

1

ISSN 0233-7673

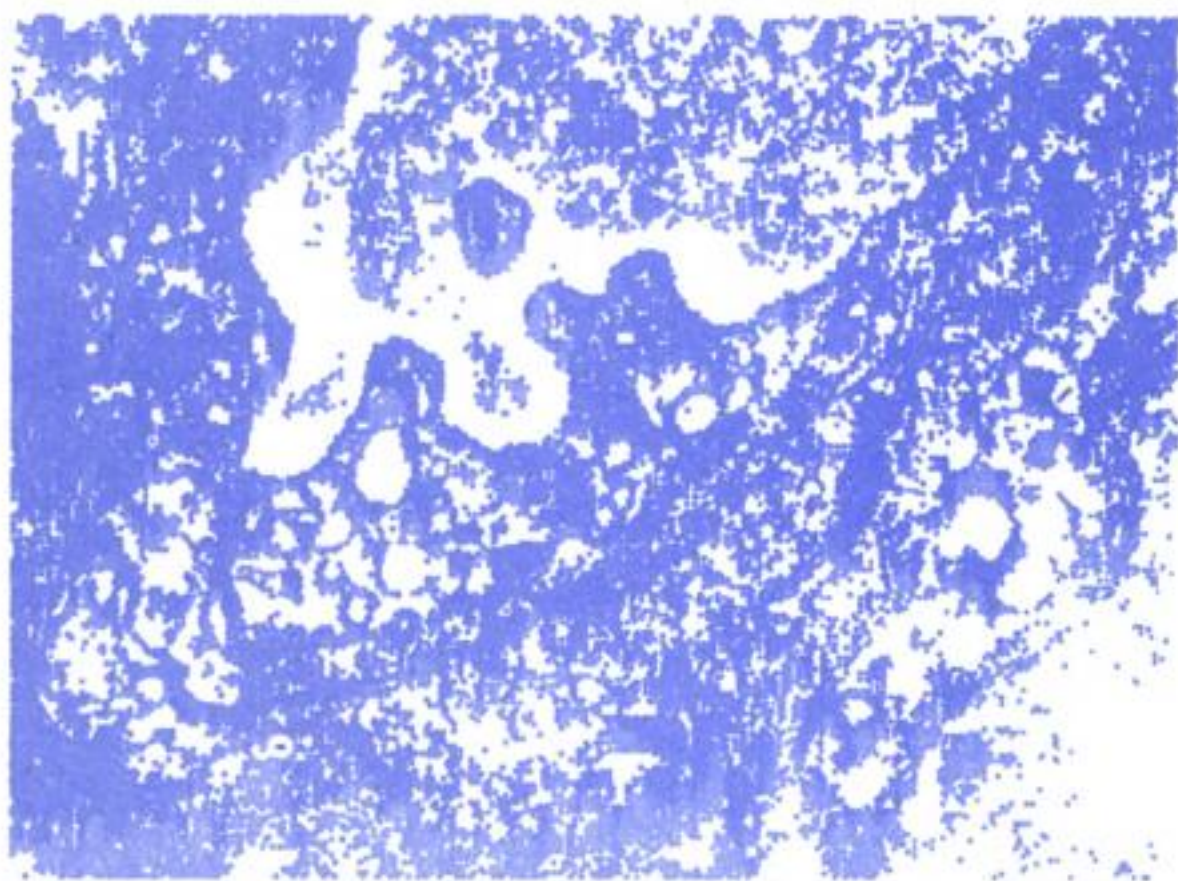
НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ,
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ
И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ
И КРИОМЕДИЦИНЫ



1995

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ



К МЕХАНИЗМАМ РЕГУЛЯЦИИ ПРОНИЦАЕМОСТИ ГЕМАТОЭН-
ЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА ОХЛАЖДЕННОГО МОЗГА. СООБ-
ЩЕНИЕ 1 *Бабийчук Г.А., Марченко В.С., Пастухов Ю.Ф., Шило В.В.,
Ломако В.В., Ломакин И.И., Марченко Л.Н.*

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОДА-БЕЛОК-ЛИПИДНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТ-
ВИЙ В ЭРИТРОЦИТАХ ПОЙКИЛОТЕРМНОГО ОРГАНИЗМА
Цымбал Л.В., Шовкопляс С.В., Белоус А.М.

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕКО-
ТОРЫХ ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ ЖИВОТНЫХ ПОСЛЕ ГЛУБОКОЙ
ГИПОТЕРМИИ С ПРЕМЕДИКАЦИЕЙ МЕТРОНИДАЗОЛОМ
Козлова В.Ф., Юрченко Т.Н.

Главный редактор В.И.Грищенко

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

С.И.Аксенов (Москва), Г.А.Бабийчук (Харьков), А.М.Белоус (зам. главного редактора, Харьков), М.Е.Бекер (Рига), Ю.П.Благой (Харьков), Л.Вонг (Канада), А.Н.Гольцев (Харьков), В.М.Гордиенко (Киев), К.Дж.Грин (Великобритания), В.Н.Гурин (Минск), Г.Ф.Жегунов (Харьков), В.Де Лекер (Бельгия), В.И.Луговой (Харьков), В.Я.Малеев (Харьков), Г.Маттес (Германия), Г.Меримен (США), П.Мнержичка (Словакия), Е.Я.Панков (Харьков), Ю.Ф.Пастухов (Санкт-Петербург), Ф.А. Приходько (ответственный секретарь, Харьков), Н.С.Пушкар (Харьков), А.Роу (США), Б.П.Сандомирский (Харьков), А.С.Снурников (Харьков), С.Сумида (Япония), А.А.Цуцаева (Харьков), С.А.Шалимов (Киев), Э.З.Эмирбеков (Махачкала), Т.Н.Юрченко (Харьков)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

А.Д.Бугров, В.Я.Волков, В.Н.Запорожан, П.А.Калиман, В.В.Лемешко, В.Д.Мануильский, В.А.Моисеев, А.С.Попов, Н.Г.Соломонов, Ю.С.Суханов, В.В.Шенталь, М.И.Шраго

Editor-in-Chief V.I.Grishchenko

EDITORIAL BOARD

S.I.Aksenov (Moscow), G.A.Babiychuk (Kharkov), A.M.Belous (Associated Editor, Kharkov), M.E.Beker (Riga), Yu.P.Blagoj (Kharkov), E.Z.Emirbekov (Makhachkala), A.N.Goltsev (Kharkov), V.M.Gordiyenko (Kiev), C.J.Green (Great Britain), V.N.Gurin (Minsk), W.De Loecker (Belgium), V.I.Lugovoj (Kharkov), V.Ya.Maleyev (Kharkov), G.Matthes (Germany), P.Mericka (Slovakia), H.T.Meryman (USA), E.Ya.Pankov (Kharkov), Yu.F.Pastukhov (Sankt-Petersburg), F.A.Prikhodko (Executive Secretary, Kharkov), N.S.Pushkar (Kharkov), A.W.Rowe (USA), B.P.Sandomirsky (Kharkov), S.A.Shalimov (Kiev), A.S.Snurnikov (Kharkov), S.Sumida (Japan), A.A.Tsutsayeva (Kharkov), T.N.Yurchenko (Kharkov), L.Wang (Canada), G.F.Zhegunov (Kharkov)

EDITORIAL COUNCIL

A.D.Bugrov, P.A.Kaliman, V.V.Lemeshko, V.D.Manuilsky, V.A.Moiseyev, A.S.Popov, V.V.Shental, M.I.Shrago, N.G.Solomonov, Yu.S.Sukhanov, V.Ya.Volkov, V.N.Zaporozhan



НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ
И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ
И КРИОМЕДИЦИНЫ

НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ОСНОВАН В 1985 ГОДУ
ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

1995

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

- Бабийчук Г.А., Марченко В.С., Пастухов Ю.Ф., Шило В.В., Ломако В.В., Ломакин И.И., Марченко Л.Н.* К механизмам регуляции проницаемости гематоэнцефалического барьера охлажденного мозга. Сообщение 1 3
- Цымбал Л.В., Шовкопляс С.В., Белоус А.М.* Исследование вода-белок-липидных взаимодействий в эритроцитах пойкилотермного организма 10
- Эмирбеков Э.З., Львова С.П., Кличханов Н.К.* Биохимические изменения в крови при искусственной и естественной гипотермии 14
- Дунаевская О.Н., Панталер Е.Р., Шпакова Н.М., Бондаренко В.А.* Некоторые возможности повышения устойчивости эритроцитов к холодовым и осмотическим воздействиям при использовании катионных амфиатов 21
- Федосова С.Н., Кудокочева Е.В.* Модифицирующее влияние курантила на осмотическую чувствительность эритроцитов 27

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

- Стрибуль Т.Ф., Тымчук С.М., Мильшина Н.Н.* Стимулирующее действие низкотемпературного замораживания семян кукурузы на процесс их прорастания 31
- Чеканова В.В., Ханина Л.А., Луговой В.И., Петренко Т.Ф.* Цитотоксичность и криопротекторная активность оксигенированных амидов при криоконсервировании перевиваемой культуры СПЭВ 37
- Козлова В.Ф., Юрченко Т.Н.* Структурно-функциональная характеристика некоторых внутренних органов животных после глубокой гипотермии с премедикацией метронидазолом 42
- Чуйко В.А., Карпенко Л.Г., Иванова Е.Г., Губина Н.Ф., Легач Е.И.* Криоконсервация коры надпочечников 47

КРИОГЕННОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

- Резников В.И., Скурников А.С.* Синтез оптимальных моделей устройств программного замораживания биобъектов с использованием ЭВМ 51

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- Скоробогатова Н.Г., Лобынцева Г.С., Вотякова И.А., Микулинский Ю.Е.* Оценка приживания эмбриональных кроветворных клеток человека в организме реципиентов с помощью полимеразной цепной реакции 56

CONTENTS

THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

<i>Babiychuk G.A., Marchenko V.S., Pastukhov Yu.F., Shilo A.V., Lomako V.V., Lomakin I.I., Marchenko L.N.</i> On the mechanism of regulating blood-brain barrier permeability of the cooled brain. Report 1	3
<i>Tsymbal L.V., Shovkoplyas S.V., Belous A.M.</i> Investigation of water-protein-lipid interactions in red blood cells of poikilothermic animals	10
<i>Emirbekov E.Z., Lvova S.P., Klichkhanov N.K.</i> Biochemical alterations in blood during artificial and natural hypothermia	14
<i>Dunayevskaya O.N., Pantaler E.R., Shpakova N.M., Bondarenko V.A.</i> Some possible methods of increasing red blood cell stability to the action of cold and osmotic effects after application of cation amphipates	21
<i>Fedosova S.N., Kudokotseva E.V.</i> Modifying action of curantyl on the osmotic susceptibility of red blood cells	27

CRYOPRESERVATION OF BIOLOGICAL SYSTEMS

<i>Stribul T.F., Tyumchuk S.M., Milshina N.N.</i> Stimulating action of low temperature freezing of maize seeds on their germination	31
<i>Chekanova V.V., Khanina L.A., Lugovoy V.I., Petrenko T.F.</i> Cytotoxicity and cryoprotective activity of oxyethylated amides during cryopreservation of a revived pekc culture	37
<i>Kozlova V.F., Yurchenko T.N.</i> Structure-functional character of some inner organs of animals following profound hypothermia with premedication by metranidasole	42
<i>Chuiko V.A., Karpenko L.G., Ivanova E.G., Gubina N.F., Legach E.I.</i> Cryopreservation of adrenal cortex	47

CRYOGENETIC EQUIPMENT

<i>Reznikov V.I., Snurnikov A.S.</i> Computerized synthesis of the optimal models of the devices for programmable freezing of biosystems	51
--	----

BRIEF COMMUNICATIONS

<i>Skorobogatova N.G., Lobyntseva G.S., Votyakova I.A., Mikulinsky Yu.E.</i> Evaluation of grafting of human hemopoietic cells in recipient organism using polymerase chain reaction	56
--	----

Адрес редакции:
310015, Харьков,
ул. Переяславская, 23,
тел. (0572) 72-10-39

Научный редактор *В.И.Луговой*
Редактор *Ф.А.Приходько*
Компьютерный набор и верстка: *Л.В.Смык, А.М.Шаталов*

Подп. в печ. ~~29.07.95~~ Формат 70x108/16. Бум. тип. № 1. Печать офсетная. Усл. печ. л. 4,9.
Тираж 400 экз. Оригинал-макет подготовлен в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины. Отпечатано в Харьковской городской типографии № 16, 310003, Харьков, ул. Университетская, 16. Зак.

**Г.А.Бабийчук, В.С.Марченко, Ю.Ф.Пастухов,
А.В.Шило, В.В.Ломако, И.И.Ломакин, Л.Н.Марченко**

**К МЕХАНИЗМАМ РЕГУЛЯЦИИ ПРОНИЦАЕМОСТИ
ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА ОХЛАЖДЕННОГО
МОЗГА. СООБЩЕНИЕ 1**

Изучено влияние краниocereбральной гипотермии и внутрибрюшинного введения бомбезина на проницаемость гематоэнцефалического барьера различных структур головного мозга крысы (передняя и задняя области гипоталамуса, неокортекс, таламус, гиппокамп) для ^3H -норадреналина, ^3H -адреналина, ^3H -ацетилхолина. Обсуждаются возможные механизмы изменения проницаемости гематоэнцефалического барьера для биологически активных веществ.

В потоке информации о функциях и строении бомбезиноподобных пептидов, их локализации у низших и высших животных, наличии центральных эффектов после системного введения [4, 10, 29] особо выделяют проблему оценки роли гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) в терморегуляторных эффектах бомбезинергической системы мозга [8, 9]. В настоящее время известно, что проницаемость ГЭБ для нейропептидов крайне низкая [18], но мы, как и другие авторы [9], считаем такую точку зрения слишком категоричной и соглашаемся с мнением о том, что бомбезин снижает поступление энергии в организм и способствует поддержанию гомеостаза в этих условиях [37] за счет реципрокного действия на тонус вегетативной нервной системы [7, 9]. Тогда возникает вопрос о значении в данных процессах степени проницаемости ГЭБ для вазоактивных веществ - важного компонента в механизмах поддержания баланса симпатических и парасимпатических влияний [14].

В связи с перечисленными фактами мы попытались оценить взаимную регуляцию функционального состояния ГЭБ и терморегуляторных нейротрансмиттеров при краниocereбральной гипотермии (КЦГ).

Эксперименты проведены на крысах самцах линии Вистар. КЦГ осуществляли на установке для программного охлаждения, созданной в ИПК и К АН Украины. Для одновременного охлаждения нескольких (5-6) крыс, головы животных помещали в специальную камеру, через которую продувались пары азота. В ходе экспериментов измеряли температуру в коре головного мозга, в среднем ухе (что соответствует температуре гипоталамуса), в прямой кишке при помощи электронного термометра термисторами СТЗ-18. Для блокирования рефлекторных терморегуляторных реакций организма экспериментальных животных наркотизировали внутрибрюшинными инъекциями смеси тиопентала натрия и оксибутирата натрия из расчета 30 мг/кг и 100 мг/кг массы, соответственно. Содержание адреналина (А) и норадреналина (НА) в тканях определяли триоксииндоловым флуоресцентным методом [11]. Изучение проницаемости ГЭБ для нейромедиаторов (^3H -НА, ^3H -А, ^3H -АХ (ацетилхолин)) проводили радиоизотопным методом в структурах головного мозга (передняя и задняя области гипоталамуса, таламус, неокортекс, гиппокамп). С этой целью через 20 мин после внутрибрюшинного введения 50 мкл (50 μCi) меченого вещества животных декапитировали, быстро извлекали головной мозг, замораживали его при температуре -15°C . Одновременно брали пробу крови. Затем делали саггитальный срез мозга толщиной приблизительно 2 мм (L 0,2 - L 2,0) (стереотаксический атлас De Groot, 1959) и выделяли участки изучаемых структур с помощью специального приспособления. Объем проб 20 мкл. Радиоактивность проб оценивали на сцинтилляционном счетчике фирмы Beckman LS-7800 (США). Содержание общего белка определяли по методу



Лоури. Концентрацию простагландинов (ПГ) в плазме крови определяли радиоиммунологическим методом с помощью наборов реактивов и по методическим рекомендациям фирмы Clinical Assyas (США). Метод позволяет с высокой чувствительностью определить содержание ПГ по конкурентному связыванию ^3H -ПГ и немеченого ПГ с антителами к ПГ данного типа. Для определения циклических нуклеотидов использовали стандартный набор реактивов и методику, предложенную фирмой Amersham (Англия). В основе метода лежит специфическое и стабильное связывание цАМФ высокоаффинным белком с последующим этапом разделения на угольном сорбенте.

Измерение активности аденилатциклазы (АЦ) проводили по модифицированному методу [15]. Активность фермента исследовали в присутствии активаторов изопротеренола, позволяющего выявить АЦ, сопряженную с βC -адренорецепторами, и натрия фтора (NaF), с помощью которого определяли максимальную активность фермента. Активность АЦ определяли в препаратах плазматических мембран из сердечной мышцы. Изменение количества образовавшегося цАМФ проводили радиометрическим методом с помощью набора реактивов Amersham (Англия) по стандартной методике.

Пептид бомбезин фирмы Serpa (США) в дозе 20 и 40 мкг вводили животным внутривентриально за 10 мин до введения меченых веществ. Ацетилсалициловую кислоту, используемую в качестве блокатора синтеза простагландинов [1], вводили внутривентриально в дозе 10 мг/кг массы животного за 40 мин до КЦГ и за 30 мин до окончания воздействия КЦГ.

Для электронно-микроскопических исследований ткань гипоталамуса фиксировали в 2% глутаральдегидном и 1% осмиевом фиксаторе на фосфатном буфере. После обезвоживания в этаноле возрастающей концентрации и абсолютном ацетоне образцы заключали в смесь эпоксидных смол эпон-аралдит. Ультратонкие срезы изготавливали с помощью ультрамикротомы УМПТ-4, окрашивали уранилацетатом и цитратом свинца. Просмотр и фотографирование осуществляли на электронном микроскопе ЭМВ-100 БР при ускоряющем напряжении 75 кВ. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили традиционными методами [5].

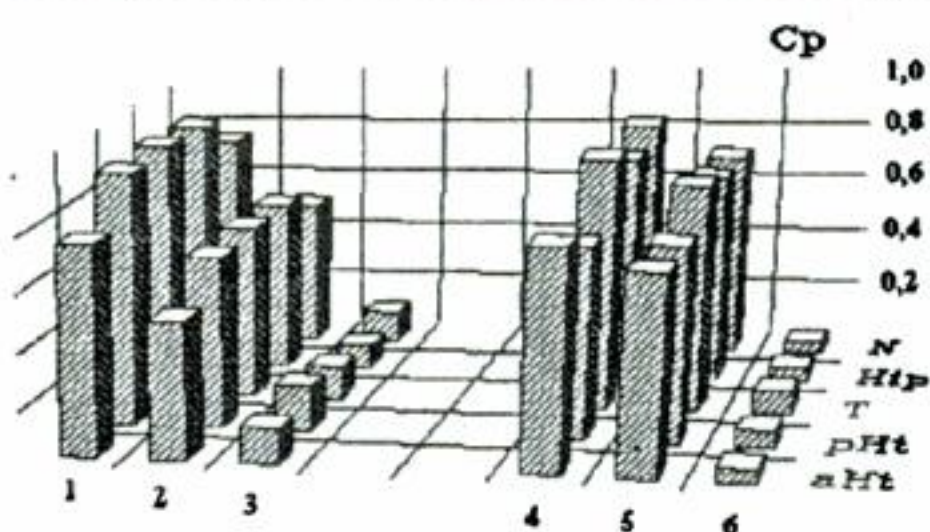


Рис. 1. Влияние бомбезина на проницаемость ГЭБ для нейромедиаторов. 1 — K^+ -индуцированная секреция ^3H -норадреналина, введенного внутривентриально; 2 — 20 мг бомбезина для ^3H -норадреналина; 3 — контроль для ^3H -норадреналина; 4 — 40 мг бомбезина для ^3H -норадреналина; 5 — 20 мг для ^3H -норадреналина; 6 — контроль наркоз для ^3H -норадреналина

Внутривентриальное введение наркотизированным крысам бомбезина приводит к существенному дозозависимому увеличению проницаемости ГЭБ для катехоламинов. Повышение проницаемости во всех изученных структурах мозга было одного порядка, но несколько больше в гипоталамусе и таламусе (рис. 1). Естественно предположить участие проникшего через барьер нейромедиатора в синаптических процессах. Действительно, проникший через ГЭБ ^3H -НА захватывается синаптическими терминалями и может высвободиться, например, под влиянием суперфузии гипоталамуса раствором Кребса-Рингера с повышенной концентрацией ионов K^+ (рис. 1). Кроме того, необходимо было определить, достаточно ли количества проникших через ГЭБ катехоламинов для проявления их физиологической функции в месте центрального приложения.

Хорошо известно, что центральное и периферическое действие катехоламинов на частоту сердечных сокращений носит противоположный характер [14, 36]. Однако, на фоне действия бомбезина, когда растворы НА вводили

системно, вместо ожидаемого учащения пульса было отмечено статистически достоверное его урежение в течение 10 мин наблюдения, т.е. наблюдается центральный эффект (табл. 1). Таким образом, проведенные исследования показали, что системное введение экзогенного бомбезина способствует повышению проницаемости ГЭБ для катехоламинов, которые в этих условиях не только проникают в мозг но и, вероятно, принимают активное участие в нейрхимических и физиологических процессах.

