and depend on the periods of their postnatal development and peculiarites of chemical structure of cryoprotectants. Species differences of entolerance remain unexpressed.

The found variations of PEO-400 and PEO-1500 toxicity witn the phase of its lowering and rising must be considered when using the substances in infantile clinical practice and experimental studies.

2 fig., 3 tables. Refs: 16 titles.

UDC 57:536.48.047:572.65

**Study in Kinetics of Human Erythrocytes Interaction with Cryoprotectants and Salts** / Kuleshova L. G., Rozanov L F. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1980, iss. 7, p. 40—44.

The interaction kinetics of cryoprotectants (glycerol, PEO-100, PEO-400. PEG-1500, PEO-1500) and salts (NaCl, sodium citrate) of different concentration with human erythrocytes is studied by the method of light microscopy using cinematographic registration of the processes. It is shown that the dimension and shape of erythrocytes depend both on the type and osmotic properties of solutions under study. It is established that cell response to the administration of hypertonic solutions consists of two stages.

4 figs. Ref: 3 titles.

UDC 576.311.34.591.044.3

**Effect of Cryoprotectants and Membrane Stabilizing Substances on Lysosomes under Freezing** / Lugovoy V. I., Kravchenko L. P., Semenchenko O. A. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1980, iss. 7, p.

The paper is concerned with the effect of cryoprotectants (glycerol and oxyethylated glycerol) on lysosomes stability during freezing. A possibility of strengthening the protective effetc of cryoprotectants by means of their combined application with steroid hormones was studied.

It is established that oxyethylated glycerol possesses the highest index of cryoprotection efficiency. Of all the studied membrane stabilizing compounds dexametason in combination with OEI was most efficient in lysosomes freezing up to —196° C.

3 tables. Refs: 12 titles.

UDC 57:536.48.047:547.96

**Effect of Low Temperatures (—196° C) on Structural and Functional State of Transcribing Nuclei Complex** / Mitryaev A. B., Stolyarov I. V., Belous A. M. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1980, iss. 7, p. 48—50.

Effect of slow (0.5-1.5 degrees/min) and rapid (300-400 degrees/min) regimes of freezing on the structural-functional properties of isolated DNA and chromatin was studied. It is shown that freezing of DNA does not result in the change of its matrix activity in RNA-polymerase system under both regimes of freezing. At the same time rapid freezing up to the temperature of —196° C evokes destruction of structural-functional integrity of chromatin causing the changes in optical properties of these macromolecules and inhibition of matrix activity.

1 table. Refs: 11 titles.



Матеріал, захищений авторським правом

UDC 574.96:543.42:541.49

**Effect of Salts Hyperconcentrations on the Conformation State of Horse Immunoglobulin** / Moiseev V. A., Morozova T. F., Mikulinsky Yu. E. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1980, iss. 7, p. 51—52.

Effect of salts hyperconcentrations on the conformation state of horse immunoglobulin was studied by the methods of spectrophotometry. The values of salts hyperconcentrations are established under which conformation transitions of immunoglobulin take place. The peculiarities of the effect of different salts on the immunoglobulin state are discussed.

Refs.: 4 titles.

UDC 615.832.9:616.3

**Endoscopic Cryodestruction of Polyps in the Upper Part of Gastroenteric Tract** / Pisanny O. E., Khvorostov E. D., Mkhitaryants A. M., Sandomirsky B. P. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1980, iss. 7, p. 53.

The paper deals with the procedure and positive effect of cryodestruction application to polyps of the upper part of gastroenteric tract by means of a special appratus through fibrogastroscope.

UDC 57.043:612.112—085.23

**Study of Viability of Human Peripheral Blood Leucocytes at Different Stages of Low Temperature Preservation by the Method of Monolayer Cultures. Selection of Nutrient Medium** / Polyakova A. I., Votyakova I. A. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1980, iss. 7, p. 54—57.

One of the most promising tests for estimating biological value of cells subjected to freezing-thawing is tissue cultivation. Study of peculiarities of monolayer culture of blood leucocytes during two-week cultivation in different nutrient media made it possible to select the optimal nutrient medium consisting of 70% of medium 199, 20% of inactivated human serum ABO and 10% of aminopeptide.

1 fig. Refs: 2 titles.

UDC 57.043:612.014.424.5

**Microwave Thawing of Biological Systems. VII. Study of the Process of Thawing** / Timoshenko Yu. P., Pakhomov P. L. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1980, iss. 7, p. 57—61.

