

ISSN 0233-7673

КРИОБИОЛОГИЯ

4|85



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Грищенко В. И. (главный редактор), Белоус А. М. (зам. гл. редактора)
Благой Ю. П., Бразников А. М., Бутенко Р. Г., Вепринцев Б. Н.,
Гольданский В. И., Луговой В. И., Осташко Ф. И., Панков Е. Я.,
Пирузян Л. А., Пушкарь Н. С., Сandomирский Б. П., Снурников А. С.,
Сытник К. М., Утевский А. М., Федотенков А. Г., Цуцаева А. А.,
Шумаков В. И., Юрченко Т. Н.

EDITORIAL BOARD

Grishchenko V. I. (Editor-in-Chief), Belous A. M. (Associated Editor),
Blagoj Yu. P., Brazhnikov A. M., Butenko R. G., Veprintsev B. N.,
Goldansky V. I., Lugovoj V. I., Ostashko F. I., Pankov E. Ya.,
Piruzyan L. A., Pushkar N. S., Sandomirsky B. P., Snurnikov A. S.,
Sytnik K. M., Utevsky A. M., Fedotenkov A. G., Tsutsayeva A. A.,
Shumakov V. I., Yurchenko T. N.

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Аксенов С. И. (Москва), Бакрадзе Н. Г. (Тбилиси), Бекер М. Е. (Рига),
Белошицкий П. В. (Киев), Гродзинский Д. М. (Киев), Запорожан В. Н. (Одесса),
Калакуцкий Л. В. (Пушино, Моск. обл.), Курбатов А. Д. (Ленинград),
Наер В. А. (Одесса), Никитин В. А. (Харьков), Пинаев Г. П. (Ленинград),
Сергеев Г. Б. (Москва), Соловьева М. А. (Киев), Соломонов Н. Г. (Якутск),
Тимофеев Н. Н. (Москва), Чередниченко В. М. (Харьков), Шенталь В. В. (Москва)
Эмирбеков Э. З. (Махачкала).

EDITORIAL COUNCIL

Aksenov S. I. (Moscow), Bakradze N. G. (Tbilisi), Beker M. E. (Riga),
Beloshitsky P. V. (Kiev), Grodzinsky D. M. (Kiev), Zaporozhan V. N. (Odessa),
Kalakutsky L. V. (Pushchino, Moscow region), Kurbatov A. D. (Leningrad),
Naer V. A. (Odessa), Nikitin V. A. (Kharkov), Pinayev G. P. (Leningrad),
Sergeyev G. B. (Moscow), Solovieva M. A. (Kiev), Solomonov N. G. (Yakutsk),
Timofeyev N. N. (Moscow), Cherednichenko V. M. (Kharkov), Shentai V. V. (Moscow),
Emirbekov E. Z. (Makhachkala).

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ОТДЕЛЕНИЕ ФИЗИОЛОГИИ

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ
И ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

КРИОБИОЛОГИЯ

4 1985

НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ОСНОВАН В 1985 ГОДУ
ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

КИЕВ НАУКОВА ДУМКА 1985

СОДЕРЖАНИЕ

ВОЛКОВ В. Я., САХАРОВ Б. В., ВОЛКОВА Л. А. Радиоспектроскопические методы в криобиологии	3
ЮРЧЕНКО Т. Н. Адаптационные и деструктивные изменения в биологических объектах после действия охлаждения и криопротекторов	10
ФИЛЕВ Л. В., ДЫГИН В. П., ХОЛОДНЫЙ А. Я., ПЕТРЕНКО Г. И. Влияние криопротекторов на колониеобразующую способность клеток — предшественников грануломонопоза костного мозга человека до замораживания	14
СТАБРОВСКИЙ Е. М. Роль дофаминергических и норадренергических терминалей гипоталамуса в регуляции функции эндокринных желез при действии холода	17
ПАРАЩУК Ю. С., ГРИЩЕНКО В. И., КАЛУГИН Ю. В., ЧЕРНЫШ Е. Н. Влияние различных условий криоконсервации на выживаемость спермиев человека	22
БРАЖНИКОВ А. М., ОСИПОВ С. Н., КОМЯКОВ О. Г., ФИЛИППЕНКО О. А., ФАТЕЕВА Е. М., КОПЫЛОВА В. И. Холодильное консервирование материнского молока	28
АКСЕНОВ С. И., ГАВРИЛОВА И. И., ГАНГАРД М. Г., РЕВОКАТОВ О. П. Исследование взаимодействия диметилсульфоксида с макромолекулами белков методом спинного эха ЯМР	31
ИСМАИЛОВ И. А., ЭМИРБЕКОВ Э. З. Активность глутаминазы печени крыс и сусликов при гипотермии	34
ДРОКИН С. И., КОПЕЙКА Е. Ф. Влияние криопротекторов на липиды сперматозоидов карпа	36
КАРПЕНКО Л. Г. Влияние замораживания до -196°C и 10 %-ного диметилсульфоксида на связывание ^3H -норадреналина клетками щитовидной железы	38
УСПЕНСКАЯ З. И., НИКОЛАЕВА Г. В., ЛОЗИНА-ЛОЗИНСКИЙ Л. К. Действие глубокого охлаждения на пресноводные простейшие в активном состоянии в присутствии криопротектора полиэтиленоксида	39
ТКАЧЕНКО С. И., ХАЙКИН Р. К., РЕЗНИКОВ В. И. Математическое моделирование системы автоматического управления процессом замораживания биообъектов	45

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

ГРИЩУК В. П., ЖЕГУНОВ Г. Ф. Поглощение кальция мембранами кардиомиоцитов гибернирующих животных	51
ВОИНОВА М. В. Температурная зависимость энергии образования поры в фосфолипидных мембранах	52

© Издательство «Наукова думка», «Криобиология», 1985

This one



78SK-C3A-LS85

и авторским правом

ЧАДАЕВ В. Е., КРАМАР М. И., ЧУБ Н. Н. Оценка гормональной активности аллотрансплантата овариальной ткани, хранившейся при низких температурах, по данным кольпоцитологического анализа	53
Рефераты	53

CONTENTS

VOLKOV V. Ya., SAKHAROV B. V., VOLKOVA L. A. Radiospectroscopy methods in cryobiology	3
YURCHENKO T. N. Adaptive and destructive changes in biological systems exposed to low temperatures and cryoprotectants	10
FILEV L. V., DYGIN V. P., KHOLODNY A. Ya., PETRENKO G. I. The effect of cryoprotectants on the colony formation ability of human bone marrow granulomonopoietic cell precursors prior to freezing	14
STABROVSKY E. M. The role of hypothalamus dopaminergic and noradrenergic terminals in the regulation of function of endocrine glands subjected to cold	17
PARASHCHUK Yu. S., GRISHCHENKO V. I., KALUGIN Yu. V., CHERNYSH E. N. The effect of different regimes of cryopreservation on survival of human spermatozoa	22
BRAZHNIKOV A. M., OSIPOV S. N., KOMYAKOV O. G., FILIPENKO O. A., FATEYEVA E. M., KOPYLOVA V. I. Freeze — preservation of mother milk	28
AKSENOV S. I., GAVRILOVA I. I., GANGARD M. G., REVOKATOV O. P. Investigation of the interaction between dimethylsulfoxide and protein macromolecules using a method of NMR spin echo	31
ISMAILOV I. A., EMIRBEKOV E. Z. Hepatic glutaminase activity of rats and ground squirrels under hypothermia	34
DROKIN S. I., KOPEYKA E. F. The effect of cryoprotectants on lipids of carp spermatozoa	36
KARPENKO L. G. The effect of freezing to -196°C and 10 % dimethylsulfoxide on binding of ^3H -noradrenaline by thyroid gland cells	38
USPENSKAYA Z. I., NIKOLAYEVA G. V., LOZINA-LOZINSKY L. K. The effect of deep cooling with cryoprotectant polyethylene oxide on active freshwater protozoa	39
TKACHENKO S. I., KHAIKIN R. K., REZNIKOV V. I. Mathematic modelling of automatic control system to monitor the process of freezing biological systems. .	45

SHORT COMMUNICATIONS

GRISHCHUK V. P., ZHEGUNOV G. F. Calcium uptake by cardiomyocyte membranes of hibernating animals	51
VOINOVA M. V. Temperature dependence of the pore formation energy in phospholipid membranes	52
CHADAYEV V. E., KRAMAR M. I., CHUB N. N. Estimation of the hormone activity of freeze-preserved ovarian allotransplantant using colpocytogram analysis .	53
Abstracts	53

Адрес редакции:
310015, Харьков, 15
ул. Переяславская, 23
тел. 72-10-39

Научные редакторы А. С. Снурников, В. А. Чуйко
Ответственный секретарь редакции Ф. А. Приходько
Редактор Л. А. Рябинина
Технический редактор В. Н. Волкова

Сдано в набор 16.08.85 г. Подписано в печать 10.10.85 г. БЦ 17069.
Формат 70×108/16. Уч.-изд. л. 5,53. Усл. краскоот. 5,60.
Усл. печ. л. 4,90. Тираж 1000 экз. Заказ № 5-1358. Цена 65 к.

Отпечатано с матриц Харьковской книжной фабрики им. М. В. Фрунзе
в Харьковской городской типографии № 16
310003, Харьков, Университетская, 16, Зак. 1491

В. Я. Волков, Б. В. Сахаров, Л. А. Волкова

РАДИОСПЕКТРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В КРИОБИОЛОГИИ

Традиционный подход к исследованию реакции биологических систем на замораживание заключается в том, что объект изучения охлаждается до необходимой температуры, выдерживается определенное время, отогревается и анализируется в обычных условиях. Для этого успешно используются различные методы исследования: физические, химические, биологические и другие. Недостатком такого подхода является то, что изучаемый объект подвергается практически неконтролируемым воздействиям на стадиях замораживания и отогрева, что затрудняет интерпретацию получаемых результатов.

Радиоспектроскопические методы (ЯМР и ЭПР) позволяют исследовать структуру, фазовое состояние и молекулярную динамику образцов непосредственно в зоне отрицательных температур. Это обусловлено тем, что замороженные биоматериалы «прозрачны» для диапазона электромагнитных волн ($10^{+2} \div 10^{-3}$ м), в котором работают радиоспектрометры, и дает принципиально новые возможности для раскрытия природы и механизма криоповреждений.

Определение количества и состояния «незамерзающей» воды

Основные повреждающие воздействия на клетку при замораживании возникают в связи с понижением температуры и фазовым переходом воды в лед. В зависимости от скоростей замораживания-отогрева и глубины охлаждения на первый план, поочередно или в комплексе, выступают следующие факторы: формирование кристаллов вне- и внутриклеточного льда, возрастание концентрации растворенных веществ, ионной силы и осмотического давления в жидких микрофазах, нарушение структуры биополимеров и надмолекулярных образований клетки в результате изменения взаимосвязей с молекулами воды и растворенных соединений и т. д. [2,8].

Однако конкретные механизмы влияния этих факторов и их вклады в повреждение клеточных структур и гибель клетки остаются неясными из-за отсутствия надежной количественной информации о физико-химических и биологических явлениях, протекающих в зоне низких температур. Существенные результаты в этом направлении могут быть получены при исследовании содержания и свойств «незамерзающей» фракции воды радиоспектроскопическими методами (ЯМР и ЭПР), которые способны отличать «жидкую воду» от фазы льда в результате их высокой чувствительности к подвижности наблюдаемых магнитных моментов (протонов воды — ЯМР, растворенных парамагнитных ионов — ЭПР). Тем не менее в замороженных растворах биополимеров, клеточных суспензиях и тканях регистрируется довольно узкий сигнал ЯМР-протонов (10^2 — 10^3 Гц) вплоть до очень низких температур (-70°C) [6, 7], который принадлежит протонам молекул воды, поскольку он исчезает в тяжелой воде D_2O [6]. Установлено, что количество незамерзшей воды при фиксированной температуре (-35°C), определяемое по площади сигнала поглощения, прямо пропорционально концентрации макромолекул, а ширина линии поглощения больше, чем для переохлажденной воды при той же температуре. Эти данные свидетельствуют о том, что незамерзающая вода находится в непосредственном контакте с биополимерами и менее подвижна, чем фракция чистой воды. Коли-

чество «незамерзшей воды» хорошо согласуется с количеством «связанной воды», определяемой другими методами при положительных температурах, по крайней мере, для растворов белков [6, 17].

Ширина сигнала незамерзающей воды увеличивается при понижении температуры с аррениусовской энергией активации от 4 до 5 ккал/моль, что соответствует энергии разрыва одной водородной связи (активационный барьер во льду — 12 ккал/моль). Было обнаружено, что водный сигнал зависит от природы биополимера и чувствителен к изменению конформации макромолекул. В [7] было показано, что при $T = 200\text{—}260\text{ K}$ отношение количества подвижных молекул воды в замороженном растворе сывороточного альбумина человека к той же величине в образце гидрофильного аэросила равно отношению числа полярных групп на единицу поверхности молекул белка и частиц аэросила. Как и следовало ожидать, общее количество незамерзшей воды в кристаллах α -химотрипсина было меньшим, чем в замороженных растворах этого белка, по-видимому, вследствие уменьшения площади контакта глобул с водой при образовании кристаллической решетки [16]. В наших опытах по замораживанию полностью насыщенных водой силикагелей с известными геометрическими характеристиками [10] содержание незамерзшей фракции изменялось строго пропорционально удельной поверхности образцов, поверхность пор которых выстлана гидроксильными группами. В суспензиях частиц гидрофобного фторопласта узкий сигнал ЯМР не наблюдается уже при температурах ниже -13°C [7]. Это говорит об отсутствии связанной воды у поверхности этого полимера. Сигнал, наблюдаемый в интервале температур от 0 до -13°C обусловлен, вероятно, пленкой «жидкой воды», существующей на поверхности кристаллов льда. В [18] наблюдалось уменьшение ширины сигнала протонов воды при повреждении ДНК γ -облучением ($T = -80^\circ\text{C}$). При исследовании фосфолипидных дисперсий было установлено [22], что их гидратация в противоположность белкам зависит от температуры и уменьшается в 2,5 раза при понижении температуры от -7°C до -35°C . Внедрение холестерина приводило к изменению упаковки фосфолипидов таким образом, что число молекул воды у полярных групп и их подвижность увеличивались. Эти наблюдения имеют чрезвычайно большое значение для понимания явлений, протекающих в зоне низких температур и, в особенности, для выявления механизма «дегидратационного повреждения» клеток при замораживании, широко обсуждаемого в последнее время [8, 20].

Предположение о том, что повреждение и гибель клеток при замораживании происходит аналогично их повреждению и гибели при высушивании, ошибочно, хотя в обоих случаях основная масса воды отделяется от биоструктур клетки, а вблизи их поверхностей наблюдается увеличение концентрации солей и других растворенных веществ [8]. Дестабилизация бислойной структуры мембран, нарушение четвертичной структуры отдельных белков и ферментных комплексов является достаточно очевидным следствием ослабления гидрофобных взаимодействий при высушивании живых систем до низких влажностей. При замораживании перестройка гидрофобных взаимодействий происходит в присутствии фазы льда, гидрофильная поверхность которого может существенно изменить механизмы повреждения. В связи с этим представляет интерес не только количество незамерзшей воды, но и ее структура, и молекулярно-динамические характеристики. Однако выявление особенностей подвижной фракции — задача не простая. Незамерзающая вода находится под влиянием сразу двух поверхностей: биополимера и льда. Кроме того, в ней сконцентрировано большое количество малых молекул и ионов, вытесненных из фазы льда. Это в значительной мере затрудняет интерпретацию результатов и описание свойств «жидкой» водной фракции.

Наибольший интерес представляют, по-видимому, следующие вопросы: является ли незамерзшая вода термодинамически однородной фазой или делится на фракции, отличающиеся состояниями? существует ли пленка жидкой воды вблизи всей поверхности биополимеров клетки или существуют

«бреши», где лед непосредственно контактирует с биоструктурами? если да, то при каких температурах эти бреши появляются? сообщаются ли жидкие микрофазы разных клеточных структур между собой? при каких условиях число и прочность водородных связей в пленке «жидкой воды» уменьшается настолько, что влиянием гидрофобных сил на стабилизацию биоструктур можно пренебречь? в растворенном или «высоленном» состоянии находятся вещества, вытесненные в «жидкую» фазу? как влияет утрата пригидратной оболочки на характер взаимодействия с реакционно-способными группами на поверхности биополимеров?

Представление о динамике молекул воды в незамерзшей фазе можно составить на основе измерения времен ядерной магнитной релаксации T_1 , T_2 протонов воды и их температурных или частотных зависимостей. Согласно теории ЯМР-релаксации для молекул воды, сорбированных на поверхности, при изменении температуры образца (или частоты резонанса — ω) T_1 проходит через глубокий минимум при $\omega\tau_c = 0,616$, где τ_c — время корреляции для воды на поверхности биополимера. Отношение T_1/T_2 в точке минимума должно составлять около 1,6 [20]. Однако на практике экспериментальные данные, как правило, не совпадают с полученными теоретически. Обычно минимум на зависимости T_1 от обратной температуры значительно шире, а отношение T_1/T_2 намного больше, чем можно ожидать исходя из теории. Это несоответствие объясняют обычно наличием двух (или более) типов мест связывания молекул воды на поверхности, обладающих различными энергетическими характеристиками, либо считают, что существует целый набор состояний, который определяет существование непрерывного распределения молекул по временам корреляции. Однако такое представление о гетерогенности состояний не согласуется с результатами измерения частотных зависимостей T_1 и T_2 при фиксированной температуре (дисперсии времен релаксации методом ЯМР-Д). Автор работы [5], используя методы ЯМР—Д для исследования воды в растворах белков, не обнаружил признаков существования особых центров связывания, обеспечивающих времена корреляции, большие чем 10^{-9} с. Это наблюдение находится в соответствии с результатами диэлектрических и калориметрических исследований, из которых следует, что незамерзшая вода на поверхности белков термодинамически ведет себя как единая фаза и ее свойства близки к свойствам переохлажденной жидкости при тех же температурах [5, 13]. Однако этот вывод относится только к очищенным белкам, растворенным в бессолевой среде. Сведений относительно свойств незамерзшей воды вблизи поверхностей других биополимеров, а тем более клеточных структур и целых клеток практически нет.

Из вывода о термодинамической однородности, очевидно, еще не следует заключение о структурной сплошности пленки «жидкой воды». Специальных опытов для выяснения этого обстоятельства, насколько нам известно, не ставилось, однако некоторые выводы можно сделать и из имеющихся результатов. Наблюдаемое несоответствие между экспериментальными и теоретическими данными (широкий минимум T_1 , большое отношение T_1/T_2) устраняется, если предположить, что молекулы воды слабо взаимодействуют между собой и движутся с существенно разными скоростями. Однако возможен и другой путь решения этого вопроса. Достаточно предположить, что молекулы воды объединяются в кластеры и движутся согласованно. Поскольку кластеры могут состоять из разного числа молекул, такое предположение объясняет как широкий спектр τ_c , так и анизотропный характер движений молекул и не противоречит термодинамическому описанию незамерзшей фазы [13]. Из этого следует важный вывод, что молекулы незамерзшей воды на достаточно большое время образуют сплошные сетки водородных связей и, по-видимому, могут обуславливать существование гидрофобных взаимодействий вблизи достаточно больших участков поверхности биополимеров.

Растворенные вещества, несомненно, оказывают существенное влияние на свойства «незамерзшей» воды. В [24] приведены результаты изучения

дегидратации ионов щелочных металлов (Li, Na, K, Rb, Cs) и хлора при медленном замораживании методом ЯМР-релаксации (использовались одномолярные растворы хлоридов). Сигнал подвижных протонов в этих опытах монотонно уменьшался при понижении температуры, но не исчезал, как можно было бы ожидать, при затвердевании систем в точках эвтектики. В растворах NaCl этот сигнал наблюдался вплоть до температуры -33°C ($T_{\text{эвт}} = -20,7^{\circ}\text{C}$), для LiCl — -70°C ($T_{\text{эвт}} = -20,5^{\circ}\text{C}$ для LiCl · 3H₂O и $-65,6^{\circ}\text{C}$ для LiCl · 5H₂O). При температурах от 0 до -10°C времена спин-решеточной (T_1) и спин-спиновой релаксации (T_2) были двухкомпонентными, при более низких температурах наблюдалась однофазная релаксация. Анализ этих результатов позволяет прийти к выводу, что при понижении температуры до точки эвтектики вымерзает в основном свободная вода и гидратная вода аниона хлора, который теряет свою гидратную оболочку вблизи -10°C . Катионы Na и Li имеют двухслойную гидратную оболочку, верхний слой которой теряется (вмерзает в структуру льда), по-видимому, одновременно с гидратной водой хлора. Сигнал, наблюдаемый ниже точки эвтектики, очевидно, обусловлен протонами воды первой гидратационной сферы катионов. По-видимому, молекулы этой воды в значительной мере утратили трансляционную подвижность, но сохранили вращательную, что и обуславливает относительно большие значения T_1 и T_2 ($T_1 > 100$ мс, $T_2 > 20$ мс) и возможность наблюдений этой фазы методом ЯМР. В наших опытах, проведенных с использованием растворов хлоридов Li, Na, K и Ca в физиологической концентрации (≈ 150 мМ), были подтверждены основные результаты работы [24]. Кроме того, чтобы проследить за поведением катионов в этих системах, были исследованы ЭПР-спектры иона Mn^{++} , введенного в виде MnCl_2 (2 мМ) в эти растворы. Во всех образцах наблюдался шестикомпонентный спектр ЭПР, характерный для аквакомплексов ионов Mn^{++} [4], интенсивность и ширина которого меняются при понижении температуры. Уширение спектров Mn^{++} в жидких системах однозначно связывается с усилением диполь-дипольного взаимодействия между парамагнитными ионами при их сближении, т. е. с увеличением концентрации. Учитывая это обстоятельство, можно видеть, что полученные результаты хорошо коррелируют с данными метода ЯМР. При понижении температуры свободная вода вымерзает, концентрация ионов в жидкой фазе монотонно возрастает. Резкое уширение спектра, наблюдаемое для хлоридов натрия и калия, объясняется образованием кристаллогидратов типа NaCl · 2H₂O и (или) утратой этими катионами своих гидратных оболочек и концентрированием «голых» (дегидратированных) ионов. Шестикомпонентная структура спектра при этом исчезает. Катионы Li^+ и Ca^{++} сохраняют свои гидратные оболочки вплоть до -70°C и ниже и, по-видимому, вмерзают в структуру льда путем «застекловывания», не испытывая эффекта концентрирования. Об этом свидетельствуют шестикомпонентный характер спектра ЭПР ионов Mn^{++} и его небольшая ширина. Необходимо отметить, что ионы K^+ и Na^+ способны восстанавливать свою гидратную оболочку только после отогрева выше точки эвтектики, хотя они теряют ее при значительно более низких температурах.

Эти данные наглядно демонстрируют, насколько детальную информацию можно получить о явлениях, протекающих в зоне низких температур при комплексном использовании радиоспектроскопических методов. К сожалению, в литературе практически нет сведений о замораживании солей в присутствии биополимеров и целых клеток. Анализ результатов, полученных нами при замораживании модельных мембран и целых клеток (эритроцитов) [3, 11, 12, 15], суспендированных в 150 мМ растворах KCl и NaCl, свидетельствует о том, что в первом приближении гидратные оболочки белков (гемоглобина), липидных бислоев и ионов вносят аддитивный вклад в количество «незамерзшей» воды. Можно думать, что в медленно замороженных образцах внеклеточная незамерзающая вода при умеренных температурах (выше $T_{\text{эвт}}$) образует единый континуум, который через водо-

проницаемость клеточных мембран связан с жидкими внутриклеточными микрофазами. Наблюдаемая корреляция между количеством незамерзшей воды и повреждением плазматических мембран [3, 15, 19] свидетельствует о важной роли этой водной фракции в поддержании структуры клеточных оболочек. Механизм этого влияния остается до конца неясным, но, по-видимому, может быть выявлен при детальном исследовании тройных (липидный бислой, соль, вода; белок, соль, вода) и более сложных модельных систем.

Исследование водопроницаемости и повреждения клеточных оболочек при замораживании-отогреве

На выживаемость клеток при криоконсервировании сильно влияют скорости замораживания-отогрева. Наличие оптимальных скоростей, индивидуальных для различных биологических объектов, в литературе связывается с различной проницаемостью оболочек клеток для воды. Способность пропускать воду определяет условия формирования внутриклеточного льда (повреждающее действие которого общепризнано), а также возможность осмотического лизиса при отогреве [8, 9]. Однако прямых измерений водопроницаемости клеточных мембран и осмотических явлений при отрицательных температурах в присутствии фазы льда не проводилось. Радиоспектроскопические методы дают такую возможность.

Один из подходов основан на методике измерения диффузионной водной проницаемости оболочек клеток [21]. Для этого во внеклеточную среду добавляют небольшое количество парамагнитной соли ($MnCl_2$) (так называемый парамагнитный допинг). Если парамагнитные катионы не проникают через мембрану клетки, то под их влиянием изменяются ЯМР-релаксационные характеристики в основном внешней воды. T_1 и T_2 протонов внутриклеточной воды изменяются только в той мере, в какой они обмениваются с протонами внешней воды. Релаксационные кривые для таких систем носят явно выраженный двухкомпонентный характер. Их анализ позволяет определить количества внутри- и внеклеточной воды (P_a , P_b), время обмена молекулами между ними (τ_a) и рассчитать водопроницаемость мембран (P).

При медленном замораживании эритроцитов человека в плазме крови с добавкой 5 мМ $MnCl_2$ было обнаружено, что мембраны этих клеток сохраняют барьерные свойства по отношению к ионам только до температур $-5 \div -7^\circ C$ [11]. При более глубоком охлаждении наступает повреждение мембран, на что указывает исчезновение двухкомпонентности процесса спин-спиновой релаксации. Чем это было вызвано? Поскольку образование льда во внеклеточной воде инициировали уже при $-1^\circ C$, то при дальнейшем охлаждении наблюдались эффекты, связанные с вытеснением растворенных соединений в жидкую фазу, которые можно было измерить количественно по уменьшению времен релаксации и амплитуд сигналов вне- и внутриклеточной воды. Объем клеток уменьшался при замораживании обратно пропорционально возрастанию осмотического давления в жидкой фазе, которое также определялось по результатам ЯМР измерений. Осмотическое сжатие происходило без повреждения до тех пор, пока из клеток не выходило $\sim 75\%$ воды. Водопроницаемость мембран при этом оставалась на исходном уровне при экстраполяции на нулевое содержание ионов Mn^{++} . Подчеркнем, что здесь речь идет о проницаемости мембран, обеспечивающей транспортные процессы клетки в норме, а не о проницаемости, которую наблюдают при повреждении и о которой судят по выбросу маркеров [3]. При дальнейшем возрастании осмотического давления наблюдался разрыв мембран эритроцитов, ионы марганца проникали внутрь клеток и выравнивали времена релаксации. При отогреве значительная часть поврежденных мембран восстанавливала барьерные свойства и нормальную водопроницаемость. Эти данные согласуются с результатами более ранних опытов, выполненных на фосфолипидных везикулах и клетках *E. coli* [12].

Некоторым недостатком используемого метода с парамагнитным допингом (ЯМР-ПД) является отмечаемое в ряде работ, в том числе и в [11], влияние двухвалентных катионов марганца на водопроницаемость мембран при их концентрации в среде, большей чем 5 мМ. Однако, с другой стороны, это наблюдение дает подход к исследованию влияния двухвалентных катионов (в т. ч. и не парамагнитных) на свойства мембран, в частности, в результате возрастания их концентрации при замораживании.

Полностью избежать введения посторонних примесей в исследуемую систему при изучении диффузии молекул воды через мембраны можно с помощью метода импульсного градиента магнитного поля (ЯМР-ИГ), широко используемого для этих целей при положительных температурах [14]. Этот метод позволяет контролировать пространственное перемещение молекул только путем наблюдения за магнитными моментами ядер с помощью радиотехнических приемов. Однако в низкотемпературной области, насколько нам известно, этот метод применялся только для исследования поступательной самодиффузии молекул незамерзающей воды в клетках дрожжей, но не для измерения проницаемости их мембран [1]. Эти результаты указывают на существование трансляционно высокоподвижной воды в клетках вплоть до -30°C и в целом согласуются с выводами на этот счет, сделанными в начале обзора.

Перспективы применения радиоспектроскопических методов в криобиологии

Методы магнитного резонанса (ЯМР, ЭПР) все шире применяются в последнее время не только для исследования изолированных биомолекул и их комплексов, но и структурной организации и механизмов функционирования интактных живых систем. Известны примеры использования методов ЭПР-спектроскопии спиновых зондов и спиновых меток (ЭПР-СЗ, ЭПР-СМ), импульсных методов ЯМР (ЯМР-И) и ЯМР-высокого разрешения (ЯМР-ВР) на ядрах ^{31}P , ^{13}C , ^2H , ^1H для исследования структуры и молекулярной динамики липидов и белков в мембранах, работы ферментов дыхательной цепи, энергетического метаболизма клеток и решения многих других проблем.

В таблице представлены наиболее перспективные, на наш взгляд, направления применения методов магнитной радиоспектроскопии в криобиологии. Случаи, когда методы ЯМР и ЭПР спектроскопии уже использовались с целью, близкой к указанной в соответствующей графе, снабжены ссылками.

1. Анисимов А. В., Мифтахутдинова Ф. Г., Евarestов А. С. Исследование поступательной диффузии незамерзающей воды дрожжевых клеток импульсным методом ЯМР. — В кн.: Водобмен и физиологические процессы растений. Казань, КГУ, 1981, с. 85—90.
2. Белоус А. М., Бондаренко В. А., Бондаренко Т. П. Молекулярные механизмы криоповреждений биомембран. В — кн.: Итоги науки и техники. — ВИНТИ АН СССР. Сер. Биофизика, 1978, 9, с. 80—113.
3. Гулевский А. К., Сахаров Б. В., Волков В. Я. Низкотемпературное нарушение проницаемости плазматических мембран, связанное с дегидратацией. — ДАН СССР, Биофизика, 1982, 263, т. 5, с. 1250—1254.
4. Гумеров Ф. М. Парамагнитная релаксация и спектры ЭПР аквакомплексов марганца (II) и хрома (III) в растворах: Автореф. дис... канд. физ.— мат. наук. — Казань, 1980. — 19 с.
5. Кениг С. Динамика взаимодействий в системе вода — белок. Результаты, полученные из измерений дисперсии ядерной магнитной релаксации. В кн.: Вода в полимерах. — М.: Мир, 1984, с. 159—182.
6. Кунтц И. Д. Физические свойства воды, связанной с биомолекулами. — В кн.: Вода в пищевых продуктах. — М.: Пищевая промышленность, 1980, с. 94—109.
7. Курзаев А. Б., Квливидзе В. И., Киселев В. Ф. Специфика фазового перехода воды на поверхности биологических и неорганических дисперсных материалов при низких температурах. — В кн.: Связанная вода в дисперсных системах, Ленинград, ЛГУ, 1977, 4, с. 156—166.
8. Лозина-Лозинский Л. К. Очерки по криобиологии. — Ленинград: Наука, 1872. — 288 с.