Т а б л и ц а 1

Влияние инъекций норадреналина (НА) и бомбезина на частоту сердечных сокращений (ЧСС) (n=5)

Условия эксперимента	Исходная частота	ЧСС в течение 15 с					
		Длительность наблюдения после введения, мин					
		0,5	1,0	3,0	5,0	10,0	35,0
Периферическое введение НА	78 ± 2	85 ± 3	94 ± 2	91 ± 2	90 ± 3	88 ± 3	78 ± 2
Центральное введение НА	78 ± 3	69 ± 2	62 ± 1	58 ± 4	48 ± 4	42 ± 3	72 ± 3
Центральное введение H ₂ O	76 ± 4	74 ± 2	76 ± 4	80 ± 4	84 ± 3	91 ± 3	82 ± 4
В/б инъекция бомбезина (20 мкг)	77 ± 2	72 ± 2	72 ± 1	72 ± 2	69 ± 2	67 ± 2	74 ± 5

Примечание. Для определения центрального действия НА вводили 5 мкл 0,2%-го р-ра гидротартрата норадреналина при помощи микрошприца в область заднего гипоталамуса и одновременно регистрировали электрокардиограмму во II стандартном отведении.

Наши данные, находясь в русле научных дискуссий на эту тему, согласуются с работами, в которых показано, что нейропептиды могут изменять проницаемость ГЭБ для биоактивных веществ [12, 18, 28, 31, 33], в том числе для моноаминов [17], но противоречат мнению ряда авторов, считающих данную возможность маловероятной [3, 32, 33]. Тем не менее, в первом приближении можно предложить гипотетическую цепочку событий, приводящих к повышению проницаемости ГЭБ. Многократно показано, что бомбезин увеличивает выброс надпочечниками в кровь адреналина [4, 19–21, 24, 26, 37], который может активировать аденилатциклазу [1]. Кроме того, возможно, бомбезин способствует дегрануляции энтерохромаффинных клеток желудочно-кишечного тракта, как рецепторно-секреторных элементов [13, 30], и высвобождению серотонина с последующей аккумуляцией в тромбоцитах. Либо активированные бомбезином симпатические процессы приводят к стимуляции обмена серотонина в эпифизе, который наряду с нейрогипофизом интегрирует центральные и системные эффекты нейропептидов [16, 31, 34]. Серотонин может прямо активировать аденилатциклазу [1], либо заметно стимулировать синтез и высвобождение простагландинов в тканях [25, 35]. Простагландины в зависимости от вида ткани и разновидности аденилатциклазы могут как стимулировать, так и ингибировать синтез цАМФ. В большинстве тканей однако простагландины активируют синтез цАМФ [1, 23, 35]. Локальное накопление цАМФ в мозговых капиллярах крыс приводит к заметной вазодилатации микрососудов, сопровождающейся увеличением везикулярного транспорта меченых веществ и повышением проницаемости ГЭБ [27, 35].

Реальность подобных построений можно оценить на экспериментальной модели активированного состояния эндогенных бомбезинзависимых процессов. На сегодняшний день известно только два основных фактора, способных достоверно возбуждать бомбезинергические механизмы организма — температурные воздействия и наркоз [9].

Поэтому, по нашему мнению, в качестве удобной модели может быть использовано состояние КЦГ наркотизированных крыс [3, 6]. В этой связи было изучено влияние КЦГ на содержание катехоламинов, простагландинов и цАМФ в тканях.

На начальных этапах КЦГ до ректальной температуры 34–35 °С проявляется тенденция к снижению концентрации А в плазме крови, тогда как со-

держание НА не изменяется. Продолжающееся в результате КЦГ снижение температуры тела до 32 °С изменяло направленность сдвигов в изменении содержания катехоламинов в крови. Отмечалось увеличение концентрации А и, в меньшей степени, НА в плазме крови, при этом содержание НА в ткани надпочечников снижалось до уровня контроля на действие наркоза (табл. 2). Полученные результаты не противоречат нашим представлениям о возможной роли бомбезина, приводящего в этих условиях к увеличению секреции адреналина надпочечниками, однако эти процессы могут быть реализованы и путем

Т а б л и ц а 2

Влияние КЦГ на содержание катехоламинов в крови (нмоль/л) и ткани надпочечников крыс (нг/г)

Условия эксперимента	Кровь		Надпочечники
	Норадреналин	Адреналин	Норадреналин
Исходный уровень	6,562 ± 0,621	6,028 ± 0,610	4,47 ± 0,58
Наркоз	7,110 ± 0,690	5,362 ± 0,170	3,06 ± 0,07
через 24 ч	4,828 ± 0,600	0,060 ± 0,402	3,18 ± 0,07
через 48 ч	4,202 ± 0,620	2,276 ± 0,340	6,64 ± 0,66
КЦГ 34–35 °С	6,374 ± 0,500	5,072 ± 0,550	3,28 ± 0,89
через 24 ч	8,236 ± 0,600	5,344 ± 0,500	5,59 ± 0,39
через 48 ч	2,512 ± 0,360	4,264 ± 0,480	3,08 ± 0,08
КЦГ 32 °С	7,486 ± 0,225	8,248 ± 0,670	2,91 ± 0,16
через 24 ч	3,968 ± 0,690	2,376 ± 0,560	5,81 ± 0,36
через 48 ч	3,468 ± 0,550	3,468 ± 0,550	8,75 ± 0,05

зерпина уменьшалось соответственно в 5 и 4 раза и оставалось низким в последующие 48 ч наблюдения.

Применение наркоза достоверно не изменяло уровень моноаминов в крови. КЦГ 34–35 °С вызывала увеличение содержания моноаминов до 50%. Отмеченный эффект был кратковременным и уже через 24 ч содержание адреналина не отличалось от его значения в крови “резерпиновых” животных.

Уровень НА достоверно снижался, но оставался не выше, чем после введения резерпина. Через 48 ч КЦГ 34–35 °С не отмечено достоверных изменений в уровне катехоламинов в крови. КЦГ 32 °С у данной группы животных вызывала существенное повышение содержания НА плазмы до уровня, близкого к исходному. Несмотря на некоторое снижение концентрации НА через 24 ч после гипотермии, тенденция к нормализации его содержания сохраня-

Т а б л и ц а 3

Влияние КЦГ на содержание катехоламинов в крови (нмоль/л) и ткани надпочечников крыс (нг/г) в условиях резерпинового истощения катехоламиновых депо

Условия эксперимента	Кровь		Надпочечники
	Норадреналин	Адреналин	Норадреналин
Исходный уровень	6,562 ± 0,621	6,028 ± 0,610	4,47 ± 0,58
Введение резерпина	1,742 ± 0,043	1,208 ± 0,290	0,60 ± 0,06
через 24 ч	2,354 ± 0,800	1,184 ± 0,031	1,05 ± 0,09
через 48 ч	1,698 ± 0,652	2,354 ± 0,800	1,18 ± 0,08
Наркоз на фоне резерпина	2,078 ± 0,080	1,074 ± 0,010	0,74 ± 0,22
через 24 ч	2,508 ± 0,670	1,286 ± 0,430	0,60 ± 0,01
через 48 ч	3,150 ± 9,110	1,092 ± 0,030	0,60 ± 0,04
КЦГ 34–35 °С	3,138 ± 0,205	2,510 ± 0,660	1,46 ± 0,58
через 24 ч	2,908 ± 0,146	1,198 ± 0,390	1,79 ± 0,65
через 48 ч	3,006 ± 0,050	1,250 ± 0,400	3,02 ± 0,04
КЦГ 32 °С	5,495 ± 0,780	2,840 ± 0,590	3,50 ± 0,94
через 24 ч	3,356 ± 0,050	4,656 ± 0,070	6,08 ± 0,49
через 48 ч	5,664 ± 1,250	2,626 ± 0,390	11,50 ± 0,06

усиления синтеза катехоламинов, поэтому мы проследили некоторые стороны функционирования норадренергической системы при экспериментальном истощении катехоламиновых депо инъекциями резерпина.

Как видно из табл. 3, содержание адреналина и норадреналина через 18 ч после введения ре-

зерпина. Через 48 ч количество НА в крови не отличалось от исходных данных. Колебания уровня адреналина в крови были более выраженными. Так, увеличение количества адреналина сменялось его уменьшением через 48 ч. КЦГ 32 °С значительно увеличивает возможности норадреналинсекретирующих клеток надпочечников. По сравнению с уров-

нем введения резерпина содержание НА повышается более чем в 5 раз, однако не достигает исходных значений, что может указывать на повышенный выброс НА в кровь под действием (вероятно) бомбезина.

Известно, что повышение содержания моноаминов в крови может привести к изменению содержания цАМФ прямо или опосредованно простагландинами [1, 23, 35]. Это определило цель последующих наших экспериментов. КЦГ в диапазоне температуры тела 32–30 °С характеризовалась умеренным повышением содержания в крови простагландина Е в течение 6 ч гипотермии и через сутки наблюдения, в то время как концентрация простаглан-

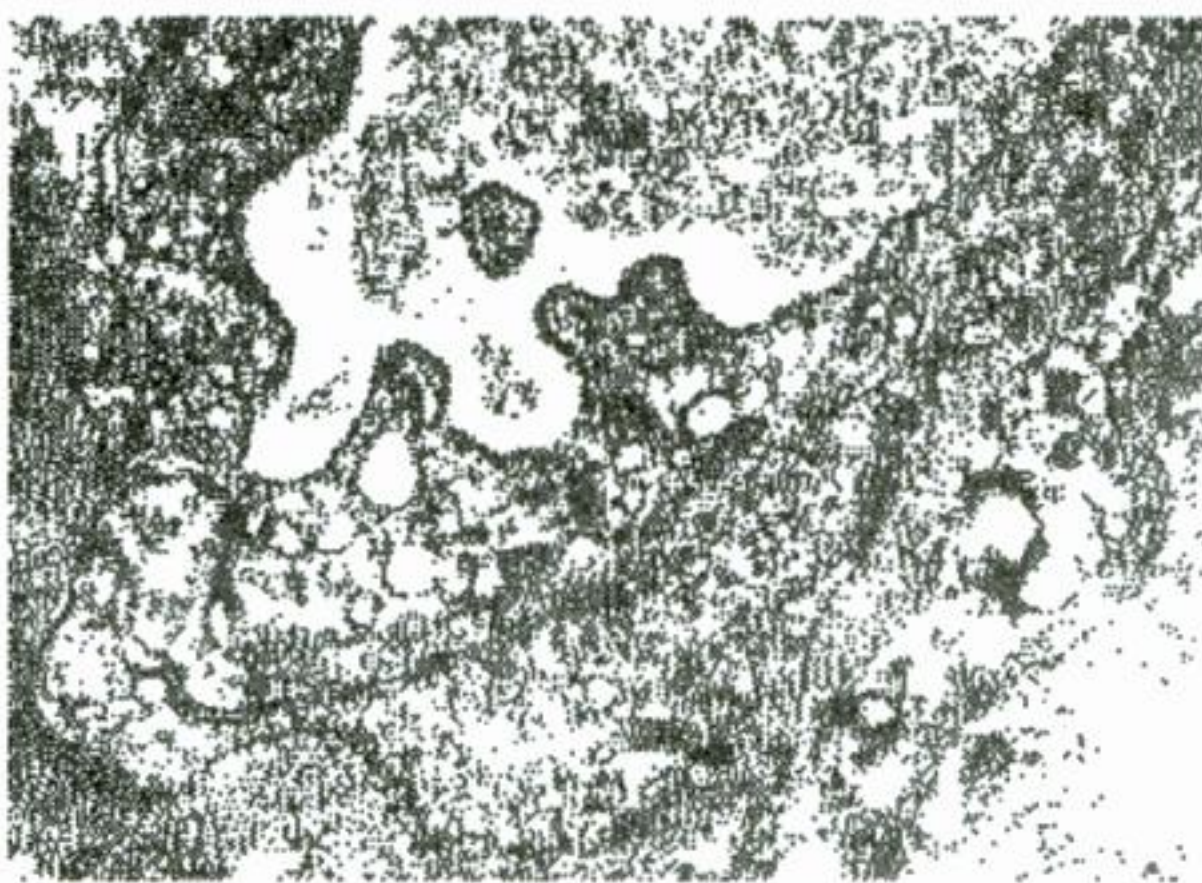


Рис. 2. Электронно-микроскопический снимок участка заднего гипоталамуса крысы после ритмических холодовых воздействий на каудальные терморецепторы. Формирование пиноцитозных везикул в цитоплазме васкулярной части эндотелиоцита. $\times 30000$

дина $F_{2\alpha}$ не была подвержена существенным изменениям и только спустя 6 ч после введения животных в гипотермию отмечено увеличение его уровня в крови с последующим уменьшением в процессе периода восстановления температуры тела (табл. 3). Кроме того, нами отмечено существенное снижение цАМФ в крови животных под влиянием умеренной КЦГ (ректальная температура 34–35 °С). Так, на уровне 32 °С его уменьшение в крови достигало 56 %, а спустя 6 ч охлаждения — 50 % от величины показателей наркотизированных животных. После отогрева наблюдали активацию синтеза цАМФ с последующим уменьшением через сутки (табл. 4). По нашему мнению, снижение содержания цАМФ в плазме крови на фоне активации симпатических влияний и увеличения содержания простагландина Е может быть связано с его аккумуляцией в тканях, например, в сердце или сосудах. В сердечной мышце нами отмечено увеличение содержания цАМФ при КЦГ 32 °С и наркозе за счет увеличения каталитической активности аденилатциклазы, причем опосредованной как β -адренорецепторами (стимуляция изопротеренолом), так и другими факторами (стимуляция NaF), например, простагландины группы Е.

Т а б л и ц а 4

Влияние КЦГ 32 °С на содержание простагландинов, цАМФ и активность аденилатциклазы

Показатели	Условия эксперимента				
	Исходные данные	Наркоз	КЦГ 32 °С	6 ч КЦГ	24 ч КЦГ
ПГ $F_{2\alpha}$ в плазме крови, нмоль/л	$0,14 \pm 0,03$	$0,14 \pm 0,03$	$0,15 \pm 0,03$	$0,29 \pm 0,03$	$0,16 \pm 0,02$
ПГЕ в плазме крови, нмоль/л	$11,11 \pm 0,17$	$10,46 \pm 1,03$	$10,75 \pm 1,40$	$13,77 \pm 1,30$	$15,59 \pm 1,21$
цАМФ в плазме крови (пмоль/мг белка/мин)	$12,95 \pm 1,95$	$13,95 \pm 1,33$	$7,87 \pm 1,27$	$6,94 \pm 1,12$	$11,54 \pm 1,22$
Активность АЦ в сердечной мышце (пмоль/мг белка/мин) без эффектора	$0,08 \pm 0,01$	$0,20 \pm 0,02$	$0,22 \pm 0,01$	$0,23 \pm 0,05$	$0,03 \pm 0,02$
+ 10 mM NaF	$0,99 \pm 0,06$	$2,78 \pm 0,22$	$2,67 \pm 0,22$	$2,06 \pm 0,04$	$0,26 \pm 0,05$
+ 10^{-5} М изопротеренола	$0,24 \pm 0,05$	$0,82 \pm 0,09$	$0,87 \pm 0,04$	$0,32 \pm 0,08$	$0,01 \pm 0,01$

Повышение активности аденилатциклазы и увеличение содержания цАМФ приводит к вазодилатации мозговых микрососудов, активации эндоте-

лиальных клеток, появлению признаков пиноцитоза, что может сопровождаться увеличением везикулярного транспорта и повышением проницаемости ГЭБ (рис. 2).

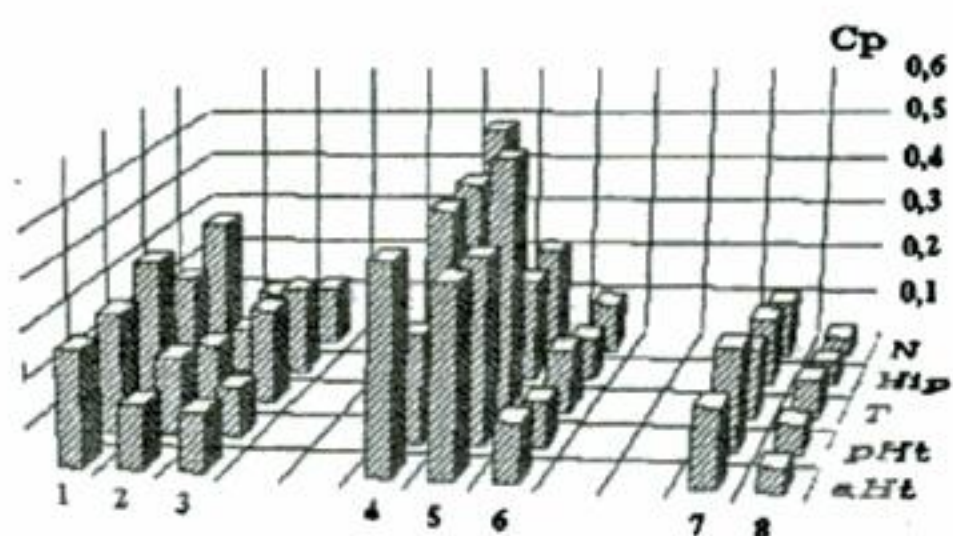


Рис. 3. Влияние краниocereбральной гипотермии на проницаемость ГЭБ для нейромедиаторов: 1 — проницаемость ^3H -норадреналина через ГЭБ при КЦГ 32°C ; 2 — проницаемость ГЭБ для ГЭБ при КЦГ 32°C ; 3 — проницаемость ГЭБ для ГЭБ при КЦГ 32°C ; 4 — проницаемость ГЭБ для ^3H -ацетилхолина на фоне блокады синтеза простагландина; 5 — проницаемость ГЭБ для ^3H -ацетилхолина при КЦГ 32°C ; 6 — проницаемость ГЭБ для ^3H -ацетилхолина в норме; 7 — проницаемость ГЭБ для ^3H -адреналина при КЦГ 32°C ; 8 — проницаемость ГЭБ для ^3H -адреналина в норме

Действительно, при КЦГ 32°C происходит значительное повышение проницаемости ГЭБ для нейромедиаторов во всех изученных структурах мозга. Причем, как и при действии экзогенного бомбезина, наиболее значительно повышается проницаемость в гипоталамусе и таламусе (рис. 3). Блокатор синтеза простагландинов, в качестве которого использовали ацетилсалициловую кислоту [1], понижал проницаемость ГЭБ для НА, хотя проходимость для ацетилхолина в этих условиях оставалась высокой, что можно объяснить активацией ацетилхолинэстераз простагландинами [19]. Таким образом, пептиды, простагландины, циклические нуклеотиды, нейромедиаторы, гормоны и др. служат коммуника-

тивными сигналами межклеточных взаимодействий, изменяющих проницаемость ГЭБ и передающих информацию в ЦНС [4].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ажгихин И.С. Простагландины — новый класс биологически активных веществ / Простагландины. — М.: Медицина, 1978. — С. 6–83.
2. Арчакова Л.И., Белявский Е.М., Гурин В.Н. Ультраструктурная организация медиальной преоптической области гипоталамуса и ее изменения при действии пирогенов // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. — 1989. — 94, № 1. — С. 44–52.
3. Бабийчук Г.А., Марченко В.С., Ломакин И.И., Белостоцкий А.В. Нейрофизиологические процессы охлажденного мозга. — Киев: Наук. думка, 1992. — 207 с.
4. Климов П.К., Марьянович А.Т., Поляков Е.Л. и др. Физиологические эффекты бомбезина // Физиол. журн. СССР им. Сеченова. — 1985. — 71, № 2. — С. 145–170.
5. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1980. — 293 с.
6. Ломакин И.И., Ломако В.В., Шило А.В. и др. Некоторые особенности реагирования норадренергической системы на однократную и повторную краниocereбральную гипотермию. Экспериментальное и клиническое исследование // Лечебная гипотермия: Сб. науч. тр. — Харьков, 1992. — С. 127–133.
7. Марьянович А.Т., Поляков Е.Л. Бомбезин: предполагаемое действие на тонус симпатических нейронов спинного мозга // Симп. Физиология пептидов: Тез. докл. (18–22 апреля 1988). — Л., 1988. — С. 117–118.
8. Марьянович А.Т., Поляков Е.Л. Нейропептиды и гематоэнцефалический барьер // Успехи физиол. наук. — 1991. — 22, № 2. — С. 33–51.
9. Марьянович А.Т., Поляков Е.Л., Куранова И.Л., Чуркина С.И. Бомбезинергическая система мозга // Физиол. журн. СССР им. Сеченова. — 1989. — 75, № 5. — С. 684–690.
10. Марьянович А.Т., Шипилов Ю.И., Цыган В.Н. Сопряженные терморегуляторные и гемодинамические эффекты при центральном введении бомбезина // Физиол. журн. СССР им. Сеченова. — 1988. — 75, № 8. — С. 1186–1190.
11. Меньшиков В.В. Методы клинической биохимии гормонов и медиаторов. — Ч. 2. — М., 1974. — С. 27–35.
12. Папсуевич О.С., Чипенс Г.И., Михайлова С.В. Нейрогипофизарные гормоны. — Рига: Зинатне, 1986. — 283 с.
13. Попова Н.К., Науменко Е.В., Колпаков В.Т. Серотонин и поведение. — Новосибирск: Наука, Сибирское отд., 1978. — 304 с.
14. Росин Я.А. Регуляция функций. — М.: Наука, 1984. — 172 с.

