КРИОБИОЛОГИЯ И КРИОМЕДИЦИНА

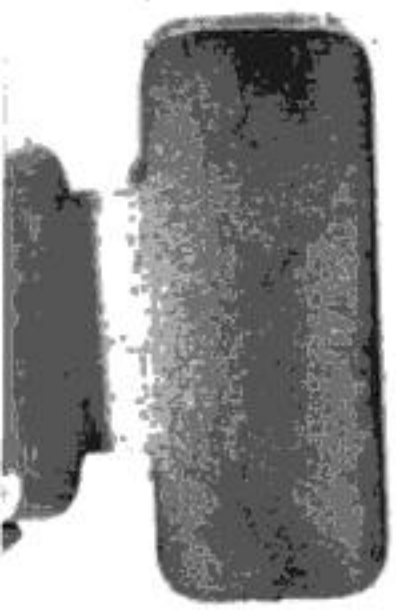
ISSN 0138-2853



13

1983

Матеріал, захищений авторським пр





Матеріал, захищений авторським правом

57.1
K82

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ И КРИОМЕДИЦИНЫ

КРИОБИОЛОГИЯ И КРИОМЕДИЦИНА

РЕСПУБЛИКАНСКИЙ МЕЖВЕДОМСТВЕННЫЙ СБОРНИК
НАУЧНЫХ ТРУДОВ

Основан в 1975 г.

ВЫПУСК
13

КИЕВ НАУКОВА ДУМКА 1983

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043

Представлены работы по исследованию механизма холодовых повреждений клеток, тканей и органов, разработке методов криоконсервации клеток. Освещены экспериментальные подходы к противоишемической защите почки в процессе гипотермической консервации, рассмотрены биохимические механизмы холодовых адаптаций организмов, физико-химические и токсикологические свойства криопротекторов. Приведены результаты терапевтического влияния холода на патологические процессы.

Для широкого круга биологов и медиков, работающих в области криобиологии и криомедицины.

Редакционная коллегия

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

Адрес редколлегии

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

НАУКОВА БІБЛІОТЕКА м. Харків

6334

Редакция межведомственных сборников

КРИОБИОЛОГИЯ И КРИОМЕДИЦИНА
Выпуск 13

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

Редактор *Т. И. Селезнева*. Художественный редактор *Р. И. Калыш*.
Технический редактор *Г. М. Терезюк*. Корректоры *Н. А. Луцкая, Э. Я. Белокопытова*

Информ. бланк № 5473.

Сдано в набор 10.10.82. Подп. в печ. 28.03.83. БФ 01670. Формат 70×108¹/₁₆. Бум. тип. № 1. Лит. гарн. Выс. печ. Усл. печ. л. 7,7. Усл. кр.-отт. 8,23. Уч.-изд. л. 8,44. Тираж 600 экз. Заказ 2—2384. Цена 1 р. 30 к.

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

Отпечатано с матриц Головного предприятия республиканского производственного объединения «Поліграфкнига», 252057, Киев-57, ул. Довженко, 3 во Львовской областной книжной типографии. Львов, Стефаника, 11. Зак. 3477.

К 4106000000-076 / M221(04)-83 457-83

© Издательство «Наукова думка», 1983

Матеріал, захищений авторським правом

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

УДК 57.043

Г. Ф. Жегунов, А. М. Белоус

РОЛЬ ЛИПИДОВ И ИОНТРАНСПОРТИРУЮЩИХ СИСТЕМ БИОМЕМБРАН В ПРОЦЕССАХ АДАПТАЦИИ ЖИВОТНЫХ К НИЗКИМ ТЕМПЕРАТУРАМ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

В последнее время вопросам изучения адаптации животных к низким температурам и природным явлениям гибернации млекопитающих уделяется большое внимание [3, 6, 11, 13, 44].

Пойкилотермные животные, не имеющие постоянной температуры тела, способны выдерживать в условиях значительных колебаний температуры окружающей среды и переносить охлаждение тела вплоть до 0° С. При таких температурах функционирование их клеток, тканей и органов остается нормальным на протяжении 3—4 месяцев, проведенных в состоянии оцепенения. Аналогичные свойства наблюдаются и у некоторых млекопитающих, способных понижать температуру своего тела во время зимней спячки почти до 0°, хотя, как известно, температура тела порядка 25—28° С является летальной для теплокровных животных. У гибернирующих млекопитающих клетки и ткани способны функционировать при температурах 1—2° С. Суслики, например, способны понижать температуру своего тела до указанных температур за довольно короткий промежуток времени. Так же быстро происходит и разогревание тела при выходе животного из состояния спячки. В состоянии гибернации при температуре 1—2° С арктический суслик способен пребывать до 6 месяцев. Как видно, у адаптирующих животных клетки тела функционируют в довольно широком диапазоне температур. По мнению многих авторов, в основе этого феномена лежат молекулярные механизмы мембранной адаптации [3, 9, 38, 46, 64], которая позволяет сохранять функцию клеток при пониженных температурах. Способность мембран клеток пойкилотермных животных и гибернаторов функционировать при пониженных температурах тела связывают с изменением липидного состава мембран и работы ионтранспортирующих систем в процессе адаптации.

Настоящий обзор посвящен вопросам роли мембранных липидов и ионных насосов биомембран у животных в процессе их холодовой адаптации.

Адаптационная роль липидов у пойкилотермных животных. Влияние окружающей температуры на структурные параметры биомембран пойкилотермных животных лучше всего изучено на различных видах рыб [3, 17—19, 24, 31—33, 38].

В работе [52] изучали изменение в структуре мембран везикулярной фракции из слизистой оболочки кишечника золотой рыбки при адаптации ее к температуре 4° С. Установлено, что спустя четыре недели адаптации в мембранах микросомальной фракции происходили изменения отношения белок/липид с 1,6 (контроль) до 1,2 без нарушения содержания нейтральных липидов и холестерина. Во фракции общих фосфолипидов увеличивалась доля фосфатидилэтаноламина, в котором повышалась пропорция $C_{22:6}$ и $C_{20:4}$ как в первой, так и во второй жирнокислотной цепочке. Количество жирнокислотных радикалов с $C_{16:0}$ и $C_{18:0}$ уменьшалось и наблюдалось переключение $C_{18:1}$ и $C_{20:1}$ из второй цепочки в первую. Увеличение уровня ненасыщенности жирнокислотных цепей фосфолипидов приводит к повышению текучести

Матеріал, захищений авторським правом

мембран, что определялось с помощью ЭПР-спинмеченых соединений [34].

При исследовании влияния низких температур на холодовую акклиматизацию форели [33] обнаружено, что в печени животных относительное количество фосфатидилэтаноламина значительно повышается во время акклиматизации, в то время как количество сфингомиэлина и кардиолипина снижается. Изучение содержания фосфатидилинозитола, лизолецитина, кардиолипина, сфингомиэлина в гепатоцитах показало, что при акклиматизации животных увеличивается количество полиненасыщенных жирных кислот при одновременном снижении уровня насыщенных жирных кислот. Повышение уровня полиненасыщенных жирных кислот во фракции фосфатидилхолина и этаноламинфосфатида во время холодовой адаптации происходило только во второй позиции фосфолипидов. При этом относительная пропорция *n*-3 и *n*-6 жирных кислот у акклиматизированных животных повышалась, тогда как пропорция *n*-9 уменьшалась. Это свидетельствует о предпочтительном включении в мембранные липиды жирных кислот, относящихся к группе линоленовых кислот.

Из полученных результатов видно, что в процессе холодовой адаптации происходит реорганизация липидного состава биологических мембран в направлении значительного повышения в фосфолипидах ненасыщенных жирных кислот. Эти данные согласуются с результатами, полученными в других экспериментальных работах [3, 17, 33, 38]. Полагают, что в результате такой перестройки липидного компонента мембран при холодовой адаптации сохраняется жидкокристаллическое состояние мембраны, обеспечивающее функционирование мембрановстроенных ферментов при пониженных температурах [3]. Представляет интерес тот факт, что липосомы, приготовленные из фосфолипидов, экстрагированных из почки форели, акклиматизированной к низким температурам (5° С), более проницаемы для таких органических молекул, как эритрол, глицерин и монамид в температурном диапазоне от 5 до 25° С, чем липосомы, приготовленные из липидов печени форели, акклиматизированной к 20° С. Это указывает на то, что изменения в составе липидов носят такой компенсаторный характер, который значительно изменяет функцию мембран. Исследование липидов мембран из мозга более чем 100 различных видов рыб [3, 33, 34, 41, 49], обитающих в теплых или холодных водах океана, показало, что именно в липидах мембран мозга наиболее четко проявляются адаптационные реакции, способствующие поддержанию основных структурно-функциональных характеристик клеток мозга. Изучение динамики содержания фосфатидилэтаноламина, фосфатидилсерина, сфингомиэлина и ганглиозидов позволило выявить некоторые закономерности этих процессов, которые свидетельствуют о том, что холоднокровные организмы реагируют на изменение температуры среды обитания переориентировкой фосфолипидного состава биомембран в направлении повышения содержания полиненасыщенных жирных кислот. Но количество основных групп фосфолипидов практически не изменяется, а увеличение количества ненасыщенных жирных кислот у холоднокровных рыб сопровождается уменьшением количества насыщенных жирных кислот, особенно стеариновой. Полагают, что липиды мембран являются такими молекулами, одной из важных биологических функций которых является уравновешивание влияния неблагоприятных условий среды на метаболическое состояние клеток и тканей. Молекулярное строение фосфолипидов, очевидно, идеально приспособлено для этих целей, так как позволяет без каких-либо нарушений в структуре молекулы изменять природу входящих в состав липида жирных кислот, что обеспечивает поддержание функционального состояния мембран и встроенных в нее ферментов. Связь между насыщенностью липидов и температурой окружающей среды была также показана на ракообразных [23]. Выяснено, что йодное число общих липидов тела изменяется у этих животных

Матеріал, захищений авторським правом

обратно пропорционально температуре среды, а точка плавления мембранных липидов поддерживается несколько ниже этой температуры.

Исследованию состояния липидов мозга при акклиматизации золотых рыбок к разным температурам посвящена работа Джонстона и Рутс [36], в которой подтверждено, что число полиненасыщенных жирных кислот липидов мозга увеличивается при более низкой температуре акклимации. Такие же закономерности обнаружены в отношении жирных кислот липидов в кишечнике золотых рыбок [38]. Было показано, что при повышении температуры тела рыб до 20° С концентрация жирных кислот 20 : 4 и 22 : 6 во фракции фосфолипидов уменьшалась в два раза, а содержание стеариновой кислоты увеличивалось в три раза. Мембраны, выделенные из тела адаптированной к холоду золотой рыбки также имели повышенный уровень полиненасыщенных жирных кислот на фоне некоторого снижения количества мононенасыщенных в зоне низких температур. При изучении влияния низких температур на синаптосомальные мембраны мозга [17] арктического бычка, обитающего при —0,3° С, рыбы из семейства карпозубых, которую содержали при 34° С, золотой рыбки, акклиматизированной к обитанию при температурах 5 и 25° С, и для сравнения млекопитающих — крысы и хомяка — показано, что у животных происходило увеличение упорядоченности жирнокислотных цепей при понижении температуры. Причем во всем диапазоне температур липиды мембран арктического бычка, по данным поляризации флуоресценции, были наиболее жидкими. Более высокая вязкость липидов мембран сохранялась в синаптосомах крысы (37° С) и рыбы, живущей при температуре 34° С. Чем больше понижалась температура окружающей среды, тем выше была пропорция ненасыщенных жирных кислот в составе мембранных структур. Следовательно, вязкостные свойства липидов биомембран во многом определяются составом жирных кислот основных классов фосфолипидов.

Таким образом, естественная и искусственная холодовые адаптации экспериментальных животных сопровождаются увеличением уровня ненасыщенных жирных кислот фосфолипидов биомембран в клетках различных тканей. Этот процесс изменения жирнокислотного состава липидов происходит всегда при понижении температуры окружающей среды, несмотря на существующую специфичность липидного состава тканей, клеток и клеточных органелл. Тем не менее в зависимости от температуры насыщенные жирные кислоты у различных видов животных, адаптирующихся к низким температурам, заменяются на радикалы различной степени ненасыщенности, что приводит к общему увеличению концентрации длинноцепочных ненасыщенных жирных кислот. При повышении температуры окружающей среды эти изменения могут развиваться в обратном направлении.

Данные о молекулярных механизмах изменения свойств мембран при температурной акклиматизации были получены при исследовании инфузорий Tetrahymena piriformis [26, 37, 48, 53], выращенных при 15 и 39,5° С. Установлено, что при понижении температуры окружающей среды относительное содержание ненасыщенных жирных кислот увеличивалось при более низких температурах, а количество стеариновой и пальмитиновой кислот уменьшалось соответственно в 4 и 1,5 раза. Изотопным методом показано, что вновь синтезируемые жирные кислоты вначале включаются в фосфолипиды мембран в виде насыщенных, а затем под действием десатураз превращаются в ненасыщенные. Причем такая перестройка мембранных липидов происходила очень быстро. В течение 5 мин 82% радиоактивной метки включалось в жирные кислоты липидов. С помощью электронной криофрактографии на сколах мембран Tetrahymena определялись равномерно распределенные белковые частицы, которые при быстром охлаждении формировали плотные участки мембран, обогащенные этими частицами либо без них. Такая агрегация мембранных частиц при охлаждении рассматривается

Матеріал, захищений авторським правом

как следствие фазовых переходов мембранных липидов при охлаждении.

В работе [48] состав и жидкостные свойства мембран Tetrahymena регулировали с помощью температуры или скармливания значительного количества ненасыщенных жирных кислот. Понижение температуры, равно как и рост на средах, обогащенных ненасыщенными жирными кислотами, приводило к увеличению содержания ненасыщенных жирных кислот в липидах мембран, что создавало их повышенную текучесть. Выращивая инфузории на средах при 15° С, а затем быстро повышая температуру до 39,5° С, определили, что жидкость липидов мембран быстро нормализуется за счет снижения активности десатураз. Полагают, что активность десатураз при этом регулируется не температурой, а степенью вязкости липидных и липид-белковых комплексов мембран. Эти факты согласуются с существующей гипотезой [37, 48] об автоматической саморегуляции жидкостности липидов мембран организмов, адаптирующихся к низким температурам.

Адаптационная роль липидов у гибернирующих животных. Известно, что некоторые гибернирующие животные, например, суслики, могут понижать температуру своего тела до 2—3° С за 2—4 ч при окружающей температуре 1—2° С. Во время выхода из спячки эти животные способны в короткий промежуток времени повысить температуру своего тела до 37° С. Таким образом, перепад температур тела, который переносят млекопитающие, составляет 34—35° С. Клетки гибернаторов, так же как и пойкилотермных животных, способны функционировать и при низкой температуре в отличие от клеток негибернирующих животных, у которых почти все процессы прекращаются уже при температуре от 10 до 15° С [47, 50]. Способность зимоспящих животных понижать температуру своего тела при сохранении основных метаболических функций органов и тканей также связана со способностью липидов мембран клеток адаптироваться к экстремальным температурам. У животных в состоянии спячки, как и у пойкилотермных, понижение температуры тела сопровождается повышением уровня ненасыщенных жирных кислот в составе липидов мембран [3, 8, 9, 28, 64]. У спящей ехидны в мембранах эритроцитов и митохондрий число ненасыщенных жирных кислот резко повышается, увеличивается количество олеиновой (18 : 1) и линолевой (18 : 2), однако снижается количество стеариновой (18 : 0) кислоты. Аналогичные изменения в мембранах клеток некоторых органов выявлены у крыс при их охлаждении [6].

Изучение состава [12] липидов в миэлине и микросомах мозга сирийского хомяка показало, что во время зимней спячки в основных классах фосфолипидов (фосфатидилэтаноламине и фосфатидилсерине) нарастал уровень олеиновой (18 : 1) и арахидоновой (20 : 4) кислот на фоне снижения содержания стеариновой (18 : 0) кислоты. Как видно, характер изменений жирнокислотного состава мембран хомячка при спячке аналогичен изменениям в составе липидов пойкилотермных животных при холодовой адаптации. При изучении изменения липидов в мембранах клеток почки сусликов при зимней спячке и в активный период [10] выявлено повышение содержания фосфатидилхолина и снижение уровня такого ненасыщенного фосфолипида, как сфингомиэлин. Подобные изменения обнаружены также на эритроцитах хомяка [42]. Указанные изменения в составе жирных кислот фосфолипидов животных оказывали влияние на вязкостные свойства мембран и в значительной мере способствовали функционированию мембрановстроенных ферментов при пониженных температурах. Приведенные данные показывают, что клетки теплокровных животных реагируют на понижение температуры, как и клетки холоднокровных животных, по одному механизму — путем изменения жирнокислотного состава липидов мембран. Важную роль при этом играет замена насыщенных жирных кислот фосфолипидов на ненасыщенные, что способствует поддержанию

Матеріал, захищений авторським правом

нарушенных холодом функций мембраны. Однако у теплокровных животных участие ненасыщенных жирных кислот в адаптивных реакциях мембран не столь выражено, как у холоднокровных особей. Согласно мнению авторов работ [9, 60], изменение насыщенности липидов, мембран не является главным фактором устойчивости гибернирующих животных к холоду, поскольку при содержании крыс и сусликов на одной и той же диете, обогащенной ненасыщенными жирными кислотами. жирнокислотный состав их мембран изменялся одинаково.

Повышение степени ненасыщенности жирных кислот липидов мембран клеток у гибернирующих животных во время спячки происходит не во всех тканях. Анализ липидов из цельного сердца суслика [11] и митохондрий из печени и сердца половозрелых и неполовозрелых сусликов [55] выявил увеличение индекса ненасыщенности (ИН) жирных кислот в этих тканях. При исследовании микросомальных фракций мозга хомяка и суслика в активном состоянии и во время спячки установлено, что ИН снижается практически во всех исследованных классах фосфолипидов — фосфатидилэтаноламине, фосфатидилхолине, фосфатидилсерине, фосфатидилинозине и сфингомиэлине [8, 28].

Изменения фазово-структурного состояния липидов и активности мембраносвязанных ферментов в зависимости от температуры хорошо выявляются на графиках Аррениуса. Изучение активности ферментов дыхательной цепи митохондрий из тканей гибернаторов в активном состоянии в координатах Аррениуса при 15—25° С показало наличие изгибов кривых, которые относили за счет фазовых превращений мембранных липидов, т. е. перехода их из жидкокристаллического состояния в гелевое. Во время спячки подобных превращений липидов не выявлено. В связи с этим предполагают, что ненасыщенные жирные кислоты, накапливающиеся в мембранах в период гибернации, препятствуют фазовым переходам липидов мембран при низкой температуре [46, 58]. Однако при изучении активности других ферментов в температурном диапазоне 15—25° С фазовых превращений липидов мембран как активных, так и гибернирующих животных, а также животных, не способных к гибернации, например крыс [16], выявлено не было. Как видно, роль фазовых превращений липидов и их связь со способностью животных к гибернации недостаточно определены. По данным калориметрии и спектроскопии, истинные фазовые превращения и полное затвердевание липидов мембран происходят обычно при температурах ниже 0° С [14]. Вполне вероятно, что липиды клеточных мембран гибернаторов способны оставаться достаточно жидкими при температурах около 0° С без изменения уровня своей ненасыщенности. Тем не менее можно заключить, что липиды и перестройки их жирнокислотного состава играют значительную роль в процессе адаптации к низким температурам, поскольку, как известно [15], для проявления оптимальной активности мембраносвязанных ферментов необходимо присутствие в окружении энзимов определенного специфического состава фосфолипидов и жирных кислот [39, 40]. Поэтому для объяснения роли липидов в холодовой приспособляемости организмов был введен термин «гомеовязкостная адаптация» [59], который означает, что организмы способны адаптироваться к температурным градиентам таким образом, что вязкость их мембран остается на постоянном уровне или изменяется так, как это необходимо для обеспечения функции ферментов.

Таким образом, липиды мембран различных органов, клеток и клеточных органелл одного и того же гибернирующего животного могут реагировать на изменение температуры по-разному. В одних клетках уровень как насыщенных, так и ненасыщенных жирных кислот может увеличиваться, в других — приспособление достигается изменением соотношения основных классов фосфолипидов и холестерина, в третьих — путем изменения асимметрии в распределении белков и липидов, в четвертых — путем «гомеовязкостной адаптации», в пятых — появлением новых классов липидов [3]. Однако какой бы характер ни носили

Матеріал, захищений авторським правом

повреждения мембран на молекулярном уровне, которые могут приводить к гибели организма при низкой температуре, основную роль в компенсации этих повреждений, очевидно, играют адаптационные свойства липидов.

Регуляция синтеза жирных кислот при адаптации животных к низким температурам. Этот вопрос освещен в литературе недостаточно полно. При изучении влияния акклиматизации к низким температурам карпов [24] с помощью ^{14}C-ацетата установлено, что содержание длинноцепочечных и полиненасыщенных жирных кислот во фракциях общих липидов очень быстро нарастало в процессе холодовой адаптации животных, т. е. рыбы могут очень быстро (и обратимо) переориентировать характер биосинтеза жирных кислот. Учитывая, что скорость перестройки биосинтеза была очень быстрой, авторы цитируемой выше работы исключают вовлечение эндокринной системы в этот процесс.

Как известно, ненасыщенные жирные кислоты образуются в организме таким образом, что вначале синтезируются насыщенные жирные кислоты 14 : 0, 16 : 0, 18 : 0 сложной ферментативной системой, находящейся в растворимой фракции цитоплазмы и состоящей из семи различных энзимов [4]. Ни митохондрии, ни эндоплазматическая сеть не способны к синтезу, например, пальмитиновой кислоты de novo. Однако эти компоненты клетки содержат ферменты, способные удлинять цепи жирных кислот, имеющих от 12 до 16 атомов углерода, а также вводить в их структуру двойные связи с помощью комплекса десатураз [3]. При охлаждении организма синтетазная система насыщенных жирных кислот резко снижает свою активность, так как у этой системы довольно высокий температурный коэффициент. Система десатураз оказывается менее чувствительной к понижению температуры [24]. Хазель [33], исследуя влияние терпературной акклимации на липидный состав печени форели, также отметил очень быстрое повышение уровня полиненасыщенных жирных кислот и снижение количества насыщенных жирных кислот. При этом определено предпочтительное включение в метаболизм линоленовой кислоты (18 : 3ω3), конечный продукт десатурации которой может составлять до 40% всего состава жирных кислот при холодовой адаптации. На фоне общего увеличения скорости удлинения углеводородных цепей у адаптированных к холоду животных наблюдалось включение полиненасыщенных жирных кислот в основном во вторую позицию фосфолипидов. Одновременно с этим происходило увеличение относительного содержания жирных кислот группы n-3 и n-6 и снижение уровня кислот группы n-9 при холодовой акклимации. В работе [35] показано довольно быстрое образование полиненасыщенных жирных кислот в печени золотых рыбок, акклиматизированных к низкой температуре. Еще более быстрые изменения в составе жирных кислот наблюдали в мембранах инфузорий Tetrahymena при ее перенесении из среды с температурой 39,5° С в среду 15° С [26, 37, 48, 53] — десатурация мембранных липидов происходила в течение первых 5 мин адаптации. Причем процесс десатурации жирных кислот мембран носил автономный характер и не зависел от изменения клеточной температуры, что было установлено в опытах по определению активности десатураз инфузорий в зависимости от температуры и жирнокислотного состава среды [37, 48]. В связи с этим полагают, что количество ненасыщенных жирных кислот возрастает в мембранах в ответ на увеличение их вязкостных свойств и не связано с изменением температуры. Эти данные подтверждаются исследованиями, проведенными и на клетках теплокровных [22].

Таким образом, детальные механизмы, лежащие в основе синтеза ненасыщенных жирных кислот, и регуляция процесса десатурации в организме животных при изменении температуры остаются недостаточно ясными.

Влияние липидов на функционирование мембранных ферментов при холодовой адаптации животных. Вопросу влияния различных классов

Матеріал, захищений авторським правом

липидов на ферментативную активность мембрановстроенных ферментов при нормальных физиологических температурах посвящено довольно большое количество работ. Установлено, что для работы энзимов, связанных с мембраной, необходимо в первую очередь наличие определенных жидкостных свойств липидов мембраны, специфического набора фосфолипидов и жирных кислот, моделирующего работу белка [3]. Указанные параметры мембран могут изменяться при холодовой адаптации, что вызывает нарушение функции ферментов. Для выяснения влияния липидных перестроек на активность митохондриальной сукцинатдегидрогеназы из мышечной ткани золотых рыбок, акклиматизированных к 5 и 25° С, выделяли изолированный фермент, который разделяли на белковую и липидную фракции [31, 32]. Методом электрофореза в ПААГ не найдено отличий в структуре белка фермента, который проявлял значительную стабильность при низких температурах. Однако при реактивации энзима обнаружено, что липиды митохондрий из адаптированных к холоду животных активировали белок в более выраженной форме, чем липиды из органелл неадаптированных животных. Следовательно, степень компенсаторных изменений активности, СДГ в данном случае определялась свойствами липидов митохондрий рыб, адаптированных к пониженным температурам.

При изучении влияния акклиматизации животных к низким температурам Лионс и Райзон [44, 56] установили, что активность ряда митохондриальных ферментов из разных тканей млекопитающих резко снижается при температурах ниже 23° С. При этом на графиках Аррениуса выявлялись типичные изломы, однако в тех же ферментах, выделенных из митохондрий холодоадаптированных животных, таких явлений не наблюдалось.

У гибернирующих животных в активном состоянии мембраносвязанные ферменты проявляют такие же свойства как типичные энзимы млекопитающих, живущих при физиологических температурах. Однако активность и свойства ферментов особей, находящихся в зимней спячке, изменяются при понижении температуры подобно ферментам пойкилотермных животных [5]. Подобные изменения ферментативной активности описаны и у чувствительных к холоду растений [45]. Известно, что изломы на графиках Аррениуса обусловлены в основном фазовым переходом липидов из жидкокристаллического состояния в состояние геля [16, 57]. Температура, при которой происходит снижение активности ферментов, обычно совпадает с температурной зоной фазового перехода липидов. Предполагают, что переход в другое фазовое состояние может изменить конформационное состояние фермента и тем самым изменить его активность. У зимоспящих животных, а также у холоднокровных, снижение температуры тела сопровождается повышением доли полиненасыщенных жирных кислот липидов, что, по-видимому, снижает температурную область структурных перестроек или полностью устраняет фазовые переходы липидов [54].

Хорошая корреляция между фазовыми превращениями мембранных липидов митохондрий печени ехидны и активностью ферментов дыхательной цепи установлена в работе [51], в которой методом ЭПР выявлены фазовые переходы мембранных липидов у активных животных в области 8 и 17° С, а при определении скорости дыхания митохондрий изломы на графике Аррениуса обнаружены в тех же областях температуры. В стадии зимней спячки этого животного липиды мембран митохондрий претерпевают фазовые извращения при температуре 10 или 6° С, а изломы на графиках Аррениуса при изучении зависимости дыхательной активности от структурного состояния липидов не определяются.

Фазовые превращения липидов в мембранах при понижении температуры оказывают влияние на активность ферментов путем изменения их кинетических характеристик (K_m, E_a) [7], что, очевидно,

Матеріал, захищений авторським правом

является основой компенсаторного влияния более жидкого липидного окружения на проявление активности энзимов.

Влияние низких температур на состояние ионных насосов мембран клеток и их роль в процессах холодовой адаптации. Для нормального функционирования клеток в первую очередь необходимо поддержание ионной асимметрии [64]. Существование ионных градиентов K^+ и Na^+ часто используется в качестве критерия жизнеспособности клеток и является показателем ее полноценного функционирования. Необходимый градиент ионов и других веществ в клетке поддерживается функционированием ионных переносчиков — транспортных АТФаз. Оказалось, что эти ферменты довольно чувствительны к понижению температуры клетки.

При исследовании активности АТФазы плазматических мембран мышечных клеток в координатах Аррениуса определяются изломы кривых в диапазоне температур 18—22° С, которые обусловлены структурными перестройками липидов в мембранах [2, 34, 46, 58, 64]. Причем изменения в активности ферментов соответствуют синхронному изменению микровязкости липидов, измеренных различными методами. Как известно, функционирование мембранных АТФаз существенно зависит от свойств липидов, окружающих фермент [2], т. е. активность переносчиков контролируется составом липидов мембран. Поэтому изменения в липидном составе мембран, которые происходят при адаптации животных к низким температурам, могут определенным образом влиять на физиологическое состояние фермента. Действительно, некоторые мембраносвязанные ферменты [31, 32], в том числе и ионтранспортные АТФазы [12, 25, 29, 64], проявляют повышенную активность в зоне пониженных температур, компенсируя, очевидно, таким образом неблагоприятное влияние холода на ионный баланс клетки. Активация ионных переносчиков в процессе холодовой адаптации или подготовки к гибернации отмечалась многими авторами [12, 25, 29]. Изменению активности АТФаз придается важное значение в подготовке животных к холодовой гибернации [25, 29]. У хомяков, экспонированных на холоду, активность АТФазы коркового слоя почки линейно увеличивалась на протяжении нескольких дней и с началом спячки больше не изменялась. У животных, которым не удавалось войти в это состояние в течение длительного периода, активность переносчиков не повышалась. Очевидно, повышение активности ионтранспортирующих АТФаз является специфическим при холодовой адаптации, поскольку активность других ферментов, связанных с мембранами (ацетилхолинэстеразы, кислой и щелочной фосфатазы и НАДФ-диафоразы), в процессе подготовки к гибернации не изменяется [25]. Выявлено, что повышение активности $Na^+ — K^+$-АТФазы из коркового слоя почки не связано с увеличением количества этого фермента в составе мембраны. При исследовании $Na^+ — K^+$-АТФазы из жабер и почек форели [49] также отмечено увеличение активности энзима в период акклимации животного к низким температурам, которое носило компенсаторный характер в ответ на нарушение транспорта ионов Na^+ через мембраны во время понижения температуры. В связи с этим АТФазу считают одним из важных элементов «усилителя» в механизме процесса восстановления нормальной асимметрии ионов на клеточной мембране. Можно представить следующую схему компенсации АТФазами нарушенных ионных потоков через мембрану в период изменения температуры. При понижении температуры окружающей среды происходит затвердевание мембранных липидов, что снижает активность переносчиков, хотя увеличивает пассивную диффузию ионов Na^+, K^+, Ca^{2+} и других через дефектные зоны мембран [1]. Благодаря довольно быстрому процессу реорганизации липидов мембраны (увеличению степени их ненасыщенности), происходит разжижение ее до уровня, необходимого для функционирования ферментов в зоне низких температур. В результате этого выравнивается градиент ионов и поддерживается необходимая метаболическая

Матеріал, захищений авторським правом

активность клетки. Во время повышения температуры среды происходит обратная реорганизация липидов мембран: на первых минутах происходит аномальное разжижение мембраны за счет повышенной ненасыщенности ее липидов. При этом происходит повышение скорости диффузии ионов через мембрану, вследствие разупорядочивания жирнокислотных цепей [3], и нарушается асимметрия распределения ионов, необходимая для нормального функционирования клетки. С повышением температуры клеток активность АТФаз резко увеличивается, что быстро восстанавливает ионный градиент. Однако функционирование мембран в таком режиме для клетки невыгодно, так как приводит к значительному перерасходу энергетических ресурсов. Поэтому в ответ на повышение температуры окружающей среды в мембранах клеток происходит уменьшение количества ненасыщенных жирных кислот и увеличение насыщенных, что приводит к уплотнению жирнокислотных цепей фосфолипидов. При этом вслед за уменьшением пассивной диффузии ионов снижается активность мембранных АТФаз до уровня, необходимого для поддержания градиента ионов. Видимо, ионтранспортирующие АТФазы лучше компенсируют изменения, происходящие в клетках при повышении температуры. Выявлена также важная роль мембранных Mg^{2+}-АТФаз в обеспечении жизнедеятельности клеток при пониженных температурах [27, 43, 61]. Например, в тканях мозга лягушки при ее акклимации к повышенным температурам активность Mg^{2+}-АТФазы повышается почти в два раза, что характерно и для Mg^{2+}-АТФазы из микросом почки карпа. Считают, что это является также специфической реакцией на изменение температуры. Предполагают, что Mg^{2+}-АТФазы способны регулировать пассивную проницаемость биомембран для некоторых ионов [43, 61], что играет важную роль в процессе температурной адаптации. Как видно, в реакции на изменение температуры клеток Mg^{2+}-АТФаза обладает свойством, противоположным Na^+, K^+-АТФазе. При понижении температуры Mg^{2+}-АТФаза снижает свою активность, а при повышении температуры — увеличивает ее. Наличие в мембранах двух совершенно разных по свойствам белковых структур, видимо, способствует более тонкому управлению ионными потоками через мембрану при сдвигах температуры.

Известно, что клетки теплокровных животных теряют ионы K^+ при снижении температуры [64]. Хотя их жизнеспособность весьма зависима от способности удерживать внутриклеточный пул ионов K^+, потеря K^+ всегда предшествует гибели клеток при пониженных температурах или в других экстремальных условиях. Так, выживание культивируемых клеток хомяка (гибернатора) коррелировало со способностью сохранять K^+ в цитоплазме по сравнению с клетками негибернирующих животных [62]. Причиной этого является способность мембранной Na^+, K^+-АТФазы клеток зимоспящих животных сохранять уровень своей активности и при пониженных температурах, на что не способны клетки негибернирующих особей. Таким образом, поддержание уровня активности мембранных переносчиков ионов является, по-видимому, одной из важных причин устойчивости клеток к охлаждению. Обнаружено, что в клетках негибернирующих животных искусственным путем можно вызвать такую перестройку мембраны, при которой будет более медленная потеря ионов. В работе [65] показано, что если L-клетки мыши многократно обрабатывать низкими температурами с небольшой экспозицией, то такие клетки приобретают способность в значительной мере сохранять внутриклеточный K^+ при последующей акклимации к более низкой температуре.

Ряд авторов отмечает, что при холодовой экспозиции клеток наблюдается несогласованность в степени снижения активности K^+, Na^+-АТФаз и скорости переноса ионов калия [21, 63]. Отмечено, что оуабаин — чувствительный вход ионов K^+ в эритроциты млекопитающих при пониженных температурах не проявляет такой же темпера-

Матеріал, захищений авторським правом

турной зависимости по сравнению с переносчиками. Эти результаты не согласуются с общепризнанным механизмом холодового ингибирования интактного насоса при фазовых переходах мембранных липидов, в связи с чем, согласно мнению авторов цитируемых выше работ, использование $Na^+ — K^+$-АТФазы как индикатора адаптивных процессов в клетках является сомнительным. Цайдлер и Виллис [65] наблюдали, что оуабаин — чувствительный вход K^+ в клетки культуры почки при 5° С составляет 10% его входа при 37° С, тогда как активность $Na^+ — K^+$-АТФазы при этом практически полностью угнетается. В работе [63] также обнаружена подобная закономерность, выявленная на клетках крови. Активность $Na^+ — K^+$-АТФазы при 5° С составляла 1—2% нормальной, тогда как вход ионов K^+ уменьшался лишь до 10%. Причем эта диспропорция более выражена в клетках зимоспящих животных. В эритроцитах колумбийского суслика это несоответствие составило при 10° С величину в 20 раз большую, чем при физиологических температурах. Однако эти результаты были получены при сравнении активности $Na^+ — K^+$-АТФазы в реконструированных эритроцитах и скорости проникновения K^+ в интактные клетки, т. е. на объектах, находящихся в различном структурном состоянии. Тем более, в работе [20], посвященной изучению активности $Na^+ — K^+$-АТФазы и функции электрогенного насоса клеточных мембран диафрагмы у мышей и хомяков при 5 и 37° С, не было обнаружено указанного выше несоответствия. У мышей активность АТФазы уменьшалась до 4% при 5° С без проявления электрогенной активности ионного насоса, а у хомяков активность фермента при 5° С снижалась до 10% от исходного уровня, однако при этом электрогенная активность насоса очень хорошо определялась. Очевидно, сохранение 10% от максимальной активности может быть достаточным для обеспечения компенсации пассивного Na^+ и K^+ обмена при пониженных температурах и поддержания мембранного потенциала. Следует полагать, что несоответствие в уровнях снижения активности $Na^+ — K^+$-АТФазы и переноса K^+ через мембрану при снижении температуры клетки можно объяснить тем, что измеряемый оуабаин — чувствительный калиевый перенос непосредственно не связан с деятельностью переносчика. Следовательно, при холодовой экспозиции клеток гибернирующих животных обнаруживается новое, не изученное свойство ионтранспортирующих систем.

Изучение влияния оуабаина на электрогенность $Na^+ — K^+$-насоса из клеток мышц диафрагмы у мышей и хомяков показало, что при 37° С этот агент в концентрации 10^{-4}М полностью ингибирует электрогенный эффект, блокируя, видимо, функцию Na^+-насоса [20]. Однако при 5° С этот ингибитор в той же концентрации стимулировал работу $Na^+ — K^+$-АТФазы хомяка в среде без K^+ до уровня более высокого, чем в присутствии K^+. Для мышечных клеток мышей такой закономерности не обнаружено. Это значит, что у хомяка оуабаин может замещать ионы K^+ и активировать фермент, причем эта активация электрогенна при условии насыщения мышечных клеток Na^+. Таким образом, результаты свидетельствуют, что энергозависимый выброс Na^+ из мышечных клеток хомяка не обязательно связан с активным транспортом K^+ через мембрану. Полагают, что энергия гидролиза АТФ при этих условиях может использоваться не в полной мере. Возможно, и часть энергии рассеивается в качестве тепла, что может иметь большое значение для поддержания функции органов и тканей при низкотемпературной гибернации животных. Эти предположения подтверждаются и в исследованиях, выполненных на крысах во время их акклимации к холоду [30], при этом обнаружено увеличение активности Na^+-насоса в клетках печени, почек, мышц. Считают, что этот факт является важным компонентом в регуляции общего термогенеза тканей при охлаждении организма.

Таким образом, ионтранспортирующие АТФазы как структурные и функциональные единицы мембран играют существенную роль в

Матеріал, захищений авторським правом

обеспечении жизнедеятельности клеток в условиях низких температур, однако молекулярные механизмы их холодовой перестройки, свойства насосов во время гибернации и регуляции ионтранспортирующего процесса остаются практически не изученными.

Анализ литературы показывает, что значительную роль в процессах адаптации животных к низким температурам играют биологические мембраны. Решающее значение в обеспечении жизнедеятельности клеток при пониженных температурах имеет способность клеток, приспособившихся к новым условиям, поддерживать градиент ионов Na^+ и K^+. Этот механизм обеспечивается функцией ионных насосов, которые в значительной степени изменяют свои свойства при низких температурах. Хотя известно, что эти изменения свойств переносчиков индуцируются мембранными липидами, их быстрой реорганизацией при адаптации, однако свойства ионпереносящих систем, механизмы их функционирования и регуляции в условиях низких температур остаются мало исследованными.

1. *Белоус А. М., Бондаренко В. А., Бондаренко Т. П.* Молекулярные механизмы криоповреждений биомембран.— Итоги науки и техники/ВИНИТИ. Сер. Биофизика, 1978, 9, с. 80—113.
2. *Болдырев А. А., Твердиелов В. А.* Молекулярная организация и механизм функционирования Na^+—K^+-насоса.— М., 1978.— 148 с.— (Итоги науки и техники/ ВИНИТИ. Сер. Биофизика; Т. 7.).
3. *Крепс Е. М.* Липиды клеточных мембран.— Л. : Наука, 1981.— 339 с.
4. *Ленинджер А.* Биохимия.— М. : Мир, 1974.— 957 с.
5. *Радловская З. Т.* Критические температуры сукцинатдегидрогеназной реакции у зимостойких сусликов.— Журн. эволюц. биохимии и физиологии, 1980, **16**, № 5, с. 527—529.
6. *Серебрянникова Э. Т., Векслер Я. И.* Влияние адаптации к переохлаждению на жирнокислотный состав липидов тканей крыс.— Укр. биохим. журн., 1977, **49**, № 2, с. 16—21.
7. *Хочачка П., Сомеро Дж.* Стратегия биохимической адаптации.— М. : Мир, 1977.— 398 с.
8. *Aloia R. C.* Brain lipid composition of the hibernating active ground squirel (Cittelus lateralis).— J. Therm. Biol., 1979, **4**, N 2, p. 223—231.
9. *Aloia R. C.* The role of membrane fatty acids in mammalian hibernation.— Fed. Proc., 1980, **39**, N 12, p. 2974—2979.
10. *Aloia R. C.* Phospholipid composition of hibernating ground squirrel (Cittelus lateralis) kidney and low temperature membrane function.— Comp. Biochem. and Physiol., 1978, **60B**, N 1, p. 19—26.
11. *Aloia R. C., Pengelley E. T.* Lipid composition of cellular membranes of hibernating mammals.— In: Chemical zoology/Eds M. Florkin, B. T. Scheer.— N. J.— London : Acad. press, 1979, p. 1—17.
12. *Blaker W. D., Moscatelli E. A.* The effect of hibernation of the lipids of brain myelin and microsomes in the syrian hamster mesocricetus auratus.— J. Neurochem., 1978, **31**, N 6, p. 1513—1518.
13. *Blaker J. H., Willis J. S.* Absence of cold resistance in sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase in a hierbnating mammals.— Comp. Biochem. and Physiol., 1975, 58B, N 4, p. 533—535.
14. *Blazyk J. F., Steim J.* Phase transition in mammalian membranes.— Biochim. et biophys. acta, 1972, **226**, N 4, p. 737—742.
15. *Bretscher M.* Asymmetrical lipid bilayer structure for biological membranes.— Nature. London, 1972, 236, N 1, p. 11—14.
16. *Charnock J. S.* Membrane lipid phase transitions: a possible biological response to hibernation.— In: Strategies in the cold: natural torpidity and thermogenesis/Eds L. C. H. Wang, J. W. Hudson. New York : Acad. press, 1978.
17. *Cossins A. R.* Adaptation of biological membranes to temperature : The effect of temperature acclimation of goldfish upon the viscosity of sinaptosomal membranes.— Biochim. et biophys. acta, 1977, 470, N 4, p. 395—411.
18. *Cossins A. R., Prosser C. L.* Evolutionary adaptation of membranes to temperature.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1978, 75, N 4, p. 2040—2043.
19. *Cossins A. R., Christiansen J., Prosser C. L.* Adaptation of biological membranes to temperature : The lack of homeoviscous adaptation in the sarcoplasmic reticulum.— Biochim. et biophys. acta, 1978, **511**, N 4, p. 442—454.
20. *Dlouha H., Donselaar Y., Teisinger J., Vyskocil F.* Effect of temperature and ouabain on the Na^+ — K^+-activated membrane ATPase and electrogenic ionic pump of the golden hamster and mouse diaphragm.— Physiol. bohemoslov., 1980, **29**, N 6, p. 543—552.
21. *Ellory J. S., Willis J. S.* Temperature dependence of membrane function : Disparity between active potassium transport and Na—K — ATPase activity.— Biochim. et biophys. acta., 1976, **443**, N 2, p. 301—305.

Матеріал, захищений авторським правом

22. *Alteration* of fatty acid composition of LM cells by lipid supplementation and temperature/K. A. Ferguson, M. Glaser, W. E. Bayer, R. R. Vagelos.— Biochem., 1975, **14**, N 1, p. 146—151.
23. *Farkas T., Herodek S.* The effect of environment temperature on the fatty acid composition of crustacean plancton.— J. Lipid Res., 1964, **5**, N 3, p. 369—373.
24. *Farcas T., Scengeri J.* Biosynthesis of fatty acid by the carp Carassius carpio in relation to environmental temperature.— Lipids, 1976, **11**, N 5, p. 401—407.
25. *Fang L. S. T., Willis J. S.* Increase of Na—K-ATPase activity in renal cortex of hamster (Mesocricetus auratus) during pre — hibernation cold exposure.— Comp. Biochem. and Physiol. A, **48**, 1974, p. 687—698.
26. *Changes* in membrane lipid composition during temperature adaptation by a thermotolerant strein of Tetrahymena pyriformig/H. Fukushima, C. E. Martin, H. Jida, Y. Kitajima et al. Biochem. et biophys. acta, 1976, **431**, N 1, p. 165—179.
27. *Gladwell R. T.* Heat death in the crayfish Austropotanobius pallipes : thermal inactivation of muscle membrane — bound ATPases in warm and cold adapted animals.— J. Therm. Biol., 1977, **1**, N 2, p. 95—100.
28. *Goldman S. S.* Cold resistance of the brain during hibernation. III. Evidence of a lipid adaptation.— Amer. J. Physiol., 1975, **228**, N 5, p. 834—840.
29. *Goldman S. S., Willis J. S.* Cold resistance of the brain during hibernation. Na—K-ATPase.— Cryobiology, 1977, **10**, N 10, p. 218—224.
30. *Guernsey D. L., Stevens E. D.* The cell membrane sodium pump as a mechanism for increasing Thermogenesis during cold acclimation in rats.— Science, 1977, **196**, N 4292, p. 908—910.
31. *Hazel J.* The effect of temperature acclimation upon succinic dehydrogenase activity from the epaxial muscle of the goldfish (Carassius auratus).— Comp. Biochem. and Physiol. B, 1972, **43**, N 4, p. 837—861.
32. *Hazel J.* The effect of temperature acclimation upon succinic dehydrogenae activity from the muscle of common goldfish: lipid reactivation of the soluble enzyme.— Ibid., 1972b, **43**, N 4, p. 863—882.
33. *Hazel Y. R.* Influence of thermal acclimation on membrane lipid composition of rainbow trout liver.— Amer. J. Physiol., 1979, **236**, N 1, p. R91—R101.
34. *Hidalgo C., Ikemoto N., Gergley J.* Role of phospholipids in the calcium-dependent ATPase of the sarcoplasmic reticulum. Enzymatic and FSR studies with phospholipid replaced membranes.— J. Biol. Chem., 1976, **251**, N 8, p. 4224—4232.
35. *Holub B. J., Piekarski J., Leatherland J. F.* Differential biosynthesis of molecular species of 1.2 deacyl — sn — glycerols and phosphatidylcholines in cold and warm acclimated goldfish.— Lipids, 1977, **12**, N 3, p. 316—318.
36. *Johnston P. V., Roots B. J.* Brain lipids fatty acids and temperature acclimation.— Comp. Biochem. and Physiol. B, 1964, **11**, N 3, p. 303—309.
37. *Molecular* control of membrane properties during temperature acclimation: membrane fluidity regulation of fatty acid desaturase action/R. Y. Kasai, Y. Kitajama, C. E. Martin et al.— Biochem., 1976, **15**, N 24, p. 5228—5233.
38. *Kemp P., Smith M. W.* Effect of temperature acclimation on the fatty acid composition of goldfish intestinae lipids.— Biochem. J., 1970, **117**, N 1, p. 9—15.
39. *Kimmelberg H. K., Papahadjopoulos D.* Phospholipid requirements for ($Na^+ + K^+$) — ATPase activity: head group specificity and fatty acid fluidity.— Biochim. et biophys acta, 1972, **282**, N 3, p. 277—283.
40. *Kimmelberg H. K., Papahadjoupoulos D.* Effect of phospholipid acyl chain fluidity, phase transition and cholesterol on ($Na^+ + K^+$) — stimulated adenosine triphosphatase.— J. Biol. Chem., 1974, **249**, N 7, p. 1071—1084.
41. *Knipparth W. G., Mead J. F.* Influence of temperature on fatty acid pattern of mosquito fish (Gambusia affinis) and guppies (Lebistus reticulatus).— Lipids, 1966, **1**, N 2, p. 113—117.
42. *Kuiper P. J., Livne A., Mayerstein N.* Changes in lipid composition and osmotic fragility of erythrocytes of hamsters induced by heat exposure.— Biochim. et biophys. acta, 1971, **248**, N 2, p. 300—305.
43. *Lagerspetz R. Y. H.* Effect of temperature acclimation on the microsomal ATPase of the frog brain.— J. Term. Biol., 1977, **2**, N 1, p. 27—30.
44. *Lyons J. M., Raison J. K.* A temperature induced transition in mitochondrial oxiadation: control between cold and warmblooded animals.— Comp. Biochem. and Physiol., 1970, **37**, N 3, p. 405—412.
45. *Lyons J. M., Raison J. K.,* Oxidative activity of mitochondria isolated from plant tissues sensitive and resistant to chilling injury.— Plant. Physiol., 1970b, **45**, N **4**, p. 386—389.
46. *Lyons J. M.* Phase transition and control of cellular metabolism at low temperatures.— Cryobiology, 1972, **9**, N 2, p. 341—358.
47. *Marshall J. M., Willis J. S.* The effect of temperature on the membrane potentials in isolated atria of the ground squirrel, Citellus tridecemlineatus.— J. Physiol., 1962, **164**, N 1, p. 64—69.
48. *Fatty* acid desaturase regulation of membrane fluidity in acclimation of Tetrahymena cells/C. E. Martin, K. Hiramotosu, Y. Kitajama et al.— Biochem., 1976, **15**, N 24, p. 5218—5228.
49. *McCarty L. S., Houston A. H.* Na^+ — K^+ — and HCO_3 — stimulated ATPase activities in the gills and kidneys of thermally acclimated rainbow trout, Salmo gairdneri.— Can. J. Zool., **55**, N 4, p. 704—712.