Т а б л и ц а. Радиоспектроскопические методы в криобиологии

№№ п/п	Стадии процесса и существенные факторы, влияющие на выживаемость клеток	Перспективные методы исследования
1.	Подготовка суспензии к замораживанию	
1.1.	Возраст (фаза роста) и физиологическое состояние клеток	^{31}P , ^{13}C -ЯМР-ВР [23] T_1 , T_2 -ЯМР-И [18]
1.2.	Концентрация клеток	ЯМР-ПД [11]
1.3.	Температура и время хранения до смешивания с защитной средой (степень истощения, энергетический потенциал)	^{31}P -ЯМР-ВР [23]
1.4.	Состав защитной среды, токсичность компонентов	^1H , ^2H , ^{13}C , ^{31}P -ЯМР-ВР
1.5.	Осмотическое давление, активность воды, pH, ионная сила	ЯМР-ПД [21] T_1 , T_2 -ЯМР-И [18] ^{31}P -ЯМР-ВР ЭПР-СЗ [12]
1.6.	Проницаемость клеточных оболочек для воды, ионов, компонентов защитной среды	ЯМР-ПД [21] ЯМР-ИГ [14] ^1H , ^{13}C , ^{31}P -ЯМР-ВР
1.7.	Вовлечение компонентов защитной среды в метаболизм и катаболизм клетки	^1H , ^{13}C , ^{31}P -ЯМР-ВР
2.	Замораживание-отогрев	
2.1.	Температура фазового перехода вода-лед, точки эвтектики, температура стеклования	^1H -ЯМР [7] T_1 , T_2 -ЯМР-И [3, 12, 16, 18, 24] ЯМР-ИГ [1] ЭПР-СЗ, ЭПР-СМ [4]
2.2.	Температура фазового перехода липидов в мембранах	T_1 , T_2 , Д-ЯМР-И ЭПР-СЗ, ЭПР-СМ
2.3.	Водопроницаемость мембран	ЯМР-ПД [11] ЯМР-ИГ
2.4.	Гидратационные свойства компонентов защитной среды, ионов, клеточных структур	^1H -ЯМР [8]; T_1 , T_2 -ЯМР-И [18] ЯМР-Д [5]; ЭПР-СЗ, ЭПР-СМ [4]
2.5.	Изменение растворимости, pH, ионной силы, осмотического давления в жидких микрофазах, сообщаемость жидких микрофаз между собой	ЭПР-СЗ, ЭПР-СМ ^{31}P -ЯМР-ВР, ЯМР-ПД [11]
2.6.	Наличие и природа «минимального объема» клеток	ЯМР-ПД [11], ЯМР-ИГ
2.7.	Химические и биохимические превращения при замораживании-отогреве	^1H , ^{13}C , ^{31}P -ЯМР ЭПР-СЗ, ЭПР-СМ

- Пушкар Н. С., Белоус А. М., Цветков Ц. Д. Теория и практика криогенного и сублимационного консервирования. — Киев; Наук. думка, 1984. — 261 с.
- Сахаров Б. В., Исангалин Ф. Ш., Волков В. Я. Исследование релаксационных характеристик воды в силикагелях импульсным методом ЯМР. — В кн.: Современные достижения ЯМР-спектроскопии высокого разрешения: Ташкент, 25—27 сент. 1979 г. Тез. докл. Ташкент: ФАН, 1979, с. 23.
- Сахаров Б. В., Волков В. Я. Проницаемость и повреждение мембран эритроцитов при температурах от -1° до -9°C по данным метода ЯМР-релаксации. — Биофизика, 1984, № 2, с. 264—267.
- Скрыпин В. И., Волкова Л. А., Рыжов В. Г., Сахаров Б. В., Волков В. Я. Исследование повреждений модельных и биологических мембран при замораживании-оттаивании радиоспектроскопическими методами. — В кн.: Магнитный резонанс в биологии и медицине (Москва—Черноголовка, 19—22 марта 1981 г.) Тез. докл., М., ИХФ АН СССР, 1981, с. 69—71.
- Хеве Ч. Структура воды в полимерах. В кн.: Вода в полимерах. — М.: Мир, с. 137—149.
- Andrasko J. Water diffusion permeability of human erythrocytes studied by a pulsed NMR technique. — BBA, 1976, 428, p. 304—311.
- Gulevsky A. K., Sakharov B. V., Volkov V. Ya. Role of dehydration in changing the permeability of erythrocyte plasma membranes by freeze — thawing — . — BBA, 1983, 728, p. 371—376.
- Hsi E., Briant R. G. NMR relaxation studies of carbonic anhydrase derivatives in frozen solutions. — J. Phys. Chem., 1977, 81, N 5, p. 462—465.
- Kuntz J. D. Properties of protein — water systems at subzero temperatures. — In book: Proteins at low temperatures, 1979, p. 27—33.
- Mathur de Vre R. The NMR studies of water in biological systems. — Progr. Biophys Mollec. Biol., 1979, 35, p. 103—134.

19. Mazur P., Rall W. F., Rigoropoulos N. Relative contributions of the fractions of unfrozen water and of salt concentrations to the survival of slowly frozen Human erythrocytes. — *Biophys. J.*, 1981, 36, p. 653—675.
20. Reasing H. A. NMR relaxation of molecules adsorbed on surfaces. — *Adv. Mol. Relax. Processes*, 1967—68, 1, p. 109—154.
21. Stout D. G., Cotts R. M., Steponkus P. L. The diffusional water permeability of elodea leaf cells as measured by NMR. — *Can. J. Bot.*, 1977, 55, p. 1623—16—31.
22. Taylor R. P. NMR studies of amphiphile hydration. — *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1976, 173, p. 596—602.
23. Ugurbill K., Shulman R. B., Brown T. R. High resolution ^{31}P and ^{13}C NMR studies of *E. coli* cells in vivo. — *Bull. Appl. Magn. Reson.*, 1980, p. 537—589.
24. Venable C. W., Miller D. M. Pulsed NMR study of aqueous solutions of alkali — metal cations. — *Physiol. Chem. Physics*, 1980, 12, p. 315—322.

ВНИИ прикладной микробиологии, г. Оболенск,
Моск. обл.

Поступила 10.10.84.

УДК 57.043

Т. Н. Юрченко

АДАПТАЦИОННЫЕ И ДЕСТРУКТИВНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ ПОСЛЕ ДЕЙСТВИЯ ОХЛАЖДЕНИЯ И КРИОПРОТЕКТОРОВ

Изучению проблемы адаптации и гомеостаза посвящено большое количество исследований, обобщенных в широко известных монографиях [2, 3, 7], из которых следует, что «явление гомеостаза представляет собой эволюционно выработавшееся наследственно закрепленное адаптационное свойство организма» [3]. Реакции, обеспечивающие гомеостаз, направлены на поддержание стационарного состояния биологической системы, на создание оптимальных условий для ограничения действия раздражителей различного рода. Включающаяся при этом автоматическая саморегуляция ограничивает возникающие в организме отклонения. Такая саморегуляция может осуществляться на определенных иерархических уровнях — высшем, среднем и низшем [1], при этом после нее обладает относительной автономностью управления, что дало основание к введению такого понятия, как внутриклеточный гомеостаз, подразумевающий динамическую устойчивость ядерно-цитоплазматических отношений в клетке [7].

Изложенное явилось побудительным мотивом проведения исследований по изучению реакции биологических объектов, находящихся в «искретном» состоянии (культивируемые клетки) и в составе плотных тканей, на действие гипотермии, которая предшествует низкотемпературной консервации или является самостоятельным способом хранения клеток и тканей. Выделенные из организма или посмертно изъятые ткани в течение определенного времени имеют еще достаточно высокий уровень жизнеспособности и, очевидно, способны к осуществлению гомеостатических процессов, направленных на обеспечение внутриклеточных и внутриорганOIDных компенсаторно-приспособительных реакций.

В качестве объекта исследования использованы роговица и печень экспериментальных животных, которые находились в условиях гипотермии ($+4^\circ\text{C}$) различное время. В сроки 1, 2, 4 и 6 суток роговица и 3, 6, 15, 24 часа печень подвергались морфологическому и цитоэнзимологическому анализу. Цитофотометрически определяли активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ, К.Ф.1.3.99.11), лактатдегидрогеназы (ЛДГ, К.Ф.1.11.27), цитоплазматической α -глицерофосфатдегидрогеназы (α -ГФДГ, К.Ф.1.1.2.8), малатдегидрогеназы (МДГ, К.Ф.1.1.1.37), а также коферментов НАД. H^2 и НАДФ. H^2 дегидрогеназ [5]. Клетки перевиваемой культуры (почка теленка), находящиеся в суспензии, также охлаждали до глубокой гипотермии и в последующем культивировали их по общепринятому методу.

Исследование динамики в активности ферментов роговицы при хранении (рис. 1) показало, что наиболее активна во всех слоях лактатдегидрогеназа. Особенно высок ее уровень в базальных клетках переднего эпителия, которые характеризуются выраженной пролиферативной активностью. В связи с этим существенно исследование влияния гипотермии на активно метаболизирующие клетки не только с точки зрения их дальнейшей функции в трансплантате, но и как биологической системы, потенциально подготовленной к пролиферации.

Полученные данные показывают, что через одни сутки происходит существенная активация фермента лактатдегидрогеназы, т. е. наблюдается интенсификация процесса гликолиза, увеличение его анаэробной фазы, что, согласно данным литературы, присуще и другим биологическим объектам, находящимся в гипоксическом состоянии. При этом максимально чувствительными оказались клетки герминативного слоя переднего эпителия и клетки заднего эпителия.

Направленность изменений активности α -ГФДГ и ЛДГ совпадает в клетках различного типа, лишь в стромальных элементах депрессия держится несколько дольше.

В качестве маркера состояния митохондрий нами был выбран фермент малатдегидрогеназа. Окисление малата НАД α -малатдегидрогеназой является завершающей реакцией цикла трикарбоновых кислот (цикла Кребса), который занимает центральное место во внутриклеточном обмене веществ. Процесс переноса атомов водорода и электронов сопровождается превращением потенциальной химической энергии в метаболическую. Как свидетельствуют полученные нами данные, такое усиленное превращение энергии происходит в течение первых суток нахождения ткани роговицы в гипотермических условиях консервации.

Было бы, очевидно, неправомерно производить оценку состояния митохондрий только по состоянию активности одного митохондриального фермента (малатдегидрогеназы). Отсюда возникла необходимость использования основного и дополнительного маркеров для избежания ошибок в трактовке полученных данных. И хотя понятия «основной» и «дополнительный» маркеры, на наш взгляд, являются в известной степени условными, принцип «дублирования», несомненно, повышает достоверность результатов. Учитывая, что НАД.Н²-дегидрогеназа связана с основными компонентами цикла Кребса, относительное изменение функционального состояния митохондрий может быть учтено с помощью реакции на этот фермент — суммарного показателя активности энзимов, использующих в качестве кофермента НАД.

Точно так же для характеристики процессов в эндоплазматической сети и цитоплазматическом матриксе рекомендуется дополнительное исследование НАДФ.Н²-дегидрогеназы, генерирующей системы дегидрогеназ. Очевидно, выявленные нами изменения ферментативной активности связаны с истощением запасов кофакторов и изменением содержания субстратов в раннем периоде гипоксии и повреждением апоферментов — в более позднем. Согласно полученным результатам можно считать, что в процессе переживания клетки роговицы проходят три периода: I-й период (до 2 суток) характеризуется высокой интенсивностью метаболических процессов, II-й период (от 2 до 4 суток) характеризуется депрессией обмена и в III-ем периоде (свыше 4 суток) наблюдается возрастание (или понижение) цито-

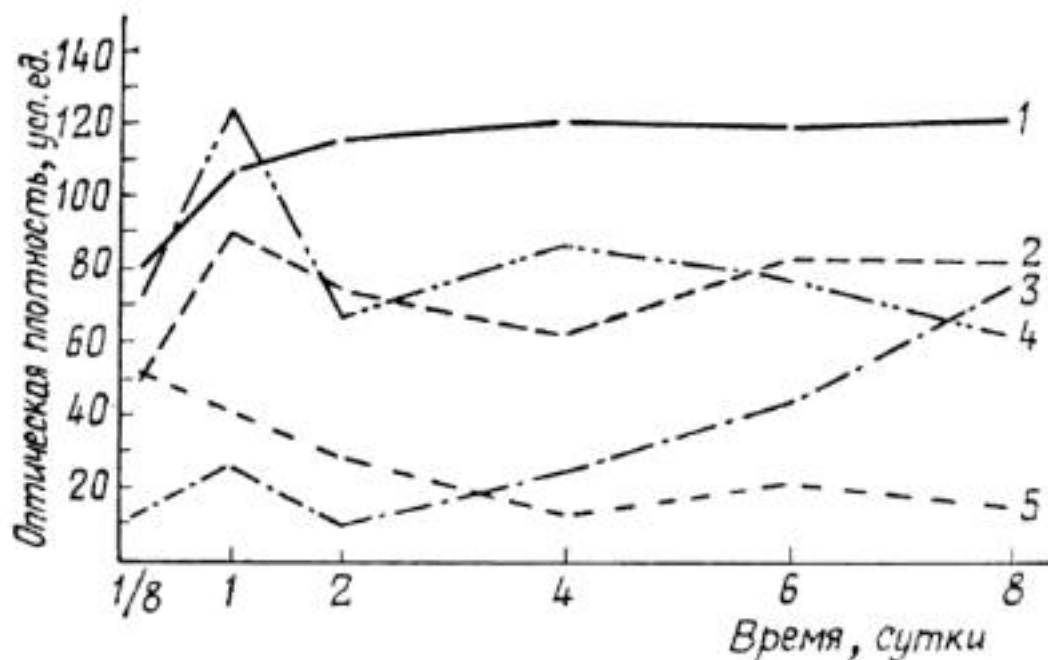


Рис 1. Динамика активности ЛДГ (1), МДГ (2), α -ГФДГ (3), НАД.Н²ДГ (4) и НАДФ.Н²ДГ (5) в клетках переднего эпителия роговицы.

энзимологических показателей, имеющее пассивный характер в связи с разрушением внутриклеточных структур и нерегулируемой реакцией с экзогенным субстратом. Повреждения, развивающиеся в I-ом периоде обратимы, во II-ом — частично обратимы и в III-ем периоде — полностью необратимы.

При исследовании ткани печени была обнаружена почти такая же закономерность в изменении активности некоторых ферментов. Особенно наглядно это проявлялось при определении активности СДГ и ЛДГ (рис. 2). Как видно из представленных графиков, после трех часов хранения происходило достоверное повышение уровня цитохимических реакций, за которыми следовало их снижение, при этом аналогичную зависимость мы наблюдали в гепатоцитах, располагающихся в центральной и периферической зонах печени. Исследование морфологии клеток показало присут-

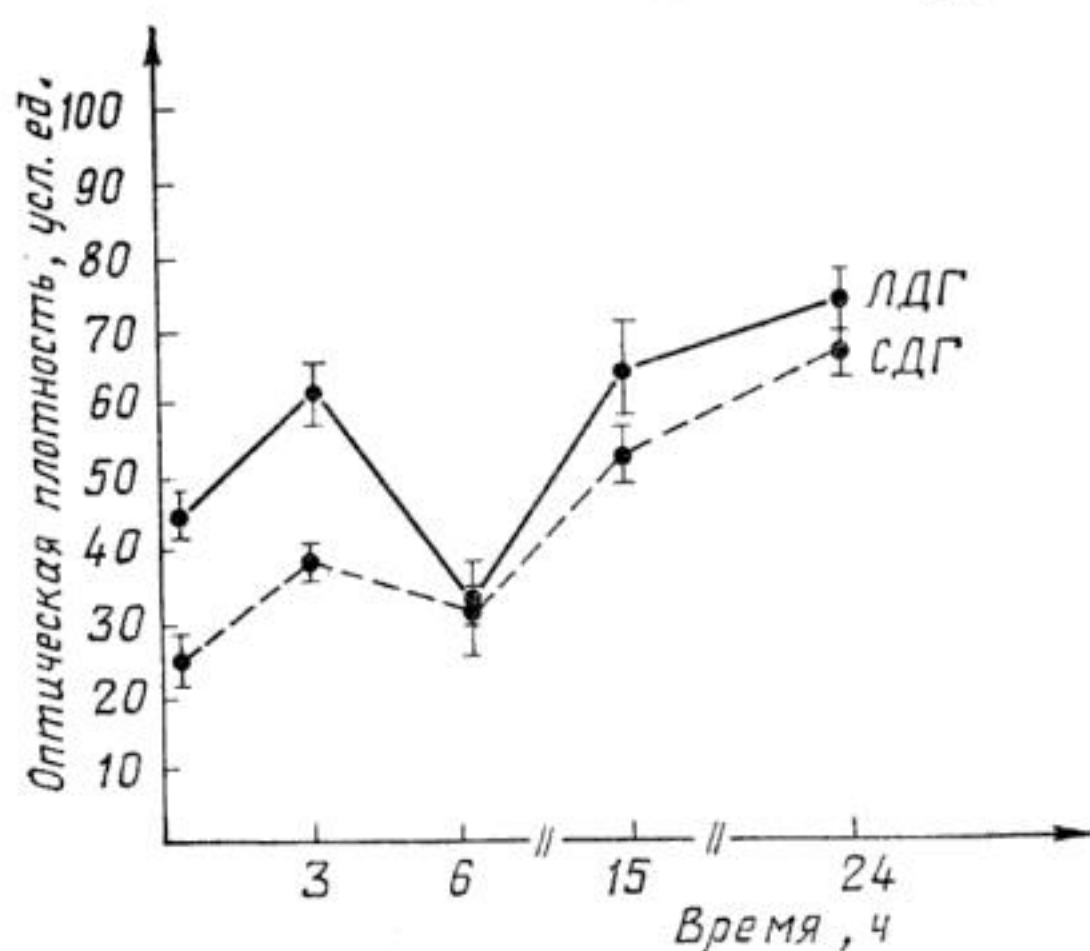


Рис. 2. Динамика активности ЛДГ и СДГ в гепатоцитах при гипотермическом хранении печени.

ствие небольшого количества гепатоцитов с набухшими и частично вакуолизированными ядрами, некоторым расширением цистерн эндоплазматической сети, нерезко выраженным отеком митохондрий и компактизацией и перераспределением хроматина.

Использование метода культивирования клеток позволило определить, каким образом один из основных показателей функционального состояния клеточной системы — пролиферативная активность — изменяется под влиянием гипотермического воздействия. Было обнаружено, что хранение клеток перевиваемой культуры при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ не вызывало в них летальных повреждений, а возвращение их в условия нормотермии ($+37^{\circ}\text{C}$) приводило к быстрому вступлению клеток в митотический цикл и заполнению подложки. При этом количество клеток в стадии метафазы в первые сутки роста после гипотермии было ниже, чем в контроле, однако ко вторым суткам роста их количество приближалось к контрольным значениям. Процент патологии деления в охлажденных образцах в первые сутки роста не отличался от контроля. Существенного изменения морфологии клеток после пребывания в гипотермическом состоянии не наблюдалось, и только 3—4-суточное воздействие приводило к неспецифическим структурным перестройкам в виде вакуолизации цитоплазмы, расширения перикарионного и межклеточного пространства, появления фибробластоподобных форм (рис. 3, 4).

Анализ литературы показывает, что ряд авторов обнаружили эффект повышения метаболизма в хранившихся тканях и более высокий трансплантационный эффект при их использовании [4, 10]. Это позволило им высказать предположение о том, что стремление к сокращению сроков гипотермического хранения не всегда оправдано. Так, функция легкого, изъятая через 2 мин после смерти животного, заметно снижена в сравнении с функцией легкого, находившегося более длительные сроки в трупке. Обращает на себя внимание «всплеск» функциональной активности в тканях изолированного легкого после 30 мин ишемии и его большая устойчивость к отеку после трансплантации, чем у ткани с меньшим сроком ишемии [4]. При изучении некоторых показателей энергетического обмена в трупных почках в течение различных сроков их гипотермического хранения было обнаружено повышение значений, характеризующих метаболическое состояние

ткани через 30 мин после забоя животного в сравнении с исходным состоянием [4]. О сохранении печенью жизнеспособности довольно длительное время после наступления смерти свидетельствуют данные [4]. Авторы допускают, что в течение 2 ч после забоя животного происходит не только завершение митозов, но и вступление в митоз готовых к делению гепатоцитов.

В дальнейшем приводятся результаты экспериментов, которые опровергают такое предположение, однако поскольку в других тканях — лимфатических узлах, эпидермисе уха, слизистой оболочке тонкого кишечника, кожном эпидермисе человека посмертная митотическая активность регистрировалась, то можно предположить, что в течение некоторого времени имеется своеобразный «блок» митотической активности, который в последующем и переходит в необратимые летальные изменения ткани. Даже

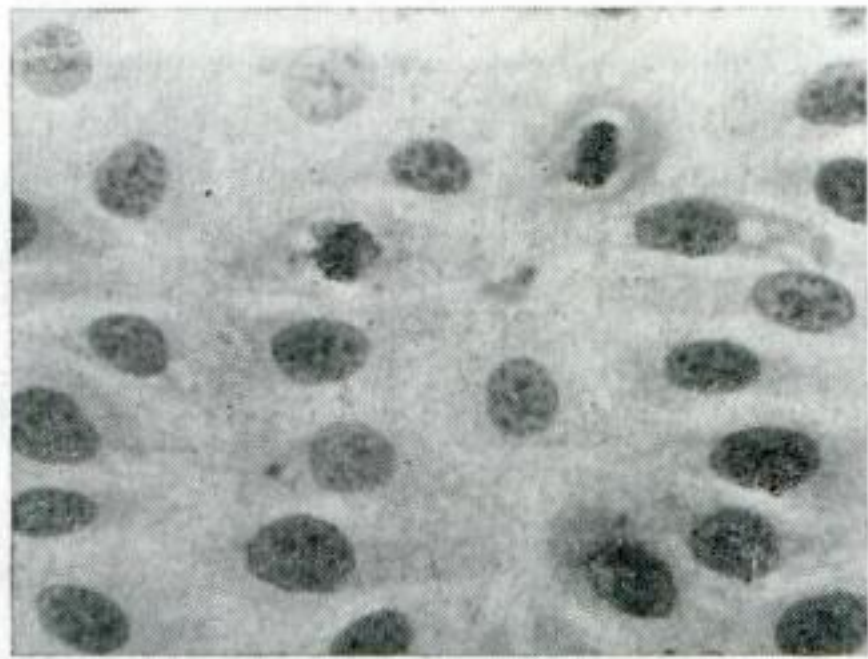


Рис. 3. Клетки перевиваемой культуры после действия гипотермии в течение двух суток (через 24 часа роста при температуре $+37^{\circ}\text{C}$). ОК.7, об. 40.

Рис. 4. Клетки перевиваемой культуры после действия гипотермии в течение четырех суток (через 24 часа роста при температуре $+37^{\circ}\text{C}$). ОК. 7, об. 40.

в отношении такого чувствительного к ишемии органа, как поджелудочная железа имеются наблюдения, свидетельствующие, что больший эффект после трансплантации был получен в случаях сохранения этого органа при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ от 24 до 48 часов [10].

Нельзя не учитывать и колоссальный опыт офтальмохирургов по трансплантации роговицы, хранившейся различное время при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ [9]. Высокие трансплантационные качества ткани роговицы, которая хранилась в этих условиях в течение суток, позволили В. П. Филатову выдвинуть гипотезу о накоплении в ней «биогенных стимуляторов».

Таким образом, можно отметить, что на примере некоторых органов и тканей был зарегистрирован эффект «накопления» в сохраняемых биологических системах каких-то веществ и изменения их структурно-функциональных свойств, обеспечивающих более высокий уровень приживания трансплантата. Процесс этот направлен на повышение адаптированности всей клеточной системы к действию неблагоприятного фактора (гипотермии) и, очевидно, может рассматриваться как проявление клеточной адаптации к стрессорному (холодовому) влиянию. В определенной степени трактовка данных, приведенных выше, имеет дискуссионный характер. Вопрос этот имеет не только терминологическое значение, так как признание факта адаптационного процесса в изолированных биологических объектах, в свою очередь, позволит считать возможным развитие явлений фенотипической адаптации и перекрестной устойчивости, что открывает новые перспективы в низкотемпературном консервировании ряда биологических объектов.

1. Брайнес С. Н., Свечинский В. Б. Элементы общей теории управления в организме. — Экспер. хир., 1963, № 5, с. 3—10.
2. Голдовский А. М. Основы учения о состояниях организма. — М.: Наука, 1977. — 371 с.

3. *Гомеостаз* / Под ред. П. Д. Горизонтова. — М.: Медицина, 1981. — 576 с.
4. *Лопухин Ю. М., Коган Э. М.* Критерии жизнеспособности органов и тканей перед трансплантацией. — М.: Медицина, 1975. — 278 с.
5. *Пирс Э.* Гистохимия. — М.: Изд-во иностр. лит., 1962. — 962 с.
6. *Пучковская Н. А.* Разработка метода кератопластики в институте имени академика В. П. Филатова. — В кн.: Тез. докл. международ. конф. по кератопластике и кератопротезированию. Одесса: Чорноморська комуна, 1978, с. 29—33.
7. *Саркисов Д. С.* Очерки по структурным основам гомеостаза. — М.: Медицина, 1977. — 351 с.
8. *Саркисов Д. С., Пальцин А. А., Втюрин Б. В.* Электронно-микроскопическая радиоавтография клетки. — М.: Медицина, 1980. — 264 с.
9. *Эшби У. Р.* Введение в кибернетику. М.: Изд-во иностр. лит., 1959. — 461 с.
10. *Toledo — Pereyra L. H., Chee M., Condie R. M. et al.* Forty — eight hours hypothermic storage of whole canine pancreas allografts. — *Cryobiology*, 1976, v. 16, n. 3, p. 221—228.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР, г. Харьков

Поступила 28.06.85.

УДК 57.043

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

ВЛИЯНИЕ КРИОПРОТЕКТОРОВ НА КОЛОНИЕОБРАЗУЮЩУЮ СПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ГРАНУЛОМОНОПОЭЗА КОСТНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА ДО ЗАМОРАЖИВАНИЯ

Криозащитные растворы являются необходимыми компонентами при криоконсервировании клеток костного мозга. Известно, что криопротекторы, входящие в состав защитных растворов, по принципу действия делятся на эндо- и экстрацеллюлярные. Для криоконсервирования миелоидной ткани в качестве криопротекторов широко применяют глицерин, диметилсульфоксид (ДМСО), поливинилпирролидон (ПВП) и полиэтиленоксид молекулярного веса 400 (ПЭО-400). Глицерин и ДМСО являются эндоцеллюлярными криопротекторами, ПВП — экстрацеллюлярным. ПЭО-400 частично проникает через клеточную мембрану, основная же его масса локализуется вне клетки [2, 3, 4, 8].

Существует точка зрения, что наиболее эффективными являются эндоцеллюлярные криопротекторы — ДМСО и глицерин. Однако эти вещества являются осмотически активными и требуют отмывания перед переливанием. Представляет интерес диметилацетамид (ДМАЦ), который, являясь эндоцеллюлярным криопротектором, не вызывает сколько-нибудь значительного осмотического воздействия на клетку, но сведения в литературе об использовании его для защиты клеток костного мозга при замораживании отсутствуют.

Нами изучалось влияние некоторых криопротекторов, не требующих отмывания (ПВП, ПЭО-400, ДМАЦ), на функциональную активность клеток-предшественников грануломонопоэза донорского костного мозга путем определения их кластеро-(КЛОС) и колониеобразующей (КОС) способности. С этой целью исследовался костный мозг двадцати доноров методом клонирования клеток-предшественников грануломонопоэза в двуслойной агаровой системе [1, 10] с некоторыми модификациями [5].

Всего проведено пять серий опытов. В первой, контрольной серии опытов, определялась колониеобразующая функция нативного костного мозга (20 образцов); во второй — проводилось изучение влияния консерванта ЦОЛИПК-3 на клетки-предшественники грануломонопоэза (9 образцов). В третьей, четвертой и пятой сериях изучалось влияние криопротекторов ПЭО-400, ПВП и ДМАЦ на клетки-предшественники грануломонопоэза (15, 13 и 13 образцов соответственно).

Контрольные образцы костного мозга (2 мл), полученные путем аспирации первых порций костного мозга из задних остей и крестцовоподвздошных сочленений доноров, помещались в стерильные силиконированные пробирки, содержащие 2 мл среды 199 и 100 ЕД гепарина. Из общей дозы костномозговой взвеси в растворе ЦОЛИПК-3 отбирали 2 мл смеси и помещали ее в пробирки со средой 199. В остальных сериях опытов производили миелокариоцитоз, после чего сконцентрированные костномозговые клетки смешивали с криозащитными растворами, при этом конечная концентрация криопротекторов составила: ПЭО-400 — 15 %, ПВП — 10 %, ДМАЦ — 3 %. Полученную взвесь костномозговых клеток с соответствующим криопротектором помещали в пробирки со средой 199 и гепарином. Дальнейшие манипуляции проводились через два часа экспозиции.

После седиментации клеток супернатант из каждой пробы отбирали в стерильные силиконированные флаконы с соответствующей маркировкой. Из каждой клеточной суспензии сепарацией в градиенте фиколл-верографина (уд. плотность 1,076) выделяли фракции моноклеаров, в которых содержатся стволовые клетки, повышая тем самым концентрацию тестируемых клеток-предшественников и освобождая от зрелых гранулоцитов, которые содержат ингибирующие грануломонопоэз кейлоны. Отмывание от фиколл-верографина осуществляли средой Мак Коя 5А.