15. Ткачук В.А., Балденков Г.Г. Выделение, очистка и характеристика регуляторных свойств аденилатциклазы сердца кролика // Биохимия. – 1978. – 43, вып. 6. – С. 1097–1110.
16. Чазов Е.И., Исаченков В.А. Эпифиз: место и роль в системе нейроэндокринной регуляции. – М.: Наука, 1974. – 238 с.
17. Banks W.A., Kastin A.J. Permeability of the blood-brain barrier to neuropeptides: the case for penetration // Psychoneuro-endocrinol. – 1985. – 10, № 4. – P. 385–399.
18. Banks W.A., Kastin A.J. Saturable transport of peptides across blood-brain barrier // Life Sci. – 1987. – 41, № 11. – P. 1319–1338.
19. Brown M.R. Bombesin, somatostatin related peptides: Action on thermoregulation // Fed. Proc. – 1981. – 40, № 13. – P. 2765–2768.
20. Brown M.R., Tache Y. Hypothalamic peptides: Central nervous system control of visceral function // Fed. Proc. – 1981. – 40, № 11. – P. 2565–2569.
21. Brown M.R., Allen R., Fisher L. Bombesin alters the sympathetic nervous system response to cold environment // Brain Res. – 1987. – 400, № 1. – P. 35–39.
22. Chacrabarty G., Poddar M.K., Ghash J.J. Effect of prostaglandin E on synaptosomal membrane-bound enzyme activities in rat brain // Int. conf. on prostaglandins. – Florence, 1975. – P. 12.
23. Chiueh C., Sun C.L., Kopin I.J. et al. Entry of [³H] norepinephrine, I-albumin and Evans blue from blood into brain following unilateral osmotic opening of the blood-brain barrier // Brain Res. – 1978. – 145. – P. 291–301.
24. Fisher L.A., Brown M.R. Bombesin-induced stimulation of cardiac parasympathetic innervation // Regulat. Peptides. – 1984. – 8, № 4. – P. 335–343.
25. Gullis R.J., Rowe C.E. The stimulation by transmitter substances and putative transmitter substances of the net activity of fospholipase A of synaptic membrane of cortex of guineapig brain // Biochem. J. – 1975. – 148. – P. 197–208.
26. Hawkins M.F., Avery D.D. Effects of centrally-administrated bombesin and adrenalectomy on behavioral thermoregulation and locomotor activity // Neuropharmacol. – 1983. – 22, № 11. – P. 1249–1256.
27. Joo F. The blood-brain barrier *in vitro* - ten years of research on microvessels isolated from the brain // Neurochem. Int. – 1985. – 7. – P. 1–25.
28. Kastin A.J., Olson R.D., Schally A.V. et al. CNS effects of periferally administrated brain peptides // Life Sci. – 1979. – 25, N 5. – P. 401–414.
29. King B.F. Bombesin and satiety // News in Physiol. Sci. – 1991. – 6, August – P. 177–180.
30. Kobayashi S., Fujita T., Sasagawa T. The endocrine cells in human duodenal mucosa. An electron study // Arch. Histol. Jap. – 1970. – 31. – P. 477–494.
31. Meisenberg G., Simmons W.H. Peptides and the blood-brain barrier // Life Sci. – 1983. – 32, № 6. – P. 2611–2623.
32. Namba H., Lucignani G., Nehlic A., et al. Effects of insulin on hexose transport across blood-brain barrier in normoglycemia // Amer. J. Physiol. – 1987. – 252, № 3. – Pt 1. – P. E299–E303.
33. Pardridge W.M. Neuropeptides and the blood-brain barrier // Ann. Rev. Physiol. – 1983. – 45. – P. 73–82.
34. Reid J.L., Rubin P.C. Peptides and central neural regulation of the circulation // Physiol. Rev. – 1987. – 67, № 3. – P. 725–749.
35. Sharma H.S., Dey P.K. Influence of long-term acute exposure on regional blood-brain barrier permeability, cerebral blood flow and 5-HT level in conscious normotensive young rats // Brain. Res. – 1987. – 424. – P. 153–162.
36. Stryken-Boudie H.A. Catecholamines receptors in nervous system. – Nijemenen, 1975. – 234 p.
37. Tache Y., Brown M. On the role of bombesin in homeostasis // Trends Neurosci. – 1982. – 5, № 12. – P. 431–433.

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

Поступила 28.01.94

Г.О.БАБІЙЧУК, В.С.МАРЧЕНКО, Ю.Ф.ПАСТУХОВ, О.В.ШИЛО, В.В.ЛОМАКО, І.І.ЛО-
МАКІН, Л.М.МАРЧЕНКО

ДО МЕХАНІЗМІВ РЕГУЛЯЦІЇ І ПРОНИКНОСТІ ГЕМАТОЕНЦЕФАЛІЧНОГО БАР'ЄРУ ОХОЛОДЖЕНОГО МОЗКУ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Вивчено вплив краніоцеребральної гіпотермії та внутрішньочеревного введення бомбезину на проникність гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ) різних структур головного мозку щура (передня і задня області гіпоталамусу, неокортекс, таламус, гіпокамп) для ³Н-норадреналіну, ³Н-адреналіну, ³Н-ацетілхоліну. Обговорюються можливі механізми зміни проникності ГЕБ для біологічно активних речовин.

G.A.BABIYCHUK, V.S.MARCHENKO, YU.F.PASTUKHOV, A.V.SHILO, V.V.LOMAKO,
I.I.LOMAKIN, L.N.MARCHENKO

ON THE MECHANISM OF REGULATING BLOOD-BRAIN BARRIER PERMEABILITY OF THE COOLED BRAIN

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the Academy of
Sciences of the Ukraine, Kharkov, Ukraine

There were studied the effects of craniocerebral hypothermia and intraperitoneal administration of bombesin on permeability of blood-brain barrier (BBB) of various structures of rat brain (anterior and posterior regions of hypothalamus, neocortex, thalamus, hippocampus) to ^3H -norepinephrine, ^3H -epinephrine, ^3H -acetyl choline. Possible mechanisms of the alterations in the permeability of BBB for biologically active substances are speculated upon.

УДК 576.32/36:591.128.1

Л.В.Цымбал, С.В.Шовкопляс, А.М.Белоус

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОДА-БЕЛОК-ЛИПИДНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В ЭРИТРОЦИТАХ ПОЙКИЛОТЕРМНОГО ОРГАНИЗМА

Изучали микровязкость липидов, водно-белковой поверхности мембран и цитозольных белков эритроцитов лягушки. Обнаружены отличия параметров динамической структуры липидов и белков в зависимости от температуры акклимации амфибий.

Среди разнообразных механизмов генетической клеточной адаптации к неблагоприятным факторам среды большое значение имеет направленное изменение микроокружения биологически важных макромолекул, олигомерных комплексов в цитоплазме и мембране клеток [8]. Изучение особенностей взаимодействия компонентов клеток организмов, приспособленных к различным интервалам изменения физико-химических параметров среды, в частности, выяснение роли осмотически активной и связанной воды в реакции белок-белковых и белок-липидных комплексов на изменение температуры, представляется важным для решения проблемы повышения устойчивости клеток к альтерирующим воздействиям.

Имеющиеся в литературе немногочисленные данные свидетельствуют об адаптивном значении определенного соотношения свободной и связанной воды [7]. Принимая также во внимание роль взаимодействий биомacroмолекул и мембран с водой в их структурно-функциональном состоянии [3], можно предположить, что вода-белок-липидные взаимодействия в клетках должны носить отпечаток адаптивных приспособлений организма к выживанию при определенных температурах.

Изучение данной проблемы в сравнительном аспекте на эритроцитах гомойотермного и пойкилотермного организмов представляет значительный интерес ввиду возможности варьирования в нативных клетках содержания воды. Наличие ядра и развитой спектрин-актиновой сети в эритроцитах амфибий [6] может приводить к изменению белок-белковых и белок-липидных взаимодействий, а также их реакции на изменение температуры.

В настоящей работе предпринята попытка выяснения влияния температуры акклимации на динамическую структуру мембран и цитозольных белков эритроцитов лягушки. Исследования конформационной динамики мембраносвязанных и водорастворимых белков, а также состояния липидного матрикса мембран проводили методом ЭПР спиновых меток и зондов [5]. Для ковалентного мечения белков применяли малеимидную (M-R) и парахлормеркурийбензоатную (ПХМБ-R) метки, приготовление спин-меченных образцов осуществляли по стандартной методике [9]. Липидный матрикс мембран исследовали с помощью спин-меченого аналога пальмитиновой кислоты [8], име-

ющего нитроксильный фрагмент в S_1 -положении, что делает этот зонд ценным инструментом изучения водно-липидной поверхности мембран.

В работе использовали свежевыделенные эритроциты из крови лягушек, акклиматизированных к 20 и 4–8 °С. Акклиматизацию к 20 °С осуществляли в течение не менее 2-х сут, при холодовой акклиматизации забор крови и выделение эритроцитов проводили в холодовой камере. Стабилизирующая и отмывочная среда содержала соответственно раствор Рингера и физиологический раствор хлорида натрия. Эксперименты проводили на лягушках, отловленных осенью и содержавшихся при 4–8 °С в период с ноября по январь. Для выяснения роли собственно температурного фактора в изменении белок-белковых и белок-липидных взаимодействий использовали также эритроциты курицы, изолированные из крови при комнатной температуре. Спектры ЭПР спиновых меток и зондов регистрировали на спектрометре ER-100 Д «Брукер» (Германия) со стандартной термоприставкой. Динамическую структуру белков и текучесть липидов оценивали по параметрам вращательной подвижности ковалентно связанных меток и липидного зонда, рассчитанных по формулам [2]. Известно, что легко проникающие через мембраны метки неспецифически связываются с SH-группами белков, экспонированными в воду. Как правило, спектры ЭПР ковалентных меток представляют собой суперпозиции спектров от нитроксидов, связанных с активными группами, по-разному доступными воде. При этом распределение меток между более и менее подвижными остатками белков может отражать крупномасштабную динамику олигомерных структур [10], а также конформационные переходы белков при их функционировании [3].

Вид спектров ЭПР примененных в данной работе меток свидетельствует о локализации спинмеченых остатков белков на поверхности макромолекул в глицериноподобном слое воды [5], а также в полостях белков, образованных в третичной структуре либо в местах контакта субъединиц [10]. На рис. 1 и 2 (на этих и последующих рисунках приведены типичные кривые, полученные в 3–5 экспериментах) представлены данные по изменению динамической структуры водно-белковой поверхности белков эритроцитов лягушки (ЭР_л) и курицы (ЭР_к), подвергнутых охлаждению. Как видно из рисунков, микровязкость водно-белковой поверхности в ядродержащих эритроцитах существенно выше таковой в эритроцитах человека. Кроме того, обращают на себя внимание более резкие нарушения монотонности изменений параметра микровязкости при температурах, близких к температурам перестроек на водно-белковой поверхности эритроцитов человека [9]. Можно предположить, что уменьшение количества объемной воды в ядродержащих клетках приводит к увеличению “чувствительности” ковалентных меток к динамической структуре собственно водно-белковой матрицы. Немонотонное изменение параметра подвижности слабо доступной растворителю метки (рис. 2, в) с участками “аномального” хода кривой при понижении температуры в интервалах 306–302, 300–296, 292–288 и 286–282 К по характеру совпадает с термоиндуцированными перестройками сетки водородных связей в водно-белковых растворах, обнаруженными ранее [2] при изучении механизмов стабилизации нативной конформации водорастворимых белков. Как предположили авторы [4], немонотонное ослабление или упрочнение водородных связей в рас-

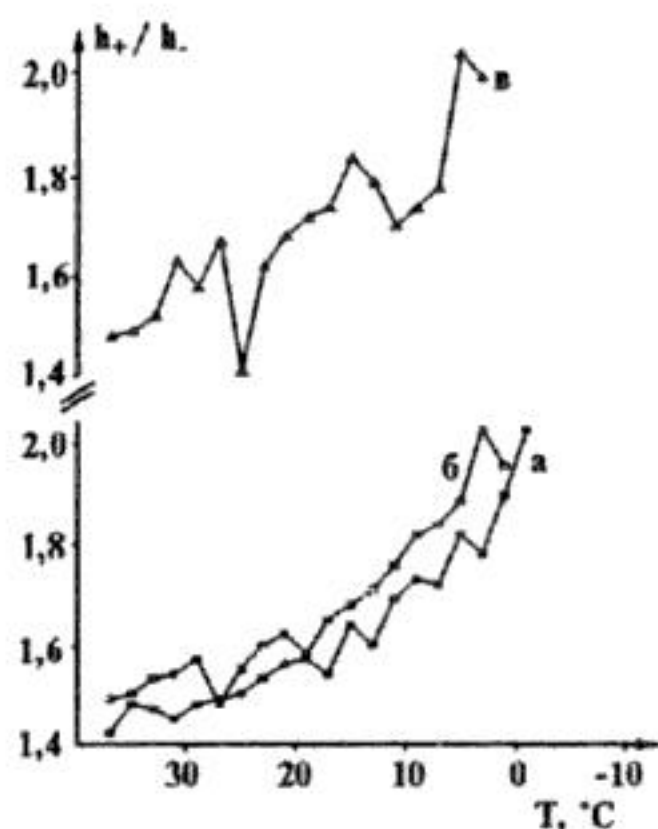


Рис. 1. Температурная зависимость подвижности малеимидной метки, присоединенной к белкам эритроцитов: а — эритроциты лягушки, акклиматизированной к холоду; б — эритроциты лягушки, акклиматизированной к 293 К; в — эритроциты курицы

творах белков, показанное методом ИК-спектроскопии, может быть причиной неденатурационных переходов биомакромолекул.

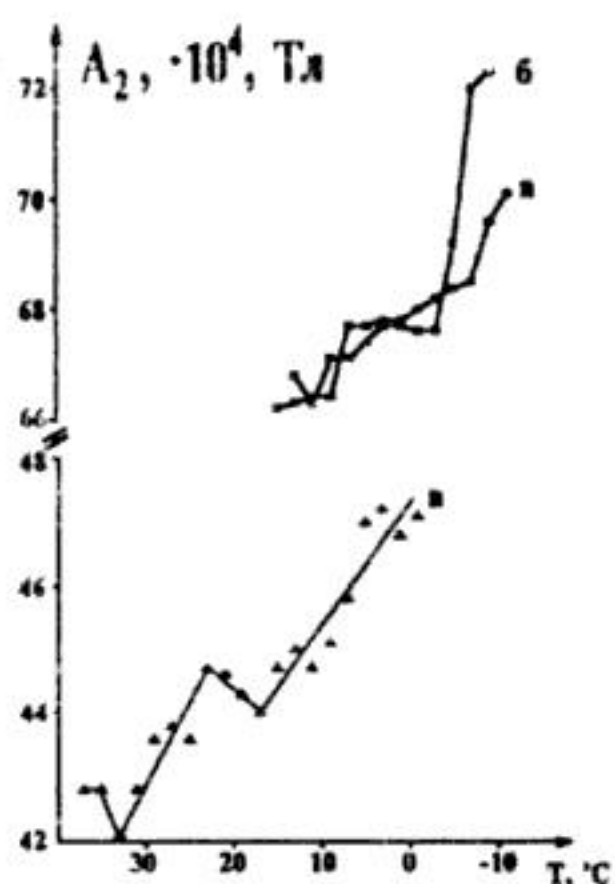


Рис. 2. Температурная зависимость параметра спектра ЭПР ковалентной метки, отражающей состояние полостей белков эритроцитов: а — лягушки, акклимированной к 277 К; б — лягушки, акклимированной к 293 К; в — курицы

обусловлена увеличением кластерфильных взаимодействий при увеличении размера полостей или их числа, что, в целом, приводит к увеличению доступности белков воде. Возможно, этим определяется наличие еще одного перехода около 273 К (рис. 2, б), а также заметно меньшее увеличение структурной жесткости белков в ЭР лягушки, акклимированной к холоду, при внеклеточной кристаллизации.

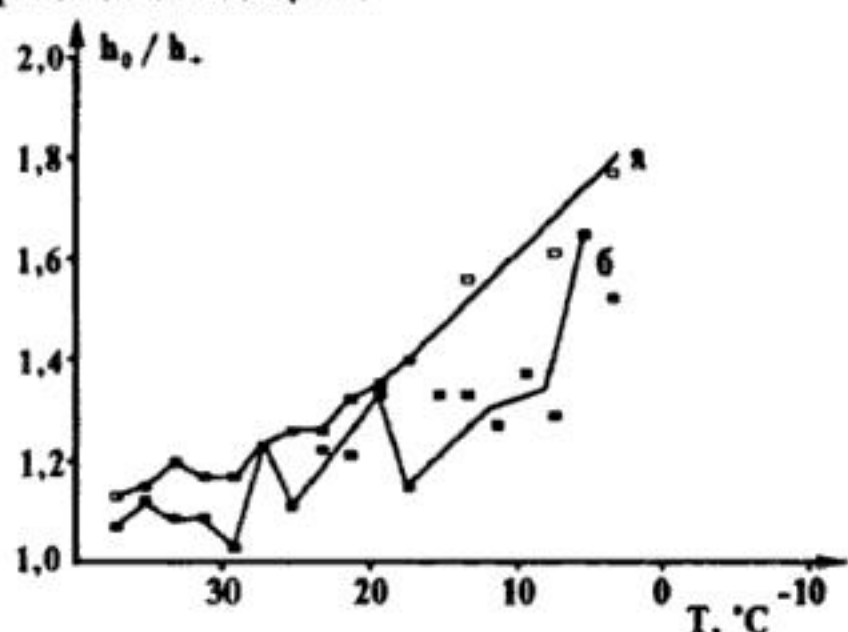


Рис. 3. Подвижность жирнокислотного спинового зонда в липидном бислое безядерных и ядродержащих эритроцитах в зависимости от температуры: а — эритроциты человека [7]; б — эритроциты курицы

Из рис. 3 и 4 видно, что при охлаждении эритроцитов лягушки и курицы наблюдаются термоиндуцированные структурные переходы на водно-липидной поверхности мембран при температурах, совпадающих с перестройками белков. Мы в этом случае также предполагаем, что уменьшение количества свободной внутриклеточной воды в ядродержащих клетках приводит к увеличению степени взаимодействия водно-белковой и водно-липидной поверхности, что регистрируется как нарушение монотонности изменения вращательной подвижности липидного зонда, нитроксильный фрагмент которого образует водородные связи с водой. Тогда увеличение числа "аномальных" участков на кривых зависимости подвижности липидного зонда можно объяснить

Обнаруживаемые отличия в динамической структуре белков ЭР лягушки, адаптированной к различной температуре, могут быть интерпретированы как уменьшение структурной жесткости водно-белковой поверхности в ЭР лягушки, акклимированной к 277 К, что особенно заметно при охлаждении клеток в интервале температур 293–276 К (рис.1). По-видимому, перестройки водно-белковых взаимодействий при температурах 303, 298, 290 и 280 К происходят как на внешней поверхности белков, доступной свободному растворителю, так и в полостях биомакромолекул, обусловленных третичной структурой, а также контактами субъединиц в олигомерных ансамблях белков [10] (рис. 2). При этом обращает на себя внимание модификация перехода в районе 283 К, который происходит на цитозольной поверхности мембран эритроцитов (рис.2, а), в зависимости от температуры акклимации. Увеличение кооперативности этого перехода при адаптации к холоду, согласно представлениям [3], может быть

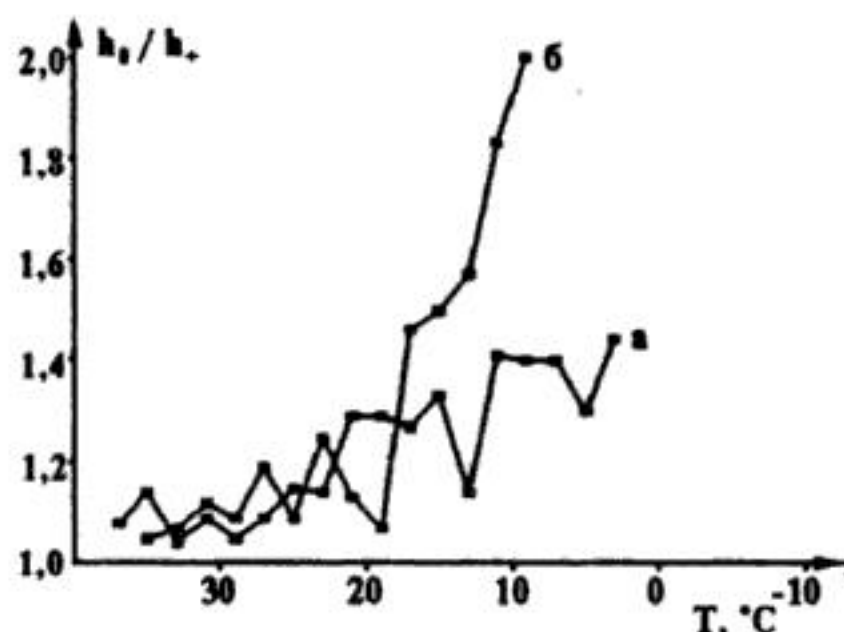


Рис. 4. Температурная зависимость подвижности липидного зонда в мембранах эритроцитов лягушки: а — акклимация к 277 К; б — акклимация к 293 К

увеличением возмущающего действия белков на поверхность мембраны, например, в результате увеличения экспонированности боковых групп белков в воду (рис. 4, а) что указывает на способность белков опосредованно через воду влиять на динамическую структуру полярной области мембран. Как видно из данных рис. 4, заметное увеличение микровязкости водно-липидной поверхности мембран ЭР лягушки, адаптированной к 293 К, происходит при температурах ниже 288 К, в то время как адаптация к холоду сопровождается видимой стабилизацией текучести в области полярных головок фосфолипидов в интервале температур 293–273 К. Эта стабилизация, однако, не препятствует резким переходам, характер которых аналогичен перестройкам водно-белковой поверхности белков. Наиболее существенное отличие в термотропном поведении поверхности липидного бислоя в зависимости от температуры акклимации, таким образом, отмечено при температуре перехода вблизи 283 К, что может быть обусловлено изменением белок-липидных взаимодействий на цитозольной поверхности мембран.