Матеріал, захищений авторським правом

50. *McMurchie E. J., Raison J. K., Cairaeross K. D.* Temperatureinduced phase changes in membranes of heart: a contrast between the thermal response of poikilotherms and homeotherms.— Comp. Biochem. and Physiol. B, 1973, **44**, p. 1017.
51. *McMurchie E. J., Raison K. J.* Hibernation and homeothermic status of the echidna (Tachyglossus aculeatus).— J. Thermal. Biol., 1975, I, N 1, p. 113—118.
52. *Miller N. G. A., Hill M. W., Smith M. W.* Positional and species analysis of goldfish adapted to different environmental temperatures.— Biochim. et biophys. acta, 1976, **455**, N 3, p. 644—654.
53. *Studies* on Tetrahymena membranes: temperature induced alteration in fatty acid composition of various membrane fraction in T. pyriformis and its effect on membrane fluidity ac inferred by spin label study/Y. Nozawa, H. Jida, H. Fukushima et al.— Ibid., 1974, **367**, N 2, p. 134—147.
54. *Oldfield E., Chapman D.* Dynamics of lipids in membranes: heterogeneity and the role of cholesterol.— FEBS Lett., 1972, **23**, N 3, p. 285—297.
55. *Mitochondrial* membrane fatty acids of liver and heart of the euthermic and hibernating ground squirrel (Citellus tridecemlineatus)/W. S. Platner, D. G. Steffen, G. Tempel, K. J. Musacchia.— Comp. Biochem. and Physiol. A, 1976, 33, N 2, p. 279—284.
56. *Raison J. K., Lyons J. M., Thompson W. W.* The influence of membranes on the temperature — induced changes in the kinetics of some respiratory enzymes of mitochondria.— Arch. Biochem. and Biophys., 1971, **142**, N 1, p. 83—90.
57. *Temperature* inducted phase changes in mitochondrial membranes detected by spin labelling/J. K. Raison. J. M. Lyons, R. J. Melhorn, A. D. Keith.— J. Biol. Chem., 1971b, **246**, N 12, p. 4036—4040.
58. *Raison J. K.* Temperature — induced phase changes in membrane lipids and their influence on metabolic regulation.— In: Rate control of biological processes/Ed. D. D. Davies. Cambridge: Oxford Univ. press, 1973, p. 485—498.
59. *Sinensky M.* Homeoviscous adaptation — a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipid in Escherichia coli.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, **71**, p. 522—525.
60. *Swan H., Schatte C.* Phospholipid and cold tolerance.— J. Therm. Biology, 1978, 3, N 2, p. 103.
61. *Tirri R., Vprnanen M., Cossins A. R.* The compensation of ATPase activities in brain and kidney microsomes from coldand warm — acclimated carp (Cyprinus carpio L.).— Ibid., N 3, p. 131—135.
62. *Willis J. S., Baundysova M.* Retention of K^+ in relation to cold resistance of cultured cells from hamster and human embryos.— Cryobiology, 1977, **14**, N 4, p. 511—515.
63. *Willis J. S., Ellory J. C., Becker J. H.* Na—K — pump and Na—K-ATPase disparity of their temperature sensitivity.— Amer. J. Physiol., 235, N 5, p. 159—167.
64. *Willis J. S.* Hibernation: cellular aspects.— Ann. Rev. Physiol., 1979, **41**, N 3, p. 275—286.
65. *Zeidler R. B., Willis J. S.* Cultured cells from renal cortex of hibernators and nonhibernators Regulation of cell K at low temperature.— Biochim et biophys. acta, 1976, **436**, N 5, p. 628—651.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
29.01.82

УДК 57.043.615.9

В. М. Гучок, В. Ф. Козлова

ФУНКЦИЯ И СТРУКТУРА ПОЧЕК КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ МАЛЫХ ДОЗ 1,2-ПРОПАНДИОЛА

Исследованиями последних лет, выполненными в Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР, и данными зарубежных авторов [7, 8], показано, что 1,2-пропандиол (α-пропиленгликоль) является активным криопротектором. В Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР разработан перспективный метод криоконсервирования эритроцитной массы под защитой 1,2-пропандиола (1,2-ПД), который представляет собой малотоксичное вещество [2—4, 9, 11], в два — три раза менее токсичное, чем традиционный криопротектор глицерин [4].

Однако в литературе нет четких данных о влиянии 1,2-ПД на функцию и структуру почек, не установлены безопасные дозы и концентрации при парентеральном введении вещества в организм. Отечественные образцы 1,2-ПД в этом аспекте вообще не изучены.

Матеріал, захищений авторським правом

Изложенное и послужило основанием для настоящего изучения влияния малых доз 1,2-ПД при однократном и продолжительном парентеральном его введении в организм.

Методы исследования. В острых опытах на 24 крысах-самцах линии Вистар массой 260—445 г изучено влияние 1,2-ПД на четырехчасовый водный диурез. Животные группировались по величине массы тела. Одним и тем же группам животных в параллельных опытах, поочередно меняя через 3 сут характер воздействия, внутрибрюшинно вводили 5—10%-ные растворы 1,2-ПД в дозах 1/20 и 1/10 ДЛ-50 (0,9 и 1,8 г/кг) или соответствующие объемы дистиллированной воды.

После внутрибрюшинного введения дистиллированной воды (водная нагрузка, 5% к массе тела) крыс помещали в индивидуальные клетки для сбора мочи. Величину диуреза определяли ежечасно в течение 4 ч. Кроме того, проводили микроскопию осадка мочи и с помощью бензидиновой пробы определяли наличие в ней крови (гемоглобина).

В субхронических опытах на 24-х половозрелых крысах-самцах линии Вистар массой 167—206 г, содержащихся на обычной диете вивария, изучено влияние 1,2-ПД при продолжительном парентеральном введении в организм. Животных разделили на четыре равные группы. 1,2-ПД вводили внутрибрюшинно ежедневно (кроме выходных дней) в течение 21-го дня: первой группе — в дозе 1/20 ДЛ-50 (0,9 г/кг) в 5%-ной концентрации, второй — в той же дозе (0,9 г/кг) в 10%-ной концентрации, третьей — в дозе 1/10 ДЛ-50 (1,8 г/кг) в 5%-ной концентрации.

Поскольку изучалось выведение почками хлоридов, то для приготовления всех растворов 1,2-ПД использовалась дистиллированная вода. Контрольной группе крыс вводили соответствующие объемы этой же воды. За время эксперимента животным первой и второй групп введено по 15,3 г/кг (0,84 ДЛ-50), третьей группы — 30,6 г/кг (1,68 ДЛ-50) 1,2-ПД. В ходе эксперимента в динамике (до введения 1,2-ПД, через 5, 14 и 21 сут) определяли: суточный диурез, удельную массу мочи (весовым методом), мочевину мочи и крови — по биотесту с тиосемикарбазидом («Лахема», ЧССР), элиминационный мочевинный индекс (ЭМИ) по Э. А. Арнольди [6], хлориды мочи по видоизмененному методу Вотечека, основанному на прямом титровании хлоридов мочи азотно-кислой ртутью [6]. О функциональном состоянии почек судили по данным микроскопии осадка мочи. После изучения функционального состояния почек произведено патологоанатомическое вскрытие животных, определены массы и относительная масса почек, произведены фиксация почек в 10%-ном растворе нейтрального формалина и обработка материала для гистологического и гистохимического исследований. Образцы почек заливали в целлоидинпарафин, срезы толщиной 5—7 мкм окрашивали гематоксилин-эозином, а также альциановым синим и реактивом Шиффа с целью индентификации гликозаминогликанов и гликопротеинов.

Полученные экспериментальные данные подвергнуты статистической обработке.

Результаты и их обсуждение. Известно, что одним из важнейших показателей деятельности почек является мочеотделение. Изучение влияния 1,2-ПД на мочеотделение в острых опытах при однократном введении вещества позволило установить, что после однократного введения 1,2-ПД в дозах 1,20 ДЛ-50 в 5%-ной концентрации и 1/10 ДЛ-50 в 10%-ной концентрации средние величины суммарного четырехчасового водного диуреза опытных и контрольных групп животных существенно не отличались между собой. Не выявлено также различий и в ежечасной динамике диуреза опытных и контрольных групп крыс. В моче опытных и контрольных животных не найдено эритроцитов (гемоглобина) и не выявлено различий данных, полученных при микроскопии осадка.

Матеріал, захищений авторським правом

В субхронических опытах средние величины суточного диуреза, выраженные в процентах к введенной жидкости, в опытных группах животных после применения 1,2-ПД колебались от 44,23 ± 8,63 (22,04 ÷ 66,42) до 81,49 ± 12,95 (48,21 ÷ 114,77) и в контроле от 45,53 ± 15,01 (6,95 ÷ 84,1) до 65,71 ± 6,68 (48,55 ÷ 82,87). При этом сравнение показателей диуреза опытных групп с соответствующими показателями контрольной группы не выявило значимых различий.

Отсутствие различий между показателями суточного и четырехчасового водного диуреза опытных и контрольных групп животных позволяет считать, что 1,2-ПД в изученных дозах (1/20 и 1/10 ДЛ-50) и концентрациях (5 и 10%) не изменяет важной функции почек — мочеотделения.

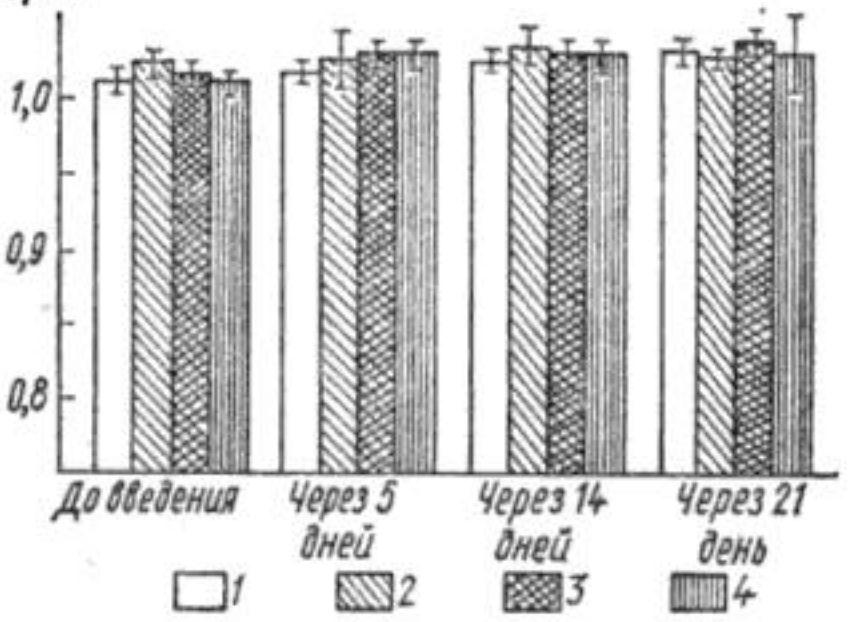


Рис. 1. Удельная масса мочи крыс:
1 — контроль; *2* — 1,2-ПД, 1,8 г/кг, 5%-ная концентрация; *3* — 1,2-ПД, 0,9 г/кг, 10%-ная концентрация; *4* — 1,2-ПД, 0,9 г/кг, 5%-ная концентрация.

О состоянии концентрационной способности почек судили по величинам удельной массы мочи. Полученные данные (рис. 1) показали, что удельная масса суточной мочи во всех опытах и контрольной группах крыс колебалась в пределах от 1,015 ± ± 0,0019 до 1,044 ± 0,0035 г/см³. Из рис. 1 видно, что в течение всего периода наблюдения не было существенных различий между величинами удельной массы мочи опытных и контрольной групп животных. Все это свидетельствует об отсутствии нарушений концентрационной функции почек крыс при продолжительном парентеральном введении им 1,2-ПД в изучаемых дозах и концентрациях.

Наряду с приведенными данными для оценки состояния основных функций нефрона: фильтрации, реабсорбции и секреции использованы показатели выведения из организма мочевины и хлоридов.

Содержание мочевины в крови (рис. 2, *а*) опытных групп крыс колебалось в диапазоне 55,77 ± 1,6 — 75,62 ± 2,29 мг% и контрольной группы — 57,95 ± 2,78 — 69,14 ± 2,71 мг%, мочевины в моче (рис. 2, *б*) соответственно — 45,93 ± 2,07 — 58,97 ± 2,11 и 47,43 ± 2,78 — 61,72 ± ± 2,75 мг/мл. Из рисунков видно, что различия в содержании мочевины в крови и моче опытных и контрольной групп животных при сравнении по соответствующим периодам наблюдения незначимы.

Исключение составило достоверное по сравнению с контролем снижение содержания мочевины в моче на 14-е сутки после начала введения 1,2-ПД в дозе 1/20 ДЛ-50 в 10%-ной концентрации. Однако анализ этого факта показал, что средняя величина выведенной крысами мочевины составила 45,93 ± 2,07 мг/мл при обычно наблюдаемых у контрольных животных колебаниях содержания мочевины в моче от 15 до 45 мг/мл [6]. Следовательно, установленная в данном опыте средняя величина выведенной крысами на 14-е сутки мочевины находится на уровне верхней границы обычных физиологических колебаний и не позволяет отнести установленное некоторое снижение выведения мочевины к разряду патологических реакций. Об этом же свидетельствует увеличение на 14-е сутки наблюдения ЭМИ до 1,07 г/кг в сутки при исходном уровне выведения в 0,567 г/кг в сутки, а также и то, что несмотря на продолжавшееся введение 1,2-ПД в той же дозе и концентрации на 21-е сут опыта выведение мочевины у тех же крыс возросло до 53,63 ± 3,82 мг/мл при ЭМИ 1,13 г/кг в сутки и значимо не отличалось от уровня контроля (рис. 2, *б*).

Об отсутствии нарушений процессов очищения от мочевины, а следовательно и функциональной активности почек у всех опытных и контрольной групп крыс видно также из показателей ЭМИ, величины

Матеріал, захищений авторським правом

которых во все периоды наблюдения после воздействия на организм 1,2-ПД превышали исходные. Исходные показатели ЭМИ у крыс опытных и контрольной групп колебались в диапазоне 0,39—0,801 г/кг в сутки, а после введения животным 1,2-ПД или соответствующих объемов дистиллированной воды они составили 0,607—1,4 г/кг в сутки.

Опыт токсикологических исследований показал, что при выявлении начальных нарушений функционального состояния почек, вызванных определенными токсическими агентами, чувствительным тестом является определение хлоридов в моче [6]. Результаты опытов (рис. 3) показали, что содержание хлоридов в моче опытных групп животных колебалось в диапазоне $1{,}16 \pm 0{,}193 — 3{,}375 \pm 0{,}668$ мг/мл и контрольной группы — $1{,}11 \pm 0{,}148 — 2{,}77 \pm 0{,}316$ мг/мл. Различия в содержании

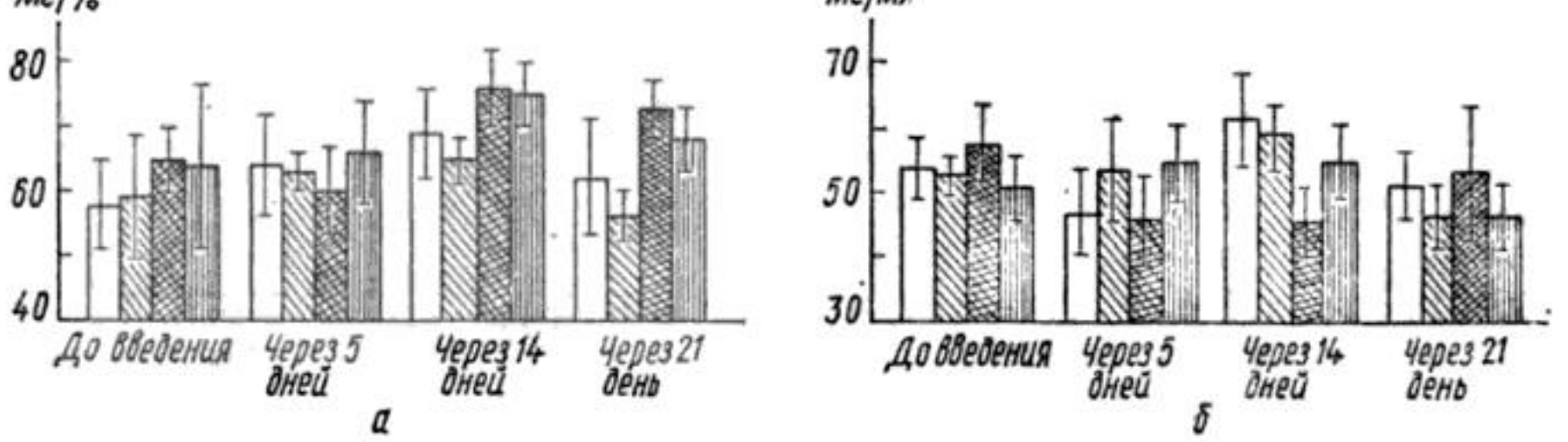


Рис. 2. Содержание мочевины в крови (*а*) и моче (*б*). Условные обозначения те же, что и на рис. 1.

хлоридов в моче опытных и контрольной групп животных при сравнении по соответствующим периодам наблюдения незначимы.

Приведенные данные указывают на отсутствие нарушений экскреции и реабсорбции хлоридов почками опытных и контрольной групп крыс.

Следовательно, продолжительное парентеральное введение 1,2-ПД в дозах 1/20 и 1/10 ДЛ-50 в 5 и 10%-ных концентрациях не нарушает экскреции и реабсорбции хлоридов почками крыс и, по-видимому, ионорегулирующей функции почек крыс в целом.

При микроскопии осадков мочи опытных и контрольных животных находили кристаллы трипельфосфатов, фосфаты, иногда единичные лейкоциты. Эритроциты, цилиндры, клетки почечного эпителия не обнаруживались. Весовые коэффициенты почек опытных и контрольной групп животных колебались в пределах $3{,}16 \pm 0{,}09 — 3{,}3 \pm 0{,}09$ и статистически значимо не отличались между собой.

Таким образом, результаты исследования функционального состояния почек опытных и контрольной групп крыс с помощью комплекса функциональных критериев позволяют считать, что продолжительное (в течение трех недель) парентеральное введение 1,2-пропандиола в малых (1/20 и 1/10 ДЛ-50) дозах в 5 и 10%-ных концентрациях не нарушает изученных функций почек животных.

Затем проводились гистологическое и гистохимическое исследования почек животных. Оценивая влияние 1,2-ПД на структуру почек, необходимо учитывать и то обстоятельство, что 12—45% введенного в организм вещества выводится в неизменном виде через почки [10]. Морфологическое исследование органов показало, что структура тканей почек крыс, которым многократно (в течение трех недель) внутрибрюшинно вводили 5%-ные растворы 1,2-ПД в дозе 1/20 ДЛ-50, не отличается от соответствующих структур почек контрольных животных. Паренхима образована обычной системой эпителиальных почечных канальцев, формирующих структурную и функциональную единицу почек — нефрон, органически связанный с кровеносными сосудами. По морфофункциональному состоянию кортикальные и юкстамедулляр-

Матеріал, захищений авторським правом

ные нефроны не равнозначны, однако они не отличаются от соответствующих нефронов почек животных контрольной группы. Строма в почках представлена нежными тонкими прослойками соединительной ткани и межклеточным основным веществом, богатым гликопротеинами и гликозаминогликанами, а также несколько расширенными кровеносными и лимфатическими сосудами. Не обнаружено существенных изменений в изучаемых структурах почек крыс, которым многократно внутрибрюшинно вводили 1,2-ПД в дозе 1/20 ДЛ-50 (10%-ные растворы), а также в дозе 1/10 ДЛ-50 (5%-ные растворы).

У подопытных животных отмечено некоторое увеличение полости капсулы клубочков, кровенаполнение капилляров и накопление в клубочках белково-углеводных соединений без повреждения структур гломерулярного фильтра: подоцитов, базальных мембран и эндотелия капилляров. По-видимому, наблюдаемые изменения связаны с развитием приспособительной реакции органа не только на вводимый 1,2-ПД, но и на объем дистиллированной воды, поскольку подобные явления в некоторых случаях имели место и у животных контрольной группы. Усиленной функцией и начальными морфологическими изменениями характеризуется эпителий проксимальных извитых канальцев, ответственных за реабсорбцию большей части воды и растворенных в ней составных частей первичной мочи. Это проявляется в увеличении размеров и мутном набухании эпителиоцитов, разрыхлении базальных мембран и интенсивном окрашивании их, а также щеточной каемки и апикальной части клеток реактивом Шиффа. Эпителиальная выстилка дистальных извитых и прямых канальцев уплотнена и уплощена, что, возможно, связано с их дегидратацией. Указанные выше изменения в канальцевой системе наиболее выражены в интермедиарной зоне, важном звене в регуляции почечного гомеостаза, структурные элементы которой ответственны за концентрационную, секреторную, экскреторную и транспортно-обменную функции. В коре и пограничном слое почек не найдено изменений волокнистых и клеточных структур соединительной ткани, имеют место лишь умеренная гиперемия сосудов микроциркуляторного русла и расширение просветов лимфатических сосудов, особенно вокруг дуговых артерий и вен.

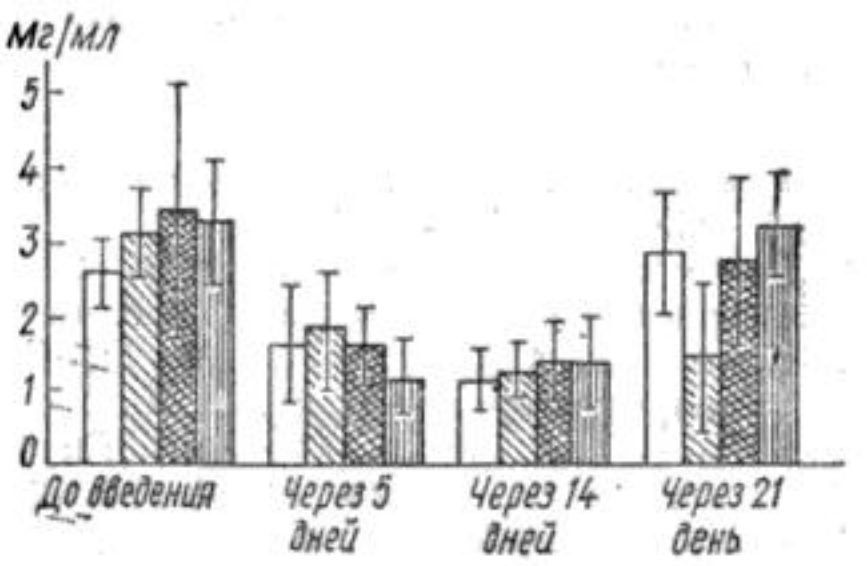


Рис. 3. Содержание хлоридов в моче. Условные обозначения те же, что и на рис. 1.

Такие изменения гемо- и лимфодинамики в почках можно рассматривать как проявление компенсаторно-приспособительной реакции органа. Паренхима мозгового вещества почек у животных подопытных групп не изменена. Интерстициальная ткань его отличается альцианофилией, что связано с накоплением гликозаминогликанов, играющих важную роль в сосудисто-тканевой проницаемости и канальцевой реабсорбции [1]. Наблюдаемая ранняя реакция соединительной ткани, по-видимому, обусловленная ее основной интегративной функцией, которая по современным представлениям [5], обеспечивает ключевую роль кооперативного взаимодействия между всеми клеточными и неклеточными компонентами в осуществлении адаптации и гомеостаза органа. Результаты гистологического и гистохимического исследования свидетельствуют о том, что 1,2-ПД в дозе 1/20 ДЛ-50 5%-ной концентрации при продолжительном парентеральном введении в организм крыс не вызывает нарушения структуры почек. Двукратное увеличение дозы или концентрации может вызвать морфофункциональное напряжение клубочко-канальцевой системы органа и развитие начальных, обратимых структурных изменений. Сопоставление полученных экспериментальных

Матеріал, захищений авторським правом

данных, характеризующих функциональное и морфологическое состояние почек опытных и контрольных групп крыс, показывает, что продолжительное (в течение трех недель) парентеральное введение 1,2-ПД в дозе 1/20 ДЛ-50 в 5%-ных растворах, приготовленных на дистиллированной воде, не нарушает ни функции, ни структуры почек. Увеличение в два раза дозы или концентрации 1,2-ПД при тех же прочих условиях эксперимента может вызывать развитие некоторых начальных, обратимых структурных изменений в почках без нарушения их функциональной способности.

Выводы. 1. 1,2-Пропандиол в дозе 1/20 ДЛ-50 (0,9 г/кг) в 5%-ной концентрации при многократном внутрибрюшинном введении в организм не нарушает функции и структуры почек крыс. 2. 1,2-Пропандиол в дозе 1/20 ДЛ-50 (0,9 г/кг) в 10%-ной концентрации или в дозе 1/10 ДЛ-50 (1,8 г/кг) в 5%-ной концентрации при многократном внутрибрюшинном введении в организм крыс может вызвать развитие некоторых начальных, обратимых структурных изменений в почках без нарушения их функции.

1. *Гинецинский А. Г.* Физиологические механизмы водно-солевого равновесия.— Л. : Наука, 1964.— 427 с.
2. *Гучок В. М., Зборовская Э. А.* О токсичности α-пропиленгликоля.— Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 8, с. 46—49.
3. *Гучок М. М., Гучок В. М.* Сравнительное исследование токсичности некоторых криопротекторов.— В кн.: I Укр. съезд гематологов и трансфузиологов : Тез. докл. (10—12 дек. 1980 г., Харьков). Киев, 1980.— 176 с.
4. *Гучок М. М., Гучок В. М., Мазалов В. К.* Сравнительное исследование токсичности этиленгликоля, α-пропиленгликоля и глицерина.— Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 9, с. 36—43.
5. *Серов В. В., Шехтер А. Б.* Соединительная ткань (функциональная морфология и общая патология).— М. : Медицина, 1981.— 312 с.
6. *Методы* исследования функции почек в эксперименте на животных.— В кн.: Методы определения токсичности и опасности химических веществ (токсикометрия)/ Под ред. И. В. Саноцкого. М. : Медицина, 1970, с. 199—209.
7. *Boutron P., Arnaud F.* Comparison of the survival rates of red blood cells in 1,2-propanediol and glycerol after cooling to —196° C and rewarming.— In: Proc. Intern. meet Soc. low temperature biology. Czechoslovakia, Prague, 1980, p. 17.
8. *Boutron P., Kaufman A.* Stability of the amorphous state in the system water — 1,2 propanediol.— Cryobiology, 1979, **16**, N 6, p. 557—568.
9. *Toxicity*, fats and excretion of propylene glycol and some other glycols/P. I. Hanzlik, H. W. Newman, W. Van Winkle Ir. et al.— J. Pharmacol. Exp. Therap., 1939, 67, N 1, p. 101—113.
10. *Lehman A. T., Newman H. W.* Propylene glycol . Rate of metabolism, absorption and excretion, with a method for estimation in body fluids.— J. Pharmacol. Exp. Therap., 1937, **60**, p. 312—322.
11. *Ruddick T. A.* Toxicology, metabolism and biochemistry of 1,2-propanediol.— Toxicol. and Appl. Pharmacol., 1972, **21**, N 1, p. 102—111.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
15.01.82

УДК 57.043

Л. А. Данилова, Л. П. Игнашева,
А. Г. Федотенков

ВЛИЯНИЕ ЗАМОРОЖЕННЫХ СИНГЕННЫХ ЛИМФОЦИТОВ НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Известно, что трансплантация костного мозга мышей родительской линии гибридному реципиенту приводит к замедленному росту пересаженной ткани в отличие от трансплантации сингенному реципиенту. Подавление пролиферативной активности родительской пересаженной ткани в F_1-гибриде (аллогенное ингибирование) может быть смягчено

Матеріал, захищений авторським правом

добавлением к костномозговому трансплантату сингенных лимфоцитов [1].

В настоящей статье использована модель совместной трансплантации свежих костномозговых клеток и замороженных лимфоцитов. Мы полагаем, что опыты позволят ответить на вопрос о влиянии замораживания на сингенные лимфоциты, в частности, на их способность воздействовать на стволовые клетки.

Материалы и методы. В опытах исследовали шесть групп животных (360 мышей). Донорским материалом служил костный мозг мышей C57B*l*/6. Сингенные лимфоциты заготавливали из лимфатических узлов мышей той же линии и затем замораживали с 15%-ным раствором глицерина или вводили в нативном состоянии вместе со свежим костным мозгом. В качестве реципиентов использовали мышей C57B*l*/6 или гибридов первого поколения (CBA × C57B*l*/6). Первая группа животных — реципиенты C57B*l*/6 — получала сингенный костный мозг (без лимфоцитов) в количестве $0{,}1 \times 10^6$ клеток; вторая — гибриды F_1 — костный мозг C57B*l*/6 (без лимфоцитов) в количестве $0{,}2 \times 10^6$ клеток; третья — гибриды F_1 — костный мозг мышей C57B*l*/6 ($0{,}2 \times 10^6$ клеток) вместе со свежими сингенными лимфоцитами ($2{,}0 \times 10^6$ клеток); четвертая — гибриды F_1 — костный мозг мышей C57B*l*/6 ($0{,}2 \times 10^6$) вместе с замороженными сингенными лимфоцитами ($2{,}0 \times 10^6$); пятая группа — гибриды F_1 — получала костный мозг мышей C57B*l*/6 ($0{,}2 \times 10^6$) вместе с замороженными сингенными лимфоцитами в двойной дозе — $4{,}0 \times \times 10^6$; шестая группа животных была контрольной — облучение без введения костного мозга. Замораживание лимфоцитов производили по методу, разработанному в лаборатории: 1° С/мин от исходной температуры до начала кристаллизации (—11° С), затем по 10° С/мин до —196° С. При заготовке суспензии клеток костного мозга и лимфатических узлов использовали раствор ЦОЛИПК-3. Донорские клетки вводили реципиентам через сутки после облучения. Через 9 сут животных забивали, селезенки извлекали, фиксировали в растворах Буэна и формалина. Подсчитывали (макроскопически) число колоний, после чего готовили серийные срезы на замораживающем микротоме и окрашивали их гематоксилин-эозином. Под микроскопом подсчитывали число колоний и идентифицировали их. Выводили эритроидно-миелоидное соотношение (Э/М).

Результаты опытов подвергали статистической обработке, достоверность различий определяли по критерию Стьюдента.

Результаты исследований. Как показали результаты опытов (таблица), при трансплантации костного мозга одного из родителей (C57B*l*/6) гибридному реципиенту число колоний резко уменьшается по сравнению с таковым в сингенном реципиенте (3,5 вместо 14,4). Добавление к костному мозгу сингенных лимфоцитов в количестве $0{,}2 \times 10^6$ смягчает явления аллогенной ингибиции: в этом случае в организме реципиента обнаруживается больше колоний (5,6 вместо 3,5).

Уменьшение эффекта аллогенной ингибиции при добавлении сингенных лимфоцитов костномозговым клеткам (M ± м)

Группа	Реципиент	Свежие клетки костного мозга C57Bl6	Клетки лимфоузлов		Среднее качество колоний (микроскопический учет)	Эритробластические колонии	Гранулоцитарные колонии	Эритроидномиелоидное соотношение
			Свежие	Размороженные				
1	C57B*l*/6	$0{,}1 \times 10^6$	—	—	$14{,}4 \pm 0{,}04$	$8{,}4 \pm 0{,}2$	$5{,}0 \pm 0{,}02$	1,7
2	F_1	$0{,}2 \times 10^6$	—	—	$3{,}5 \pm 0{,}06$	$2{,}1 \pm 0{,}01$	$1{,}1 \pm 0{,}01$	
3	F_1	$0{,}2 \times 10^6$	$2{,}0 \times 10^6$	—	$5{,}6 \pm 0{,}07$	$3{,}9 \pm 0{,}09$	$1{,}5 \pm 0{,}01$	1,9
4	F_1	$0{,}2 \times 10^6$	—	$2{,}0 \times 10^6$	$3{,}6 \pm 0{,}06$	$2{,}2 \pm 0{,}01$	$1{,}1 \pm 0{,}01$	2,6
5	F_1	$0{,}2 \times 10^6$	—	$4{,}0 \times 10^6$	$5{,}8 \pm 0{,}05$	$3{,}6 \pm 0{,}06$	$2{,}05 \pm 0{,}01$	1,8
6	F_1	—	—	—	$0{,}3 \pm 0{,}05$	$0{,}3 \pm 0{,}05$	0	—

Матеріал, захищений авторським правом

Введение замороженных лимфоцитов вместе с костным мозгом также смягчает явления аллогенной ингибиции. Однако чтобы достигнуть аналогичных цифровых показателей (5,8 вместо 3,5), замороженных сингенных лимфоцитов понадобилось вдвое больше ($4{,}0 \times 10^6$), чем свежих.

Таким образом, процесс замораживания не лишает сингенные лимфоциты способности уменьшать явления аллогенного ингибирования стволовых клеток в организме реципиента. Способность эта несколько ослаблена, по сравнению со свежими лимфоцитами. Не исключено, что данная закономерность связана с тем, что при замораживании уменьшается популяция Т-клеток, наиболее чувствительных к действию холода. Тем не менее от присутствия в трансплантате костного мозга замороженных сингенных лимфоцитов пролиферативная активность стволовых клеток в гибридном реципиенте усиливается.

Выводы. 1. Процесс замораживания не лишает сингенные лимфоциты способности смягчать аллогенное ингибирование стволовых клеток в организме гибридного реципиента. 2. Замороженные лимфоциты могут быть использованы (при определенных показаниях) для повышения эффективности трансплантата аллогенного костного мозга.

1. *Петров Р. В., Швец В. Н.* Взаимодействие стволовых кроветворных клеток с лимфоцитами.— Пробл. гематологии и переливания крови, 1973, № 10, с. 48—55.

Центральный научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови МЗ СССР

Поступила в редколлегию 18.01.82

УДК 57.043 : 577.37.1

Л. И. Золочевская, В. И. Луговой

МЕХАНИЗМ ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ НАД-ЗАВИСИМОЙ МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ МИТОХОНДРИЙ ПРИ ЗАМОРАЖИВАНИИ-ОТТАИВАНИИ

В предыдущих исследованиях [3, 4] нами было показано, что различные режимы замораживания-оттаивания митохондрий печени крыс вызывали увеличение активности НАД-зависимой малатдегидрогеназы (НАД-МДГ), причем медленное замораживание суспензии органелл оказывало более выраженное влияние на изменение активности фермента по сравнению с быстрым режимом замораживания. Отмечалось также, что в условиях медленных скоростей замораживания повышение активности фермента происходило в основном в диапазоне температур от 0 до —30° С. В связи с этим представляло интерес более детально исследовать активность НАД-МДГ в этом температурном интервале с целью выяснения механизма нарушения каталитических свойств фермента при замораживании-оттаивании.

Материалы и методы. Выделение митохондриальной фракции из печени крыс и определение активности НАД-МДГ проводили по методам, описанным в работах [3, 4]. В одной серии опытов полученную в 0,15М растворе KCl суспензию митохондрий замораживали в криостате со средней скоростью 1 град/мин до —5, —11, —20, —25° С (—11° С — точка эвтектики KCl). В других исследованиях к суспензии митохондрий, используемой в опытах по переохлаждению, добавляли глицерин до конечной концентрации 40% по объему, после чего пробы медленно охлаждали в криостате до тех же температур. Пробы отогревали в водяном термостате при 37° С. Контролем служили суспензии интактных митохондрий и митохондрий с добавлением глицерина, которые хранились при 0° С. Активность НАД-МДГ выражали в микромолях НАД-Н на 1 мг белка митохондрий за 1 мин инкубации при 25° С.

Матеріал, захищений авторським правом

Результаты и их обсуждение. В качестве предварительного этапа исследования представлялось целесообразным выяснить общий механизм повышения активности НАД-малатдегидрогеназы в условиях замораживания-оттаивания митохондрий. Для этого активность фермента изучалась после замораживания митохондрий до —30° С как в постмитохондриальном супернатанте, так и непосредственно в митохондриях, находящихся в осадке. Активность НАД-МДГ обнаруживалась

Условие опыта	Активность фермента
Суспензия митохондрий до замораживания (контроль)	0,58±0,18
Суспензия митохондрий после замораживания до —30 °С	2,68±0,40 ($p<0,001$)
Постмитохондриальный супернатант после замораживания органелл до —30 °С	2,62±0,38 ($p<0,001$)
Осадок митохондрий после замораживания суспензии органелл до —30 °С	0,68±0,22 ($p>0,7$)

в супернатанте, тогда как в митохондриальном осадке уровень ферментативной активности был очень низким. Следовательно, увеличение активности НАД-МДГ при замораживании-оттаивании митохондрий является следствием выхода ферментного белка в окружающую среду через поврежденную митохондриальную мембрану. Поскольку НАД-малатдегидрогеназа локализована в митохондриальном матриксе и непрочно связана с мембранными структурами [2], нарушение активности этого фермента в применявшихся экспериментальных условиях в общих чертах подобно освобождению ферментов из состава лизосом, что наблюдается при действии на органеллы различных повреждающих факторов, в том числе замораживания-оттаивания [1].

Температура замораживания, °С	Активность фермента	Температура замораживания, °С	Активность фермента
Контроль, 0	0,78±0,06	—20	2,08±0,06 ($p<0,001$)
—5	1,32±0,13 ($p<0,001$)	—25	2,08±0,21 ($p<0,001$)
—11	1,46±0,16 ($p<0,01$)		

После замораживания митохондрий до различных температур в интервале от 0 до —25° С отмечено примерно в равной степени повышение активности фермента при —5 и —11° С и более значительное при —20 и —25° С. Обнаруженные изменения активности НАД-малатдегидрогеназы являются, очевидно, результатом повреждающего влияния на мембранные структуры митохондрий комплекса физико-химических факторов, возникающих при вымораживании воды,— кристаллов льда, концентрационных и осмотических эффектов солей, дегидратации. Оценить относительный вклад каждого из указанных факторов в механизм криоповреждения мембранных структур весьма трудно, хотя в более упрощенных модельных системах подобная задача в первом приближении может быть решена.

Так, косвенным подтверждением значения гиперконцентрации солей в криоповреждениях мембран митохондрий могут быть результаты исследования активности НАД-МДГ после одночасовой инкубации фракции органелл в гипертонических растворах хлористого натрия.

Концентрация хлористого натрия	Активность фермента
Контроль (0,15М NaCl)	0,89±0,08
1М NaCl	1 59±0,32 ($0,05<p<0,1$)
4М NaCl	3,42±0,76 ($p<0,01$)

Матеріал, захищений авторським правом

Из этого видно, что 1М раствор хлористого натрия вызывал значительное повышение активности фермента. При инкубации митохондрий в 4М солевом растворе, что приближается к эвтектической концентрации хлористого натрия, наблюдалось более резкое изменение активности фермента.

Однако остается неясным, в какой мере обнаруженные в процессе замораживания-оттаивания митохондрий изменения активности фермента являются результатом, с одной стороны, действия указанного комплекса физико-химических сдвигов, а с другой,— следствием непосредственного влияния температурного фактора на структурные свойства мембран. Литературные данные [5, 6] свидетельствуют, что понижение температуры вызывает термотропные фазовые переходы фосфолипидов мембран из жидкокристаллического в твердокристаллическое состояние, кластеризацию липидов, агрегацию мембранных белков, что приводит к изменению многих ферментов и специфических функций мембран.

В связи с этим мы исследовали активность НАД-малатдегидрогеназы после переохлаждения митохондрий до различных температур в незамерзающем водно-глицериновом растворе. Как видно, увеличение активности НАД-МДГ происходило уже после охлаждения митохондрий до —5° С и в дальнейшем, по мере понижения температуры, дополнительных изменений активности фермента не наблюдалось.

Температура переохлаждения, °С	Активность фермента	Температура переохлаждения, °С	Активность фермента
Контроль (0)	1,58±0,13	—20	2,04±0,10 ($p<0,05$)
—5	2,17±0,21 ($p<0,05$)	—25	2,27±0,26 ($p<0,05$)
—11	2,18±0,23 ($p<0,05$)		

Полученные результаты согласуются с данными других авторов [5, 6], согласно которым температурный диапазон фазовых переходов липидов в составе внутренней мембраны митохондрий из печени крыс находится в интервале от —4 до —12° С.

Таким образом, изменение активности НАД-малатдегидрогеназы в процессе замораживания-оттаивания митохондрий может быть результатом не только повреждающего действия на мембранные структуры комплекса физико-химических сдвигов в растворе, но и возможным следствием изменения мембранной проницаемости при температурно-зависимых структурных переходах митохондриальных липидов.

1. *Кравченко Л. П., Луговой В. И., Белоусова Е.* Влияние скорости оттаивания лизосом печени на активность гидролаз.— Криобиология и криомедицина, 1975, вып. 1, с. 64—65.
2. *Ленинджер А. А.*— Биохимия.— М. : Мир, 1974.— 960 с.
3. *Активность* дегидрогеназ цикла Кребса после замораживания-оттаивания митохондрий/В. И. Луговой, Л. И. Золочевская, А. М. Грек, О. А. Жирова.— Докл. АН УССР, 1980. Сер. Б., № 10, с. 82—85.
4. *Луговой В. И., Золочевская Л. И.* Активность НАД-зависимой малатдегидрогеназы после различных режимов замораживания-оттаивания митохондрий печени крыс.— Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 8, с. 7—9.
5. *Chapman D.* Phase transition and fluidity : Characteristics of lipids and cell membranes.— Quart. Revs Biophys., 1975, 8, N 2, p. 185—235.
6. *Hochli M., Hackenbrock C. R.* Fluidity in mitochondrial membranes. Thermotropic lateral translation motion of intramembrane particles.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1976, 73, N 5, p. 1636—1640.

Институт проблем криобиологии и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию 18.01.82

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043

Л. П. Игнашева, Л. А. Данилова,
А. Г. Федотенков

ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ГЛИЦЕРИНА НА ГОМОТРАНСПЛАНТАЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ ЛИМФОЦИТОВ КРОВЕТВОРНЫХ ТКАНЕЙ

Предыдущие наши исследования [1, 3] показали, что под влиянием 15%-ного глицерина снижается инактивирующая способность лимфоцитов из костного мозга и лимфоузлов по отношению к экзогенным и эндогенным КОЕ. Однако при использовании 15%-ного глицерина необходимо проводить отмывание клеток от криофилактика, что значительно усложняет процесс подготовки к трансплантации костного мозга со сниженной иммунологической активностью.

В настоящей статье изучено влияние низких концентраций глицерина на иммунологическую активность лимфоцитов, содержащихся в лимфоузлах и костном мозге.

Материал и методы. Материалом для исследований служили клетки лимфоузлов и костного мозга мышей высокоинбредных линий. У мышей-доноров СВА удаляли лимфатические узлы, бедренные и берцовые косточки. В опытах использовали консервирующий раствор ЦОЛИПК-3. На этом растворе готовили взвесь клеток лимфоузлов и костного мозга. К полученным суспензиям клеток добавляли глицерин в 7 или 5%-ных концентрациях и 10%-ную аутологическую сыворотку. Экспозиция клеток с глицерином составляла 30 или 60 мин.

В первой серии экспериментов интактные и обработанные 7 и 5%-ным глицерином клетки лимфоузлов мышей СВА в равной концентрации вводили мышам-реципиентам (СВА × C57B*l*/6) F_1.