В качестве фидера использовали моноклеары, выделенные из свежегепаринизированной донорской крови АВIV сепарацией в градиенте фиколл-верографина. Модифицированную среду Мак Коя 5А и питательную агаровую среду готовили согласно рекомендациям Б. В. Афанасьева [1]. Нижний слой (фидер) содержал $4-5 \times 10^5$ моноклеаров в 1 мл агаровой среды. Тестируемые моноклеары костного мозга в каждой серии опытов разводились соответствующим супернатантом, содержащим криопротектор, в концентрации 1×10^6 клеток/мл и затем эксплантировались в верхний агаровый слой в концентрации 1×10^5 клеток/мл. Культивирование проводилось также по методу Б. В. Афанасьева [1]. Кроме того, культивировали моноклеары каждой пробы костного мозга (1×10^5 клеток) в однослойной агаровой системе (без фидера) — контроль возможного спонтанного колониеобразования.

Результаты исследований оценивали на 8—10-ый день культивирования, КОС определяли по числу колоний, а КлОС — по числу кластеров на 1×10^5 эксплантированных моноклеаров костного мозга. Агрегаты, содержащие более 20 клеток, оценивали как колонии, а содержащие от 3 до 20 клеток — как кластеры. Колонии подразделялись на малые (20—40 клеток), средние (40—100 клеток) и большие (более 100 клеток). По числу кластеров и колоний ретроспективно судят о концентрации кластеро- и колониеобразующих клеток (КлОК и КОК) — предшественников грануломонопоэза в исходной клеточной суспензии. Ни в одной однослойной агаровой культуре не было обнаружено колоние- и кластерообразования. Этот факт говорит о том, что условием роста колоний в двуслойной агаровой системе является наличие в фидере колониестимулирующего фактора (КСФ), определяющего коммитирование стволовой клетки в грануломоноцитарном направлении [6, 7, 9].

Как видно из таблицы, КлОС клеток-предшественников грануломонопоэза в присутствии различных криопротекторов не имела статистически достоверных отличий от наблюдаемой в контрольной серии опытов ($p < 0,5$).

При изучении КОС клеток-предшественников грануломонопоэза оказалось, что происходит достоверное ($p < 0,5$) снижение КОС, по сравнению с контрольными значениями, во 2-ой, 4-ой и 5-ой сериях опытов (при культивировании соответственно с ЦОЛИПК-3 и криопротекторами ПВП и ДМАЦ). Особенно заметным было снижение КОС (на 50 %) при культивировании моноклеаров костного мозга с ДМАЦ.

Снижение КОС во 2-ой серии опытов (с ЦОЛИПК-3) происходило за счет подавления роста средних и больших колоний, в 4-ой (опыты с ПВП) —

Т а б л и ц а. Влияние различных криопротекторов на кластеро-(КлОС) и колониобразующую (КОС) способность клеток-предшественников грануломонопоза ($M \pm m$) в донорском костном мозге

Серия опыта	Криопротектор	Число наблюдений	КлОС	КОС	Число колоний разного размера		
			(на 1×10^6)		моноклукеров костного мозга		
					малые (20—40 клеток)	средние (40—100 клеток)	большие (больше 100 клеток)
1	Контроль (без криопротектора)	20	$131,8 \pm 10,7$ (62—720)	$54,0 \pm 2,9$ (24—102)	$23,6 \pm 2,6$ (13—54)	$25,3 \pm 2,2$ (7—34)	$5,2 \pm 0,7$ (0—27)
2	ЦОЛИПК	9	$122,3 \pm 13,6$ (78—192)	$33,1 \pm 7,0$ (17—76)	$20,0 \pm 2,7$ (10—34)	$11,0 \pm 3,8$ (4—36)	$2,1 \pm 0,8$ (0—7)
3	ПЭО-400	15	$113,0 \pm 10,3$ (76—210)	$37,7 \pm 7,3$ (11—106)	$23,8 \pm 5,5$ (10—82)	$10,2 \pm 1,7$ (8—23)	$2,9 \pm 0,7$ (0—9)
4	ПВП	13	$113,8 \pm 9,5$ (70—180)	$38,7 \pm 4,6$ (16—69)	$22,3 \pm 4,1$ (4—52)	$13,7 \pm 2,6$ (3—33)	$4,2 \pm 1,0$ (0—12)
5	ДМАЦ	13	$142,6 \pm 28,0$ (76—400)	$27,8 \pm 3,9$ (12—59)	$13,9 \pm 1,1$ (6—19)	$11,6 \pm 3,1$ (2—38)	$2,3 \pm 0,7$ (0—8)
Достоверные различия между сериями опытов ($p < 0,05$)				1—2 1—4 1—5	1—5	1, 2, 1—3 1—4, 1—5	1—2, 1—3 1—5

Примечание: в скобках указаны минимальные и максимальные значения.

за счет средних колоний, а в 5-ой серии опытов (с ДМАЦ) — за счет малых, средних и больших колоний.

В третьей серии опытов (с ПЭО-400) несмотря на то, что снижение общей КОС по сравнению с контролем было статистически недостоверным, обнаружено уменьшение количества средних и больших колоний.

В результате проведенного исследования установлено, что в присутствии изученных криопротекторов кластерообразующая способность клеток-предшественников практически не изменяется, тогда как рост колоний подавляется. Выраженность воздействия зависит от криопротектора.

Колоние-(КОК) и кластерообразующие (КлОК) клетки не являются однородными популяциями, а представляют собой гетерогенные популяции клеток, отличающихся друг от друга степенью дифференцирования, а также пролиферативным потенциалом.

Количество и размер колоний, образующихся в агаровой культуре, зависит как от положения клеток-предшественников в генерационном цикле, так и от числа делений, которые способны проделать клетки-предшественники. Предполагается, что чем крупнее колонии, тем больший пролиферативный потенциал имеют образующие их клетки-предшественники, тем ближе они стоят к полипотентной стволовой клетке. Следовательно, криопротекторы воздействуют на функциональную активность зрелых КОК и практически не оказывают влияния на более зрелые клетки-предшественники грануломонопоза (КлОК).

Известно, что стволовые клетки могут иметь длительный период покоя (G_0), в котором они практически недоступны для любых внешних воздействий. Следовательно, чем больше клеток-предшественников будет находиться в G_0 -периоде, тем большее число их будет неуязвимо для различных экстремальных воздействий, в том числе сверхнизких температур и последующего замораживания.

Таким образом, можно предположить, что криозащитные препараты воздействуют на стволовые клетки-предшественники, задерживая их в G_0 -периоде, и тем самым повышают устойчивость к различным физико-химическим факторам. Выраженность криозащитного действия на разные типы клеток-предшественников у различных криопротекторов достаточно индивидуальна.

С другой стороны, такая трактовка механизма воздействия криопротекторов на стволовые клетки-предшественники грануломонопоэза может иметь следствием замедление темпов восстановления репопулирующей активности стволовых клеток после размораживания, причем это «запаздывание» может быть различным, в зависимости от применяемого криопротектора. Кроме того, количество функционально сохранных клеток-предшественников грануломонопоэза после замораживания-оттаивания также может зависеть от криопротектора.

Если учесть, что эффективность миелотрансфузий и миелотрансплантаций зависит от количества трансплантируемых стволовых клеток, то можно предположить, что из числа изучавшихся криопротекторов, ДМАЦ окажется способным защитить наибольшее число клеток-предшественников грануломонопоэза.

Таким образом, результаты проведенного исследования позволяют сделать вывод, что криопротекторы оказывают непосредственное воздействие на функциональную активность клеток-предшественников грануломонопоэза. Выраженность воздействия индивидуальна для каждого криопротектора. Представляется перспективной гипотеза, что криопротекторы задерживают стволовые клетки в G_0 -периоде и тем самым повышают их устойчивость к экстремальным воздействиям.

1. Афанасьев Б. В. Метод клонирования гемопоэтических клеток. Изучение колониобразующей способности клеток костного мозга и крови гематологически здоровых лиц и больных с различными нейтропеническими состояниями. — Автореф. дис.... канд. мед. наук. Л., 1977. — 16 с.
2. Лаврик С. С. Консервирование костного мозга. — Киев: Здоровье, 1975. — 125 с.
3. Пушкарь Н. С., Наконечный А. А., Калугин Ю. В. Некоторые аспекты механизма действия криопротекторов. — В кн.: Актуальные вопросы консервирования и трансплантации костного мозга и крови. Харьков, 1972, с. 168—169.
4. Федотенков А. Г., Шишкина И. Д., Беспалова А. А. ДМСО как ограждающее вещество при замораживании костного мозга. В кн.: Современные проблемы гематологии и переливания крови. М., 1966, вып. 38, с. 250—252.
5. Филев Л. В., Коцюбинский Н. Н., Ибрагимов Т. И. и др. Изучение клеток-предшественников грануломонопоэза с применением различных культурных сред. — Лаб. дело, 1982, № 7, с. 387—389.
6. Chervenick P. A., Lo Biglio A. F. Human blood monocytes stimulators of granulocyte and mononuclear colony formation in vitro. — Science, 1972, v. 178, p. 164—166.
7. Cline M. J., Golde D. W. Production of colony — stimulating activity of human lymphocytes. — Nature (London), 1974, v. 248, p. 703—704.
8. Doeblner C. F. Cryoprotective compounds. — Cryobiology, 1966, v. 3, N 1, p. 2—11.
9. Metcalf D., Moore M. A. Regulation of growth and differentiation in hemopoietic colonies growing in agar. — In: Hemopoietic Stem Cells. Amsterdam, 1973, p. 157—182.
10. Picke B. L., Robinson W. A. Human bone marrow colony growth in agar — gel. — J. Cell. Physiol., 1970, v. 76, p. 77—84.

Военно-медицинская ордена Ленина
Краснознаменная академия
им. С. М. Кирова, г. Ленинград

Поступила 25.07.84

УДК 57.043 : 612.13.59

Е. М. Стабровский

РОЛЬ ДОФАМИНЕРГИЧЕСКИХ И НОРАДРЕНЕРГИЧЕСКИХ ТЕРМИНАЛЕЙ ГИПОТАЛАМУСА В РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИИ ЭНДОКРИННЫХ ЖЕЛЕЗ ПРИ ДЕЙСТВИИ ХОЛОДА*

Вопрос о природе моноаминергической (МА) регуляции гипоталамусом функции гипофиза — периферические эндокринные органы — противоречив и требует дальнейшего изучения [1,2]. Одним из методических подхо-

* В работе использованы материалы, полученные при участии А. С. Егорьковой, М. С. Константиновой, К. Ф. Коровина, Л. С. Шпанской, Л. Я. Ямпольской.

дов при изучении указанной проблемы может быть одновременное исследование как в физиологических условиях, так и при стрессе, с одной стороны — дифференцированно моноаминов гипоталамуса, а с другой — показателей, отражающих деятельность периферических желез внутренней секреции. Этот подход был использован в настоящей работе, при этом в качестве фактора, вызывающего стресс, применили острое холодовое воздействие, которое, как известно, оказывает стимулирующее влияние на моноаминергические системы центральной нервной системы (ЦНС) [3]. Дифференцированная реакция моноаминов ЦНС оценивалась путем селективной фармакологической деструкции: норадреналин-(НА), дофамин-(ДА) и серотонинергических (С) нейронов мозга с последующим их гистохимическим определением. Содержание кортикостерона, моноаминов в крови и тканях определялось флуориметрически. Коэффициент эффективности тироксина (КЭТ) — радиоиммунологически.

Опыты проводились на беспородных половозрелых белых крысах — самцах массой 180—200 г в осенне-зимний период. 6-оксидофамин (6-ОДА) фирмы Regis chemical Co с целью разрушения катехоламинергических (КА) нейронов вводился в дозе 200 мкг в 20 мкл однократно в боковой желудочек мозга (2 серия). Контроль — крысы, получившие в/ж 20 мкл растворителя без 6-ОДА (1 серия). В третьей серии опытов за 30 минут до в/ж инъекции крысам вводили внутривбрюшинно 25 мг дезметилипрамина (ДМИ) фирмы Geigy, защищающего от разрушения 6-оксидофамином норадренергические, но не дофаминергические нейроны. Через семь дней после инъекции указанных препаратов крыс помещали на 1 час в камеру с температурой воздуха $22 \pm 1^\circ\text{C}$ или $5 \pm 1^\circ\text{C}$.

После в/ж инъекции 6-ОДА в условиях пребывания крыс в термонеutralной зоне ($+22^\circ\text{C}$) в гипоталамусе наблюдалось трехкратное уменьшение содержания норадреналина, двукратное дофамина (табл. 1). Гистохимический анализ срезов гипоталамуса флуоресцентным методом показал,

Таблица 1. Влияние инъекции 6-ОДА и ДМИ + 6-ОДА на содержание ($M \pm m$) НА и ДА в гипоталамусе при действии температур $22 \pm 1^\circ\text{C}$ (К) и $5 \pm 1^\circ\text{C}$ (Х)

Воздействие	Гипоталамус, мкмоль/кг			
	НА		ДА	
	К	Х	К	Х
Контроль (22)	$9,69 \pm 0,58$	$10,34 \pm 0,24$	$5,84 \pm 0,28$	$5,51 \pm 0,10$
6-ОДА (12+12)	$3,01 \pm 0,19$	$3,80 \pm 0,37$	$2,49 \pm 0,25$	$2,75 \pm 0,16$
	$p_{1-2} < 0,001$	$p_{1-2} < 0,001$	$p_{1-2} < 0,001$	$p_{1-2} < 0,001$
ДМИ+6-ОДА	$6,07 \pm 0,36$	$7,03 \pm 0,26$	$3,34 \pm 0,23$	$3,94 \pm 0,50$
	$p_{1-3} < 0,05$	$p_{1-3} < 0,01$	$p_{1-3} < 0,001$	$p_{1-3} < 0,001$

что введение 6-ОДА приводит к исчезновению в области супраоптического и паравентрикулярного ядер сети норадренергических волокон с ярко-зеленым свечением, сохранению лишь единичных терминалей с мелкими варикозными утолщениями и неярым свечением. Флуоресценция норадренергических терминалей исчезает и вокруг сосудов оболочки мозга около супраоптического ядра. В аркуатном ядре обнаруживаются одиночные дофаминергические нейросекреторные клетки и отдельные волокна с интенсивной зеленой флуоресценцией. Во внутренней зоне срединного возвышения свечение, присущее норадренергическим волокнам, исчезает. В наружной зоне срединного возвышения, где локализованы главным образом дофаминергические терминали, интенсивность свечения, особенно вокруг капилляров портальной системы, также значительно уменьшена.

Структурное изучение гипоталамуса показало, что на седьмые сутки после введения 6-ОДА усиливаются процессы выработки пептидных нейро-

гормонов в клетках супраоптического ядра. Пребывание крыс, получавших 6-ОДА в течение 1 часа при температуре 5 °С не изменяло указанного выше общего характера биохимических и гистохимических изменений в гипоталамусе. В супраоптическом ядре переднего гипоталамуса преобладают светлые клетки с крупными ядрами и ядрышками. В телах нейросекреторных клеток очень мало нейросекрета. Отростки нейросекреторных клеток сильно расширены и практически лишены нейросекреторного материала. Капилляры нейросекреторных клеток супраоптического ядра также расширены. Аналогичные изменения отмечены в паравентрикулярном ядре. Во внутренней зоне срединного возвышения среднего гипоталамуса очень мало нейросекрета, тела Геринга отсутствуют. В наружной зоне срединного возвышения капилляры расширены. В передней доле гипофиза отмечается сильная гиперемия. Кровеносные сосуды расширены и переполнены элементами крови, особенно в зоне гонадотрофов и тиреотрофов. Наблюдается вакуолизация этих и других клеточных зон аденогипофиза. В промежуточной зоне клетки также вакуолизированы; границы клеток стерты. Отдельные ПАФ-положительные волокна проникают в долю. В задней доле происходит накопление нейросекрета до 3—4 баллов, отмечены сильная гиперемия и большое скопление тел Геринга.

Таким образом, в гипоталамо-гипофизарной нейроэндокринной системе после деструкции катехоламинергических систем гипоталамуса в условиях термонеutralной зоны наблюдается усиление образования гипоталамических пептидных нейрогормонов супраоптического, паравентрикулярного и, вероятно, других ядер, возрастает их транспорт по нервным путям и через посредство портальной системы с последующим накоплением их в задней доле гипофиза и активацией железистой секреции передней и промежуточной долей, особенно гонадотрофов, адренокортикотрофов и тиреотрофов.

После деструкции катехоламинергических волокон гипоталамуса 6-ОДА действие острого холода сопровождалось еще большим, чем в условиях термонеutralной зоны, увеличением гиперемии в супраоптическом и паравентрикулярном ядрах. Нейросекреторные клетки этих ядер были гипертрофированы, в них отсутствовал нейросекрет. В отростках этих клеток очень мало коричневого гомориположительного материала. Наблюдались отток нейросекрета в пределах супраоптического и паравентрикулярного ядер и скопление ПАФ-положительного материала у крупных сосудов. ПАФ-положительным материалом были переполнены и другие группы нейросекреторных клеток гипоталамуса. В области паравентрикулярного ядра выделяются расширения нейросекреторных волокон типа тел Геринга. В целом реакция на охлаждение более всего выражена в паравентрикулярном ядре. В наружной зоне среднего возвышения также выявлена гиперемия, появились ПАФ-положительные волокна и нейросекрет, которых нет в контроле. Гиперемия характерна и для гипофиза. В задней доле много нейросекрета и тел Геринга. Следовательно, функциональная активность гипоталамо-гипофизарной нейросекреторной системы у крыс с деструкцией катехоламинсодержащих волокон гипоталамуса после воздействия острым холодом еще более активизируется.

Разрушение катехоламинергических терминалей гипоталамуса приводило к увеличению базальной секреции адреналина и норадреналина. При действии острого холода дальнейшего нарастания секреции катехоламина не наблюдалось (табл. 2). Это позволяет судить, что катехоламинсодержащие терминали гипоталамуса играют ингибирующую роль в секреции симпато-адреналовой системы.

После деструкции катехоламинергических терминалей гипоталамуса уровень базальной секреции кортикостерона в условиях термонеutralной зоны увеличивался в два раза (рис. 1). Действие холода при этом в контрольной группе и у крыс с разрушенными катехоламинергическими терминалями гипоталамуса вызывало трехкратное увеличение секреции кортикостерона. Однако у крыс с деструкцией катехоламинергических тер-

Таблица 2. Влияние инъекции 6-ОДА и ДМИ+6-ОДА на содержание ($M \pm m$) НА и А в плазме периферической крови крыс при действии температур $22 \pm 1^\circ\text{C}$ (К) и $5 \pm 1^\circ\text{C}$ (Х)

Воздействие	Кровь, нмоль/л			
	НА		А	
	К	Х	К	Х
Контроль (22)	$24,71 \pm 2,04$	$34,22 \pm 2,30$	$20,14 \pm 1,11$	$28,87 \pm 1,11$
6-ОДА (12+12)	$39,60 \pm 1,57$	$41,96 \pm 1,95$	$30,18 \pm 0,84$	$26,57 \pm 2,49$
	$p_{1-2} < 0,001$	$p_{1-2} < 0,001$	$p_{1-2} < 0,01$	$p_{1-2} > 0,5$
ДМИ+6-ОДА (12+12)	$24,12 \pm 0,76$	$23,99 \pm 1,33$	$18,37 \pm 1,04$	$20,34 \pm 1,16$
	$p_{1-3} > 0,5$	$p_{1-3} < 0,001$	$p_{1-3} > 0,05$	$p_{1-3} < 0,05$

миналей секрция возрастала более значительно. Следовательно, разрушение катехоламинергических терминалей приводит к увеличению базальной и стимулированной холодом секреции кортикостерона. Этот факт свидетельствует о том, что катехоламинсодержащие нейrogормоны играют ингибирующую роль в регуляции гормонов гипофиз-адреналовой системы.

Содержание серотонина в крови после деструкции катехоламинергических нейронов гипоталамуса в условиях термoneйтральной зоны увеличивалось в два раза (рис. 2). Действие холода значительно повышало содержание этого моноамина. Однако оно

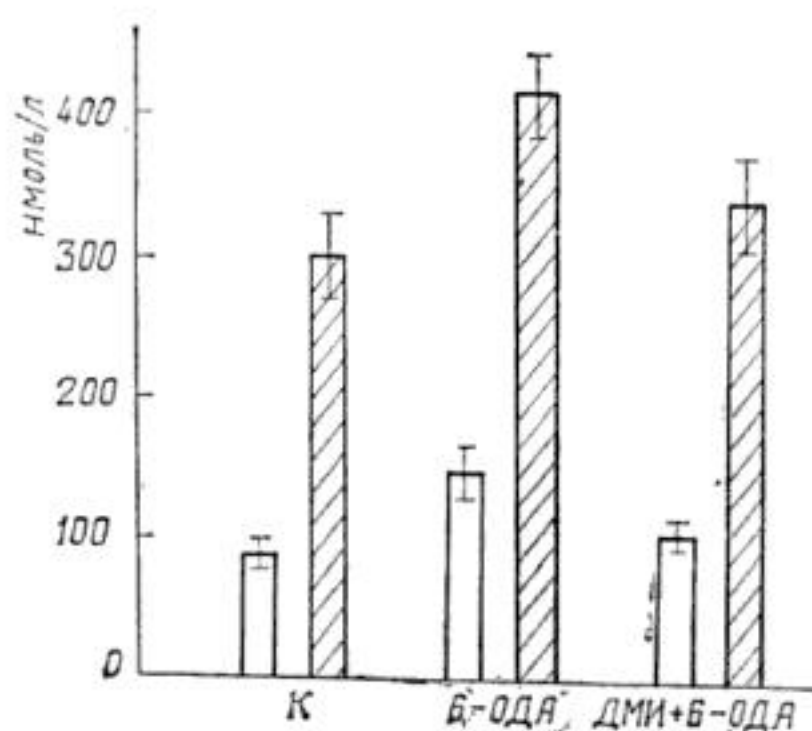


Рис. 1. Содержание кортикостерона в крови крыс после инъекции 6-ОДА и ДМИ+6-ОДА в условиях 60-минутного действия температур 22°C (светлые столбики) и 5°C (заштрихованные столбики): К — контроль, 6-ОДА — группа крыс после в/ж инъекции 6-ОДА, ДМИ+6-ОДА — группа крыс после в/ж инъекции 6-ОДА и предварительного в/б введения ДМИ.

снижали концентрацию НА в гипоталамусе, но менее значительно, чем при введении 6-ОДА (см. табл. 1). Действие холода не изменяло указанной картины. Что касается дофамина, то содержание его в гипоталамусе независимо от окружающей температуры после инъекции ДМИ + 6-ОДА снижалось столь же отчетливо, как и при введении только 6-ОДА.

Результаты гистохимических исследований согласуются с биохимическими данными. Так, в участках гипоталамуса с наивысшей концентрацией норадренергических волокон, которые выявляются по желто-зеленой флуоресценции, видны ярко-зеленые терминали вокруг крупных кровеносных сосудов вблизи супраоптического ядра гипоталамуса. В сосудах гипоталамуса наблюдаются многочисленные клетки с желтосветящимися гранулами

в группе крыс, которым вводился 6-ОДА, не вызывало дальнейшего повышения концентрации серотонина, что указывает на прямую связь между снижением активности катехоламинергических терминалей и увеличением базальной функции энтерохромаффинной системы.

Разрушение катехоламинергических нейронов гипоталамуса не изменяло функцию щитовидной железы (рис. 3). В то время как холодостресс в контрольной группе увеличивал коэффициент эффективности тироксина в сыворотке крови, в группе крыс, получавших 6-ОДА, действие холода не вызывало повышения КЭТ. Таким образом, деструкция катехоламинергических окончаний гипоталамуса не приводила к изменению базальной активности щитовидной железы, но блокировала ее реакцию на действие холода.

Инъекции ДМИ + 6-ОДА в условиях термoneйтральной зоны, хотя и

НА. В области супрахиазматического ядра встречаются клетки с немногочисленными слабосветящимися желтыми гранулами. В супраоптическом ядре вокруг нейросекреторных клеток видны сплетения волокон с зеленым свечением. Хотя гистохимически норадренергические терминалы в группе крыс, получавших ДМИ + 6-ОДА, отличаются от соответствующих показателей у животных, получавших только 6-ОДА, тем не менее интенсивность свечения указанных терминалов мало отличается от обнаруженной в контрольной серии. В участках гипоталамуса, где сосредоточены дофаминергические нейроны, в частности, в аркуатном ядре и наружной зоне срединного возвышения, интенсивность желто-зеленой флуоресценции значительно меньше, чем в контроле, она напоминает гистохимическую картину, характерную для группы крыс, получавших 6-ОДА.

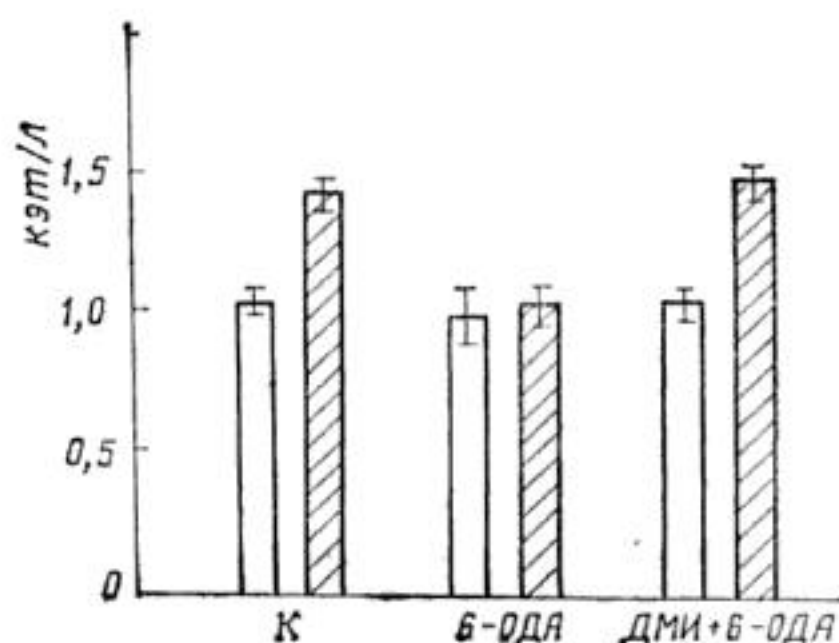
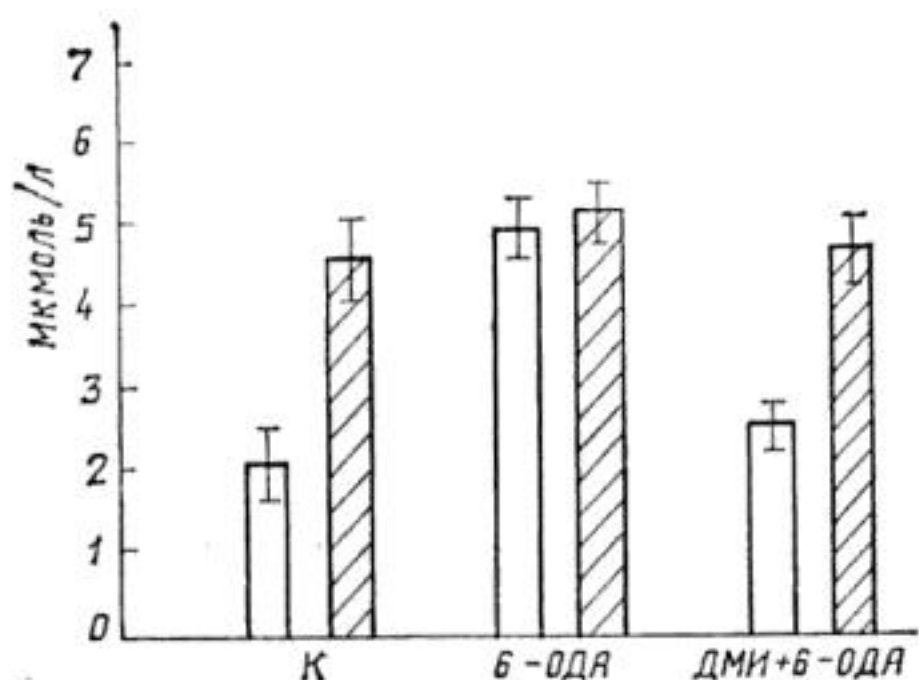


Рис. 2. Содержание серотонина в крови крыс после инъекции 6-ОДА и ДМИ+6-ОДА в условиях действия температур 22 °C (светлые столбики) и 5 °C (заштрихованные столбики).

Рис. 3. Коэффициент эффективности тироксана (КЭТ) крови крыс после инъекции 6-ОДА и ДМИ+6-ОДА в условиях 60-минутного действия температур 22 °C (светлые столбики) и 5 °C (заштрихованные столбики).

Структурные изменения на границе промежуточной и передней долей гипофиза между клетками промежуточной доли обнаруживаются скопления клеток, в цитоплазме которых выявляются ярко-желтые гранулы. В передней доле видны мелкие клетки с отростками вокруг сосудов. В цитоплазме этих клеток флуоресцируют желто-коричневые гранулы. В задней доле гипофиза по ходу сосудов наблюдаются терминалы с бледно-зеленым свечением. В группе крыс, получивших ДМИ + 6-ОДА в условиях термонеutralной зоны, микроструктурные изменения в гипоталамо-гипофизарной системе при охлаждении не отличаются от таковых после обработки 6-ОДА.

Анализ полученных данных показывает, что при разрушении дофаминергической системы гипоталамуса базальная и стимулированная холодом секреция кортикостерона практически не отличалась от таковой в контроле (см. рис. 1). Таким образом, при введении только 6-ОДА увеличение базальной и стимулированной холодом функциональной активности гипофиз-адреналовой системы происходит, по-видимому, за счет выключения норадренергической системы, а дофаминергические нейроны не участвуют в регуляции указанной функции.

Сопоставление функциональной активности щитовидной железы в контроле и в группе крыс, получавших ДМИ + 6-ОДА, выявило отсутствие изменений между группами как в отношении базальной, так и стимулируемой холодом активности щитовидной железы (см. рис. 3). Увеличение базальной секреции серотонина в группе крыс, обработанных 6-ОДА, и отсутствие дальнейшего роста этого процесса при действии холода (см. рис. 2) можно отнести за счет разрушения норадренергических волокон в гипоталамусе, что свидетельствует об ингибирующей роли норадренергических волокон в регуляции активности энтерохромаффинной системы, незначительном участии дофаминергической системы в этих процессах.

Разрушение преимущественно дофаминергической системы (ДМИ + 6-ОДА) существенно не изменяло функцию симпато-адреналовой системы, но блокировало вызванное холодом увеличение ее активности (см. табл. 2). Можно полагать, что как норадренергическая, так и дофаминергическая системы участвуют в регуляции функции симпато-адреналовой системы. Норадренергические волокна гипоталамуса регулируют базальную, а дофаминергические — вызванную холодом секрецию гормонов указанной системы.