Полученные в настоящей работе данные об особенностях структурной динамики белков эритроцитов в зависимости от температуры акклимации оставляют вне рассмотрения природу инициации изменений водно-белковых взаимодействий в процессе адаптации к определенной температуре. Можно пока лишь высказать предположение о ионной или неэлектролитной природе модификаторов структуры водно-белковой матрицы [3].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анисимов А.В., Швалева А.Л., Ионенко И.Ф. Водопроницаемость и гидратация мембран в связи с устойчивостью клеток к низким температурам // Биофизика. – 1988. – 33, № 1. – С. 113–116.
2. Жуковский А.П., Халюмов А.И., Ровнов Н.В., Раев А.Н. Термостабильность структуры белков в нативном состоянии и механизм ее поддержания // Биофизика. – 1987. – 32, № 4. – С. 583–587.
3. Кяйвярайнен А.И. Динамическое поведение белков в водной среде и их функции. – Л.: Наука, 1980. – 272 с.
4. Кяйвярайнен А.И. Термодинамический анализ процессов в трехкомпонентной системе вода-ионы-макромолекулы, механизм термоиндуцированных переходов в системе. Дестабилизация растворителя и взаимодействие белок-белок и белок-клетка через растворитель // Биофизика. – 1988. – 33, № 3. – С. 54.
5. Лихтенштейн Г.И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии. – М.: Наука, 1974. – 256 с.
6. Фултон А. Цитоскелет. Архитектура и хореография клетки. – М.: Мир, 1987. – 120 с.
7. Хочачка П., Сомеро Дж. Биохимическая адаптация. – М.: Мир, 1988. – 568 с.
8. Цымбал Л.В., Гаврилова И.И., Моисеев В.А. Исследование влияния полиспиртов на динамическую структуру биологических мембран методом спиновых зондов // Криобиология. – 1985. – № 3. – С. 20–24.
9. Цымбал Л.В., Моисеев В.А. Влияние криопротекторов на мембраносвязанные и цитозольные белки эритроцитов // Проблемы криобиологии. – 1992. – № 2. – С. 13–20.
10. Cassidy R., Daveloose D., Leterrier F. Spin labeling of human spectrin. Effects of temperature, divalent cations and reassociation with erythrocyte membrane // Biochem. et Biophys. Acta. – 1980. – 601, № 3. – P. 478–489.

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

Поступила 28.02.94

Л.В.ЦИМБАЛ, С.В.ШОВКОПЛЯС, А.М.БІЛОУС

ДОСЛІДЖЕННЯ ВОДА-БІЛОК-ЛІПІДНИХ ВЗАЄМОДІЙ В ЕРИТРОЦИТАХ ПОЙКІЛОТЕРМНОГО ОРГАНІЗМУ

Інститут проблем криобіології і криомедицини АН України, м. Харків

Вивчали мікрров'язкість ліпідів, водно-білкової поверхні мембран та цитозольних білків і еритроцитів жаби. Знайдено відмінності параметрів динамічної структури ліпідів та білків еритроцитів в залежності від температури акліматії.

L.V.TSYMBAL, S.V.SHOKKOPLYAS, A.M.BELOUS

INVESTIGATION OF WATER-PROTEIN-LIPID INTERACTIONS IN RED BLOOD CELLS OF POIKILOTHERMIC ANIMALS

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov, Ukraine

Microviscosities of lipids of membrane water-protein surface and cytosolic proteins of frog red blood cells (RBC) were studied. The difference in the parameters of the dynamic structure of RBC lipids and proteins was found to depend on the temperature of amphibian acclimation.

УДК 612.12:612.57:591.543.42

Э.З.Эмирбеков, С.П.Львова, Н.К.Кличханов

БИОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В КРОВИ ПРИ ИСКУССТВЕННОЙ И ЕСТЕСТВЕННОЙ ГИПОТЕРМИИ

Представлен обзор данных литературы и собственных результатов по биохимии крови в динамике гипотермии и зимней спячки млекопитающих. Авторы приходят к заключению о наличии заметного различия в биохимических показателях крови и физико-химических характеристиках эритроцитов при искусственном и физиологическом снижении температуры тела.

Состав и свойства крови отличаются динамическим, но относительно устойчивым постоянством, благодаря чему она играет важную роль в поддержании гомеостаза при изменяющихся условиях среды. По физиологическим и биохимическим показателям крови можно объективно и достоверно судить о состоянии организма. Изучение биохимических изменений крови при искусственной и физиологической (зимняя спячка) гипотермии в сравнительном аспекте может представить материал, помогающий раскрыть механизмы влияния низких температур на животных и человека и обеспечить прогресс использования гипотермии в клинике.

Целью настоящей работы явился анализ наших собственных экспериментов и материалов других авторов по данной проблеме. Известно, что холодовой стресс (как и стресс другой этиологии) активизирует гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую систему. Следствием этого является существенное усиление синтеза и секреции катехоламинов и глюкокортикоидов, которые способствуют распаду депонированных липидов и гликогена, а также усилению их утилизации в тканях. Эта закономерность сохраняется и при умеренной (30–28 °C) гипотермии ненаркотизированных млекопитающих [8, 25, 31]. Уровень глюкозы и свободных жирных кислот в крови при этом существенно повышается, причем увеличение концентрации жирных кислот (в 2–2,5 раза) более выражено, чем повышение концентрации (на 30–50%) глюкозы [31]. Жирные кислоты являются более калорийным энергетическим субстратом, чем углеводы, они способствуют энергизации дыхательной цепи, понижают коэффициент Р/О и, следовательно, усиливают теплообразование. Высокий уровень гликемии и концентрации жирных кислот в крови сохраняется в течение нескольких часов пролонгирования умеренной гипотермии [20, 31]. При этом к концу 3-го ч гипотермии концентрация глюкозы в крови превышает уровень контроля на 32% [20], а жирных кислот – в 3,6 раза [31].

Таким образом, удлинение сроков умеренной гипотермии усиливает различия в мобилизации запасных углеводов и жиров. В еще большей мере эти различия проявляются при акклимации животных к непрерывному или прерывному действию холодового агента [27, 28, 31]. Повышается также содержание кетоновых тел, холестерина, меняется соотношение его свободной и этерифицированной форм (табл. 1).

Высокий уровень липидных компонентов наблюдается в крови сусликов [19], которым свойственна генетически закрепленная тканевая адаптация к

действию низких температур. При умеренной гипотермии зимоспящих млекопитающих, наряду со значительным (в 2,5 раза) увеличением концентрации жирных кислот, в крови существенно повышается содержание холестерина [19]. Повышение в той или иной мере уровня общего холестерина в крови и увеличение доли его свободной формы наблюдалось также на начальных этапах гипотермии незимоспящих животных [1, 13, 30]. Умеренная гипотермия изменяет не только общее содержание жирных кислот в крови, но и жирнокислотный спектр [8], причем в разных фракциях липопротеинов плазмы динамика этих изменений может быть разнонаправлена [9]. Если увеличение количества жирных кислот в крови эндотермного организма на начальных этапах охлаждения является четко установленным фактом, то данные по их динамике при глубокой гипотермии не так однозначны [8, 21, 31]. По-видимому, это в значительной мере зависит от скорости охлаждения, отсутствия или применения наркоза, длительности гипотермии и прочих причин.

Т а б л и ц а 1

Содержание липидных компонентов в сыворотке крови крыс при искусственной гипотермии ($M \pm m$)

Вариант опыта	Холестерин, мг %			Фосфо- липиды, мг %	Жирные кислоты, мкэкв/мл	Ацето- ацетат	β -оксибу- тират
	общий	свобод- ный	этери- фициро- ванный				
Контроль	162 $\pm$ 9,4	70 $\pm$ 5,1	92 $\pm$ 3,8	298 $\pm$ 12,8	0,25 $\pm$ 0,02	0,9 $\pm$ 0,09	2,33 $\pm$ 0,2
Гипотермия, 30 °С	190 $\pm$ 8,8	99 $\pm$ 8,5*	90,6 $\pm$ 6,9	230 $\pm$ 10,5*	0,50 $\pm$ 0,02*	1,23 $\pm$ 0,15*	2,7 $\pm$ 0,12
Гипотермия, 20 °С	162 $\pm$ 6,0	105 $\pm$ 4,26*	57,6 $\pm$ 2,5*	187 $\pm$ 3,9*	0,22 $\pm$ 0,011	2,44 $\pm$ 0,10*	3,16 $\pm$ 0,07*
Самосогрева- ние, 37 °С	346 $\pm$ 14,7*	242 $\pm$ 14*	104 $\pm$ 3,3	321 $\pm$ 35,2	0,76 $\pm$ 0,04*	1,0 $\pm$ 0,06	2,93 $\pm$ 0,07
Крысы (37 °С), подвергнутые 12–15 сеансам охлаждения до 30 °С	317 $\pm$ 9,3*	227 $\pm$ 14*	92 $\pm$ 3,5	272 $\pm$ 22,3	0,66 $\pm$ 0,026*	1,8 $\pm$ 0,10*	2,7 $\pm$ 0,31

Примечание. Здесь и в табл. 2–4 звездочкой обозначены статистически достоверные ($p < 0,05$) изменения по сравнению с контролем.

В наших экспериментах (табл. 1) охлаждение ненаркотизированных крыс до 20 °С в течение часа вело к нормализации уровня жирных кислот в крови по сравнению с начальным этапом гипотермии. При 3-часовом пролонгировании глубокой гипотермии содержание жирных кислот в крови превышало контроль в 6 раз [31]. Уровень жирных кислот в крови может служить тестом на обратимость пролонгированного гипобиоза, так как при его снижении ткани начинают потреблять глюкозу, что способствует острой гипогликемии и гибели организма [25]. Из экспериментов следует, что глубокая искусственная гипотермия ведет к увеличению количества кетоновых тел в крови незимоспящих (табл. 1) и зимоспящих [19] млекопитающих. Кетоновые тела, вследствие своей гидрофильности, легко проникают из крови в ткани, поэтому при снижении кровотока и сужении капилляров, характерных для низких температур тела, они могут служить важным энергетическим субстратом прежде всего для скелетных мышц, миокарда, почек.

Литературные данные свидетельствуют о том, что при снижении температуры тела усиливаются процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) в крови крыс [6, 17]. Однако эти работы носят фрагментарный характер. Поэтому мы исследовали интенсивность процессов ПОЛ в крови крыс при гипотермии различной глубины. Оказалось, что при умеренной (30 °С) гипотермии содержание как первичных (диеновые конъюгаты), так и вторичных (кетодиены и сопряженные триены, МДА) продуктов ПОЛ в крови достоверно повы-

шается (табл. 2). Возможно, что в качестве компенсаторной реакции возрастает антиокислительная активность водорастворимой фракции плазмы крови и активность антиокислительных ферментов. При глубокой (20 °С) гипотермии наблюдается тенденция к нормализации процессов ПОЛ.

Т а б л и ц а 2

Влияние гипотермии на интенсивность процессов ПОЛ в крови и активность Na, К-АТФазы мембран эритроцитов крыс ($M \pm m$; $n=8-12$)

Исследуемые показатели	Контроль	Гипотермия, °С	
		30	20
Изолированные двойные связи E_{220} /мл	$5,63 \pm 0,30$	$6,51 \pm 0,14^*$	$5,89 \pm 0,15$
Диеновые конъюгаты E_{220} /мл	$1,47 \pm 0,09$	$1,68 \pm 0,05^*$	$1,64 \pm 0,06$
Кетодиены и сопряженные триены E_{278} /мл	$0,65 \pm 0,03$	$0,73 \pm 0,03^*$	$0,69 \pm 0,02$
МДА, мкмоль/л	$1,99 \pm 0,07$	$2,38 \pm 0,18^*$	$1,87 \pm 0,10$
Антиокислительная активность водорастворимой фракции плазмы, %	$58,1 \pm 1,6$	$73,5 \pm 0,6^*$	$42,7 \pm 1,9^*$
Активность СОД Ег/мг Нб	$1,36 \pm 0,05$	$1,82 \pm 0,06^*$	$1,14 \pm 0,03^*$
Активность каталазы, мкмоль/мг Нб/мин	$5,04 \pm 0,06$	$5,32 \pm 0,03^*$	$3,65 \pm 0,06^*$
Перекисная резистентность эритроцитов индуцированная: H_2O_2	$16,6 \pm 0,53$ ($10,9 \pm 0,22$)	-	$22,3 \pm 0,44^*$ ($17,8 \pm 0,25$)
Fe^{2+} -аскорбат	$12,1 \pm 0,52$ ($12,0 \pm 0,31$)	-	$18,8 \pm 0,24^*$ ($13,3 \pm 0,46$)
Активность Na, К-АТФазы, мкмоль P_n /мг белка	$1,93 \pm 0,08$	-	$1,76 \pm 0,05^*$

Примечание. В скобках указаны значения показателя после внутрибрюшинного введения мочевины.

Таким образом, по нашим наблюдениям, опасность интенсификации процессов ПОЛ в крови при гипотермии существует на ее начальных этапах, что, видимо, имеет стрессовую природу.

Интенсификация процессов ПОЛ в крови представляет наибольшую опасность для мембран форменных элементов и в первую очередь для эритроцитов. Показано, что при гипотермии в плазме крови крыс значительно увеличивается концентрация свободного гемоглобина, что свидетельствует об усилении внутрисосудистого гемолиза и снижении стабильности мембран [33]. В усилении внутрисосудистого гемолиза при гипотермии немаловажное значение имеет их окислительный лизис. Это подтверждается данными (табл. 2) о возрастании при гипотермии крыс гемолиза индуцированного как H_2O_2 (34%), так и системой Fe^{2+} -аскорбат (54%). Оказалось, что аргинин, введенный (в/б 120 мг на 100 г массы) животным за 30 мин до снижения температуры тела, защищает эритроциты от окислительного лизиса. При гипотермии значительно изменяется липидный состав мембран крыс. При этом существенно увеличивается количество лизофосфатидилхолина и свободных жирных кислот, что связывается с активацией под действием низкой температуры фосфолипазы A_2 [17].

Таким образом, данные литературы и результаты собственных исследований показывают, что при гипотермии происходит дестабилизация мембран эритроцитов. Одной из вероятных причин такой дестабилизации может быть изменение физико-химического состояния мембран клетки под действием низкой температуры, что приводит к повышению доступности липидов для атаки молекулярным кислородом и его "активными" формами.

В отличие от острого низкотемпературного стресса при повторяющихся умеренных (4–5 °С) холодовых нагрузках интенсивность ПОЛ в крови возвращается к исходному уровню [14]. В случае же повторяющихся сильных холодовых воздействий наблюдается усиление процессов ПОЛ в эритроцитах, "напряжение" и дисбаланс антиокислительной системы [4, 14]. Следовательно, при умеренном действии стрессора наблюдается процесс адаптации, включающий снижение интенсивности ПОЛ и рост антиокислительной активности, а при сильном стрессе — рост ПОЛ и несбалансированное изменение компонентов антиокислительной системы.

Итак, голодовой стресс, адаптация к нему, а также самонагревание после глубокой гипотермии сопровождаются резким увеличением энергетических затрат. При этом появляется возможность возникновения патологий, сохраняющихся довольно длительное время. В то же время в процессе эволюции у ряда животных умеренных широт возникло приспособление к перенесению зимней бескормицы, выражающееся в значительном снижении температуры тела и метаболизма. Гибернация (перезимовывание) или зимняя спячка наблюдается у представителей ряда классов (амфибий, рептилий, у около 200 видов млекопитающих, некоторых птиц) и является одним из примеров широко распространенного в живом мире явления торпидности. Ведущая роль в регуляции зимней спячки и периодических пробуждений, характерных для гибернирующих млекопитающих, принадлежит нервной (особенно структурам лимбической системы: гипокамп, гипоталамус, септальная область) и эндокринной системам [3, 10, 31, 41].

Известно, что при зимней спячке млекопитающих жир становится основным энергетическим субстратом [11]. Повышение содержания жирных кислот в крови гибернирующих млекопитающих отмечало ряд авторов [24, 31, 40]. Жировая ткань гибернирующих млекопитающих сохраняет чувствительность к глюкагону (стимулирующему липолиз), в то время как чувствительность к инсулину (подавляющему липолиз) снижается [38].

Содержание жирных кислот в крови зависит от длительности спячки. Так, при погружении суслика в спячку, концентрация жирных кислот в сыворотке крови снижается по сравнению с бодрствующими осенью животными на 28% [19]. Однако затем к концу баута она достоверно превышает контроль и поддерживается на высоком уровне в течение длительного времени. Периодические пробуждения способствуют резкому увеличению уровня жирных кислот и кетоновых тел в крови [24, 31]. Содержание холестерина и соотношение его свободной и этерифицированных форм в крови гибернирующих животных также зависит от длительности гибернации [19]. Наблюдается достоверное увеличение холестерина в крови весной перед пробуждением и, особенно, в ходе самого пробуждения. Динамика фосфолипидов в крови при гибернации более монотонна: их концентрация снижается на всех этапах зимней спячки [19].

Т а б л и ц а 3

Интенсивность глюконеогенеза из разных субстратов в срезах печени сусликов (*Citellus pygmaeus*) при гибернации, в мкМ глюкозы/г ткани/ч

Вариант опыта	Без суб- страта	Аланин	Глута- мат	Аспар- тат	Пируват	Оксало- ацетат	Сукци- нат	Глице- рин
Контроль, лето	2,7± 0,21	7,5С 0,17	4,9± 0,92	8,5± 0,25	6,5± 0,51	10,5С 0,35	16,0± 0,53	5,0± 0,25
Погружение в спячку, 19–18 °С	4,0± 0,72	16,0± 0,71*	17,2± 0,86*	14,4± 0,61*	16,6± 0,86*	12,6± 1,64	16,0± 0,64	13,6± 1,15*
Недельная гибер- нация, 11–10 °С	5,6± 0,35*	24,7± 0,23*	20,5± 1,11*	19,1± 0,48*	21,4± 0,57*	24,1± 0,53*	17,2± 0,53	22,5± 0,63*
2-месячная гибернация, 5 °С	8,6± 0,58*	48,9± 3,78*	54,0± 2,37*	38,6± 1,92*	53,5± 3,04*	63,6± 4,04*	28,7± 1,16	60,4± 4,00*
4-месячная гибернация, 5 °С	9,3± 0,41*	59,5± 1,85*	67,2± 0,93*	47,2± 1,46*	64,2± 1,25*	76,7± 0,42*	33,9± 1,40*	72,7± 0,98*

Энергетические потребности нервной системы и эритроцитов удовлетворяются за счет утилизации глюкозы. Погружение в спячку и ее начальные этапы со сравнительно высокой температурой тела (17–10 °С) сопровождаются некоторой гипогликемией [31, 32]. Однако при глубокой (5 °С) зимней спячке уровень гликемии возвращается к норме или превышает ее. Это несомненно является следствием значительного снижения утилизации глюкозы в тканях, особенно в ходе расточительного гликолиза [31].

Запасы гликогена в печени быстро восстанавливаются при периодических коротких пробуждениях за счет активации глюконеогенеза и в период самой спячки (табл. 3). Из таблицы видно, что чем продолжительнее гибернация, тем активнее идет синтез глюкозы из неуглеводных предшественников, особенно из глицерина и оксалоацетата. Интенсивный глюконеогенез обеспечивает высокий уровень глюкозы и гликогена в мозге гибернаторов [18], что необходимо для поддержания его функций.

Важную роль в поддержании гомеостаза углеводов во время зимней спячки играет глюкагон, синтез и секреция которого (в отличие от инсулина) при гибернации не подавляются, а при пробуждении резко усиливаются [34, 37]. При выходе из спячки наблюдается также увеличение в крови глюкокортикоидов [29, 35] и тиреоидных гормонов [29]. Наблюдаемые гормональные изменения способствуют активации углеводного и липидного обмена.

Нейрогуморальная регуляция метаболизма при чрезвычайно низкой температуре тела становится возможной благодаря особым свойствам крови зимоспящих животных [39]. Указанная особенность обеспечивает нормальное функционирование крови при низкой температуре тела и замедленном кровотоке во время зимней спячки. Кроме того, в период гибернации обнаружена низкая свертываемость крови [22]. Эти особенности крови зимоспящих обеспечивают сохранение микроциркуляции. Содержание кислорода в крови снижается относительно незначительно, а артериально-венозная разница по кислороду остается неизменной [23].

Т а б л и ц а 4

Энергия активации и температура излома кривой температурной зависимости АХЭ мембран эритроцитов сусликов при зимней спячке ($M \pm m$; $n = 6-8$)

Группа животных	Температура излома, °C	Энергия активации, ккал/моль	
		выше излома	ниже излома
Летний контроль	$27,9 \pm 1,20$	$1,43 \pm 0,13$	$3,18 \pm 0,10$
Спячка: 1 месяц	$19,4 \pm 0,29$ $p < 0,001$	$1,84 \pm 0,08$ $p < 0,01$	$3,07 \pm 0,10$
3 месяца	$15,7 \pm 0,41$ $p < 0,001$	$2,15 \pm 0,10$ $p < 0,01$	$3,89 \pm 0,16$ $p < 0,01$

Изменения энергетических, иммунологических, осмотических, онкотических и реологических условий внутренней среды организма предъявляют повышенные требования к таким "функционально неполноценным" клеткам как эритроциты, а на субклеточном уровне — их

мембранному аппарату. Наблюдения показали, что при зимней спячке в плазме крови сусликов накопление свободного гемоглобина происходит в значительно меньшей степени, чем у крыс при гипотермии, что свидетельствует о низком уровне внутрисосудстого гемолиза и повышении стабильности эритроцитов. У сусликов углубление и удлинение состояния зимней спячки приводит к повышению устойчивости эритроцитов к кислотному гемолизу. Об этом свидетельствует правый сдвиг основного пика (контроль $3,9 \pm 0,15$ мин, 3-месячная спячка — $5,6 \pm 0,13$ мин) и возрастание количества повышенистойких эритроцитов при зимней спячке. Оказалось, что эритроциты, взятые у зимоспящего животного, способны к длительному гипотермическому хранению [7]. При спячку уменьшается пассивная проницаемость ионов Rb^{86} и увеличивается активный транспорт Rb^{86} в эритроцитах [7], а активность Na/K-АТФазы существенно не меняется [16]. Следовательно, в состоянии зимней спячки плазматическая мембрана эритроцитов перестраивается таким образом, чтобы эффективно поддерживать ионный гомеостаз.