Во второй серии опытов к разным концентрациям клеток костного мозга мышей СВА (интактных или обработанных глицерином) добавляли интактные клетки костного мозга мышей C57B*l*/6 в концентрации $0{,}5 \times 10^6$. Смесь клеток вводили мышам-гибридам (СВА × C57B*l*/6) F_1.

Суспензию клеток вводили через 20—22 ч. Иммунологические свойства лимфоцитов определяли методом учета инактивации несингенных стволовых клеток и методом учета отмены эндогенного колониеобразования [2].

Морфологическую сохранность клеток определяли с помощью суправитальной окраски 1%-ным раствором эозина и подсчетом количества ядросодержащих клеток в камере Горяева. При трансплантации реципиентам клеточных суспензий производился пересчет на количество «живых» (морфологических сохранных) клеток. На девятый день после трансплантации клеток у реципиентов извлекали селезенки, фиксировали их в растворе Буэна и 10%-ном растворе формалина. Визуально подсчитывали число макроскопически видимых колоний в каждой селезенке. Вычисляли индекс инактивации. Результаты опытов обрабатывались статистически, достоверность различий определяли по критерию Стьюдента.

Собственные исследования. В табл. 1 приведены данные об изменении гомотрансплантационной активности лимфоцитов из лимфоузлов мышей СВА под влиянием 7%-ного глицерина. Добавление к интактным клеткам 7%-ного глицерина приводит к значительному снижению эффекта инактивации несингенных КОЕ. Причем данное явление праКнии гомотрансплантационной активности лимфоцитов из лимфоузлов с 7%-ным глицерином (30 или 60 мин).

Результаты по влиянию 7%-ного глицерина на иммунологическую активность лимфоцитов костного мозга представлены в табл. 2. Показано, что при введении свежего костного мозга мышей C57B*l*/6 с клетками костного мозга мышей СВА, обработанными 7%-ным глицерином

Матеріал, захищений авторським правом

Таблица 1. **Изменение инактивации эндогенных КОЕ под влиянием 7 %-ного глицерина при трансплантации клеток лимфатических узлов мышей линии СВА (СВА×С57Bl/6) F_1**

Количество введенных клеток лимфоузлов мышей СВА×10^6	Трансплантация интактных клеток лимфоузлов			Трансплантация клеток лимфоузлов с глицерином					
				Экспозиция 30 мин			Экспозиция 60 мин		
	Количество использованных мышей	Количество колоний в селезенке (M±м)	Индекс инактивации КОЕ, %	Количество использованных мышей	Количество колоний в селезенке (M±м)	Индекс инактивации КОЕ, %	Количество использованных мышей	Количество колоний в селезенке (M±м)	Индекс инактивации КОЕ, %
0,5	27	8,6±0,3	14,9	32	8,0±0,3	10,1	34	10,3±0,2	0
1,0	24	4,7±0,5	53,5	32	7,4±0,2	16,9	32	6,8±0,2	23,6
2,0	26	1,8±0,2	82,2	32	3,7±0,2	58,4	34	3,9±0,1	56,2
4,0	34	0,7±0,07	93,1	33	0,6±0,03	93,3	36	0,1±0,03	98,9
—	36	10,1±0,2		30	8,9±0,2	—	30	8,9±0,2	—

Примечание. При трансплантации реципиентам клеточной суспензии интактных лимфоцитов производился пересчет на количество «живых» (морфологически сохранных) клеток.

в течение 30 мин, значительно снижена или полностью отсутствует инактивация стволовых клеток-мишеней (С57Bl/6) клетками-киллерами (СВА).

Таблица 2. **Образование экзогенных колоний в селезенке мышей-гибридов F_1 при введении им смеси интактного костного мозга мышей С57Bl6 с клетками костного мозга мышей СВА, обработанных 7%-ным глицерином**

Доноры и количество клеток		Соотношение взаимодействующих клеток	Среднее число колоний в селезенке (M±м)	Индекс инактивации КОЕ, %	Количество мышей
Костный мозг мышей СВА×$\times 10^6$	Костный мозг мышей С57Bl6×10^6				
0,5	0,5	1:1	26,0±0,6	0	27
2,0	0,5	4:1	35,8±0,6	8,2	24
4,0	0,5	8:1	32,1±0,2	26,2	28
—	0,5	—	6,5±0,3	—	25
0,5	—	—	16,8±0,5	—	25
2,0	—	—	32,1±0,2	—	28
0,4	—	—	36,6±0,5	—	26
Контроль	—	—	0,4±0,1	—	18

В наших опытах только восьмикратное увеличение клеток-киллеров, обработанных 7%-ным глицерином, дало инактивацию, равную 26%. В следующей серии экспериментов изучено влияние 5%-ного глицерина на иммунологическую активность лимфоцитов.

При трансплантации клеток лимфоузлов мышей СВА с 5%-ным глицерином отмечена высокая инактивация эндогенного колониеобразования в одинаковой степени при экспозиции клеток с глицерином в течение 30 и 60 мин. Причем индекс инактивации высокий (41,1; 60,8%) при дозе клеток, равной $0,5 \times 10^6$ и еще больше повышается с увеличением количества вводимых клеток (табл. 3). Следовательно, под влиянием 5%-ного глицерина лимфоциты не потеряли инактивирующей способности по отношению к эндогенным КОЕ.

Микроскопическое исследование гемопоэтических колоний в селезенках смертельно облученных реципиентов подтвердило, что под влиянием 7%-ного глицерина инактивирующая активность лимфоцитов против эндогенных и экзогенных КОЕ снижается. На дифференцировку КОЕ 7%-ный глицерин влияния не оказывает (Э/М-2,1—3,3); 5%-ный глицерин не снижает инактивирующую способность лимфоцитов по

Матеріал, захищений авторським правом

Таблица 3. **Изменение инактивации эндогенных КОЕ под влиянием 5 %-ного глицерина при трансплантации клеток лимфатических узлов мышей линии СВА реципиентам (СВА×С57Bl/6) F_1**

Количество введенных клеток лимфоузлов мышей СВА×10^6	Трансплантация клеток лимфоузлов с 5 %-ным глицерином					
	Экспозиция 30 мин			Экспозиция 60 мин		
	Количество использованных мышей	Количество колоний в селезенке (M±m)	Индекс инактивации КОЕ, %	Количество использованных мышей	Количество колоний в селезенке (M±m)	Индекс инактивации КОЕ, %
0,5	39	9,3±0,3	41,1	27	6,2±0,1	60,8
1,0	36	4,3±0,3	73,6	23	5,1±0,5	67,8
2,0	32	0,6±0,05	96,3	28	1,7±0,1	89,3
4,0	28	0,2±0,01	98,7	27	0,4±0,02	97,5
—	35	15,8±0,3	—	35	15,8±0,3	—

отношению к эндогенным КОЕ. При этом инактивация КОЕ сопровождается сдвигами в дифференцировке в сторону увеличения эритробластического ростка (Э/М-4,5—5,1).

Выводы 1. Установлена минимальная концентрация глицерина (7%), вызывающая торможение гомотрансплантационной активности лимфоцитов против эндогенных и экзогенных КОЕ. 2. Показано, что 5%-ный глицерин не обладает этим свойством.

1. *Влияние* криоконсервирования на гомотрансплантационную активность лимфоцитов / Л. А. Данилова, А. Г. Федотенков, Р. В. Петров и др.— Пробл. гематологии и переливания крови, 1978, № 12, с. 21—25.
2. *Петров Р. В., Сеславина Л. С.* Инактивация «стволовых» клеток при контакте генетически несовместных клеточных взвесей из лимфоидных тканей.— Докл. АН СССР, 1967, **176**, № 5, с. 1170—1173.
3. *Федотенков А. Г., Данилова Л. А., Игнашева Л. П.* Снижение гомотрансплантационной активности лимфоцитов кроветворной ткани.— Иммунология, 1981, № 5, с. 22—26.

Центральный научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови МЗ СССР

Поступила в редколлегию 18.01.82

УДК 57.043 : 612.111.014.41

И. А. Кочережская, В. И. Вишневский, Г. А. Инютин

ВЛИЯНИЕ ОТМЫВАНИЯ ОТ ПЭО-1500 НА ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ЭРИТРОЦИТОВ

Целью исследования защитных свойств внеклеточных криопротекторов, к которым относится и ПЭО-1500, была разработка методов приготовления консервированного материала, позволивших бы использовать размороженные клетки без предварительного отмывания [8]. Однако в организме реципиента эритроциты подвергаются естественному отмыванию плазмой. Поэтому функциональное состояние перелитых клеток будет определяться не только их морфологической целостностью после консервирования, но и обратимостью изменений, вызванных в клетке криопротектором.

Эти изменения затрагивают как мембрану клетки [1, 2], так и ее цитоплазму [3]. Поэтому важное значение имеет изучение обеих структур в процессе отмывания эритроцитов от криопротектора. Новые перспективы в плане таких исследований дает применение биофизических методов. К числу информативных методов в биофизике клетки относится и электроспектроскопия. Многочисленными исследованиями доказана тесная связь электрических характеристик клеток с морфо-функциональным состоянием биологических субстратов, что позволяет

Матеріал, захищений авторським правом

использовать эти параметры для тестирования исследуемых объектов в норме и при воздействии различных физико-химических факторов [6, 7].

Задачей настоящего исследования явилось изучение обратимости изменений электрических параметров эритроцитов, вызванных экспозицией клеток в растворах ПЭО-1500 различных концентраций, приготовленных на дистиллированной воде и физиологическом растворе.

Методика эксперимента. Исследования проводили на эритроцитах донорской крови, стабилизированной глюкозно-цитратной средой № 7б, сроком хранения не более трех суток при 2—4° С. После естественного осаждения эритроцитов в течение первых суток хранения снимали плазму и удаляли пленку лейкоцитов. Суспензию эритроцитов центрифугировали 15 мин при 2500 об/мин на центрифуге Т23 (фирмы Янецки).

Отмывание эритроцитов от плазмы проводили следующим образом: центрифугированные эритроциты разбавляли (1 : 2) физиологическим раствором, затем полученную суспензию центрифугировали при тех же условиях, надосадок снимали. Процедуру отмывания повторяли еще раз, pH физиологического раствора не корректировали.

В зависимости от задачи эксперимента ПЭО-1500 приготавливали на дистиллированной воде или физиологическом растворе. pH растворов криопротекторов корректировали трис-буфером и 0,1 н. HCl до 6,8—7,2. Растворы ПЭО-1500 5, 15 и 25%-ной концентрации добавляли к суспензии эритроцитов в объемном отношении 1 : 1. Криопротектор добавляли по каплям при одновременном перемешивании суспензии. Время экспозиции с ПЭО-1500 — 15 мин.

Эритроциты, экспонированные с водными растворами ПЭО-1500, отмывали аутоплазмой, с растворами ПЭО-1500, приготовленными на физиологическом растворе,— физиологическим раствором. Процедура отмывания заключалась в следующем: суспензию эритроцитов с криопротектором центрифугировали 15 мин при 2500 об/мин, надосадочную жидкость снимали, к эритроцитам по каплям добавляли отмывающую среду в соотношении 1 : 1 в случае использования аутоплазмы и 1 : 2 — при использовании физиологического раствора. Полученную суспензию перемешивали и центрифугировали при тех же условиях. Аналогично проводили второе отмывание.

Установка для измерения электрических параметров крови в диапазоне частот 30 Гц — 1,5 МГц состоит из моста полных проводимостей СВМ 3—2 фирмы РФТ (ГДР), питающее напряжение подается от генератора Г3-33 или Г3-41 в зависимости от рабочей частоты. Индикатором баланса моста служит ламповый вольтметр В3-13. На частоте 30 МГц активную составляющую импеданса определяли с помощью автоматического измерителя полных сопротивлений и комплексных коэффициентов передачи типа ИПСа-1, разработанного в Институте радиофизики и электроники АН УССР. Исследуемые суспензии термостатировали при $25 \pm 0{,}1$° С. Напряжение на измерительных электродах, выполненных из черненой платины, не превышает 0,03 В.

Состояние мембраны эритроцитов оценивали по ее поляризационным свойствам. Коэффициент поляризации мембран эритроцитов определяли отношением

$$K_{\text{п}} = \frac{\varkappa_{10^6}}{\varkappa_{10^4}},$$

где $\varkappa_{10^6}$, $\varkappa_{10^4}$ — удельная электропроводность суспензии эритроцитов соответственно на частотах 10^6 и 10^4 Гц [5]. Значения $K_{\text{п}}$ соответствуют концентрации эритроцитов в суспензии $\rho_{\text{г}} = 0{,}7$. Погрешность определения $K_{\text{п}}$ не превышает 1,5%.

При оценке электрических свойств клетки важное значение имеет исследование электрических параметров содержимого эритроцитов.

Матеріал, захищений авторським правом

Для определения удельной электропроводности цитоплазмы эритроцитов использована методика, основанная на измерении электропроводности суспензии эритроцитов на двух частотах [9]. Метод позволяет исследовать содержимое клетки непосредственно в изучаемой среде без повреждения мембраны. Удельная электропроводность внутренней фазы определяется по формуле

$$\varkappa_{ц} = \varkappa_{пл} \frac{\varkappa_{в.ч} - \varkappa_{н.ч}}{\varkappa_{пл} - \varkappa_{н.ч}},$$

где $\varkappa_{ц}$, $\varkappa_{пл}$, $\varkappa_{в.ч}$, $\varkappa_{н.ч}$ — удельные электропроводности цитоплазмы, суспензионной среды на частоте 10 кГц и суспензии на высокой (30 МГц) и низкой (10 кГц) частотах. Относительная погрешность измерения $\varkappa_{ц}$ эритроцитов данным методом не превышает 3%. Уровень свободного гемоглобина в суспензионной среде опре-



Рис. 1. Коэффициент поляризации мембран эритроцитов, экспонированных с различными концентрациями ПЭО-1500 (растворенного в дистиллированной воде):

1 — с криопротектором, *2* — первое, *3* — второе отмывание аутоплазмой. $K_{п}$ контрольных эритроцитов в плазме — 1,45 ± 0,03.

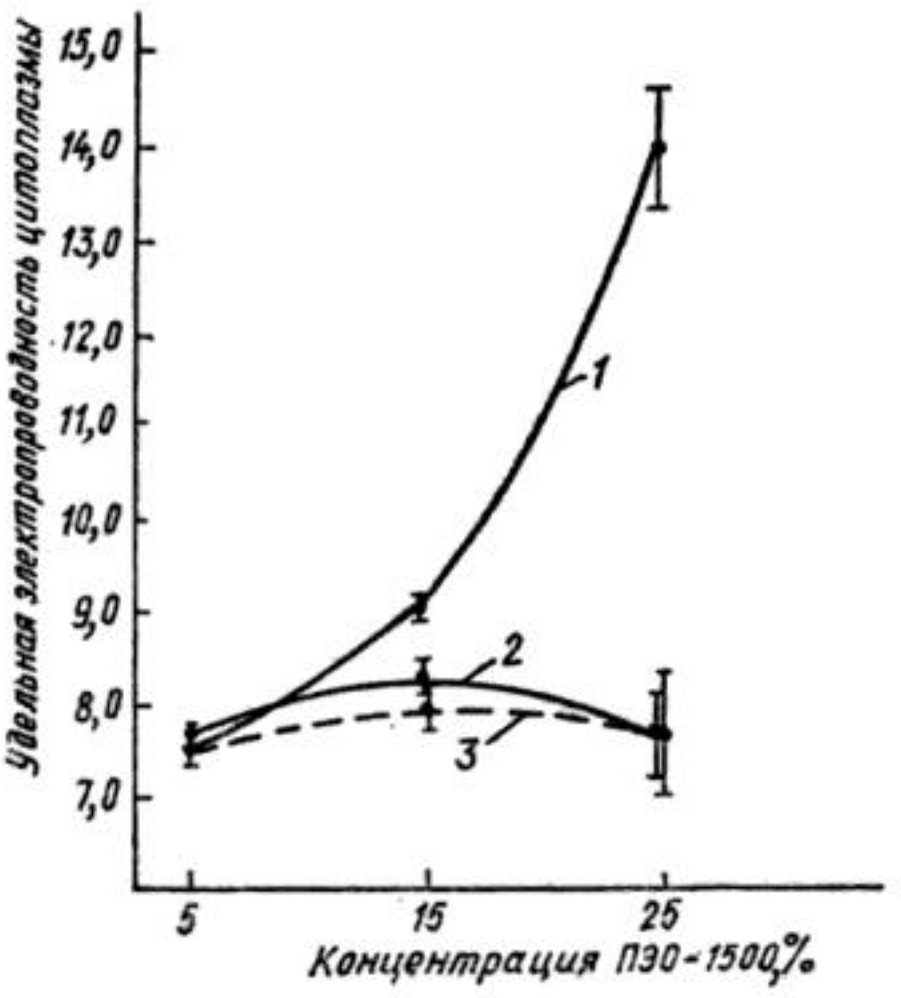


Рис. 2. Удельная электропроводность цитоплазмы эритроцитов, экспонированных с различными концентрациями ПЭО-1500 (растворенного в дистиллированной воде):

1 — с криопротектором, *2* — первое, *3* — второе отмывание аутоплазмой. $\varkappa_{ц}$ -контрольных эритроцитов в плазме — (8,06 ± 0,14) × × 10⁻¹ См·м⁻¹

деляли фотокалориметрически по методике М. А. Рождественской [4].

Результаты и их обсуждение. Отмывание аутоплазмой эритроцитов, экспонированных с ПЭО-1500, приготовленном на дистиллированной воде, приводит к значительному снижению коэффициента поляризации мембран по сравнению с эритроцитами в криопротекторе (рис. 1). При этом наблюдается различие в степени изменения $K_{п}$ для эритроцитов, контактировавших с различными концентрациями ПЭО-1500. Лучше всего переносят отмывание эритроциты, к которым добавляется 15%-ный ПЭО-1500. В этом случае осмотичность суспензионной среды близка к области изотонии для эритроцитов [3]. $K_{п}$ отмытых от 5%-ного ПЭО-1500 эритроцитов снижается по сравнению с $K_{п}$ для контрольных эритроцитов в плазме, что свидетельствует о повреждении мембраны. Коэффициент поляризации мембран эритроцитов, к суспензии которых добавлялся 25%-ный криопротектор, после отмывания принимает значения в пределах контроля, однако большой разброс в значениях $K_{п}$ для эритроцитов разных доноров свидетельствует об их различной чувствительности к процедуре отмывания, а, следовательно, и о наличии большей вероятности повреждения. Это подтверждается уменьшением $K_{п}$ после повторного отмывания плазмой. То же самое можно сказать и о повторном отмывании выдержанных с 5 %-ным ПЭО-1500 эритроцитов. Коэффициент поляризации мембран ниже уровня контроля, хотя частично поляризационные свойства мембраны вос-

Матеріал, захищений авторським правом

станавливаются. Коэффициент поляризации мембран эритроцитов, выдержанных в изотоническом растворе криопротектора (15%), после второго отмывания существенно не отличается от контроля.

Таким образом, поляризационные свойства мембран эритроцитов, экспонированных с различными концентрациями ПЭО-1500, приготовленными на дистиллированной воде, после отмывания аутологичной плазмой восстанавливаются в случае использования изотонических концентраций криопротектора.

Аналогичный вывод можно сделать и об изменении удельной электропроводности цитоплазмы



Рис. 3. Коэффициент поляризации мембран эритроцитов, экспонированных с различными концентрациями ПЭО-1500 (растворенного в физиологическом растворе):
1 — с криопротектором, *2* — первое, *3* — второе отмывание физиологическим раствором. $K_п$ контрольных эритроцитов в физиологическом растворе — 1,160 ± 0,004.

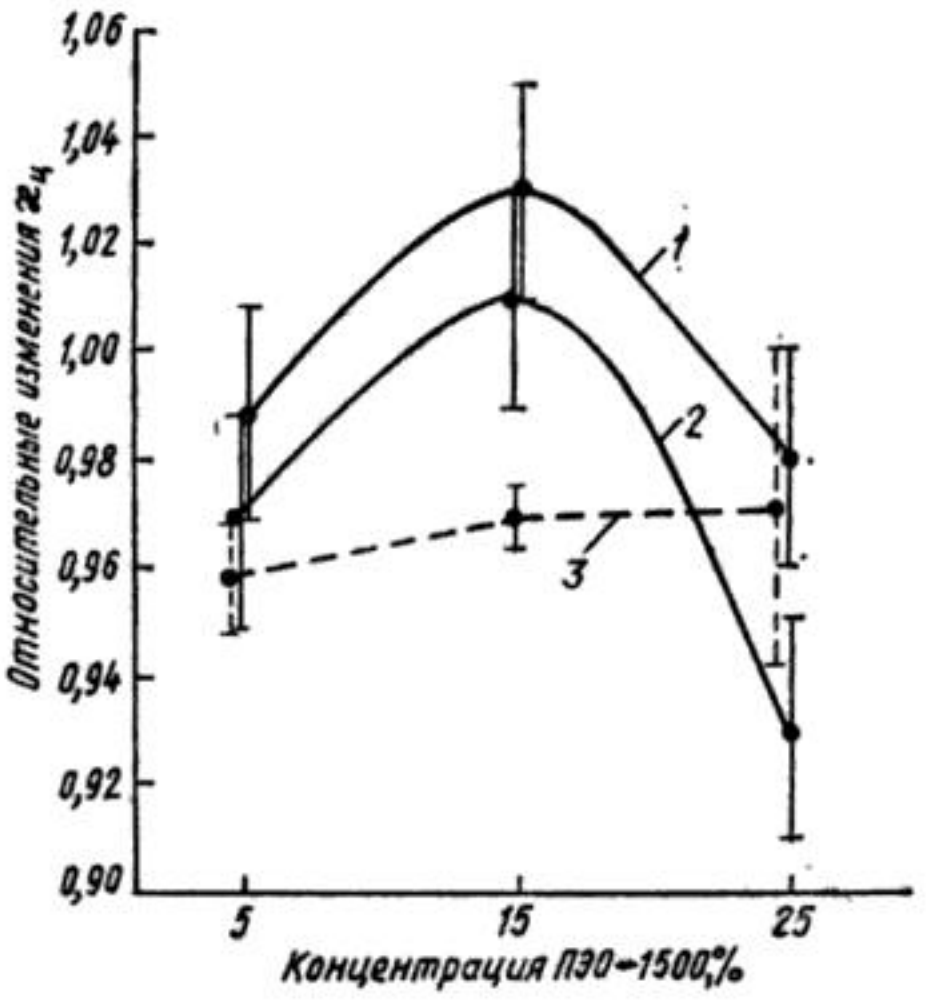


Рис. 4. Относительные изменения удельной электропроводности цитоплазмы эритроцитов, экспонированных с различными концентрациями ПЭО-1500 (растворенного в физиологическом растворе):
1 — с криопротектором, *2* — первое, *3* — второе отмывание физиологическим раствором. Контроль — эритроциты в физиологическом растворе.

эритроцитов, контактировавших с водными растворами ПЭО-1500, после отмывания аутоплазмой. Отмывание плазмой эритроцитов, экспонированных с 5%-ным ПЭО-1500, как первое, так и повторное, приводит к снижению $\varkappa_ц$ по сравнению с контрольными эритроцитами, что свидетельствует о невосстанавливаемости внутреннего состава эритроцитов, поврежденных в гипотонических растворах 5%-ным ПЭО-1500 (рис. 2). Отмывание от изотонических концентраций криопротектора (15% в добавляемом растворе) приводит к восстановлению исходных значений удельной электропроводности цитоплазмы эритроцитов. Отмывание от 25%-ного ПЭО-1500 приводит к снижению значений $\varkappa_ц$ по сравнению с эритроцитами в криопротекторе, однако наблюдается большой разброс в величинах удельной электропроводности цитоплазмы эритроцитов для разных доноров, что свидетельствует о некоторой индивидуальной чувствительности эритроцитов разных доноров к отмыванию от гиперосмотических сред, хотя часть эритроцитов восстанавливает электрические свойства цитоплазмы. В этом случае электропроводность цитоплазмы эритроцитов большинства доноров ниже контроля, что свидетельствует о необратимой потере клеткой носителей заряда или же об оводнении клетки. Оба эти процесса предшествуют гемолизу.

Отмывание физиологическим раствором эритроцитов, выдержанных с различными концентрациями ПЭО-1500, приготовленными на физиологическом растворе, также приводит к снижению коэффициента поляризации мембран эритроцитов по сравнению с эритроцитами в криопротекторе (рис. 3). При этом $K_п$ отмытых эритроцитов, экспонированных с 5 и 15%-ным криопротектором, не достигает уровня $K_п$ для

Матеріал, захищений авторським правом

контроля, а $K_п$ отмытых от 25%-ного ПЭО-1500 эритроцитов — ниже уровня контроля. Повторное отмывание физиологическим раствором снижает средние значения $K_п$- мембран эритроцитов, экспонированных с 5 и 15%-ным ПЭО-1500, до уровня контроля, хотя разброс в значениях $K_п$ в случае использования 5%-ного криопротектора очень велик. Отмывание от этих концентраций криопротектора приводит к незначительной потере гемоглобина клеткой, не превышающей терапевтически допустимую норму (таблица), в то время как отмывание от 25%-ного

Уровень свободного гемоглобина (мг·%) в суспензиях эритроцитов, экспонированных с различными концентрациями ПЭО-1500 (растворитель — физиологический раствор), на различных этапах отмывания от криопротектора физиологическим раствором

Этап отмывания	Концентрация ПЭО-1500, %			
	0	5	15	25
До отмывания (с ПЭО-1500)	7±2	29±4	37±12	26±6
После первого отмывания	—	45±5	54±5	1347±454
После второго отмывания	—	63±13	87±23	1518±508

ПЭО-1500 (особенно повторное) вызывает усиленный выход гемоглобина, что свидетельствует о существенном повреждении клетки при отмывании от гиперосмотической среды, хотя добавление физиологического раствора проводилось осторожно, по каплям. При этом коэффициент поляризации мембраны после первого отмывания снижается по сравнению с контролем в физиологическом растворе, а после второго отмывания повышается, что, по-видимому, отражает процесс последовательного повреждения мембраны — образование разрывов при первом отмывании и разрыхление мембраны после второго отмывания.

Электропроводность цитоплазмы эритроцитов, экспонированных с различными концентрациями ПЭО-1500, приготовленными на физиологическом растворе, после отмывания физиологическим раствором также изменяется, причем степень изменения зависит от концентрации криопротектора (рис. 4). Наибольшие изменения $\varkappa_ц$ после отмывания наблюдаются для эритроцитов, экспонированных с 25%-ным ПЭО-1500, что согласуется с результатами измерения выхода свободного гемоглобина из эритроцитов (см. таблицу). Некоторое снижение электропроводности цитоплазмы эритроцитов после отмывания (особенно повторного) наблюдается также и при экспонировании с 5%-ным криопротектором, однако оно не превышает 5%.

Выводы. Обратимость изменений электрических параметров эритроцитов, вызванных экспозицией с различными концентрациями ПЭО-1500, существенно зависит от осмотичности раствора криопротектора. Отмывание от ПЭО-1500, приготовленного как на дистиллированной воде, так и на физиологическом растворе, лучше переносят эритроциты, экспонированные в изотонических концентрациях криопротектора. Наблюдаемая невосстанавливаемость электрических свойств эритроцитов после отмывания от гипертонических растворов ПЭО-1500 связана, по-видимому, не со спецификой взаимодействия ПЭО-1500 с эритроцитами, а с осмотическим стрессом, возникающим на мембране при перенесении эритроцитов в изотонические условия.

1. *Бондаренко В. А., Бондаренко Т. П., Белоус А. М.* Взаимодействие полиэтиленоксидов с искусственными фосфолипидными и митохондриальными мембранами.— Криобиология и криомедицина, 1978, вып. 4, с. 7—9.
2. *Иванов Л. И., Гаврилова И. И., Моисеев В. А.* Исследование действия низких температур и криопротекторов на структуру мембран эритроцитов методом спиновых меток.— В кн.: Механизмы криоповреждения и криозащиты биологических структур. Киев : Наук. думка, 1977, с. 39—40.

Матеріал, захищений авторським правом

3. *Кулешова Л. Г., Розанов Л. Ф.* Изучение кинетики взаимодействия эритроцитов человека с криопротекторами и солями.— Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 7, с. 40—44.
4. *Рождественская М. А.* Определение гемоглобина в плазме консервированной крови.— В кн.: Актуальные вопросы переливания крови. М.: Медгиз, 1955, с. 55—56.
5. *Тарусов Б. Н.* Электропроводность как метод определения жизнеспособности тканей.— Арх. биол. наук, 1938, 52, № 2, с. 178—181.
6. *Диэлектрическая* спектроскопия крови. I. Диэлектрические спектры нормальной крови человека/Т. Л. Челидзе, В. Д. Кикнадзе, Г. Е. Кевлишвили, В. Т. Чхаидзе.— Биофизика, 1973, 18, вып. 5, с. 932—935.
7. *Челидзе Т. Л., Кикнадзе В. Д., Кевлишвили Г. Е.* Диэлектрическая спектроскопия крови. IV. Диэлектрические спектры крови при физико-химическом воздействии.— Там же, 1974, 19, вып. 3, с. 479—484.
8. *Полиэтиленоксиды* в низкотемпературном консервировании эритроцитов (некоторые итоги и перспективы)/М. И. Шраго, Л. П. Бредихина, В. Г. Тимченко и др.— Криобиология и криомедицина, 1978, вып. 4, с. 38—45.
9. *Krupa J., Kwiatkowski B., Terlecki B.* Methode zur Leitfähigkeitbestimmung des Inneren der menschlichen Erythrozyten auf der Grundlage der Messung elektrischer Gröben der Suspension.— Biophysik, 1972, 8, S. 227—236.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР
Институт радиофизики
и электроники АН УССР

Поступила в редколлегию
26.01.82

УДК 57.043 : 547.422 : 53.082.4

В. М. Куракса, М. Б. Милешкин

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА МЕХАНИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ СТРУКТУРЫ ТВЕРДОЙ ФАЗЫ ПРИ НЕРАВНОВЕСНОМ ЗАМОРАЖИВАНИИ И ОТОГРЕВЕ ЖИДКОСТЕЙ

В процессе криоконсервация клеточных суспензий при температурах ниже точки фазового перехода жидкость — твердое тело образуется сложная композитная структура, представляющая собой включения клеток, расположенных в матричной среде криопротектора. При реальных режимах замораживания и отогрева в объеме клеточной суспензии имеет место значительный градиент температур. Наличие температурного градиента, а также фазового перехода, связанного с изменением объема, приводит к возникновению в объеме материала механических напряжений. При напряжениях, превышающих предел прочности материала, происходит нарушение сплошности матричной среды. Явлениями, приводящими к нарушению сплошности твердой фазы среды, могут быть: движения дислокационных скоплений, возникновение микро- и макротрещин. Из материаловедения известно, что подобные явления, а также фазовые превращения, связанные с изменением объема, сопровождаются излучением звуковых волн различной частоты и интенсивности [2, 5, 7]. Эти звуковые волны могут фиксироваться специальной аппаратурой [1, 3]. В литературе для обозначения процесса излучения таких волн принят термин акустическая эмиссия (АЭ).

Процессы нарушения внутренней структуры матричной среды затвердевшего криопротектора могут захватывать и клеточные включения.

Таким образом, изучение таких процессов связано с необходимостью конкретизации механизмов повреждения клеток затвердевшей внеклеточной средой. В настоящее время таким механизмом, в основном, считается механическое давление окружающей среды на клетки [4].

В работе [6] указывается, что необходимо учитывать возможность повреждения клеток микро- и макротрещинами, возникающими в среде затвердевшего криопротектора. В этой работе методами оптической

Матеріал, захищений авторським правом

микроскопии и термографического анализа фиксировались температура и время возникновения микро- и макротрещин при охлаждении растворов глицерина эвтектических концентраций. Однако применяемые в этой работе методики не позволили провести количественную оценку возникающих повреждений.

Настоящая работа выполнена с целью получения количественных оценок обобщенных процессов перестройки внутренней структуры твердой фазы в процессе неравновесного замораживания и отогрева жидкостей. Представляет интерес сравнение таких оценок для жидкостей разной природы.

Материалы и методы. В качестве объектов исследования выбраны: дистиллированная вода, 40%-ный водный раствор полиэтиленгликоля (ПЭГ) с молекулярной массой 1500 и 100%-ный этиленгликоль. Методика исследований заключалась в регистрации сигналов АЭ, возникающих при образовании и развитии структурных нарушений в твердой фазе в процессе неравновесного замораживания и отогрева жидкостей.

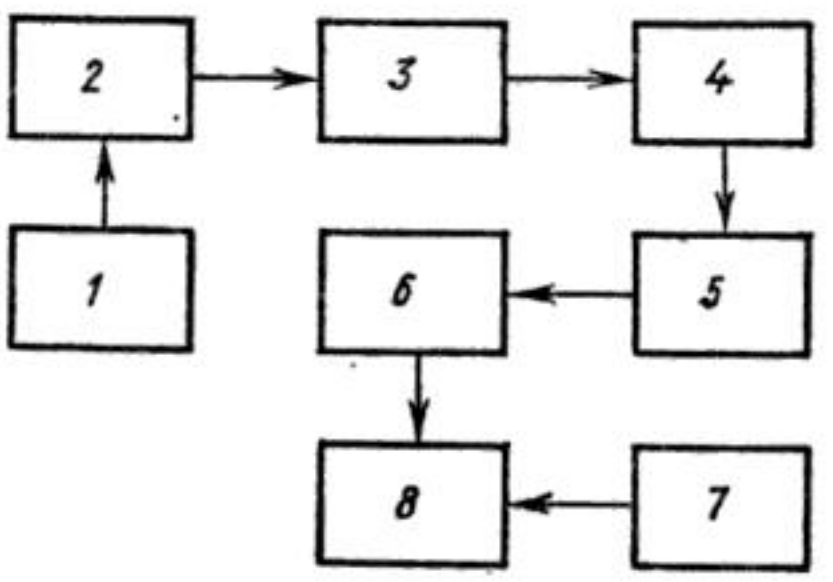


Рис. 1. Функциональная схема регистрирующей аппаратуры:

1 — датчик, *2* — предусилитель, *3* — блок фильтров, *4* — усилитель мощности, *5* — амплитудный дискриминатор, *6* — счетчик импульсов, *7* — цифропоказывающий милливольтметр, *8* — кинокамера.

Принцип измерения основан на применении регистрирующего резонансного датчика — велосиметра из титаната-цирконата свинца (ТЦС), преобразующего механические колебания в электрические.

Установка, использованная в работе, состоит из измерительной ячейки с исследуемым раствором, в котором устанавливается титановый звуковод с жестко закрепленным датчиком. Температура объекта измерялась дифференциальной медь-константановой термопарой. Измерительная ячейка с исследуемым раствором погружалась в дьюар, заполненный рабочей жидкостью, которой являлся жидкий азот или смесь спирта с глицерином при температуре +40° С в зависимости от режима охлаждения или отогрева. Функциональная схема регистрирующей аппаратуры представлена на рис. 1.

Сигнал АЭ с датчика ТЦС *1* усиливается предусилителем *2*, затем в блоке фильтров *3* выделяется сигнал, соответствующий резонансной частоте датчика 200 кГц. Этот сигнал усиливается в усилителе мощности *4* и подается на амплитудный дискриминатор *5*, позволяющий производить отстройку по амплитудному принципу от помех и устанавливать три различных уровня энергии, при превышении которых происходит регистрация сигнала.

В настоящей работе уровни энергии выбраны так, что амплитуды сигналов, приведенных ко входу предусилителя, превышали 5, 15, 50 мкВ соответственно.

С амплитудного дискриминатора *5* сигнал поступает на счетчики числа импульсов *6* (тип Ф5007), которые регистрируют общее число импульсов звукового сигнала, прошедшее через соответствующие уровни дискриминации. Показания термопары фиксируются цифропоказывающим милливольтметром *7* (тип Щ 4310) с точностью до 0,01 mV. Показания цифропоказывающих приборов *6* и *7* регистрируются покадровой съемкой кинокамерой *8*. После опыта пленка проявляется, показания приборов записываются и вводятся затем в ЭВМ-СМ-1. После машинной обработки результаты получаются в виде зависимости общего числа импульсов АЭ от температуры — $N = F\ (T°)$. Кроме того, вычисляются значения интенсивности АЭ, т. е. отношение приращения числа импульсов АЭ к приращению температуры $I = \frac{\Delta N}{\Delta T°}$.

Матеріал, захищений авторським правом

Результаты и обсуждение. Результаты опытов хорошо воспроизводятся при идентичности режимов замораживания и отогрева. На рис. 2 показан характер изменения общего числа импульсов в зависимости от текущей температуры (активность АЭ), полученный при охлаждении дистиллированной воды. Как видно из рис. 2, кривые активности АЭ, полученные для различных уровней дискриминации, регистрируемого сигнала, имеют одинаковый характер. Уменьшение количества импуль-

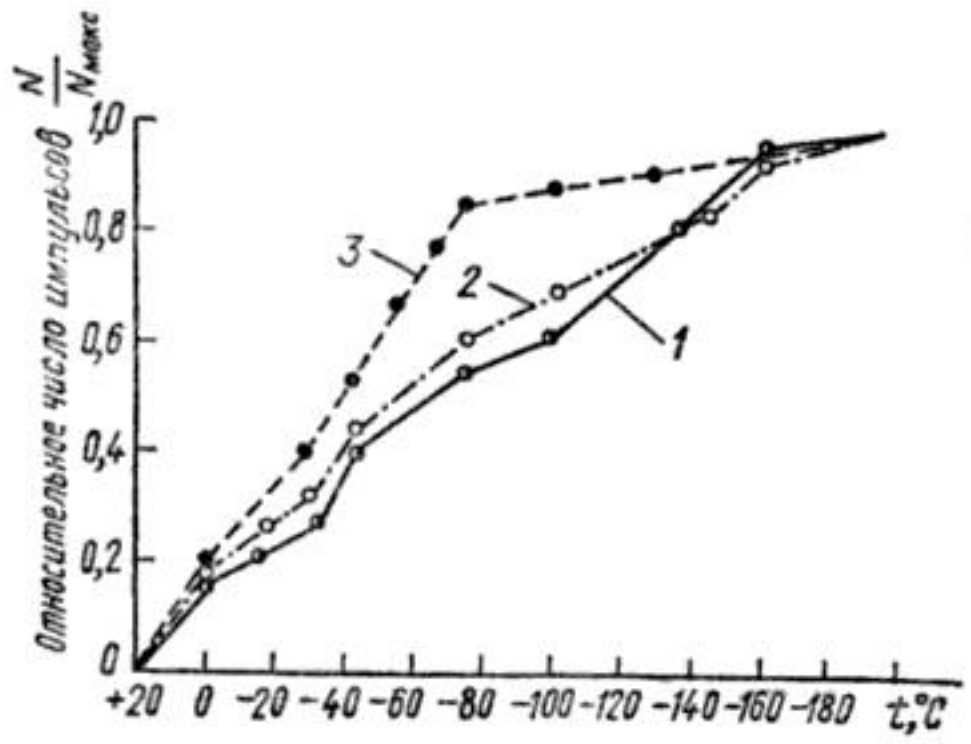


Рис. 2. Зависимость активности акустической эмиссии от текущей температуры при замораживании дистиллированной воды:

1 — количество импульсов АЭ, прошедших по первому уровню дискриминации Nмакс — $6 \cdot 10^5$ имп, порог дискриминации — 5 мкВ; *2* — количество импульсов АЭ, прошедших по второму уровню дискриминации $N_{макс}$ — $1{,}6 \cdot 10^5$ имп, порог дискриминации — 15 мкВ; *3* — количество импульсов АЭ, прошедших по третьему уровню дискриминации Nмакс — $1{,}6 \cdot 10^4$ имп, порог дискриминации — 50 мкВ.

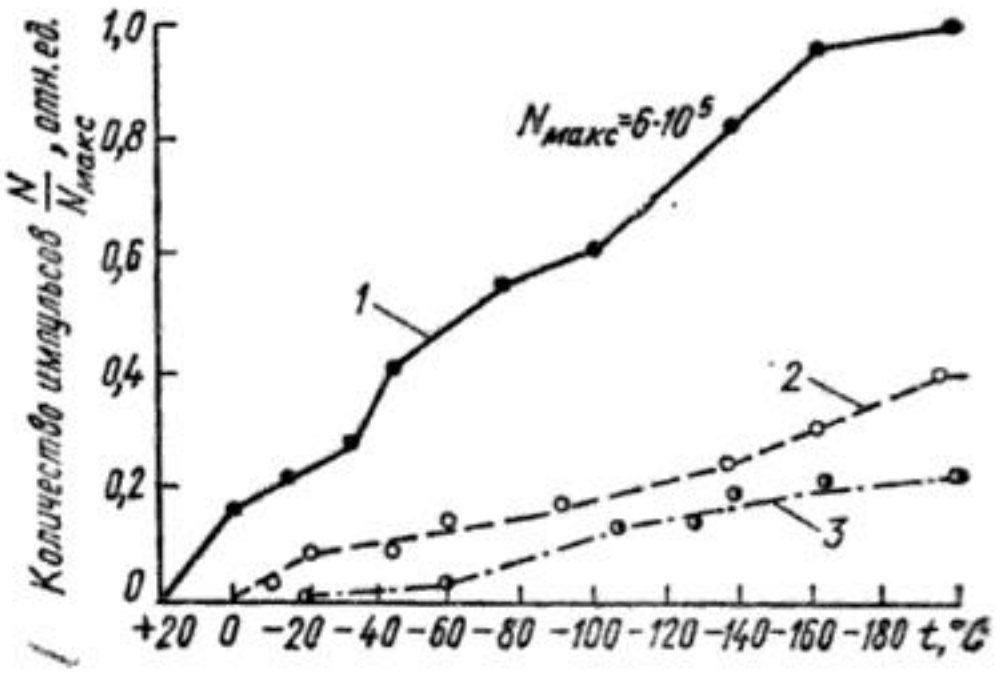


Рис. 3. Зависимость акустической эмиссии от текущей температуры при замораживании жидкостей:

1 — активность АЭ при замораживании дистиллированной воды, *2* — активность АЭ при замораживании 40%-ного водного раствора ПЭГ-1500, *3* — активность АЭ при замораживании 100%-ного ЭГ.

сов, зарегистрированное на втором и третьем уровнях дискриминации, отвечает возрастанию порога дискриминации. Аналогичные зависимости получены для 40%-ного раствора ПЭГ-1500 и 100%-ного ЭГ. В дальнейшем сравнения кривых активности АЭ будем проводить по первому — самому чувствительному уровню с низким порогом дискриминации сигнала. На рис. 3 в едином масштабе представлены кривые активности АЭ, полученные для воды, 40%-ного раствора ПЭГ-1500 и 100%-ного ЭГ в процессе охлаждения от комнатной до азотной температур. Из рис. 3 видно уменьшение активности АЭ при охлаждении 40%-ного водного раствора ПЭГ-1500 и 100%-ного ЭГ по сравнению с активностью АЭ при охлаждении воды с идентичными условиями замораживания. Кривые активности АЭ, полученные при отогреве исследуемых веществ от азотной до комнатной температуры, представлены на рис. 4. Кривые активности АЭ, полученные при отогреве исследованных жидкостей, показывают уменьшение количества импульсов АЭ, полученных при отогреве 40%-ного водного раствора ПЭГ-1500 и 100%-ного ЭГ по сравнению с теми же показателями для воды. В табл. 1 представлены количественные характеристики активности и интенсивности АЭ в исследованных веществах в процессе замораживания

Таблица 1. **Количественные показатели активности и интенсивности АЭ**

Вещество	Активность АЭ при охлаждении	Активность АЭ при отогреве	Максимальная интенсивность АЭ при охлаждении	Максимальная интенсивность АЭ при отогреве
Вода	$6{,}0 \cdot 10^5$	$7 \cdot 10^4$	$1{,}9 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4$
40 %-ный ПЭГ-1500	$2{,}3 \cdot 10^4$	$2{,}9 \cdot 10^4$	$8 \cdot 10^3$	$6 \cdot 10^2$
100 %-ный ЭГ	$1{,}4 \cdot 10^5$	$2{,}7 \cdot 10^4$	$2{,}4 \cdot 10^3$	$8 \cdot 10^2$

Матеріал, захищений авторським правом

ния и отогрева. Из приведенных данных видно, что активность и интенсивность АЭ при отогреве приблизительно на порядок меньше соответствующих показателей при замораживании для всех исследованных жидкостей. Кроме того, в ряду активностей и интенсивностей АЭ явно видно уменьшение этих показателей для 40%-ного ПЭГ-1500 и 100%-ного ЭГ по сравнению с дистиллированной водой. Так, при охлаждении и отогреве активность АЭ в 40%-ном водном растворе ПЭГ-1500 ниже активности АЭ при охлаждении воды более, чем в два раза. Этот факт, а также связь АЭ с возникновением и развитием механических нарушений структуры твердой фазы позволяют указать на снижение степени нарушения внутренней структуры матричного раствора, как на один из возможных механизмов криопротекции.