Полученные данные показывают, что в регуляции функции гипофиз-адреналовой системы при действии холода норадренергические волокна гипоталамуса оказывают на нее ингибирующее влияние, а дофаминергические — не играют, вероятно, при этом существенной роли. В то же время в регуляции функции щитовидной железы большую роль играет норадренергическая система, способствующая ее стимуляции при действии холода; она же играет ингибирующую роль в регуляции базальной активности энтерохромаффинной системы. Норадренергическая система регулирует также базальную, а дофаминергическая — стимулируемую холодом секрецию гормонов симпато-адреналовой системы.

1. Алешин Б. В. Двойственность нейросекреторных механизмов гипоталамуса и ее значение в регуляции эндокринных функций. — Успехи физиологических наук, 1979, 10, № 1, с. 7—27.
2. Шаляпина В. Г. Участие катехоламинов мозга в регуляции гипофизарно-адреналовой системы. — В кн.: Гипофизарно-адреналовая система и мозг. Л.: Наука, 1976, с. 49—66.
3. Felberg W., Myers R. D. Effects of temperature of amines injected into the cerebral ventricles. A new concept of temperature regulation. — J. Physiol., 1964, 173, N 2, p. 226—237.

Институт усовершенствования
врачей им. Кирова, г. Ленинград

Поступила 19.02.85.

УДК 611.012.1 : 615.361.014.41

Ю. С. Паращук, В. И. Грищенко, Ю. В. Калугин, Е. Н. Черныш

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЙ КРИОКОНСЕРВАЦИИ НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ СПЕРМИЕВ ЧЕЛОВЕКА

Известно, что количество бесплодных супружеских пар как в нашей стране, так и за рубежом составляет 10—15 %, из числа которых в 30—50 % случаев «виновником» бесплодного брака является мужчина [3]. Одной из форм борьбы с бесплодием и мерой, направленной на повышение рождаемости, является искусственная инсеминация женщин. Однако для успешного внедрения этого метода в клиническую практику необходимо создание запаса спермы, что возможно лишь при условии успешной ее криоконсервации. Поэтому, несмотря на то что вопросами искусственной инсеминации начали заниматься сравнительно давно, широкое использование этого метода в борьбе с бесплодием стало возможным лишь с развитием исследований, направленных на разработку методов низкотемпературного консервирования спермы человека. Начиная с 1954 г., когда в Японии и США были зарегистрированы первые роды после инсеминации замороженной спермой, практической медициной был проявлен большой интерес к тем несомненным преимуществам, которые связаны с ее использованием. К их числу можно отнести следующие. Наличие криоконсервированной спермы позволяет проводить селекцию эякулятов и выбирать для инсеминации наиболее качественные образцы. Наряду с этим в процессе криоконсервирования происходит отбор наиболее жизнеспособных спермиев, генетический материал которых не претерпевает каких-либо структурно-функциональных изменений. В силу этого, как свидетельствуют клинические наблюдения, число детей, рожденных с генетическими аномалиями после инсеминации

криоконсервированной спермой, значительно меньше (1 %), чем при использовании свежей спермы (6 %) [8]. Применение замороженной спермы открыло новые перспективы перед клиницистами в лечении бесплодия. Стало возможным повседневное проведение искусственной инсеминации в дни, наиболее благоприятные для оплодотворения, поскольку наличие криоконсервированного биоматериала позволяет проводить инсеминации через день, как это требуется, в то время как для нормального течения сперматогенеза, необходимого для восполнения спермиев после эякуляции, этого времени недостаточно. Кроме того, сперму от одного мужчины стало возможным использовать для искусственной инсеминации нескольких женщин. Наконец, отпала необходимость многократных посещений клиники мужчин-доноров.

Таким образом, проблема инсеминации замороженной спермой имеет клинические, социальные, экономические и правовые аспекты. Несмотря на применение криоконсервированной спермы в медицинской практике, в настоящее время как у нас в стране, так и за рубежом нет достаточно надежных способов криоконсервации спермы человека, позволяющих развернуть клиническую работу по инсеминации замороженной спермой в тех масштабах, которые продиктованы запросами практической медицины. Недостаточная эффективность применяемых методов связана с тем, что хотя исследования по криоконсервации спермы человека ведутся уже 30 лет, они малочисленны, проводятся тематически разрозненно и основаны на эмпирическом подходе к решению стоящих задач. Отсюда и неясность по кардинальным вопросам криоповреждения и криозащиты этого биообъекта, отсутствие единства мнений по ряду важных проблем. Это прежде всего относится к оценке естественной криорезистентности спермиев и способам ее повышения, что, в свою очередь, тормозит развитие исследований по искусственной криозащите этого вида клеток. Разработка эффективных методов их глубокого замораживания может быть успешно осуществлена лишь при всестороннем изучении характера воздействия температурного фактора на всей температурной шкале. Однако проблема температурного шока применительно к спермиям человека находится лишь на начальных этапах изучения. Известно также, что многие виды клеток претерпевают повреждение в зоне субнулевых температур при плавном охлаждении образца, исключая проявление температурного шока. Причина этого хорошо изученного явления в отношении разного вида клеток может быть связана как с дисбалансом в метаболизме, разрегулиции ионтранспортных систем, так и с фазовыми переходами в липид-белковых комплексах мембран, в силу чего происходит разделение липидов и формирование в мембране дефектных областей, повышающих ее проницаемость для ионов и метаболитов. Однако информация по всем этим вопросам и, в частности, о температуре фазовых переходов, интенсивности и обратимости этих процессов в мембране спермиев человека — более чем скромная. Между тем она крайне необходима в связи с важностью использования приема холодовой адаптации спермиев человека. Подобным же образом обстоит дело и с информацией о повреждающем действии кристаллизации, вызывающем экстремальные ситуации в среде замораживания. Имеющиеся данные по этому вопросу, полученные на клетках других видов или в модельных экспериментах, не могут быть экстраполированы на спермии человека ввиду присущих им морфологических отличий: в мембранном аппарате, в ферментативных системах, биоэнергетике, в генетическом аппарате и др. Однако деятельность этих систем у спермиев человека в условиях низких температур и химических факторов защиты изучена далеко неполно. Следует признать, что криобиология спермиев человека не имеет еще достаточно мощного фундамента, который позволил бы интенсифицировать разработки в этой области науки с целью более широкого внедрения ее достижений в клиническую практику. Особенно остро это ощущается при попытках криоконсервировать сперму, полученную от лиц с нарушенным сперматогенезом. Между тем, в случае олигоспермии либо астеноспермии, а также некоторых других приобретен-

ных или генетически детерминированных патологиях криоконсервированная сперма человека в количестве, необходимом для искусственной инсеминации, едва ли не единственное радикальное средство в борьбе с бесплодием. Недостаточно изучены иммунологические аспекты у человека и влияние криоконсервации на изменение иммунологической реактивности, нарушение которой также нередко является причиной бесплодного брака. В силу вышесказанного практические рекомендации по криоконсервации спермы человека не всегда имеют должное научное обоснование.

К числу актуальных проблем современной криобиологии спермы человека, наряду с определением оптимальных параметров адаптации, эквilibрации, скорости охлаждения и отогрева спермы, выбора объема, формы упаковки и материала для ее изготовления, поиска информативных, но в то же время простых способов оценки жизнеспособности спермиев, относится разработка оптимального состава криоконсерванта, а также опреде-

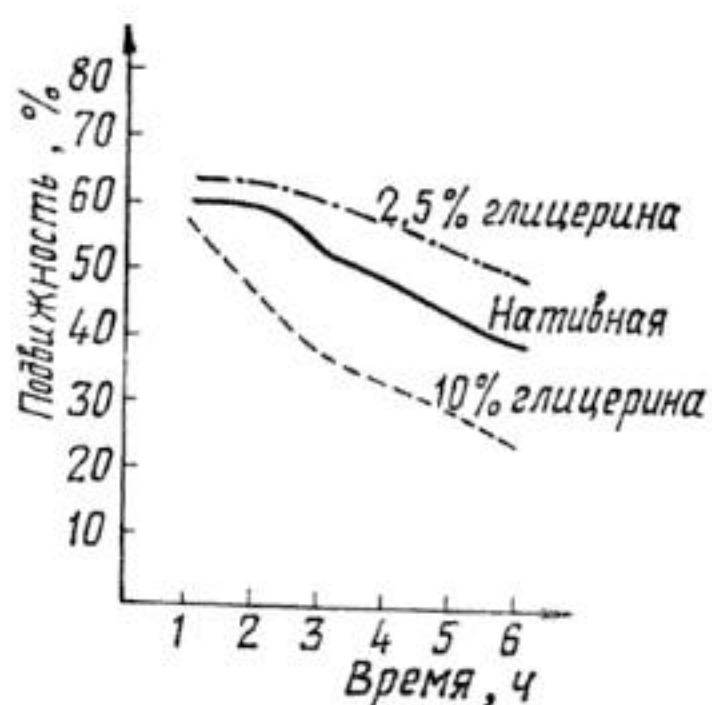


Рис. 1. Зависимость переживаемости спермиев от концентрации глицерина при температуре 40 °C.

ление условий его добавления к эякуляту. Разработанные методы криоконсервации этого вида гамет основаны на использовании в качестве криопротектора чистого глицерина, чаще всего применяемого в 10 %-ной концентрации. Однако известно, что спермии человека исключительно чувствительны к изменению физико-химических условий среды [4], и глицерин в момент добавления к эякуляту в указанной концентрации, вызывая повышение осмотического давления, в четыре раза снижает подвижность гамет еще до начала их охлаждения. Наряду с этим в процессе эквilibрации спермиев человека в среде глицерина отмечается сморщивание акросомы, дестабилизация ее мембраны и формирование в ней каналов утечки акрозина. При концентрации глицерина выше 9 % подавляется дыхание клеток. По нашим данным, инкубирование нативной спермы при температуре 40 °C и в среде 2,5 и 10 %-ного глицерина обусловило наименьшую переживаемость спермиев в последнем случае (рис. 1).

Применение глицерина в составе сложных сред, включающих буферные системы и лецитин, действие которого направлено на защиту мембраны спермиев от повреждающего действия не только температурного шока, но и всевозможных физико-химических сдвигов в среде, обеспечило более длительную переживаемость спермиев по сравнению со средой чистого глицерина. При этом повысилась выживаемость гамет после замораживания и их оплодотворяющая способность. Однако как в том, так и в другом случае глицерин даже в 7—10 %-ной концентрациях не обеспечивает надлежащую криозащиту. Данные электронномикроскопического исследования спермиев, перенесших криоконсервирование, показали, что большинство их утратило плазматическую мембрану, внешнюю мембрану акросомы и содержимое самой акросомы, причем внутренняя мембрана акросомы обычно оставалась морфологически целой.

Исследование качества спермы по таким показателям, как количество и кинетические свойства нативных спермиев человека и оттаянных после замораживания, показывают, что подвижность гамет после криоконсервации в среднем снижается на 30 % [4]. В оттаянной сперме падение подвижности и оплодотворяющей способности наблюдается уже через шесть часов с момента оттаивания, причем пенетрационные свойства падают ниже 40 %, т. е. до уровня подвижности и оплодотворяющей способности, которые наблюдаются у бесплодных мужчин [9]. Таким образом, дальнейшая разработка эффективных способов криоконсервации спермы человека для клинических целей не потеряла актуальности. Совершенно очевидно, что муж-

ские гаметы, перенесшие криоконсервирование, должны обладать максимально возможным резервом жизнеспособности и функциональной активности, и успехи в оптимизации методов криоконсервации спермы связаны прежде всего с результативностью исследований, направленных на познание механизмов криозащиты. К числу наиболее перспективных исследований, проводимых с этой целью, может быть отнесено развиваемое в последние годы в Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР научное направление, связанное с поиском зависимости между химическими параметрами криопротекторного соединения и его криозащитными свойствами. К подобного рода исследованиям относится проведенное нами изучение криопротекторных свойств ряда амидов и оксиэтилированных глицеринов (ОЭГ) в связи с наличием у этих соединений особенностей в структуре и физико-химических свойствах, которые могут коррелировать с проявлением криозащитной эффективности.

Амиды в этом плане представляют интерес в связи с тем, что криопротекторы из числа этих веществ относятся к ряду соединений с регулярно уплотняющейся структурой. Это же в известной мере относится и к оксиэтильным производным многоатомных спиртов, синтезированных в ИПКиК АН УССР. Криозащитные свойства некоторых из этих соединений уже изучались на различных биообъектах в различных научных центрах. Тем более целесообразно было исследовать особенности их криозащиты в отношении спермиев человека. С точки зрения физико-химических свойств амиды являются слабыми основаниями с различной способностью к образованию водородных связей. Это объясняется тем, что электронная пара азота смещена в сторону карбоксильной группы вещества. В результате основность атома азота у амидов уменьшена, а основность атома кислорода увеличена. Поэтому, вероятно, образование водородных связей происходит по кислороду.

Замена атома водорода в $\text{N} \begin{smallmatrix} \text{H} \\ \diagup \\ \text{H} \end{smallmatrix}$ группе метильными группами, что наблю-

дается при переходе ацетамида к N-метилацетамиду, N, N-диметилацетамиду и N, N-диметилформамиду, приводит к увеличению основных свойств соединения. Это обусловлено тем, что с метилированием связано увеличение электронной плотности атома азота, основность которого, таким образом, возрастает по сравнению с незамещенным аналогом. В результате взаимодействия *p*-электронов азота с электронно-акцепторной карбоксильной группировкой происходит смещение электронной плотности в сторону кислорода, основность которого возрастает и, следовательно, увеличивается способность к образованию водородных связей, причем влияние на изменение основности метильных групп, присоединенных к амидному азоту, зависит от их числа. В ряду ацетамидов и формамидов замещение одного амидного атома водорода вызывает заметное увеличение основности. Однако замещение второго атома водорода указанной группировкой лишь незначительно изменяет этот показатель и соответственно в меньшей мере оказывает влияние на возможность данным соединением образовывать водородные связи [5]. Как известно, в настоящее время еще не создана интегральная теория криозащиты, она фрагментарна и в указанном смысле каждый ее аспект освещает лишь какую-либо из сторон этого сложного многогранного процесса. Склонность химического вещества к образованию водородных связей рассматривается как важнейшее свойство, прямо коррелирующее с его криозащитной эффективностью. Именно увеличение в молекуле числа водородных связей, способных укреплять гидратационную решетку белковых макромолекул, связывают с повышением криопротекторных свойств химического соединения [7]. Амиды, реализацию криозащитных свойств которых в отношении спермиев человека мы изучаем, можно расположить по протонноакцепторным свойствам в следующей убывающей последовательности.

В таблице даны значения константы основности амидов и формамидов (K) в уксусной кислоте по отношению к судану III [5].

Изучение криозащитных свойств указанных соединений, проведенное

Т а б л и ц а. Значение константы основности амидов и формамидов в уксусной кислоте по отношению к судану III

Соединение	Формула	K	Выживаемость, %
N, N-диметилацетамид	$\text{CH}_3-\text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{N} \begin{array}{l} \nearrow \text{CH}_3 \\ \searrow \text{CH}_3 \end{array} \end{array}$	0,011	65 $p < 0,05$
Ацетамид	$\text{CH}_3-\text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{NH}_2 \end{array}$	0,10	60 $p < 0,05$
N, N-диметилформамид	$\text{H}-\text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{N} \begin{array}{l} \nearrow \text{CH}_3 \\ \searrow \text{CH}_3 \end{array} \end{array}$	0,14	51 $p < 0,05$
Формамид	$\text{H}-\text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{NH}_2 \end{array}$	0,53	12 $p < 0,05$

в условиях многофакторного эксперимента с вариациями концентраций изучаемых веществ, скорости охлаждения, показало, что по криозащитной эффективности их можно поместить в той последовательности, в какой они располагаются по основности, т. е. криозащитная активность этих соединений падает по мере снижения их способности образовывать водородные связи. Если у диметилацетамида она проявилась в наибольшей мере, то у формамида криозащитные свойства практически отсутствуют (см. табл.).

Изучение синтезированных в ИПКиК АН УССР (канд. хим. наук Ханиной Л. А.) ОЭГ в отношении спермиев человека позволяет проследить зависимость не только между криозащитной эффективностью этих соединений и их свойством образовывать водородные связи, но и в связи с изменением в криобиологической системе характера гидрофильно-гидрофобных взаимодействий. От глицерина ОЭГ отличаются наличием в молекуле этоксигрупп $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$, с увеличением числа которых меняется структура вещества, физико-химические свойства его раствора и характер криозащиты. В модельных биологических экспериментах показано, что порогом проницаемости является полимергомолг со степенью полимеризации 3 [6]. Следовательно, путем оксиэтилирования исходного глицерина, являющегося эндоцеллюлярным криопротектором, представляется возможным получать криозащитные соединения ряда ОЭГ экзоцеллюлярного механизма действия. При известной условности такого рода деления криопротекторов по принципу их проницаемости через цитоплазматическую мембрану оно существует и предполагает наличие различных механизмов криозащиты. Способность молекул ОЭГ образовывать водородные связи зависит от числа в ней указанных этоксигрупп: в каждой из которых атом кислорода способен устанавливать 2-Н связи с молекулами воды, биомакромолекулами, биометаллами [1]. С включением в молекулу ОЭГ очередной этоксигруппы возрастает число водородных связей и, в частности, повышаются гидратационные свойства этого соединения.

Наряду с количественной, важна и качественная характеристика этого процесса. Известно, что ОЭГ оказывают упорядочивающие структурирующие влияния на воду, в силу чего в зоне эвтектической концентрации его раствора (60 %) температура замерзания лежит в области -35°C [2]. Свойство кислорода образовывать водородные связи с молекулами воды выражено в зависимости от структуры молекул этого криопротектора и в тем большей мере, чем более к центрам гидратации облегчен доступ воды.

В противном случае в большей мере проявляются гидрофобные взаимодействия в криопротекторе молекул с биомакромолекулами, что обусловлено наличием в криопротекторе групп CH_2 . Длительная, в течение многих часов, переживаемость спермиев человека в средах с ОЭГ низкой степени полимеризации ($n = 2,3$) позволяет отводить гидрофобным взаимодействиям не большую роль, чем они играют при введении в эякулят глицерина. Хорошей жизнеспособности спермиев в среде ОЭГ способствует и то, что стрессорное действие градиента осмотического давления, в случае введения в сперму этого криопротектора, значительно меньше выражено, чем при добавлении к ней глицерина. Это связано с тем, что осмотическое давление ОЭГ $n = 3$, скажем, в 5 %-ной концентрации в три раза меньше, чем глицерина [1].

Изучение криозащитных свойств ОЭГ $n = 2$ и 3 показало, что выживаемость спермиев после криоконсервирования под защитой этих соедине-

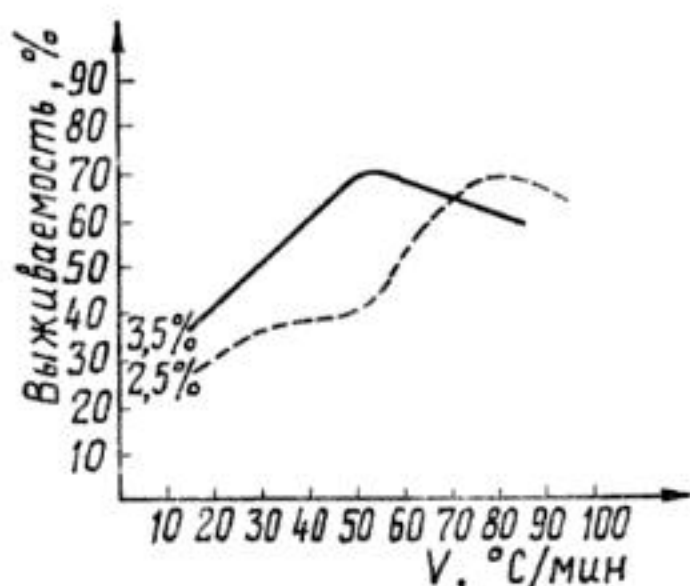


Рис. 2. Выживаемость спермиев при различной концентрации ОЭГ $n = 2$ и скорости охлаждения на втором этапе.

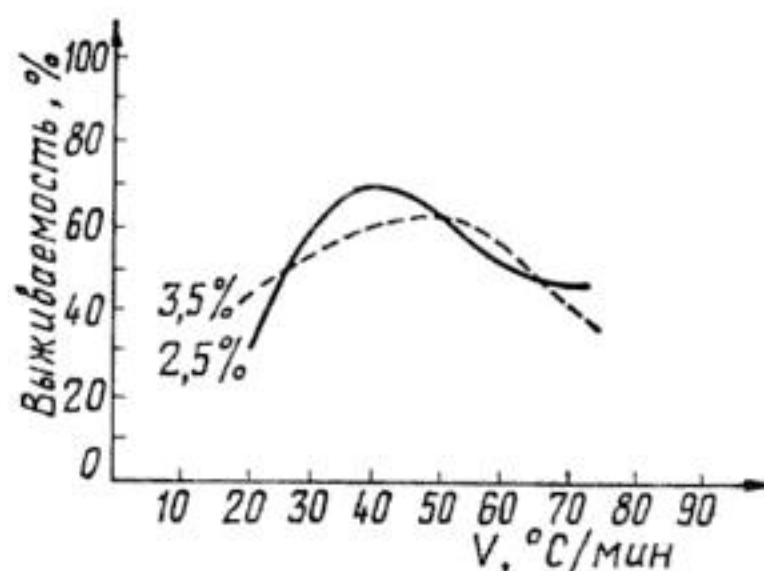


Рис. 3. Выживаемость спермиев при различной концентрации ОЭГ $n = 3$ и скорости охлаждения на втором этапе.

ний находится на достаточно высоком уровне. Однако условия реализации криозащиты при включении в криоконсервант этих полимергомологов имеют некоторые различия. Они выражаются в том, что с увеличением степени полимеризации ОЭГ оптимум скорости замораживания на втором этапе (V_2) смещается в сторону ее понижения (рис. 2,3). Характерно, что оптимум выживаемости спермиев в случае применения ОЭГ $n = 2$ разной концентрации лежит на одном уровне, однако 2,5 %-ное содержание этого полимергомолога в криоконсерванте сдвигает этот показатель в зону более высоких температур. Включение в среду замораживания ОЭГ $n = 3$ различно влияет на выживаемость клеток при разных его концентрациях. Это выражается в том, что более низкая концентрация соединения обуславливает более высокую величину этого показателя при более низкой скорости охлаждения на втором этапе. Повышение концентрации этого соединения в среде замораживания приводит к некоторому снижению выживаемости спермиев, причем криозащита в большей мере выражена при повышении их охлаждения на V_2 . В целом же следует отметить, что несмотря на минимальную разницу в степени полимеризации полимергомологов, для реализации ими криозащитных свойств требуются разные условия. Надо полагать, что это связано с различиями соединений в структуре, которые предопределили различие во взаимодействии их с цитоплазматической мембраной клеток, выражающееся, в частности, в неодинаковом перераспределении этих полимергомологов по обе ее стороны.

Нами представлен лишь один из этапов исследований, проводимых с целью изучения некоторых особенностей криозащиты спермиев человека, обусловленных структурными различиями в ряде применяемых криопротекторов и связанных с этим фактором особенностей режима криоконсервирования.

Дальнейшее решение этой задачи сопряжено с необходимостью применения более информативных методов оценки жизнеспособности спермы на разных этапах криоконсервирования. К ним в первую очередь следует отнести объективизацию оценки подвижности клеток и характера их движения, что позволяет оценить не только число подвижных спермиев, но и осуществить их градацию по скорости движения, анализ трековых характеристик. Наряду с этим целесообразно использование морфометрии, флуоресцентных зондов, позволяющих оценить состояние митохондриального аппарата клетки, применение метода сверхслабого свечения, позволяющего получить объективную информацию о перекисных процессах в мембранах. Повышение надежности методов оценки жизнеспособности спермиев имеет важное значение в решении вопроса о сохранении оплодотворяющей способности спермиев человека.

1. Белоус А. М., Шраго М. И., Пушкарь Н. С. Криоконсерванты. — Киев: Наук. думка, 1979. — 196 с.
2. Воротилин А. М., Манжелей В. Г., Данилина В. В., Тассон В. М. О механизме повреждения эритроцитов человека в растворах полиэтиленоксидов при низких температурах. — Биофизика, 1969, 14, № 3, с. 575—576.
3. Кунин М. А. Бесплодие в браке. — М.: Медицина, 1973, — 232 с.
4. Молнар Е. Общая сперматология. — Будапешт: Издательство Академии наук Венгрии, 1969, — 294 с.
5. Сигга С., Ханна Д. Г. Количественный органический анализ по функциональным группам. — М.: Химия, 1983, — 159 с.
6. Шраго М. И., Гучок М. М., Калугин Ю. В. Некоторые принципы направленного синтеза криопротекторов. — В кн.: Актуальные проблемы криобиологии. Киев: Наук. думка, 1981, с. 157—200.
7. Doeblner J. F. Review and discussion of structure and function. — Cryobiology, 1966, N 1, 3, p. 2—5.
8. Sherman J. K. Cryobanking of human Semen. — Acta Medica Polona, 1978, 19, N 1—2, p. 148—156.
9. Ulstein M. Fertility, motility, and penetration in cervical mucus of freeze — preserved human spermatozoa. — Acta Obstet Gynec. Scand., 1973, 52, p. 205—210.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР,
Харьковский медицинский институт, г. Харьков

Поступила 15.03.85

УДК 612.664.36.014.41

**А. М. Бражников, С. Н. Осипов, О. Г. Комяков, О. А. Филиппенко,
Е. М. Фатеева, В. И. Копылова**

ХОЛОДИЛЬНОЕ КОНСЕРВИРОВАНИЕ МАТЕРИНСКОГО МОЛОКА

Современное состояние научных исследований в криобиологии позволяет перейти от консервирования биообъектов в лабораториях к разработке технологического процесса консервирования и использования его в промышленных условиях. Материнское молоко является незаменимым продуктом питания для грудных детей и обладает ценными биологическими и иммунологическими качествами. Свойства его как пищевого продукта хорошо изучены, эти знания используются при создании искусственных смесей для детского питания. Молоко содержит антитела к наиболее распространенным возбудителям инфекционных заболеваний [1]. Поэтому большее значение приобретает возможность создания «банков» материнского молока.

Консервирование материнского молока открывает новые возможности для создания новых видов продуктов детского и диетического питания на основе сухого материнского молока. Не исключена возможность применения его в специальных целях, например для людей, работающих в экстремальных условиях.

Целью данной работы явилось изучение процессов кристаллообразования при различных режимах замораживания, влияния структуры продук-

та на сохранение биологических ценных веществ. В качестве основного критерия оценки принято содержание иммуноглобулинов. Эксперименты по замораживанию и отогреву молока проводились в специальной камере объемом 14 см³, в основу работы которой положен принцип направленной кристаллизации, т. е. за счет организации одностороннего теплоотвода от исследуемого объекта формирования кристаллов льда в образце происходит по нормали к поверхности теплоотвода вглубь исследуемого образца. Молоко заливают в специальную ванну из термоизоляционного материала, изолируют от окружающей среды и включают подачу хладагента. В качестве хладагента использовался жидкий азот. Размораживание проводилось со скоростью 15, 10, 7, 1 °С/мин.

Рост кристаллов льда, а также кинетика процесса кристаллообразования наблюдались на специальном стенде [2]. Основным узлом стенда (рис. 1) является криоприставка к оптическому микроскопу, условия замораживания в которой аналогичны работе низкотемпературного кристаллизатора. Но при этом толщина исследуемого образца составляет не более 40 мкм. Образец в виде раздавленной капли помещается на предметном стекле криокамеры, которая изолируется от окружающей среды и подключается к системе хладоснабжения. Криокамера расположена на столике биологического микроскопа. Процесс кристаллообразования записывался на ленту видеоманитфона.

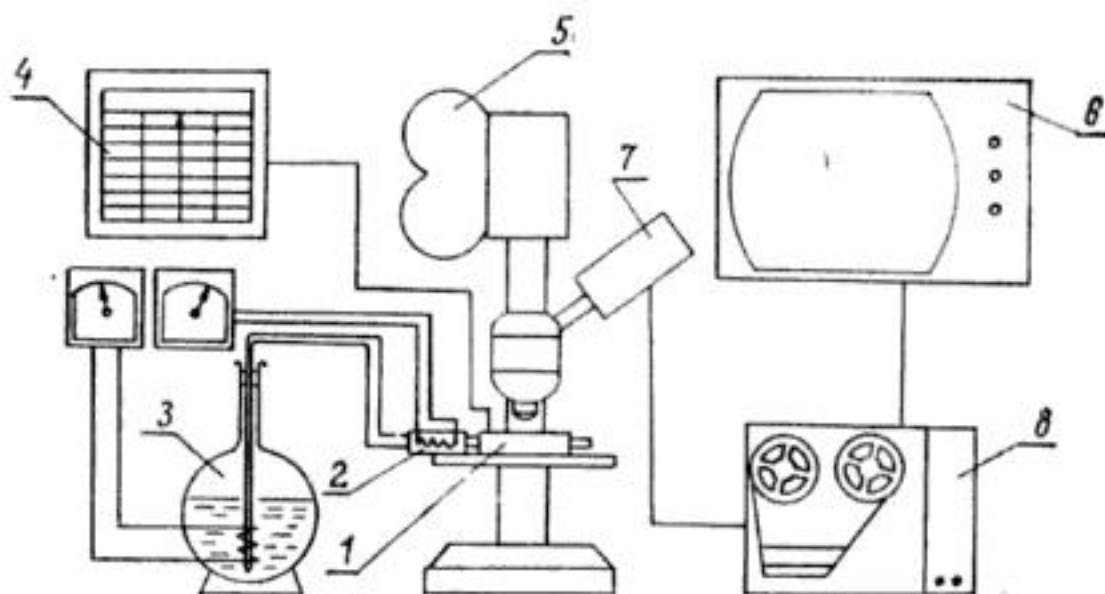


Рис. 1. Блок — схема экспериментального стенда: 1 — криокамера, 2 — промежуточный нагреватель для тонкой регулировки температуры, 3 — сосуд Дьюара, 4 — самопишущий прибор, 5 — кино- или фотокамера, 6 — телевизор.