The paper deals with results of the approximate estimate of the bioobjects defrosting process duration. A method is considered for improving the uniformity of heating in the domain of the substance melting and for regularability of the process of defrosting by means of introducing the conductive particles. It is better to realize the process control by regulating the number of the introduced particles.

UDC 57.043.577.15:576.347

**Effect of Cooling on the Actiivty of Mitochondrial Monoaminoxidase of Albino Rat Hearts** / Utevsky A. M., Chuyko V. A., Nazarova L. A. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1980, iss. 7, p. 61—63.

Activity of mitochondrial monoamine oxidase of albino rat heart as to tyramine, 5-oxitryptamin and benzylamine was studied after heart preliminary 60 min exposure at different temperatures (37; 20; 4; 0; —10; —20° C). It is shown that exposition at —10 and —20° C results in the considerable activation of the enzyme as to tyramine and 5-oxitryptamine but not to benzylamine. Addition of ПЭО-400 as cryoprotector under freezing does not prevent from monoaminoxidase activation.

2 tables.

UDC 616.155.3:615.014.41:616—001.28

**Effect of Transplantation of Allogenic Cryopreserved Lymphoid Cells on Survival of Irradiated Animals** / Tsutsaeva A. A., Popov N. N. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1980, iss. 7, p. 63—66.

Experiments were carried out with mice-hybrids (CBA×C57 BL)$F_1$. It is shown that transplantation of allogenic cryopreserved lymphocytes increases the 60-day survival of animals irradiated by the dose of LD 50/30 by 19-22% and that of animals irradiated by the dose of LD 100/15, protected by syngenic cryopreserved bone marrow by 18-23% as compared with the animals to which lymphocytes were not introduced.

The data on the dependence of animals survival rate on the time and dose of transplanted cells are presented.

2 tables. Refs: 7 titles.



Матеріал, захищений авторським правом

UDC 616.155.3:615.014.41:616—001.28

**Restoration of Immune Responses in the Irradiated Organism under Transplantation of Allogenic Cryoconserved Lymphocytes** / Tsutsaeva A. A., Popov N. N. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1980, iss. 7, p. 66—69.

Transplantation of allogenic cryoconserved lymphocytes considerably enhances humoral and cellular immune responses of the organism as it is shown on mice-hybrids (CBA×C57BL)$F_1$ irraliated by LD 100/15 and protected by syngenic cryoconserved bone marrow.

1 fig. 1 table. Refs: 14 titles.

UDC 57.043.612.1

**Effect of Cryoprotectants Water Solution on Rheological Properties of Blood** / Shrago M. I., Pustovoyt P. A. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1980, iss. 7, p. 69—73.

Low toxicity as well as pronounced cryoprotective properties are main advantages of polyethelene oxide ensuring the possibility of its wide application as cryoprotectants.

Effect of 20% water solutions of cryoprotectors on the viscosity of systems „blood+water solution cryoprotectants depends on the flow rate, molecular mass and their contents in blood. Water solutions of cryoprotectants with great molecular mass (PEO-2000, OEG *n*-30) with the shift stress (rate) enhancement (from 3 to 8.49 din/cm²) increase the systems viscosity, low-molecular ones decrease it relative to the control. Under small shift stresses (to 3 din/cm²) high-molecular cryoprotectants (PEO-2000, OEG *n*-30) do not increase and low-molecular (PEO-400) decrease the viscosity of the systems in dilutions of 10 : 1, 4 : 1.

The molecular mass of cryoprotectants and its content in blood being increased, erythrocyte sedimentation rate slows down.

3 figs. Refs: 5 titles.

UDC 57.043.616.127—005.8:616.832.9

**Microcirculation State under Experimental Myocardium Infarction and Hypothermia** / Babiychuk G. A., Korolev V. V., Miklyaev I. Yu., Latoguz I. K., Dyachenko V. K., Zadorozhnaya V. N. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1980, iss. 7, p. 73—77.

The paper is concerned with results of the investigations of sclera conjunctive vascular bed under experimental myocardium infarction, hypothermia and their combination. It is shown that with combination of the formed myocardium infarction and hypothermia (30-28° C), essential changes of microcirculatory bed appear resulting in the vascular permeability, erythrostases in venous sections, in formation of dense aggregations of erythrocytes.

A necessity is found for application of hypothermia in combination with pharmacological correction of microcirculatory bed damages under the myocardium infarction.

3 figs. Refs: 7 titles.

UDC 57.043:611.718.4:616—001.19

**Changes in Femur Structure after Cryoeffect in the Experiment** / Babiychuk G. A., Pankov E. Ya., Makedonskaya V. A., Kosheleva O. N., Zhygun A. I. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1980, iss. 7, p. 77—79.