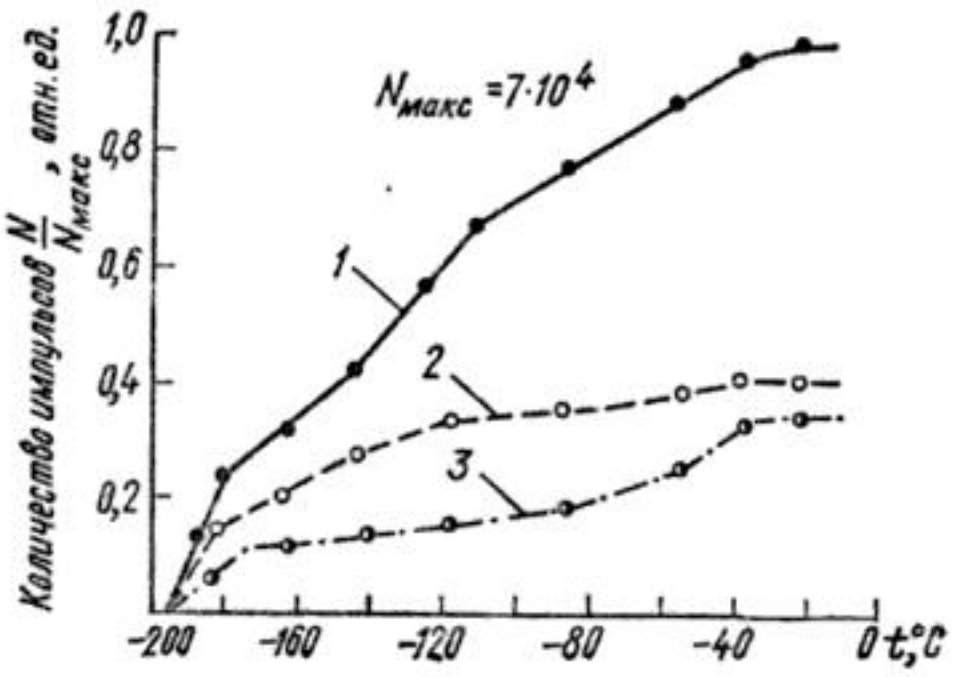


Рис. 4. Зависимость активности акустической эмиссии от текущей температуры при отогреве жидкостей:

1 — активность АЭ при отогреве дистиллированной воды. *2* — активность АЭ при отогреве 40%-ного водного раствора ПЭГ-1500. *3* — активность АЭ при отогреве 100%-ного ЭГ.

Из данных, приведенных в табл. 2, а также из характера кривых активности (см. рис. 3 и 4) видно, что для всех исследованных веществ при отогреве первый максимум интенсивности АЭ появляется при перенесении вещества из жидкого азота в спиртовоглицериновую баню с 40° С. Это свидетельствует о том, что в этот момент из-за значительных механических напряжений, связанных с резким градиентом температур на периферии и в центре исследуемых образцов, в них происходят значительные нарушения структуры. По тем же причинам значительные нарушения структуры образующейся твердой фазы появляются в режиме замораживания при погружении образцов ПЭГ-1500 и воды в жидкий азот.

Таблица 2. **Интервалы температуры, отвечающие максимальным значениям интенсивности АЭ**

Температурные интервалы максимального значения	Вода	ПЭГ-1500	100 % ЭГ
Охлаждение	0°С; от —30° до —40°С; от —100 до —150 °С	0°С; от —70 до —80°С; от —140 до —170 °С;	—60 °С; от —100 до —130 °С; от —170 до —180 °С;
Отогрев	от —196 до —180° С; от —140 до —120 °С; от —50 до —400 °С	от —196 до —180 °С; от —140 до —120 °С;	от —196 до —180 °С; от —60 до —40 °С

Выводы 1. Доказана возможность применения метода АЭ к исследованию структурных нарушений в твердой фазе при неравновесном замораживании и отогреве жидкостей на примере воды, 40%-ного водного раствора ПЭГ-1500 и 100%-ного ЭГ. 2. Количественно показана меньшая степень нарушений структуры твердой фазы изученных веществ при отогреве по сравнению с нарушениями структуры при охлаждении. 3. Указаны температуры, при которых реализуется наибольшая интенсивность АЭ для исследованных веществ в режиме охлаждения и отогрева.

1. *Авербух И. И., Вайнберг В. Е.* Области применения ультразвуковой эмиссии.— Дефектоскопия, 1972, № 4, с. 49—54.
2. *Бойко В. С., Гарбер Р. И., Кривенко Я. Ф.* Звуковая эмиссия при аннигиляции дислокационного скопления.— Физика твердого тела, 1974, 16, № 4, с. 1233—1235.

Матеріал, захищений авторським правом

3. *Минц Р. И., Мелехин В. П., Иевлев И. Е.* Акустическая идентификация структурных изменений кристаллической решетки.— В кн.: Неразрушающий контроль напряженно-деформированного состояния конструкционных материалов и изделий с использованием эмиссии волн напряжений: Тез. докл. Всесоюз. науч-техн. конф. Киев, 13—15 мая 1974. М., 1974, с. 12—15 (НТО Приборпром).
4. *Низкотемпературная* кристаллизация в биологических системах. Н. С. Пушкарь, А. М. Белоус, Ю. А. Иткин и др.— Киев : Наук. думка, 1977.— 240 с.
5. *Финкель В. М., Черный В. В., Головин Ю. И.* Акустическая эмиссия ветвящейся трещины.— В кн.: Вопросы металловедения и физики металлов. Тула : Тул. политехн. ин-т, 1972, с. 140—144.
6. *Kroener C., Luyet B.* Formation of cracks during the vitrification of glycerol solutions and disappearance of the cracks during rewarming.— Biodynamica, 1966, **10**, N 201, p. 47—53.
7. *Muller E. M.* Acustic amission bei fase transformation.— Metall, W — Berlin, 1978, 32, fer. 7, S. 681—685.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР
Институт проблем машиностроения АН УССР

Поступила в редколлегию
12.01.82

УДК 57.043 : 577.154 : 577.158.1 : 591.436.2

В. И. Луговой, Л. П. Кравченко, Л. В. Карева,
В. А. Коптелов, А. А. Мартыненко, О. А. Семенченко

МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ

Изолированные клетки печени (гепатоциты) представляют удобную in vitro систему для изучения влияния на них низкотемпературного фактора, поскольку полученная суспензия клеток является относительно однородной популяцией, что облегчает стандартизацию экспериментальных условий и интерпретацию полученных данных.

В литературе описан ряд методов получения изолированных клеток печени [1, 3, 5]. Все применяемые методы можно разделить на три типа: механический, химический, ферментативный. Наиболее простым методом считается механический, который основан на перфузии печени различными бескальциевыми растворами с последующей легкой гомогенизацией ткани. Суть химического метода заключается в том, что в перфузионную жидкость добавляют кальций-хелатирующие агенты, например, этилендиаминтетраацетат, тетрафенилборат и другие, которые облегчают отделение клеток друг от друга. Ферментативный метод получения изолированных клеток печени предусматривает при гомогенизации ткани, а иногда и при перфузии печени, использование ферментов (трипсин, проназу, коллагеназу, гиалуронидазу), разрушающих межклеточное вещество. Сравнение различных методов показывает, что при ферментативном методе выход клеток был минимальным, но зато наилучшим образом сохранялась их ультраструктура. Применение хелатирующих агентов, наоборот, давало максимальный выход клеток, однако структура их была несколько нарушена.

В задачу работы входили сравнение двух методов получения изолированных клеток печени белых крыс, оценка их пригодности для целей криобиологического эксперимента и возможная модификация этих методов с точки зрения улучшения морфо-функциональных характеристик клеток.

С этой целью для получения изолированных клеток печени применяли метод И. П. Канаевой и соавт. [1], который предусматривает использование в качестве диссоциирующего агента комплексон ЭДТА, а в качестве среды выделения — сбалансированный солями раствор 0,25 М сахарозы с 1%-ным альбумином для стабилизации клеточных мембран. Согласно данному методу, общий выход гепатоцитов составляет из печени массой 4—5 г $200 - 280 \times 10^6$ клеток, а на 1 млн изолированных клеток приходилось 0,9—1,2 мг белка.

Матеріал, захищений авторським правом

Изолирование клеток печени во втором случае проводили достаточно хорошо разработанным механическим методом [3], в который вносились лишь незначительные изменения В. К. Науменко и соавт. [2]. Авторы указывают, что в группе 18-месячных животных среднее содержание белка на 1 млн клеток составляло 2,07 мг.

Для опыта брали 2—3 крысы зрелого возраста (150—200 г). При получении изолированных клеток первым методом общий выход гепатоцитов из печени одного животного составлял 160—180 $\times 10^6$ клеток, а на 1 млн их приходилось 1,54 мг белка. При получении клеток механическим методом общий выход гепатоцитов из печени составлял 140—150 $\times 10^6$ клеток и на 1 млн их приходилось 1,48 мг белка. Белок определяли по методу [4], количество изолированных клеток печени подсчитывали в камере Горяева. Количество мертвых клеток контролировали окрашиванием их в 0,2%-ном растворе витального красителя (трипанового синего).

Анализ данных показал, что выделенные гепатоциты первым и вторым методами представлены однородной популяцией паренхиматозных клеток, которые имеют округлую форму с четко выраженными контурами плазматической мембраны. Ядра отчетливо контрастируют на фоне светлой неокрашенной цитоплазмы. В препаратах попадались лишь отдельные темные (поврежденные) клетки. Гепатоциты, полученные обоими методами, в световом микроскопе выглядят одинаково. Однако необходимо обратить внимание на то, что при переводе гепатоцитов из сахарозной среды в физиологический раствор клетки приобретают способность к образованию блоков. Это в наибольшей мере относится к клеткам, полученным механическим методом, что в ряде случаев затрудняло их подсчет в камере Горяева. На этот факт обращают внимание В. К. Науменко и соавт., в связи с чем они считают, что наиболее подходящей средой для клеток печени является забуференный раствор сахарозы.

Из биохимических тестов для характеристики степени интактности изолированных клеток печени проводили исследования проницаемости плазматических мембран для белков ферментов, в частности, для ЛДГ и кислой фосфатазы. Исследовали также скорость эндогенного дыхания гепатоцитов в среде выделения, степень стимуляции эндогенного дыхания клеток сукцинатом и динитрофенолом.

Морфо-функциональные характеристики гепатоцитов, изолированных различными методами

Исследуемый показатель	Химический метод	Механический метод	Модифицированный метод
Средний выход гепатоцитов (на 1 г сырой массы печени)	20—30 $\times 10^6$ кл.	25—28 $\times 10^6$ кл.	40—50 $\times 10^6$ кл.
Общее содержание белка в изолированных гепатоцитах	1,54 мг/10^6 кл.	1,48 мг/10^6 кл.	2,38 мг/10^6 кл.
Окраска 0,2%-ным раствором трипанового синего	4—5 % полностью окрашенных клеток	3—4 % полностью окрашенных клеток	1—2 % полностью окрашенных клеток
Активность ферментов в среде выделения:			
лактатдегидрогеназа (мкМ НАДН на 1 мг белка за 1 ч инкубации)	0,40	0,44	0,31
кислая фосфатаза (мкМ НР на 1 мг белка за 1 мин инкубации)	0,083	0,11	0,08
Дыхание (нм O_2/мин/мг белка):			
на эндогенных субстратах	10,2 ± 2,9	3,3 ± 1,1	8,7 ± 0,4
на сукцинате	20,9 ± 9,1	4,5 ± 1,9	15,4 ± 1,7
после стимуляции ДНФ	48,5 ± 18,4	4,5 ± 1,7	53,0 ± 7,8
Коэффициент стимуляции	2,4	1,0	3,6

Матеріал, захищений авторським правом

Исходя из полученных данных (таблица), можно сделать заключение, что химический метод получения гепатоцитов является более предпочтительным, хотя также нуждается в дальнейшем совершенствовании с целью получения функционально полноценных клеток.

В связи с этим мы предприняли попытку разработать способ выделения гепатоцитов из печени крыс, основанный на использовании рациональных начал указанных выше методов, который в сочетании с соответствующими модификациями позволил бы получить хороший выход изолированных клеток с удовлетворительными морфо-функциональными характеристиками.

В опытах использовали беспородных белых крыс массой 150—200 г. После декапитации животным вскрывали брюшную и грудную полости и через канюлю, введенную в нижнюю полую вену, проводили перфузию печени. В качестве перфузата использовали охлажденный бескальциевый раствор Локка (pH 7,4), в который добавляли цитрат натрия до конечной концентрации 0,027 М. Перфузию проводили в течение 7—10 мин до просветления поверхности печени. Однократный расход перфузионной среды составлял 200—250 мл. На втором этапе перфузию печени осуществляли альбуминовым раствором в следующей композиции: 250 мМ сахарозы, 5 мМ KCl, 0,4 мМ Na_2HPO_4, 0,4 мМ KH_2PO_4, 2 мМ дитиотреитола, 1 мМ ЭДТА, 0,8 мМ $MgCl_2$, 1% альбумина (pH 7,4) — расход 20 мм. В стеклянный цилиндр объемом 200 мл с внутренним диаметром 25—30 мл вносили иссеченную, предварительно перфузированную ткань, добавляли охлажденный альбумин-солевой раствор из расчета 5 объемов раствора на 1 весовую часть ткани. Ткань разрушали на холоду эластичным резиновым пестиком (6—8 тракций) в течение 1—2 мин при зазоре между стенками пестика и цилиндра 0,2—0,4 мм. Полученный гомогенат фильтровали через 1 слой нейлоновой ткани, фильтрат центрифугировали при 1500 об/мин в течение 1,5—2,0 мин, после чего осадок клеток промывали физиологическим раствором с последующим центрифугированием.

В таблице также представлены данные, отражающие некоторые морфо-функциональные свойства гепатоцитов, выделенных предложенным методом. Как видно, метод позволяет получить вполне удовлетворительный выход изолированных клеток печени при хорошей сохранности белковых компонентов, что согласуется с соответствующими результатами других авторов. Суправитальным окрашиванием 0,2%-ным раствором трипанового синего выявлено довольно низкий процент мертвых клеток, что свидетельствует о достаточно высокой степени интактности изолированных клеток. Об этом же подтверждает весьма низкий уровень выхода из гепатоцитов ЛДГ и кислой фосфатазы. Выделенные клетки характеризуются стабильным дыханием на эндогенных субстратах, которое стимулировалось сукцинатом. Значительное увеличение дыхания гепатоцитов под влиянием разобщающего агента ДНФ, очевидно, указывает на сохранность механизмов сопряжения дыхания и фосфорилирования в гепатоцитах, о чем свидетельствует высокий коэффициент стимуляции. Кроме того, при переводе полученных гепатоцитов в физиологический раствор не наблюдалось слипания их в блоки.

Таким образом, разработанный метод получения гепатоцитов как по выходу клеточных элементов, так и по основным морфо-функциональным характеристикам выделенных клеток является достаточно воспроизводимым, простым в исполнении, экономичным и может использоваться для решения криобиологических задач.

1. *Дыхание* и окислительное фосфорилирование в изолированных клетках печени/ И. П. Канаева, А. В. Карякин, Т. В. Аленичева и др.— Цитология, 1975, 17, № 5, с. 545—551.
2. *Науменко В. К., Малычев В. В., Разумович А. Н.* Клеточные аспекты старения. I. Общая характеристика суспензий изолированных клеток печени зрелых и старых крыс.— В кн.: Биохимические и физиологические механизмы старения. Минск: Наука и техника, 1979, с. 7—13.

Матеріал, захищений авторським правом

3. *Jacob S. T., Bhargava P. M.* A new method for the preparation of cell suspension.— Exper. Cell. Res., 1962, 27, N 2, p. 453—467.
4. *Protein* measurement with folin phenol reagent/O. Lowry, N. Rosebrough, A. Farz, R. Randall.— J. Biol. Chem., 1951, 193, N 1, p. 265—275.
5. *Rappaport C., Howze G. B.* Dissociation of adult mouse liver by sodium tempaphenylboron : A potassium complexing agent.— Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1966, 121, p. 1010—1016.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
13.01.82

УДК 57.043 : 578.088

А. Н. Новиков, О. В. Липина, С. Т. Олейник

АДСОРБЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ ЭТИЛЕНГЛИКОЛЯ И КРИОПРОТЕКТОРОВ РЯДА ПЭО

Механизм криозащиты непроникающих криопротекторов до настоящего времени полностью не изучен. Предполагается, что в его реализации имеют место следующие процессы: 1) адсорбция молекул криопротектора на мембране клетки, что приводит к понижению проницаемости ее для воды и биологически активных веществ, стабилизации мембраны при механических воздействиях, замедлению процесса образования внутриклеточного льда [4]; 2) адсорбция на гранях кристаллов льда, что приводит к образованию мелкокристаллических структур [2, 5]. В связи с этим необходимо и важно изучить адсорбционную активность непроникающих криопротекторов на границах раздела: мембрана клетки — внеклеточная среда и лед — внеклеточная среда.

Различие в интенсивности силовых полей, т. е. разница полярностей двух фаз (растворителя и адсорбента) является причиной возникновения свободной энергии на границе, разделяющей эти фазы. Чем больше разность полярностей, а следовательно, и величина свободной энергии, тем сильнее выражена тенденция к ее уменьшению. В этих условиях положительная адсорбция растворенного вещества будет наибольшей. Стремление к уменьшению разности полярностей и поверхностной энергии в процессе адсорбции определяет характер ориентации адсорбируемых молекул в поверхностном слое. Дифильные молекулы ориентируются в поверхностном слое полярным радикалом в сторону более полярной фазы, неполярным — в сторону менее полярной, уменьшая тем самым разность полярностей двух фаз.

Поверхностное натяжение твердых тел определяется с большими трудностями и, как правило, косвенными методами. Поэтому для моделирования поверхностных явлений на границе раздела мембрана клетки — внеклеточная среда и лед — внеклеточная среда удобна модель «жидкость—жидкость», где прототипом менее полярных фаз (мембран клетки и льда) является гептан, более полярной фазы (внеклеточной среды) — вода.

Методика. Для измерения поверхностного натяжения применялся метод сталагмометра по счету капель [3]. Для усовершенствования метода внесены некоторые методические поправки, включающие термостатирование, для чего использовали цилиндрическую полую камеру, омываемую слоем прозрачной термостатирующей жидкости. Внутрь этой камеры помещался стакан с изучаемой моделью — «водный раствор криопротектора — гептан». Для повышения точности метода счета капель в отличие от существующей методики жидкость набирали в сталагмометр до верхней метки, скорость вытекания капель из сталагмометра регулировалась с помощью капилляра с регулируемым сопротивлением.

Объекты. Исследовалась поверхностная активность непроникающих криопротекторов ряда ПЭО с молекулярной массой 400, 1000, 1500,

Матеріал, захищений авторським правом

3000, 6000, 20 000. Для полноты картины изменения поверхностной активности при увеличении молекулярной массы взяты и более низкомолекулярные вещества — этиленгликоль, ПЭО-100.

Экспериментальные данные. Определено поверхностное натяжение на границе раздела принятой модели «гептан — раствор криопротектора» с вариацией концентраций 0—0,5% при температуре 25° С (табл. 1).

Таблица 1. **Поверхностное натяжение на границе раздела гептан — раствор криопротектора, эрг/см²**

Криопротектор	Концентрация криопротектора, %				
	0,0	0,05	0,10	0,20	0,50
Этиленгликоль	52,4	51,9	51,7	51,7	51,7
ПЭО-100	52,4	50,6	49,4	48,0	46,2
ПЭО-400	52,4	43,8	40,9	40,5	40,1
ПЭО-1000	52,4	38,3	37,4	37,3	35,5
ПЭО-1500	52,4	36,0	34,8	34,5	33,8
ПЭО-3000	52,4	34,0	33,5	32,2	32,0
ПЭО-6000	52,4	32,4	31,5	31,7	31,5
ПЭО-20000	52,4	31,4	31,2	31,0	31.0

Анализ экспериментальных данных. Полученные значения поверхностного натяжения на границе раздела гептан — раствор криопротектора позволяют рассчитать их поверхностную активность, изотермы адсорбции, площадь, занимаемую молекулой криопротектора на границе раздела. Для этих расчетов использовано уравнение Гиббса [1], выражающее зависимость количества адсорбированного вещества от его поверхностной активности и концентрации в растворе:

$$\Gamma = \frac{c}{RT}\,\frac{d\sigma}{dc},$$

где Γ — избыток вещества, моль/см²; c — концентрация растворенного вещества в растворе; R — газовая постоянная; T — абсолютная температура; $\frac{d\sigma}{dc}$ — поверхностная активность: изменение поверхностного натяжения с изменением концентрации.

Вычисленные значения поверхностной активности исследованных криопротекторов (табл. 2) свидетельствуют о быстром возрастании ее величины при увеличении молекулярной массы до 1500. Дальнейшее увеличение молекулярной массы приводит к замедлению темпа ее возрастания. Уменьшение поверхностной активности в диапазоне концентраций 0—0,5% в сравнении с диапазоном 0—0,1% свидетельствует о преимущественной адсорбции криопротекторов при небольшом содержании их в растворе. Можно считать полиэтиленоксиды с молекулярной массой более 500—1000 веществами, обладающими значительной поверхностной активностью.

Таблица 2. **Поверхностная активность этиленгликоля и ряда ПЭО, эрг/см² моль**

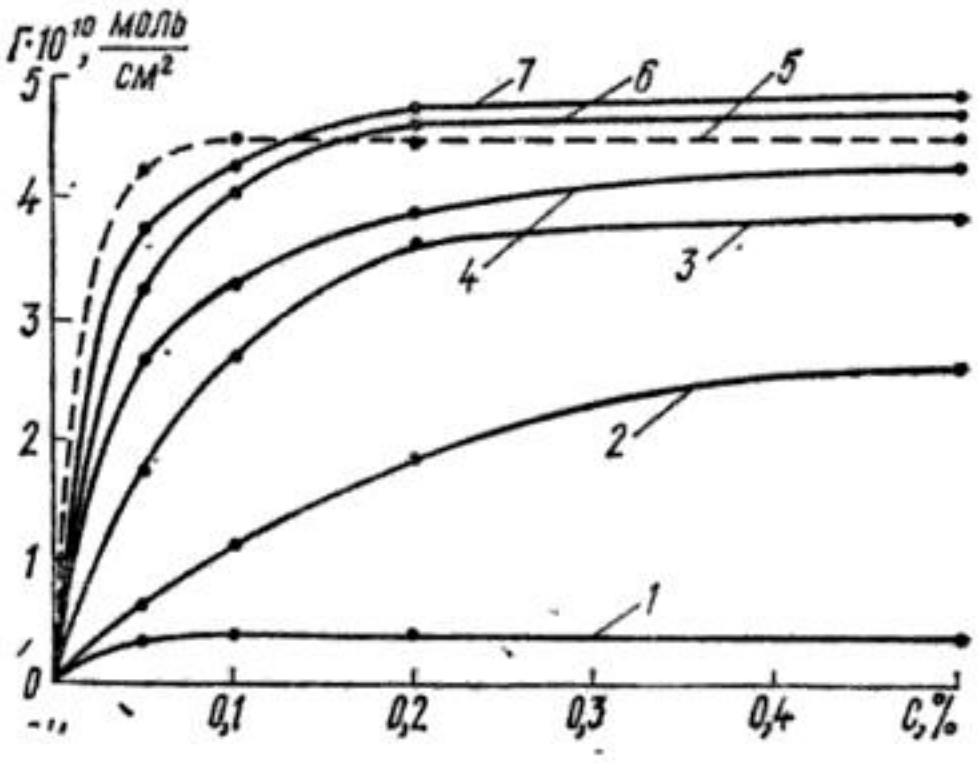
Криопротектор	Диапазон концентраций, %	
	0—0,1	0—0,5
Этиленгликоль	7,0	1,4
ПЭО-100	30,0	12,6
ПЭО-400	115,0	23,6
ПЭО-1000	150,0	31,4
ПЭО-1500	176,0	38,6
ПЭО-3000	189,0	42,8
ПЭО-6000	209,0	41,2
ПЭО-200000	212,0	40,4

Изотермы адсорбции исследованных криопротекторов (рис. 1) подобны классическим изотермам мономолекулярной адсорбции с чисто физической природой адсорбционных сил. Так, в полученных изотермах адсорбции можно выделить три участка: 1) наклонный прямолинейный участок в области малых концентраций. Он показывает, что адсорбция криопротекторов пропорциональна их концентрации в растворе. Это соответствует стадии заполнения молекулами криопротектора границы раздела фаз; 2) прямолинейный, почти параллельный оси абсцисс участок в области больших концентраций, который соответ-

Матеріал, захищений авторським правом

ствует поверхности раздела фаз, полностью занятой молекулами криопротектора. Наличие небольшого наклона его можно объяснить уплотнением молекул криопротекторов на границе раздела фаз за счет изменения структуры адсорбционного слоя или тенденцией к полимолекулярной адсорбции; 3) переходный криволинейный участок изотермы, соответствующий промежуточным степеням заполнения криопротектором границы раздела фаз. Размер его определяется адсорбционной активностью криопротектора: чем больше эта величина, тем меньше он растянут по оси концентраций.

Сравнительная оценка изотермы адсорбции этиленгликоля и ряда ПЭО (рис. 1) указывает на возрастание предельной величины адсорбировавшегося криопротектора при увеличении его молекулярной массы. В этом отношении отлична только изотерма ПЭО-20000, предельная величина адсорбции которого даже ниже таковой ПЭО-3000. Эту аномалию можно скорее всего объяснить сравнительно небольшой склонностью ПЭО-20000 изменять структуру адсорбционного слоя.



Изотермы адсорбции этиленгликоля и полиэтиленоксидов:

1 — этиленгликоль, *2* — ПЭО-100, *3* — ПЭО-400, *4* — ПЭО-1000, *5* — ПЭО-20000, *6* — ПЭО-3000, *7* — ПЭО-6000.

Рассчитанные по экспериментальным данным с использованием уравнения Гиббса площади, занимаемые молекулой криопротектора, и сравнение их с площадями, вычисленными графически по справочным данным длин и углов связи [6] (табл. 3), свидетельствуют, что площадь, занимаемая одной молекулой криопротектора в адсорбционном слое, значительно уменьшается при увеличении его молекулярной массы до 400. Дальнейшее увеличение молекулярной массы приводит лишь к незначительному уменьшению последней. Молекулы этиленгликоля и ПЭО-100 в адсорбционном слое занимают площадь, превышающую их размеры, т. е. они образуют ненасыщенные адсорбционные слои. Площадь молекулы ПЭО-400 — 20 000 в адсорбционном слое гораздо меньше их максимальной площади, но меньше минимальной — 6,2 (Å) ². Следовательно, можно предположить два вида связи молекул криопротекторов с межфазной границей: молекулы связаны с границей раздела фаз только концевыми звеньями или несколькими элементарными звеньями цепи, количество которых можно рассчитать, зная площадь элементарного звена молекул ПЭО — 10,8 (Å) ². Результаты расчета показывают следующие величины: ПЭО-400 — 4,4; ПЭО-1000 — 4,5; ПЭО-1500 — 3,8; ПЭО-3000 — 3,8; ПЭО-6000 — 3,3; ПЭО-20000 — 3,5.

Таблица 3. Площадь, занимаемая молекулой криопротектора в адсорбционном слое

Криопротектор	Площадь молекулы в адсорбционном слое, Å²	Максимальная площадь молекулы по справочным данным длин и углов связей, Å²
Этиленгликоль	394,0	15,1
ПЭО-100	152,0	24,3
ПЭО-400	48,0	97,3
ПЭО-100	49,0	243,2
ПЭО-1500	41,0	363,0
ПЭО-3000	41,0	729,5
ПЭО-6000	36,0	1459,3
ПЭО-20000	38,0	4864,2

Матеріал, захищений авторським правом

Окончательно выяснить характер связи молекул криопротекторов с межфазной границей можно будет после исследования адсорбции однотипных криопротекторов с различными концевыми группами.

1. *Воюцкий С. С.* Курс коллоидной химии.— М. : Химия, 1964.— 574 с.
2. *Кулешова Л. Г., Моисеев В. А., Иткин Ю. А.* Кристаллизация водных растворов некоторых криопротекторов.— Криобиология и криомедицина, 1976, вып. 2, с. 27—31.
3. *Практикум* по коллоидной химии и электронной микроскопии/Под ред. С. С. Воюцкого, Р. М. Панич.— М. : Химия, 1974.— 224 с.
4. *Пушкарь Н. С., Белоус А. М.* Введение в криобиологию.— Киев : Наук. думка, 1975.— 343 с.
5. *Низкотемпературная* кристаллизация в биологических системах/Н. С. Пушкарь, А. М. Белоус, Ю. А., Иткин и др.— Киев : Наук. думка, 1977.— 243 с.
6. *Справочник химика.*— 2-е изд.— М. : Химия, 1965. Т. 1.— 1168 с.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
11.01.82

УДК 57.043 : 578.088

Ю. И. Пичугин, А. Н. Новиков

ВЛИЯНИЕ РЯДА КРИОПРОТЕКТОРОВ НА РАСТВОРИМОСТЬ СОЛЕЙ NaCl, KCl

Одним из факторов, оказывающих повреждающее действие при замораживании биообъектов, является повышение концентрации электролитов, в основном NaCl и KCl [4]. Применение криопротекторов в концентрации 10% и выше позволяет уменьшить повышение концентрации солей при вымораживании воды за счет «связывания» части воды криопротектором с образованием эвтектики, т. е. криопротекторы являются буферами концентрации солей. Кроме этого, при повышении концентрации криопротектора возрастает токсичность среды и концентрация криопротектора 10% уже является повреждающей для некоторых биообъектов.

Известно [3], что эффективная концентрация электролита меньше общей концентрации растворенной соли на величину степени диссоциации: $[A^+] = [K^-] = \alpha \cdot c$, где $[A^+]$, $[K^-]$ — равновесные концентрации ионов, α — степень диссоциации соли, c — общая концентрация растворенной соли.

Чем меньше степень диссоциации соли, тем меньше эффективная концентрация электролита, а значит и меньшее повреждающее действие повышенной концентрации этой соли. Поэтому интересно выяснить, как влияют криопротекторы на степень диссоциации солей NaCl, KCl.

Получать данные по степени диссоциации таких сильных электролитов, как NaCl и KCl, в концентрации 0,2 моль/л в растворителях с большой диэлектрической проницаемостью, каковыми являются растворы криопротекторов,— задача трудная [1]. Легче получать не абсолютные величины степени диссоциации NaCl и KCl, а давать относительную оценку влияния криопротекторов на степень диссоциации этих солей по сравнению со степенью диссоциации их в воде. Для относительной оценки использовался метод определения растворимости этих солей, предполагающий, что константа диссоциации, а значит и степень диссоциации, таких сильных солей, как NaCl и KCl пропорциональны растворимости этих солей [3].

Данных по константам диссоциации и растворимости солей NaCl и KCl в растворах криопротекторов в специальной литературе [5] мы не обнаружили, поэтому целью данной работы явилось определение растворимости солей NaCl и KCl в растворах криопротекторов.

Матеріал, захищений авторським правом

Использовались следующие криопротекторы с чистотой, обычно применяемой при низкотемпературном консервировании: глицерин, этиленгликоль, пропиленгликоль, формамид, диметилформамид (ДМФА), полиэтиленоксиды (ПЭО) с молекулярными массами 100, 200, 400, 1000, 2000, 3000; ацетамид, диметилацетамид (ДМА), диметилсульфоксид (ДМСО), диэтилсульфоксид (ДЭСО). Концентрация всех криопротекторов составляла 50% массы. Соли NaCl и KCl использовались с маркой «х. ч.».

Методика определения растворимости. К 10 мл 50%-ного раствора криопротектора при 0° С добавляли в избытке соль NaCl или KCl. Раствор перемешивали и термостатировали при 0° С в течение 7—10 ч

Растворимость солей NaCl, KCl в 50%-ных водных растворах криопротекторов при 0 °С

Криопротектор	Растворимость, моль/л			
	NaCl		KCl	
	1	2	1	2
Глицерин	3,8	0,70	1,9	0,56
Этиленгликоль	3,0	0,56	1,6	0,47
Пропиленгликоль	2,3	0,42	0,93	0,27
Формамид	3,4	0,63	2,0	0,59
ДМФА	2,2	0,41	0,78	0,23
ПЭО-100	2,9	0,54	1,5	0,44
ПЭО-200	2,7	0,50	1,4	0,41
ПЭО-400	2,4	0,44	1,3	0,38
ПЭО-1000	2,2	0,41	1,2	0,35
ПЭО-2000	2,1	0,39	1,1	0,32
ПЭО-3000	1,9	0,35	1,0	0,29
Ацетамид	2,2	0,41	1,0	0,29
ДМА	1,4	0,26	0,76	0,22
ДМСО	2,1	0,39	0,70	0,20
ДЭСО	1,4	0,26	0,60	0,18

Примечания: 1— растворимость данной соли в 50 %-ных криопротекторах $S_{кр}$; 2 — отношение растворимости данной соли в 50 %-ных криопротекторах к растворимости ее в воде ($S_{вод}$), т. е $S_{кр}/S_{вод}$. Растворимость NaCl в воде при 0 °С составляет 5,5 моль/л, KCl — 3,4 моль/л.

до наступления гетерогенного равновесия. Затем охлажденной микропипеткой отбирали 0,2 мл насыщенного раствора соли над осадком и переносили в мерную колбу, которую наполняли дистиллированной водой до 25 мл при 25° С. На кондуктометре типа 102/1 фирмы «Промартель Раделкис» (Венгрия) измеряли удельную электропроводность полученного раствора при 25° С. По калибровочным графикам зависимости удельной электропроводности растворов NaCl или KCl при 25° С от их молекулярной концентрации при той же температуре определялась концентрация полученного разбавленного раствора. Несложными пересчетами вычислялась концентрация насыщенного раствора соли в 50%-ном криопротекторе при 0° С.

Криопротекторы распределены по группам сходства их химического строения (таблица). Внутри групп криопротекторы расположены по уменьшению их полярности, а значит и уменьшению величины их диэлектрической проницаемости ε. Между группами криопротекторов растворимость солей не коррелирует ни со значениями диэлектрической проницаемости, ни с величинами дипольного момента. Так, для 50%-ного раствора глицерина при 0° С $\varepsilon = 72{,}6$, для 50%-ного раствора ДМСО при 0° С $\varepsilon = 83{,}9$ [2], а растворимость исследуемых солей в данных растворах глицерина больше, чем в данных растворах ДМСО. Внутри же всех групп растворимость солей понижается с уменьшением диэлектрической проницаемости.

Следовательно, растворимость солей в данных растворах криопротекторов зависит в основном не от электростатических взаимодействий,

Матеріал, захищений авторським правом

характеризующих эти растворы, а от слабых химических взаимодействий соль — криопротектор, выражающихся в специфической сольватации молекулами криопротектора молекул и ионов соли, и конкурирующих взаимодействий криопротектор — вода и соль — вода. Так, ДМСО имеет большее сродство к воде, чем к солям NaCl и KCl, а глицерин хорошо взаимодействует как с водой, так и с этими солями.

Расположив криопротекторы в ряд по уменьшению растворимости солей NaCl или KCl, можно качественно оценить их влияние на степень диссоциации этих солей, приняв, что с уменьшением растворимости соли понижается и степень ее диссоциации.

Ряд для NaCl: ДЭСО-ДМА < ПЭО-3000 < ПЭО-2000-ДМСО < < ПЭО-1000-Ацетамид-ДМФА < Пропиленгликоль < ПЭО-400 < ПЭО-200 < ПЭО-100 < Этиленгликоль < Формамид < Глицерин.

Ряд для KCl: ДЭСО < ДМСО < ДМА < ДМФА < Пропиленгликоль < ПЭО-3000-Ацетамид < ПЭО-2000 < ПЭО-1000 < ПЭО-400 < < ПЭО-200 < ПЭО-100 < Этиленгликоль < Глицерин < Формамид.

С понижением степени диссоциации соли уменьшается и эффективная концентрация электролита, а значит и повреждающее действие соли, т. е. лучшим криопротектором по уменьшению повреждающего действия «солевого эффекта» в этих рядах является ДЭСО, а худшим для NaCl — глицерин, а для KCl — формамид. Но делать вывод о том, что ДЭСО является лучшим криопротектором вообще лишь на основании его влияния на «солевой эффект» нельзя, так как не известна степень вклада «солевого эффекта» в повреждения биообъектов по сравнению с другими повреждающими факторами при низкотемпературном консервировании.

1. *Гардон Дж.* Органическая химия растворов электролитов.— М. : Мир, 1979.— 712 с.
2. *Дузу П.* Криобиохимия.— М. : Мир, 1980.— 284 с.
3. *Измайлов Н. А.* Электрохимия растворов.— Харьков : Изд-во Харьк. ун-та, 1959.— 958 с.
4. *Пушкарь Н. С., Белоус А. М.* Введение в криобиологию.— Киев : Наук. думка, 1975,— 345 с.
5. *Справочник* по растворимости/Под ред. В. В. Когана и др.: В 3-х т.— М.; Л. : Изд-во АН СССР, 1963.— Т. 2. 2068 с.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
30.09.81

УДК 57.043.612.1

П. А. Пустовойт, О. В. Липина

ВЛИЯНИЕ КРИОПРОТЕКТОРОВ И НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО КОНСЕРВИРОВАНИЯ НА РЕОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КРОВИ

Интегральным показателем, определяющим реологические свойства крови (текучесть), является ее динамическая вязкость [2, 3]. Последняя, в свою очередь, зависит от вязкости плазмы, суспензионной стабильности и скорости течения крови, содержания в ней эритроцитов, их формы, объема, взаимодействия, клеточного заряда и т. д. [1, 4, 6—10]. Поскольку основным компонентом крови являются эритроциты, то их количество оказывает существенное влияние на вязкость крови. При увеличении концентрации эритроцитов, даже при гематокрите 98%, кровь сохраняет текучесть. Эта способность концентрированной суспензии эритроцитов обусловлена эластичностью мембран самих клеток, т. е. функциональным их состоянием. При небольшой скорости кровотока преимущественное значение имеет агрегация эритроцитов, а при большей скорости кровотока — деформация эритроцитов [9]. Одним из методов, характеризующим функциональное состояние эри-

Матеріал, захищений авторським правом

троцитных мембран, дающим представление как об агрегационном состоянии крови, так и об эластичности мембран эритроцитов, является вискозиметрия.

Целью нашего исследования является изучение влияния экспозиции эритроцитов с криопротекторами эндо- и экзоцеллюлярного действия (глицерина и ПЭО-1500), а также дальнейшего замораживания и отогрева суспензии на динамическую вязкость последний как показателя текучести крови.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования служила одно-, двухдневная консервированная донорская кровь, заготовлен-

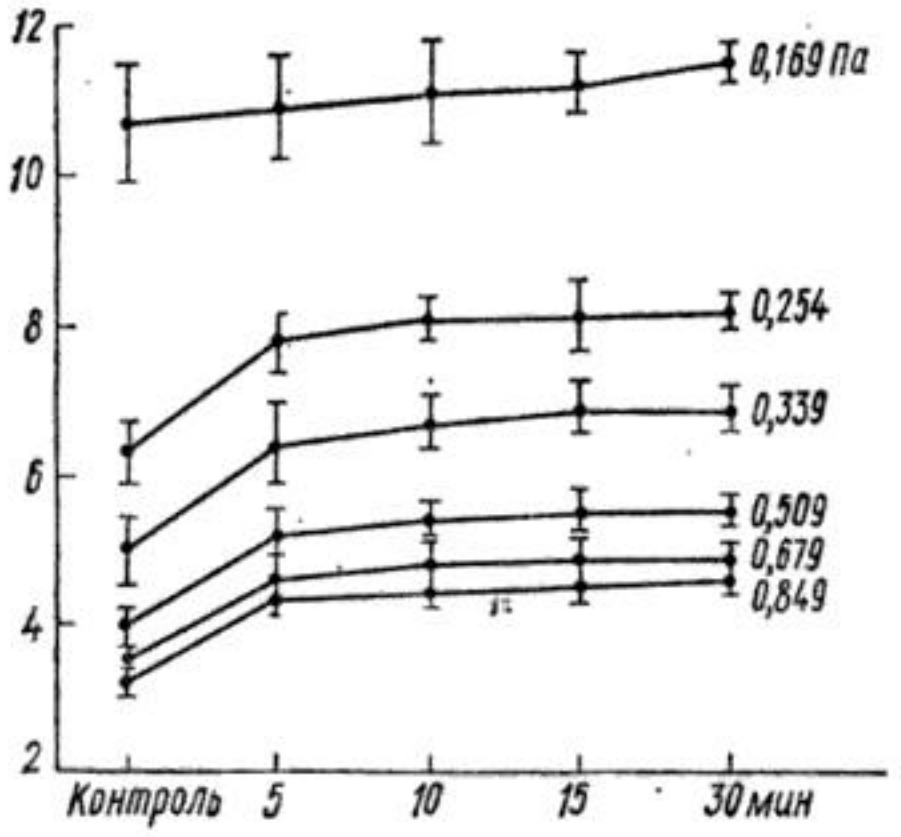


Рис. 1. Влияние продолжительности контакта эритроцитов с ПЭО-1500 на динамическую вязкость суспензии эритроцитов.

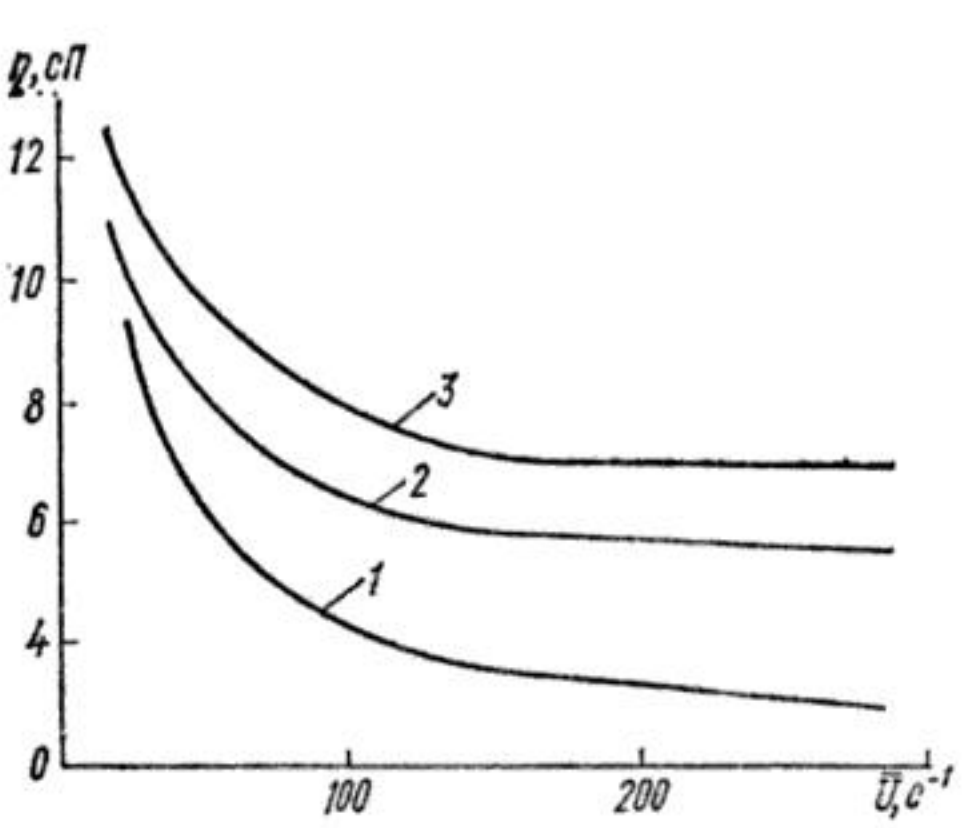


Рис. 2. Влияние экспозиции и замораживания с 20%-ным ПЭО-1500 на динамическую вязкость суспензии эритроцитов:

1 — консервированная донорская кровь, *2* — суспензия эритроцитов после экспозиции с ПЭО, *3* — суспензия эритроцитов после замораживания.

ная на консерванте ЦОЛИПК-7б. В качестве криопротекторов использовали 30%-ный раствор глицерина (ЦНИИГПК — 11_4), а также 20%-ный водный раствор ПЭО-1500. Растворы криопротекторов смешивали с эритроцитной массой в соотношении 1 : 1 и после тридцатиминутной экспозиции при температуре 25° С замораживали путем погружения контейнера с клеточной суспензией в жидкий азот. Отогрев проводили на водяной бане при температуре 42° С. Клеточную взвесь центрифугировали в течение 10 мин при 1500 об/мин, после чего эритроцитную массу переносили в нативную плазму в соотношении 1 : 1. После замораживания в растворе глицерина производили трехкратное отмывание клеток от глицерина. Динамическую вязкость образцов крови определяли на капиллярно-рамочном вискозиметре типа Копли при напряжениях сдвига от 0,169 до 0,849 Па. Распределение ПЭО в системе «эритроцит — криопротектор» изучали методом ультразвуковой интерферометрии [5]. Реологические свойства крови определяли созданием модели трансфузии; при этом замороженные эритроциты с ПЭО-1500 смешивали с кровью того же донора в соотношении 1 : 10.

Результаты исследования. Методом ультразвуковой интерферометрии установлено, что содержание криопротектора ПЭО-1500 в околоклеточной среде после 30-мин контакта с клетками снижается на 18—20% (если принять исходный 20%-ный раствор за 100%), это количество криопротектора поглощается эритроцитами или оседает на их поверхности. Следует отметить, что такое распределение криопротектора происходит в первые 5—10 мин, и при дальнейшей экспозиции клеток с раствором ПЭО установившиеся соотношения не изменяются. Аналогичная закономерность получена при определении влияния вре-

Матеріал, захищений авторським правом

мени экспозиции с 20%-ным раствором ПЭО-1500 на динамическую вязкость суспензии эритроцитов. Как показано на рис. 1, достоверное увеличение вязкости суспензии эритроцитов наблюдается также в первые 5—10 мин и в дальнейшем, на протяжении 20 мин вязкость суспензии остается на том же уровне. Замораживание эритроцитов в среде, содержащей ПЭО-1500, приводит к дальнейшему повышению вязкости суспензии эритроцитов (рис. 2). Аналогичные изменения вязкости наблюдаются также в суспензиях как после контакта эритроцитов с 30%-ным раствором глицерина, так и после их замораживания-отогрева (рис. 3).