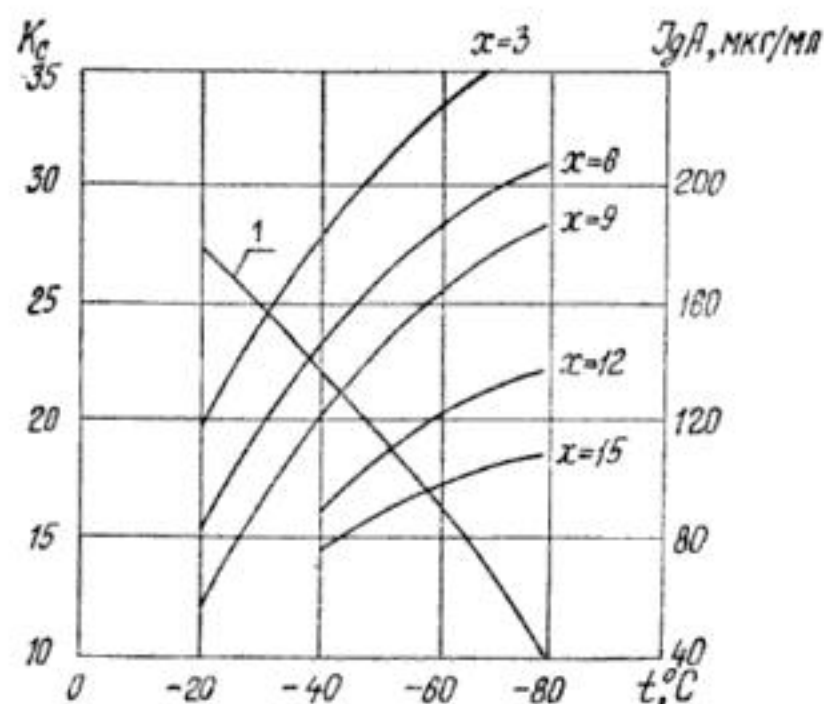


Рис. 2. Зависимость коэффициента сложности рисунка кристаллов льда и содержания иммуноглобулинов в материнском молоке от температуры замораживания. 1 — содержание иммуноглобулинов А.

Количественно кристаллообразование оценивалось с помощью коэффициента сложности рисунка кристаллов льда (K_c):

$$K_c = \frac{L}{\sqrt{\frac{\Pi}{F_{ед}} \cdot F_{кр}}},$$

где $F_{ед}$ — единичная площадь кадра исследуемого образца; L — суммарная длина границы кристаллов льда в единичной площади кадра; Π — ко-

личество кристаллов льда в единичной площади кадра; $F_{кр}$ — суммарная площадь кристаллов льда в единичной площади кадра.

На рис. 2 изображена зависимость коэффициента сложности рисунка кристаллов от температуры замораживания и степени удаления от теплоотводящей стенки. По мере удаления от поверхности теплоотвода рисунок кристаллов упрощается вследствие увеличения термического сопротивления.

Были проведены исследования для определения изменения качества материнского молока при замораживании.

Исследование содержания Jg, A, M, G проводилось с помощью метода простой радиальной иммунодиффузии по Mancini [3]. Принцип метода ос-

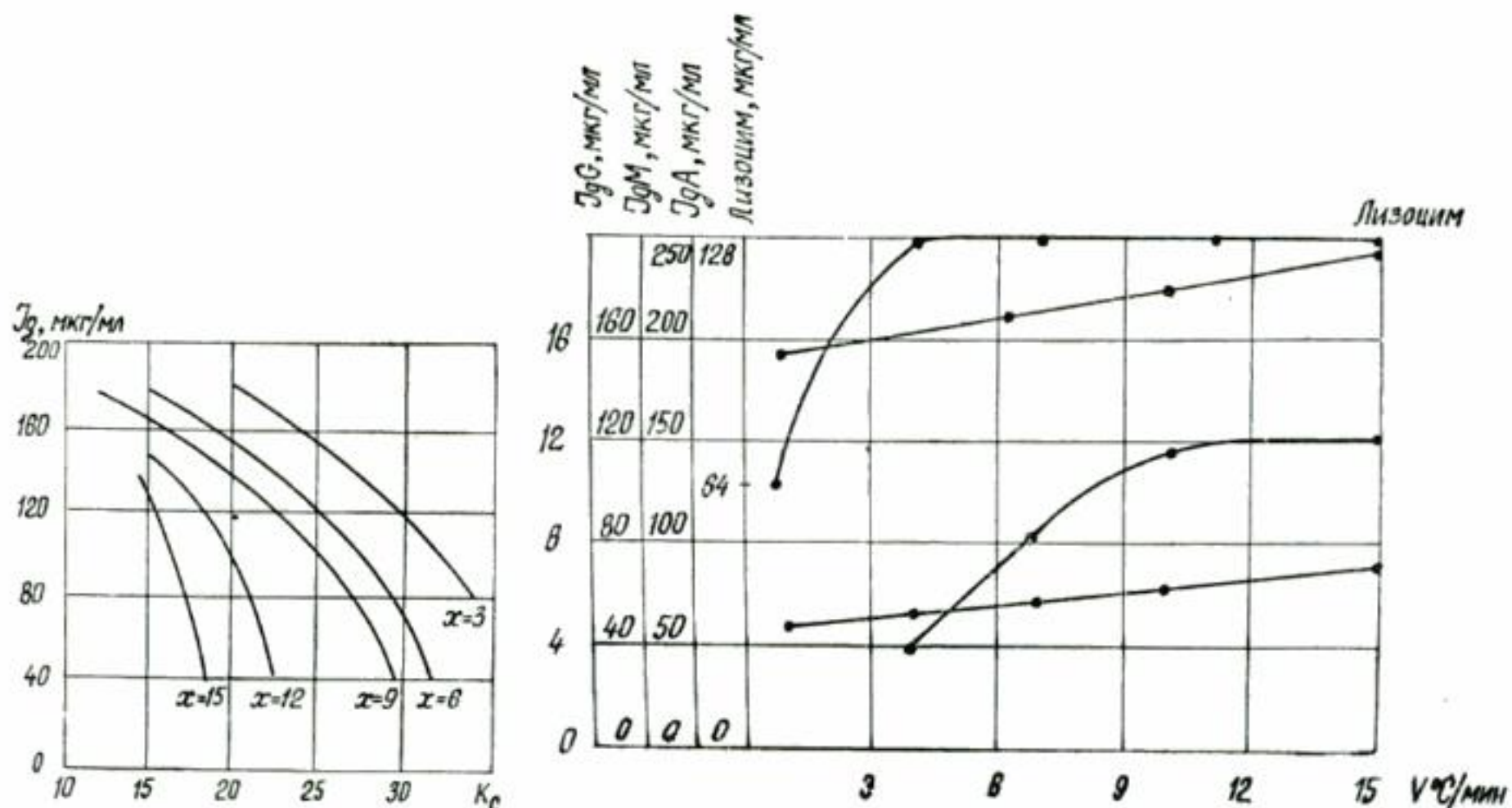


Рис. 3. Зависимость содержания иммуноглобулинов в материнском молоке от коэффициента сложности рисунка кристаллов льда.

Рис. 4. Изменение содержания иммунных веществ в материнском молоке при размораживании.

нован на диффузии находящихся в исследуемом материале иммунных белков в агаровом геле, содержащем моноспецифические АГ к различным классам иммуноглобулинов. Точность метода составляет ± 3 мг/100 мл. Для определения Jg в биологических жидкостях использовались антисыворотки и стандарты к иммуноглобулинам сыворотки крови человека производства Sevac (ЧССР).

На рис. 2 (кривая 1) видно, что с понижением температуры замораживания содержание иммуноглобулинов заметно снижается, это можно объяснить частичной денатурацией белка при низких температурах.

Наблюдается значительное снижение содержания иммуноглобулинов с увеличением коэффициента сложности рисунка (рис. 3). Влияние скорости размораживания на содержание иммуноглобулинов А, М, G и лизоцима показано на рис. 4. При скорости размораживания от 1 до 10 °С/мин в готовом продукте уменьшалось количество иммунных веществ.

Проведенные исследования позволили рекомендовать для холодильного консервирования материнского молока температуру $-20 \div -40$ °С, обеспечивающую максимальное сохранение иммунных веществ. Процесс размораживания продукта проводить со скоростью от 10 °С/мин и выше.

1. Аршавский И. А. Физиологическое обоснование вскармливания грудью новорожденных детей. — Вопросы охраны материнства, 1952, т. XI, № 5, с. 45—56.
2. Осипов С. Н. Разработка процессов низкотемпературного консервирования культурных сред и комбинированных мясopодуков. — Автореф. .. канд. техн. наук. М., 1982, с. 8.

Московский технологический институт
мясной и молочной промышленности,
Всесоюзный научно-исследовательский
институт пищевых концентратов промышлен-
ности и специальной пищевой технологии,
Институт питания АМН СССР, г. Москва

Поступила 24.09.84.

УДК 577.322

С. И. Аксенов, И. И. Гаврилова, М. Г. Гангард, О. П. Ревокатов
ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДА С МАКРОМОЛЕКУЛАМИ БЕЛКОВ
МЕТОДОМ СПИНОВОГО ЭХА ЯМР

Одной из основных задач в области фундаментальных и прикладных исследований криобиологии является раскрытие механизмов криодеструкции и криопротекции на различных уровнях биологической организации и, в первую очередь, на молекулярном уровне.

К настоящему времени накоплен достаточно обширный материал по изучению физико-химических факторов, обуславливающих повреждение биологических систем при замораживании, в частности, по вопросам дегидратации макромолекул вследствие кристаллизации воды, денатурации макромолекул в результате их пространственного сближения и взаимодействия полярных групп с потерей молекул воды, изменения состава, концентрации и pH раствора макромолекул, что приводит к конформационным изменениям молекул и изменениям их функций [4, 5, 6, 7].

Изучение характера взаимодействия малых органических молекул (используемых в качестве криопротекторов в криобиологии) с макромолекулами белка имеет важное значение для раскрытия механизмов криоповреждения и криозащиты биологических объектов.

Нами исследовалось взаимодействие криопротекторов (КП) (на примере диметилсульфоксида) с макромолекулами сывороточного альбумина быка (САБ) и иммуноглобулина (*JgG*) методом спинового эха ЯМР [1]. Использовался САБ фирмы Calbio chem. (США), очищенный от жирных кислот, электрофоретически однородный и *JgG*. Препараты белков для опытов получали путем лиофильного высушивания их растворов в D_2O ; дейтерированный диметилсульфоксид (ДМСО) отечественного производства, дважды перегнанный.

Измерения времен ЯМР-релаксации T_1 и T_2 и коэффициента самодиффузии D [2] проводились с помощью импульсного когерентного ЯМР-спектрометра Bruker — ВКР 322S на резонансной частоте 38,600 МГц. Для измерения T_1 использовалась импульсная последовательность 90° — 90° — 180° , а T_2 и D определялись с помощью импульсной последовательности Карра-Парсела. Температурные измерения проводились с помощью газового термостата с продувом азота, испаряемого из сосуда Дьюара. Значение температуры определялось при помощи термопары медь-константан. Точность поддержания температуры была не хуже $0,5^\circ C$; точность измерения T_1 и T_2 не хуже 2,5 %; точность относительных значений D — 4 %; линейность градиента в объеме ЯМР-датчика не хуже 5 %, максимальное значение градиента составляло 14,6 гс/см.

Кривая восстановления продольной намагниченности образца с белком однокомпонентна, а для T_2 имеет сложный характер, резко выраженный при низких температурах и при низких концентрациях ДМСО. Эта кривая состоит из быстроспадающего, медленноспадающего и промежуточного компонентов. Быстроспадающий компонент при положительных температурах относится к протонам белка [2], а медленноспадающий — к протонам ДМСО. При отрицательных температурах доля быстроспадающего компо-

нента не может быть объяснена лишь за счет протонов белка, так как вместе с белком вымерзает и часть ДМСО.

На рис. 1 и 2 приведены температурные зависимости времен ЯМР-релаксации T_1 и T_2 для протонов ДМСО в D_2O без белка и при добавлении 5 % САБ и JgG. Без белка T_1 и T_2 близки, исключая очень низкие температуры. При добавлении белка наблюдается укорочение времен T_1 и T_2 , но T_2 меняется больше. Это свидетельствует о появлении молекул ДМСО, характеризующихся временем большим, чем время корреляции для поступательного и вращательного движения молекул ДМСО в отсутствие белка. При росте концентрации ДМСО в растворе при одной и той же температуре это время уменьшается. При понижении температуры различие в значениях T_1 и T_2 проявляется тем сильнее, чем меньше концентрация ДМСО. В рас-

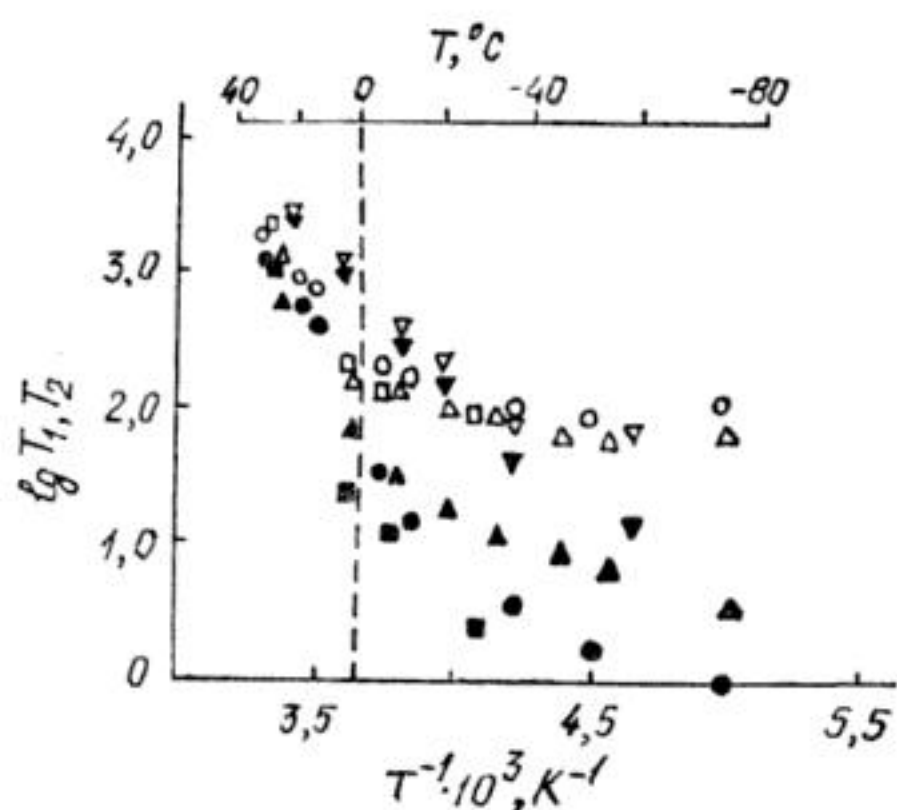


Рис. 1. Температурные зависимости времен ЯМР-релаксации T_1 и T_2 протонов ДМСО в отсутствие белка (∇ , $\blacktriangledown$) и в присутствии 5 % САБ ($\square$, $\blacksquare$ — 3 %-ный ДМСО; $\circ$, $\bullet$ — 7 %-ный ДМСО; $\triangle$, $\blacktriangle$ — 30 %-ный ДМСО в растворе). Значки, относящиеся к T_2 , зачернены.

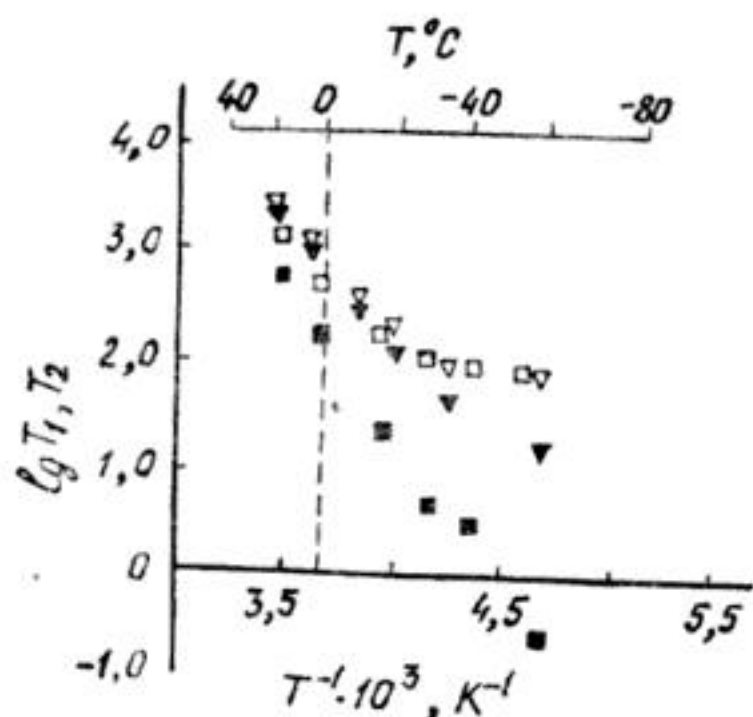


Рис. 2. Температурные зависимости времени ЯМР-релаксации T_1 и T_2 протонов ДМСО в отсутствие белка (∇ , $\blacktriangledown$) и в присутствии 5 % JgG ($\square$, $\blacksquare$ — 3 %-ный ДМСО). Значки, относящиеся к T_2 , зачернены.

творах разных белков наблюдается аналогичный ход температурных зависимостей T_1 и T_2 . При глубоко отрицательных температурах значения T_1 для всех образцов слабо чувствительны к фазовому состоянию системы. По-видимому, это связано с тем, что определяющее влияние на T_1 оказывает не движение самих молекул, а вращение метильных групп в пределах молекулы ДМСО.

Дополнительная информация о взаимодействии молекул ДМСО с белком была получена в результате исследования кривых спада спинного эха от протонов ДМСО в растворе белка, а также изменения T_1 , T_2 и D протонов воды в белковом растворе без ДМСО и при добавлении ДМСО.

При увеличении количества наблюдаемых протонов в растворе доля быстроспадающего компонента убывает от 1/3 для 3 %-ного ДМСО в растворе до 1/6 при 7 %-ном и 1/9 при 10 %-ном содержании ДМСО в растворе. При этом во всех случаях количество протонов ДМСО, дающих быстроспадающий компонент, составляет 1 %. Ниже приведены данные температурных зависимостей отношения количества протонов, дающих быстроспадающий компонент, к общему числу протонов (А, %) и количества протонов, дающих медленнопадающий компонент, к общему числу протонов (В, %) образца, содержащего 10 % ДМСО и 5% САБ:

ТК	302	285,9	283,5	281,1	273,2	261
А, %	12,5	17	35	41	65	69
В, %	87,5	83	65	59	35	31

Приведенные данные свидетельствуют о преимущественном концентрировании молекул ДМСО вблизи макромолекулы белка, которое особенно резко выражено при отрицательных температурах.

Отношение времен ЯМР-релаксации T_1/T_2 для протонов воды без белка было ~ 1 , в белковом растворе без ДМСО ~ 2 , а при добавлении 5 %-ного ДМСО $\sim 1,5$; коэффициент самодиффузии D при этом уменьшался от 2,71 до 2,05 относительных единиц (добавлялся дейтерированный ДМСО, доля H_2O и HDO в смеси $H_2O - HDO - D_2O$ составляла около 10 %). Это свидетельствует о связывании ДМСО белковой молекулой. Данные об изменении значений T_1 , T_2 и D протонов ДМСО в зависимости от времени хранения (при температуре порядка $0^\circ C$) белкового раствора с различным содержанием КП приведены ниже:

	T_1	T_2	T_1/T_2	D
3%-ный ДМСО свежеприготовленный	1,73	1,05	1,65	1,22
То же 3 суток хранения	1,36	0,752	1,8	1,72
То же 15 суток хранения	1,02	0,46	2,22	2,24
10%-ный ДМСО свежеприготовленный	1,88	1,22	1,55	1,04
То же 16 суток хранения	1,58	0,813	1,7	1,46

Из этих данных следует, что при хранении образца с 10 %-ным КП изменения T_1 , T_2 и D значительно меньшие, чем при его хранении с 3 % КП. Это можно объяснить тем, что на опыте наблюдаются некоторые усредненные значения T_2 , T_1 и D от протонов молекул, связанных с белком, и свободных молекул. Поэтому, несмотря на одинаковый эффект налипания молекул КП на белок в обоих случаях, он более заметен для образца с меньшим количеством КП.

Анализ вышеизложенных результатов экспериментов позволяет сделать вывод, что при уменьшении ДМСО в растворе происходит его преимущественное перераспределение вблизи макромолекулы белка. За счет этого уменьшается T_2 прот. н. ДМСО и одновременно уменьшается доля связанной воды, взаимодействующей с белком (1 молекула белка связывает примерно одинаковое по весу количество ДМСО). Этот вывод важен для понимания механизма криопротекции биологических объектов: образование слоя молекул ДМСО вокруг макромолекулы белка предохраняет ее от повреждения при понижении температуры.

Эти данные подтверждают полученные ранее [3] методом спиновых меток ЭПР результаты по повышению вязкости среды в районе спиновой метки и по вытеснению молекулами КП стероидного зонда из гидрофобной полости макромолекулы белка.

1. Абрагам А. Ядерный магнетизм. — М.: Изд-во иностр. лит., 1961, — 340 с.
2. Аксенов С. И., Филатов А. В. Сравнительное исследование характеристик спада спинового эха ЯМР протонов различных глобулярных белков в воде. — Биофизика, 1979, 24, № 4, с. 602—605.
3. Иванов Л. В., Гаврилова И. И., Моисеев В. А. Исследование действия низких температур и криопротекторов на структуру мембран эритроцитов методом спин-меток. — В кн.: Механизмы криоповреждения и криозащиты. Киев: Наук. думка, 1977, с. 33.
4. Lovelock J. E. Denaturation of lipid-protein complexes as a cause of damage by freezing. — Proc. Roy. Soc. (Biol.), 1957, 147, p. 427—433.
5. Mazur P. Causes of injury in frozen and thawed cells. — Fed. Proc. Amer. Soc. Exp. Biol., 1965, 24, 1, p. 175—182.
6. Meryman H. T. Freezing injury prevention in living cells. — Annual Rev. Biophys. Bioeng., 1974, 3, p. 341—363.
7. Ulirich H., Heber V. Über die schutzwirkung der zucker bei der frostresistenz von winterweizen. — Pflanze, 1957, 48, st. 724—728.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова,

Поступила 11.05.85.

Институт проблем криобиологии и криомедицины АН УССР, г. Харьков

И. А. Исмаилов, Э. З. Эмирбеков

АКТИВНОСТЬ ГЛУТАМИНАЗЫ ПЕЧЕНИ КРЫС И СУСЛИКОВ ПРИ ГИПОТЕРМИИ

Глутаминаза, являясь ключевым ферментом азотистого обмена, играет метаболическую и медиаторную роль в тканях животного организма [6]. В ткани печени, где идет активная нейтрализация свободного аммиака, глутаминаза главным образом поставляет глутаминовую кислоту для цикла трикарбоновых кислот [2]. Охлаждение теплокровных животных приводит к значительному изменению азотистого обмена [5, 4], вызывая дискоординацию в системе освобождения и связывания аммиака. При выяснении механизма влияния гипотермии на метаболическую функцию глутаминазы значительный интерес представляет изучение ее активности в печени незимоспящих и зимоспящих животных, по разному реагирующих на охлаждение.

Эксперименты проводились на лабораторных белых крысах и сусликах малых (*Citellus pygmaeus pall.*), которых помещали в холодовые камеры с циркулирующей водой ($t = 3 - 5^{\circ}\text{C}$) [1]. Ректальную температуру снижали до 30, 20, 19 и 10°C соответственно за 15, 30 и 55—60 мин. В качестве контроля брали бодрствующих животных.

Подопытных и контрольных животных декапитировали и извлекали печень. 2 %-ный гомогенат готовили на холодной (4°C) бидистиллированной воде или в 0,15 М растворе KCl с помощью стеклянного гомогенизатора с тефлоновым пестиком.

Для определения активности глутаминазы [3] в 0,2 мл гомогената добавляли 0,2 мл 50 мМ раствора глутамината, 0,2 мл 0,5 М фосфатного буфера (рН 7,9), 0,4 бидистиллированной воды. Конечный объем пробы составлял 1 мл. Смесь инкубировали при 37, 30, 20 и 10°C в течение 15 мин. По окончании инкубации в пробы добавляли 2,5 мл нитропруссид-фенолового реактива, тщательно перемешивали, добавляли 2,5 мл 1 %-ного раствора гипохлорита калия и после повторного перемешивания инкубировали в течение 30—40 мин при 37, 30, 20 и 10°C до появления синей окраски. В контрольные пробы гомогенат печени добавлялся после нитропруссид-фенольного реактива. Активность глутаминазы (КФ.3.5.1.2) определялась по стандартной калибровочной кривой в пересчете на количество азота-аммиака, образовавшегося в результате ферментативного расщепления глутамината.

Исследования обнаружили, что у интактных крыс и сусликов (нормотермических, бодрствующих) температура инкубации по-разному влияет на активность глутаминазы (таблица). Так, у крыс при температуре инкубации 30°C активность фермента в гомогенате печени почти не меняется, а у сусликов снижается на 1/3. Влияние температуры инкубации (20 и 10°C) на активность фермента у незимоспящих и зимоспящих животных одинакова. При гипотермии 30°C активность глутаминазы печени крыс (измеренная при температуре инкубации 37°C) достоверно снижается, а сусликов не изменяется по сравнению с таковой у контрольных животных.

Измерение ферментативной активности в гомогенате при температуре инкубации, соответствующей температуре охлажденного организма (30°C), обнаруживает ее значительное снижение у крыс и сохранение почти одинакового уровня по сравнению с активностью глутаминазы при температуре инкубации 37°C у этих животных.

Глубокая гипотермия при 20°C , вызывающая у крыс состояние «холодового наркоза», сопровождается резким снижением активности глутаминазы как при температуре инкубации 37°C , так и при 20°C . Суслики же при принудительном охлаждении до 20°C сохраняют бодрствующее состояние, и активность исследуемого фермента при температуре инкубации 37°C почти не изменяется, а при температуре, соответствующей темпера-

Т а б л и ц а. Активность глутаминазы печени крыс и сусликов при гипотермии (в мкМоль N—NH₃ на 1 г свежей ткани, $M \pm m$; $n = 5-6$)

Температурные условия определения ферментативной активности, °С	Температура тела исследуемых животных, °С			
	нормотермия 37—38 (контроль)	гипотермия		
		30	20	10
Крысы				
37	39,3±1,17	33,2±3,6	26,4±0,8*	
30	38,6±2,27	26,1±2,9*	22,4±1,55*	
20	24,5±1,075	13,2±0,6*	12,1±0,6*	
10	13,8±0,32	8,6±1,16*	5,7±0,86**	
Суслики				
37	47,25±1,75	51,6±3,17	48,8±1,56	51,3±1,8
30	30,7±1,34	48,7±1,3*	38,7±0,64**	42,5±1,36*
20	22,5±1,13	24,8±0,93	20,1±0,66**	32,1±1,43**
10	13,4±0,9	14,7±0,87	13,6±0,58	22,2±0,7**

П р и м е ч а н и е: * — достоверные различия по отношению к контролю; ** — по отношению к предыдущему этапу гипотермии.

туре охлажденного организма (20 °C), активность фермента снижается почти в 2,5 раза по сравнению с таковой при температуре инкубации 37 °C. Суслики впадают в состояние «холодового наркоза» при гипотермии 10 °C. Как видно из таблицы, даже при глубоком охлаждении у сусликов активность глутаминазы печени, измеренная при температуре инкубации 37 °C, не изменяется и при 10 °C также сохраняется на довольно высоком уровне. Наши результаты показывают, что в отличие от крыс, у сусликов при охлаждении организма наблюдается быстрая обратимость активности глутаминазы печени: при всех формах гипотермии активность фермента при температуре инкубации 37 °C поднимается до уровня, наблюдаемого у контрольных животных. Зависимость активности исследуемого фермента от температуры охлаждения животных (от 37 до 10 °C) указывает на более высокие значения его активности у сусликов.

1. Абдуллаев Р. А., Эмирбеков Э. З. Содержание свободных аминокислот в мозге при гипотермии и в разные сроки постгипотермического периода. — *Вопр. мед. химии*, 1980, 24, № 6, с. 802—807.
 2. Исмаилов И. А. Влияние различной степени гипотермии и гибернации на обменные процессы глутамин и глутаминовой кислоты в головном мозгу: Автореф... канд. биол. наук. — Ереван. 1982. — 23 с.
 3. Магарламов А. Г., Зайкина А. А., Беляева Л. В. Прямой фенол-гипохлоритный метод определения глутаминазной активности. — *Укр. биохим. журнал*, 1979, 51, № 6, с. 549—551.
 4. Эмирбеков Э. З. Функциональная нейрохимия. — Махачкала, 1980. — 120 с.
 5. Berl S. Biochemical consequences of compartmentation of glutamate and associated metabolite. In: *Metabolic compartmentation in the brain*. Eds. R. Balazs and I. E. Gremer. — Machillan press Ltd, 1982. — p. 3—17.
- Kvamme E. In: *GABA — Biochemistry and CNS Function* Eds Mandel P., De Feudis F. M. Y.: Plenum Press, 1979. — p. 111—138.

Дагестанский государственный университет,
г. Махачкала

Поступила 03.04.85

С. И. Дрокин, Е. Ф. Копейка

ВЛИЯНИЕ КРИОПРОТЕКТОРОВ НА ЛИПИДЫ
СПЕРМАТОЗОИДОВ КАРПА

Изучение механизма действия криопротекторов на липиды представляет значительный интерес для криобиологии [2], однако работ, посвященных исследованию данного вопроса, сравнительно немного. Мало изучено влияние криопротекторов на липиды сперматозоидов рыб. Известно лишь, что происходит изменение характера кристаллизации воды и некоторых свойств мембраны [1]. Установлено также, что глицерин (ГЛ), диметилсульфоксид (ДМСО) и другие криопротекторы способны значительно уменьшить поверхностный заряд монослоев основных фракций фосфолипидов (ФЛ) и могут вызвать слияние клеточных мембран путем действия на полярную группу мембранных ФЛ и на поверхностный потенциал мембраны [8]. При взаимодействии ГЛ с ФЛ мембран клеток мозга установлено накопление фосфатидилглицерина [6]. Липидный состав сперматозоидов рыб также изучен относительно слабо. Имеются единичные работы, в которых отражен состав ФЛ и нейтральных липидов сперматозоидов рыб [3, 4].