Changes in the structure of rat femur after the effect of liquid nitrogen vapours (—196° C) in periods from 1 to 8 weeks are presented. A week after cryoeffect the necrotic changes in chondrocytes which do not distribute deeper than the obturative cartilage substance with fibroblasts and formation of the layer of newformed cartilage was not subjected to considerable changes, was not rejected, but the intergrowth of cartilage substance with fibroblasts and formation of the layer of newformed cartilage were determined.

Refs: 5 titles.

UDC 57:536.48:048:622.234.6

**Device for Cryodestruction of Palatine Tonsils** / Gladky N. I., Shevchenko A. M., Zinchenko V. D., Yakovenko V. D., Rud'ko Yu. M. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1980, iss. 7, p. 79—80.

Construction of the device for cryodestruction of palatine tonsils in patients with chronic tonsillitis is described. The peculiarities of the device are its autonomous character and presence of a heater in the cooled acting part of the tip for its quick separation from the frozen tissue. Clinical tests in 16 patients with chronical tonsillitis showed its reliability in operation. For freezing of one tonsil the 2-3 min contact with a tip is sufficient, heating lasts for 30 s.

1 fig. Refs: 10 titles.



Матеріал, захищений авторським правом

UDC [618.14—005.1:615.832.9—08]:612.015

**Changes of Certain Biochemical Blood Indices in Women with Disfunctional Uterine Bleeding Under Effect of Vaginal Hypothermia** / Grishchenko O. V. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1980, iss. 7, p. 81—84.

The paper is concerned with studying therapeutic possibilities of the method new in gynecologic practice which is applied to cure disfunctional uterine bleedings by vaginal hypothermia. The dynamics of indices of the blood coagulating system, serum protein composition, as well as progesteron level in it were analyzed. It is established that vaginal hypothermia has no unfavourable effect on the organism. The stable hemostatic effect was achieved in most patients parallel with normalization of indices of coagulograms and proteinograms. On the basis of studying the level of progesteron in blood and the data of colpocytograms in dynamics it may be concluded that the ovulation process in ovaries promoting hemostasis is normalized.

Refs.: 17 titles.

UDC 618.14—005.1—089:615.832.9:618.7

**Arrest of Hypotonic and Atonic Bleedings in Early Postnatal Period by Means of Cryocoagulator** / Kurmangalieva D. A., Grishchenko V. I., Morgulyan V. B., Murinets B. N., Nosov M. E. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1980, iss. 7, p. 84—86.

The data of successive struggle with hypotonic and atonic bleeding in 11 puerperas by means of cryocoagulator are presented. Nitrous oxide was used as cooling agent. The generally accepted methods for bleeding arrest (manual examination of uterus cavity, uterus massage on the fist) gave temporary effect, and the final hemostasis took place only after cryoeffect on the uterus. Then favourable near and remote results are registered, no damages of ovarial-menstrual and genital function were observed in women.

Refs: 17 titles.

UDC 57.043

**Low-temperature Preservation of Isolated Cartilage Cells in Rats** / Matthes G., Hackensellner H. A., Hammerschmid H. R. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1980, iss. 7, p. 87—90.

The procedure is presented for isolating cartilage cells from rat bones and their conservation under DMSO protection which made it possible to obtain 36.4% of viable cells. The method of freezing cartilage cells which may be used for experimental and clinical purposes requires further improvement.

2 figs. 3 tables. Refs.: 13 titles.

UDC 612.79.085.23

**Study of Viability of Human Cadaverous Skin in Organ Culture** / Sandomirsky B. P., Volkova N. A., Morozov I. A. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1980, iss, 7, p. 90—93.

The indices of growth of human cadaverous skin in the organ culture were studied as the criterion of the initial material viability. It is established that hypothermal preservation (+4°) of native cadaverous skin during 6-30 hrs ensures good indexes of its growth in the culture.

1 fig. 1 table. Refs: 4 titles.

UDC 57.043.531,62:13,62:218.2

**Remote Results of Cryotherapy of Chronic Nonspecific Erosions, Ulcera, Fissures of Mucous Membrane in Mouth Cavity and Lips** / Tochilovskaya R. V. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1980, iss. 7, p. 93—94.

The remote (up to 3 years) results of cryotherapy of chronic nonspecific erosions, ulcera and fissures of mouth cavity and lips mucosa are traced. 96 patients were under observation. All patients were cured by cryoirrigator KAC-01. Positive results were observed in 93 patients and this evidences for high efficiensy of the given method in curing the mentioned pathology.