В литературе имеются ссылки на то, что обработка эритроцитной массы глютаральдегидом повышает жесткость клеточной мембраны,

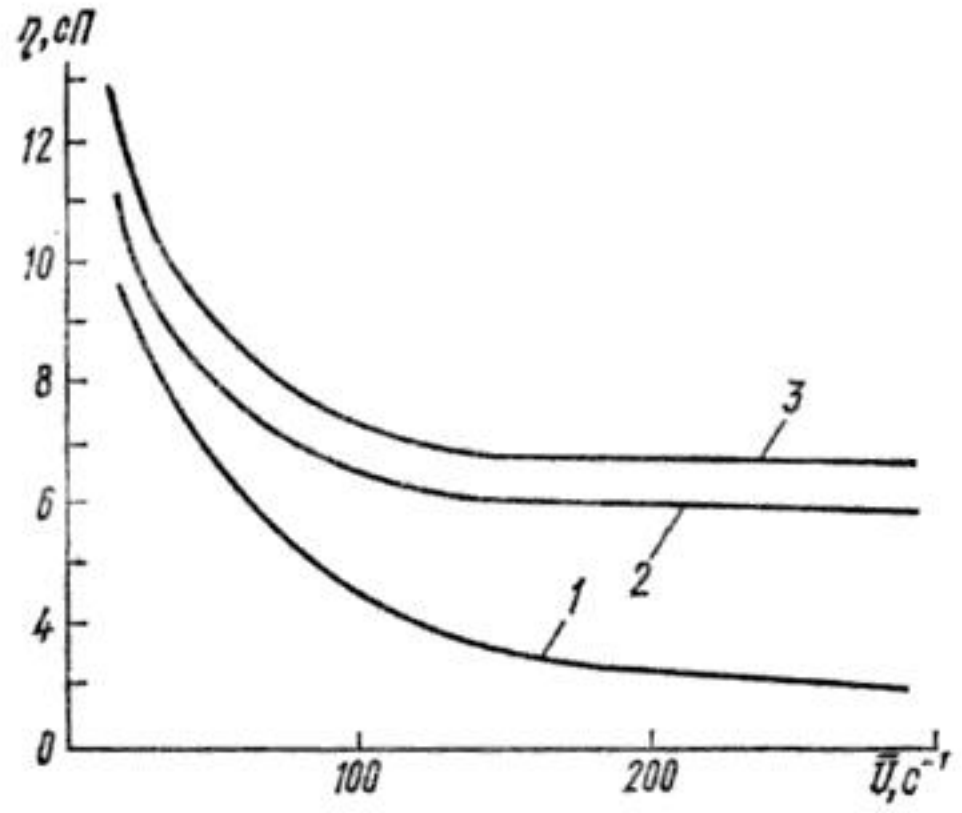


Рис. 3. Влияние экспозиции и замораживания с глицерином на динамическую вязкость суспензии эритроцитов:

1 — консервированная донорская кровь, *2* — суспензия эритроцитов после экспозиции с глицерином, *3* — суспензия эритроцитов после замораживания.

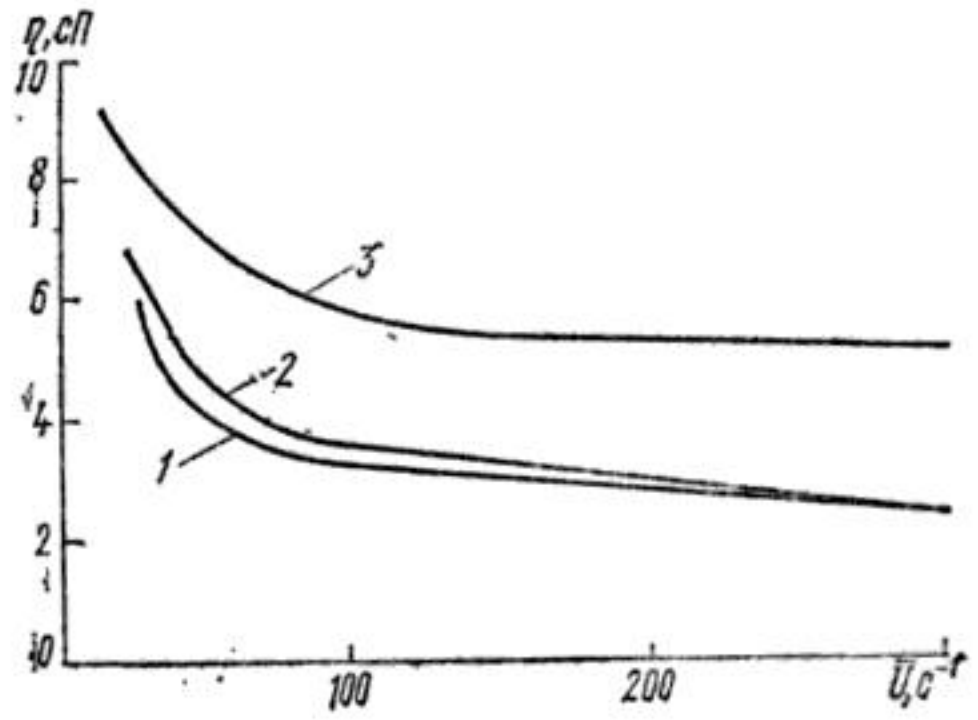


Рис. 4. Влияние разведения консервированной донорской крови, размороженной суспензией эритроцитов в соотношении 10 : 1 на ее динамическую вязкость:

1 — консервированная донорская кровь, *2* — вязкость крови, разведенной размороженными эритроцитами, *3* — вязкость суспензии размороженных эритроцитов.

что находит проявление в увеличении динамической вязкости клеточной суспензии [9]. Можно предположить, что замораживание эритроцитов с криопротекторами ПЭО-1500 и глицерином вызывает подобные изменения клеточных мембран. Суспензии с размороженными клетками сохраняли ньютоновский характер течения. Это дает основание предполагать, что экспозиция клеток с криопротектором, а также их замораживание приводит к частичному понижению эластичности клеточных мембран. Полученные результаты отличаются от данных других авторов [3], где указано, что суспензия размороженных эритроцитов проявляла ньютоновский характер течения, наблюдалась полная потеря эластичности мембран эритроцитов.

Разведение крови доноров суспензией размороженных эритроцитов в соотношении 10 : 1 не влияло на повышение ее динамической вязкости. Это дает основание предположить, что внутривенное введение размороженной суспензии эритроцитов без предварительного удаления ПЭО-1500 не оказывает отрицательного влияния на гемоциркуляцию (рис. 4).

Выводы. 1. Пребывание эритроцитов в растворе проникающего глицерина и не проникающего (ПЭО-1500) в клетку криопротекторов вызывает увеличение вязкости клеточной суспензии. 2. Распределение полимера в суспензии между клетками и жидкой частью, а также повышение динамической вязкости суспензии происходит в течение первых 5—10 мин после пребывания клеток в среде, содержащей ПЭО-1500. 3. Замораживание вызывает дальнейшее увеличение динамической вязкости клеточной суспензии. 4. Разведение цельной крови суспензией

Матеріал, захищений авторським правом

размороженных эритроцитов в соотношении 10 : 1 (моделирование трансфузии) не изменяет ее реологических свойств.

1. *Бланк М.* Молекулярные основы эластичности и прочности мембраны.— В кн.: Мембраны и болезнь. М. : Медицина, 1980, с. 94—101.
2. *Гуревич М. И., Берштейн С. А.* Основы гемодинамики.— Киев : Наук. думка, 1979.— 232 с.
3. *Костин Г. Л., Перевозкина Е. С., Метельская С. А.* Реологические свойства суспензии консервированных эритроцитов.— В кн.: I укр. съезд гематологов и трансфузиологов : Тез. докл. Харьков, 1980, с. 181—182.
4. *Регионарное* и системное кровообращение/В. А. Левтов, Н. И. Никифоров, А. С. Попель и др.— Л. : Наука, 1978.— 217 с.
5. *Пашковская О. В.* О количественном определении криопротектора в жидких средах.— В кн.: Современные вопросы криобиологии. Киев : Наук. думка, 1976, с. 19—20.
6. *Чернух А. М., Александров П. Н., Алексеев О. В.* Микроциркуляция. М. : Медицина, 1975.— 455 с.
7. *Чернух А. М.* Воспаление.— Медицина, 1979.— 445 с.
8. *Marcel N.* Red cell Deformability.— J. Med., 1979, 10, N 5, p. 409—416.
9. *Stoltz J. F.* Les parametres de la rheologie du sang incidences hemodynamiques.— Bull. Acad. et Soc Zorraines sci., 1979, 18, N 2, p. 24—49.
10. *Schien S., Susami R. J.* Dellenback blood viscosity influence of erythrocyte deformation.— Science, 1967, 157, N 8, p. 827—829.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
15.01.82

УДК 57.043 : 517 : 174.5

А. М. Утевский, В. А. Чуйко, Н. Ф. Губина, В. А. Щирова

ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР НА ПРОЦЕССЫ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ КАТЕХОЛАМИНОВ

Процессы высвобождения катехоламинов из нервных окончаний как в центральной, так и в периферической нервной системе, а также из мозгового вещества надпочечников в известной мере отражают состояние секреции катехоламинов. Их исследование позволяет характеризовать крайне важный этап адренергического процесса, предшествующий осуществлению действия медиатора [1].

Особую актуальность приобретает исследование указанного процесса при оценке функций клеток, тканей и органов после их низкотемпературного консервирования для решения вопроса о их трансплантации, поскольку процесс изъятия и изоляции биологических структур всегда сопровождается утратой нервно-проводниковых связей и регуляторные взаимоотношения обеспечиваются исключительно гуморальным путем.

В данной работе исследовалось влияние охлаждения-замораживания на K^+ — и тирамин-зависимое высвобождение норадреналина срезами предсердий и щитовидной железы быка.

Материал и методы. In vitro в среде с высоким содержанием K^+ (60 мМ) изучали высвобождение норадреналина-H^3 срезами предсердий и щитовидной железы быка в условиях блокады моноаминоксидазы паргилином (0,2 мМ/мл). Для пополнения запасов медиатора меченым норадреналином срезы предварительно инкубировали с норадреналином-H^3 (185 Бк/мл) в течение 30 мин при 37° С. Количество выделившегося медиатора определяли в инкубационной среде с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика «Интертекник» (Франция) и выражали числом импульсов в 1 мин на 1 мг сырой ткани (см. таблицу).

Представленные данные свидетельствуют о том, что выдерживание предсердий в течение 60 мин при температуре 20° С с последующим

Матеріал, захищений авторським правом

отогреванием и инкубацией при 37° С сопровождалось существенным (на 32%) снижением характера высвобождения медиатора. Аналогичные результаты наблюдались в условиях экспозиции предсердий при 4° С. Температура 0° С оказывала более выраженное влияние на исследуемые процессы. Активность высвобождения медиатора снижалась почти на 50%. Глубокое охлаждение (до —196° С) сопровождалось ингибированием высвобождения на 63% по отношению к контролю.

При исследовании процесса K^+-зависимого высвобождения норадреналина-H^3 срезами щитовидной железы быка получены следующие

Влияние температуры на K^+- зависимое высвобождение норадреналина-H^3 срезами предсердий и щитовидной железы быка, имп/мин на 1 мг сырой ткани

Температура, °С	Предсердие	p	Щитовидная железа	p
37	32,83±4,07	—	28,30±3,52	—
20	22,97±4,16	<0,05	18,28±5,78	<0,05
4	21,10±4,06	<0.05	18,36±6,59	<0,05
0	17,94±2,41	<0,05	22,10±4,31	<0,05
—196 (без программы)	10,26±1,11	<0,05	9,94±2,55	<0,05
—196 (по программе)	—	—	9,45±1,48	<0,05

результаты. Интенсивность высвобождения норадреналина-H^3 в щитовидной железе выше, чем аналогичный процесс в предсердиях. Действие положительных сниженных температур приводит к ингибированию высвобождения медиатора после предварительной инкубации при 20 и 4° С. Инкубация при 0° С не оказывает существенного ингибирующего действия, как это имеет место при исследовании предсердий.

Криоконсервирование щитовидной железы по программе и без нее приводит к резко выраженному угнетению K^+-зависимого высвобождения норадреналина-H^3 адренореактивными структурами предсердий и щитовидной железы быка, которые весьма чувствительны к охлаждению как в зоне положительных околонулевых температур, так и к замораживанию до —196° С.

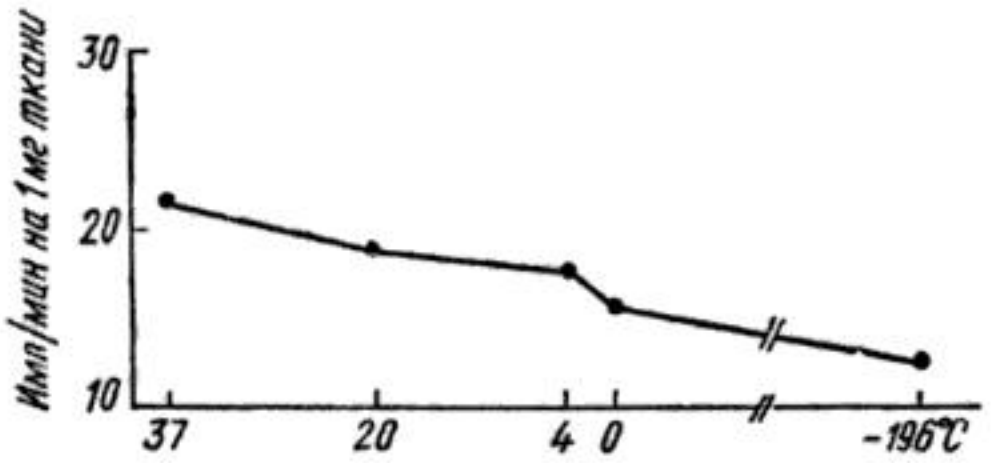
Мы также исследовали влияние низких температур на процесс высвобождения норадреналина-H^3 адренореактивными структурами, индуцированный тирамином ($1 \cdot 10^{-4}$ М). Инкубация срезов производилась при 20; 4; 0 и —196° С. Установлено, что вызванное тирамином высвобождение норадреналина-H^3 из предсердий быка составляет 21,38 имп/мин на 1 мг ткани (рисунок). Выдерживание при 20° С не влияет на высвобождение медиатора, незначительное снижение процесса наблюдается после экспозиции при 4° С. Выраженное влияние оказывает выдерживание при 0° С, а также замораживание до —196° С. Под влиянием этих воздействий высвобождение медиатора снижается на 30%.

Таким образом, вызванный тирамином процесс высвобождения норадреналина-H^3 мало чувствителен к охлаждению при температуре 20° С. Этим он отличается от K^+-зависимого высвобождения норадреналина-H^3 из предсердий, при исследовании которого обнаружено снижение высвобождения под влиянием охлаждения при 20° С. Отличается он и от процесса высвобождения медиатора щитовидной железой, также чувствительного к охлаждению при 20° С (табл. 1).

Вызванное охлаждением при 20° С снижение K^+-зависимого высвобождения норадреналина-H^3 можно объяснить происходящими при данной температуре фазовыми переходами липидов, участвующих в организации данного процесса [2, 5]. То обстоятельство, что высвобождение, вызванное тирамином, устойчиво к выдерживанию при 20° С, возможно, указывает, что липиды, претерпевающие фазовые переходы при данной температуре, не имеют существенного значения для осуществ-

Матеріал, захищений авторським правом

ления процесса высвобождения. Вместе с тем снижение активности этого процесса после экспозиций при 4° и 0° С могут быть объяснены тем, что в его структурно-функциональной организации принимают участие липиды, температура фазовых превращений которых лежит в данной температурной зоне. Замораживание предсердий до —196° С и отогревание при 40° С, как и охлаждение до околонулевых положительных температур, вызывает уменьшение высвобождения медиатора. Аналогичные результаты получены нами при исследовании захвата медиаторов адренореактивными структурами [3, 4]. Возможной причиной этого явления могут быть вызванные замораживанием-оттаиванием нарушения осмотических и ионных режимов клетки, а также изменения белок-липидных взаимодействий, некоторые механические повреждения мембран и других компонентов клетки [2].



Влияние температуры на тирамин-зависимое высвобождение норадреналина-H^3 срезами предсердий быка.

Таким образом, тирамин-зависимое высвобождение медиатора, косвенным образом отражающее процесс его секреции, чувствительно к охлаждению и замораживанию: указанные воздействия сопровождаются уменьшением активности процесса. Существуют, по-видимому, общие механизмы нарушения как при охлаждении, так и замораживании (в частности, фазовые переходы в липидах, нарушение белок-липидных взаимодействий). При замораживании к ним добавляются нарушения, вызванные еще образованием кристаллов льда [2]. Факт уменьшения активности высвобождения медиатора нервным аппаратом тканей может иметь существенное значение для понимания механизмов гипотермо-и криоповреждений в биологической системе, оценки пригодности этих тканей к трансплантации и прогноза приживления и функционирования трансплантата.

1. *Глебов Р. Н., Крыжановский Г. Н.* Функциональная биохимия синапсов.— М. : Медицина, 1978.— 324 с.
2. *Пушкарь Н. С., Белоус А. М.* Введение в криобиологию.— Киев : Наук. думка, 1975.— 343 с.
3. *Утевский А. М., Чуйко В. А., Губина Н. Ф.* Характеристика некоторых нейрогуморальных процессов при охлаждении различных биологических структур.— Криобиология и криомедицина, 1979, вып. 5, с 52—57.
4. *Утевский А. М., Чуйко В. А., Губина Н. Ф.* Влияние охлаждения на способность тканей к захвату катехоламинов.— Укр. биохим. журн., 1980, 52, № 1, с. 16—19.
5. *Lyons J. M.* Phase transitions and control of cellular metabolism at low temperature.— Cryobiology, 1972, 9, N 5, p. 341—350.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
14.01.82

УДК 57.043.577.15 : 576.347

А. М. Утевский, В. А. Чуйко, Л. А. Назарова,
Е. Г. Тарасова

АКТИВНОСТЬ МОНОАМИНОКСИДАЗЫ В СЕРДЦЕ, ПЕЧЕНИ И ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЕ ПОСЛЕ ИХ БЫСТРОГО ЗАМОРАЖИВАНИЯ ДО —196° С

Исследование процессов адренергической регуляции клеточного метаболизма, являющихся центральным звеном механизма нейро-гуморальной регуляции, универсальным для большинства клеток и тканей, приобретает первостепенное значение при оценке функции биологиче-

Матеріал, захищений авторським правом

ских объектов после их низкотемпературной консервации, а также прогнозирования их приживления и функционирования в организме реципиента. Одним из этапов адренергического процесса является окисление моноаминов с помощью аминоксидаз-ферментов, катализирующих дезаминирование важнейших нейромедиаторов и биогенных аминов (дофамин, адреналин, норадреналин, серотонин). Указанная ферментная система обеспечивает поддержание определенного физиологического уровня указанных биогенных моноаминов как в нервных окончаниях, так и в клетках периферических тканей, осуществляя тем самым направление и интенсивность биохимических процессов в клетке [1].

В продолжении и развитии исследований, проводимых в лаборатории криобиохимии нейро-гуморальных систем по изучению адренергических механизмов регуляции в биологических объектах, подвергнутых низкотемпературной консервации [3—6], нами предприняты настоящие исследования, цель которых — определить активность моноаминоксидазы митохондрий сердца, печени, щитовидной железы, подвергнутых быстрому (300—400° С) замораживанию до —196° С. Исследовалась также чувствительность указанного фермента к специфическому ингибитору МАО-ниаламиду.

Материалы и методы исследования. Из навески ткани сердца и печени крыс (2—4 г) и щитовидной железы быка (4 г) получали 10%-ный гомогенат в 0,25 М сахарозе (все операции проводили при 0° С). Митохондрии получали методом дифференциального центрифугирования (12 тыс. об/мин), затем их промывали 0,01 М фосфатным буфером. Осадок митохондрий суспензировали в 0,1 М фосфатном буфере (pH — 7,4) из расчета 2—3 мг белка на пробу. Активность МАО определяли по освобождению аммиака. Пробы (конечный объем 2 мл) содержали суспензию митохондрий, 0,1 М фосфатный буфер и один из субстратов (тирамин в концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ М, серотонин — 10 мкг в пробе). Пробы инкубировали при 37° С в течение 30 мин в атмосфере кислорода. После окончания инкубации в пробы добавляли по 0,2 мл 50%-ной трихлоруксусной кислоты, а образовавшийся осадок удаляли центрифугированием. В безбелковом фильтрате определяли освобожденный в процессе моноаминоксидазной реакции аммиак по методу И. С. Севериной [2] с реактивом Несслера. При исследовании торможения активности МАО ниаламидом (концентрация $1 \cdot 10^{-3}$ М) митохондрии преинкубировали в 0,1 М фосфатном буфере с ингибитором в течение 15 мин при 23° С, затем к пробам добавляли субстрат. Белок определяли по методу Лоури. Быстрое замораживание (300—400°/мин) осуществляли погружением контейнеров со срезами исследуемых тканей — печени, сердца, щитовидной железы в жидкий азот на 60 мин. Отогрев замороженных образцов производили на водяной бане (40° С).

При исследовании активности МАО в печени крыс установлено, что активность МАО в контроле для субстрата тирамина составляла 0,13 мкг NH_3 на 1 мг белка в 1 мин. Под влиянием ниаламида происходило снижение активности до 0,0032. Таким образом, данный препарат практически полностью блокирует способность МАО дезаминировать тирамин. Аналогичным образом действует он и в отношении субстрата серотинина. Быстрое замораживание срезов печени со скоростью 300—400°/мин не изменяет окислительную активность МАО по отношению к тирамину (рис. 1).

Замораживание также не изменяет чувствительность данной ферментной системы к ингибитору как и в печени: ниаламид почти в три раза снижает активность МАО. Аналогичным образом действует быстрое замораживание на способность МАО дезаминировать серотонин. Не изменяется чувствительность фермента и к ингибитору. В опытах, проведенных на щитовидных железах быка (рис. 2), установлено, что активность МАО в митохондриях составляет 0,17 мкг NH_3 на 1 мг белка в 1 мин по отношению к субстрату тирамину и 0,079 мкг NH_3 на 1 мг белка в 1 мин по отношению к серотонину. Под влиянием ниала-

Матеріал, захищений авторським правом

мида происходит ингибирование исследуемого процесса на 93% в случае субстрата тирамина, на 100% — серотонина. После быстрого замораживания (300—400°/мин) до —196° С щитовидной железы активность МАО составляла 0,18 мкг NH_3 на 1 мг белка в 1 мин по отношению к субстрату тирамину, 0,077 мкг NH_3 на 1 мг белка в 1 мин — к серотонину. При использовании ниаламида в обоих случаях происходит ингибирование исследуемого процесса на 100%. На основании представлен-

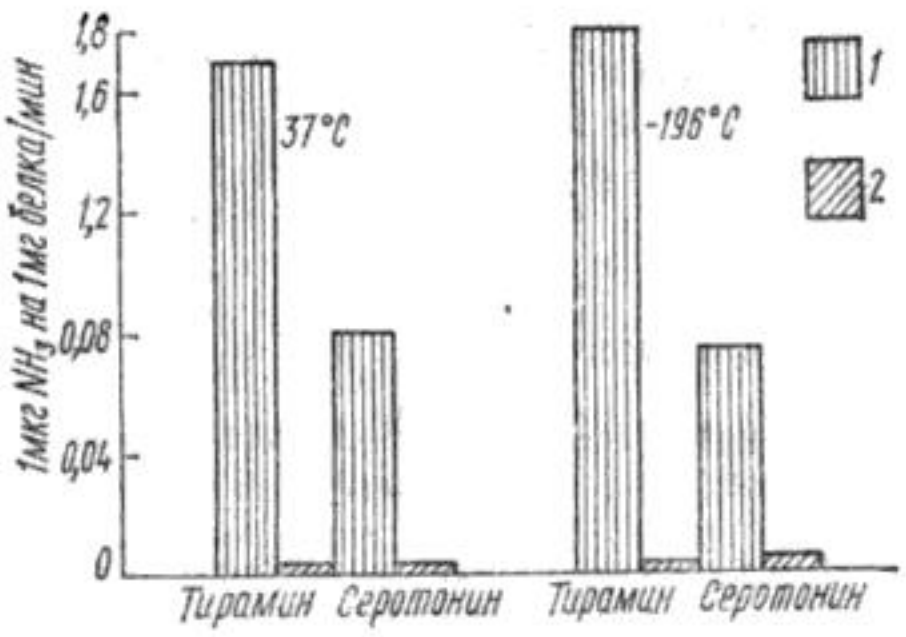


Рис. 1. Влияние замораживания (300—400 °/мин) и ингибирования ниаламидом в концентрации $1 \cdot 10^{-3}$М на активность МАО в печени крыс:
1 — без ингибитора, 2 — с ингибитором.



Рис. 2. Влияние замораживания (300—400 °/мин) и ингибирования ниаламидом в концентрации $1 \cdot 10^{-3}$М на активность МАО в щитовидной железе быка.
Условные обозначения те же, что и на рис. 1.

ных данных следует заключить, что быстрое замораживание образцов ткани до температуры жидкого азота не вызывает существенных изменений каталитической активности МАО и ее чувствительности к специфическому ингибитору. Эти данные позволяют заключить, что моноаминоксидаза устойчива к низким температурам и сохраняет в условиях замораживания-оттаивания свою структурно-функциональную организацию.

Учитывая, что МАО существует в виде двух функционально активных форм — А и Б [10], отличающихся между собой по отношению к субстратам и ингибиторам, мы попытались проанализировать полученные данные с точки зрения неоднородности указанной ферментной системы. Известно, что в сердце крыс (рис. 3) из исследуемых субстратов тирамин и серотонин являются субстратами для МАО типа А, в то время как в печени серотонин является субстратом типа А, а тирамин одинаково эффективно использовался как А, так и Б системами МАО [1]. В связи с тем, что в наших исследованиях при использовании указанных субстратов не было обнаружено различий в отношении МАО к замораживанию-оттаиванию, мы предполагали, что разные по функциональной активности формы МАО не отличаются между собой в криочувствительности. Несущественное значение для криоустойчивости имеет и характер локализации типов фермента: МАО, обладающая способностью окислять тирамин, расположена снаружи и внутри митохондриальных мембран, а форма А, окисляющая серотонин, представлена исключительно на внутренней поверхности митохон-

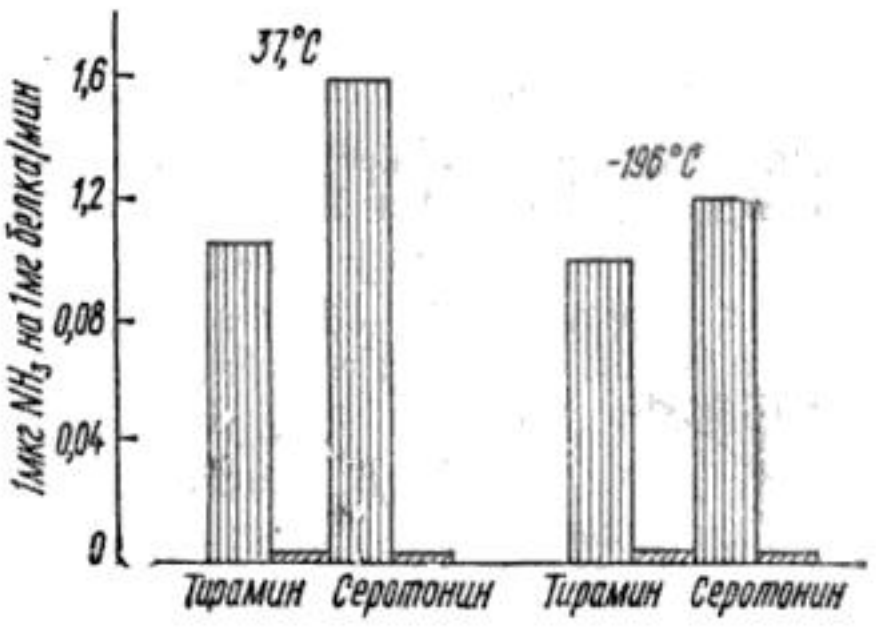


Рис. 3. Влияние замораживания (300—400 °/мин) и ингибирования ниаламидом в концентрации $1 \cdot 10^{-3}$М на активность МАО в сердце крыс.
Условные обозначения те же, что и на рис. 1.

Матеріал, захищений авторським правом

дриальных мембран [9]. Не является, по-видимому, решающим фактором для сохранения каталитической активности МАО после замораживания-оттаивания и липидное микроокружение фермента, которое, как известно, неодинаково у различных типов МАО и по-разному реагирует на охлаждение. В то время как МАО, окисляющая серотонин (типа А), существенно изменяется при понижении температуры до 21—23° С и таким образом связывается с фазовыми переходами липидов в липидно-белковом комплексе мембран, МАО, катализирующая окисление бензил-амина (форма Б), не зависит от жидкокристаллических свойств мембран [7]. Очевидно, устойчивость исследуемой ферментной системы к замораживанию определяется структурой белка. Не исключено, что проявление регулирующих свойств МАО связано с локализацией и микроокружением ферментной системы.

1. *Горкин В. З.* Аминоксидазы и их значение в медицине.— М.: Медицина, 1981.— 336 с.
2. *Северина И. С.*— О возможном механизме избирательного торможения хлоргилином и депренилом активности митохондриальной моноаминоксидазы печени крыс.— Биохимия, 1979, **44**, вып. 2, с. 195—205.
3. *Утевский А. М., Чуйко В. А., Губина Н. Ф.* Характеристика некоторых нейрогуморальных процессов при охлаждении различных биологических структур.— Криобиология и криомедицина, 1979, вып. 5, с. 52—57.
4. *Утевский А. М., Чуйко В. А., Губина Н. Ф.* Влияние охлаждения на способность тканей к захвату катехоламинов.— Укр. биохим. журн., 1980, **52**, № 1, с. 16—18.
5. *Утевский А. М., Губина Н. Ф., Чуйко В. А.* Охлаждение биологических структур и адренергические механизмы.— В кн.: Актуальные проблемы криобиологии. Киев: Наук. думка, 1981, с. 125—156.
6. *Утевский А. М., Чуйко В. А., Назарова Л. А.* Влияние охлаждения на активность митохондриальной моноаминоксидазы сердца белых крыс.— Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 7, с. 61—63.
7. *Rosa H. Huang.* Lipid-protein interactions in the multiple forms of monoamine oxidase enzymatic and ESR studies with purified intact rat brain mitochondria.— Pharmacology, 1980, **17**, N 2, p. 192—199.
8. Protein measurement with the foline phenol reagent/O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall.— J. Biol. Chem., 1951, v. **193**, N 1, p. 265—275.
9. *Russel S. M., Davey J., Mayer R. J.* Immunochemical studies of the localization of human monoamine oxidase on the mitochondrial outer membrane.— Biochem. Soc. Trans., 1979, **7**, p. 359—361.
10. *Tipton K. F.* Monoamine oxidase.— Amer. Physiol. Soc. Handbuch. Physiol., 1975, **6**, p. 677—697.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
21.01.82

УДК 57.043

А. В. Филев, В. П. Дыгин, А. Я. Холодный,
Г. И. Петренко

ОЦЕНКА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ГРАНУЛОМОНОПОЭЗА В КАДАВЕРНОМ КОСТНОМ МОЗГЕ, КРИОКОНСЕРВИРОВАННОМ ПОД ЗАЩИТОЙ ПОЛИВИНИЛПИРРОЛИДОНА

Известно, что при лучевых поражениях, некоторых интоксикациях, активной химиотерапии развиваются тяжелые поражения гемопоэтических органов, вплоть до полной аплазии костного мозга. При этом, в первую очередь, повреждаются гемопоэтические стволовые клетки, от концентрации и функциональной способности которых зависят возможность и сроки восстановления гемопоэза.

В случае необратимого поражения стволовых клеток средством выбора лечения становится миелотрансплантация. Этим диктуется необходимость заготовки и длительного хранения значительных количеств

Матеріал, захищений авторським правом

костного мозга. Однако лечебная эффективность миелотрансплантации определяется не столько объемом перелитого костного мозга, сколько концентрацией и функциональной активностью стволовых клеток трансплантируемого костного мозга. Заготовка больших количеств костного мозга здоровых людей является сложной экономической и деонтологической проблемой, поэтому представляется весьма важным изучение возможности получения и длительного хранения стволовых клеток-предшественников гемопоэза посмертного костного мозга.

Задачей настоящего исследования было изучение функциональной способности клеток-предшественников грануломонопоэза кадаверного костного мозга, заготовленного от скоропостижно умерших людей через 2—6 ч после смерти.

Материал и методы. Костный мозг получали путем аспирации из крыльев подвздошных костей. В качестве консерванта для костного мозга использовали раствор ЦОЛИПК-3 в соотношении 1 : 1. Заготовленную костномозговую суспензию хранили до замораживания 18—24 ч при температуре 4—6° С. Непосредственно перед замораживанием производили миелокариоцитаферез. Сконцентрированные в нужном объеме костномозговые клетки смешивали с криозащитным раствором в соотношении 1 : 1, при этом конечная концентрация поливинилпирролидона в смеси составляла 10%. Замораживание костного мозга осуществляли в алюминиевых контейнерах емкостью 160 мл по двухэтапной программе. Охлаждение осуществляли со скоростью 1°/мин до начала кристаллизации смеси, затем, по завершении кристаллизации, со скоростью 10°/мин, до температуры жидкого азота (—196° С). Замороженный костный мозг хранили в жидком азоте в течение 3—6 лет. Оттаивание производили на водяной бане при температуре 40—41° С в течение 60 с.

Изучение функциональной способности клеток-предшественников грануломонопоэза проводили путем определения их кластеро-(КлОС) и колониеобразующей (КОС) способности. Использовали метод клонирования в двухслойной агаровой культуре Пик, Робинсон [6] с некоторыми модификациями. Известно, что рост грануломоноцитарных клеток-предшественников in vitro происходит только в присутствии колониестимулирующего фактора (КСФ), основными донаторами которого являются мононуклеары [3, 4]. Использованный нами метод культивирования клеток достаточно чувствительный. Однако и он имеет некоторые недостатки. Так, разведение костного мозга периферической кровью при аспирации дает заниженную величину колониеобразующей способности костного мозга. Использование в качестве фидера лейкоцитов периферической крови также не совсем адекватно, поскольку, кроме клеток-донаторов КСФ, среди них есть сегментоядерные лейкоциты, содержащие ингибиторы пролиферации молодых клеток — кейлоны [5, 7].

После размораживания гемопоэтические клетки помещали в силиконированную стерильную пробирку с 2 мл среды № 199 + 100Ед гепарина и сидментировали клетки. Супернатант, содержащий криопротектор, отсасывали, из клеточной суспензии выделяли фракцию мононуклеаров путем сепарации в градиенте фиколл-верографина (уд. плотность 1,076). Отмывание от фиколл-верографина и остаточных примесей криопротектора проводили средой Мак-Койс путем центрифугирования при 800 об/мин в течение 5 мин. Полученную фракцию мононуклеаров, содержащую стволовые гемопоэтические клетки, разводили средой Мак-Койс до концентрации 1×10^6 клеток в 1 мл. Модифицированную среду Мак-Койс и питательные полужидкие агаровые среды готовили согласно рекомендациям Б. В. Афанасьева с соавт. [1]. В качестве фидера (донатора КСФ) использовали мононуклеары, полученные из свежегепаринизированной донорской крови АВ(IV) сепарацией в градиенте фиколл-верографина. Нижний (5%) агаровый слой (фидер) содержал $4—5 \times 10^5$ мононуклеаров в 1 мл агаровой среды; тестируемые мононуклеары костного мозга эксплантировали в верхний ага-

Матеріал, захищений авторським правом

ровый (3%) слой в концентрации 1×10^5 кл/мл агаровой среды. Культивирование проводили по методу Б. В. Афанасьева с соавт. [2]. Результаты оценивали на 8—10-й день после посева. КОС определяли по числу колоний, а КлОС — по числу кластеров на 1×10^5 экспантированных клеток. Агрегаты, содержащие более 20 клеток, оценивали как колонии, а от 3 до 20 клеток — как кластеры. Колонии подразделяли на малые (20—40), средние (40—100) и большие (более 100)

Показатели кластеро-(КлОС) и колониеобразующей (КОС) способности клеток-предшественников грануломонопоэза в костном мозге

Костный мозг	Статистический показатель	КлОС/10^5-мононуклеаров	КОС/10^5 мононуклеаров	Размер колоний		
				20—40 клеток	40—100 клеток	более 100 клеток
Кадаверный криоконсервированный (13 наблюдений)	Max	240	77	40	34	9
	Min	64	18	7	2	0
	$M \pm m$	112,4±15,2	44,6±5,1	21,2±2,9	19,8±2,8	4,0±0,8
Донорский нативный (20 наблюдений)	Max	280	76	54	43	11
	Min	106	29	12	7	0
	$M \pm m$	131,76±10,7	54±2,9	23,6±2,6	25,8±2,2	5,2±0,7
	p	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

клетки. Исследовано 13 образцов размороженного кадаверного костного мозга. Контролем служили результаты определения КлОС и КОС клеток-предшественников грануломонопоэза 20 здоровых лиц.

Обнаружено, что после хранения в жидком азоте под защитой поливинилперролидона — в размороженном кадаверном костном мозге КлОС и КОС грануломоноцитарных клеток-предшественников несколько ниже соответствующих показателей костного мозга здоровых людей (различия статистически недостоверны). Это свидетельствует о том, что даже через несколько часов после смерти в костном мозге умерших имеются жизнеспособные стволовые клетки-предшественники грануломонопоэза, сохраняющие чувствительность к КСФ (регулятору грануломонопоэза) и свой репопулирующий потенциал. Криоконсервирование с поливинилпирролидоном и хранение в течение нескольких лет в жидком азоте гемопоэтических клеток существенно не влияет на жизнеспособность клеток-предшественников грануломонопоэза. Об этом свидетельствует достаточно высокое содержание кластеро- и колониеобразующих клеток в размороженном посмертном костном мозге (таблица).

Поскольку стволовые и полустволовые (морфологически неидентифицируемые) клетки имеют длительный период покоя (G_o) и отличаются весьма низким метаболизмом, можно предполагать, что потеря ими жизнеспособности происходит значительно позднее, чем у дифференцированных (морфологически идентифицируемых) клеток с коротким периодом покоя и более высокими темпами метаболизма. Именно так можно объяснить достаточно высокую сохранность стволовых клеток-предшественников гемопоэза в посмертном костном мозге.

Есть основание также полагать, что за счет более ранней гибели класса созревающих и зрелых гемопоэтических клеток возможно относительное возрастание процента грануломоноцитарных клеток-предшественников, который, вероятно, увеличивается еще в большей степени в ходе криоконсервирования, хранения и размораживания.

Таким образом, проведенные нами исследования позволили установить, что посмертный костный мозг является перспективным источником получения клеток-предшественников грануломонопоэза, а криоконсервирование в жидком азоте под защитой поливинилпирролидона дает возможность хранить их в жизнеспособном состоянии до шести лет.

Матеріал, захищений авторським правом

1. *Афанасьев Б. В., Зарицкий А. Ю., Забелина Т. С.* Колониеобразующая способность костного мозга гематологически здоровых лиц в полутвердой агаровой среде.— Физиология человека, 1976, 2, с. 301—308.
2. *Афанасьев Б. В., Зарицкий А. Ю., Забелина Т. С.* Применение сыворотки плацентарной крови для культивирования гемопоэтических клеток человека в полутвердой агаровой среде.— Там же, 1976, 2, с. 308—310.
3. *Chervenick T. A., Lobiglio A. F.* Human blood monocytes stimulatore of granulocytes and mononuclear colony formation in vitro.— Science, 1972, 173, p. 164—166.
4. *Cline M. J., Golde D. W.* Production of colony-stimulating activity by human lymphocytes.— Nature. London, 1974, 248, p. 703—704.
5. *Paucovits W. R., Paucovits J. B.* Separation, identification and mechanism of action of the granulocytic chalone.— Boll. Inst. Sierotez. Milan, 1975, 54, p. 177—186.
6. *Pike B. L., Robinson W. A.* Human bone marrow colony growth in ag agar-gel.— J. Cell. Physiol., 1970, 76, p. 77—84.
7. *Pytõmaa T.* Chalone of granulocyte system.— Nat. Congr. I Inst. Monogr., 1972, 38, p. 143—146.

Военно-медицинская академия
им. С. М. Кирова МО СССР
г. Ленинград

Поступила в редколлегию
25.01.81

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043 : 616.5.361.014.41 : 547.422

Н. А. Волкова, Б. П. Сандомирский

ВЛИЯНИЕ ПЭО-400 НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ДЕКОНСЕРВИРОВАННОЙ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА

Биологическая полноценность деконсервированного материала зависит от большого количества факторов, действующих на этапах криоконсервирования [9, 12]. Функциональное изучение замороженной кожи крыс и мышей [10] показало, что охлаждение до температуры сухого льда или жидкого азота без специальных защитных веществ приводит ткань к гибели. В то же время имеются экспериментальные и клинические данные в пользу оптимизации скоростей охлаждения кожи с сохранением ее полноценности и без криопротектора [2, 11], однако большинство методов криоконсервации и долгосрочного хранения кожи, существующих в настоящее время, основаны на применении криозащитных веществ — глицерина, ДМСО, ПЭО-400 [1, 5—8]. Существенное влияние на результат криоконсервации оказывают концентрация криопротектора и длительность контакта с ним, обеспечивающие защиту биологического объекта при замораживании-отогревании [4].

Целью настоящей работы явилось изучение влияния экспозиции в среде замораживания, содержащей ПЭО-400, на морфофункциональное состояние деконсервированной трупной кожи.

Материал и методы исследования. В работе использованы дермоэпидермальные лоскуты от 9 трупов мужского пола 54—71 года, взятые через 5—6 ч с момента смерти и находившиеся до замораживания 24 ч в гипотермических условиях (4° С), включая контакт с 15%-ным раствором ПЭО-400 на среде Хенкса на протяжении 3, 12 и 24 ч. В дальнейшем лоскуты замораживали со скоростью 25—35°/мин до —196° С и хранили в жидком азоте на протяжении 6—7 сут. Отогрев осуществляли на водяной бане при 40° С. Органное культивирование вели в чашках Конвея по методу Е. А. Лурия [3] на миллипоровых фильтрах НА (диаметр пор 0,45 мкм). Жидкая среда состояла из 70% среды 199, 10% телячьей эмбриональной сыворотки, 10% сыворотки крови человека IV (АВ) группы, 10% куриного эмбрионального экстракта и дополнялась другими ингредиентами из расчета: 400 мг глюкозы, 10 мг аскорбиновой кислоты, 20 мг L-глютамина, по 50 ед. пенициллина и стрептомицина на каждые 100 мл среды. Культивирование проводили при 37° С в атмосфере воздуха с 5% CO_2, смену жидкой фазы — через 48—72 ч на $^1/_3$ объема. Эксплантаты фиксировали на 2, 3, 5, 7, 10, 12, 14 и 16-е сутки в 96-градусном этаноле и заключали в целлоидин-парафин. Серийные срезы толщиной 5—7 мкм, полученные перпендикулярно поверхности эпидермиса, а также тотальные препараты фильтров окрашивали гематоксилин-эозином. Всего эксплантировано и изучено 27 серий эксплантатов.

Результаты исследования. При культивировании эксплантатов из лоскутов, экспонированных до замораживания 3 ч в 15%-ном растворе ПЭО-400 на среде Хенкса, в течение первых 2—3 сут обнаружена гибель большинства ядер эпидермоцитов (рис. 1, *а*). При сохранении размеров и формы клеток и их ядер наблюдались повышенная эозинофилия цитоплазмы и крайне слабая базофилия ядер. Кроме кариолиза, наблюдались явления кариорексиса и пикноза, однако на этом фоне

Матеріал, захищений авторським правом

в составе эпидермиса находились также клетки, малоотличающиеся от интактных. Подобная картина наблюдалась и в составе эпителиальной выстилки дериватов кожи: наряду со множеством погибших, выявлялись клетки, сохранившие характерное строение и типичную окраску. Эозинофилия поверхностных слоев эпидермиса выражалась сильнее, чем глубоких. Эпидермис частично отделен от дермы, имевшей хорошо выраженный рисунок волокнистых структур и мало измененные клеточные элементы.

К 5-м суткам культивирования эпидермис на большем протяжении был отделен от дермы, практически все ядра в нем лизированы, окраска оксифильная. Линия отторжения эпидермиса неровная, на поверхности

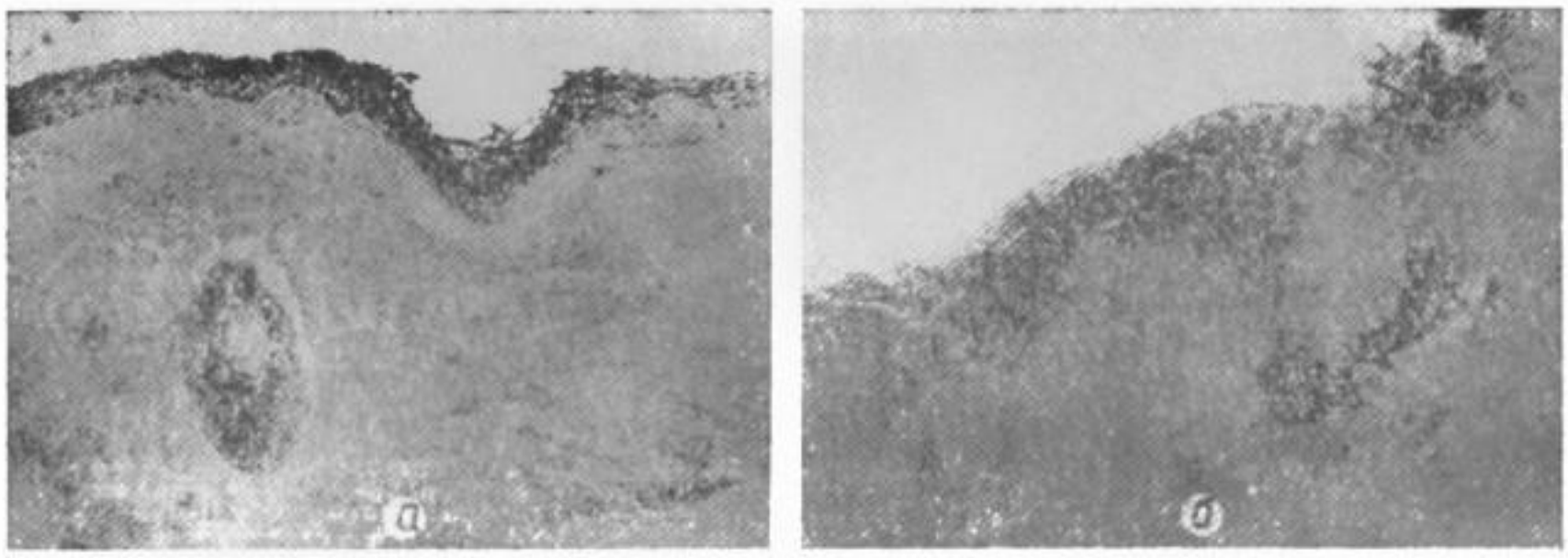


Рис. 1. Развитие в органной культуре эксплантатов деконсервированной трупной кожи (3 ч контакта с 15%-ным ПЭО-400 перед замораживанием):

а — 3-дневный эксплантат. Дистрофические и некротические процессы в эпидермисе. Гематоксилин-эозин, × 100; *б* — 10-дневный эксплантат. Пролиферация эпителия концевых отделов волосяных фолликулов. Гематоксилин-эозин, × 100.