В связи с тем, что при замораживании сперматозоидов рыб в основном применяются криопротекторы проникающего типа, был исследован липидный состав сперматозоидов карпа после эквilibрации с ГЛ, ДМСО и этиленгликолем (ЭГ).

Сперму карпа разбавляли растворами, содержащими криопротекторы в соотношении 1 : 1, и выдерживали при температуре $+5^{\circ}\text{C}$ в течение 10 и 30 минут. Отделяли сперматозоиды от семенной жидкости центрифугированием при 1500×15 минут. Экстрагировали липиды, как описано в [5]. Для улучшения экстракции суспензию в смеси хлороформ-метанол (1:1) озвучивали ультразвуком при частоте 22 кГц в течение трех минут. Аликвоты липидного экстракта минерализовали и определяли в них суммарное содержание фосфора ФЛ. Разделение нейтральных липидов осуществляли

Таблица. Фосфолипидный состав сперматозоидов карпа в контроле и после воздействия криопротекторов (мкг р/10⁹ сперматозоидов)

Криопротекторы		Глицерин				Этиленгликоль				Диметилсульфоксид				Конт- роль
Ф.Л	Концентрация, %	9		20		9		20		9		20		0
	Время выдержки, мин	10	30	10	30	10	30	10	30	10	30	10	30	
Фосфатидилсерин (ФС)		1,44	1,6	1,2	1,32	0,92	1,2	1,0	0,8	1,56	1,32	0,92	0,76	1,68
Фосфатидилинозит (ФИ)		1,16	1,56	1,0	0,92	0,64	0,72	0,76	0,76	1,32	1,12	0,6	0,7	1,44
Сфингомиелин (СФМ)		3,6	3,4	3,08	3,07	2,0	1,96	2,0	2,44	3,48	4,04	1,48	2,44	3,8
Плазмалогенфос- фатидилхолин (ПХФ)		1,72	2,4	1,68	1,16	0,72	1,12	1,12	1,4	0,92	1,48	1,04	1,03	1,92
Фосфатидилхолин (ФХ)		10,08	9,52	9,2	9,24	4,96	6,44	6,76	5,64	10,76	11,4	4,82	6,64	11,24
Плазмалогенфосфа- тидилэтаноламин (ПФЭА)		2,88	2,72	2,52	2,68	1,16	1,4	1,2	1,88	1,68	3,16	0,92	1,24	3,4
Фосфатидилэта- ноламин (ФЭА)		7,2	5,6	5,68	5,6	4,04	4,36	4,44	3,44	6,88	7,34	2,68	3,96	8,0
$p \leq 0,05$ Σ		28,08	26,80	24,36	23,99	14,44	17,20	17,28	16,36	26,60	29,86	12,46	16,77	31,48

с помощью одномерной, а ФЛ — с помощью двухмерной и тонкослойной хроматографии [7].

Как видно из таблицы, в результате хранения спермы карпа в присутствии криопротекторов происходит существенное уменьшение количества ФЛ. Наименьшее влияние оказывает ГЛ, а под воздействием ЭГ и ДМСО количество ФЛ уменьшается в среднем на 45 %. Однако если ФЛ уменьшается и под действием 9 %-ной концентрации ЭГ, то ДМСО оказывает сходное действие лишь при 20 %-ной концентрации. Обращает на себя внимание тот факт, что после 30-минутной выдержки спермы с криопротекторами количество ФЛ уменьшается в некоторых случаях в меньшей степени, чем после 10-минутной выдержки. Особенно хорошо это видно в результате контакта сперматозоидов с ДМСО. Увеличение времени выдержки более 10 минут не приводит к увеличению потерь ФЛ. Возможно, существует временной оптимум повреждения или повышается экстрагируемость при увеличении времени экспозиции.

При анализе качественного состава ФЛ были идентифицированы фосфатидилсерин, фосфатидилинозит, сфингомиелин, плазмагенфосфатидилхолин, фосфатидилхолин, плазмалогенфосфатидилэтаноламин, фосфатидилэтаноламин, однако как в контроле, так и после воздействия криопротекторов лизофосфатидилхолин определялся в следовых количествах. Таким образом, криопротекторы не оказывают существенного действия в сторону деградации жирнокислотных цепей ФЛ.

В процессе исследования хроматограммы нейтральных липидов в контроле были идентифицированы холестерин, свободные жирные кислоты и эфиры холестерина (рис. 1). После контакта сперматозоидов с криопротекторами во всех случаях появились новые фракции нейтральных липидов, идентифицированные как диглицериды (ДГЛ), а в суспензии с ЭГ и 20 %-ным ДМСО еще и моноглицериды (МГЛ). Следовательно, можно предположить наличие активации фосфолипазы, способной разрывать эфирную связь, соединяющую ДГЛ с фосфатом. Причем активация наступает сразу же после добавления криопротекторов, и время ее действия ограничивается десятью минутами.

Суммируя полученные результаты, делаем вывод, что под действием 9 %-ной и 20 %-ной концентраций криопротекторов проникающего типа происходит существенная деградация ФЛ. Отрыв полярных головок ФЛ приводит к появлению МГЛ и ДГЛ. Сродство этих нейтральных липидов с мембраной значительно выше, чем у ФЛ. Своими аполярными гидрофобными жирнокислотными хвостами они включаются в гидрофобную фазу мембраны. Обычно МГЛ и ДГЛ или отсутствуют, или находятся в мембранах клеток в малых количествах. В литературе нет данных об их влиянии на мембранные функции, но, несомненно, описанное превращение ФЛ в нейтральные липиды под влиянием криопротекторов может приводить к искажению свойств мембраны спермиев.

Полученные результаты свидетельствуют об одном из возможных последствий контакта сперматозоидов карпа с криопротекторами, но, возмож-



Рис. 1. Хроматограмма нейтральных липидов сперматозоидов карпа: в контроле (1) и после воздействия криопротекторов ГЛ, ДМСО и ЭГ (2, 3): ЭХЛ — эфиры холестерина, СЖК — свободные жирные кислоты, ХЛ — холестерин, ДГЛ — диглицериды, МГЛ — моноглицериды.

но, действие криопротекторов на сперматозоиды и их липиды значительно более многогранно.

1. *Актуальные проблемы криобиологии* / Под ред. Н. С. Пушкаря. — Киев: Наук. думка, 1981, — 606 с.
2. Белоус А. М., Бондаренко В. А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. — Киев: Наук. думка, 1982, — 255 с.
3. Дрокин С. И., Забелинский С. А., Копейка Е. Ф. Влияние низкотемпературной консервации на фосфолипиды и их жирные кислоты сперматозоидов рыбы белого амура *Stenopharyngodon idella* и индюка *Meleagris gallopavo*. — Журнал эволюционной биохимии и физиологии, 1985, № 1, с. 79—82.
4. Ким Е. Д., Жуковский В. М. Изменчивость аминокислотного и липидного состава спермы в онтогенезе самцов леща. — Докл. АН УССР, сер. Б., 1978, № 10, с. 930—935.
5. Bligh E. G., Dyer W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. — Can. J. Biochem. Physiol., 1959, 37, п. 911.
6. Chalifour R. J., Taki T., Kanfer J. N. Phosphatidylglycerol formation via transphosphatidylolation by rat brain extracts. — Can. J. Biochem., 1980, 58, N10, p. 1189—1196.
7. Horrocks L. A., Sun G. Y. Determination of the phospholipid composition including the alkenyl acyl and alkyl acyl components. — In: Research in Neurochemistry. Sec. III. Components of neutral tissues. Chap. 9; New York: Plenum Press, 1972, p. 1223.
8. Lucy J. A. Cell fusion. — Trends. Biochem. Sci. 1977, 2, N1, p. 17—20.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР, г. Харьков

Поступила 05.04.85

УДК 57.043.612.43

Л. Г. Карпенко

ВЛИЯНИЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ ДО -196°C И 10 %-НОГО ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДА НА СВЯЗЫВАНИЕ ^3H -НОРАДРЕНАЛИНА КЛЕТКАМИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

В настоящей работе представлены результаты изучения влияния различных скоростей замораживания и 10 %-ного раствора диметилсульфоксида (ДМСО) на процесс взаимодействия радиоактивного адренергического лиганда с соответствующими рецепторами тироцитов. Исследования проведены на щитовидных железах быка. Грубая фракция плазматических мембран 10000g была получена по методу Невилля [2]. Исследование связывания норадреналина выполнялось методом радиолигандного анализа при помощи ^3H -норадреналина фирмы Amersham (Англия). Подсчет радиоактивности проб производился на β счетчике фирмы Beckman (модель LS7800).

Данные о влиянии различных скоростей замораживания представлены в таблице. Видно, что после медленного замораживания изменений в величинах общего связывания норадреналина не происходит. После быстрого замораживания в 1,5 раза увеличивается общее связывание радиолиганда с мембранами за счет увеличения как специфического, так и неспецифического его компонентов.

Существенные изменения в исследуемом процессе вызывает добавление 10 %-ного раствора ДМСО, который значительно угнетает связывание адренергического лиганда — ^3H -норадреналина с рецепторами. Предварительная инкубация щитовидной железы с 10 %-ным раствором ДМСО и последующее замораживание со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ приводит к незначительному увеличению общего связывания гормона за счет возрастания неспецифического его компонента.

Быстрое и медленное замораживание тироцитов до температуры -196°C без криопротектора, а также медленное охлаждение с ДМСО оказывает на связывание ^3H -норадреналина соответствующими рецепторами различный по направленности и выраженности эффект, который, однако, не

Таблица. Влияние быстрого и медленного замораживания и ДМСО на связывание норадреналина мембранами тироцитов быка, фМ/мг белка

Условия эксперимента	Общее связывание	Неспецифическое связывание	Специфическое связывание	Количество связывающих мест	Константа ассоциации, M^{-1}
Контроль	3027 ± 594	1527 ± 377	1500 ± 428	2685	$7,3 \cdot 10^9$
10 %-ный ДМСО	$1747 \pm 278^*$	1161 ± 375	$586 \pm 206^*$	1000	$6,0 \cdot 10^9$
Замораживание 1— 3 °C/мин с 10 %-ным ДМСО	3684 ± 384	2198 ± 384	1486 ± 651	3000	$2 \cdot 10^{10}$
Замораживание 1— 3 °C/мин	3905 ± 593	2180 ± 368	1725 ± 451	3500	$8,1 \cdot 10^9$
Контроль	2618 ± 535	1178 ± 278	1440 ± 270	2500	$9 \cdot 10^9$
Замораживание 85— 100 °C/мин	$4584 \pm 664^*$	$2146 \pm 240^*$	$2438 \pm 464^*$	4000	$5,5 \cdot 10^9$

* — Достоверно по отношению к контролю ($p > 0,05$)

нарушает функционирование системы и связывание адренергических лигандов с соответствующими рецепторами.

Значительные изменения в процессе связывания норадреналина с адренорецепторами после действия 10 %-ного раствора ДМСО обусловлены, очевидно, способностью этого соединения взаимодействовать с функциональными группами рецепторных белков, липидами мембран, а также с гидратной оболочкой данных белков. Это взаимодействие может привести к изменениям конформационного состояния рецепторных белков, нарушениям белок-липидных взаимодействий внутри мембран [1], что может явиться причиной снижения способности адренорецепторов связывать норадреналин в мембранах тироцитов.

1. Jakob S. W., Herschler R. J., Bischel M. D. DMSO: effect on permeability of biological membranes. — Cur. Ther. Res. Clin. Exp., 1964, 6, N 2, p. 193—198.
2. Saltiel A. R., Powell—Jones C. H. J., Thomas C. G. I., Mayofen N. Regulation of thyroid adenylate cyclase: I. Guanyl nucleotide modulation of thyrotropin receptor-adenylate cyclase function. — Endocrinology, 1981, 109, N 5, p. 1578—1589.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР, г. Харьков

Поступила 14.06.85.

УДК 57.043.576.3 : 577.42 : 593.121

З. И. Успенская, Г. В. Николаева, Л. К. Лозина-Лозинский

ДЕЙСТВИЕ ГЛУБОКОГО ОХЛАЖДЕНИЯ НА ПРЕСНОВОДНЫЕ ПРОСТЕЙШИЕ В АКТИВНОМ СОСТОЯНИИ В ПРИСУТСТВИИ КРИОПРОТЕКТОРА ПОЛИЭТИЛЕНОКСИДА

Изучение устойчивости свободноживущих простейших к замораживанию и глубокому охлаждению представляет интерес с различных сторон. Давно известно, что цисты покоя простейших хорошо переносят глубокое охлаждение и состояние анабиоза без обработки их защитными веществами. Иначе обстоит вопрос с пресноводными простейшими, не образующими цист покоя или организма в состоянии активной жизнедеятельности. Они, как правило, не поддаются криоконсервации даже в присутствии криопротекторов. Изучение реакций на замерзание и глубокое охлаждение простейших, объединяющих в себе признаки клетки и целого организма, позволит глубже подойти к пониманию механизмов криоповреждений и выяснить условия, необходимые для успешной их криоконсервации.

Объектом лабораторного изучения холодоустойчивости у простейших служила *Acanthamoeba proteus*. Предпринятые ранее попытки повысить холодоустойчивость амёб обработкой глицерином не увенчались успехом; не дало

положительных результатов и использование диметилсульфоксида (ДМСО) [5]. Нами был выбран полимерный криопротектор полиэтиленоксид (ПЭО) с молекулярной массой 400, который, как считается, не проникает в клетки

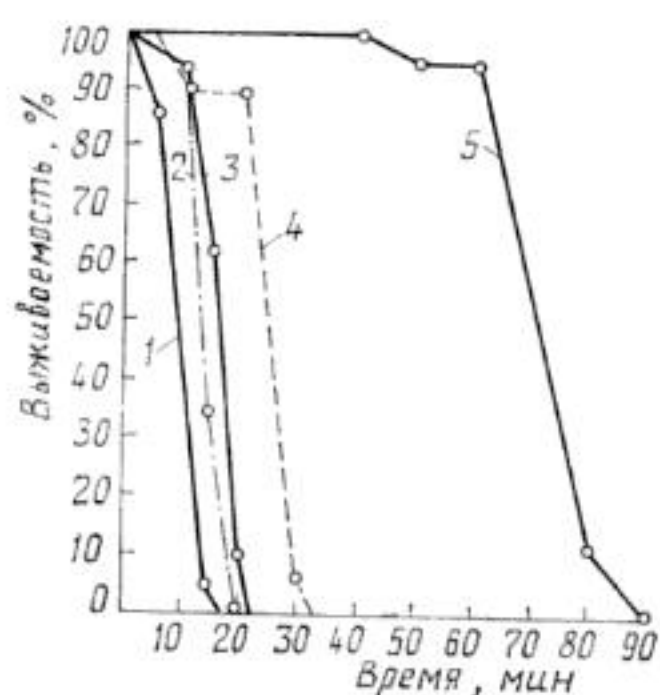


Рис. 1. Зависимость выживаемости амеб от продолжительности охлаждения в замораживателе R-201.

Температура в замораживателе, °C: 1 — 50, 2 — 40, 3 — 30, 4 — 20, 5 — 10.

Экспозиция при окончательной температуре суспензии: —10 и —20 °C — 10 мин; —30, —40 и —50 °C — 1 мин.

лаждение. Исследовалось действие температур от 0 до —196 °C. Размораживание во всех случаях осуществлялось быстро: в водяной бане при $t = 50$ °C. Жизнеспособность простейших после замораживания-оттаивания определялась по их двигательной активности и по способности к клонированию. Был также применен метод люминесцентного анализа клеток, окрашенных акридиновым оранжевым, с помощью охлаждающей камеры [2].

При замораживании амеб под защитой ПЭО при различных температурах в пределах до —70 °C жизнеспособность клеток после оттаивания зависела от экспозиции в замороженном состоянии и глубины охлаждения (рис. 1). Без криопротектора амебы обычно полностью разрушались во время оттаивания, даже при охлаждении лишь до температур —2÷—3 °C. Охлаждение до —196 °C при любом режиме и под защитой ПЭО вызывало 100 %-ную гибель амеб. Замерзание суспензии происходило при температурах около —4 °C, причем в клетках отмечена кристаллизация, что было показано микроскопическими наблюдениями в охлаждающей камере. Таким образом, выживаемость амеб в замерзшей среде лимитируется прежде всего сроком их пребывания при температуре ниже точки замерзания. Скорость охлаждения не имела существенного значения, если окончательная температура суспензии клеток не опускалась ниже —10 °C и продолжительность охлаждения не превышала 20 мин. Однако гибель амеб достигала 50 % при скорости охлаждения 0,35 °C/мин в случае, когда для охлаждения до —10 °C требовался большой срок — 70 мин (рис. 2). Увеличение скорости охлаждения свыше

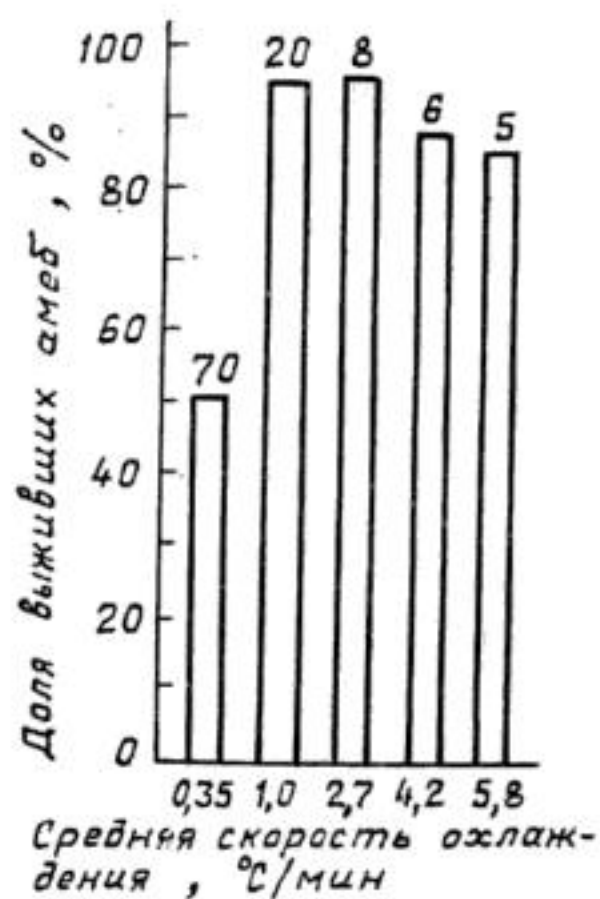


Рис. 2. Влияние скорости охлаждения на выживаемость амеб.

Цифры над столбиками — общая продолжительность охлаждения, мин.

Окончательная температура суспензии —10 °C при экспозиции 1 мин.

10 °С/мин и ультрабыстрое замораживание не способствовали лучшему переживанию амёб.

Заметное влияние на устойчивость к замерзанию под защитой ПЭО оказывает физиологическое состояние амёб. Если в течение суток им не давать корм, клетки амёб совсем не переносят замораживания. Амёбы, получившие корм за несколько часов перед охлаждением, значительно устойчивее к замораживанию при разных температурах (табл. 1). Способность переносить замораживание зависит также от генотипических свойств амёб. Амёбы штамма С, отличающиеся небольшим количеством кристаллов в цитоплазме, менее устойчивы к замораживанию, что зависит как от условий охлаждения, так и от некоторых факторов морфо-физиологического порядка. Такие же особенности обнаруживаются при работе с клетками других типов. Велика вероятность, что определяющим моментом при этом является состояние клеточных мембран, которые сразу же реагируют на различные внешние воздействия.

При одноэтапном охлаждении трофонтов инфузорий *Colpoda* под защитой ПЭО с разными скоростями замораживания и отогревания не удалось получить переживания инфузорий при температуре ниже -70°C (рис. 3). Наилучший результат был получен при относительно медленном

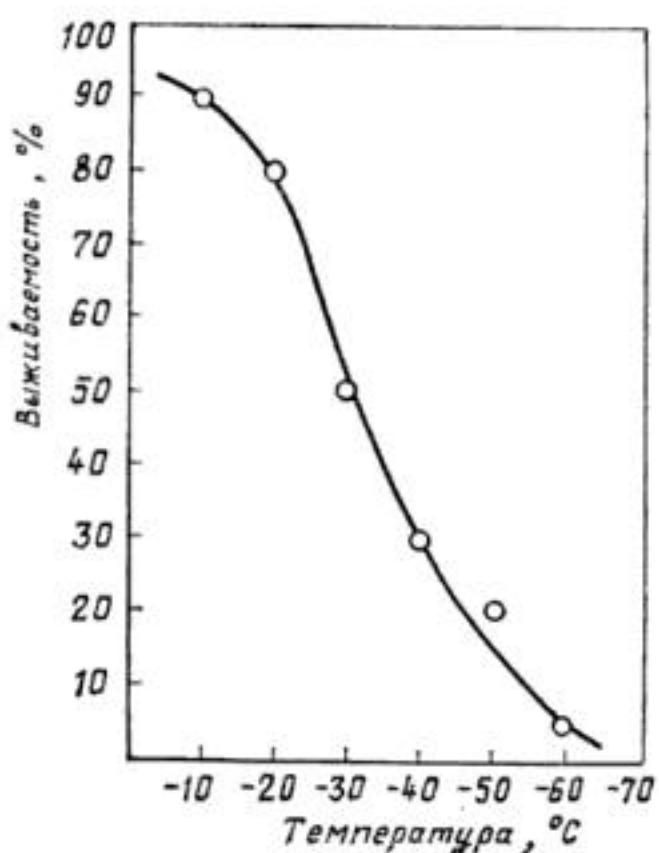


Рис. 3. Выживаемость трофонтов инфузорий при одноэтапном охлаждении под защитой ПЭО при 15-мин экспозиции в замороженном состоянии.

охлаждении около 10 °С/мин. В экспериментах с быстрым охлаждением выживаемость инфузорий ниже на 15—20 %, чем при медленном замораживании. Ультрабыстрое охлаждение в стаканчиках из фольги до температуры -196°C позволило в некоторых случаях получить живые клетки лишь после очень непродолжительного пребывания в жидком азоте — до 1 мин. Но эти пережившие трофонты не были жизнеспособны: они не клонировались и погибали в течение 1 сут. При использовании двухэтапного охлаждения трофонты охлаждались со скоростью 10 °С/мин до -30°C и выдерживались при этой температуре некоторое время — не менее 30 мин. Затем замороженные образцы быстро охлаждались со скоростью 60 °С/с до температуры жидкого азота. Такой режим замораживания позволял во многих случаях получить жизнеспособные клетки, но выживаемость была низкой и результаты нестабильны. Вероятно, криоповреждения возникают на обоих этапах замораживания, и для того, чтобы получить положительные результаты, необходимо изменить метод криопротекции.

Используемый криопротектор, согласно литературным данным, относится к экзоцеллюлярным и почти не проникает в клетку. Известно также, что он представляет собой полидисперсное соединение, содержащее как высоко-, так и низкомолекулярные фракции, и низкомолекулярные фракции могут проникать в клетку [4]. Допустив, что все же имеет место медленное проникновение молекул ПЭО в трофонты инфузорий, мы провели экспери-

Таблица 1. Влияние питания на устойчивость *A. proteus* (штамм С) к замерзанию под защитой 15%-ного ПЭО

Конечная температура суспензии амёб, °C	Скорость охлаждения, °C/мин	Продолжительность охлаждения, мин	Амёбы, накормленные перед охлаждением		Голодные амёбы	
			число амёб	доля живых амёб, %	число амёб	доля живых амёб, %
—20	3,0	12	200	100	200	0
—30	4,0	13	200	75	200	0
—40	3,5	16	200	0	200	0
—40	12,0	5	150	26	200	0

охлаждении около 10 °С/мин. В экспериментах с быстрым охлаждением выживаемость инфузорий ниже на 15—20 %, чем при медленном замораживании. Ультрабыстрое охлаждение в стаканчиках из фольги до температуры -196°C позволило в некоторых случаях получить живые клетки лишь после очень непродолжительного пребывания в жидком азоте — до 1 мин. Но эти пережившие трофонты не были жизнеспособны: они не клонировались и погибали в течение 1 сут. При использовании двухэтапного охлаждения трофонты охлаждались со скоростью 10 °С/мин до -30°C и выдерживались при этой температуре некоторое время — не менее 30 мин. Затем замороженные образцы быстро охлаждались со скоростью 60 °С/с до температуры жидкого азота. Такой режим замораживания позволял во многих случаях получить жизнеспособные клетки, но выживаемость была низкой и результаты нестабильны. Вероятно, криоповреждения возникают на обоих этапах замораживания, и для того, чтобы получить положительные результаты, необходимо изменить метод криопротекции.

менты, в которых клетки перед замораживанием выдерживались в 5 %-ном растворе ПЭО в течение суток. Затем инфузории переносились в 20 %-ный раствор и замораживались в стаканчиках из фольги по двухэтапной схеме. При уменьшении объема замораживаемой суспензии клеток до 0,05 мл выживаемость повышалась (табл. 2). После размораживания пережившие клетки оставались жизнеспособными — хорошо клонировались и через сутки их темп деления не отличался от контроля.

Таблица 2. Выживаемость инфузорий *C. taurasi* под защитой ПЭО при двухэтапном охлаждении после выдерживания в 5 %-ном растворе ПЭО в течение суток

№ опыта	Доля выживших клеток, %, при разном объеме суспензии клеток, мл			
	0,5	0,2	0,1	0,05
1	6,1	5,5	8,0	9,1
2	5,0	4,8	9,0	10,4
3	4,9	5,7	8,8	9,8
4	6,4	5,6	10,2	9,0
5	4,9	6,1	9,8	11,2
6	6,0	6,0	8,1	10,5
7	5,2	5,9	10,2	9,1
8	4,2	6,3	11,2	10,5
9	6,0	5,8	8,4	9,0
10	4,8	5,3	9,1	10,6
Среднее	$5,35 \pm 0,7$	$5,70 \pm 0,9$	$9,28 \pm 0,5$	$9,96 \pm 0,4$

Таблица 3. Выживаемость инфузорий *C. taurasi* под защитой ПЭО при хранении в жидком азоте

Срок хранения, мес	Доля выживших клеток, %, при разном объеме суспензии клеток, мл			
	0,5	0,2	0,1	0,05
3	$6,4 \pm 0,4$	$6,1 \pm 0,6$	$7,2 \pm 0,5$	$10,1 \pm 0,2$
6	$4,8 \pm 0,8$	$6,3 \pm 0,3$	$11,2 \pm 0,4$	$11,3 \pm 0,6$
9	$5,6 \pm 0,9$	$5,9 \pm 0,4$	$9,1 \pm 0,8$	$9,1 \pm 0,3$
12	$3,3 \pm 0,7$	$3,8 \pm 0,5$	$8,8 \pm 0,7$	$7,5 \pm 0,7$
15	$4,7 \pm 0,9$	$4,8 \pm 0,4$	$7,7 \pm 0,5$	$4,4 \pm 0,6$
18	$3,9 \pm 0,6$	$4,2 \pm 0,2$	$6,6 \pm 0,4$	$5,5 \pm 0,3$
21	$4,1 \pm 0,3$	$5,7 \pm 0,5$	$7,3 \pm 0,7$	$6,4 \pm 0,4$
24	$4,4 \pm 0,7$	$4,8 \pm 0,5$	$6,3 \pm 0,4$	$7,2 \pm 0,2$

зеленого свечения клеточных структур возникают прозрачные несветящиеся ячейки или полости сотообразной формы. Эти полости представляют собой агрегаты крупных кристаллов льда, границей которых является вытесненная льдом светящаяся цитоплазма. По ее структуре можно составить некоторое представление о количестве замерзшей воды в клетке и о форме кристаллов льда и их агрегатов. При быстром замораживании амёб без криопротектора цитоплазма мгновенно приобретает бледно-зеленое равномерное свечение, что может явиться следствием образования мелкокристаллической структуры льда. Ячейки при этом не видны — они появляются в начале отогрева, когда происходит рост кристаллов. Во время отогревания конфигурация ячеек изменяется, а после таяния они исчезают. В среде с ПЭО переохлаждения обычно нет, и клетки замерзают одновременно со средой при температуре несколько ниже 0°. Ядра клеток обладают ярким зеленым

На основании этих данных были подготовлены эксперименты по выяснению возможности длительного хранения замороженных клеток инфузорий в жидком азоте. Трофонты *Colpoda* в стационарной фазе роста отбирались в стандартные ампулы, помещались в криопротекторную среду и замораживались по описанному методу. Материал находился в жидком азоте два года. Каждый месяц производился отбор и просмотр клеток: клетки размораживались, определялось количество сохранившихся в сравнении с исходным числом и проверялась их жизнеспособность. Результаты, представленные в табл. 3, свидетельствуют о незначительном падении выживаемости с увеличением времени пребывания в жидком азоте и о возможности криоконсервации трофонов этих инфузорий.

При охлаждении амёб без криопротектора они переохлаждаются незначительно, и замерзание происходит при температуре около -4°C . Такую же картину описывает О. Смит [5]. Для обнаружения внутриклеточной кристаллизации в живой клетке удачно используется метод люминесцентной микроскопии в падающем свете [1]. При замораживании клеток момент образования в них льда определяется тем, что в цитоплазме на фоне

свечением, которое у амёб не изменяется и после начала кристаллизации в цитоплазме. Возможно, что лёд внутри ядра при сравнительно медленном охлаждении не образуется. Это предположение подтверждается тем, что ядро амёб сморщивается вследствие дегидратации, и в нём отсутствуют темные ячейки льда (рис. 4, а, б).

Замерзание трофонтов инфузорий выглядит несколько иначе. Без ПЭО цитоплазма имеет темно-зеленое свечение с более или менее светлыми участками. Макронуклеус имеет ярко-зеленое свечение, и более интенсивно люминесцирует микронуклеус. При температурах до -10°C наступает переохлаждение, после которого происходит замерзание среды и клеток. При мгновенном образовании льда в цитоплазме темно-зеленое свечение переходит в светлое, после чего начинают выделяться темные и прозрачные ячей-



а



б

Рис. 4. Замерзание амёб до температуры -20°C .
а — Быстрое замораживание без криопротектора.
б — Медленное замораживание под защитой 15 %-ного ПЭО.
Увеличение 40×10 .

ки и полости, характеризующие, по-видимому, процесс, связанный с ростом кристаллов. В начале замораживания, видимо, тогда, когда лёд образовался в среде, но не внутри клетки, тело трофонта немного сморщивается. Иначе говоря, можно допустить, что в начале замораживания происходит дегидратация, а затем — внутриклеточная кристаллизация. Под защитой ПЭО при медленном замораживании инфузории не переохлаждались. С момента образования льда в среде клетка приобретала более светлое зеленое свечение, но изменения конфигурации тела не происходило. В цитоплазме можно было обнаружить лёд. По мере отогревания инфузории светились ярче, как до замерзания, форма тела при этом не изменялась (рис. 5, а, б).