Поддержание функциональной активности и целостности мембран эритроцитов связаны прежде всего с их липидным составом [2, 5]. Обнаружено, что с наступлением спячки в липидах эритроцитов сусликов возрастает количество моноеновых жирных кислот, что по мнению авторов уменьшает вероятность их перекисидации. С наступлением гибернационного периода и по мере его углубления снижается молярное соотношение холестерина/фосфолипиды в мембранах эритроцитов сусликов [16].

Изменение липидного состава мембран эритроцитов отражается на функционировании мембраносвязанных ферментов. Нами в динамике зимней спячки изучены термокинетические параметры ацетилхолинэстеразы (АХЭ) эритроцитов сусликов [12]. Показано, что наиболее заметные изменения в кинетике действия фермента наблюдаются в течение первого месяца спячки, при температуре инкубации, близкой к температуре тела спящего животного. При этом повышается активность фермента, возрастает скорость превращения фермент-субстратного комплекса и сродство субстрата к ферменту. Как адаптивные изменения можно рассматривать и то, что в состоянии зимней спячки позиция перегиба на температурной кривой фермента смещается в низкотемпературную область (табл. 4).

Т а б л и ц а 5

Содержание сульфгидрильных групп (мкмоль/мг белка) и дисульфидных связей (мкмоль/белка) в белках мембран эритроцитов сусликов при зимней спячке ($M \pm m$; $n = 6-10$)

Группа животных	SH-группы				S-S связи
	Общие	Поверхностные (а)	Скрытые (б)	а/б	
Контроль	$0,200 \pm 0,007$	$0,123 \pm 0,004$	$0,080 \pm 0,008$	1,54	$0,022 \pm 0,004$
Спячка	$0,098 \pm 0,0005$ $p < 0,001$	$0,059 \pm 0,003$ $p < 0,001$	$0,040 \pm 0,002$ $p < 0,001$	1,48	$0,007 \pm 0,001$ $p < 0,001$

Можно думать, что при гибернации вокруг фермента создается специфическое липидное микроокружение, обеспечивающее конформационную подвижность при низких температурах. Однако не исключена возможность регуляции активности фермента за счет вытеснения из липидной матрицы и изменения степени погруженности в результате изменения давления в бислое и поверхностного натяжения биомембран.

Модификация активности мембранных ферментов возможна за счет изменения его конформации, которая поддерживается благодаря функциональным группам белка. Особое место среди функциональных групп белковой молекулы занимают сульфгидрильные группы [26]. Анализ содержания тиоловых групп в белках мембраны эритроцитов сусликов показал, что при 3-месячной спячке содержание SH-групп снижается в 2 раза, а дисульфидных связей – в 3 раза (табл. 5). Подобное явление мы обнаружили и для белков мембран синапсом коры головного мозга сусликов. Учитывая высокую реакционную способность SH-групп и риск их окисления, а также то, что восстановление их – это энергозависимый процесс, общее снижение этих функциональных групп, по-видимому является одной из стратегий адаптации клеток к низкой температуре тела. Таким образом, наши и литературные данные свидетельствуют о том, что при зимней спячке, в отличие от искусственной гипотермии, поддерживается стабильность и функциональные свойства мембран эритроцитов. Для обоснования этого факта требуются дополнительные исследования по изучению липидного состава, интенсивности процессов ПОЛ, активности антиокислительной системы эритроцитов в динамике зимней спячки.

Сопоставление биохимических изменений в крови при искусственной гипотермии, адаптации к низкой температуре и зимней спячке позволяет выделить патологические и адаптивные механизмы. Это способствует направленному поиску веществ, корректирующих метаболизм при снижении температуры тела и позволяющих создать управляемую, хорошо обратимую гипотермию у строгих гомойотермов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алимова А.Е., Максименко В.А., Шепелев А.П. Изменения обмена липидов на разных стадиях острой экспериментальной гипотермии // Физиол. журн. СССР. – 1973. – 59, №5. – С. 814–817.
2. Апуховская Л.И., Ивашкевич С.П., Вендт В.П. Влияние стероидов на свойства мембран эритроцитов при экспериментальном рахите // Вопр. мед. химии – 1979, № 5. – С. 548–554.

3. Белоусов А.В. Роль центральной нервной системы в контроле зимней спячки // Успехи физиол. наук. – 1993. – 24, № 2. – С. 109–127.
4. Бородин Е.А., Бородина Г.П., Доровский В.А. и др. Перекисное окисление липидов в мембранах эритроцитов и микросом печени и антиокислительная система тканей крыс при длительном действии холода // Биол. мембраны. – 1992. – 9, № 6. – С. 622–627.
5. Бриллиант М.Д., Воробьев А.И. Роль липидов в распределении эритроцитов на кислотной эритрограмме // Вопр. биофиз., биохим. и патологии эритроцитов. – М.: Наука, 1967. – С. 123–131.
6. Василькова Т.У., Кухта В.К. Колькасць продуктаў перакіснага акіслення ліпідаў і стан антыакісляльнай ахоўнай сістэмы эрытрацытаў ва умовах ахладжэння арганізма // Весці АН БССР. Сер. біял. н. – 1988, № 5. – С. 62–67.
7. Гулевский А.К., Загнойко В.И., Щенявский И.И. и др. Особенности структурно-функционального состояния эритроцитов гомойотермных и гетеротермных животных в условиях гипотермического хранения // Журн. эволюц. биохим. и физиол. – 1991. – 27, № 4. С. 432–436.
8. Гурин В.Н. Обмен липидов при гипотермии, гипертермии и лихорадке. – Минск: Беларусь, 1986. – 192 с.
9. Гурин В.Н., Семеня И.Н. Зависимость обмена липопротеинов плазмы крови при холодовом стрессе от функционального состояния м-холинреактивных систем // Криобиология. – 1988. – №2. – С. 21–24.
10. Демин Н.Н., Шортанова Т.Х., Эмирбеков Э.З. Нейрохимия зимней спячки млекопитающих. – Л.: Наука, 1988. – 137 с.
11. Калабухов Н.И. Спячка млекопитающих. – М.: Наука, 1985. – 260 с.
12. Кличханов Н.К., Сфиев А.А., Халилов Р.А., Авшалумов М.В. Влияние зимней спячки на активность ацетилхолинэстеразы мембран эритроцитов сусликов // Биохимические аспекты холодовых адаптаций. – Харьков: Б.и., 1991. – С. 78–84.
13. Коротков С.В. Изучение изменений обмена липопротеинов при гипотермии в зависимости от состояния адренергических систем // Физиология и фармакология терморегуляции. – Минск: Б.и., 1978. – С. 41–48.
14. Куликов В.Ю., Семенюк А.В., Колесникова Л.И. Перекисное окисление липидов и холодовый фактор. – Новосибирск: Наука, 1988. – 191 с.
15. Лапинский А.Г., Невретдинова З.Г. О роли неспецифической модификации липидов мембран эритроцитов при гибернации у суслика *Citellus parryi* при гибернации // Изв. АН СССР. – 1991. – № 3. – С. 398–409.
16. Лапинский А.Г., Невретдинова З.Г. Тиреоидный статус и обмен липидов у суслика *Citellus parryi* при гибернации // Изв. АН СССР. – 1991. – № 3. – С. 398–409.
17. Линчевская А.А., Кондратьева Л.А. Влияние гипотермии на структурно-функциональные свойства мембран эритроцитов белых крыс // Вопр. мед. химии. – 1989. – № 6. – С. 36–39.
18. Львова С.П. Содержание гликогена, фосфоорилазная и глюкозо-6-фосфатазная активность в тканях сусликов и лягушки при зимней спячке // Криобиология. – 1988. – № 1. – С. 39–43.
19. Львова С.П. Содержание липидных компонентов крови и кетоновых тел в тканях сусликов при зимней спячке // Проблемы криобиологии. – 1991, № 3. – С. 16–21.
20. Львова С.П., Назаревич Л.А. Содержание глюкозы в тканях сусликов и крыс различного возраста при гипотермии // Укр. биохим. журн. – 1976. – 48, №5. – С. 563–567.
21. Плотников Н.Ю., Безгачев В.Г. Мобилизация субстратов при остром интенсивном охлаждении и ее адренергический контроль // Регуляторные эффекты и обмен ионаминов и циклонуклеинов. – Вып. 3. – Красноярск, 1981. – С. 35–41.
22. Пономарева Т.А., Гейн А.К., Тюрина В.В. Функция гомеостаза у зимоспящих млекопитающих при гипотермии и гибернации // Эколого.-физиол. характеристики природных гипометаболических состояний. – Пущино, 1987. – С. 48–56.
23. Попова Н.К., Науменко Е.В., Колпаков В.Г. Серотонин и поведение. – Новосибирск: Наука, 1978. – 304 с.
24. Соломонов Н.Г., Ахременко А.К., Ануфриев А.И. Динамика энергетических субстратов в тканях пробуждающихся сусликов // Механизмы зимней спячки. – Пущино, 1987. – С. 48–56.
25. Тимофеев Н.Н. Искусственный гипобиоз. – М.: Медицина, 1983. – 192 с.
26. Торчинский Ю.М. Сера в белках. М.: Наука, 1977. – 301 с.
27. Хаскин В.В. Энергетика теплообразования и адаптация к холоду. – Новосибирск: Наука, 1975. – 199 с.
28. Хочачка П., Сомеро Д. Биохимическая адаптация. – М.: Мир, 1988. – 567 с.
29. Шварева Н.В., Невретдинова З.Г. Содержание гормонов гипофизарно-адренокортикальной системы в крови суслика *Citellus undulatus* в разные годы // Журн. эволюц. биохим. и физиол. – 1988. – 24, №2. – С. 188–194.
30. Шепелев А.П. Роль липидов в патогенезе общих термических травм: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Ростов-на-Дону, 1979. – 35 с.
31. Эмирбеков Э.З., Львова С.П. Механизмы биохимических изменений при низких температурах тела. – Ростов-на-Дону: Изд-во РГУ, 1985. – 79 с.

32. Эмирбеков Э.З., Львова С.П. Энергетический метаболизм при гибернации у представителей разных филогенетических групп // Успехи физиол. наук. – 1991. – 22, № 1. – С. 97–111.
33. Эмирбеков Э.З., Сфиев А.А., Кличханов Н.К. Исследование устойчивости эритроцитов крыс при гипотермии // Пробл. криобиологии. – 1991. – № 4. – С. 31–33.
34. Bauman W.A., Merun S., Florant G.L. Pancreatic hormones in the nonhibernating and hibernating goldenmantled ground squirrel // Comp. Biochem. and Physiol. – 1987. – 86, № 2. – P. 242–244.
35. Chivatcheva T.M., Ankov V.K., Hadjioloff A. Circannual fluctuations of the serum cortisol in the european ground squirrel, *Citellus citellus* // Comp. Biochem. and Physiol. A. 90. – 1988. – № 3. – P. 515–518.
36. Galster W., Morrison P.R. Cluconeogenesis in arctic ground squirrel between period of hibernation // Amer. J. Physiol. – 1975. – 228, № 1. – P. 325–330.
37. Hoo-Paris R., Hamsany M., Sutter B.Ch. et al. Plasma glucose and glucagon concentration in the hibernating hedgehog // Gen. and Comp. Endocrinol. – 1982. – 46, № 2. – P. 246–254.
38. Hoo-Paris R., Moreau C., Castex Ch., Suffer B. Effect of insulin and glucagon on *in vitro* gluserol production by white adipose tissue of hibernating Jerloa (*Jaculus Orientalis*) // Cryobiology. – 1987. – 24, № 6. – P. 569.
39. McLean Y.S. Blood viscosity of two mammalian hibernatos: *spermophilus tridesemlineatus* and *tamias striatus* // Physiol. Zool. – 1981. – 54, № 1. – P. 122–131.
40. Suomalainen P., Saarikovski P.L. The content of non-esterified fatty acids and glycerol in the blood of the hedgehog during the hibernation period // Experimentia. – 1967. – 23. – P. 457.
41. Wang L.C.H. Some neuroendocrine aspects of mammalian hibernation. // Regul. endocrinic. et adapt. environm.: Colloq. intern. Cent. etud. Biol. Anim. Saurag. Chize, 1–5 Juill, Paris. – 1985. – P. 341–349.

НИИ биологии Дагестанского у-та, г. Махачкала

Поступила 04.04.94

Е.З.ЕМІРБЕКОВ, С.П.ЛЬВОВА, М.К.КЛІЧХАНОВ

БІОХІМІЧНІ ЗМІНИ У КРОВІ ПРИ ШТУЧНІЙ І ПРИРОДНІЙ ГІПОТЕРМІЇ І ЗИМОВІЙ СПЛЯЧЦІ ССАВЦІВ

НДІ біології Дагестанського університету, м. Махачкала

Зроблено огляд даних літератури і власних результатів по біохімії крові у динаміці гіпотермії і зимовій сплячці ссавців. Автори приходять до висновку про помітні відмінності в біохімічних показниках крові і фізико-хімічних характеристиках еритроцитів при штучному і фізіологічному зниженні температури тіла.

E.Z.EMIRBEKOV, S.P.LVOVA, N.K.KLICHKHANOV

BIOCHEMICAL ALTERATIONS IN BLOOD DURING ARTIFICIAL AND NATURAL HYPOTHERMIA

Scientific Research Institute of Biology with the Dagestan University,
Makhachkala, Dagestan

The report deals with the review of special literature and personal findings on time course of blood biochemistry hibernation of mammals. The authors conclude on the presence of significant differences in biochemical indices of blood and physico-chemical characteristics of red blood cells (RBC) during artificial and natural lowering of body temperature.

УДК 57.043.612.111

**О.Н.Дунаевская, Е.Р.Панталер, Н.М.Шпакова,
В.А.Бондаренко**

НЕКОТОРЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПОВЫШЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ К ХОЛОДОВЫМ И ОСМОТИЧЕСКИМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ КАТИОННЫХ АМФИПАТОВ

Представлены результаты исследований, свидетельствующие о том, что катионные амфипаты: трифторперазин и хлорпромазин – способны оказывать протектирующее действие на эритроциты как при гиперосмотическом, так и при холодовом шоке. Степень выраженности полученного эффекта зависит от температуры и исходного уровня дегидратации клеток, так что при оптимальных условиях подвергаются лизису лишь 10% эритроцитов. На основе анализа физико-химических свойств указанных соединений и существующих в литературе данных о характере их

взаимодействий с компонентами эритроцитарной мембраны обсуждаются возможные механизмы полученного защитного эффекта.

При изменении температурных и осмотических условий, в которых находятся биологические объекты, они подвергаются действию сложного комплекса неблагоприятных факторов [1]. Ведущими факторами в условиях низкотемпературного консервирования, способными вызвать нарушение структуры и функции биологических объектов, являются высокие концентрации солей, образующиеся при вымораживании свободной воды, а также сдвиг температуры.

Для оценки вклада изменения осмотических и температурных условий среды в результирующий повреждающий эффект при замораживании можно использовать эксперименты, моделирующие действие осмолярности и температурного сдвига при положительных температурах. Действие гиперосмотического стресса при переносе клеток в высококонцентрированные растворы электролита (4,0 М NaCl) моделирует гиперосмотический шок, причем эффекты гиперосмотического шока коррелируют с эффектами замораживания [3]. Холодовой шок наблюдается при охлаждении от 37 до 0 °С после предварительного выдерживания клеток в гипертонических растворах солей или неэлектролитов [10], и в этом случае исходная область тоничности, в пределах которой клетки сенсibiliзируются к охлаждению, совпадает с таковой в случае гиперосмотического шока. Таким образом, исходные осмотические условия, в которых находятся клетки, являются фактором, определяющим степень их чувствительности к холодовому и осмотическому шоку.

Так как основной мишенью повреждающего действия гиперосмолярности является плазматическая мембрана [1,9], можно предположить, что температурная и осмотическая чувствительность клеток будет изменяться при модификации физико-химических свойств мембраны. Значительное модифицирующее действие на компоненты биологической мембраны [18] и, соответственно, на холодовую и осмотическую чувствительность клеток оказывают амфипатические соединения [5, 6].

В данной работе мы изучали модифицирующее действие катионных амфипатов (трифторперазина, хлорпромазина), способных распределяться во внутренний монослой мембраны, на чувствительность эритроцитов к холодовому шоку и гиперосмотическому стрессу.

Эритроциты получали из донорской крови группы А. После удаления плазмы эритроциты дважды отмывали физиологическим раствором (0,15 М NaCl, 5 мМ фосфатный буфер, рН 7,4. Полученную суспензию (гематокрит 50%) хранили не более 2 ч при 0 °С.

Для изучения влияния гиперосмотического стресса эритроциты предварительно помещали в среды с различным содержанием хлористого натрия (от 0,15 до 1,0 М) при определенной температуре на 2 мин, а затем изотермически переносили в гипертонический раствор NaCl (4,0 М) на 5 мин (конечный гематокрит 0,4%).

Для развития холодового шока пробы, предварительно проинкубированные при 37 °С в течение 10 мин, охлаждали до 0 °С (время экспозиции то же). Температуру контролировали медькапельным термоэлектрическим преобразователем.

Для модификации клеток использовали трифторперазин в концентрации 3×10^{-5} М и хлорпромазин в концентрации 7×10^{-5} М.

После завершения инкубационного периода пробы центрифугировали, поглощение супернатанта определяли спектрофотометрически при длине волны 543 нм. За 100% принимали поглощение пробы, в которую добавляли детегент Х-100 (0,1%).

Гипертонический шок, развивающийся при переносе эритроцитов в среды, содержащие высокие концентрации солей, оказывает повреждающий эф-

фekt на клетки в зависимости от осмотических и температурных условий до и после переноса. Как видно из данных, представленных на рис. 1, уровень повреждения эритроцитов, предварительно находившихся в физиологической по тоничности среде (0,15 M NaCl), в условиях гиперосмотического стресса в средах, содержащих 4,0 M NaCl, достигает 70–90%, причем при 0 °C клетки лизируют в меньшей степени, чем при 22 и 37 °C.

Исходя из того, что химические соединения из группы фенотиазинов, к которым относится трифторперазин, являются ингибиторами кальмодулина, защищают эритроциты при гипотоническом шоке [6], а также значительно повышают их устойчивость к действию холодового шока, развивающегося при охлаждении клеток от 37 до 0 °C [5], представляет интерес изучение влияния трифторперазина на устойчивость эритроцитов к переносу в высококонцентрированные растворы электролита (4,0 M NaCl), т.е. на устойчивость клеток к гиперосмотическому шоку.

Трифторперазин является положительно заряженным производным фенотиазинов, вызывающим изменение формы эритроцита по типу “дискоцит – стоматоцит”. Указанное амфипатическое соединение способно пересекать плазматическую мембрану и распределяться на границе раздела цитоплазматической поверхности бислоя и белков цитоскелета. При этом, согласно гипотезе сопряженного бислоя (bilayer couple) [17], при встраивании амфипата происходит увеличение площади внутреннего монослоя по отношению к наружному, что, в конечном итоге, лежит в основе образования стоматоцитогенных форм эритроцитов. К настоящему времени появились данные, свидетельствующие в пользу того, что подобные амфипатические соединения преимущественно распределяются в цитоплазму [7], что может оказывать влияние на состояние компонентов цитозоля, однако последующие работы ставят под сомнение результаты указанных работ [14, 15].

Применение трифторперазина позволяет модифицировать чувствительность эритроцитов к гиперосмотическому шоку (рис. 1). Как видно из данных, представленных на рис. 1, трифторперазин, при достижении определенной для каждого из исследуемых температурных режимов концентрации, протектирует клетки от повреждения при действии высоких концентраций солей, причем дальнейшее повышение концентрации амфипата сопровождается обращением эффекта и возрастанием уровня лизиса клеток. Температура в значительной

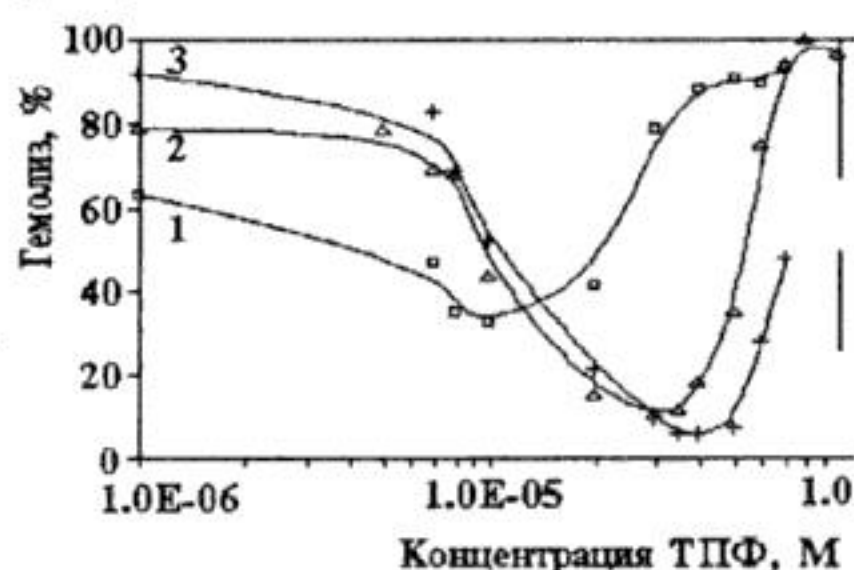


Рис. 1. Влияние различных концентраций трифторперазина (ТФП) и температуры на уровень гемолиза эритроцитов при переносе в 4 M NaCl: 1 – 0 °C, 2 – 22 °C, 3 – 37 °C.