нарушенной базальной мембраны остались единичные базальные клетки нормального вида. Состояние дермы мало отличалось от предыдущего наблюдения.

В конце первой — начале второй недели культивирования наблюдалось активное размножение эпителиальных клеток, происходящих в основном из эпителиальной выстилки концевых отделов волосяных фолликулов. Эти эпидермоциты в виде пласта распространялись по поверхности дермы (рис. 1, *б*). Молодые полигональные клетки характеризовались большими размерами, светлой цитоплазмой и содержали крупные округлые ядра с несколькими ядрышками. Пласт, достигающий к 10-м суткам высоты 6—7 слоев клеток без выраженной вертикальной анизоморфности, проявлял тенденцию к распространению эпителия не только по поверхности дермы, но и образованию небольших выростов в дерму. В течение второй недели культивирования наблюдалось активное заселение эпителиальными клетками эпидермальной поверхности дермы, завершающееся к 14-м суткам. Одновременно с этим наиболее глубокие слои, обнаруживавшие способность к врастанию в дерму, сменялись 1—2 слоями уплощенных клеток, поверхностнее которых лежали полигональные клетки с пикнотичными ядрами. Параллельно выявлялась тенденция эпителиальных клеток к миграции по плоскости резаного края дермы, волокнистые структуры в которой отличались склонностью к базофилии. В дальнейшем наблюдалось незначительное усиление описанных процессов, хотя ни полное обрастание дермы эпителиальными клетками, ни формирование рогового слоя не отмечены.

При изучении поддерживающих фильтров на 10-е сутки обнаружены прикрепившиеся эпителиальные клетки, на 12-е сутки — единичные фибробласты. В эксплантатах деконсервированной кожи, находившейся до замораживания 12 ч в 15%-ном растворе ПЭО-400, на 2—3-е сутки культивирования наблюдался резкий пикноз ядер, отличающихся неровными краями (рис. 2, *а*). Наиболее пострадавшими выглядели

Матеріал, захищений авторським правом

поверхностные слои эпидермиса, базальные клетки росткового слоя сохранены лучше. Волокнистые структуры дермы имели рисунок и тинкториальные свойства, характерные для исходного материала, а в части клеточных элементов наблюдались единичные пикнотичные ядра. На 5-е сутки эпидермис был разделен, верхние слои, включая часть шиповатого, отторгнуты. В составе эксплантата отмечены дерма, а также базальные клетки росткового слоя и 2—3 ряда шиповатых клеток, многие из которых нагружены пигментом. Ядра таких клеток пикнотичны, цитоплазма базофильна. Клеточные элементы и волокнистые структу-

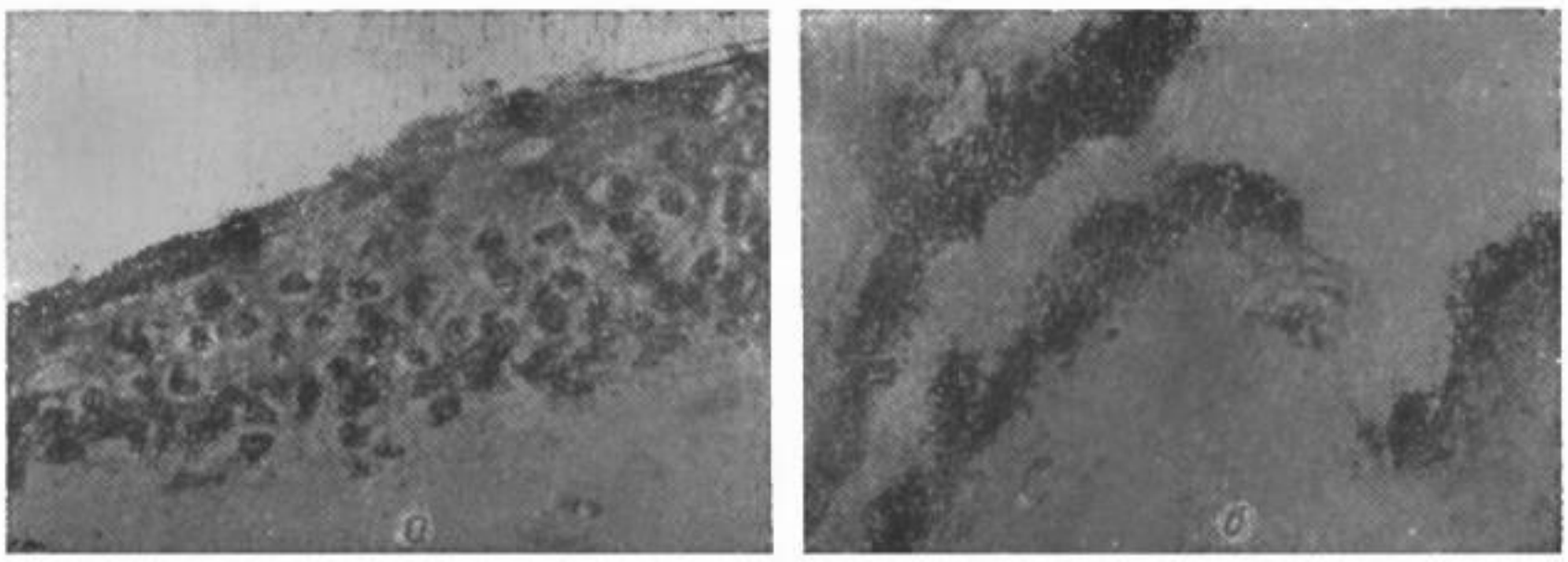


Рис. 2. Состояние в органной культуре эксплантатов деконсервированной трупной кожи (12 ч контакта с 15%-ным раствором ПЭО-400 перед замораживанием):

а — 2-дневный эксплантат. Дистрофические изменения ядер эпидермиса. Гематоксилин-эозин, × 200; *б* — 7-дневный эксплантат. Некротизация эпидермиса. Гематоксилин-эозин, × 100.

ры дермы мало отличались от предыдущих наблюдений. На 7—10-е сутки культивирования на поверхности базальной мембраны заметно чередование бесклеточных участков и зон, содержащих клетки с лизированными ядрами и изменившимися в сторону базофилии тинкториальными свойствами (рис. 2, *б*). Сохранившиеся клетки потеряли многоугольную форму и стали округлы, в некоторых местах они отделялись от слоя. Дерма слабо базофильна, хотя фибробластические элементы в ней признаков углубления дистрофических процессов не обнаруживали.

Дальнейшее культивирование приводило к усилению некротических изменений в эпидермисе: округлившиеся клетки частично или полностью теряли ядерное содержимое. Однако среди этих клеток встречались светлые с четким базофильным ядром эпидермоциты. Дерма изменялась меньше, но на 12-е сутки большинство клеточных элементов в ней обнаруживало признаки дистрофии.

Изучение тотальных препаратов фильтров показало, что после недели культивирования на фильтре выявлялись единичные клетки с поврежденной цитоплазмой. Если трупная кожа до замораживания находилась 24 ч в контакте с 15%-ным раствором ПЭО-400, то при помещении ее после деконсервации в условия органного культивирования признаки развития, свойственные эксплантатам кожи, отсутствовали, архитектоника эксплантатов сохраняла статичность. С 2-х суток культивирования развивались аутолитические процессы, которые приводили к тому, что к 5-ым суткам культивирования клетки эпидермиса были практически без ядер и только в глубине росткового слоя обнаруживались отдельные нормально окрашенные ядросодержащие клеточные элементы (рис. 3, *а*). Эозинофильный эпидермис по окраске мало отличался от дермы, его граница определялась по наличию пигмента в базальных клетках. На 10—12-е сутки эксплантат погибал (рис. 3, *б*). При изучении фильтров не обнаружено выселение клеточных элементов.

Обсуждение полученных результатов. Продолжительность инкубации кожи в защитной среде оказывает существенное влияние на ре-

Матеріал, захищений авторським правом

зультаты консервирования, что обусловлено как повреждающим действием криопротектора, так и временем, необходимым для насыщения ткани этим веществом, придающим объекту устойчивость к неблагоприятным условиям замораживания-оттаивания. Полученные данные свидетельствуют о том, что 3-часовое пребывание перед замораживанием кожного лоскута в 15%-ном растворе ПЭО-400 сохраняет у части клеток способность к размножению и формированию нового редуцированного эпидермиса, реализуемую в благоприятных условиях органной культуры. Это положение относится и к фибробластическим элементам

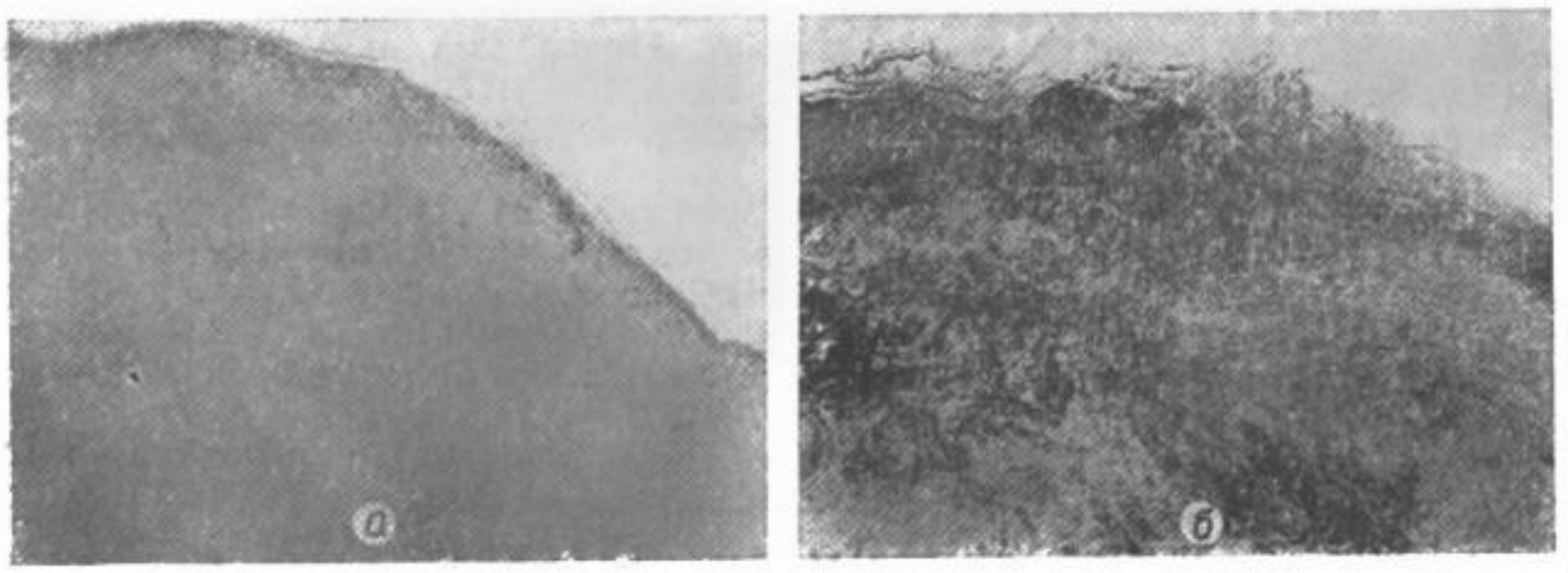


Рис. 3. Состояние в органной культуре эксплантатов деконсервированной трупной кожи (24 ч контакта с 15%-ным раствором ПЭО-400 перед замораживанием):

а — 3-дневный эксплантат. Кариолиз, оксифилия. Гематоксилин-эозин, × 100; *б* — 10-дневный эксплантат. Гибель эксплантата. Гематоксилин-эозин, × 100.

дермы, что подтверждается появлением их на поддерживающих фильтрах. Пролиферация выживших клеток начинается в конце первой недели культивирования и наблюдается в течение всего срока исследования. Более длительный (12—24-часовой) контакт с криопротектором ПЭО-400 приводит к утрате размороженной тканью способности к пролиферации и функционированию. При сохранении структурного взаиморасположения компонентов кожного фрагмента и размеров клеток, входящих в его состав, наблюдается изменение тинкториальных свойств и кариолиз сходно с аутолизом кожи в безмикробной среде. С другой стороны, эксплантаты из кожных лоскутов, различное время контактировавших с ПЭО-400 до замораживания, первые 2—3-е суток культивирования после отогрева проявляют близкие дистрофические изменения. На 5-е сутки выявляются различия между сериями в зависимости от экспозиции с криопротектором: в ткани, которая 3 и 12 ч находилась в контакте с ПЭО-400, наблюдается отделение некротизированного эпидермиса и, в случае сохранности части базальных клеток, как это имело место после 3-часовой экспозиции, с конца первой недели — пролиферация эпидермальных клеточных элементов, приводящая к эпителизации обнаженной поверхности эксплантата. Более длительный контакт (12 ч) приводит к отделению на 5-е сутки части эпидермиса, причем оставшиеся на базальной мембране клетки не способны к восстановлению и постепенно гибнут. После 24 ч экспозиции с 15%-ным раствором ПЭО-400 в размороженных кожных лоскутах отсутствуют грубые механические повреждения, характерные для результатов низкотемпературной консервации без криопротектора, однако имеют место необратимые повреждения главным образом клеточных элементов.

Таким образом, 3-часовая экспозиция кожных лоскутов с 15%-ным раствором ПЭО-400 является вполне достаточной для реализации его криозащитных свойств, обеспечивая после размораживания способность к восстановлению части камбиальных клеток эпидермиса, которые при культивировании вовлекаются в реконструктивные процессы, приводящие к формированию нового многослойного эпителия.

Матеріал, захищений авторським правом

1. *Гулиева Ш. К.* Оценка методов определения жизнеспособности кожи, фасции и сухожилия, консервированных низкими температурами (экспериментальное исследование) : Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— Новосибирск, 1978.— 27 с.
2. *Лівшиць В. Л.* Анабіотична консервація шкіри і гомопластика її при опіках.— К. : Здоров'я, 1970.— 196 с.
3. *Лурия Е. А.* Кроветворная и лимфоидная ткань в культурах.— М. : Медицина, 1972.— 176 с.
4. *Пушкарь Н. С., Белоус А. М.* Введение в криобиологию.— К. : Наук. думка, 1975.— 343 с.
5. *А. С. № 549123 (СССР).* Способ консервирования кожи / Пушкарь Н. С., Пекарский Д. Е., Сандомирский Б. П. и др. Опубл. в Б. И., 1977, № 9.
6. *А. С. 535933 (СССР).* Способ консервации кожи / Пушкарь Н. С., Цуцаева А. А., Калмыков К. К. и др.— Опубл. в Б. И., 1976, № 43.
7. *Barlyn L. W., Berggren R. B., Lehr H. B.* Frozen skin autografts protected by dimethyl sulfoxide.— Surg. Forum, 1964, N 15, p. 475—477.
8. *Billingham R. E., Medawar P. B.* The freezing, drying and storage of mammalian skin.— J. Exp. Biol., 1952, 29, p. 454—468.
9. *Mazur P., Leibo S. P., Farrant J. et al.* Interaction of cooling rate, warming rate and protective additive on the survival of frozen mammalian cells.— In: The frozen cell / Ed. G. E. W. Wolstenholme, M. O'Connor. London, 1970, p. 69—88.
10. *Taylor A. C., Gernstner R.* Tissue survival after exposure to low temperatures and effectiveness of protective pretreatment. I. Evaluation by growth in tissue culture.— J. Cell Comp. Physiol., 1955, **46**, p. 477—502.
11. Évolution des greffes de peau congelée aprés implantation intraviscérale / M.-J. Tharanne, C. Dhennin, M. Sam Giao, J.-M. Greco.— Folia morphol. (CSSR) Praha, 1980, **28**, N 3, p. 211—213.
12. *Weimar W., Haraguchi K.* Mesodermal growth factor a new type a cryoprotectant? — Cryobiology, 1979, **16**, N 4, p. 332—337.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
05.01.82

УДК 57.043

В. Ю. Клейза, Б. Э. Дайнис,
Г. Ю. Жукаускас

ГИПОТЕРМИЧЕСКАЯ ПЕРФУЗИОННАЯ КОНСЕРВАЦИЯ КАДАВЕРНЫХ ПОЧЕК

По данным разных центров пересадки почки [3, 6], от 20 до 30% всех пересаженных почек не способны функционировать после пересадки чаще всего из-за глубоких ишемических повреждений. Больным с хронической почечной недостаточностью пересадка нежизнеспособного почечного трансплантата часто приводит к фатальному исходу. Из двух, применяемых в клинике методов консервации органов [4, 5], более информативным является гипотермическая перфузионная консервация [2, 7, 8]. Однако методы оценки жизнеспособности и функциональной полноценности органа пока не позволяют с полной уверенностью судить о пригодности почки к трансплантации в клинике.

Целью нашей работы явился поиск существенных критериев, отображающих пригодность почечного трансплантата для пересадки после консервации его методом гипотермической перфузии.

Материалы и методы исследования. В Вильнюсском центре пересадки почки с 1970 г. заготовлено свыше 630 кадаверных почечных трансплантатов, 323 из которых было пересажено больным с хронической почечной недостаточностью (ХПН). Большинство почек консервировали иммерсионным методом, используя модифицированный раствор ВНИИКиЭХ. В 28 случаях применялся комбинированный метод консервации: иммерсия в сочетании с перфузией. Доноры почек находились в лечебных учреждениях Литовской ССР на расстоянии от 5 до 320 км от Вильнюсского центра пересадки почки. Первичная тепловая ишемия почек в большинстве случаев не превышала 25 мин. После изъятия почечные трансплантаты промывали гипотермическим (2° С) раствором ВНИИКиЭХ, после чего помещали в физиологический рас-

Матеріал, захищений авторським правом

твор при той же температуре. В качестве транспортной тары использовались стерильные одноразовые трехслойные полиэтиленовые мешочки и контейнеры со льдом. Продолжительность первичной иммерсионной консервации во время транспортировки до Вильнюсского центра пересадки почки колебалась от 4 до 14 ч (7,5 ч в среднем). В случаях, когда жизнеспособность почечных трансплантатов подвергалась сомнениям, нами использовался комбинированный метод консервации. Доставленные в Вильнюсский центр трансплантаты подключали к перфузионному аппарату ПФ-3Б фирмы «Гамбро». Показаниями для перфузионной консервации служили: длительная агония донора с выраженной артериальной гипотензией, олигурия донора перед смертью, выраженный периферический спазм сосудов донора, первичная тепловая ишемия на

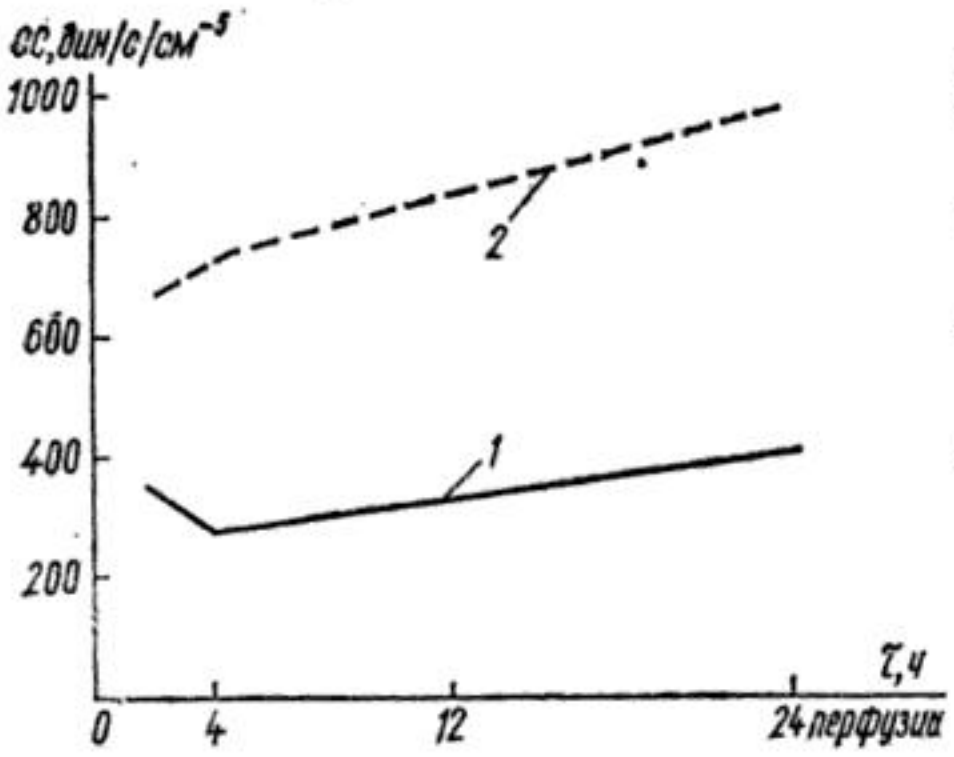


Рис. 1. Динамика сосудистого сопротивления во время перфузии:
1 — первая группа. *2* — вторая группа.

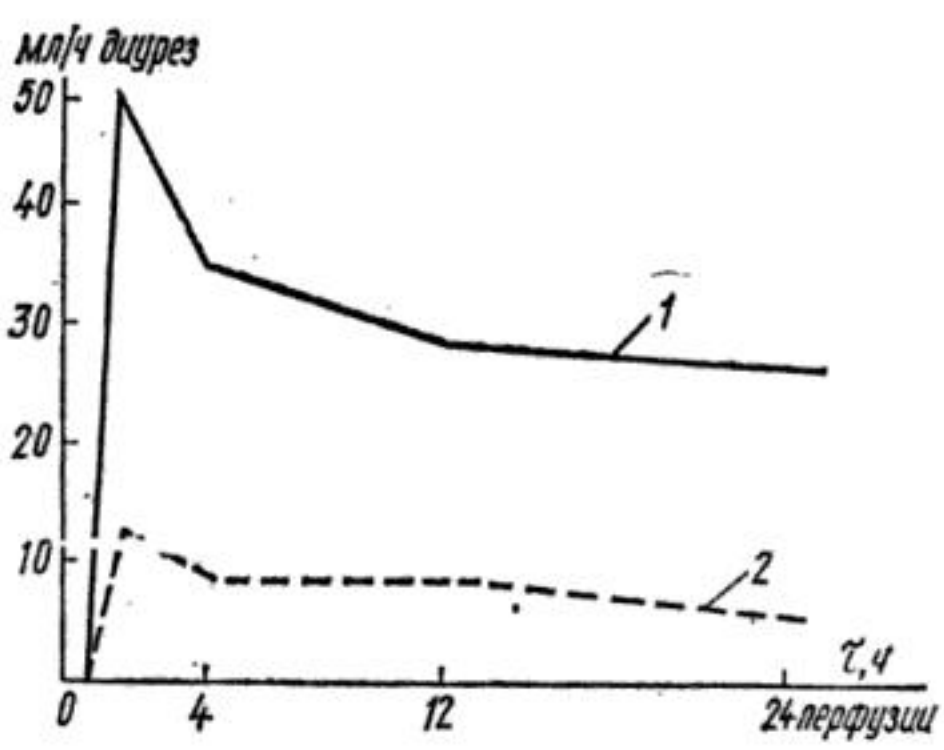


Рис. 2. Диурез почки во время перфузии. Условные обозначения те же, что и на рис. 1.

протяжении более 25 мин, плохо отмытый трансплантат, предполагаемая продолжительность консервации более 24 ч.

Перфузия производилась гипотермическим раствором 8—10° С ВНИИКиЭХ с добавлением 5%-ного раствора альбумина. Ежечасно регистрировали объем перфузии, перфузионное давление, количество выделяемой почкой мочи, высчитывали сосудистое сопротивление. Через 1, 4, 12 и 24 ч в перфузате определяли pH, pO_2, pCO_2, количество молочной, пировиноградной кислот и ферментативную активность лактатдегидрогеназы. Перфузию почек производили в двух группах: в первой — с короткими сроками первичной тепловой ишемии; во второй — с более длительными сроками первичной тепловой ишемии и с менее благоприятным анамнезом донора (гипотензия, олигурия и т. п.).

Результаты и их обсуждение. Объем перфузии в первой группе колебался от 150 до 350 мл/мин или от 0,9 до 1,8 мл/г·мин. Сосудистое сопротивление (СС) — в среднем 350 дин/с/см$^{-5}$ — имело тенденцию снижаться в первые 4 ч перфузии и медленно повышаться при дальнейшей перфузии. Во второй группе объем перфузии колебался от 50 до 130 мл/мин или от 0,25 до 0,8 мл/г·мин. Сосудистое сопротивление (в среднем 680 дин/с/см$^{-5}$) вначале имело тенденцию повышаться на протяжении всей перфузии (рис. 1). Разница между группами статистически достоверна ($p < 0{,}01$).

Количество выделяемой почкой мочи во время перфузии в первой группе составляло в среднем 51 мл/ч в начале, а потом снижалось и колебалось в пределах 30—25 мл/ч, а во второй группе достигало в среднем только 13 мл/ч в начале перфузии. Спустя 4 ч перфузии вплоть до 24 ч количество мочи не превышало 7—10 мл/ч (рис. 2). Надо отметить, что 4 из 10 почек этой группы во время перфузии вообще не выделяли мочи. Количество молочной кислоты в процессе перфузии постепенно увеличивалось как в первой, так и во второй группе

Матеріал, захищений авторським правом

опытов (рис. 3). Количество пировиноградной кислоты в ходе перфузии до 12 ч изменялось в группах в пределах небольших величин, однако спустя этот срок в первой группе опытов содержание метаболита несколько повышалось (рис. 4). Ферментативная активность лактатдегидрогеназы в ходе перфузии увеличивалась в обеих группах (рис. 5). В связи с избыточным накапливанием в перфузате кислых метаболитов его pH в обеих группах уменьшалась на протяжении всей перфузии

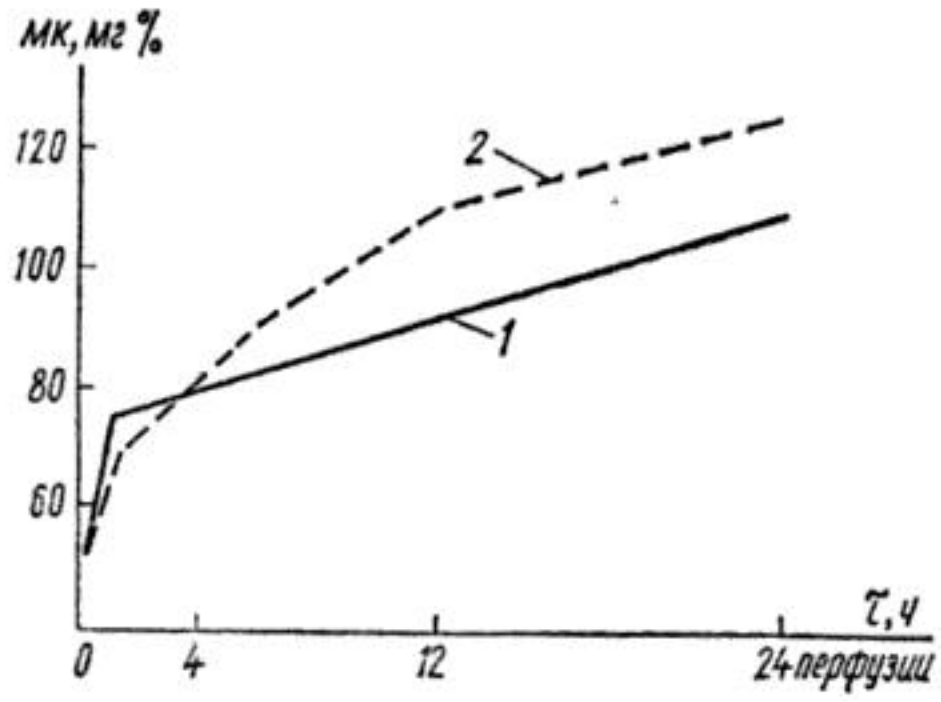


Рис. 3. Концентрация молочной кислоты в перфузате.
Условные обозначения те же, что на рис. 1.

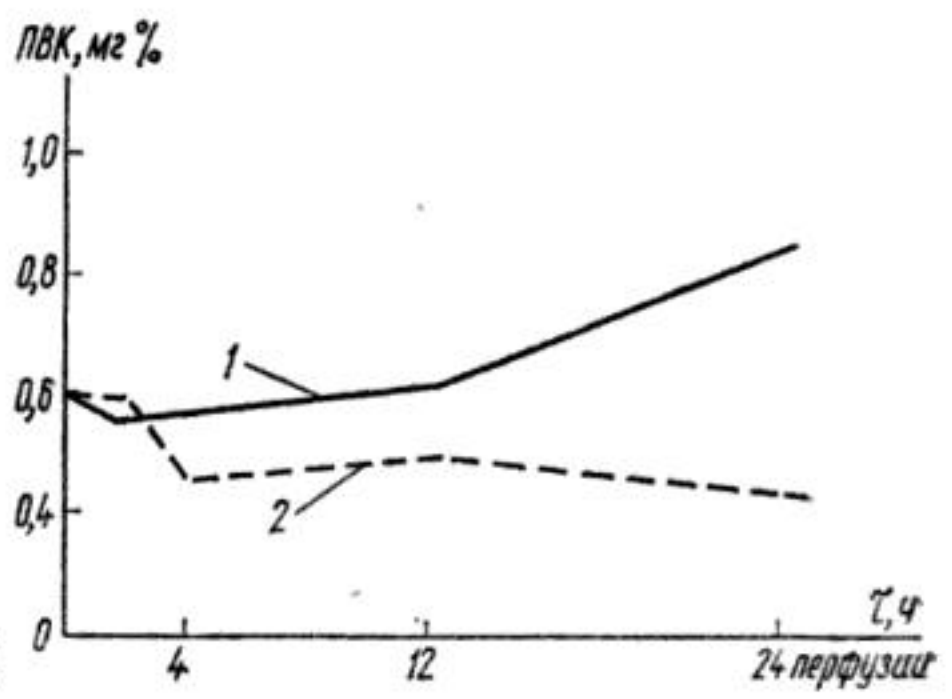


Рис. 4. Концентрация пировиноградной кислоты в перфузате.
Условные обозначения те же, что на рис. 1.

(рис. 6). (По этим четырем параметрам разница между группами статистически недостоверна ($p > 0{,}1$)).

Три почечных трансплантата (11%) после перфузионной консервации были пересажены больным с ХПН. В послеоперационном периоде

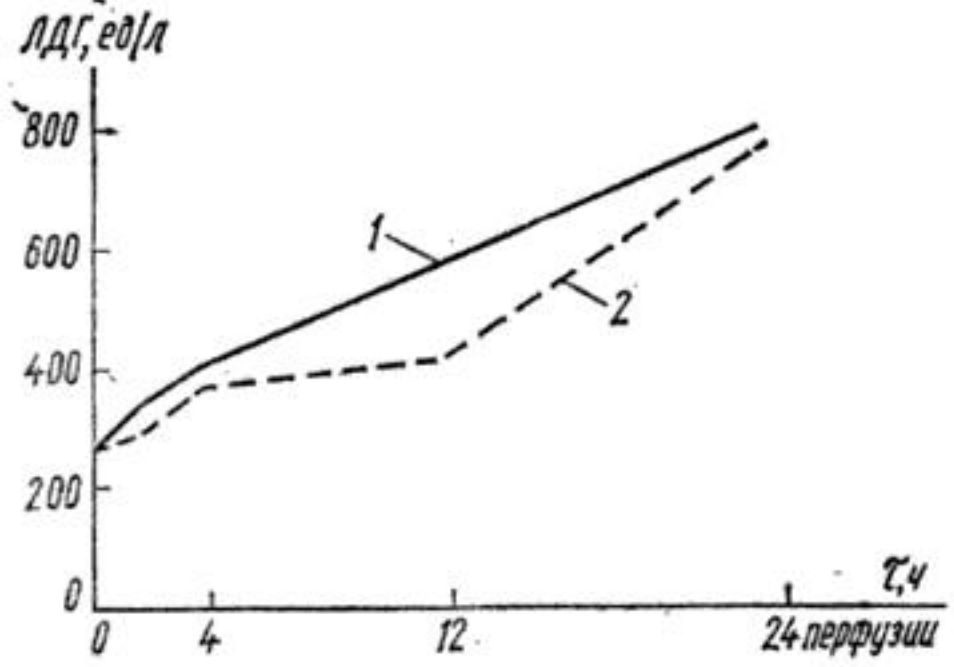


Рис. 5. Концентрация лактатдегидрогеназы в перфузате.
Условные обозначения те же, что на рис. 1.

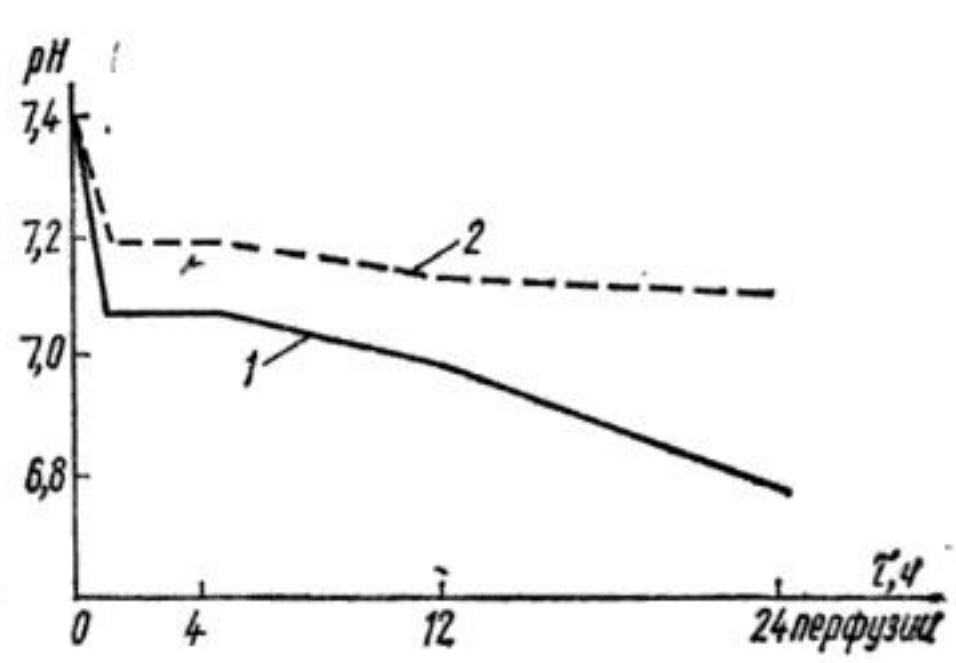


Рис. 6. Динамика pH в перфузате во время перфузии.
Условные обозначения те же, что на рис. 1.

у всех больных отмечался острый канальцевый некроз. Двум больным было проведено по три сеанса гемодиализа, после которых начала восстанавливаться функция трансплантата. Нормализация показателей азотистого обмена и креатинина наступала на 20-й день после трансплантации. Третий трансплантат был удален на 18-е сутки после пересадки из-за острого отторжения.

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что наиболее выраженная разница в уровне жизнеспособности трансплантатов может быть получена на основе гидродинамических показателей перфузии и количества выделяемой почкой мочи. Эти показатели являются информативными даже в первые часы (0—4 ч) перфузии, потому их можно использовать в качестве критерия жизнеспособности трансплантата.

Таким образом, в процессе перфузионной консервации можно определять жизнеспособность почечного трансплантата и пригодность его к пересадке по следующим показателям: объему перфузии не менее

Матеріал, захищений авторським правом

150 мл/мин или 0,9 мл/г·мин при перфузионном давлении не выше 60 мм рт. ст., сосудистом сопротивлении не более 450 дин/с/см$^{-5}$ и количеству выделяемой почкой мочи не менее 25 мл/ч в первые часы перфузии. Если в течение первых четырех часов перфузионные параметры остаются ниже указанных, дальнейшую перфузионную консервацию почки надо считать нецелесообразной и трансплантат непригодным для пересадки.

1. *Лопухин Ю. М., Коган Э. М.* Критерии жизнеспособности органов и тканей перед трансплантацией.— М. : Медицина, 1975.— 280 с.
2. Биохимическая оценка консервированной почки / Н. Е. Савченко, Г. Т. Козлов, В. С. Пилотович и др.— В кн.: Трансплантация органов и тканей : Тез. докл. VIII Всесоюз. конф. по пересадке органов и тканей. Тбилиси, 1979, с. 289—290.
3. *Шумаков В. И., Штейнгольд Е. Ш., Онищенко Н. А.* Консервация органов.— М. : Медицина, 1975.— 252 с.
4. Comparison of intracellular flushing and cold storage to machine perfusion for human kidney preservation / J. M. Barry, J. B. Metcalfe, M. A. Farnsworth et al.— J. Urol., 1980, **123**, N 1, p. 14—16.
5. *McCabe R. E.* Kidney preservation.— New York State J. Med., 1981, **80**, N 2, p. 95—98.
6. *Newman C. P. St. J., Shenton B. K.* Re-evaluation of viability testing of cadaveri kidneys for transplantation.— British. J.Urol., 1981, **53**, p. 95—98.
7. The significance of pH variations in human albumin perfusion media during continuous hypotermic renal perfusion / O. P. Rosenkilde, T. Krarup, V. Ferurby et al.— Scand. J. Urol. Nephrol., 1980, **14**, N 3, p. 288—291.
8. Flow and function in machine — preserved kidneys / D. Sampson, H. M. Jun Kaufman, P. Walczak.— Brit. J. Surg., 1978, **65**, N 1, p. 37—40.

Вильнюсская городская клиническая больница Горздрава

Поступила в редколлегию 05.01.82

УДК 57.043

Г. В. Юдин

ОРГАНОСОХРАНЯЮЩИЙ ЭФФЕКТ ЭЛЕКТРОСТИМУЛЯЦИИ ПРИ ГИПОТЕРМИЧЕСКОЙ КОНСЕРВАЦИИ ДОНОРСКИХ ПОЧЕК

Степень жизнеспособности консервированной пересаженной почки зависит прежде всего от эффективности средств борьбы с ишемическими повреждениями, возникающими в агональной стадии донора и в процессе гипотермической консервации донорской почки. Для предупреждения этих повреждений во время умирания донора в последние годы успешно используются различные способы фармакологической защиты [2, 4, 6, 7]. Однако проведение такого рода мероприятий в период гипотермической консервации в условиях применения бесперфузионного метода затруднено. Поэтому мы попытались исследовать возможный органосохраняющий эффект электрической стимуляции в период 24-часовой бесперфузионной консервации донорских почек. При этом мы основывались на известном положении об адаптационно-трофической роли нервного аппарата почек [1, 5], а также на сохранении электропроводимости почечных нервов в течение первых суток после их перерезки [3].

Материал и методы. Эксперименты проведены на 40 изолированных почках, взятых у 20 беспородных собак массой от 14 до 20 кг. В первой серии опытов (20 почек) перед забором левых почек выделяли по возможности все крупные ветви почечного сплетения в области ворот, которые затем пересекали. После нефрэктомии к почечным нервам присоединяли платиновый электрод и подвергали почку 24-часовой консервации при 0° С в гипокалиевом растворе ИТиИО-2, в котором оптимизирована концентрация ионов K^+ и важнейших метаболитов, тормозящих повреждение клеток и пролонгирующих метаболизм на редуцированном уровне. Перед началом консервации и далее через каждые 6 ч

Матеріал, захищений авторським правом

хранения почку промывали через артерию тем же раствором с температурой 4° С под давлением 70 мм рт. ст. в течение 3 мин и проводили в этот период электрическое раздражение почечных нервов с помощью электростимулятора марки ЭСЛ-2 при следующем режиме: форма импульсов — прямоугольная, частота — 100 Гц, длительность — 2 мк/с, амплитуда — 5 В. После каждого трехминутного сеанса электростимуляции определяли массу почки, объемную скорость перфузии, концентрацию молочной кислоты, ионов K^+, Na^+ и Cl^- в перфузате. По окончании консервации почку пересаживали в таз той же собаке и в течение 1 ч исследовали динамику почечного кровотока с помощью отечественного расходомера крови марки РКИ-2 и интенсивность мочевыделения. Затем почку удаляли и проводили ее гистологическое, электронно-микроскопическое и ионометрическое исследования с расчетом тканевой и внутриклеточной жидкостей, тканевых и внутриклеточных концентраций K^+, Na^+ и Cl^- [8].

Правые почки использовали в качестве контроля (электростимуляция не проводилась).

Эксперименты второй серии (20 почек) отличались от первой только тем, что почки консервировали в модифицированной гиперкалиевой среде Игла с добавлением 10 г человеческого альбумина на 1 л раствора.

Результаты и обсуждение. Результаты 1 серии экспериментов показали выраженное влияние электростимуляции прежде всего на интенсивность возникновения тканевого отека в процессе консервации и через 1 ч после восстановления почечного кровотока. Так, масса почки, подвергнутой электростимуляции, после консервации меньше на 11%, а через 1 ч после пересадки — на 15% по сравнению с контрольной почкой ($p < 0{,}05$). При этом концентрации тканевых и клеточных ионов K^+, Na^+ и Cl^- в опытах и контроле достоверно не отличались друг от друга. Отмечен также положительный эффект электростимуляции на состояние сосудистого русла как в период консервации, так и через 1 ч после восстановления кровообращения почки: в опытных почках объемная скорость перфузии и объемная скорость кровотока превышали соответственно в два и три раза контрольный уровень этих показателей. Концентрация молочной кислоты в опытных почках поддерживалась на исходном уровне в течение всего периода консервации, в то время как в контрольных почках она постепенно нарастала так, что к концу наблюдения достоверно превышала опытный уровень на 14% ($p < 0{,}05$). Морфологические исследования не выявили существенных различий в структурных изменениях в опыте и контроле. Отмеченные изменения имели функциональный характер. В опытах второй серии эффект электростимуляции не обнаружен.

Таким образом, применение электростимуляции донорских почек в период 24-часовой бесперфузионной гипотермической консервации оказывает выраженный трофический эффект, проявляющийся в уменьшении клеточного отека, лучшей сохранности клеточных мембран и более интенсивной утилизации субстратов метаболизма при использовании гипокалиевых консервирующих растворов. Кроме того, электростимуляция защищает сосудистое русло почек от ишемических повреждений в процессе консервации. Отсутствие органосохраняющего эффекта электростимуляции при использовании гиперкалиевых консервирующих растворов, по-видимому, объясняется тем, что выравнивание вне- и внутриклеточных концентраций ионов K^+ устраняет мембранный потенциал клеток как дополнительную форму аккумуляции энергии, что приводит к утечке естественных субстратов и метаболитов, необходимых для поддержания клеточного гомеостаза.

Дальнейший поиск оптимального режима электростимуляции, более глубокое и всестороннее изучение ее влияния на почку в период длительной консервации может явиться еще одним шагом на пути к решению проблемы консервации трупных почек.

Матеріал, захищений авторським правом

1. *Генецинский А. Г.* Физиологические механизмы водно-солевого равновесия.— М.: Изд-во АН СССР, 1963.— 426 с.
2. *Кирпатовский В. И., Каменев В. Ф., Расторгуев Б. П.* Фармакологическая защита почек агонирующего донора.— В кн.: Трансплантация органов в клинике и эксперименте и искусственные органы. М., 1978.— 102 с.
3. *Лебедев А. А.* Аутотрансплантация почки.— М.; Л.: Наука, 1965.— 120 с.
4. *Об адаптационном* действии некоторых фармакологических препаратов на ишемизированную почку / Н. А. Онищенко, В. И. Кирпатовский, А. И. Крылова, Л. Д. Смирнов.— В кн.: Вопросы трансплантологии и искусственных органов. М., 1977, с. 71—74.
5. *Швалев В. Н.* Иннервация почек.— М.; Л.: Наука, 1965.— 176 с.
6. *Dienst S. G.* Statenwide donor pretreatment study.— Transplant. Proc., 1977, 9, N 3, p. 1597—1599.
7. *Kothe K., Sachenröder Ch., Reich J. B.* Redox metabolism of glutatione in the red blood cells.— Acta biol. germ., 1975, 34, p. 203—228.
8. *Whittenbury G.* Sodium extrusion and potassium uptake in gui nea pig kidney cortex slices.— J. Gen. Physiol., 1965, 48, p. 699—717.

Ивановский государственный
медицинский институт им. А. С. Бубнова

Поступила в редколлегию
22.01.82

5 2-2384

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043

Г. Ф. Катурова, Р. В. Точиловская,
Г. М. Пинский

КРИОТЕРАПИЯ РЕТЕНЦИОННЫХ КИСТ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ГУБ

Ретенционные кисты — сравнительно частая патология слизистой губ. Они представляют собой полость, возникающую в области слизистых желез в результате закрытия их выводного протока и задержки секрета. Течение этого заболевания доброкачественное и не вызывает значительных субъективных ощущений. Общепринятым методом лечения ретенционных кист в настоящее время является оперативное вмешательство — вылущивание кисты [1].

Однако и этот метод имеет определенные недостатки и трудности. Кистозная полость легко ранима при операции и это значительно усложняет ее удаление, так как опорожнившись от содержимого в момент операции, кистозная капсула мало чем отличается по своей плотности и форме от остальных тканей раны [2]. Кроме того, хирургическое вмешательство очень часто приводит к профузному, трудно останавливаемому кровотечению, что также создает технические трудности, при которых не всегда удается полное иссечение оболочки. Все это приводит к рецидивам заболевания. В послеоперационном периоде, как правило, возникает на длительное время значительный отек губы, вызванный образовавшейся послеоперационной гематомой. В свою очередь, эти косметические нарушения действуют раздражающе на психику больного [1].

Все указанное выше послужило основанием к поиску менее травматичного, легко осуществимого метода, исключающего указанные возможные осложнения, а главное — рецидивы заболевания.

В своей работе мы применили метод криотерапии, занявший достойное место за последние 20 лет среди хирургических методов лечения. Атравматичность, простота выполнения, кровеостанавливающий эффект и, главное, отсутствие косметических дефектов послужили основанием к применению этого метода при лечении ретенционных кист губ.