Использование криопротектора для криоконсервации активных стадий свободноживущих простейших дало некоторые положительные результаты, которые имеют важное значение для выработки методов их криозащиты. Особенности клеток простейших диктуют необходимость правильного выбора защитного агента, который бы не был токсичен для клетки и не влиял бы на ее осмоларные свойства. Большинство применяемых в настоящее время криопротекторов, проникающих в клетки, таких как ДМСО и глицерин, могут оказаться для них токсичными [9]. По нашим данным, амёбы и кольподы не переносят защищающей концентрации глицерина и ДМСО. Вопрос о выборе криопротектора решается в настоящее время на основании результатов биологического эксперимента. Используемый нами ПЭО-400 оказался эффективным в активной стадии инфузорий. В этих условиях простейшие переносили длительную криоконсервацию при $t = -196^{\circ}\text{C}$. У амёб защитный эффект также проявлялся, но был недостаточным для криоконсервации. Согласно литературным данным и нашим экспериментам, без криопротектора амёбы всегда погибали при температуре замерзания. Под защитой ПЭО амёбы выдерживали кратковременное замораживание до

—40 °С даже при условии внутриклеточной кристаллизации. Оказалось, что способность переносить отрицательные температуры и замораживание зависит не только от криозащитного эффекта, но в большей степени от физиологического состояния клетки-организма. При охлаждении голодных амёб действие криопротектора сводится к нулю. Два различных штамма амёб, отличающихся по своим физиологическим свойствам, отличались и по устойчивости к охлаждению.

Наши опыты позволяют сделать следующий вывод: клетки простейших под защитой ПЭО способны переносить замерзание цитоплазмы. Из данных люминесцентно-микроскопических наблюдений над процессом замерзания амёб и инфузорий следует, что внутри клеток возможно образование льда. Очевидно, что действие криопротектора строго индивидуально, поэтому для каждого типа клеток существует своя оптимальная концентрация криозащитного агента и режимы замораживания-оттаивания, которые пока

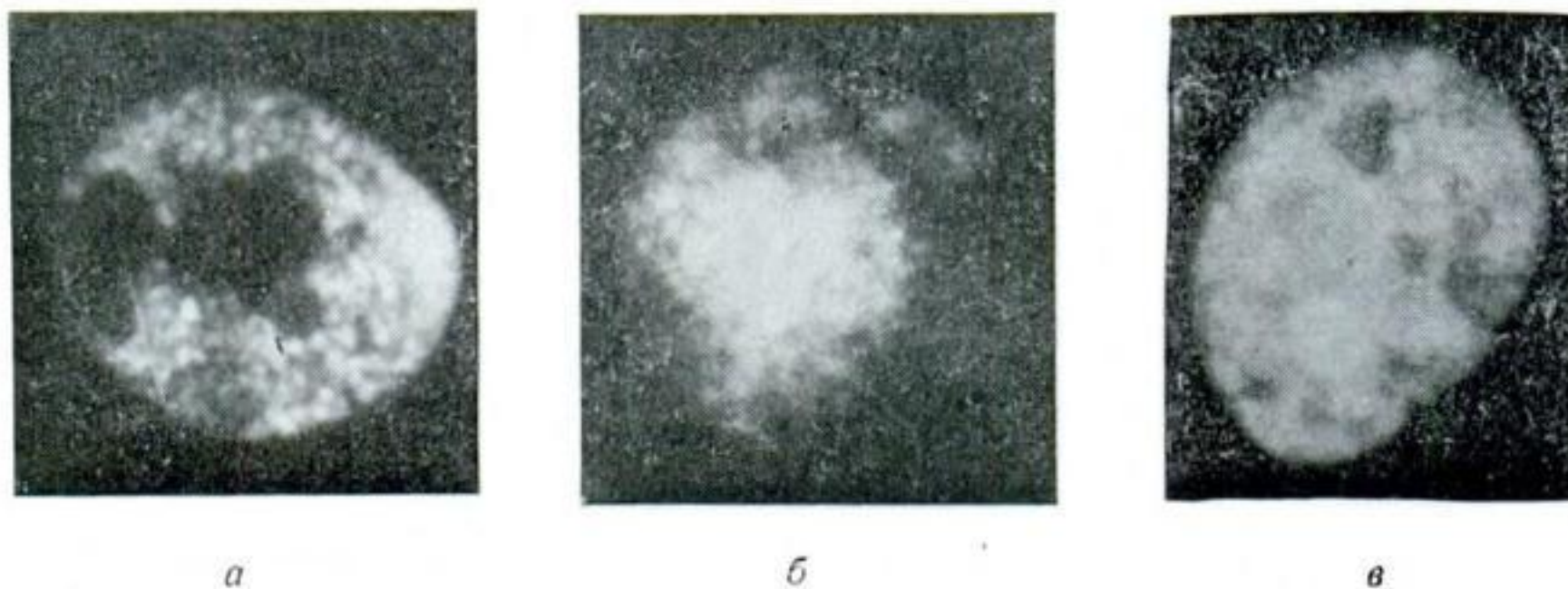


Рис. 5. Замораживание трофонтов инфузорий до температуры —50 °С.
а — Медленное замораживание без криопротектора.
б — Медленное замораживание под защитой 20 %-ного ПЭО.
в — Размороженная инфузория после замораживания до —59 °С под защитой ПЭО.
 Увеличение 40 × 10.

устанавливаются экспериментально. Основные причины невысокой устойчивости к замораживанию активных стадий пресноводных простейших даже в присутствии криопротектора связаны, по нашему мнению, с особым строением их внешней оболочки, мембраны которой адаптированы к жизни в пресной водной гипотонической среде и соответственно обладают слабой проницаемостью для воды. В связи с этим клетки этих простейших плохо дегидратируются при замерзании среды. Благодаря этому внутри клеток образуется много льда, что может быть причиной их гибели как во время быстрой кристаллизации, так и при отогреве в результате процесса рекристаллизации. Эта закономерность была прослежена на амёбах. Инфузории, обладая более проницаемой оболочкой, легче дегидратируются и менее повреждаются во время замораживания. Защитная роль криопротектора ПЭО-400 не вполне ясна. С одной стороны, ПЭО в защитных концентрациях не проникает внутрь клетки вследствие крупных размеров молекул, с другой стороны — длительное выдерживание инфузорий в 5 %-ном ПЭО повышает устойчивость к замораживанию. Поэтому возникает два предположения: либо криопротектор все же проникает в клетки, либо защитный эффект связан с действием молекул ПЭО на внешнюю оболочку клетки. Весьма вероятно, что справедливы оба эти предположения. Люминесцентно-микроскопический анализ помог установить различное действие ПЭО на амёб и инфузорий, различающихся по проницаемости мембран.

Одна из теоретических основ криозащиты состоит в возможности воздействия на проницаемость мембран и оболочек клеток. Именно исходя из различной проницаемости плазматических мембран клетки, структура которых зависит от экологических факторов и адаптации к ним, следует объяснять различную устойчивость к замораживанию и способность к криоконсервации простейших, обитающих в различных условиях среды.

Поэтому клетки многоклеточных животных, в том числе млекопитающих и человека, легче защищаются криопротекторами из-за большей проницаемости мембран для воды [8]. Авторы полагают, что исследования в этой области криоконсервации клеток животных следует расширить с целью создания банков клеток и тканей животных.

1. Лозина-Лозинский Л. К. К вопросу о способности некоторых живых систем переносить внутриклеточное образование льда. — В кн.: Реакция клеток и их белковых компонентов на экстремальные воздействия. М. — Л. 1966, с. 33—50.
2. Лозина-Лозинский Л. К., Мороз П. Э. Новый метод микроскопического исследования процесса замораживания клеток. — Цитология, 1966, 6, № 6, с. 774—778.
3. Лозина-Лозинский Л. К., Николаева Г. В. Устойчивость *Acanthamoeba proteus* к замораживанию под защитой полиэтиленоксида-400. — Цитология, 1980, 22, № 11, 1357—1364.
4. Пушкарь Н. С., Шраго М. И., Белоус А. М., Калугин Ю. В. Криопротекторы. — Киев: Наук. думка, 1978, — 201 с.
5. Смит О. Биологическое действие замораживания-переохлаждения. — М.: Изд-во иностр. лит., 1963, с. 140—173.
6. Успенская З. И. Действие коротковолновой УФ радиации на цисты покоя инфузорий *Colpoda caudata* при низких температурах. — Цитология, 1971, 13, № 12, с. 1506—1513.
7. Успенская З. И., Лозина-Лозинский Л. К. Устойчивость к замораживанию трофонтов *Colpoda caudata* в присутствии полиэтиленоксида. — Цитология, 1981, 23, № 9, с. 1066—1072.
8. Шраго М. И., Бредихина Л. П., Лубяный В. Г. О повышении устойчивости клеток к повреждению под влиянием криопротекторов. — В кн.: Общие механизмы клеточных реакций на повреждающие воздействия. Л.: Наука, 1977, с. 175—176.
9. Meryman H. T. Cryoprotective agents. — Cryobiology, 1971, 8, N 1, p. 171—183.

Институт цитологии АН СССР,
г. Ленинград

Поступила 28.08.83

УДК 57.043 : 519.876.2

С. И. Ткаченко, Р. К. Хайкин, В. И. Резников

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ СИСТЕМЫ АВТОМАТИЧЕСКОГО УПРАВЛЕНИЯ ПРОЦЕССОМ ЗАМОРАЖИВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

Охлаждение биоматериалов до весьма низких (вплоть до -196°C) температур является важнейшей частью технологического процесса их низкотемпературной консервации. Программные замораживатели осуществляют охлаждение консервируемого биоматериала от некоторых положительных до отрицательных криогенных температур в соответствии с определенной, адекватной данному биоматериалу программой, чем обеспечивается его высокая сохранность в течение длительного времени хранения в среде жидкого азота или его паров [1,2].

Настоящая работа посвящена описанию математической модели устройства программного охлаждения (программного замораживателя), разработанного и выпускаемого Специальным конструкторско-технологическим бюро с опытным производством Института проблем криобиологии и криомедицины АН УССР.

Необходимость математического моделирования на ЭВМ системы автоматического управления (САУ) процессом замораживания биоматериалов связана, во-первых, с тем, что из-за сложности (нестационарности и нелинейности) объекта управления не представляется возможным произвести достаточно адекватные аналитические описания работы системы, во-вторых, в связи с тем, что экспериментальные исследования макета реальной системы при значительных потерях времени и средств не позволяют по техническим причинам зарегистрировать ход процесса управления в отдельных звеньях системы и, следовательно, изучить отдельные стороны работы системы. От этих недостатков свободна постановка машинного эксперимента

на ЭВМ, при котором появляется возможность оперативного выбора оптимальных структур и параметров системы с учетом широкого класса возмущающих и управляющих воздействий.

Для построения математической модели САУ процессом замораживания биологических объектов была использована реальная модель программного замораживателя, функциональная схема которого изображена на рис. 1.

Объектом управления (ОУ) в реальной модели является камера замораживания с контейнерами, содержащими биоматериал. Управление стабилизацией температуры или скорости изменения температуры осуществляется исполнительными устройствами ИУ1 и ИУ2, подачей жидкого азота с расходом G или электрической мощностью Q в камеру замораживания. Импульсное управление (ИУ) осуществляется с помощью схемы ШИМ и УЭК, преобразующих сигнал ошибки, полученный в УС и КУ, во временной интервал $\tau_{\text{ШИМ}}$, составляющий долю $K = \tau_{\text{ШИМ}}/T_{\text{ШИМ}}$ от постоянного периода $T_{\text{ШИМ}}$ работы схемы ШИМ.

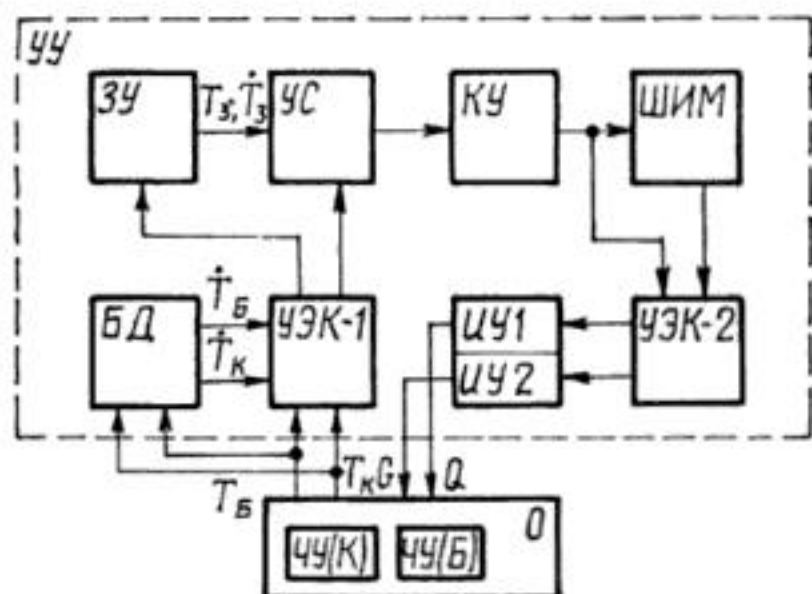


Рис. 1. Функциональная схема физической модели САУ процессом замораживания биологических объектов:

ЗУ — задающее устройство; УС — устройство сравнения; КУ — корректирующее устройство ШИМ — широтно-импульсный модулятор; УЭК — управляемый электронный коммутатор; ИУ — исполнительное устройство; ОУ — объект управления; ЧУ — чувствительное устройство; БД — блок дифференцирования; УУ — управляющее устройство; T — информация о текущем состоянии температуры объекта; G — расход жидкого азота; Q — мощность электрическая.

В свою очередь, сигнал ошибки формируется путем сравнения задающих программу параметров (T_z , $\dot{T}_z$) с сигналами, пропорциональными текущему значению температуры или скорости изменения температуры биоматериала (T_b , $\dot{T}_b$) или камеры замораживания (T_k , $\dot{T}_k$).

Важнейшей составной частью описываемой модели является математическая модель объекта управления, под которой будем понимать зависимость температуры T объекта (T_b и T_k) от параметров, характеризующих воздействие G или Q в интервалах $\tau_{\text{ШИМ}}$, а также теплофизические свойства объекта $\bar{B} = (b_1, b_2, \dots, b_n)$:

$$T = T(\tau_{\text{ШИМ}}, \bar{B}). \quad (1)$$

Учет свойств $\bar{B}$ аналитическими методами для столь сложного объекта не представляется возможным, поэтому модель объекта строилась путем обработки семейства разгонных характеристик, представляющих собой функции отклика системы на ступенчатые воздействия различной интенсивности. Такой подход позволил создать модель, учитывающую нелинейность и нестационарность объекта, связанные с вариацией теплофизических свойств хладагента, параметры камеры и биоматериала при изменении температуры.

Модель (1) создавалась в три этапа. На первом этапе было получено семейство функций

$$V_i = V(\Delta T_i, \tau_{\text{ШИМ}}), \quad (2)$$

характеризующих скорость изменения температуры $V_i = \frac{dT_i}{dt}$ объекта в зависимости от продолжительности воздействия для температурного интервала $\Delta T_i = T_i - T_{i-1}$.

Семейство V_i было получено путем аппроксимации степенным рядом семейства разгонных характеристик, снятых при разных значениях $K = \tau_{\text{ШИМ}}/T_{\text{ШИМ}}$ ($K = 0,1; 0,2; \dots; 1$), в каждом из температурных диапазонов ΔT_i .

Аппроксимация с помощью метода наименьших квадратов [3] позволила получить семейство функций V_i в виде:

$$V_i = \sum_{l=0}^K a_{il} \cdot \tau_{\text{шим}}^l, \quad (3)$$

где a_{il} — коэффициенты модели, составляющие матрицу $A = \|a_{il}\|$.

На втором этапе были учтены инерционные свойства объекта, проявляющиеся в том, что скорость изменения температуры, соответствующая некоторому изменению воздействия G или Q , устанавливается не скачкообразно, а постепенно, то есть с некоторым запаздыванием, которое, как показало экспериментальное исследование, слабо зависит от температуры. Такое запаздывание обусловлено интегрирующими свойствами камеры, которые учитывались в модели с помощью свертки:

$$V(\Delta T_i, \tau_{\text{шим}}(t)) = \frac{1}{\Delta t} \int_{t-\Delta t}^t V(\Delta T_i, \tau_{\text{шим}}(\tau)) \cdot h(\tau - t + \Delta t) \cdot d\tau, \quad (4)$$

где $h(x) = \begin{cases} 1, & \text{если } 0 \leq x \leq \Delta t; \\ 0, & \text{если } x < 0; x > \Delta t \end{cases}$ — прямоугольная весовая функция.

Свертка (4) в дискретном варианте реализовалась в виде:

$$V(\Delta T_i, \tau_{\text{шим}}(t)) = \frac{1}{n} \sum_{i=k-n}^k V(\Delta T_i, \tau_{\text{шим}}(t_i)), \quad (5)$$

где $n = \Delta t/H$; H — временная дискрета; t_i — дискретные моменты текущего времени.

На третьем этапе находилась температура объекта управления путем интегрирования выражения (5):

$$T(t) = \int_0^t V(\Delta T_i, \tau_{\text{шим}}(t)) \cdot dt + T_0, \quad (6)$$

где T_0 — начальная температура объекта.

При построении модели управляющего устройства (УУ) был использован изоморфный метод моделирования, устанавливающий полное поэлементное соответствие между математической моделью УУ и реальным управляющим устройством.

В модели управляющего устройства (УУ) предусмотрены три варианта управления объектом. При первом варианте система функционирует как следящая по температуре, во втором — как следящая по скорости изменения температуры, а в третьем — как система стабилизации разности температур в камере охлаждения и в контейнере с биологическим материалом. В зависимости от варианта управления соответственно определяется сигнал рассогласования T_Σ на выходе устройства сравнения УС:

$$\Delta T_\Sigma = A_T \cdot (T - T_3); \quad (7)$$

$$\Delta T_\Sigma = A_V \cdot \left(\frac{dT}{dt} - \frac{dT_3}{dt} \right);$$

$$\Delta T_\Sigma = A_R \cdot (T_B - T_K - T_R),$$

где:

T — температура объекта управления ($T = T_B$ или $T = T_K$); T_B — температура биоматериала в контейнере; T_K — температура в камере охлаждения; T_R — заданная разность температур; A_T , A_V , A_R — коэффициенты пропорциональности.

Наибольший интерес в модели УУ представляют описания корректирующего устройства (КУ) и блока дифференцирования (БД) [4]. Схема корректирующего устройства, приведенная на рис. 2, выполнена на операционных усилителях (ОУ) и позволяет реализовать в зависимости от по-

ложения ключей $k1$ и $k2$ четыре варианта закона управления. В связи с ограниченным линейным динамическим диапазоном ОУ ($E_{огр} = \pm 6В$) в схеме (см. рис. 2) проявляются нелинейные эффекты, и задача математического моделирования состоит в учете этих нелинейностей, а также влияния коэффициентов передачи корректирующего устройства (параметры $R0$, $R1$, $R2$, $C1$ и $C2$) на качество регулирования.

Если принять, что действие ключей $k1$ и $k2$ описывается переключающей функцией:

$$A_{1,2} = \begin{cases} 1, & \text{если ключи } k1 \text{ и } k2 \text{ замкнуты;} \\ 0, & \text{если ключи } k1 \text{ и } k2 \text{ разомкнуты,} \end{cases} \quad (8)$$

входные токи операционных усилителей ОУ1 и ОУ2 равны нулю, а коэффициент передачи ОУ2 $K2 = 1$, то функционирование корректирующего уст-

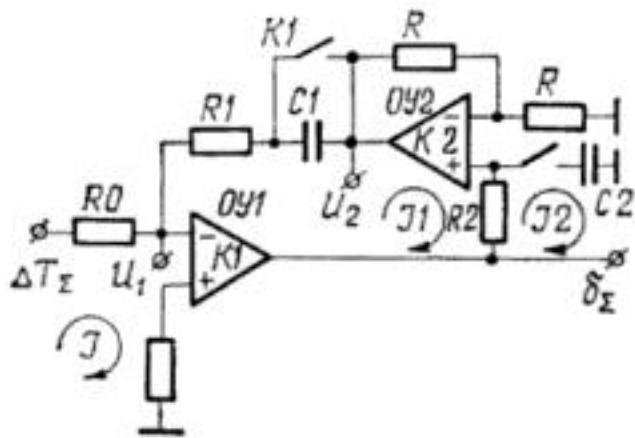


Рис. 2. Схема корректирующего устройства САУ.

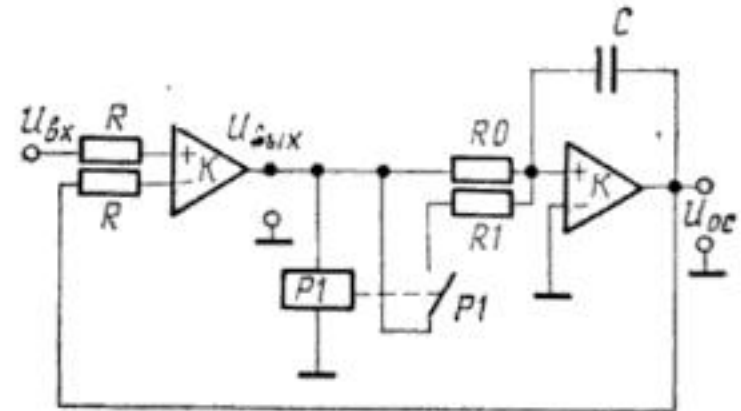


Рис. 3. Схема блока дифференциатора САУ.

ройства (см. рис. 2) описывается системой уравнений:

$$\delta_z(t) = \begin{cases} -u_1(t) \cdot K1, & \text{при } |u_1(t)| < \frac{E_{огр}}{K1}; \\ \pm E_{огр}, & \text{при } |u_1(t)| \geq \frac{E_{огр}}{K1}; \end{cases} \quad (9)$$

$$u_1(t) = \Delta T_z(t) - I_1(t) \cdot R0; \quad (10)$$

$$I_1(t) = \frac{1}{R1 + R0} \cdot (\Delta T_z(t) - u_{c1}(t) - u_2(t)); \quad (11)$$

$$u_{c1}(t) = \frac{A_1}{c1} \cdot \int_0^t I_1(t) \cdot dt + A_1 \cdot u_{c1}(0); \quad (12)$$

$$u_2(t) = \delta_z(t) - I_2(t) \cdot R2; \quad (13)$$

$$I_2(t) = (\delta_z(t) - u_{c2}(t)) \cdot \frac{A_2}{R2}; \quad (14)$$

$$u_{c2}(t) = \frac{1}{c2} \int_0^t I_2(t) \cdot dt + A_2 \cdot u_{c2}(0). \quad (15)$$

Нетрудно видеть, что при $A_1=1$, $A_2=0$ емкости $c1$ и $c2$ исключаются из схемы и КУ преобразуется в пропорциональное звено, при $A_1=0$, $A_2=0$ — в пропорционально-интегрирующее, при $A_1=1$, $A_2=1$ — в пропорционально-дифференцирующее, а при $A_1=0$, $A_2=1$ — в пропорционально-интегро-дифференцирующее.

Блок дифференциатора (рис. 3) собран на дифференциальном усилителе ОУ1, в цепи обратной связи которого включен интегратор на ОУ2. Реле $P1$ обеспечивает уменьшение постоянной времени интегратора в момент включения схемы, а также быстрое ее включение в линейный режим дифференцирования. При снижении уровня выходного сигнала $U_{вых}$ ниже $0,33 \cdot E_{огр}$ происходит восстановление постоянной времени интегратора $\tau = R0 \cdot C$, обеспечивающей заданные требования к дифференциатору. Если учесть, что напряжение на выходе интегратора ОУ2 при большом

коэффициенте усиления операционного усилителя практически повторяет напряжение на емкости ($u_{oc} = u_c$), то функционирование БД можно описать следующей системой уравнений, учитывающей нелинейные свойства ОУ1:

$$u_{вых}(t) = \begin{cases} u_{тк}(t) - u_{oc}(t) \cdot K_1; & \text{при } |u_{тк} - u_{oc}| < \frac{E_{огр}}{K_1}; \\ \pm E_{огр}, & \text{при } |u_{тк} - u_{oc}| \geq \frac{E_{огр}}{K_1}; \end{cases} \quad (16)$$

$$u_{oc}(t) = \frac{1}{R \cdot C} \int_0^t u_{вых}(t) \cdot dt + u_{oc}(0), \quad (17)$$

где:

$$R = \begin{cases} R0, & \text{при } |u_{вых}(t)| < \frac{E_{огр}}{3}; \\ R1, & \text{при } |u_{вых}(t)| \geq \frac{E_{огр}}{3}. \end{cases} \quad (18)$$

При построении модели дифференциатора учитывалось, что интервал временной дискретизации задачи τ_g должен выбираться по условию:

$$k_1 \cdot \left| \frac{du_{oc}}{dt} \cdot \tau_g \right| \ll E_{огр}, \quad (19)$$

обеспечивающему исключение ошибок учета действия обратной связи в аналоговой схеме за счет дискретности счета задачи.

Остальные элементы управляющего устройства (см. рис. 1): схема ШИМ, исполнительные устройства УИ1 и ИУ2, электронные коммутаторы УЭК1 и УЭК2 описаны в модели очевидными соотношениями, которые в статье не приводятся.

Проверка адекватности математической модели реальной системы проводилась в два этапа. На первом этапе проверялась адекватность математической модели объекта управления (камеры замораживания) путем сравнения экспериментальных разгонных характеристик камеры с расчетными. Расчетные характеристики были получены при подаче на вход разомкнутой системы управляющих сигналов схемы ШИМ с различной относительной длительностью. Проверка на этом этапе выявила хорошее совпадение расчетных и экспериментальных данных и подтвердила адекватность модели объекта. На втором этапе было проведено исследование модели замкнутой системы при задании параметров программы и схем КУ и БД, использовавшихся в экспериментах на реальной модели.

Результаты исследований приведены на рис. 4, где сплошной линией показан характер изменения температуры биоматериала в контейнере при реальном эксперименте (с использованием программного замораживателя), а пунктиром — при математическом моделировании (математическая модель САУ). Римскими цифрами (I—V) обозначены участки: стабилизации температуры (III), скорости изменения температуры (I, IV, V) и разности температур в камере замораживания и в контейнерах с биоматериалом (II). На участках стабилизации скорости изменения температуры были заданы сле-



Рис. 4. Графики процесса изменения температуры биоматериала в контейнере при физическом моделировании; $u_{ШИМ} = 0,3$ В, $c1 = 1$ мкф, $c2 = 0,22$ мкф, — физическая модель, --- математическая модель.

дующие программные значения скорости: $-5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и $-10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ для температур $< 10^{\circ}\text{C}$ и $\geq 10^{\circ}\text{C}$ соответственно; $-20^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ для температур $< -5^{\circ}\text{C}$; $-20^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и $-50^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ для температур $< -30^{\circ}\text{C}$ и $< -60^{\circ}\text{C}$ соответственно. Программные значения разности температур и температуры на участках стабилизации температуры (II, III) задавались -65°C и -30°C соответственно.

Из приведенных на рис. 4 переходных процессов видно, что разработанная математическая модель САУ с выбранными в процессе синтеза параметрами закона управления обеспечивает хорошее качество стабилизации объекта управления на всех температурных участках. Максимальная ошибка по усредненной, относительно программного значения, скорости на участках стабилизации скоростей изменения температуры объекта управления не превышает для скоростей $\geq -20^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и для скоростей $< -20^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ $\pm 3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и $\pm 5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ соответственно. На участке стабилизации температуры время переходного процесса составляет 2,5 мин, а величина перерегулирования по температуре не превышает 6°C .

Из рис. 4 также видно, что переходные процессы при физическом и математическом моделировании хорошо совпадают. Максимальное рассогласование по температуре и скорости не превышает 4°C и $3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ соответственно. Предложенная математическая модель может использоваться для определения оптимальных структур и параметров САУ в ходе машинного эксперимента.

1. Пушкарь Н. С., Белоус А. М. Актуальные проблемы криобиологии. — Киев: Наук. думка, 1981. — 606 с.
2. Пушкарь Н. С., Белоус А. М., Цуцаева А. А. и др. Низкотемпературное консервирование костного мозга. — Киев: Наук. думка, 1976. — 287 с.
3. Раскин Л. Г. Анализ сложных систем и элементы теории оптимального управления. — М.: Сов. радио, 1976, с. 137—143.
4. Юревич Е. И. Теория автоматического управления. — Л.: Энергия. 1969. — 375 с.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР, г. Харьков

Поступила 05.03.84

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 577.35.465

В. П. Грищук, Г. Ф. Жегунов

ПОГЛОЩЕНИЕ КАЛЬЦИЯ МЕМБРАНАМИ КАРДИОМИОЦИТОВ ГИБЕРНИРУЮЩИХ ЖИВОТНЫХ

При гипотермии теплокровных животных происходят существенные нарушения в деятельности миокарда, а при температурах тела $15-20^{\circ}\text{C}$ происходит остановка сердца. У гетеротермных млекопитающих, способных в период зимней спячки снижать температуру своего тела до $1-2^{\circ}\text{C}$, сердечная мышца продолжает функционировать, хотя существенно изменяет свои сократительные свойства [1]. Целью настоящей работы явилось выяснение некоторых особенностей функционирования Са-насоса мембран саркоплазматического ретикулума (СР) из миокарда сусликов в различных физиологических состояниях.

Опыты проводились на длиннохвостых сусликах в состоянии зимней спячки и при пробуждении, а также на активных животных. Микросомальный препарат получали методом дифференциального центрифугирования [2]. Все процедуры выделения проводились при температуре 4°C . Количество поглощенного ^{45}Ca определяли, используя метод ручного смешивания в отсутствие оксалата в среде инкубации. Суспензию мембран СР фильтровали через $0,17\text{ мкм}$ Сынпор-фильтры, и активность поглощенного $^{45}\text{Ca}^{2+}$ считали на сцинтилляционном счетчике Beckman LS7 800 в диоксановом сцинтилляторе.