степени определяет характер протектирования эритроцитов в присутствии трифторперазина, а также соответствующий интервал концентраций амфипата, в котором наблюдается повышение устойчивости клеток к действию неблагоприятных факторов. С повышением температуры от 0 до 37 °C оптимальный концентрационный интервал смещается от $8 \times 10^{-6} \div 2 \times 10^{-5}$ М при 0 °C до $2 \times 10^{-5} \div 4 \times 10^{-5}$ М и $3 \times 10^{-5} \div 5 \times 10^{-5}$ М при 22 и 37 °C, соответственно. Следует также отметить, что при оптимальной концентрации трифторперазина и физиологической температуре минимальный уровень чувствительности клеток достигает 10%, в то время как при 0 °C — 35–40%. Таким образом, если степень протекции в присутствии трифторперазина при 0 °C составляет 20–25%, то при более высоких температурах достигает уровня 70–80% (рис. 1).

Полученные данные свидетельствуют, что при разных температурных режимах формируются различные состояния клеток, отличающиеся по их способности противостоять повреждающему действию стрессового фактора, с

одной стороны, и модифицирующему действию трифторперазина, с другой. При физиологической температуре протектирующее действие трифторперазина выражено в гораздо большей степени.

Модификация эритроцитов в присутствии трифторперазина, по-видимому, инициирует в них комплекс изменений, что лежит в основе резкого повышения устойчивости клеток к повреждающим факторам среды, в частности, к гиперосмотическому шоку, развивающемуся в 4,0 М NaCl.

Предварительная частичная дегидратация клеток также сопровождается изменением структуры мембраны и цитоскелета, которые способствуют формированию состояния клеток, характеризующегося повышенной устойчивостью к стрессовым факторам. В частности известно, что предварительная дегидратация эритроцитов существенным образом меняет чувствительность клеток как к механическому, так и к гипертоническому шоку в 4,0 М NaCl [2].

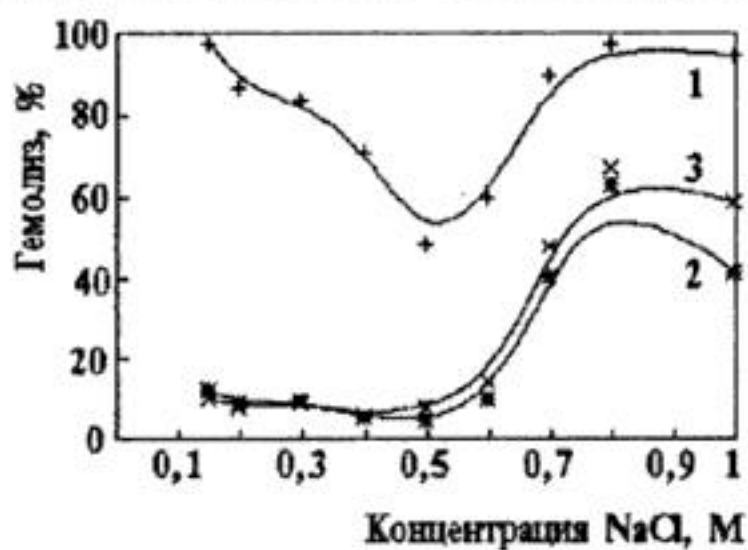


Рис. 2. Влияние катионных амфиатов и предварительной дегидратации на уровень гемолиза эритроцитов при переносе в 4 М NaCl: 1 — контроль, 2 — трифторперазин (ТФП) ($3 \cdot 10^{-5}$ М), 3 — хлорпромазин (ХПР) ($7 \cdot 10^{-5}$ М)

в значительной степени контролируется характером ассоциации-диссоциации белка полосы 3 с цитоскелетом.

Для коррекции состояния эритроцитов на этапах, предшествующих переносу клеток в 4,0 М NaCl, с учетом данных, представленных на рис.1, мы использовали трифторперазин в концентрации 3×10^{-5} М и частичную дегидратацию клеток. Полученные результаты, отражающие сочетанное влияние частичной дегидратации и трифторперазина на чувствительность клеток к переносу в 4,0 М NaCl, представлены на рис. 2 (кривая 2). Как видно, применение амфиата на фоне частичной дегидратации клеток в электролитных средах позволяет повысить устойчивость эритроцитов к стрессовым воздействиям во всем исследуемом интервале концентраций хлористого натрия.

Известно, что эритроциты человека приобретают чувствительность к охлаждению в интервале температур 37–0 °С после предварительного выдерживания в гипертонических растворах солей и неэлектролитов [10]. Как видно из данных, представленных на рис. 3, развитие повреждения клеток при охлаждении от 37 до 0 °С наблюдается в средах с содержанием NaCl выше 0,75 М, достигая максимального значения в присутствии 1,2 М хлористого натрия. Это совпадает с интервалом осмолярности, в пределах которого наблюдается нарушение барьерной функции мембраны и формирование каналов утечки для ионов К [5]. В случае клеток, модифицированных трифторперазином в концентрации 3×10^{-5} М, наблюдается существенное повышение устойчивости к действию холодового шока по сравнению с нативными эритроцитами (рис. 3).

Следует отметить, что другой представитель группы фенотиазинов — хлорпромазин также защищает клетки как в условиях холодового шока [5], так и при действии гиперосмотического стресса (рис. 2, кривая 3). Защитное действие указанного амфиата реализуется при использовании его в концен-

Как видно из данных, представленных кривой 1 рис. 2, интервал концентраций хлористого натрия, инкубация в котором приводит к появлению устойчивости к действию высоких концентраций электролита, является относительно узким. Полагают, что устойчивость эритроцитов, предварительно находившихся в средах, содержащих 0,4–0,5 М NaCl, к действию гиперосмотического стресса при переносе клеток в 4,0 М NaCl, обусловлена изменениями объема клеток, ответственными за формирование стабильного состояния [2, 3]. Результаты работы [4] свидетельствуют в пользу того, что устойчивость клеток к переносу в среды с высоким содержанием электролита

трации 7×10^{-5} М, т.е. для получения максимального протектирующего эффекта при действии стрессовых факторов необходима концентрация хлорпромазина в 2 раза выше по сравнению с трифторперазином. Данные амфипатические соединения различаются по некоторым физико-химическим характеристикам. Например, коэффициент распределения в системе октанол-вода для трифторперазина выше, чем для хлорпромазина, что свидетельствует о более выраженной гидрофобности первого соединения [19]. Именно поэтому трифторперазин легче распределяется в мембрану и достаточно гораздо меньшего его количества для получения аналогичного мембранного эффекта [19]. Как ингибитор кальмодулина и капформер трифторперазин является более сильным по сравнению с хлорпромазином [6,11]. Для ингибирования Са-АТФазы необходима концентрация трифторперазина в 2,4 раза меньшая по сравнению с хлорпромазином [8]. В то же время концентрации указанных амфипатических соединений, необходимые для протекции клеток при действии гипотонического шока, различаются уже в 8 раз [16].

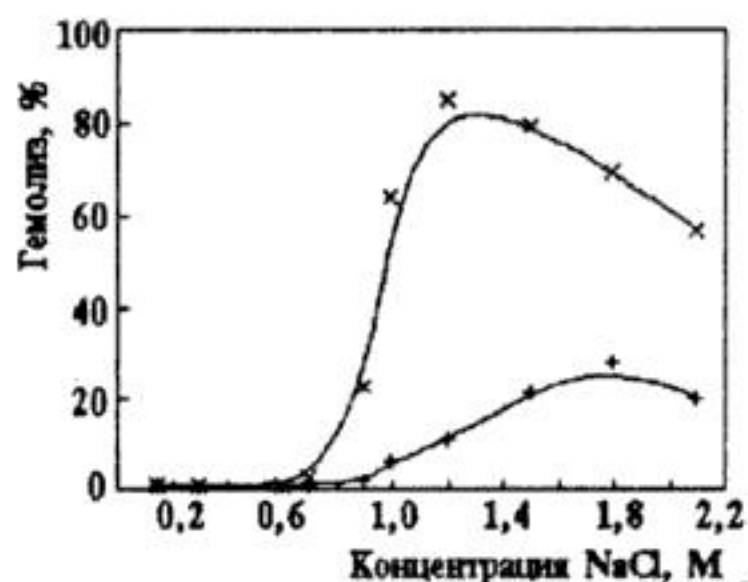


Рис. 3. Влияние трифторперазина ($3 \cdot 10^{-5}$ М) и предварительной дегидратации на уровень гемолиза эритроцитов при действии холодового шока: 1 – контроль, 2 – трифторперазин.

Таким образом, трифторперазин, как и хлорпромазин, оказывает протектирующее действие на эритроциты как в условиях гиперосмотического, так и холодового шока. Иными словами, данные амфипаты способствуют проявлению резервных возможностей клетки и формированию ее стабильного состояния, позволяющего переносить переход в неблагоприятные условия среды. Так как указанные вещества оказывают множественное действие на клетки, трудно выделить какой-либо единственный “узел” или структуру, обеспечивающую устойчивость эритроцитов к стрессу. Однако, исходя из физико-химических свойств амфипатических соединений, их способности оказывать влияние на процесс замыкания эритроцитарных теней [12,13], а также неспособности изменять форму эритроцитов, у которых цитоскелет диссоциирован от мембранного бислоя в результате селективного расщепления анкирина [9], можно выделить два возможных механизма, обеспечивающих протектирующий эффект трифторперазина и хлорпромазина. Один из механизмов, по-видимому, связан с влиянием указанных веществ на характер ассоциации белкового скелета с плазматической мембраной. Преимущественная локализация катионных амфипатов во внутреннем монослое мембраны может являться предпосылкой к ослаблению взаимодействий на границе, разделяющей плазматическую поверхность мембраны и периферическую белковую сеть. В результате ослабляется действие факторов, обеспечивающих стабилизацию дефектов, образующихся как при сдвиге температуры в условиях холодового шока, так и при действии гиперосмотического стресса в 4,0 М NaCl.

Другой механизм протектирующего действия трифторперазина и хлорпромазина может заключаться в непосредственном влиянии указанных веществ на процессы роста и стабилизации дефектов бислоя, формирующихся при действии неблагоприятных факторов среды. Так как отрицательные заряды на стенках поры могут вносить значительный вклад в контроль ее размеров и времени жизни, весьма вероятно, что положительно заряженные амфипатические соединения будут способствовать “заживлению” дефектов, нейтрализуя заряды на их краях.

Авторами предполагается проведение дальнейших исследований для углубления представлений о структурных основах полученного защитного эффекта фенотиазинов.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Белоус А.М., Бондаренко В.А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. – Киев: Наук. думка, 1982. – 255 с.
2. Поздняков В.В. Влияние состава и осмолярности среды на устойчивость эритроцитов к осмотическому и температурному шоку: Автореф. дисс. ... канд.биол.наук. – Харьков, 1989. – 16 с.
3. Поздняков В.В., Панталер Е.Р., Бондаренко В.А. Осморезистентность как принцип устойчивости к замораживанию // Физико-химические свойства и биологическое действие криопротекторов: Сб. науч. тр. – Харьков, 1990. – С. 124–130.
4. Рамазанов В.В., Бондаренко В.А., Руденко С.В. Влияние модификаторов цитоскелета на чувствительность эритроцитов к гипертоническому шоку при повышении осмолярности среды прединкубации // Криобиология. – 1994. – № 2. – С. 11–16.
5. Шпакова Н.М., Бондаренко В.А. Действие хлорпромазина на температурную и осмотическую чувствительность эритроцитов // Биохимия. – 1991. – 56, № 12. – С. 2125–2130.
6. Bereza V., Brewer G., Mizukami I. Association of calmodulin inhibition, erythrocyte membrane stabilization and pharmacological effects of drugs // Biochim. Biophys. Acta. – 1982. – 692, № 2. – P. 304–30.
7. Conrad M.J., Singer S.J. The solubility of amphipathic molecules in biological membranes and lipid bilayers and its implications for membrane structure // Biochemistry. – 1981. – 20, № 4. – P. 808–818.
8. Gietzen K., Mansard A., Bader M. Inhibition of human erythrocyte Ca-transport ATPase by phenothiazines and butyrophenones // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1980. – 94, № 2. – P. 674–681.
9. Jinbu Y., Sato S., Nakao T. et al. The role of ankyrin in shape and deformability change of human erythrocyte ghosts // Biochim. Biophys. Acta. – 1984. – 773, № 2. – P. 237–245.
10. Jung C.Y., Green F.A. Hypertonic cryohemolysis: ionophore and pH effects // J. Membrane Biol. – 1978. – 39, № 2–3. – P. 273–284.
11. Kanaho Y., Sato T., Fugii T. Affinity of various phenothiazine drugs for membranes of intact human erythrocytes and their membrane-transforming activity // Mol. Pharmacol. – 1981. – 20, № 3. – P. 704–709.
12. Lieber M.R., Steck T.L. A description of the holes in human erythrocyte membrane ghosts // J. Biol. Chem. – 1982. – 257, № 19. – P. 11651–11659.
13. Lieber M.R., Steck T.L. Dynamics of the holes in human erythrocyte membrane ghosts // J. Biol. Chem. – 1982. – 257, № 19. – P. 11660–11679.
14. Lieber M.R., Lange Y., Wienstein R.S., Steck T.L. Interaction of chlorpromazine with the human erythrocyte membrane // J. Biol. Chem. – 1984. – 259, № 14. – P. 9225–9234.
15. Luxnat M., Gella H.-J. Partition of chlorpromazine into lipid bilayer membranes: the effect of membrane structure and composition // Biochem. Biophys. Acta. – 1986. – 856, № 2. – P. 274–283.
16. Seeman p. The membrane actions of anesthetics and tranquilizers // Pharmacol. Rev. – 1972. – 24. – P. 583–655.
17. Sheetz M.p., Painter R.G., Singer S.J. Biological membranes as bilayer couples. III. Compensatory shape changes induced in membranes // J. Cell. Biol. – 1976. – 70, № 1. – P. 193–203.
18. Svetina S., Vrhovec S., Gros M., Zeks B. Red blood cell membrane as a possible model system for studying mechanisms of chlorpromazine action // Acta pharm. – 1992. – 42, № 1. – P. 25–35.
19. Zimmer G., Schulze P. Membrane action of tricyclic drugs—Spectroscopic studies of a series of phenothiazines compared with tricyclic antidepressive substances in red cell membrane, using the spin labelling technique // Arzneim. – Forsch. – Drug Res. – 1981. – 31–2, № 9. – P. 1389–92.

Ин-т проблем криобиологии
и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Поступила 09.06.94

О.М.ДУНАЄВСЬКА, О.Р.ПАНТАЛЕР, Н.М.ШПАКОВА, В.А.БОНДАРЕНКО

ДЕЯКІ МОЖЛИВОСТІ ПІДВИЩЕННЯ СТІЙКОСТІ ЕРИТРОЦИТІВ ДО ХОЛОДОВИХ ТА ГІПЕРОСМОТИЧНИХ ВПЛИВІВ ПРИ ВИКОРИСТАННІ КАТІОННИХ АМФІПАТІВ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Представлені результати досліджень, які свідчать про те, що катіонні амфіпати: трифторперазин та хлорпромазин — захищають еритроцити при дії як гіперосмотичного, так і холодового шоку. Ступінь вияву отриманого ефекту залежить від температури та початкового рівня дегідратації клітин, так що при оптимальних умовах зазнають лізису тільки 10% еритроцитів. На основі аналізу фізико-хімічних властивостей вказаних сполук та існуючих у літературі даних про характер їх взаємодій з компонентами еритроцитарної мембрани обговорюються можливі механізми одержаного захисного ефекту.

O.N.DUNAYEVSKAYA, E.R.PANTALER, N.M.SHPAKOVA, V.A.BONDARENKO

SOME POSSIBLE METHODS OF INCREASING RED BLOOD CELL STABILITY TO THE ACTION OF COLD AND OSMOTIC EFFECTS AFTER APPLICATION OF CATION AMPHIPATES

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov, Ukraine

There are submitted the results of investigations, testifying to the fact that cation amphipates, namely: trifluoroperazine and chlorpromazine - are capable of exercising a protective action on red blood cells (RBC) both during hyperosmotic and cold stress. The extent of manifestation of the observed effect depends on temperature and the value of the original level of cell dehydration, and only 10% of RBC are affected by lysis under optimal conditions. On the basis of the analysis of the physico-chemical properties of the above compounds and review of the data currently available on the nature of their interaction with the components of the RBC membrane the authors speculate on the possible mechanisms of the protective effect observed.

УДК 57. 043:612.111:615.224

С.Н.Федосова, Е.В.Кудокоцева

МОДИФИЦИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ КУРАНТИЛА НА ОСМОТИЧЕСКУЮ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ

Изучалось модифицирующее влияние курантила на чувствительность человека и крысы к действию гиперосмотического шока после прединкубации клеток в растворах NaCl с различной тоничностью при 0, 37 °С. Показано, что под влиянием курантила осмотическая чувствительность эритроцитов крысы уменьшается, а человека — увеличивается, по сравнению с нативными клетками, независимо от температуры прединкубации. Полученные результаты обсуждаются с позиции влияния курантила на внутриклеточное содержание АТФ и цАМФ, участвующих в регуляции физико-химического состояния белков цитоскелета в клетке при действии осмотически активных соединений. Предполагается, что изменение чувствительности эритроцитов к действию гиперосмотического шока при увеличении тоничности среды прединкубации связано с механизмом модификации взаимодействий белка полосы 4.1 с капнофорином и другими белками мембраны и цитоскелета.

В настоящее время для решения актуальных проблем трансфузиологии, а именно для сохранения структурной, метаболической и функциональной полноценности эритроцитов в процессе гипотермического хранения основное внимание уделяется модификации состава восстанавливающих и ресуспендирующих сред.

В качестве одного из компонентов таких сред предлагается [3] использование химических соединений — ингибиторов ферментов, катализирующих реакции расщепления пуриновых нуклеотидов, представляющих единственный источник ресинтеза АТФ в эритроцитах [8]. Необходимость использования такого класса соединений объясняется тем, что при охлаждении и гипотермическом хранении происходит замедление метаболизма клетки и, в частности, главного обменного пути эритроцита — гликолиза, обусловленное высокими температурными коэффициентами каталитических реакций и дефицитом необходимых гликолитических субстратов [10]. Замедление метаболизма приводит к истощению ключевых продуктов и интермедиатов, в том числе, таких важнейших органических фосфатов клетки, как АТФ. В свою очередь, энергетическое истощение, лимитируя многочисленные энергозависимые внутриклеточные процессы, приводит к нарушению структурно-функциональных свойств мембраны и, в конечном итоге, к потере жизнеспособности клетки в целом [8].

Известно, что некоторые лекарственные препараты обладают свойствами ингибиторов ферментов распада пуринов, в частности, коронаролитик — курантил, который, ингибируя активность аденозиндезаминазы, препятствует

дезаминированию аденозина, необходимого как для ресинтеза АТФ, так и для активации аденилатциклазы [8, 10]. Систематическое исследование влияний подобного класса веществ на температурную, осмотическую чувствительность эритроцитов до сих пор не проводилось.

С учетом этого, целью настоящей работы было изучение влияния курантила на осмотическую чувствительность эритроцитов человека и крысы в условиях дегидратации клеток в растворах электролитов.

Материалом исследования служили эритроциты 12-месячных крыс линии Вистар и эритроциты донорской крови человека II группы, заготовленной на Харьковской областной станции переливания крови на консерванте ЦОЛИПК-76. После удаления плазмы эритроциты трижды отмывали физиологическим раствором, содержащим 150 мМ NaCl, 10 мМ Na-фосфатный буфер, pH 7,4. Все растворы готовились на Na-фосфатном буфере, pH 7,4. Эритроциты обрабатывались курантилом при инкубации клеток в физиологическом растворе NaCl, содержащем 0,05 мМ этого препарата, в течение 10 мин при 37 °C.

Для изучения влияния тоничности среды прединкубации на чувствительность эритроцитов к действию гиперосмотического шока, клетки инкубировали в растворах NaCl с различной тоничностью (0,15–1,05 М) в течение 10 мин при 0, 37 °C и, после этого, по 0,1 мл из каждой пробы переносили в 0,9 мл 4,0 М NaCl на 10 мин при 0, 37 °C. Устойчивость цитоскелета эритроцитов к механическому воздействию оценивали по методу [9], в котором суспензию эритроцитов после прединкубации в растворах NaCl при 0, 37 °C пропускали 6 раз через медицинскую иглу диаметром 0,3 мм. После завершения этих процедур пробы центрифугировали на центрифуге ОПН – 3 мин при 3000 об/мин и поглощение супернатанта определяли спектрофотометрически при λ – 543 нм. Выход гемоглобина рассчитывали в процентах по отношению к 100%-му гемолизу.