Метод криотерапии был применен у 96 больных в возрасте от 12 до 60 лет. Мужчин — 78, женщин — 18. Сопутствующая патология (сердечно-сосудистая, желудочно-кишечная, хроническая почечная недостаточность). Большая часть больных отмечает, что образованию кисты предшествовала травма. Размер кист от 0,5 до 2 см: 0,5—0,7 у 56 больных; 0,8—1 — у 32; 1,1—1,5 — у 4; 2 см у 4 больных. Кисты располагались чаще в верхних отделах нижней губы (84 случая). Только у двух больных киста располагалась в области угла рта на уровне смыкания зубов.

Криовоздействие проводили по следующей методике: предварительно определяли точные границы кисты, для чего применяли витальную окраску 0,2—0,3 мл 1%-ным водным раствором метиленового синего [2]. На следующий день проводили криотерапию. Кисты размером 0,5—0,7 см обрабатывали парожидкостной струей азота в течение 20—25 с, 0,8—1 см — 25—30 с, 1,1—1,5 — 30—35 с, 2 см — 40—45 с. Под действием струи азота наружная стенка кисты прогибалась и примыкала к внутренней, т. е. одновременно воздействовали на всю оболочку кисты.

Матеріал, захищений авторським правом

Незначительная припухлость наблюдалась в течение 1 сут после криотерапии только больших кист (1,5—2 см). В остальных случаях отечность тканей губы отсутствовала. Раневая поверхность покрывалась некротической пленкой, исчезавшей по мере эпителизации, которая наступала на 7—12-е сутки, в зависимости от размеров кисты. Никаких нарушений косметического и фонетического характера у больных не отмечалось. Непосредственные результаты были положительны во всех случаях.

Ближайшие результаты (до 6 месяцев) прослежены у 91 человека (положительные у 86 человек). Рецидивы отмечались у больных, диаметр кист которых превышал 1 см. Этим больным было проведено повторное криовоздействие. Отдаленные результаты (до 2,5 лет) прослежены у 82 человек. Лишь в трех случаях отмечались рецидивы заболевания, что, очевидно, связано с недостаточной экспозицией криовоздействия, следствием чего является неполное промерзание всей оболочки из-за больших размеров кисты (1,3—2,0 см).

Таким образом, криотерапия парожидкостной струей азота является радикальным методом лечения ретенционных кист слизистой губ размером 0,5—1 см. Для лечения ретенционных кист больших размеров, возможно, целесообразней применять криоаппликационный метод, позволяющий использовать, кроме охлаждающего фактора, еще и силу давления прибора. Метод криотерапии ретенционных кист может быть применен у лиц всех возрастных групп, а также при наличии сопутствующей патологии, так как не оказывает побочного отрицательного действия.

1. *Савина С. Я.* К методике оперативного лечения слизистых кист губы.— В кн.: Научные работы врачей Центральной поликлиники министерства путей сообщения. М., 1970, с. 53—54.
2. *Сидерман А. П.* Радикальная экстирпация ретенционной кисты нижней губы с применением витальной окраски.— Стоматология, 1964, № 2, с. 121—123.

Харьковский медицинский
институт МЗ СССР
Украинский институт
усовершенствования врачей МЗ СССР

Поступила в редколлегию
14.01.82

УДК 57.043

Ю. В. Кононов, Е. И. Легостаева

ВИРУС ГЕПАТИТА В В ЗАМОРОЖЕННЫХ ЭРИТРОЦИТАХ

Согласно современным представлениям, к факторам риска при переливаниях цельной крови, плазмы и некоторых гемопрепаратов относится заражение вирусом гепатита [1].

По данным ВОЗ, в мире ежегодно регистрируется до 1 000 000 случаев вирусного гепатита, причем в литературе приводятся данные, утверждающие, что заболеваемость вирусным гепатитом не снижается [3]. Выделение вирусного гепатита типа В в самостоятельную нозологическую единицу с обязательной регистрацией случаев парентерального инфицирования способствовало выяснению широты распространения заболевания. При этом оказалось, что в некоторых районах показатель заболеваемости вирусным гепатитом типа В находится на достаточно высоком уровне и имеет тенденцию к повышению. Так, в УССР заболеваемость возросла с 8,46% в 1971 г. до 18,4% в 1977 г. на 100 000 населения [5].

Для вирусного гепатита В весьма характерно носительство вируса в крови, которое может продолжаться годы и сохраняться пожизненно [2,6]. Следовательно, донорская кровь и ее препараты, не подвергаю-

Матеріал, захищений авторським правом

щиеся пастеризации в процессе получения, могут служить резервуаром вируса для человека, и потому расширение профилактических мероприятий должно идти по пути снижения опасности заражения гепатитом реципиентов, получающих гемопрепараты, двумя путями: предупреждением попадания вируса в препарат и надежным обеззараживанием гемопрепарата перед клиническим применением.

При использовании гемопрепаратов, содержащих живые клетки, приемлем только первый путь. Для его успешного осуществления необходимы знания о сохранности вируса на этапах получения конкретного препарата крови.

Криоконсервирование клеток крови, обеспечивающее создание запасов гемопрепаратов, заслуживает изучения в указанном направлении. Установлено, что вирус гепатита В сохраняется после повторных замораживаний. Исследовалось действие криопротекторов, в частности, глицерина на вирус гепатита В. Оказалось [4], что эндоцеллюлярный криопротектор глицерин не влияет на сохранность антигена вируса гепатита В, однако при использовании размороженных эритроцитов, криоконсервированных под защитой глицерина, отмечено снижение заболеваемости посттрансфузионным гепатитом вследствие применения отмываний для удаления криопротектора перед трансфузией. Опасность передачи посттрансфузионного гепатита при переливаниях размороженных эритроцитов зависит от способа и кратности отмываний от криопротектора. Даже многоэтапные отмывания не снимают опасности инфицирования реципиента. Влияние других криопротекторов на сохранность антигена гепатита В не получило освещений в литературе.

В данной работе представлены результаты изучения действия криозащитных растворов, содержащих экзоцеллюлярные криопротекторы полиэтиленоксид (ПЭО) молекулярной массы 400 и 1500, а также замораживания и хранения в замороженном состоянии на ангитен гепатита В и антитела к нему.

Методика работы. Поверхностный антиген гепатита В и антитела к нему изучали методом встречного иммуноэлектрофореза (ВИЭФ). Указанный метод рекомендуется при массовом обследовании доноров [4]. Использовался иммунодиагностикум МНИИЭМ им. Гамалея АМН СССР и иммунодиагностикум, изготовленный на Харьковской областной станции переливания крови (ХОСПК) (с титрами антител по ВИЭФ 1 : 4, 1 : 16, 1 : 64) на агаре Дифко и на дальневосточном белом агаре.

Объектом исследования было 103 образца донорской крови, содержащие антиген гепатита В в титрах 1 : 1 и 1 : 32, а также антитела к нему в разведении 1 : 1 и 1 : 64.

К эритроцитной массе после снятия плазмы прибавляли криозащитные среды в соотношении 1 : 1 (по объему). Полученные клеточные взвести выдерживали при комнатной температуре, затем замораживали погружением в жидкий азот, хранили в замороженном состоянии до 1 года. Конечная концентрация криопротектора в пробах составляла 10 и 20%. Для исследования брали супернатант, полученный после центрифугирования клеточной взвеси. Исследования проводили через 1 сут, 2, 6 и 12 мес хранения. В качестве контроля использовалась плазма тех же доноров и плазма, смешанная с раствором, содержащим ПЭО, в соотношении 1 : 1 и хранившаяся при 4— —40 и —196° С. Если после добавления к клеткам консерванта либо после замораживания антиген гепатита В и антитела к нему обнаружить не удавалось, эритроцитная взвесь центрифугировалась и супернатант концентрировали в два — три раза упариванием.

Результаты исследования. Установлено, что в плазме донорской крови (контрольная группа) антиген гепатита В и антитела к нему сохранялись на протяжении года независимо от температуры хранения (4, —40, —196° С) и исходного титра (таблица).

Матеріал, захищений авторським правом

Содержание антигена гепатита В и антител к нему в эритроцитных взвесях, содержащих ПЭО-400 в ПЭО-1500

Показатель	Исходный материал		Сроки хранения (месяцы) с ПЭО-400						Сроки хранения (месяцы) с ПЭО-1500					
	Титр	Количество образцов	—40 °С			—196 °С			—40 °С			—196 °С		
			2	6	12	2	6	12	2	6	12	2	6	12
Поверхностный антиген гепатита В	1:1 1:2 1:4 1:8 1:16	9 7 42 28 4	Выявляется в титре 1:1 после концентрирования супернатанта											
Антитела к поверхностному антигену гепатита В	1:1 1:2 1:4 1:8 1:64	2 2 4 1 1	Выявляется в титре 1:1 после концентрирования супернатанта											

Примечание. В контроле титры поверхностного антигена В и антител к нему в процессе хранения при 4 °С не изменялись.

При криоконсервировании эритровзвеси с ПЭО антиген гепатита В и антитела к нему определяются в супернатанте, их идентификация зависит от исходного титра. При исходных титрах 1 : 4; 1 : 6 антиген гепатита В и антитела к нему идентифицировались в супернатанте методом ВИЭФ в титре 1 : 1. При исходных титрах 1 : 1; 1 : 2 и в ряде образцов при титре 1 : 4 идентификация была возможна лишь после концентрирования супернатанта в два — три раза.

Этот факт свидетельствует о невысокой чувствительности метода ВИЭФ при определении малых количеств как антигена вируса гепатита В, так и антител к нему и необходимости дополнительной обработки материала для повышения содержания антигена гепатита В и антител в исследуемых образцах. Показано, что экзоцеллюлярные криопротекторы ряда ПЭО не оказывают влияния на антиген гепатита В, на антитела к нему независимо от исходного титра, молекулярной массы полимера, конечной его концентрации, температуры и сроков хранения гемопрепарата.

При замораживании и хранении в замороженном состоянии клеточных взвесей в них сохраняются антиген гепатита В и антитела к нему. Следовательно, препараты донорской крови, подлежащие криоконсервированию, требуют предварительного контроля на наличие поверхностного антигена гепатита В и антител к нему. Нами получены идентичные результаты при использовании агара Дифко и дальневосточного белого агара, а также иммунодиагностикумов МНИИЭМ им. Гамалея АМН СССР и полученных на ХОСПК.

1. *Блюгер А. Ф.* Вирусный гепатит.— Рига, 1973.— 473 с.
2. *Голосова Т. В., Власихина С. С.* Современное состояние вопроса профилактики вирусного гепатита В. — Пробл. гематологии и переливания крови, 1980, № 9, с. 49—54.
3. *Жданов В. М., Пакторис Е. А.* Вирусные гепатиты.— Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 1979, № 1, с. 26—31.
4. *Исследование* крови доноров на антиген гепатита В : Метод. рекомендации.— М., 1974.— 14 с.
5. *Угрюмов Б. Л.* К проблеме вирусного гепатита В.— Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 1979, № 2, с. 109—113.
6. *Фролов А. Ф., Угрюмов Б. Л., Шевченко Л. Ф.* Вирусный гепатит.— Киев : Здоров'я, 1980.— 180 с.

Областная станция переливания крови
МЗ УССР, г. Харьков

Поступила в редколлегию
26.01.82

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043

Н. М. Петрунь, Е. Я. Баран, Е. И. Цыбуляк,
Е. И. Кримкевич, Г. Г. Никулина

ОЦЕНКА НЕКОТОРЫХ СРЕДСТВ ПРОТИВОИШЕМИЧЕСКОЙ ЗАЩИТЫ ДОНОРСКИХ ПОЧЕК

Вопросам сохранения жизнеспособности донорских почек в предтрансплантационном периоде в настоящее время уделяется исключительно большое внимание, так как от состояния трансплантата зависит исход пересадки [12].

Известно, что в агональном периоде донора происходят ишемические изменения, вызванные развивающейся гипоксией и ацидозом, причем определяющим фактором в их развитии является повышение внутрипочечного сосудистого сопротивления [7, 10, 13, 15]. Поэтому профилактика гипоксии и ацидоза, поддержание в ишемическом органе высокого состояния внутриклеточного гомеостаза и предотвращения дефицита субстратов окисления являются важной проблемой трансплантологии.

Исследования показывают, что введение донору в агональном периоде фармакологических веществ значительно улучшает функцию почки после ее трансплантации [7, 13]. С целью предупреждения ишемических повреждений за последние два десятилетия использовались самые различные препараты мембраннотропного и метаболического типа действия [4].

Нами изучена возможность использования в качестве средств противоишемической защиты преднизолона, лазикса с дроперидолом, контрикала, поскольку показано, что стероидные гормоны и антиоксиданты активизируют пентозный путь окисления, оказывают стабилизирующее влияние на мембранные структуры клетки, предотвращают развитие тубулярного некроза [7—9, 13, 18, 19]. По данным работ [5, 14, 16, 17], введение в агональном и предышемическом периоде средств, улучшающих микроциркуляцию и диурез (маннитола, лазикса, фуросемида), стабилизирующих внутрикальцевый обмен и давление, заметно улучшает посттрансплантационную функцию трупной донорской почки. Так, В. В. Суслов и соавт. [11] выявили, что дроперидол снижает внутрипочечное сосудистое сопротивление и увеличивает эффективный почечный плазмоток. Активный тканевой протеолиз является также неблагоприятным фактором, влияющим на жизнеспособность трансплантата, в связи с чем сообщено [1—3, 6] о целесообразности использования ингибиторов протеиназ — контрикала и трасилола.

Материалы и методы. Исследования проводили на кроликах, которым вводили перечисленные выше препараты (преднизолон в дозе 30 мг/кг массы, лазикс — 2, дроперидол — 0,15 мг/кг, контрикал — 4—8 тыс. АТрЕ/кг) на фоне создания 120-минутной циркуляторной ишемии органа. В ткани почки изучали уровень дыхания и фосфорилирования, гликолиза, активность ферментов цикла Кребса, а также протеолитическую активность, автолиз и уровень катепсинов при использовании контрикала.

Результаты и их обсуждение. Установлено, что при ишемии увеличиваются автолиз тканей и активность трипсиноподобных протеиназ и катепсинов на фоне резкого снижения окисления и фосфорилирования. По нашим данным, активность ключевых ферментов гликолиза, которая возрастает до 30-й минуты ишемии, затем резко снижается при более длительных сроках, а спустя 120 мин ишемии обнаруживаются лишь следовые активности ферментов анаэробного гликолиза. Однако активность ферментов цикла Кребса (сукцинат-, малатдегидрогеназ) при длительном ишемическом воздействии сохраняется на довольно высоком уровне, что связано с разрушением внутриклеточных структур и высвобождением из них ферментов в окружающую среду.

Матеріал, захищений авторським правом

В почках животных после промедикации преднизолоном после 2-часовой ишемии дыхательная активность была достоверно выше, чем в почках животных, не получавших преднизолон. В ряде случаев показатель Δ0 приближался к исходному уровню. Так, при аэробном превращении янтарной и лимонной кислот он составил 92% от нормы, пировиноградной — 87, яблочной — 70%. Активность процесса фосфорилирования оставалась на столь же низком уровне по сравнению с нормой, как и в контрольных почках. По-видимому, преднизолон оказывает стабилизирующее действие на процессы, связанные с утилизацией кислорода, но является мало эффективным в отношении процессов, обеспечивающих трансформацию энергии окисления в макроэргические связи АТФ.

Более высокие показатели окислительного фосфорилирования получены в опытах с введением лазикса с дроперидолом. Скорость поглощения кислорода ишемической почкой при введении этих веществ была выше, чем в контрольной ишемической почке, а при использовании таких субстратов, как янтарная, лимонная и пировиноградная кислоты уровень поглощения кислорода был даже выше исходного соответственно на 27, 15 и 12%.

Согласно полученным нами результатам, лазикс с дроперидолом по сравнению с преднизолоном оказывают более выраженное воздействие на механизмы, связанные с аккумуляцией энергии окисления в АТФ. Об этом свидетельствует повышение скорости процессов фосфорилирования при аэробном превращении α-кетоглутаровой, пировиноградной и β-оксимасляной кислот на 30—50% по сравнению с контрольными ишемическими почками животных, не получавших лекарственных препаратов. Показатели Р/О также указывали на более тесную сопряженность процессов окисления и фосфорилирования.

Предварительное введение животным преднизолона и лазикса с дроперидолом оказывало также нормализирующее влияние на активность окислительно-восстановительных ферментов. При этом активность малат- и сукинатдегидрогеназ при введении лазикса с дроперидолом снижалась. Инъекции преднизолона оказывали нормализующее влияние на активность ферментов анаэробного гликолиза; введение лазикса с дроперидолом вызывало гиперактивацию альдолаз.

Введение контрикала в дозе 4 тыс. АТрЕ не оказывало положительного влияния на способность ткани поглощать кислород при добавлении субстратов окисления, но в два — три раза повышало активность фосфорилирования и соответственно нормализовывало показатель Р/О. При увеличении дозы препарата положительное влияние его на процессы окислительного фосфорилирования выявлялось в еще большей степени. При аэробном декарбоксилировании α-кетоглутаровой и пировиноградной кислот наблюдали нормализацию окислительного фосфорилирования, а янтарной, яблочной и β-оксимасляной кислот — положительные сдвиги в скорости потребления O_2 и фосфорилирования. Введение контрикала способствовало также нормализации активности окислительно-восстановительных и гликолитических ферментов.

Сравнительная оценка эффективности защитного действия исследуемых препаратов показала, что интенсивность процессов окисления в почке, пережившей 120-минутную тепловую ишемию на фоне предварительного введения лекарственных препаратов, по сравнению с контролем была выше (рис. 1). В случае введения кролику лазикса с дроперидолом, она была наиболее выраженной. Несколько ниже был процент увеличения скорости окисления субстратов после предварительного введения преднизолона, а в случае введения в организм контрикала значительно снижен по сравнению с контролем.

Таким образом, видно, что исследуемые фармакологические препараты способствуют сохранению скорости утилизации O_2 в почечной ткани в условиях ишемии по сравнению с контролем, и в порядке увеличе-

Матеріал, захищений авторським правом

ния стабилизирующего эффекта они могут быть расположены в следующем порядке: контрикал, преднизолон, лазикс + дроперидол.

В предыдущих исследованиях [8] нами показано, что у кроликов без введения противоишемических средств в почках после 120-минутной тепловой ишемии процессы фосфорилирования подавляются.

Под влиянием контрикала (рис. 2) скорость фосфорилирования увеличивается значительнее, чем в контроле: более чем в два раза ΔP увеличилось в случае использования как субстрата окисления янтар-

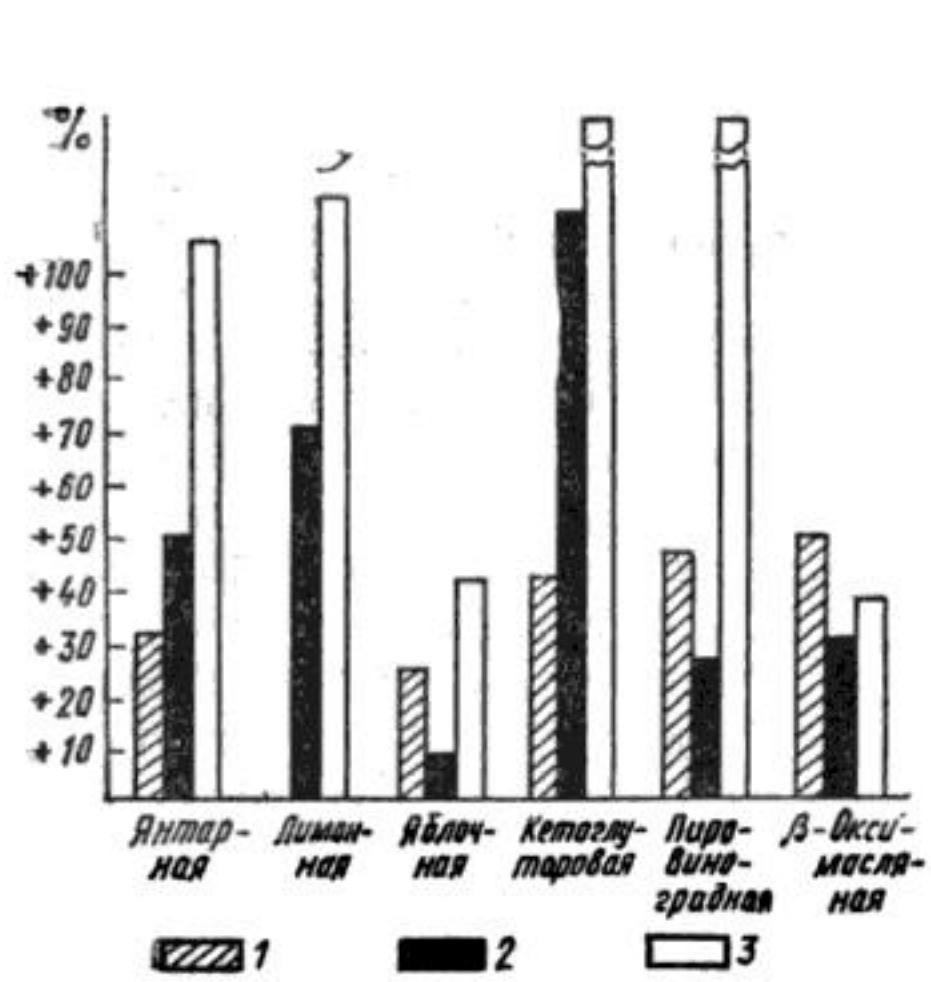


Рис. 1. Изменение уровня поглощения O_2 тканью ишемической почки после введения различных лекарственных препаратов по сравнению с контролем:

1 — контрикал, *2* — преднизолон, *3* — лазикс + + дроперидол.

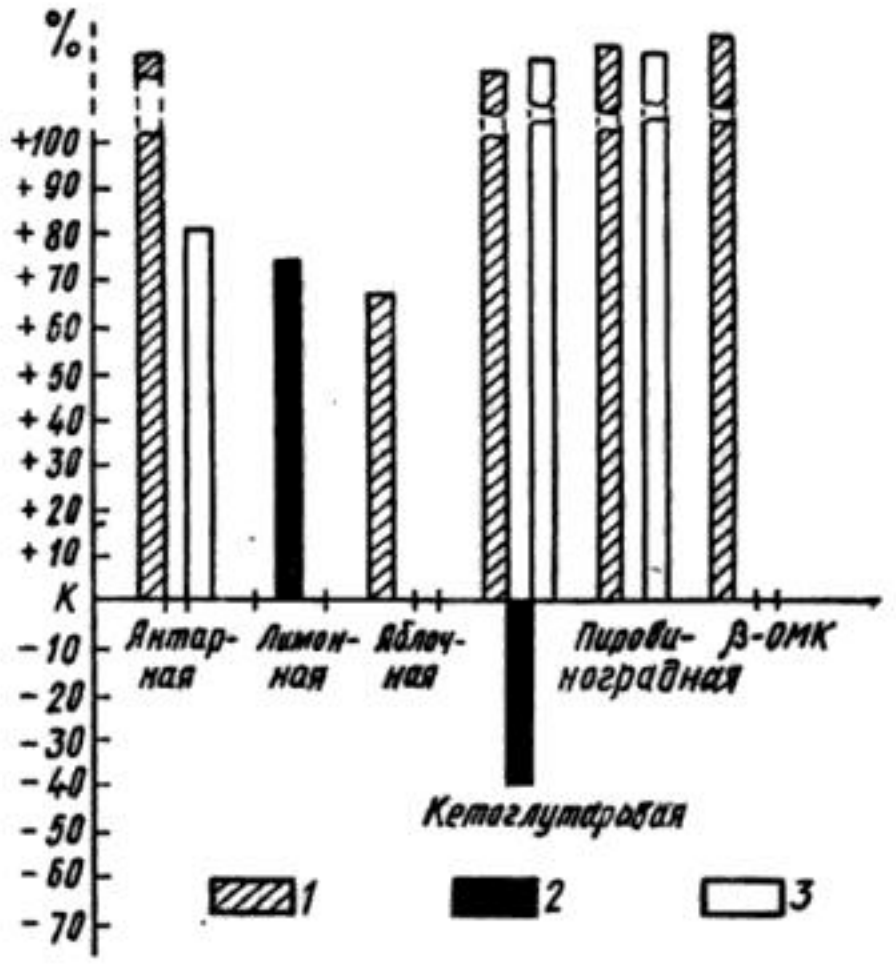


Рис. 2. Изменение уровня фосфорилирования в ишемической почке после введения различных лекарственных препаратов по сравнению с контролем. Условные обозначения те же, что на рис. 1.

ной, α-кетоглутаровой, пировиноградной, β-оксимасляной кислот и почти на 70% — лимонной и яблочной кислот. В меньшей степени ΔP увеличивалась по сравнению с контролем при введении лазикса с дроперидолом: при добавлении в инкубационную среду α-кетоглутаровой и пировиноградной кислот процент увеличения ΔP равнялся 100% и более, янтарной — 82%, однако в случаях добавления к ткани почек лимонной, яблочной и β-оксимасляной кислот увеличение ΔP по сравнению с контролем не наблюдалось.

Наименьшее по эффективности защитное действие на процессы окислительного фосфорилирования оказывало введение преднизолона по сравнению с другими препаратами. При введении его кроликам уровень фосфорилирования в ишемических почках был низким и не превышал таковой в контрольных исследованиях при аэробном превращении яблочной, пировиноградной и β-оксимасляной кислот: при использовании в качестве субстрата α-кетоглутаровой кислоты наблюдалось даже снижение ΔP на 40% по сравнению с контролем. Лишь в случае с лимонной кислотой ΔP было выше контроля на 75%.

При сравнении ΔP с нормой вырисовывалась аналогичная картина. После введения преднизолона процент снижения ΔP по сравнению с ΔP в здоровой почке был наиболее значительным, а при введении лазикса с дроперидолом процент ингибирования фосфорилирования по сравнению с нормой был несколько меньшим. После введения контрикала скорость фосфорилирования в ишемических почках наименее отличалась от нормального уровня.

Следовательно, можно предполагать, что контрикал оказывает более выраженное стабилизирующее действие на процессы фосфорилиро-

Матеріал, захищений авторським правом

вания в ишемизированной почке; лазикс и дроперидол — менее выраженное; преднизолон — наименьшее, по сравнению с другими препаратами.

По сравнению с контролем при введении контрикала отмечалась наиболее значимая положительная динамика показателей Р/О, причем в случае использования яблочной, α-кетоглутаровой, пировиноградной, β-оксимасляной кислот Р/О достигал исходного уровня (рис. 3).

Под влиянием лазикса с дроперидолом после 120-минутной тепловой ишемии сопряженность окисления и фосфорилирования изменялась неоднозначно на различных участках цикла Кребса: при аэробном превращении пирувата и янтарной кислоты Р/О увеличивалось по сравнению с контролем. Вместе с тем при аэробном превращении яблочной и α-кетоглутаровой кислот Р/О было меньше контрольного значения на 30 и 23% соответственно.

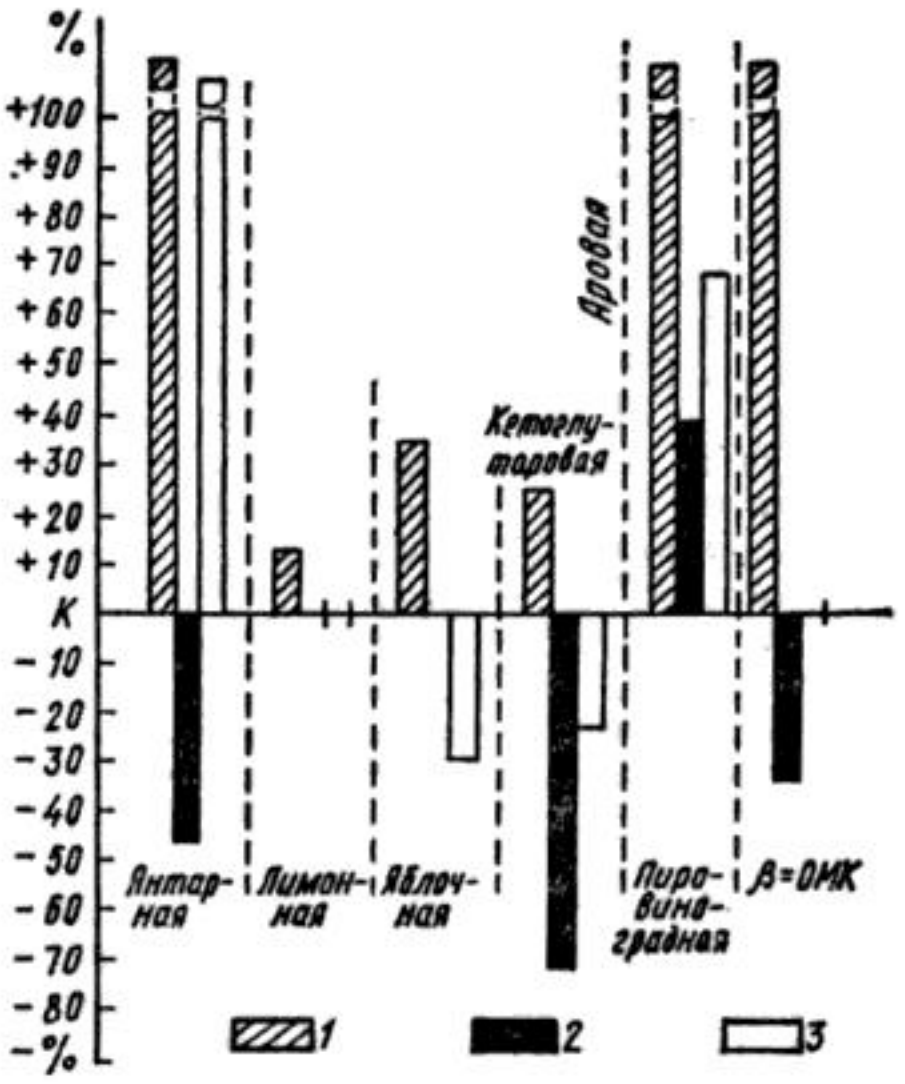


Рис. 3. Изменение отношения Р/О в ишемической почке после введения различных лекарственных препаратов по сравнению с контролем. Условные обозначения те же, что и на рис. 1.

Несмотря на тенденцию коэффициентов Р/О под влиянием лазикса с дроперидолом к увеличению, их значение все же оставалось намного ниже нормы: снижение только при окислении янтарной кислоты составило 10%, а в случаях с остальными субстратами цикла Кребса — 60—90% исходного значения.

После введения кролику преднизолона в ишемических почках практически не наблюдалось повышения коэффициентов Р/О как по сравнению с контролем, так и по сравнению с нормой. Следовательно, контрикал оказывал наиболее положительный эффект на сохранение степени сопряженности процессов окисления и фосфорилирования. Менее выраженное действие на Р/О оказывали комплекс лазикс + дроперидол, а также преднизолон.

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о протекторном противоишемическом действии использованных препаратов на метаболизм ишемической почки. Следует полагать, что испытанные нами препараты с различным механизмом действия влияют на разные внутриклеточные процессы и обеспечивают частичную стабилизацию их функции при ишемии. В ряду изученных препаратов наиболее эффективными оказались контрикал и лазикс в сочетании с дроперидолом.

1. *Елизаров В. Г., Морозов Т. И., Молотков Е. М.* Блокаторы протеаз и иммунодепрессоры в комплексном лечении отека мозга.— В кн.: X Всесоюз. конф. молодых нейрохирургов (Калуга, 4—6 сент. 1974 г.). М., 1974, с. 84—88.
2. *Заец Т. Л.* Характеристика протеолитических ферментов в тканях кролика после термической травмы.— Вопр. мед. химии, 1969, 15, № 1, с. 43—47.
3. *Сравнительная* оценка эффективности препаратов различных фармакологических групп, используемых для фармакологической защиты почек от ишемического повреждения / В. И. Кирпатовский, Н. А. Онищенко, Т. А. Козырева, В. Н. Блюмкин — Вестн. АМН СССР, 1981, № 10, с. 48—52.
4. *Коткина Т. И.* Распад белков печени при термических ожогах на фоне действия контрикала в эксперименте.— В кн.: Актуальные вопросы современной хирургии. М.: Медицина, 1975, с. 195—196.
5. *Лебедев А. А., Дубищев А. В., Образцов Н. В.* Способ предупреждения ишемического поражения почек гидродинамическим эффектом диуретиков.— В кн.: Новые технические решения в диагностике и лечении патологии сердечно-сосудистой системы. Куйбышев, 1977, с. 15—19.

Матеріал, захищений авторським правом

6. *Носова И. М., Зайденберг М. А.* Особенности влияния контрикала на активность дегидрогеназ и их изоферменты в мышцах и органах животных с развивающейся грануляционной тканью.— Бюл. эксперим. биологии и медицины, 1976, № 7, с. 807—810.
7. *Онищенко Н. А., Кирпатовский В. И.* Предварительная защита донорских почек препаратами различных фармакологических групп.— В кн.: Консервация органов. Москва; Тбилиси, Тбилис. мед. ин-т, 1975, с. 14—16.
8. *Данные* окислительно-восстановительных процессов и электронной микроскопии при консервации почек по методу ВНИИКиЭХ / Н. М. Петрунь, Г. Г. Никулина, А. Т. Носов, Е. И. Цыбуляк.— В кн.: Трансплантация органов и тканей : Тез. докл. VII Всесоюз. конф. по пересадке органов и тканей. Ростов н / Д : Рост. мед. ин-т, 1976, с. 129.
9. *Защитное* действие некоторых фармакологических препаратов на метаболизм и структуру почек при тепловой ишемии в эксперименте / Н. М. Петрунь, Г. Г. Никулина, А. Т. Носов и др.— Урология и нефрология, 1979, № 6, с. 57—62.
10. *Пути* повышения резистентности почечного трансплантата к тканевой ишемии / Н. Е. Савченко, И. А. Скобяков, В. И. Соклаков, В. С. Пилотович.— Там же, 1977, № 5, с. 72—76.
11. *Особенности* механизма действия дроперидола и фентанила на функцию почек / В. С. Суслов, Т. К. Кульчицкая, В. А. Романенко, Н. К. Терещенко. В кн.: Тез. докл. III съезда фармакологов УССР. Винница, 1977, с. 176—177.
12. *Шумаков В. И., Онищенко Н. А.* Проблемы фармакологической защиты почек при трансплантации.— Вестн. АМН СССР, 1981, № 10, с. 44—48.
13. *Шумаков В. И., Штенгольд Е. Ш., Онищенко Н. А.* Консервация органов.— М. : Медицина, 1975.— 252 с.
14. *Barry K. L., Malloy G. P.* Oligurie renal faibere: evalnation and therapy by the intravenous infusion of mannitol.— J. A. M. A., 1962, **179**, p. 510—513.
15. *Belzer F. O., Kountz S. L.* Preservation and transplantation of human cadaver kidneys: a two-year experience.— Ann. Surg., 1970, **172**, N 3, p. 394—404.
16. Reduction of acute tubular necrosis by furosemide and steroids in cadaver kidney recovery / R. McCabe, L. E. Stevens, A. Subramaian et al.— Amer. J. Surg., 1975, **41**, N 2, p. 246—248.
17. *Mc Loughlin J. H., Sells K. N., Tyrrell J.* An evalnation of kidney preservation techniques.— Brit. J. Surg., 1977, **61**, p. 406—409.
18. Effect of heparin and corticosteroids on renal ischemic injury / J. A. Pinkenton, N. H. Walkup, H. Haffari, D. N. Killen.— J. Ibid., 1972, **38**, N 6, p. 333—334.
19. *Weissman L.* Labilization and stabilization of lysosomes.— Fed. Proc., 1964, **28**, N 5, p. 1038—1044.

Киевский научно-исследовательский
институт заболеваний почек
и мочевыводящих путей МЗ УССР

Поступила в редколлегию
05.01.82

УДК 57.043.617.715.361.014.41

В. М. Чередниченко, Ю. Ф. Переузник, А. Л. Демин,
Т. Н. Юрченко, Т. М. Шарлай, О. В. Репко

ОПЫТ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ СКЛЕРЫ

Сквозное расплавление склеры до недавнего времени заканчивалось гибелью глаза. В последние годы для лечения этого тяжелого заболевания применяют пластику склеры, для чего используют широкую фасцию бедра, взятую от донора или того же больного [9, 10, 11] либо донорскую гомосклеру, консервированную при температуре 2—4° С в течение 7—8 сут [3, 4, 6]. Недостатком такого метода консервации является непродолжительный срок хранения склеры и невозможность заготовки ее впрок. Вместе с тем трансплантации склеры обычно носят ургентный характер и требуют наличия заранее заготовленного материала.

Экспериментальные исследования по аллотрансплантации склеры, проведенные многими авторами, показали возможность хорошего приживления ее после различных способов длительной консервации. Так, Е. Е. Сомов [7] провел 200 экспериментальных трансплантаций на кроликах с использованием склеры, консервированной: во влажной камере (2, 4° С), в 96%-ном спирте и 5%-ном растворе формалина; высушенной над силикагелем или в безводном глицерине, лиофилизированной.

Матеріал, захищений авторським правом

Результаты исследования показали, что жизнеспособные и нежизнеспособные трансплантаты обладают практически равноценными хорошими пластическими свойствами, степень родства ткани (гомо- и ауто-) существенно не влияет на результаты, все ауто- и гомосклеральные трансплантаты с течением времени инкапсулируются, но сохраняют соединительнотканную структуру.

По данным В. А. Мачехина [5], заметных изменений в характере приживления трансплантатов, консервированных во влажной камере при 2, 4° С и в 96-градусном спирте, не отмечалось. Через 6 мес после операции структура трансплантата приближалась к нормальной склере.

Клинические трансплантации подтвердили данные экспериментальных исследований. Получены хорошие результаты при использовании как жизнеспособного материала, консервированного во влажной камере при 2, 4° С [3, 4, 6], так и нежизнеспособного, высушенного над силикагелем [1, 2].

В Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР (ИПКиК) разработан способ долгосрочной консервации роговой оболочки, при котором в качестве криопротектора применен полиэтиленоксид с молекулярной массой 400 (ПЭО-400) [8].

Специально разработку метода низкотемпературного консервирования склеры мы не проводили, поскольку, как было приведено выше, для склеропластики нет необходимости в жизнеспособном материале и для консервации склеры можно использовать менее трудоемкие и сложные способы длительного хранения. Однако мы считали целесообразным одновременно с консервацией роговицы заготавливать и склеру, чтобы максимально использовать ткани глаза, полученные от трупа. Из донорских глаз извлекали роговицу и склеру, параллельно замораживали их по одной программе в полиэтиленовых контейнерах под защитой ПЭО-400.

Консервированная таким способом склера полностью сохраняла свою гистологическую структуру, а проведенные экспериментальные трансплантации на кроликах позволили судить о ее хорошей приживляемости.

Созданный в (ИПКиК) АН УССР банк криоконсервированной склеры обеспечивает получение клиническими базами г. Харькова необходимого для трансплантации материала в течение 1 ч. Криоконсервированная в ПЭО-400 склера использована нами в двух случаях перфорирующей склеромаляции и в одном случае пролежня склеры циркляжным швом с образованием стафиломы. Учитывая редкость таких операций и первый опыт трансплантации криоконсервированной в ПЭО-400 склеры, считаем необходимым сообщить о наших наблюдениях.

У больной О., 36 лет (история болезни № 3185), 29.11.1976 г. на четвертый день после операции рифления склеры по поводу отслойки сетчатой оболочки левого глаза развилась гнойная инфильтрация склеры, перешедшая в глубокий некроз со склеромаляцией. На девятый день после безуспешного лечения антибиотиками, сульфаниламидами и кортикостероидами произведена некрэктомия гнойно-инфильтрированной склеры с замещением дефекта криоконсервированным в ПЭО-400 при температуре —196° С склеральным трансплантатом размерами 13 × 10 мм, укрепленным к глазному яблоку супрамидными швами. Уже на третий день после трансплантации исчезло гнойное отделяемое, прекратились упорные и жестокие боли в глазу. Трансплантат пророс новообразованной соединительной тканью и сосудами. Больная выписана на 26-й день в хорошем состоянии. При повторных осмотрах на протяжении пяти лет отторжения трансплантата не наблюдалось.

Больному К., 44 лет (история болезни № 3307), трансплантация криоконсервированной в ПЭО-400 склеры произведена 28.12.1976 г. по поводу некротической склеромаляции в левом глазу, развившейся на месте рифления склеры и диатермокоагуляции, предпринятой 21.12.1976 г. в связи с отслойкой сетчатой оболочки. Трансплантат скле-

Матеріал, захищений авторським правом

ры размерами 8 × 4 мм укреплен к глазному яблоку четырьмя супрамидными швами. Трансплантат прижил. Срок наблюдения пять лет.

На основании успешного опыта трансплантации криоконсервированной склеры при склеромаляции мы решили использовать этот метод для хирургического лечения склеральных стафилом. Первый же случай оказался весьма успешным.

Больной К., 42 лет (история болезни № 3183), в 1977 г. оперирован по поводу отслойки сетчатой оболочки на левом глазу. Произведен цирклаж Арруга шелковой нитью. Спустя четыре года образовался пролежень склеры цирклажной нитью и появилась стафилома в 8 мм от лимба в меридиане 12 ч.

В связи с угрозой возникновения перфорации глазного яблока 21.10.1981 г. в ургентном порядке произведено иссечение стафиломы с одномоментной пластикой криоконсервированной в ПЭО-400 склерой. Лоскут склеры размером 6 × 4 мм пришит к глазному яблоку четырьмя биошвами. Через три недели отмечено прорастание лоскута новообразованной соединительной тканью и сосудами. Трансплантат плотно прижил к склере реципиента.

Наши наблюдения подтверждают возможность и целесообразность криоконсервации склеры в ПЭО-400 при —196° С, что обеспечивает ее длительное хранение. Криоконсервированная склера с успехом может быть использована для трансплантации и способна к приживлению. Очевидно, имеется необходимость создания банков криоконсервированных тканей глаза (роговицы, склеры и, возможно, стекловидного тела) для обеспечения в ургентном порядке офтальмохирургов, проводящих неотложные пластические операции на глазном яблоке.

1. *Волков В. В., Загородная Т. П., Сомов Е. Е.* Пластика стенки глазного яблока консервированной склерой при вылущивании из глаза опухолей сосудистого тракта.— Вопр. восстанов. хирургии, 1972, **191**, с. 142—145.
2. *Горячев Ю. Е.* Применение высушенной склеры для пломбирования при операциях по поводу отслойки сетчатки.— В кн.: Материалы к Итоговой науч. конф. Перм. мед. ин-та. Пермь, 1965, с. 112—114.
3. *Зайкова М. В., Скрипка В. П., Останина Р. А.* Первичная гомосклеропластика при особо тяжелых прободных ранениях глаз.— Вестн. офтальмологии, 1978, № 5, с. 59—62.
4. *Золотарева М. М.* К показаниям, технике и результатам послойной ауто- и гомосклеропластики.— Офтальмол. журн., 1969, № 2, с. 96—100.
5. *Мачехин В. А.*— Экспериментальные исследования по сквозной пересадке склеры.— Там же, 1968, № 5, с. 53—57.
6. *Пучковская Н. А., Скрипниченко З. М.* Приживление склеры при гомопластической ее пересадке.— В кн.: Трансплантация органов и тканей : Материалы IV Всесоюз. конф. М : Медицина, 1966, с 269—271.
7. *Сомов Е. Е.* Использование высушенной гомосклеры при пластических операциях на глазном яблоке.— Вопр. восстанов. хирургии, 1972, **191**, с. 133—137.
8. *Чередниченко В. М., Юрченко Т. Н., Шарлай Т. М.* К методике низкотемпературной консервации тканей глаза.— В кн: Трансплантация органов и тканей. Рига, 1972, с. 493—494.
9. *Blum F. L., Salamoun J. G.* Scleromalacia perforance : A useful surgical modification in fascia lata or scleral grafting.— Arch. Ophthalmol., 1963, **69**, N 3, p. 287—289.
10. *Cappin J. M., Allen D. W.* Paralimbic scleromalacia.— Brit. J. Ophthalmol., 1973, 57, N 11, p. 871—872.
11. *Torchia R. T., Dunn R. E., Pease P. J.* Fascia lata grafting in scleromalacia perforance with lammelar corneal-scleral dissection.— Amer. J. Ophthalmol., 1968, **66**, N 4, p. 705—709.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
18.01.82

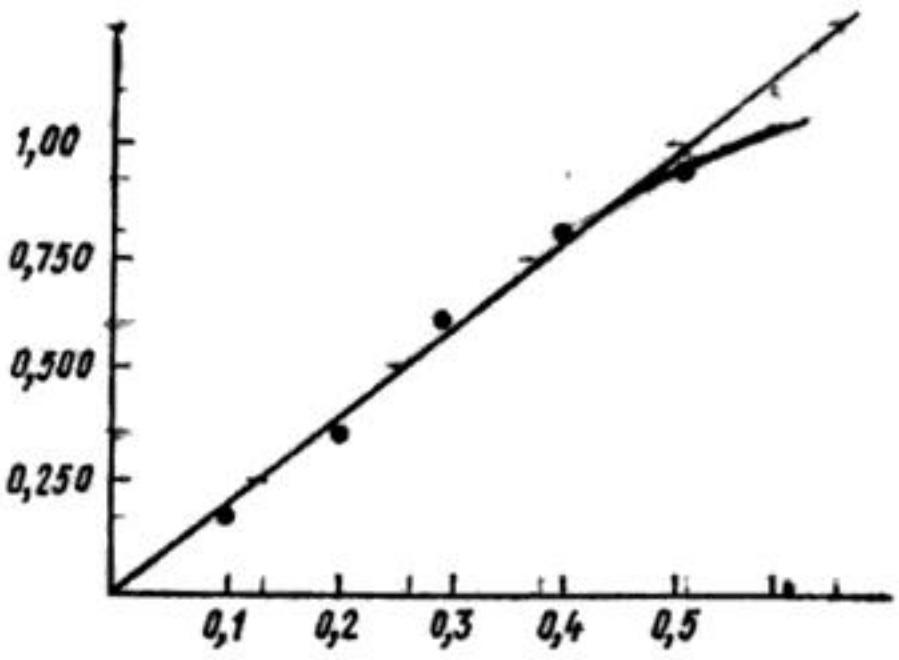
Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043.615.385.1.014.413.074

М. М. Лоевский, А. М. Воротилин

КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНОГО 1,2-ПРОПАНДИОЛА В РАЗМОРОЖЕННЫХ ЭРИТРОЦИТАХ

В настоящее время в практике низкотемпературного консервирования клеток крови в качестве ограждающего агента широко применяется глицерин [1, 4], однако разработанный в ИПКиК АН УССР метод консервирования эритроцитов под защитой 1,2-пропандиола (α-пропиленгликоля) имеет ряд преимуществ [2, 3]. Использование этого соединения в качестве криопротектора требует разработки метода определения его остаточной концентрации в размороженной и отмытой эритроцитарной взвеси. Для определения 1,2-пропандиола мы модифицировали периодатнохромотроповый метод [5], который является наиболее пригодным для количественного определения спиртов. В основе метода лежит окисление 1,2-пропандиола периодатом до формальдегида, протекающее по следующему уравнению: $CH_2OH — CHOH — CH_3 + 2HIO_4 = HCOH + CH_3COOH + 2HIO_3 + H_2O$. Формальдегид образует окрашенный комплекс с хромотроповой кислотой, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации 1,2-пропандиола и может быть измерена калориметрически.