Показано, что наибольшее поглощение кальция характерно для мембран СР из миокарда бодрствующих сусликов. Микросомальные мембраны при концентрации ионизированного кальция 100 мкМ ($\text{pH } 6,8$) и температуре измерения 35°C поглощали $64,8 \pm 3,9\text{ нмоль Са}^{2+}/\text{мг} \cdot \text{мин}$. Измерение поглощения кальция микросомальными препаратами из сердец гибернирующих животных при температуре 35°C показало снижение активности Са-транспортирующей системы до $14,8\text{ нмоль Са}^{2+}/\text{мг} \cdot \text{мин}$. Поглощение кальция мембранами СР из миокарда просыпающихся сусликов при температуре измерения 35°C составляло $27,5 \pm 1,7\text{ нмоль Са}^{2+}/\text{мг} \cdot \text{мин}$. Однако актив-

ность везикул ретикулума животных, находящихся в различных физиологических состояниях, определявшаяся в температурном диапазоне 15—20 °С, уже существенно не отличалась и составляла при температуре измерения 20 °С $18,2 \pm 1,1$, $10,1 \pm 0,9$ и $8,4 \pm 0,8$ нмоль $\text{Ca}^{2+}/\text{мг} \cdot \text{мин}$ соответственно для бодрствующих, просыпающихся и гибернирующих животных. В условиях измерения поглощения кальция в диапазоне температур 5—15 °С наибольшая активность микросомального препарата была отмечена у спящих и просыпающихся сусликов. Причем, если поглощение кальция везикулами СР из миокарда бодрствующих сусликов резко снижалось в температурном диапазоне от 35 до 20 °С и более плавно уменьшалось в интервале температур 20—5 °С ($10,8 \pm 0,7$ нмоль $\text{Ca}^{2+}/\text{мг} \cdot \text{мин}$ при температуре измерения 10 °С), то активность аналогичного препарата из сердец спящих и пробуждающихся сусликов имела тенденцию к стабилизации после 20 °С и даже к некоторому увеличению поглощения кальция при температурах 5—10 °С ($14,4 \pm 0,9$ и $11,6 \pm 0,7$ нмоль $\text{Ca}^{2+}/\text{мг} \cdot \text{мин}$ для просыпающихся и спящих сусликов соответственно). Таким образом, установлено, что скорость поглощения кальция микросомальными препаратами из миокарда сусликов, находящихся в различных физиологических состояниях, имеет различные температурные зависимости. Полученные данные показывают возможность сохранения необходимой активности Са-транспортирующей системы мембран СР у зимоспящих животных в условиях природной глубокой гипотермии.

Отмеченные способности функционирования Са-насоса мембран СР сердец гетеротермных животных являются одним из ряда биохимических механизмов, обеспечивающих функцию кардиомиоцитов при низких температурах тела и создающих возможность быстрого приспособления клеток миокарда к высоким нагрузкам при пробуждении млекопитающих из зимней спячки.

1. Жегунов Г. Ф., Грищук В. П. Особенности функционирования сердца гибернирующих животных: Тез. докл. II Всесоюз. конф. по анабиозу «Экспериментальный анабиоз», Рига, 1984, с. 65—66.
2. Levitsky D. O., Benevolensky D. S., Levchenko T. S., et al. Calcium — binding rate and capacity of cardiac sarcoplasmic reticulum. — J. Mol. Cel. Cardiol., 1981, N13, p. 785—796.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР, г. Харьков

Поступило 02.05.85

УДК 577.37

М. В. Воинова

ТЕМПЕРАТУРНАЯ ЗАВИСИМОСТЬ ЭНЕРГИИ ОБРАЗОВАНИЯ ПОРЫ В ФОСФОЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ

Механизм образования макроскопических пор в мембранах везикул и связанный с этим лизис представляют большой интерес при выявлении причин криоповреждения клеток, так как установлено, что появление пор в мембране клетки связано только с липидным матриком [1,2]. Обычно рассматриваются следующие причины появления пор: осмотическое растяжение мембраны [2], натяжение бислоя за счет мениска, воздействие электрического поля [1], влияние примесей «клиновидных» молекул, нарушающих целостность упаковки бислоя [3]. В настоящее время существуют две гипотезы о возможном механизме влияния температуры на образование пор, в том числе в зоне фазового перехода: 1) фазовая перестройка приводит к появлению границ раздела, являющихся дефектами структуры, через которые выходит содержимое [1]; 2) в зоне фазового перехода образуется гидрофильная микроскопическая пора, способная залечиваться.

В данной работе исследуется процесс образования макроскопической поры в мембране бислойных липидных везикул при снижении температуры, вне и в зоне фазового перехода.

Рассмотрим бислойную везикулу с наружным радиусом R_o , внутренним — R_i . При малых деформациях можно считать, что $\frac{\Delta V}{V_o} \approx \frac{3}{2} \frac{\Delta S}{S_o}$, где ΔV и ΔS — изменение объема и площади мембраны везикулы. Напряжения, возникающие только за счет термического сжатия, зависят от скорости охлаждения системы ($\dot{T}$).

При низких скоростях охлаждения $\dot{T}/T$ необходимо рассматривать кинетику процесса деформации везикулы с учетом изменения осмотического давления; рождение поры возможно, если остаточное давление ΔP_r превосходит критическое значение перепада давления, равное, согласно [2]:

$$\Delta P_c = 3 \frac{\Gamma}{R_o} \left(\frac{\gamma}{\Gamma R_o} \right)^{2/3},$$

где Γ — коэффициент упругости мембраны [2], γ — линейное натяжение поры.

Энергия деформации бислоевой мембраны (F) с порой, имеющей площадь A , в зоне фазового перехода есть сумма энергии внешнего (индекс «о») и внутреннего (индекс «i») монослоев:

$$F = \Gamma S_o \left(\frac{\Delta S_o}{S_o} - \frac{A}{S_o} - \beta \Delta T_o \right)^2 + \Gamma S_i \left(\frac{\Delta S_i}{S_i} - \frac{A}{S_i} - \beta \Delta T_i \right)^2 + 2 \sqrt{\pi \gamma} \sqrt{A}, \quad (1)$$

где β — температурный коэффициент поверхностного сжатия мембраны.

Для больших пор [3] $\gamma = \frac{\pi D}{8} (1 - 2K_c \delta)$, где K_c — «спонтанная кривизна» монослоя, D — модуль изгиба мембраны, δ — толщина монослоя. Изменение площади монослоев $\Delta S_{o,i}$ обусловлено появлением кристаллической фазы (индекс «s») в «жидкой» фазе (индекс «f»):

$$\frac{\Delta S_o}{S_o} = \frac{N_s^o}{N_o} \left(1 - \frac{a_s^o}{a_f^o} \right), \quad \frac{\Delta S_i}{S_i} = \frac{N_s^i}{N_i} \left(1 - \frac{a_s^i}{a_f^i} \right), \quad (2)$$

где a_f и a_s — площадь молекул «жидкой» и кристаллической фаз соответственно; $N_{o,i} = N_s^{o,i} + N_f^{o,i}$ (N_s и N_f — количество молекул жидкой фазы в липидном слое соответственно).

Предполагаем, что фазовый переход может идти неодновременно во внешнем и внутреннем монослоях:

$$\Delta T_{o,i} = T - T_{o,i}^c, \quad (3)$$

где $T_{o,i}^c$ — соответствует началу перехода. Введем $\theta = N_s/N$ — параметр, описывающий степень перехода. Фазовый переход «гель — жидкий кристалл» описывается как кооперативный [4]:

$$\theta = \frac{1}{2} \left[1 - \frac{\varepsilon - 1}{\sqrt{(\varepsilon - 1)^2 + 4\sigma\varepsilon}} \right], \quad (4)$$

где $\sigma \sim (\Delta H)^{-2}$ — параметр кооперативности, ΔH — изменение энтальпии при «плавлении», а $\varepsilon = \exp(-\Delta H/RT^2)$ — нормированный температурный параметр. При некотором критическом значении параметра степени перехода $\tilde{\theta}_{cr}$ энергия деформации мембраны везикулы минимальна, что свидетельствует о возможности появления квазиравновесной поры. При $N_o \approx N_i = N$, $a_s^o \approx a_s^i$; $a_f^o \approx a_f^i$ параметр перехода выражается:

$$\tilde{\theta}_{cr} = \frac{1/2 (a_f)}{a_f - a_s} \left\{ \frac{3}{2} \left[\frac{S_o + S_i}{S_o S_i} \left(-\frac{2\pi\gamma^2}{\Gamma^2} \right) \right]^{1/3} + \left(\frac{\Delta T_o}{S_o} + \frac{\Delta T_i}{S_i} \right) \right\}. \quad (5)$$

Из (4) и (5) видно, что чем меньше модуль изгиба мембраны и больше «спонтанная кривизна» липидных молекул, тем раньше достигается критическое натяжение, соответствующее появлению поры. Вероятность появления поры $\omega \sim e^{-\tilde{W}_o/KT}$, где $\tilde{W}_o \sim \sim (R_o \gamma^2)^{2/3}$ [2], т. е. с ростом R_o вероятность появления поры при данной температуре уменьшается. Из (3) — (5) можно найти критическое значение ΔT_{cr} как функцию параметров a_f , a_s , D , Γ , K_c , δ и R_o . Анализ показывает, что для малых везикул за счет большой искривленности внутреннего монослоя интервал фазового перехода расширяется, что качественно согласуется с результатами работы [5], в которой изучалась зависимость температуры фазового перехода от размеров везикул.

В заключение необходимо отметить, что термоупругие эффекты вносят существенный вклад в деформацию везикул, температура фазового перехода которых близка к 0 °С или лежит в области отрицательных температур. Лизис везикул из высокотемпературных липидов, по всей вероятности, связан с появлением поры в зоне фазового перехода, хотя возможно, что частично утечка содержимого может идти и через границы раздела фаз.

1. Ивков В. Г., Берестовский Г. Н. Динамическая структура липидного бислоя. — М.: Наука, 1981, — 296 с.
2. Козлов М. М., Маркин В. С. Теория осмотического лизиса липидных везикул. — Биологические мембраны, 1984, 1, № 1, с. 74—90.
3. Маркин В. С., Козлов М. М. Статистика пор в бислоевых липидных мембранах. — Биологические мембраны, 1985, 2, № 2, с. 205—223.
4. Флори П. Статистическая механика цепных молекул. — М.: Мир, 1971, — 440 с.
5. Van Dijck P. W. M., De Kruijff B., Aarts P. A. M. M., Verkley A. J., De Gier J. Phase transitions in phospholipid model membranes. — BBA, 1978, 506, N 2, p. 183—191.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР, Харьков

Поступило 03.04.85.

В. Е. Чадаев, М. И. Крамар, Н. Н. Чуб

ОЦЕНКА ГОРМОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ АЛЛОТРАНСПЛАНТАТА ОВАРИАЛЬНОЙ ТКАНИ, ХРАНИВШЕЙСЯ ПРИ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ, ПО ДАННЫМ КОЛЬПОЦИТОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

В Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР совместно с кафедрой акушерства и гинекологии Харьковского медицинского института разработан способ низкотемпературной консервации и долгосрочного хранения (-196°C) ткани яичника [2]. Терапевтическую эффективность аллотрансплантации криоконсервированной этим методом овариальной ткани (АКОТ) проверяли у 12 женщин. Деконсервированные сегменты яичника помещали в амниотическую оболочку, предохраняющую трансплантат от клеточной инфильтрации и снижающую силу иммунологического конфликта [3]. Криоконсервированную овариальную ткань трансплантировали в подкожно-жировую клетчатку передней стенки живота. В качестве контроля обследовали 12 женщин с аналогичной патологией, которым не делали АКОТ. Оценка гормональной активности аллотрансплантата проводилась по данным тестов функциональной диагностики с детальным анализом кольпоцитогамм до и после АКОТ. У больных обеих групп определялся гипоэстрогенный ановуляторный цикл. В группе женщин, которым была произведена АКОТ, перед овуляцией наблюдалось усиление процесса пролиферации и дифференциации вагинальных эпителиальных клеток. Количество клеток поверхностного слоя достигало максимума. В эпителиальных клетках определялось увеличение цитоплазмы, эозинофильная окраска, выраженная зернистость вакуолей и пикноз ядра. Клетки располагались отдельно друг от друга на светлом фоне мазка. К моменту овуляции кариопикнотический индекс (КИ) и эозинофильный индекс (ЭИ) достигали наибольшей величины. Кроме того, в мазке имелись палочки Дежерлейна и отсутствовали лейкоциты.

Признаки прогестеронового влияния наблюдались в мазках, взятых в лютеинную фазу, только после АКОТ и отсутствовали у женщин контрольной группы. При этом происходило уменьшение КИ и ЭИ, индекс созревания указывал на сдвиг влево, появлялась складчатость и скручивание клеток, которые располагались группами и пластами. АКОТ способствовала нормализации менструального цикла у 9 больных и наступлению овуляции у 7 пациенток, что подтверждалось и другими тестами функциональной диагностики. Такие клеточные изменения обусловлены влиянием половых гормонов, вырабатываемых зреющим фолликулом, а затем желтым телом [1].

1. Арсеньева М. Г. Кольпоцитологические исследования в диагностике и терапии эндокринных гинекологических заболеваний. — М.: Медицина 1977. — 366 с.
2. Грищенко В. И., Лобынцева Г. С., Демина Л. Г. и др. А. с. 1017251 (СССР). Способ консервирования ткани яичника человека. — Оpubл. в Б. И., 1983, № 18.
3. Лопухин Ю. М. Пересадка яичников при использовании полупроницаемых биологических мембран. — В кн.: Тез. VII Международного конгресса акушеров-гинекологов (Москва, сент., 1973 г.), . М.: Медицина, 1973, с. 356.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР, г. Харьков

Поступило 02.04.85.

РЕФЕРАТЫ

УДК 543.422.25 : 57.088.6

Радиоспектроскопические методы в криобиологии / Волков В. Я., Сахаров Б. В., Волкова Л. А. — Криобиология, 1985, № 4, с. 3—10.

Обсуждены возможности применения методов магнитного резонанса (ЯМР и ЭПР) для решения проблем криобиологии. Показана перспективность этих методов при исследовании механизмов повреждения, связанных с фазовыми переходами и взаимодействием клеточных структур с водой и растворенными веществами.

Табл. 1. Библиогр.: 24 назв.

УДК 57.043

Адаптационные и деструктивные изменения в биологических объектах после действия охлаждения и криопротекторов / Юрченко Т. Н. — Криобиология, 1985, № 4, с. 10—14.

Гистохимическое исследование цитоплазматических окислительно-восстановительных ферментов показало, что хранение ткани печени и роговицы при глубокой гипотермии сопровождается повышением активности изученных дегидрогеназ. Исследование состояния ядерного аппарата перевиваемых культур свидетельствует об ингибирующем эффекте гипотермии. Обратимость изменений доказывается восстановлением пролиферативного потенциала в клетках культуры и приживляемостью ткани роговицы после кератопластики. Обнаруженные эффекты, по мнению автора, имеют адаптационный характер.

Ил. 4. Библиогр.: 10 назв.

УДК 57.043

Влияние криопротекторов на колониеобразующую способность клеток-предшественников грануломонопоэза костного мозга человека до замораживания / Филев Л. В., Дыгин В. П., Холодный А. Я., Петренко Г. И. — Криобиология, 1985, № 4, с. 14—17.

Колониеобразующая способность клеток-предшественников грануломонопоэза костного мозга человека, культивированных в средах, содержащих криопротекторы (ЦОЛИПК-3, полиэтиленоксид, поливинилпирролидон, диметилацетамид), менялась в зависимости от вида использованного защитного вещества. Способность этих клеток формировать кластеры не отличалась от контрольных (в отсутствие криопротекторов) значений.

Табл. 1. Библиогр.: 10 назв.

УДК 57.043:612.13.59

Роль дофаминергических и норадренергических терминалей гипоталамуса в регуляции функции эндокринных желез при действии холода / Стабровский Е. М. — Криобиология, 1985, № 4, с. 17—22.

Исследовалось влияние фармакологической (6-оксидофамин) деструкции дофаминергических и норадренергических терминалей гипоталамуса на базальную и стимулируемую холодным стрессом активность симпато-адреналовой, гипофиз-адреналовой, гипофиз-тиреоидной и энтерохромаффинной систем. Разрушение норадренергических терминалей способствовало активации симпато-, гипофиз-адреналовой и энтерохромаффинной систем. Действие холодного стресса в еще большей степени активировало состояние указанных систем, при этом функция гипофиз-тиреоидной системы не изменялась. Делается вывод, что норадренергические волокна гипоталамуса участвуют в ингибировании функции симпато-, гипофиз-адреналовой и энтерохромаффинной систем, но стимулируют функцию гипофиз-тиреоидной системы.

Ил. 3. Табл. 2. Библиогр.: 3 назв.

УДК 611.012.1 : 615.361.014.41

Влияние различных условий криоконсервации на выживаемость спермиев человека / Паращук Ю. С., Грищенко В. И., Кагулин Ю. В., Черныш Е. Н. — Криобиология, 1985, № 4, с. 22—28.

В работе освещены некоторые аспекты современного состояния проблемы криоконсервации спермы человека, а также представлены результаты исследований авторами зависимости между структурой ряда химических соединений и их криозащитной эффективностью. Показано, что в ряду амидов криозащитная эффективность повышается с ростом основности соединений и наиболее выражена у метилацетамида, а наименее — у формамида. Криозащита оксиэтильных производных глицерина коррелирует с гидратационными свойствами макромолекул полимеров.

Ил. 3. Табл. 1. Библиогр.: 9 назв.

УДК 612.664.36.014.41

Холодильное консервирование материнского молока / Бражников А. М., Осипов С. Н., Комяков О. Г., Филиппенко О. А., Фатеева Е. М., Копылова В. И. — Криобиология, 1985, № 4, с. 28—31.

Исследовалось влияние процессов замораживания и размораживания на сохранение биологически ценных веществ в материнском молоке. В качестве основного критерия при оценке принято содержание иммуноглобулинов. Замораживание проводилось при температурах от -20°C до -80°C с интервалом в 20° . Размораживание осуществляли со скоростью 15, 10, 7, 4 и $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$.

Ил. 4. Библиогр.: 3 назв.

УДК 577.322

Исследование взаимодействия диметилсульфоксида с макромолекулами белков методом спинного эха ЯМР / Аксенов С. И., Гаврилова И. И., Гангард М. Г., Ревактов О. П. — Криобиология, 1985, № 4, с. 31—33.

Исследование характера взаимодействия диметилсульфоксида (ДМСО) с сывороточным альбумином быка и иммуноглобулином G методом спинного эха ЯМР позволило сделать вывод о преимущественном распределении ДМСО в белковом растворе вблизи макромолекулы белка, что может являться основой одного из механизмов криозащиты биологических объектов на молекулярном уровне.

Ил. 2. Библиогр.: 7 назв.

УДК 615.832.9.015.42 : 612.82.015.3

Активность глутаминазы печени крыс и сусликов при гипотермии / Исмаилов И. А., Эмирбеков Э. З. — Криобиология, 1985, № 4, с. 31—35.

Активность глутаминазы печени крыс, находящихся в состоянии гипотермии, достоверно снижается, а активность данного фермента печени сусликов не изменяется по сравнению с контрольными значениями при измерении активности фермента в диапазоне температур от 37 до 10°C .

Табл. 1. Библиогр.: 6 назв.

УДК 591.147.8.05 : 547.953 : 597.5 : 598.617

Влияние криопротекторов на липиды сперматозоидов карпа / Дрокин С. И., Копейка Е. Ф. — Криобиология, № 4, с. 36—38.

В работе рассмотрены результаты исследования липидного состава сперматозоидов карпа, контрольных и после воздействия криопротекторов проникающего типа — глицерина, диметилсульфоксида, этиленгликоля. Полученные данные свидетельствуют о том, что 9 %- и 20 %-ные концентрации криопротекторов вызывают существенную деградацию фосфолипидов. Появление моноглицеридов и диглицеридов после эквilibрации позволяет предположить активацию фосфолипазы. Моноглицериды и диглицериды способны включаться в гидрофобную фазу мембраны и, возможно, искажают ее свойства.

Ил. 1. Табл. 1. Библиогр.: 8 назв.

УДК 57.043.612.43

Влияние замораживания до -196°C и 10 %-ного диметилсульфоксида на связывание ^3H -норадреналина клетками щитовидной железы / Карпенко Л. Г. — Криобиология, 1985, № 4, с. 38—39.

Изучалось влияние различных скоростей замораживания и 10 %-ного ДМСО на связывание норадреналина в плазматических мембранах тироцитов. Установлено, что 10 %-ный ДМСО значительно угнетает связывание лиганда с адренорецепторами. Медленное замораживание в присутствии 10 %-ного ДМСО приводит к незначительному увеличению связывания гормона. Быстрое и медленное замораживание криопротектора оказывает на исследуемый процесс различное по направленности влияние.

Табл. 1. Библиогр.: 2 назв.

УДК 576.3 : 577.42 : 593.121

Действие глубокого охлаждения на пресноводные простейшие в активном состоянии в присутствии криопротектора полиэтиленоксида / Успенская З. И., Николаева Г. В. Лозина-Лозинский Л. К. — Криобиология, 1985, № 4, с. 39—45.

Амебы и трофонты инфузорий обрабатывали криопротектором ПЭО-400 при разных температурах в диапазоне от 0° до -196°C . Установлено, что выживаемость амеб в замерзшей среде зависит от срока их пребывания при температуре ниже точки замерзания; скорость охлаждения не имеет существенного значения при замораживании до -10°C . Амебы переносили лишь кратковременное замерзание при -70°C . Трофонты инфузорий под защитой ПЭО переживали замораживание до -196°C . Описан способ двухэтапного охлаждения, при использовании которого выживаемость клеток составляла 10 %. Замороженные таким образом инфузории оставались жизнеспособными после хранения в жидком азоте в течение двух лет. Обсуждается вопрос о связи устойчивости к замораживанию различных клеток с проницаемостью их оболочек для воды, которая определяется видом простейших.

Ил. 5. Табл. 3. Библиогр.: 9 назв.

УДК 57.043 : 519.876.2

Математическое моделирование системы автоматического управления процессом замораживания биологических объектов / Ткаченко С. И., Хайкин Р. К., Резников В. И. — Криобиология, 1985, № 4, с. 45—50.

Описана математическая модель системы автоматического управления (САУ) процессом программного замораживания биологических объектов, предназначенная для проведения машинных экспериментов (на ЭВМ СМ-1) с целью определения оптимальной структуры и параметров САУ для заданной камеры замораживания. В работе приводятся результаты проверки математической модели на адекватность ее физической модели САУ процессом замораживания при разомкнутой и замкнутой цепи обратной связи. Сделан вывод о возможности применения модели для оптимизации САУ в ходе машинного эксперимента.

Ил. 4. Библиогр.: 4 назв.

UDC 543.422.25 : 57.088.6

Radiospectroscopy methods in cryobiology / Volkov V. Ya., Sakharov B. V., Volkova L. A. — Kriobiologiya, 1985, N 4, p. 3—10.

Possible application of magnetic resonance methods (NMR and EPR) in cryobiology is considered. The methods are shown to be promising for studies of the mechanisms of injury related to phase transitions and interactions of cellular components with water and solutes.

1 table. Refs.: 24 titles

UDC 57.043

Adaptive and destructive changes in biological systems exposed to low temperatures and cryoprotectants / Yurchenko T. N. — Kriobiologiya, 1985, N 4, p. 10—14.

Histochemical study of cytoplasmic redox enzymes showed that storage of liver tissue and cornea under conditions of deep hypothermia is accompanied by increasing the dehydrogenases. Investigation of the nuclear apparatus of cultured cells indicated that hypothermia exerted an inhibition effect. The reversibility of changes was demonstrated by reduction of the proliferation potential in cultured cells. The revealed effects are of adaptive character.

4 figs. Refs.: 10 titles.

UDC 57.043

The effect of cryoprotectants on the colony formation ability of human bone marrow granulomonopoietic cell precursors prior to freezing / Filev L. V., Dygin V. P., Kholodny A. Ya., Petrenko G. I. — Kriobiologiya, 1985, N 4, p. 14—17.

The colony formation ability of human bone marrow granulomonopoietic cell precursors cultivated in media containing cryoprotectants (TSOLIPK-3, polyethylene oxide, polyvinylpyrrolidone, dimethylacetamide) varied with cryoprotectant used. The ability of cluster formation did not differ from control values (without cryoprotectants).

1 table. Refs.: 10 titles

UDC 57.043 : 612.13.59

The role of hypothalamus dopaminergic and noradrenergic terminals in the regulation of function of endocrine glands subjected to cold / Stabrovsky E. M. — Kriobiologiya, 1985, N 4, p. 17—22.

The effect of pharmacologic (6-oxidophamine) destruction of hypothalamus dopaminergic and noradrenergic terminals on the basal and cold — stimulated activities of sympathoadrenal, hypophysioadrenal and thyroid enterochromaffine systems was studied. The destruction of noradrenergic terminals resulted in activation of sympathoadrenal and hypophysioadrenal enterochromaffine systems. The systems were further activated by cold stress, the function of hypophysiothyroid system remaining unchanged. It has been concluded that hypothalamus noradrenergic fibres are involved in the inhibition of sympathoadrenal and hypophysioadrenal enterochromaffine systems and stimulated the function of hypophysiothyroid system.

3 figs. 2 tables. Refs.: 3 titles

UDC 618.177 — 089.888.11

The effect of different regimes of cryopreservation on survival of human spermatozoa / Parashchuk Yu. S., Grishchenko V. I., Kalugin Yu. V., Chernysh E. N. — Kriobiologiya 1985, N 4, p. 22—28.

The report describes our studies on the relationship between the cryoprotective efficiency of a series of chemical compounds and their structure in the light of present knowledge of human sperm freeze-preservation. It has been shown that the cryoprotective efficiency of a series of amides increased with increase in their basicity. The most protective effect exerted methylacetamide and formamide had the least effect. The cryoprotection by glycerol hydroxyethyl derivatives appeared to correlate with hydration properties of polymer molecules.

3 figs. Refs.: 9 titles

UDC 612.664.36.014.41

Freeze -preservation of mother milk / Brazhnikov A. M., Osipov S. N., Komyakov O. G., Filipenko O. A., Fateyeva E. M., Kopylova V. I. — Kriobiologiya, 1985, N 4, p. 28—31.

The effect of freezing and thawing processes on preservation of biologically important substances of mother milk were studied. The content of immunoglobulins served as a main estimation criterion. Freezing was performed at temperatures from -20°C to -80°C with 20° intervals. Thawing was accomplished at a rate of 15, 10, 7, 4 and $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

4 figs. Refs.: 3 titles.

UDC 577.322

Investigation of the interaction between dimethylsulfoxide and protein macromolecules using a method of NMR spin echo / Aksenov S. I., Gavrilova I. I., Gangard M. G., Revokatov O. P. — Kriobiologiya, 1985, N 4, p. 31—33.

Investigation of the interaction of dimethylsulfoxide (DMSO) with bovine serum albumin and immunoglobulin G using a method of NMR spin echo allowed to make a conclusion about preferential distribution of DMSO in a protein solution near protein macromolecules, that may be a possible basis of one of the cryoprotection mechanisms of biological systems at the molecular level.

2 figs. Refs.: 7 titles

UDC 615.832.9.015.42 : 612.82.015.3

Hepatic glutaminase activity of rats and ground squirrels under hypothermia / Ismailov I. A., Emirbekov E. Z. — Kriobiologiya, 1985, N 4, p. 34—35.

Hepatic glutaminase activity of rats under hypothermia decreases significantly and remains unchanged in ground squirrel liver as compared to values measured in the range of 37 to 10 °C.

1 table. Refs.: 6 titles

UDC 591.147.8.05:547.953 : 597.5 : 598.617

The effect of cryoprotectants on lipids of carp spermatozoa / Drokin S. I., Kopeyka E. F. — Kriobiologiya, N 4, p. 36—38.

Results of the investigation of lipid composition of control and treated with permeable cryoprotectants, namely glycerol, dimethylsulfoxide or ethylene glycol, spermatozoa were considered. The data obtained indicated that 9 % and 20 % cryoprotectant concentrations induced a marked degradation of phospholipids. Appearance of monoglycerides and diglycerides after equilibration suggested phospholipase activation. Monoglycerides and diglycerides were capable of incorporating into the hydrophobic phase of membrane and possibly change its properties.

1 fig. 1 table. Refs.: 8 titles

UDC 57.043.612.43

The effect of freezing to —196 °C and 10 % dimethylsulfoxide on binding of ³H-noradrenaline by thyroid gland cells / Karpenko L. I. — Kriobiologiya, 1985, N 4, p. 38—39.

The effect of various freezing rates and 10 % DMSO on binding of noradrenaline in plasma membranes was studied. It has been found that 10 % DMSO inhibits markedly binding the ligand to adrenal receptors. Slow freezing with 10 % DMSO increases hormone binding but insignificantly. Rapid and slow freezing without cryoprotectants exerted an effect of different direction on the process studied.

1 table. Refs.: 2 titles

UDC 576.3.577.42:593.121

The effect of deep cooling with cryoprotectant polyethylene oxide on active freshwater protozoa / Uspenskaya Z. I., Nikolayeva G. V., Lozina-Lozinsky L. K. — Kriobiologiya, 1985, N 4, p. 39—45.

Amoebae and infusorial trophozoites were treated with PEO-400 at different temperatures from 0 to —196 °C. Survival of amoebae in a frozen medium has been found to depend on the duration of exposition at temperatures below the freezing point; the cooling rate was of little importance upon freezing to —10 °C. Amoebae survived only short-term freezing to —70 °C. Infusorial trophozoites protected with PEO survived freezing to —196 °C. A method of two-step cooling that gives 10 % cell viability is described. Infusoria frozen according to this method remained viable after 2 year storage. The relationship between the resistance of different cells to freezing and the permeability of their membranes to water that is determined by protozoa species is discussed.

5 figs. 3 tables. Refs.: 9 titles

UDC 57.043:519.876.2

Mathematic modelling of automatic control system to monitor the process of freezing biological systems / Tkachenko S. I., Khaikin R. K., Reznikov V. I. — Kriobiologiya, 1985, N 4, p. 45—50.

A mathematic model of automatic control system (ACS) to monitor programmed freezing biological systems intended for computer experiments (using EVM SM-1) with the purpose of determination of ACS optimal structure and parameters for a given freezing chamber is described. The results of examination of correspondance of the mathematic model to a real ACS model for a freezing process with open and closed feedback are presented. It has been concluded that the model could be used for ACS optimization in computer experiments.

4 figs. Refs.: 4 titles

Цена 65 к.

Индекс 70474

Журнал «Криобиология», № 4, 1985 г.
Издательство «Наукова думка», г. Киев