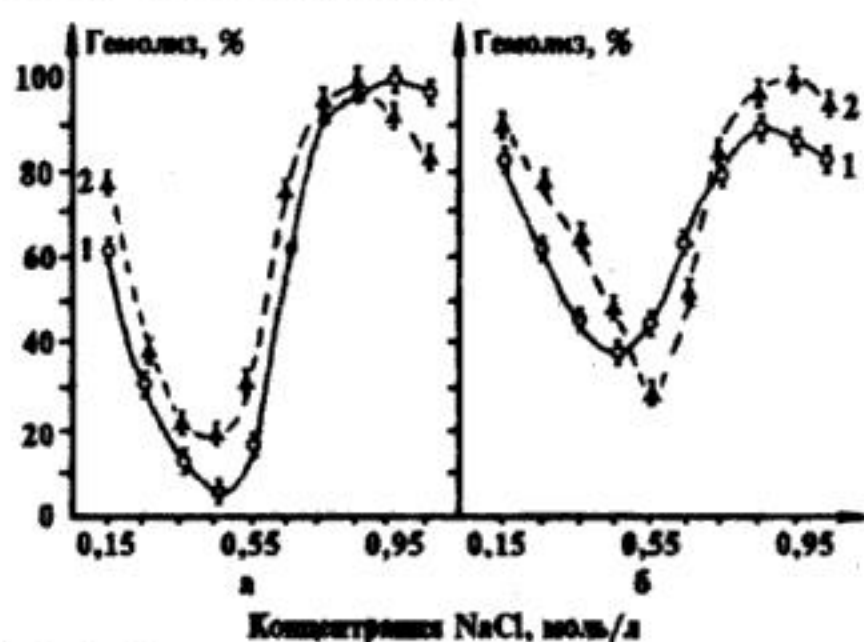


Рис. 1. Влияние курантила и начальных осмотических условий инкубации эритроцитов человека в растворах NaCl (0,15–1,05 моль/л) при 0 °C а) и при 37 °C, б) на уровень гемолиза клеток при переносе в 4,0 моль/л NaCl: 1 — нативные эритроциты человека, 2 — эритроциты человека, обработанные курантилом

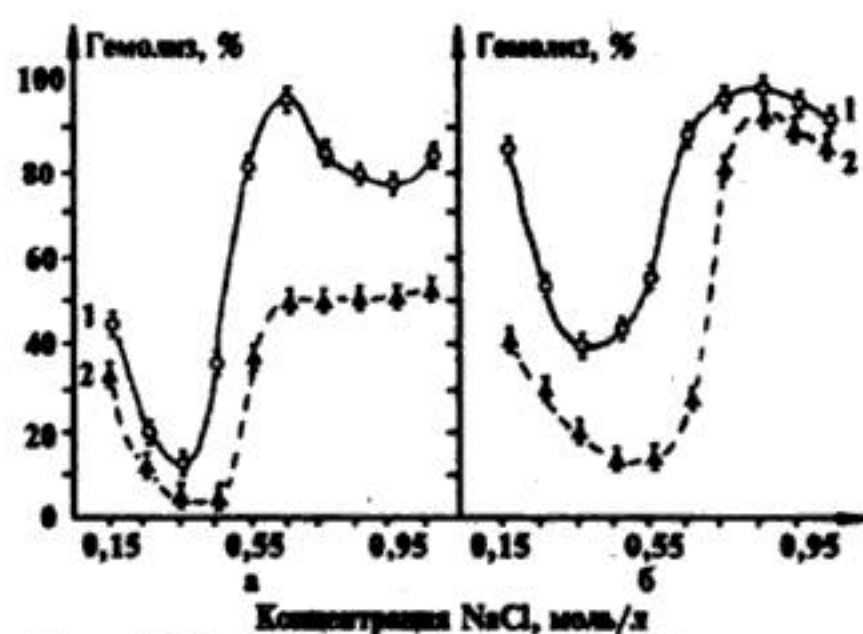


Рис. 2. Влияние курантила и начальных осмотических условий инкубации эритроцитов крысы в растворах NaCl (0,15–1,05 моль/л) при 0 °C а) и при 37 °C, б) на уровень гемолиза при переносе в 4,0 моль/л NaCl: 1 — нативные эритроциты крысы, 2 — эритроциты крысы, обработанные курантилом

Нами обнаружено, что по мере увеличения тоничности среды прединкубации до 0,45 М NaCl возрастает устойчивость эритроцитов человека и крысы к последующему переносу клеток в 4,0 М NaCl (рис. 1, 2) и минимальный уровень лизиса эритроцитов человека наблюдается после прединкубации в 0,35–0,55 М NaCl, а эритроцитов крысы — в 0,25–0,45 М NaCl. При этом температура среды прединкубации оказывает существенное влияние на чувствительность клеток к последующему изменению осмолярности среды: прединкубация эритроцитов при 0 °C уменьшает уровень повреждения клеток при последующем действии гиперосмотического шока. Несмотря на отсутствие существенных различий в чувствительности нативных эритроцитов человека и

крысы к гиперосмотическому шоку, обработка клеток курантилом приводит к тому, что реакция клеток на изменение осмолярности среды становится видоспецифичной. Осмотическая чувствительность эритроцитов крысы уменьшается (рис. 2), а чувствительность эритроцитов человека к гиперосмотическому шоку увеличивается по сравнению с осмотической чувствительностью нативных эритроцитов (рис. 1).

Из представленных данных следует, что чувствительность эритроцитов к гиперосмотическому шоку определяется исходными условиями инкубации, которые обеспечивают частичную дегидратацию клеток. Можно предположить, что основную роль в изменении чувствительности эритроцитов к изменению осмолярности среды играет изменение структурного состояния комплекса "цитоскелет—мембрана" при изменении объема клетки, поскольку частичная дегидратация эритроцитов приводит к концентрированию структурных элементов цитоскелета в примембранном слое, что, в свою очередь, может изменять характер их взаимодействия с мембраной [2].

Для проверки этого предположения были проведены эксперименты по изучению механической чувствительности эритроцитов в условиях их дегидратации в растворах NaCl с различной тоничностью при 0, 37 °C.

Локальный минимум лизиса эритроцитов человека после механического воздействия в присутствии 0,35–0,45 М NaCl, возможно, отражает структурную реорганизацию цитоскелета и изменение характера его взаимодействия с мембраной, что совпадает с областью минимальной чувствительности эритроцитов человека к гиперосмотическому шоку (рис. 3, 1). Чувствительность эритроцитов человека, обработанных курантилом, к механическому воздействию при 37 °C возрастает после прединкубации клеток в 0,15–0,45 М и 0,85–1,05 М NaCl, а после прединкубации в 0,55–0,75 М NaCl — снижается, по сравнению с механической чувствительностью нативных эритроцитов, что коррелирует с изменением чувствительности эритроцитов человека к гиперосмотическому шоку под влиянием курантила. Характер изменения механической чувствительности эритроцитов человека после обработки курантилом коррелирует с изменением осмотической чувствительности этих клеток и после прединкубации при 0 °C в растворах NaCl.

Чувствительность эритроцитов крысы к механическому воздействию значительно выше механической чувствительности эритроцитов человека (рис. 3, 4). Эритроциты крысы, обработанные курантилом, становятся более устойчивыми к механическому воздействию, по сравнению с нативными клетками, что коррелирует с уменьшением чувствительности эритроцитов крысы под влиянием курантила к гиперосмотическому шоку (рис. 2, 4).

Представленные результаты подтверждают имеющиеся в литературе предположения [2] о том, что структурной основой механизма, контролирующего

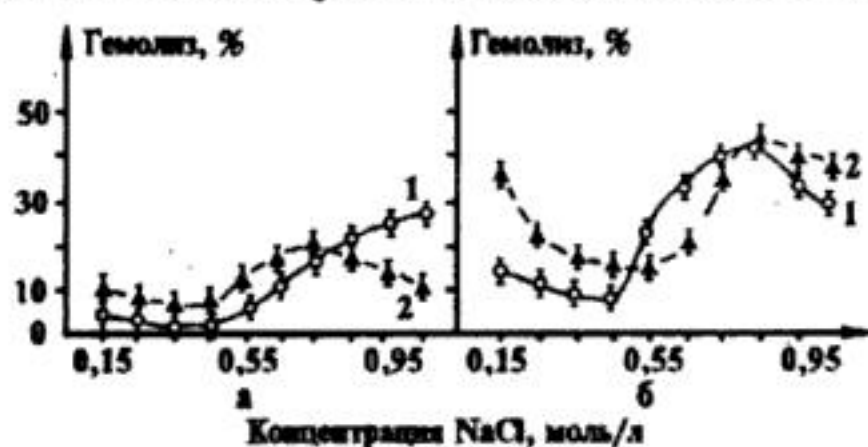


Рис. 3. Влияние курантила на уровень гемолиза эритроцитов человека при механическом воздействии после прединкубации клеток в растворах NaCl с различной тоничностью: при 0 °C а) и при 37 °C, б): 1 — нативные эритроциты человека, 2 — эритроциты человека, обработанные курантилом

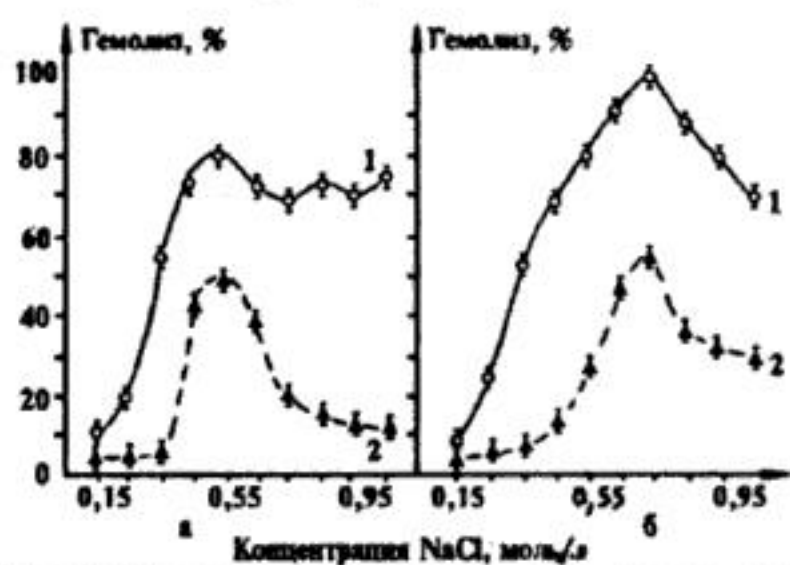


Рис. 4. Влияние курантила на уровень гемолиза эритроцитов крысы при механическом воздействии после прединкубации клеток в растворах с различной тоничностью: при 0 °C а) и при 37 °C, б): 1 — нативные эритроциты крысы, 2 — эритроциты крысы, обработанные курантилом

щего осмотическую чувствительность эритроцитов в условиях дегидратации клеток в растворах электролитов, является цитоскелет.

Рабочую гипотезу, объясняющую различное модифицирующее влияние курантила на осмотическую и механическую чувствительность эритроцитов человека и крысы, удобно представить на основе предлагаемых [7] данных о том, что устойчивость эритроцитов к механическому воздействию обусловлена взаимодействием белка полосы 4.1 с гликофорином С. Исходя из данных [6] об отсутствии в мембранах эритроцитов крысы гликофоринов, легко объяснить, с этой точки зрения, высокую чувствительность эритроцитов крысы к механическому воздействию.

Известно, что при осмотическом сжатии эритроцитов крысы, но не человека, происходит активация полифосфоинозитидного цикла [5], что приводит к образованию инозитолтрифосфата, который, поступая в цитоплазму клетки, вызывает высвобождение ионов Ca^{2+} из внутриклеточных белковых депо, инактивируя тем самым аденилатциклазу, что приводит к выключению всех цАМФ-зависимых процессов в клетке. Поскольку курантил, ингибируя аденозиндезаминазу, увеличивает содержание аденозина в клетке, то после обработки эритроцитов крысы этим препаратом, вероятно, в процессе гиперосмотического сжатия аденилатциклаза не ингибируется и происходит активация цАМФ-зависимых процессов фосфорилирования белков цитоскелета, в частности, белков полосы 4,1, 4.5, 2.1 [6], что проявляется в увеличении устойчивости эритроцитов крысы.

Обработка эритроцитов человека курантилом приводит к увеличению пула АТФ в клетке, что сопровождается ингибированием главной фосфоглицераткиназной ветви гликолиза, способствуя повышению уровня 2,3-ДФГ [8]. Увеличение концентрации 2,3-ДФГ приводит к нарушению связи белка полосы 4.1 с гликофорином С вследствие предпочтительного связывания в этих условиях белка полосы 4.1 с капнофорином [7], что в свою очередь вызывает диссоциацию белок полосы 4.1-спектрин-актинового комплекса [7], что и проявляется в снижении механической устойчивости эритроцитов человека под влиянием курантила.

Таким образом, можно предположить, что изменение чувствительности эритроцитов к гиперосмотическому шоку при увеличении тоничности среды прединкубации связано с механизмом, в основе которого лежит модификация взаимодействия белка полосы 4.1 с капнофорином и другими белками мембраны цитоскелета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоус А.М. Роль регуляторных систем, модулирующих состояние белков цитоскелета при температурно-осмотическом воздействии // Проблемы криобиологии. – 1992. – № 4. – С. 3–13.
2. Бондаренко В.А., Бондаренко Т.П., Руденко С.В. Эффекты дегидратации в контроле холодовой и осмотической чувствительности клеток // Проблемы криобиологии. – 1992. – № 4 – С. 14–26.
3. Гусева Н.Р., Луговой В.И. Введение добавок метаболитов и мембранотропных веществ в растворы для ресуспендирования размороженных и отмытых эритроцитов // Пробл. гематол. – 1982. – 27, – № 4. – С. 10–14.
4. Дорофеев Г.И., Кожемякин А.А., Ивашкин В.Т. Циклические нуклеотиды и адаптация организма. – Л.: Наука, 1978. – 182 с.
5. Орлов С.Н., Покудин Н.И., Котелевцев Ю.В. и др. О механизме индукции ионного транспорта при сжатии эритроцитов // Внутриклеточная сигнализация. – М.: Наука, 1987. – С. 118–126.
6. Черницкий Е.А., Воробей А.Р. Структура и функции эритроцитарных мембран. – Минск: Наука и техника, 1981. – 216 с.
7. Bennett V. The spectrin-actin junction of erythrocyte membrane skeletons // Biochem. Biophys. Acta. – 1989. – 988, № 1. – P. 107–121.
8. Kolassa H., Plank B., Turkisim K. pH and temperature dependence of adenosine uptake in human erythrocytes // Eur. J. Pharmacol. – 1978. – 53, № 3–4. – P. 345–351.
9. Leibo S.P. Freezing damage of bovine erythrocytes: simulation using glycerol concentration changes at subzero temperatures // Cryobiology. – 1976. – 13, № 6. – P. 578–598.

10. *Strauss D., de Verdier C.H.* Preservation of red blood cells with purines and nucleosides. II Uptake and utilization of purines and nucleosides by stored red blood cells. III. Synthesis of adenine and hypoxanthine nucleosides // *Folia Haematol. (DDR)*. – 1980. – 107, № 3. – P. 417–433.

Харьковский гос. ун-т
Ин-т проблем криобиологии
и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Поступила 16.05.94

С.М.ФЕДОСОВА, О.В.КУДОКОЦЕВА

МОДИФІКУЮЧИЙ ВПЛИВ КУРАНТИЛА НА ОСМОТИЧНУ ЧУТЛИВІСТЬ ЕРИТРОЦИТІВ

Харківський державний університет

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Вивчався модифікуючий вплив курантилу на чутливість еритроцитів людини та щура до дії гіперосмотичного шоку після предінкубації клітин в розчинах NaCl з різною тоничністю при 0 та 37 °С. Виявлено, що під впливом курантилу осмотична чутливість еритроцитів людини збільшується, а щура зменшується у порівнянні з інтактними клітинами, незалежно від температури предінкубації. Припускається, що зміна чутливості еритроцитів до дії гіперосмотичного шоку при збільшенні тоничності середовища предінкубації пов'язана з механізмом модифікації взаємодії білка смуги 4.1 з капнофорином та другими білками мембран і цитоскелета.

S.N.FEDOSOVA, E.V.KUDOKOTSEVA

MODIFYING ACTION OF CURANTYL ON THE OSMOTIC SUSCEPTIBILITY OF RED BLOOD CELLS

Kharkov State University, Kharkov, Ukraine

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov, Ukraine

Modifying action of curantyl on the susceptibility of red blood cells (RBC) of man and rat to the action of hyperosmotic stress was studied following cell pre-incubation in the NaCl solutions with various tonicity at 0°C and 37°C. The action of curantyl increased the osmotic susceptibility of human RBC, while that of rats is reduced as compared with native cells independently of the pre-incubation temperature. A supposition is due that a change in the RBC susceptibility to the action of hyperosmotic stress after a rise in the tonicity of the pre-incubation medium relates to the mechanism, modifying the interaction of a 4.1 band protein with capnophorine and other cytoskeletal and membrane proteins.

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

УДК 57.043

Т.Ф.Стрибуль, С.М.Тымчук, Н.Н.Мильшина

СТИМУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО ЗАМОРАЖИВАНИЯ СЕМЯН КУКУРУЗЫ НА ПРОЦЕСС ИХ ПРОРАСТАНИЯ

Исследовано влияние условий замораживания и отогрева семян кукурузы с различным уровнем влажности на их сохранность после криовоздействия. Установлен режим криоконсервирования и оптимальные влажности семян, при использовании которых наблюдается стимуляция интенсивности начального роста проростков, выращенных из консервированных семян. Предложен механизм стимулирующего действия низкотемпературной предобработки семян на процесс их последующего прорастания.

Доминирующим фактором в процессе криоконсервирования семян растений является их влажность. Семена большинства сельскохозяйственных культур с исходной влажностью 8–20% проявляют устойчивость к действию низких температур, сохраняя при этом высокий уровень выживаемости, практически не зависящий от скоростей охлаждения и отогрева [8, 16–18]. При замораживании семян с влажностью, близкой к критической, их жизнеспособность в значительной степени зависит от режимов криоконсервирования [16–18]. Так, при содержании воды в семенах сои и гороха более 25% успех консерви-

рования при -196°C достигался с помощью высоких скоростей охлаждения и отогрева (до $700^{\circ}\text{C}/\text{мин}$). Имеются некоторые особенности в криочувствительности семян. Например, замораживание семян кукурузы с влажностью 13% до -196°C со скоростью $40^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ привело к снижению показателей жизнеспособности по отношению к контролю. Эти же семена, увлажненные до 24%, при тех же условиях криообработки имели жизнеспособность на уровне контроля. А охлаждение семян кукурузы с 13%-й влажностью до -70°C со скоростью $1-2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ вызвало стимуляцию роста проростков [4]. На наличие стимулирующего эффекта криовоздействия указано и в ряде других работ [12, 14].

Исходя из этих предпосылок, мы исследовали влияние условий криообработки на жизнеспособность семян с различным уровнем влажности. В качестве объекта исследования был использован ряд мутантных линий кукурузы с генетически перераспределенным углеводным комплексом эндосперма семян [1, 3, 10, 13]. Линии С-91 о₁, Р-502 о₂; W-153_{wx}, С-50 fl₁, Вир-44 fl₂ характеризуются полным отсутствием в эндосперме роговидной части без количественной депрессии синтеза крахмала. У С-451 ае отмечается смещение соотношения структурных сополимеров крахмала (амилозы и амилопектина) в сторону увеличения содержания амилозы с 27% у обычной кукурузы до 62% у мутанта ае. У W-153_{wx} увеличена доля амилопектина до 100%. Линии С-181 sh₁ и С-73 sh₂ характеризуются низким содержанием крахмала и повышенным — свободных сахаров и сахарозы. В эндосперме семян линии МС-722 su₁ увеличено содержание водорастворимых полисахаридов (ВРП), а у линии Вир-38 su₂ — амилозы и свободных сахаров. Кроме мутантных линий кукурузы в работе были исследованы простые (обычные) линии: Черновицкая-21 (Чр-21), F-2, Р-502.

С точки зрения физической структуры зерновки семя кукурузы С-91 о₁, Р-502 о₂, С-50 fl₁ и Вир-44 fl₂ имеют рыхлую мучнистую консистенцию эндосперма. У мутантов С-451 ае и W-153_{wx} нормальный эндосперм, состоящий из роговидной и мучнистой частей. Линия С-181 sh₁ характеризуется сморщенными семенами мучнистой консистенции. У остальных мутантов (С-73 sh₂, МС-722 su₁, Вир-38 su₂) — роговидный эндосперм.

Семена кукурузы исследуемых линий подвергали замораживанию до -70°C и -196°C на программном замораживателе по экспоненциальному режиму со скоростью $6,7^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ [5]. После 60-мин экспозиции при конечной температуре охлаждения производили отогрев образцов со скоростями $5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и $23^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ соответственно от -70 и от -196°C . Эти режимы криовоздействия были специально подобраны из ряда предварительно исследованных режимов и обеспечивали наибольшее стимулирующее действие на процесс последующего прорастания семян.

Для изучения влияния степени влажности семян на результаты криообработки их подвергали искусственному увлажнению. Перед замораживанием до -70°C семена замачивали в воде при 20°C в течение 15 и 60 мин. Влажность их составила от 11,5 до 22,4%. Перед замораживанием до -196°C семена замачивали в воде с температурой 5°C в продолжение 15 мин. Влажность семян варьировала от 9,7 до 19,6%.

Для оценки качества и жизнеспособности исследуемых семян их проращивали в рулонах фильтровальной бумаги [2, 7]. Анализ лабораторной всхожести и морфометрических показателей проростков производили на 7-й день проращивания. Показатели морфометрии (высоту coleoptilia, длину главного корня, массу сухого и сырого вещества надземной и подземной части проростков) определяли на выборке из 10 растений, наиболее типичных для данного образца (из 50-ти проростков), в 4-х повторностях.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о стимулирующем действии низких температур на показатели всхожести семян у ряда ли-

ний кукурузы: из табл. 1 следует, что замораживание до -70°C воздушно-сухих (*) семян кукурузы Чр-21, F-2, W-153 o₂, Вир-38 su₂ привело к увеличению их всхожести. Замораживание до -196°C предварительно увлажненных семян последних 2-х линий также способствовало росту их всхожести.