Калибровочный график зависимости оптической плотности от концентрации 1,2-пропандиола в биоматериале.
По вертикали — оптическая плотность, по горизонтали — концентрация 1,2-пропандиола, %.

Необходимые реактивы: 10% ТХУ (трихлоруксусная кислота); 20% $CuSo_4$; 25% $Ca(OH)_2$; 0,025 М KIO_4 на 0,1 NH_2SO_4; 5% Na_3AsO_3; сернокислый раствор хромотроповой (4,5-дигидрокси-2,7-нафталендисульфоновой) кислоты. 2 г кислоты добавляют к 200 мл дистиллированной воды, размешивают до растворения и фильтруют через бумажный фильтр. Отдельно готовят 12,5 М раствор H_2SO_4, добавляя 2 объема концентрированной серной кислоты к одному объему охлажденной дистиллированной воды. Затем доводят водный раствор хромотроповой кислоты до 1 л 12,5 М раствором H_2SO_4. Реактив хранится непродолжительное время в склянке из темного стекла.

Метод подразделяется на несколько стадий: 1) осаждение белков с помощью ТХУ; 2) удаление углеводных компонентов: гексоз, пентоз, аскорбиновой кислоты, гликолевой и глицериновой кислот, сахарозы — добавлением $CuSO_4 — Ca(OH)_2$; 3) окисление 1,2-пропандиола периодатом; удаление избытка периодата арсенитом; 5) калориметрия.

Описание метода. К 1 мл крови (плазмы, биологической жидкости), в которой присутствует 1,2-пропандиол, добавляют 9 мл 10%-ного раствора ТХУ, перемешивают и центрифугируют 10 мин при 3000 об/мин. 5 мл супернатанта отбирают, к ним добавляют 2 мл 20%-ного раствора $CuSO_4$, 2 мл 25%-ного $Ca(OH)_2$ и 1 мл H_2O. Пробирки закрывают пробками и интенсивно перемешивают в течение 10 мин. Содержимое центрифугируют 5 мин и аликвоты в 1 мл переносят в другие пробирки, в которые затем добавляют по 1 мл 0,025 М сернокислого раствора KIO_4 и помещают их в термостат на 10 мин при 37° С. Избыток периодата устраняют добавлением 1 мл 5%-ного раствора Na_3AsO_3. Через 10 мин добавляют по 1 мл H_2O, содержимое перемешивают и центрифугируют 10 мин при 3000 об/мин. К 1 мл супернатанта каждой пробы

Матеріал, захищений авторським правом

добавляют 5 мл приготовленной хромотроповой кислоты и выдерживают 40 мин в кипящей водяной бане, защищая ее от избытка света. Затем охлаждают и интенсивность развивающейся фиолетовой окраски измеряют на ФЭКе при 520 нм (зеленый светофильтр) против холостой пробы (1 мл H_2O + 5 мл хромотроповой кислоты). Для получения опытных данных строится калибровочный график, который прямолинеен в диапазоне 0—5,23 мг/мл или 0—0,5% *(V/V)* 1,2-пропандиола (рисунок), причем на одной партии реактивов калибровочный график, построенный при приготовлении криопротектора на дистиллированной воде, плазме или цельной крови полностью совпадает. Чувствительность метода — 0,01% 1,2-пропандиола. Достоинством данного метода является возможность прямого измерения концентрации криопротектора в пробе без вычета вклада других соединений и, в частности, сахарозы, входящей в состав криопротекторной среды. Использование этой методики для определения остаточного 1,2-пропандиола в замороженной и отмытой по нашему методу эритровзвеси показало ее высокую разрешающую способность и воспроизводимость результатов.

1. *Виноград-Финкель Ф. Р., Гинзбург Ф. Г., Федорова Л. И. и др.* Криоконсервирование эритроцитов и их функциональная полноценность (хранение в жидком азоте до 7 лет).— Пробл. гематологии и переливания крови, 1973, № 9, с. 3—10.
2. *А. с. 888896 (СССР).* Способ консервирования эритроцитов / А. М. Воротилин, М. М. Гучок, В. А. Моисеев, В. К. Дворцевой.— Опубл. в Б. И., 1981, № 46.
3. *Гучок М. М., Гучок В. М.* Сравнительное изучение токсичности некоторых криопротекторов.— В кн.: 1-й Украинский съезд гематологов и трансфузиологов. Тез. докл. Киев, 1980, с. 176.
4. *Meryman H. T., Hornblower M.* A simplified procedure for deglycerolizing red blood cells frozen in a high glycerol concentration.— Transfusion, 1977, **17**, N 5, p. 438—442.
5. *Rajagopal G., Ramakrishnan S.* A new method for estimation of ethylene glycol in biological material.— Anal. Biochem., 1975, **65**, N 1/2, p. 132—136.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
31.03.82

Матеріал, захищений авторським правом

СОДЕРЖАНИЕ

Теоретическая и экспериментальная криобиология

Жегунов Г. Ф., Белоус А. М. Роль липидов и интранспортирующих систем биомембран в процессах адаптации животных к низким температурам (обзор литературы) 3

Гучок В. М., Козлова В. Ф. Функция и структура почек крыс при введении малых доз 1,2-пропандиола 15

Данилова Л. А., Игнашева Л. П., Федотенков А. Г. Влияние замороженных сингенных лимфоцитов на пролиферативную активность стволовых клеток 20

Золочевская Л. И., Луговой В. И. Механизм изменения активности НАД-зависимой малатдегидрогеназы митохондрий при замораживании-оттаивании 22

Игнашева Л. П., Данилова Л. А., Федотенков А. Г. Влияние низких концентраций глицерина на гомотрансплантационную активность лимфоцитов кроветворных тканей 25

Кочережская И. А., Вишневский В. И., Инютин Г. А. Влияние отмывания от ПЭО-1 500 на электрические параметры эритроцитов 27

Куракса В. М., Милешкин М. Б. Сравнительная оценка механических нарушений структуры твердой фазы при неравновесном замораживании и отогреве жидкостей 32

Луговой В. И., Кравченко Л. П., Карева Л. В., Коптелов В. А., Мартыненко А. А., Семенченко О. А. Метод получения изолированных клеток печени 36

Новиков А. Н., Липина О. В., Олейник С. Т. Адсорбционная активность этиленгликоля и криопротекторов ряда ПЭО 39

Пичугин Ю. И., Новиков А. Н. Влияние ряда криопротекторов на растворимость солей NaCl, KCl 42

Пустовойт П. А., Липина О. В. Влияние криопротекторов и низкотемпературного консервирования на реологические свойства крови 44

Утевский А. М., Чуйко В. А., Губина Н. Ф., Широва В. А. Влияние низких температур на процессы высвобождения катехоламинов 47

Утевский А. М., Чуйко В. А., Назарова Л. А., Тарасова Е. Г. Активность моноаминоксидазы в сердце, печени и щитовидной железе после их быстрого замораживания до —196° С 49

Филев А. В., Дыгин В. П., Холодный А. Я., Петренко Г. И. Оценка жизнеспособности стволовых клеток-предшественников грануломонопоэза в кадаверном костном мозге, криоконсервированном под защитой поливинилпирролидона 52

Консервирование биологических объектов

Волкова Н. А., Сандомирский Б. П. Влияние ПЭО-400 на морфофункциональное состояние деконсервированной кожи человека 56

Клейза В. Ю., Дайнис Б. Э., Жукаускас Г. Ю. Гипотермическая перфузионная консервация кадаверных почек 60

Юдин Г. В. Органосохраняющий эффект электростимуляции при гипотермической консервации донорских почек 63

Криомедицина

Катурова Г. Ф., Точиловская Р. В., Пинский Г. М. Криотерапия ретенционных кист слизистой оболочки губ 66

Кононов Ю. В., Легостаева Е. И. Вирус гепатита В в замороженных эритроцитах 67

Петрунь Н. М., Баран Е. Я., Цыбуляк З. И., Кримкевич Е. И., Никулина Г. Г. Оценка некоторых средств противоишемической защиты донорских почек 70

Чередниченко В. М., Переузник Ю. Ф., Демин А. Л., Юрченко Т. Н., Шарлай Т. М., Репко О. В. Опыт клинического применения криоконсервированной склеры 74

Лоевский М. М., Воротилин А. М. Колориметрический метод определения остаточного 1,2-пропандиола в размороженных эритроцитах 77

Матеріал, захищений авторським правом

CONTENTS

Theoretical and Experimental Cryobiology

Zhegunov G. F., Belous A. M. The Role of Lipids and Ion-Transporting Membrane Systems in Processes of Animal Adaptation to Low Temperatures (Literature Review) 3

Guchok V. M., Kozlova V. F. The Function and Structure of Rat Kindneys After Injection of Small Doses of 1,2-Propanediol 15

Danilova L. A., Ignasheva L. P., Fedotenkov A. G. Influence of Frozen Syngenic Lymphocytes on the Proliferative Activity of Stem Cells 20

Zolochevskaya L. I., Lugovoy V. I. The Mechanism of Changes in the Activity of NAD-Dependent Mitochondrial Malate Dehydrogenase During Freezing and Thawing 22

Ignasheva L. P., Danilova L. A., Fedotenkov A. G. Effect of Low Concentrations of Glycerol on the Homotransplantational Activity of Hemopoietic Tissue Lymphocytes 25

Kocherezhskaya I. A., Vishnevsky V. I., Inyutin G. A. Effect of Washing out from PEO-1500 on Electrical Parameters of Erythrocytes 27

Kuraksa V. M., Mileshkin M. B. A Comparative Estimation of Mechanical Changes in the Solid Phase Structure During Nonequilibrium Freezing and Thawing of Liquids 32

Lugovoy V. I., Kravchenko L. P., Kareva L. V., Koptelov V. A., Martynenko A. A., Semenchenko O. A. A Method for Producing Isolated Liver Cells 36

Novikov A. N., Lipina O. V., Oleinik S. F. Adsorption Activity of Ethylene Glycol and Cryoprotectants of Polyethylene Oxide (PEO) Series 39

Pichugin Yu. I., Novikov A. N. The Influence of Some Cryoprotectants on Solubility of NaCl, KCl Salts 42

Pustovoit P. A., Lipina O. V. The Influence of Cryoprotectants and Low-Temperature Preservation on Rheologic Properties of Blood 44

Utevsky A. M., Chuiko V. A., Gubina N. F., Shchirova V. O. Effect of Low Temperatures on Catecholamine Release Processes 47

Utevsky A. M., Chuiko V. A., Nazarova I. A., Tarasova E. G. Monoaminoxidase Activity in the Heart, Liver and Thyroid Gland After Their Rapid Freezing to —196° C 49

Filev A. V., Dygin V. P., Kholodny A. Ya., Petrenko G. I. Viability Evaluation for Stem Cells — Precusors of Granulomonopoiesis in the Cadaverous Bone Marrow Cryopreserved with Polyvinylpyrrolidone. 52

Cryopreservation of Biological Systems

Volkova N. A., Sandomirsky B. P. Effect of PEO-400 on the Morphofunctional State of the Frozen-Thawed Human Skin 56

Kleiza V. Yu., Dainis B. F., Zhukauskas G. Yu. Hypothermic Perfusion Preservation of Cadaverous Kidneys 60

Yudin G. V. Organ-Preserving Effect of Electrical Stimulation in Hypothermic Preservation of Donor Kidneys 63

Cryomedicine

Katurova G. F., Tochilovskaya R. V., Pinsky G. M. Cryotherapy of Retention Cysts of Lip Mucosa 66

Kononov Yu. V., Legostaeva E. I. Hepatitis B Virus in Frozen Red Cells . . . 67

Petrun N. M., Baran E. Ya., Tsybulyak E. I., Krimkevich E. I., Nikulina G. G. Assessment of Some Substances Protecting Donor Kidneys Against Ischemia 70

Cherednichenko V. M., Pereuznik Yu. F., Demin A. L., Yurchenko T. N., Sharlaya T. M., Repko O. V. An Approach to Clinical Use of Cryopreserved Sclera 74

Loyevsky M. M., Vorotilin A. M. A calorimetric method of determining residual 1,2-propanediol in the frozen-thawed erythrocytes 77

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043

Роль липидов и нонтранспортирующих систем биомембран в процессах адаптации животных к низким температурам (обзор литературы) / Жегунов Г. Ф., Белоус А. М.— Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 13, с. 3—15.

Рассмотрена одна из сторон низкотемпературной акклиматизации — участие в этом процессе биологических мембран.

Показано, что в приспособлении организмов к охлаждению существенную роль играют липиды клеточных мембран, а также их ионные насосы. Освещены некоторые стороны регуляции функционирования мембранных АТФаз различным составом липидов. Дается заключение о необходимости дальнейшей разработки этого направления научных исследований для выяснения молекулярных механизмов приспособления животных к низким температурам.

Библ.: 67 назв.

УДК 57.043.615.9

Функция и структура почек крыс при введении малых доз 1,2-пропандиола / Гучок В. М., Козлова В. Ф.— Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 13, с. 15—20.

В субхронических опытах на половозрелых крысах-самцах линии Вистар установлено, что 1,2-пропандиол отечественного изготовления в дозе 1/20 ДЛ-50 (0,9 г/кг) в 50%-ной концентрации (растворы на дистиллированной воде) при ежедневном внутрибрюшинном введении в течение 21 дня не нарушают функции и структуры почек. Двукратное увеличение дозы или концентрации 1,2-пропандиола при тех же условиях эксперимента может приводить к развитию некоторых начальных обратимых изменений в структуре почек без нарушения их функции. 1,2-пропандиол в дозах 1/20 и 1/10 ДЛ-50 (0,9 и 1,8 г/кг) при однократном внутрибрюшинном введении не изменяет четырехчасового водного диуреза у крыс.

Ил. 3. Библиогр.: 11 назв.

УДК 57.043

Влияние замороженных сингенных лимфоцитов на пролиферативную активность стволовых клеток / Данилова Л. А., Игнашева Л. П., Федотенков А. Г.— Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 13, с. 20—22.

На линейных мышах изучалось влияние замороженных сингенных лимфоцитов на стволовые клетки в условиях совместной трансплантации их гибридному реципиенту. Показано, что добавление к трансплантату костного мозга замороженных сингенных лимфоцитов ведет к смягчению аллогенного ингибирования и усилению пролиферативной активности КОЕ «in vivo».

Табл. 1. Библиогр. : 1 назв.

УДК 57. 043:577.37.1

Механизм изменения активности НАД-зависимой малатдегидрогеназы митохондрий при замораживании-оттаивании / Золочевская Л. И., Луговой В. И.— Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 13, с. 22—24.

Изучалось изменение активности НАД-зависимой малатдегидрогеназы после замораживания и охлаждения в водно-глицериновом растворе митохондрий в диапазоне температур от 0 до —30° С. Обнаружено, что после осаждения митохондрий в пробах, подвергавшихся замораживанию до —30° С, большая часть малатдегидрогеназной активности определялась в постмитохондриальном супернатанте, а не в составе органелл. После медленного замораживания митохондрий (от 0 до —30° С) активность НАД-малатдегидрогеназы увеличивалась приблизительно в равной степени при —5 и —11° С и более значительно при —20 и —25° С. Охлаждение митохондрий в незамерзающем водно-глицериновом растворе вызывало изменение активности фермента. По мере понижения температуры, начиная от —5° С, дополнительных изменений активности фермента не наблюдалось. Предполагается, что изменение активности НАД-малатдегидрогеназы в процессе замораживания-оттаивания митохондрий обусловлено как физико-химическими сдвигами в растворе, так и термотропными фазовыми переходами липид-белковых компонентов мембран.

Библиогр.: 5 назв.

УДК 57.043

Влияние низких концентраций глицерина на гомотрансплантационную активность лимфоцитов кроветворных тканей / Игнашева Л. П., Данилова Л. А., Федотенков А. Г.— Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 13, с. 25—27.

Изучено влияние 7 и 5%-ного глицерина на иммунологические свойства лимфоцитов, содержащихся в лимфоузлах и костном мозге. Для определения иммунологической активности лимфоцитов использованы методы, отражающие взаимодействие стволовых клеток и лимфоцитов «in vivo»: 1) метод учета инактивации несин-

Матеріал, захищений авторським правом

генных стволовых клеток и 2) метод учета отмены эндогенного колониеобразования. Установлена минимальная концентрация глицерина (7%), позволяющая снижать гомотрансплантационную активность лимфоцитов кроветворных тканей против эндогенных и экзогенных КОЕ.

Табл. 3. Библиогр.: 3 назв.

УДК 57. 043:612.111.014.41

Влияние отмывания от ПЭО-1500 на электрические параметры эритроцитов / Кочережская И. А., Вишневский В. И., Инютин Г. А.— Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 13, с. 27—32.

Исследованы электрические параметры эритроцитов (коэффициент поляризации мембраны и электропроводность цитоплазмы) после отмывания от различных концентраций ПЭО-1500. Показано, что обратимость изменений указанных параметров после отмывания зависит от осмотичности используемых растворов криопротектора. Восстановление исходных электрических свойств эритроцитов наблюдается в случае отмывания от изотонических растворов ПЭО-1500.

Ил. 4. Табл. 1. Библиогр.: 9 назв.

УДК 57.043:547.422:53.082.4

Сравнительная оценка механических нарушений структуры твердой фазы при неравновесном замораживании и отогреве жидкостей / Куракса В. М., Милешкин М. Б.— Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 13, с. 32—36.

Доказана возможность применения метода регистрации акустической эмиссии (АЭ) для количественной оценки механических структурных нарушений твердой фазы при неравновесном замораживании и отогреве криопротекторов, их растворов и воды. Получены сравнительные характеристики активности АЭ при замораживании и отогреве для воды, 40%-ного водного раствора ПЭГ-1500 и 100%-ного ЭГ. Указаны температуры, при которых реализуется наибольшая температурная интенсивность АЭ для исследованных веществ в режиме замораживания и отогрева. Количественно проиллюстрирована меньшая степень механических структурных нарушений твердой фазы изученных веществ при отогреве по сравнению с нарушениями структуры при охлаждении.

Ил. 4. табл. 2. Библиогр.: 7 назв.

УДК 57.043:577.154:577.158.1:591.436.2

Метод получения изолированных клеток печени / Луговой В. И., Кравченко Л. П., Карева Л. В., Коптелов В. А., Мартыненко А. А., Семенченко О. А.— Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 13, с. 36—39.

В задачу работы входило сравнение двух методов получения изолированных клеток печени белых крыс, оценка их пригодности для целей криобиологического эксперимента и возможная модификация этих методов с точки зрения улучшения морфофункциональных характеристик клеток. Разработанный метод получения гепатоцитов как по выходу клеточных элементов, так и по основным морфо-функциональным характеристикам выделенных клеток является достаточно воспроизводимым, простым в исполнении, экономичным и может использоваться для решения криобиологических задач.

Библиогр.: 5 назв.

УДК 57.043:578.088

Адсорбционная активность этиленгликоля и криопротекторов ряда ПЭО / Новиков А. Н., Липина О. В., Олейник С. Т.— Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 13, с. 39—42.

Оценена поверхностная активность этиленгликоля и ряда ПЭО с молекулярной массой 100—20 000. Рассчитаны изотермы адсорбции этих криопротекторов, сделан их анализ. Значения рассчитанных площадей, занимаемых молекулами исследуемых криопротекторов в адсорбционном слое, позволили оценить характер их связи с межфазной границей.

Ил. 1. Табл. 3. Библиогр.: 5 назв.

УДК 57.043:578.088

Влияние ряда криопротекторов на растворимость солей NaCl, KCl / Пичугин Ю. И., Новиков А. Н.— Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 13, с. 42—44.

Определены экспериментальные величины растворимости солей NaCl и KCl в 50%-ных водных растворах 15 криопротекторов при 0° С. На основании этих данных сделана оценка влияния исследованных криопротекторов на степень диссоциации солей NaCl, KCl по сравнению со степенью диссоциации этих солей в воде.

Табл. 1. Библиогр.: 5 назв.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043.612.1

Влияние криопротекторов и низкотемпературного консервирования на реологические свойства крови / Пустовойт П. А., Липина О. В.— Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 13, с. 44—47.

Исследовано влияние криопротекторов ПЭО-1500 и глицерина, а также криоконсервирования при температуре жидкого азота на динамическую вязкость суспензии эритроцитов, характеризующую ее реологические свойства. Показано, что увеличение динамической вязкости суспензии наступает в первые 5 — 10 мин контакта эритроцитов с криопротекторами эндо- и экзоцеллюлярного действия, что совпадает по времени с распределением в суспензии ПЭО. При разведении цельной крови суспензией размороженных эритроцитов, содержащей ПЭО-1500 (модель гемотрансфузии in vitro), не отмечено достоверных различий в показателях динамической вязкости.

Ил. 4. Библиогр.: 10 назв.

УДК 57.043:517:174.5

Влияние низких температур на процессы высвобождения катехоламинов / Утевский А. М., Чуйко В. А., Губина Н. Ф., Широва В. А.— Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 13, с. 47—49.

Исследована способность ткани предсердий и щитовидной железы быка к K^+ и тирамин-зависимому высвобождению норадреналина-H^3 в условиях охлаждения и замораживания тканей. Установлено, что после выдерживания тканей при 20, 4, 0° С интенсивность K^+-зависимого высвобождения норадреналина-H^3 снижается более существенно, чем тирамин-зависимого, а замораживание-отогрев угнетает оба исследованных процесса. Приведено объяснение возможных механизмов термозависимости процессов высвобождения гормонов-медиаторов.

Ил. 1. Табл. 1. Библиогр.: 5 назв.

УДК 57.043.577.15:576.347

Активность моноаминоксидазы в сердце, печени и щитовидной железе после их быстрого замораживания до —196° С / Утевский А. М., Чуйко В. А., Назарова Л. А., Тарасова Е. Г.— Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 13, с. 49—52.

Исследовалась активность моноаминоксидазы (МАО) митохондрий сердца, печени, щитовидной железы, подвергнутых быстрому (300—400°/мин) замораживанию до —196° С, а также чувствительность указанного фермента к специфическому ингибитору МАО-ниаламиду. Показано, что быстрое замораживание образцов ткани до температуры жидкого азота не вызывает существенных изменений каталитической активности МАО и ее чувствительности к специфическому ингибитору. Моноаминоксидаза устойчива к низким температурам и сохраняет в условиях замораживания-оттаивания свою структурно-функциональную организацию.

Ил. 3. Библиогр.: 10 назв.

УДК 57.043

Оценка жизнеспособности стволовых клеток-предшественников грануломонопоэза в кадаверном костном мозге, криоконсервированном под защитой поливинилпирролидона / Филев А. В., Дыгин В. П., Холодный А. Я., Петренко Г. И.— Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 13, с. 52—55.

Проводилось изучение кластеро (КЛОС) и колониеобразующей (КОС) способности клеток — предшественников грануломонопоэза кадаверного костного мозга, заготовленного через 2 — 6 ч после смерти и подвергнутого криоконсервированию в жидком азоте через 18 ч.

Авторы приходят к выводу, что посмертный костный мозг является перспективным источником получения клеток-предшественников грануломонопоэза, а криоконсервирование в жидком азоте под защитой поливинилпирролидона позволяет хранить их жизнеспособными в течение шести и более лет.

Табл. 1. Библиогр.: 7 назв.

УДК 57.043:616.5.361.014.41:547.422

Влияние ПЭО-400 на морфофункциональное состояние деконсервированной кожи человека / Волкова Н. А., Сандомирский Б. П.— Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 13, с. 56—60.

При изучении влияния экспозиции в среде замораживания, содержащей 15% ПЭО-400, на морфофункциональное состояние деконсервированной трупной кожи установлено, что 3-часовой контакт с защитной средой является достаточным для реализации криозащитных свойств ПЭО-400 по отношению к части как камбиальных клеток эпидермиса, формирующих в органной культуре деконсервированной кожи новый многослойный эпидермис, так и фибробластическим элементам дермы. Более длительный контакт (12—24 ч) с 15%-ным раствором ПЭО-400 в среде Хенкса ведет к необратимым повреждениям при замораживании- оттаивании, что проявляется при культивировании в виде аутолитических процессов.

Ил. 3. Библиогр.: 12 назв.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043

Гипотермическая перфузионная консервация кадаверных почек / Клейза В. Ю., Дайнис Б. Э., Жукаускас Г. Ю.— Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 13, с. 60—63.

Произведено в клинике 28 перфузионных консерваций кадаверных почек с целью установить жизнеспособность трансплантата. Наиболее информативными явились гидродинамические показатели перфузии, в частности, сосудистое сопротивление и количество выделяемой почкой мочи во время перфузии. Биохимические показатели явились менее информативными. Опираясь на параметры перфузионной консервации, предложены критерии жизнеспособности и пригодности трансплантата для пересадки.

Ил. 6. Библиогр.: 8 назв.

УДК 57.043

Органосохраняющий эффект электростимуляции при гипотермической консервации донорских почек / Юдин Г. В.— Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 13, с. 63—65.

В экспериментах на 40 изолированных почках собак изучен органосохраняющий эффект электростимуляции в период 24-часовой гипотермической консервации. При использовании гипокалиевого консервирующего раствора ИТиИО-2 выявлен трофический эффект, проявляющийся в уменьшении клеточного отека, лучшей сохранности клеточных мембран, более интенсивной утилизации субстратов метаболизма. При консервации почек в гиперкалиевой среде Игла эффект электростимуляции не обнаружен.

Библиогр.: 8 назв.

УДК 57.043

Криотерапия ретенционных кист слизистой оболочки губ / Катурова Г. Ф., Точиловская Р. В., Пинский Г. М.— Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 13, с. 66—67.

Обобщен опыт лечения ретенционных кист слизистой губ с помощью парожидкостной струи азота. Прослежены непосредственные, ближайшие и отдаленные результаты криотерапии ретенционных кист разного диаметра. Установлено, что метод криотерапии парожидкостной струей целесообразен при лечении кист размером не более 1 см.

Библиогр.: 2 назв.

УДК 57.043

Вирус гепатита В в замороженных эритроцитах / Кононов Ю. В., Легостаева Е. И.— Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 13, с. 67—69.

Представлены результаты исследования влияния экзоцеллюлярных криопротекторов: глицерина и полиэтиленоксида (ПЭО) с молекулярной массой 400 и 1500 и замораживания на сохранность маркера вируса гепатита типа В — поверхностного антигена вируса гепатита В и антител к нему. Показано, что ПЭО не оказывает угнетающего действия на антиген гепатита В независимо от его титра в исходном сырье, молекулярной массы и конечной концентрации (10 и 20%) ПЭО, температуры (4—40, —196° С) и сроков хранения (до одного года).

Табл. 1. Библиогр.: 8 назв.

УДК 57.043

Оценка некоторых средств противоишемической защиты донорских почек / Петрунь Н. М., Баран Е. Я., Цыбуляк Е. И., Кримкевич Е. И., Никулина Г. Г.— Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 13, с. 70—74.

Представлены экспериментальные данные о протекторном противоишемическом действии преднизолона, лазикса с дроперидолом и контрокила на метаболизм ишемической почки кролика. В ряду изученных препаратов по данным дыхания, окислительного фосфорилирования, гликолиза, активности ферментов цикла Кребса, а также протеолитической активности, аутолиза и уровня катепсинов, наиболее эффективными оказались контрикал и лазикс в сочетании с дроперидолом.

Ил. 3. Библиогр.: 19 назв.

УДК 57.043.617.715.361.014.41

Опыт клинического применения криоконсервированной склеры / Чередниченко В. М., Переузник Ю. Ф., Демин А. Л., Юрченко Т. Н., Шарлай Т. М., Репко О. В.— Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 13, с. 74—76.

Приведены результаты применения криоконсервированной до —196° С под защитой полиэтиленоксида с молекулярной массой 400 (ПЭО-400) склеры в клинике. Результаты наблюдений подтвердили пригодность криоконсервированного материала для склероукрепляющих ургентных трансплантаций.

Библиогр.: 11 назв.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043.615.385.1.014.413.074

Колориметрический метод определения остаточного 1,2-пропандиола в размороженных эритроцитах / Лоевский М. М., Воротилин А. М.— Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 13, с. 77—78.

Представлен метод определения 1,2-пропандиола в биоматериале, обладающий высокой разрешающей способностью и воспроизводимостью результатов.

Ил. 1. Библиогр.: 5 назв.

UDC 57.043

The Role of Lipids and Ion-Transporting Membrane Systems in Processes of Animal Adaptation to Low Temperatures / Zhegunov G. F., Belous A. M.— Kriobiologia i kriomeditsina, 1983, iss. 13, p. 3—15.

The paper deals with a review of literature on the problem of poikilothermic and homoiothermic animal adaptation to low temperatures. One aspect of low temperature acclimatization — the involvement of biological membranes in this process — is discussed.

It is shown that lipids of cell membranes and ionic pumps play an important role in the adaptation of animals to cold. Some aspects of membrane ATPase functioning regulation by various lipid composition are considered. A necessity is emphasized for further investigation of molecular mechanisms of animal adaptation to low temperatures.

Refs: 67 titles.

UDC 57.043.615.9

The Function and Structure of Rat Kidneys After Injection of Small Doses of 1,2-Propanediol / Guchok V. M., Kozlova V. F.— Kriobiologiya i kriomeditsina, 1983, iss. 13, p. 15—20.

Subchronic experiments in mature Wistar rats (male) have demonstrated that a daily intraperitoneal administration of home-made 5% 1,2-propanediol in a dose of 1/20 LD-50 (0.9 g/kg) for 21 days does not alter the function and structure of rat kidneys. A twofold increase in the dose or concentration of 1,2 propanediol under the same experimental conditions may lead to development of some initial reversible changes in the kidney structure without impairment of their function. Single intraperitoneal injections of 1,2-propanediol in doses of 1/20 and 1/10 LD-50 (0.9 and 1,8 g/kg) do not change the 4-hour aqueous diuresis in rats.

3 figs. Refs: 11 titles.

UDC 57.043

Influence of Frozen Syngenic Lymphocytes on the Proliferative Activity of Stem Cells / Danilova L. A., Ignasheva L. P., Fedotenkov A. G.— Kriobiologiya i kriomeditsina, 1983, iss 13, p. 20—22.

The effect of frozen-thawed syngenic lymphocytes on stem cells under conditions of their combined transplantation to hybrid recipients has been studied in lethally irradiated strain mice. It has been demonstrated that addition of frozen-thawed syngenic lymphocytes to the bone marrow transplant leads to a decrease in the allogenic inhibition and to an increase in the proliferation activity of colony forming units in vivo.

1 table. Refs: 1 titles.

UDC 57.043:577.37.1

The Mechanism of Changes in the Activity of NAD-Dependent Mitochondrial Malate Dehydrogenase During Freezing and Thawing / Zolochevskaya L. I., Lugovoy V. I.— Kriobiologiya i kriomeditsina, 1983, iss. 13, p. 22—24.

Changes in the activity of NAD-dependent malate dehydrogenase after freezing and cooling in aqueous-glycerol solution of mitochondria were studied within a 0-30° C range. It is found that after mitochondria sedimentation in samples subjected to freezing up to —30° C malate dehydrogenase activity was mainly determined in postmitochondrial supernatant rather than in the composition of organelles. After a slow freezing of mitochondria from 0° to —30° C the NAD-malate dehydrogenase activity increased approximately equally at —5° and —11° C and more markedly at —20° C and —25° C. The mitochondria cooling in a nonfreezing aqueous glycerol solution evoked changes in the enzyme activity beginning from —5° C, further temperature lowering inducing no alterations in the enzyme activity.

Iit is supposed that changes in NAD-malate dehydrogenase activity during freezing and thawing of mitochondria are due to both physicochemical shifts in the solution and thermothropic phase transitions of lipid-protein components of the membranes.

Refs: 5 titles.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 57.043

Effect of Low Concentration of Glycerol on the Homotrans plantational Activity of Hemopoietic Tissue Lymphocytes / Ignasheva L. P., Danilova L. A., Fedotenkov A. G.— Kriobiologia i kriomeditsina, 1983, iss. 13, p. 25—27

The effect of 7 and 5 % glycerol on the immunological properties of lymphocytes contained in lymph nodes and bone marrow has been studied. Methods reflecting the interaction of stem cells and lymphocytes in vivo were used to determine the immunological activity of lymphocytes: 1) registration of nonsyngenic stem cell inactivation and 2) registration of endogenic colony formation inhibition. Minimum glycerol concentration (7%) has been established to reduce the homotransplantational activity of homopoietic tissue lymphocytes against endogenic and exogenic colony forming units.

3 tables. Refs: 3 titles.

UDC 57.043:612.111.014.41

Effect of Washing out from PEO-1500 on Electrical Parameters of Erythrocytes / Kocherezhskaya I. A., Vishnevsky V. I., Inyutin G. A.— Kriobiologia i kriomeditsina, 1983, iss. 3, p. 27—32.

Electrical parameters (membrane paralization coefficient and cytoplasm conductivity) of erythrocytes have been studied after washing out from PEO-1500 of various concentrations. It is demonstrated that the reversibility of changes in these parameters after washing out depends on osmoticity of cryoprotectant solutions. Recovery of the initial electrical properties of erythrocytes is observed in case of washing out from isotonic PEO-1500 solutions.

4 figs. 1 table. Refs: 9 titles.

UDC 57.043:547.422:53.082.4

A Comparative Estimation of Mechanical Changes in the Solid Phase Structure During Nonequilibrium Freezing and Thawing of Liquids / Kuraksa V. M., Mileshkin M. B.— Kriobiologiya i kriomeditsina, 1983, iss. 13, p. 32—36.

A possibility is demonstrated for the acoustic emission (AE) registration technique to be employed in quantitative evaluation of mechanical structural changes in the solid phase during nonequilibrium freezing and thawing of cryoprotectants, their solutions and water. Comparative characteristics have been obtained for AE activity during freezing and thawing of water, 40% aqueous PEG-1500 and 10% EG solutions. Temperatures are indicated at which the greatest thermal intensity of AE is manifested during freezing and thawing for the substances studied. A smaller degree of mechanical alterations during thawing in the solid phase of the substances under study is illustrated quantitatively in comparison with structural changes during cooling.

4 figs. 2. tables. Refs: 7 titles.

UDC 57.043:577.154:577.158.1:591.436.2

A Method for Producing Isolated Liver Cells / Lugovoy V. I., Kravchenko L. P., Kareva L. K., Koptelov V. A., Martynenko A. A., Semenchenko O. A.— Kriobiologiya i kriomeditsina, 1983, iss. 13, p. 36—39.

The present investigation has been aimed at comparing two methods for production of isolated albino rat liver cells, evaluating their applicability to cryobiologic experiments and possible modifications of these methods from the standpoint of improving morphofunctional characteristics of the cells. The developed method of hepathocyte production both in the yield of cellular elements and in the main morphofunctional characteristics of isolated cells is sufficiently reproducible, simple in realization, economical and may be used for solution of cryobiologic tasks.

3 tables. Refs: 5 titles.

UDC 57.043:578.088

Adsorption Activity of Ethylene Glycol and Cryoprotectants of Polyethylene Oxide (PEO) Series / Novikov A. N., Lipina O. V., Oleinik S. T.— Kriobiologiya i kriomeritsina, 1983, iss. 13, p. 39—42.

Surface activities of ethylene glycol and PEO series, m. w. 100-20000, have been estimated. Adsorption isotherms of these cryoprotectants have been calculated and analyzed. The values of calculated areas occupied by these cryoprectants in the adsorption layer enable the character of their binding to the interfase to be estimated.

1 fig. 3 tables. Refs: 5 titles.

UDC 57.043:578.088

The Influence of Some Cryoprotectants on Solubility of NaCl, KCl Salts / Pichugin Yu. I., Novikov A. N.— Kriobiologiya i kriomeditsina, 1983, iss. 13, p. 42—44.

Experimental values of NaCl and KCl salts solubility in 50% aqueous solutions of 15 cryoprotectants were determined at 0° C. On the basis of these data the influence of cryoprotectants under study on the degree of NaCl, KCl salts dissociation was evaluated in comparison with dissociation of these salts in water.

1 table. Refs: 5 titles.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 57.043.612.1

The Influence of Cryoprotectants and Low-Temperature Preservation on Rheologic Properties of Blood / Pustovoit P. A., Lipina O. V.— Kriobiologiya i kriomeditsina, 1983, iss. 13, p. 44—47.

Dynamic viscosity of erythrocyte suspension, characterizing the suspension rheologic properties has been investigated as affected by cryoprotectants PEO-1500 and glycerol and cryopreservation at the liquid nitrogen temperature.

It is shown that dynamic viscosity of the suspension increases during the first 5-10 min of the erythrocyte exposure to cryoprotectants of endo- and exocellular action, which coincides in time with PEO distribution in the suspension.

After dilution of the whole blood with the suspension of thawed erythrocytes containing PEO-1500 (hemotransformation model in vitro) no significant differences have been observed in indices of dynamic viscosity.

4 figs. Refs: 10 titles.

UDC 57.043:517.174.5

Effect of Low Temperatures on Catecholamine Release Processes / Utevsky A. M., Chuiko V. A., Gubina N. F., Shchirova V. A.— Kriobiologiya i kriomeditsina, 1983, iss. 13, p. 47—49.

The bovine atrium and thyroid gland tissues have been investigated for their ability of K^+- and tyramine-dependent release of norepinephrine-^3H during tissue cooling and freezing. It is found that after tissue incubation at +20, +4, 0° C the intensity of K^+-dependent release of norepinephrine-^3H decreased more essentially than that of tyramine-dependent, and freezing-thawing inhibits both of the processes. Possible mechanisms of thermodependence of mediator hormone release processes are accounted for.

1 fig. 1 table. Refs: 5 titles.

UDC 57.043.577.15:576.347

Monoaminoxidase Activity in the Heart, Liver and Thyroid Gland After Their Rapid Freezing to —196° C / Utevsky A. M., Chuiko V. A., Nazarova L. A., Tarasova E. G.— Kriobiologiya i kriomeditsina, 1983, iss. 13, p. 49—52.

The activity of monoaminoxidase (MAO) of the heart, liver and thyroid gland mitochondria subjected to rapid (300-400°/min) freezing to (196° C has been investigated for its activity and susceptibility to a specific MAO inhibitor — nialamide. It is shown that rapid freezing of the tissue samples down to the liquid nitrogen temperature does not cause essential changes in catalytic activity of MAO and its susceptibility to the specific inhibitor. Monoaminoxidase is resistant to low temperatures and retains its structural and functional organization during freezing and thawing.

3 figs. Refs: 10 titles.

UDC 57.043

Viability Evaluation for Stem Cells — Precursors of Granulomonopoiesis in the Cadaverous Bone Marrow Cryopreserved with Polyvinylpyrrolidone / Filev A. V., Dygin V. P., Kholodny A. Ya., Petrenko G. I.— Kriobiologiya i kriomeditsina, 1983, iss. 13, p. 52—55.

Cluster- and colony-forming activities have been studied in granulomonopoiesis precursor cells of the cadaverous bone marrow obtained 2-6 h after death and cryopreserved in liquid nitrogen for 18 h. It is concluded that the postmortal bone marrow is a promising source of granulomonopoiesis precursor cells and cryopreservation in liquid nitrogen under polyvinylpyrrolidone protection enables their storage for more than 6 years.

1 table. Refs: 7 titles.

UDC 57.043:616.5.361.014.41:547.422

Effect of PEO-400 on the Morphofunctional State of the Frozen-Thawed Human Skin / Volkova N. A., Sandomirsky B. P.— Kriobiologiya i kriomeditsina, 1983, iss. 13, p. 56—60.

The investigation in the effect of skin exposure to a freezing medium containing 15% PEO-400 on the morphofunctional state of the frozen-thawed cadaverous skin has shown that a 3-hour exposure to the protective medium is enough for the realization of cryoprotective properties of PEO-400 with respect to a part of both cambial epidermic cells forming a new multiplayer epidermis in the organ culture of the frozen-thawed skin, and to fibroblastic elements of the derma. A longer contact (12-24 h) with 15% PEO-400 solution in the Hanks medium leads to irreversible changes during freezing and thawing, which is manifested in autolytic processes during cultivation.

3 figs. Refs: 12 titles.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 57.043

Hypothermic Perfusion Preservation of Cadaverous Kidneys / Kleiza V. Yu., Dainis B. E., Zhukauskas G. Yu.— Kriobiologiya i kriomeditsina, 1983, iss. 13, p. 60—63.

28 perfusion preservations of cadaverous kidneys were performed in the clinic with a view to determine viability of the graft. The most informative were hydrodynamic perfusion characteristics, vessel resistance and the amount of urine produced by the kidney during perfusion in particular. Biochemical indices appeared to be less informative. Criteria based on perfusion parameters are suggested for viability and fitness of the graft for transplantation.

6 figs. Refs: 8 titles.

UDC 57.043

Organ-Preserving Effect of Electrical Stimulation in Hypothermic Preservation of Donor Kidneys / Yudin G. V.— Kriobiologiya i kriomeditsina, 1983, iss. 13, p. 63—65.

The organ-preserving effect of electrical stimulation during a 24-hour hypothermic storage has been studied in experiments with 40 isolated dog kidneys. A trophic effect manifested in reduction of the cell edema, a better preservation of cell membranes and a more intensive utilization of metabolic substrates is observed in case of utilization of hypopotassium preserving medium ITiIO-2, No electrostimulation effect was observed when kidneys were preserved in hyperpotassium Eagle's medium.

Refs: 8 titles.

UDC 57.043

Cryotherapy of Retention Cysts of Lip Mucosa / Katurova G. F., Tochilovskaya R. V., Pinsky G. M.— Kriobiologiya i kriomeditsina, 1983, iss. 13, p. 66—67.

An experience of treating lip mucosa retention cysts by means of a vapour-liquid nitrogen jet is summarized. Immediate, nearest and remote results of cryotherapy of retention cysts of different diameters are traced. It is determined that the method of cryotherapy with a vapour-liquid jet is advisable for treating cysts with a 1 cm diameter and not more.

Refs: 2 titles.

UDC 57.043

Hepatitis B Virus in Frozen Red Cells / Kononov Yu V., Legostaeva E. I.— Kriobiologiya i kriomeditsina, 1983, iss. 13, p. 67—69.

The paper presents results of studies in the effect of exocellular cryoprotectants, glycerol and polyethylene oxide (PEO), m. w. 400 and 1500, and freezing on preservation of the hepatitis B virus marker — a surface antigen of the hepatitis B virus and its antibodies. It is shown that PEO does not inhibit the hepatitis B antigen irrespective of its titre in the initial material, PEO molecular weight and final concentration (10% and 20%), temperature (4, —40, —196° C) and time of storage (up to 1 year).

1 table. Refs: 8 titles.

UDC 57.043

Assessment of Some Substances Protecting Donor Kidneys Against Ischemia / Petrun N. M., Baran E. Ya., Tsybulyak E. I., Krimkevich E. I., Nikulina G. G.— Kriobiologiya i kriomeditsina, 1983, iss. 13, p. 70—74.

Experimental evidence on protective antiischemic effect of prednisolone, lasix with droperidolum and contrykal on metabolism of the ischemic rabbit kidney is presented.

According to data on respiration, oxidative phosphorylation, glycolysis, Krebs cycle enzymic activity, proteolytic activity, autolysis and cathepsin level the most effective substances are contrykal and lasix combined with droperidolum.

3 figs. Refs: 19 titles.

UDC 57.043.617.715.361.014.41

An Approach to Clinical Use of Cryopreserved Sclera / Cherednichenko V. M., Pereuznik Yu F., Demin A. L., Yurchenko T. N., Sharlay T. M., Repko O. V.— Kriobiologiya i kriomeditsina, 1983, iss. 13, p. 74—76.

A clinical experience is presented for application of sclera cryopreserved at —196° C under the protection of polyethylene oxide, m. w. 400 (PEO-400). Results of the observations proved the fitness of the cryopreserved material for sclerostrengthening urgent transplantations.

Refs: 11 titles.

UDC 57.043.615.385.1.014.413.074

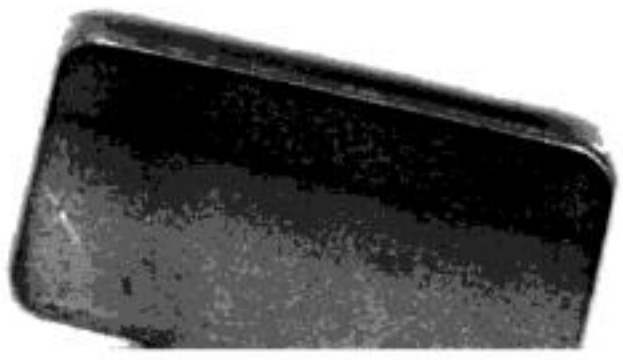
A calorimetric method of determining residual 1,2-propanediol in the frozen—thawed erythrocytes / Loyevsky M. M.; Vorotilin A. M. Kriobiologia i kriomeditsina, 1983, iss. 13, p. 77—78.

A method of determining 1,2-propanediol in biological material is described which is characterized by a high resolution and a good reproducibility of results.

1 ill., 5 refs.

Матеріал, захищений авторським правом





Матеріал, захищений авторським правом

1 р. 30 к.

ПАУКОВА ДУМКА

Бібліографія в коментованому індексі. вип. 13. 1—88 с.

Матеріал, захищений авторським правом