UDC 57.043

**Immunogenicity of Transplantation Material Preserved by Different Methods** / Hackensellner H. A., Kaden I., Schimmak L. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1980, iss. 7, p. 94—95.

The dependence of deconserved skin immunogenicity on its viability was studied in experiments on linear mice. The conditions of conservation providing for viability maintenance as well as regimes of conservation decreasing immunogenicity are found out.

2 tables. Refs: 6 titles.



Матеріал, захищений авторським правом

UDC 57.043

**Improvement of the Method of Myocardium Cryopreservation** / Hackensellner H. A., Matthes G. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1980, iss. 7, p. 96—98.

Freezing of myocardium fragments in adult rats up to —196° C under protection of 3.1 M solution of DMSO was studied. The Krebs-Henseleit modified medium enriched with $K^+$, $Ca^{2+}$, $M^{2+}$ permits the properties of fragments to be preserved by 38%; the medium containig glucose, adenosine, xylith, pyruvate, ATP and sodium selenite retained still higher percentage of contracting fragments. Attention is paid to the fact that not only cryoprotectants but also medium composition are significant in freezing.

1 tables. Refs: 11 titles.

UDC 57:577.151/158.577.152

**Formation of Hybrid Enzymes under Effect of Deep Cooling** / Khenokh M. A., Pershina V. P. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1980, iss. 7, p. 98—101.

The results are reported obtained when affecting water solutions of enzymes: lysozyme, RNAse as well as their mixtures by deep cooling (—78° C). It is shown that with freezing of separate proteins the high-molecular fraction is formed retaining enzymatic activity. Under freezing of proteins mixture their hybridization took place. The hybrid, lysozyme-RNAse, was obtained. The hybrid retained activity of its components. It is establitshed that -S-S-bonds took place in the hybrid formation.

2 figs. 2 tables. Refs: 14 titles.

Матеріал, захищений авторським правом

**В ИЗДАТЕЛЬСТВЕ «НАУКОВА ДУМКА»**
**В 1981 г.**
**ВЫЙДЕТ В СВЕТ КНИГА:**

**Криобиология и криомедицина.** Вып. 8. 10 л. 1 р. 50 к.

Рассматриваются результаты исследований влияния физических и химических факторов на криоконсервирование клеток крови. Освещаются некоторые стороны механизма действия криопротекторов, дана их токсифармакологическая характеристика. Описываются теплофизические параметры процесса замораживания и отогрева. Приводятся экспериментальные и клинические данные о влиянии холода на патологически измененные ткани, а также результаты трансфузий консервированной крови.

Для биологов и медиков, работающих в области криобиологии и криомедицины, а также преподавателей и студентов соответствующих факультетов.

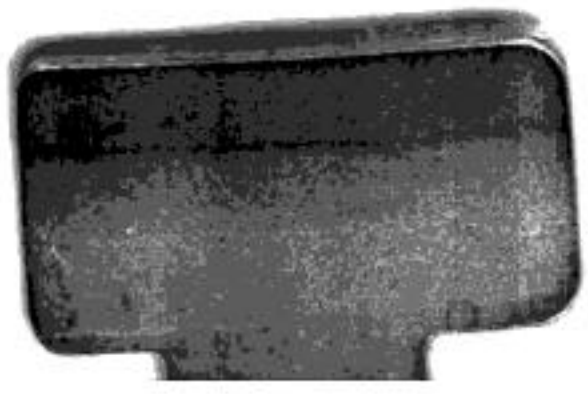
*Предварительные заказы на эту книгу принимают все магазины книготоргов, магазины «Книга—почтой» и «Академкнига».*

*Просим пользоваться услугами магазинов — опорных пунктов издательства: Дома книги — магазина № 200 (340048, Донецк-48, ул. Артема, 147а), магазина «Книжный мир» (310003, Харьков-3, пл. Советской Украины, 2/2), магазина научно-технической книги № 19 (290006, Львов-6, пл. Рынок, 10), магазина «Техническая книга» (270001, Одесса-1, ул. Ленина, 17) и магазина издательства «Наукова думка» (252001, Киев-1, ул. Кирова, 4).*

*Магазины во Львове, Одессе и Киеве высылают книги иногородним заказчикам наложенным платежом.*

Матеріал, захищений авторським правом





Матеріал, захищений авторським правом

1 р. 60 к.

«НАУКОВА ДУМКА»

Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 7, 1—120