Т а б л и ц а 1

Всхожесть семян ряда линий кукурузы и морфометрические показатели их проростков в зависимости от влажности семян и конечной температуры охлаждения

Линия	Влажность семян, %	Конечная температура охлаждения, °C	Всхожесть, %	Длина, см		Сырая масса, мг	
				колеоптиля	корня	колеоптиля	корня
Чр-21	9,2	без охл.	79	14,4	13,2	307	128
	9,2	-70	92*	11,3*	11,0	175*	117
F-2	16,0	-70	81	17,2*	14,0	384*	157*
	10,5	без охл.	89	7,8	7,1	150	138
	10,5	-70	98*	7,6	11,3*	180*	160*
	16,4	-70	97*	8,0	9,5	178*	133
P-502	10,0	без охл.	93	7,9	12,8	136	79
	10,0	-70	93	9,3**	13,9**	150*	80
	21,0	-70	60*	7,6	11,7	136	78
	10,0	-196	97	8,2	11,3	143	78
P-502 o ₂	17,0	-196	98	8,0	11,0	95*	70
	9,8	без охл.	98	5,2	12,5	160	150
	9,8	-70	98	5,9	10,4*	130*	144
	18,4	-70	90*	12,6*	19,6*	330*	220*
	21,1	-70	10*	10,4	12,0	300*	100*
	9,8	-196	98	7,9*	13,9**	210*	130**
W-153 o ₂	18,0	-196	89*	7,3*	16,3*	210*	200*
	9,7	без охл.	80	5,1	10,3	165	163
	9,7	-70	90*	6,9*	11,8	189*	156
	18,6	-70	98*	6,4	10,1	170	140
	21,5	-70	44*	12,0*	13,9*	275*	175*
	9,7	-196	89*	5,3	11,5**	174*	125*
Вир-38 su ₂	17,9	-196	83	7,3*	13,6*	205*	164
	9,9	без охл.	90	7,8	12,5	79	178
	9,9	-70	98*	6,2*	12,4	164	155
	20,0	-70	80*	5,5*	11,3	125*	125*
	22,4	-70	70*	7,5	10,2*	157*	129*
	9,9	-196	80*	5,4* ⁹	6,0*	100*	50*
	19,6	-196	98*	7,8	9,8*	110*	70*

Примечание. Различие достоверно по отношению к контролю: * – при $p < 0,05$ и ** – при $p < 0,1$.

Следует отметить, что криовоздействие на увлажненные семена кукурузы вызывает стимуляцию их прорастания, если уровень влажности семян не превышает порогового (критического) значения. Так увлажнение семян линии P-502 до 21 % привело к уменьшению их всхожести после охлаждения до -70°C . Для семян кукурузы одной из опейковых линий W-153 o₂ влажность 18,6 % не являлась критической, а для другой линии P-502 o₂, при влажности семян 18,4 %, отмечено падение всхожести по сравнению с контролем после замораживания до -70°C . Для сахарной линии Вир-38 su₂ увеличение влажности семян до 22 % не вызывало столь резкого снижения всхожести, как у семян опейковых линий (табл. 1).

Рост морфометрических показателей проростков линий F-2 и W-153 o₂, семена которых подвергали замораживанию до -70°C в воздушно-сухом состоянии, положительно коррелировал с увеличением всхожести семян. Для кукурузы линий Чр-21 и Вир-38 su₂, при тех же условиях криоконсервирования их семян, обнаружена отрицательная корреляция между всхожестью и морфометрией проростков (угнетение роста проростков при стимуляции всхожести). Замораживание до -70°C воздушно-сухих семян кукурузы линий P-502 и P-502 o₂ вызывало стимуляцию интенсивности начального роста у P-502 и угнетение роста ее у опейкового аналога (P-502 o₂). Вместе с тем криоконсервирование сухих семян P-502 o₂ привело к увеличению морфометрических показателей проростков (табл. 1).

⁹ Воздушно-сухими названы семена с влажностью, установившейся в результате хранения их в стандартных условиях. В наших данных это семена с наименьшими значениями влажности.

Увлажнение семян кукурузы перед замораживанием, как правило, способствовало увеличению интенсивности начального роста проростков. Это относится в первую очередь к семенам опейковой кукурузы (Р-502 о2 и W-153 о2) с влажностью 18–22%, замораживаемых до –70 и –196 °С, а также к семенам немутантной кукурузы Чр-21. Что касается двух других простых линий F-2 и Р-502, то увлажненные семена первой из них испытывали стимулирующее действие низких температур в меньшей степени, чем воздушно-сухие семена этой линии. А у увлажненных семян линии Р-502 замораживание не вызывало изменений морфометрических показателей проростков по сравнению с контролем. Очень чувствительными к действию низких температур оказались семена сахарной кукурузы. Замораживание таких семян, имеющих влажность 20–22% до –70 °С и –196 °С привело к угнетению роста проростков по сравнению с контролем (табл. 1).

Т а б л и ц а 2

Морфометрические показатели проростков, полученных при проращивании воздушно-сухих контрольных (к) и криообработанных (о) семян кукурузы

Линия кукурузы	Вариант обработки	Влажность семян, %	Длина, см		Сухая масса, мг	
			колеоптиля	корня	колеоптиля	корня
С-451 ае	к	9,0	11,4	12,5	24,6	7,0
	о		11,0	12,7	22,0	8,0
W-153 wx	к	9,1	15,1	18,4	13,3	17,4
	о		17,8*	18,3	38,9*	18,4*
С-91 о1	к	9,2	9,6	20,5	29,6	17,1
	о		10,5*	20,2	32,9*	17,0
W-153 о2	к	9,2	12,3	16,6	32,5	12,3
	о		14,1*	18,5*	38,4*	14,3*
С-50 f11	к	9,6	11,8	18,0	38,5	10,8
	о		13,1*	18,2	41,5*	11,7
Вир-44 f12	к	10,6	14,0	18,2	43,6	22,4
	о		12,4*	17,4	40,4	21,1*
С-181 sh1	к	9,1	13,7	17,9	33,3	12,8
	о		14,1	18,4	37,0*	11,2
С-73 sh2	к	7,9	4,7	12,6	6,8	7,2
	о		7,7*	14,8*	14,4*	10,0*
МС-722 su1	к	6,5	7,3	17,0	22,6	17,8
	о		9,1*	19,0*	30,7*	24,5*
Вир-38 su2	к	7,0	11,6	15,4	46,7	15,6
	о		11,7	15,3	43,3*	17,5
Чр-21	к	9,1	11,8	19,6	31,5	20,9
	о		12,3	18,9	29,7	16,1*

Примечание. * — различие достоверно по отношению к контролю при $p < 0,05$

Однако из-за небольшой выборки линий кукурузы в данном эксперименте не представилось возможным однозначно определить зависимость стимуляции интенсивности начального роста семян в результате криовоздействия от генотипа исследуемой линии. В связи с этим анализ реакций организма семени на низкотемпературный стресс был проведен на более широко представленном наборе семян мутантных линий кукурузы, структура и свойства углеводного комплекса которых варьируют в максимально возможных пределах. Были использованы воздушно-сухие семена (табл. 2) и семена с уровнем влажности, промежуточным между значением, соответствующим воздушно-сухому состоянию, и пороговым значением (табл. 3).

Оказалось, что характер прорастания контрольных семян различных линий кукурузы не связан со спецификой морфометрической структуры зерновки. Обнаружены и достаточно высокие, и низкие показатели биометрии проростков, выращенных из семян как крахмалсодержащей, так и сахаросодержащей групп линий.

Влияние замораживания на семена кукурузы зависело и от генотипической специфичности линии, и от уровня влажности семян. На прорастание су-

хих и увлажненных семян линии С-451 ае низкотемпературная обработка влияния не оказала. У W-153 wx наблюдали увеличение длины проростков при снижении их массы. У опейковой кукурузы стимулирующий эффект криовоздействия обнаружен и для сухих, и для увлажненных семян. На воздушно-сухие семена Вир-44 fl₂ замораживание оказало угнетающее действие, а на увлажненные — стимулирующее. Интенсификацию прорастания после криообработки показали семена линии С-50 fl₁, причем увлажненные семена — в большей степени, чем сухие. На увлажненных семенах сахарных линий кукурузы (МС-722 su₁, Вир-38 su₂, С-181 sh₁) низкотемпературное воздействие проявилось в увеличении морфометрических показателей проростков, причем в большей степени, чем на воздушно-сухих и чем на увлажненных семенах мучнистых линий кукурузы. Замораживание увлажненных до 15,8% семян С-73 sh₂ вызвало угнетение роста проростков. Очевидно указанная влажность для этой линии оказалась критической. Такой же эффект наблюдался у других сахаросодержащих линий кукурузы после замораживания их семян, имеющих критическую влажность (19% и выше).

Т а б л и ц а 3

Морфометрические показатели проростков, полученных при проращивании увлажненных контрольных (к) и криообработанных (о) семян кукурузы

Линия кукурузы	Вариант обработки	Влажность семян, %	Длина, см		Сухая масса, мг	
			колеоптиля	корня	колеоптиля	корня
С-451 ае	к	19,0	12,1	9,7	21,0	6,4
	о		12,3	10,8*	24,6	7,0
W-153 wx	к	13,6	14,9	18,2	39,5	20,4
	о		16,2*	17,4*	37,3	19,3
С-91 о1	к	16,0	9,8	16,7	33,1	17,2
	о		10,9*	16,5	32,3	14,8*
W-153 о2	к	14,8	10,6	17,2	38,6	13,0
	о		12,1*	16,8	39,5	17,7*
С-50 fl 1	к	13,4	11,5	18,3	40,9	14,2
	о		12,6*	19,7	45,6*	15,7*
Вир-44 fl 2	к	14,4	14,2	18,2	45,3	20,7
	о		14,8	18,1	45,7	18,7
С-181 sh 1	к	11,5	11,8	16,2	37,4	12,9
	о		13,9*	18,7	45,4*	18,3*
С-73 sh 2	к	15,8	11,3	15,4	19,1	10,0
	о		9,3	10,2*	14,3*	5,6*
МС-722 su 1	к	13,6	7,5	17,1	22,8	17,7
	о		8,6	17,4	30,3*	19,4*
Вир-38 su 2	к	12,7	11,0	16,4	45,0	18,4
	о		12,1*	17,7*	48,9*	20,6*
Чр-21	к	14,2	12,1	19,0	39,8	20,5
	о		12,9	21,9*	42,2	26,3*

Примечание. * — различие достоверно по отношению к контролю при $p < 0,05$.

Для понимания полученных результатов воспользуемся объяснением [4] причины криоповреждения зерновок семян, заключающейся в возникновении напряжений между отличающимися по структуре частями зерновки. Увлажнение семян, способствуя формированию более гомогенной физической структуры семени, должно приводить к большей сохранности их после криовоздействия. Для семян простых и крахмалсодержащих мутантных линий оптимальным можно считать увлажнение 18–20%, для сахарных линий кукурузы — 11–14%.

Однако различиями в структуре зерновки можно объяснить причину ее криоповреждения. Стимулирующий эффект криовоздействия связан, по-видимому, с биохимическим составом зерна и биохимическим обменом при прорастании. У одной из двух простых линий (Чр-21) обнаружена более значительная стимуляция роста проростков, чем у второй (Р-502). Семена этих линий, практически одинаковые по морфологической структуре, различаются

по биохимическому составу [10]: зерно кукурузы Чр-21 содержит больше свободных сахаров и ВРП, чем семена Р-502. А сахара, кроме того, что являются естественными криопротекторами и способствуют лучшей сохранности семян в условиях криовоздействия, легче мобилизуются при прорастании. Реакцию семян опейковых линий кукурузы на низкотемпературный стресс можно, по-видимому, объяснить генетической особенностью этих линий [1, 6, 10, 13]. Основное биологическое действие гена *oz* состоит в блокировании биосинтеза проламинов и относительном увеличении доли альбуминовой и глобулиновой фракций, что сопровождается новообразованием легкорастворимых, в том числе, ферментных белков эндосперма [10]. С одной стороны, растворимые белки оказывают защитное действие на биомембраны растительных клеток при замораживании [9, 15]. А с другой стороны — низкие температуры изменяют структурную организацию белков, в частности, ферментов, что сказывается на их функциональной активности [11]. По-видимому, при используемых условиях криовоздействия на семена кукурузы, происходит изменение активности ферментативного комплекса зерновки, что может являться причиной интенсификации прорастания криоконсервированных семян. Что касается семян сахарных линий кукурузы, то действие модифицированных под влиянием низких температур ферментов на легкомобилизуемые свободные сахара, имеющиеся в этих семенах в большом количестве, приводит к очень быстрому результату.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Генетика культурных растений: кукуруза, рис, просо, овес / Под ред. В.Ф.Дорофеева. — Л.: Агропромиздат, 1988. — 272 с.
2. Гриценко В.В., Калошина З.М. Семеноведение полевых культур. — М.: Колос, 1984. — 270 с.
3. Мику В.Е. Генетические исследования кукурузы. — Кишинев: Штиинца, 1981. — 232 с.
4. Молодкин В.Ю. Методы консервации семян культурных растений при низких и сверхнизких температурах: Автореф. дис. ... канд. с.-х наук. — Л., 1987. — 18 с.
5. Новиков А.Н., Ткаченко С.И., Стрибуль Т.Ф., Рындин В.Ф. О возможности использования экспоненциальных режимов охлаждения при криоконсервировании биологических объектов // Биофизика. — 1985. — XXX, в. 6. — С. 1042–1045.
6. Семихов В.Ф. Генезис проламинов и причины их появления в процессе эволюции белкового комплекса семян злаков // Известия АН СССР. Сер. биол. — 1982. — 5. — С. 738–747.
7. Семена и посадочный материал сельскохозяйственных культур. — М.: Изд-во стандартов. — 1977. — 400 с.
8. Стаинов С., Джантила О. Устойчивость гидратированных семян салата к повреждающему действию температур при глубоком переохлаждении // Холодостойкость растений / Под ред. Г.А.Самыгина. М.: Колос, 1989. — С. 189–211.
9. Туманов И.И. О физиологическом механизме морозостойкости растений // Физиология растений. — 1967. — 14, в. 3. — С. 520–539.
10. Тымчук С.М. Наследование основных биохимических признаков при селекции гибридов кукурузы на качество зерна: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Харьков, 1979. — 16 с.
11. Хочачка П., Сомеро Дж. Стратегия биохимической адаптации. — М.: Мир, 1977. — 398 с.
12. Busse W.F. Effect of low temperatures on germination of impermeable seeds // Botanical Gazette. — 1930. — 89. — P. 169–179.
13. Creech R.G. Genetic control of carbohydrate synthesis in maize endosperm // Genetica. — 1965. — 52, № 6. — P. 1175–1185.
14. Jordan J.L., Jordan L.S., Jordan C.M. Effects of freezing to -196°C and thawing on *Setaria Lutescens* seeds // Cryobiology. — 1982. — 19, № 4. — P. 435–442.
15. Jung G.A., Spin S.C., Shelton D.C. Seasonal changes in soluble protein nucleic acids and tissue pH related to cold hardiness of alfalfa // Cryobiology. — 1967. — 4, № 1. — P. 11–16.
16. Lockert M., Luyet B. Survival of frozen seeds of various water contents // Biodinamica. — 1961. — 7. — P. 67–71.
17. Pritchard H.W. Survival of terrestrial orchid seed from liquid nitrogen temperature // Cryobiology. — 1983. — 20, № 6. — P. 704–708.
18. Vertucci C.W. Effects of cooling rate on seeds exposed to liquid nitrogen temperatures // Plant Physiol. — 1989. — 90, № 4. — P. 1478–1485.

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

Поступила 17.02.94

Т.Ф.СТРИБУЛЬ, С.М.ТИМЧУК, Н.Н.МІЛЬШИНА

СТИМУЛЮЮЧА ДІЯ НИЗЬКОТЕМПЕРАТУРНОГО ЗАМОРОЖУВАННЯ НАСІННЯ КУКУРУДЗИ НА ПРОЦЕС ЙОГО ПРОРОЩУВАННЯ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини АН України, м. Харків

Досліджено вплив умов заморожування та відігріву насіння кукурудзи з різним рівнем вологості на його збереження після кріовпливу. Встановлено режими кріоконсервування та оптимальної вологості насіння, при використанні яких спостерігається стимуляція інтенсивності початкового росту проростків, що вирощені із консервованого насіння. Пропонується механізм стимулюючої дії низькотемпературної обробки насіння на процес його наступного пророщування.

T.F.STRIBUL, S.M.TYUMCHUK, N.N.MILSHINA

STIMULATING ACTION OF LOW TEMPERATURE FREEZING OF MAIZE SEEDS ON THEIR GERMINATION

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov, Ukraine;

We have studied the effect of the conditions of freeze-thawing of maize seeds, possessing different levels of humidity, on their survival rate after cryoexposure. The protocols of cryopreservation and values of the optimal humidity of seeds have been elaborated, the application of which provides for the stimulation of the intensity of the initial growth of shoots, germinated from cryopreserved seeds. A mechanism of stimulating action of low temperature pre-treatment of seeds on the process of their subsequent germination has been proposed.

УДК 57.043 + [57.085.23 + 57.083.36] : 547.422 + 547.484

В.В.Чеканова, Л.А.Ханина, В.И.Луговой, Т.Ф.Петренко

ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ И КРИОПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ ОКСИЭТИЛИРОВАННЫХ АМИДОВ ПРИ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИИ ПЕРЕВИВАЕМОЙ КУЛЬТУРЫ СПЭВ

Представлены результаты исследования цитотоксичности и криопротекторных свойств ряда оксиэтилированных алифатических амидов на культуре клеток СПЭВ. Установлено, что наибольшей криопротекторной активностью обладает оксиэтилированный N-ацетилэтаноламин со степенью полимеризации 3–4, а также N-ацетилацетамид со степенью полимеризации п-7. Эти вещества можно рекомендовать для дальнейшего изучения в качестве криопротекторов на клеточной культуре и других клеток.

С целью консервирования клеточных суспензий, в том числе клеточных культур, наряду с другими криопротекторами в последнее время успешно применяется полиэтиленоксид-400 (ПЭО-400) [2, 7] и оксиэтилированные глицерины [10]. Показано, что для каждого типа клеток существует оптимальная концентрация криопротектора и скорость охлаждения, обеспечивающие максимальную сохранность клеток [5]. В работе [4] при охлаждении клеточных суспензий Нер-2; Sp 2/0; гибридомы ОА3 использовали полиэтиленоксид-400 в концентрациях 5 и 10%. При увеличении концентрации ПЭО-400 в среде до 20% повышалась сохранность клеток, однако для разных клеточных линий степень этого повышения различна. Использование в качестве криопротектора 10%-го ПЭО-400 привело к появлению клеток с морфологическими изменениями, а также происходило снижение пролиферативной активности и значительное нарушение рецепторных функций — значительное торможение в скорости распластывания клеток. Замораживание перевиваемых клеточных культур ПО, СПЭВ под защитой оксиэтилированного глицерина п=3 и морфолина обеспечило высокую сохранность клеток при оценке их жизнеспособности методом суправитального окрашивания с сохранением их ростовой, митотической активности [9, 10]. Имеются данные об успешном применении в качестве криопротекторов для этих целей оксиэтильных производных глицери-

на, в частности ОЭГ $p=5$ [1]. Однако с увеличением концентрации ОЭГ $p=5$ до 15% количество бластных и делящихся клеток уменьшается, что приводит к резкому снижению митотического индекса. Одновременно со снижением митотического индекса в опытных культурах наблюдается увеличение числа клеток на стадии метафазы, возрастающего по мере увеличения концентрации криопротекторов. Обнаружено также, что в этом случае слабее выражена адгезия клеток к подложке и медленно происходит восстановление монослоя.

Таким образом, из приведенного краткого анализа обзора данных литературы явствует, что применение оксиэтильных производных полиолов для криоконсервирования различных клеточных культур в ряде случаев может быть успешным, хотя в конечном счете может быть ограничено из-за побочного, нежелательного влияния на клетки этих криопротекторов. В задачу данного исследования входило изучение цитотоксичности и криозащитной активности оксиэтилированных амидов в отношении клеточной культуры СПЭВ. В качестве производных полиэтиленоксида можно рассматривать оксиэтилированные амиды. Как и полиэтиленоксиды и другие оксиэтильные производные, оксиэтилированные амиды являются не индивидуальными соединениями, а представляют собой смесь олигомеров с различной длиной цепи. Поэтому представляло интерес изучить зависимость цитотоксического и криопротекторного действия оксиэтилированных амидов на клеточные культуры. Клетки перевиваемой культуры СПЭВ получали из УкрНИИ ветеринарии. В опытах использовали 35 образцов клеточной культуры.

Для изучения цитотоксического действия криопротекторов в отношении культуры СПЭВ клетки переводили в суспензию, обрабатывая монослой раствором Версена 0,02% с трипсином 0,25%, взятых в соотношении 9:1. К суспензии клеток добавляли медленно по каплям равный объем криопротекторов, приготовленных на ростовой среде, доведя конечную концентрацию криопротекторов до заданной 5, 10, 20%. Клетки выдерживали в течение 30 мин при комнатной температуре, после чего из суспензии отбирали пробы для оценки жизнеспособности. Суспензию клеток с добавленными криопротекторами высевали на флаконы и инкубировали при 37°C. Морфофункциональное состояние клеток контролировали через каждые 1, 2, 3 ч.

Аналогично, как описано выше, к суспензии клеток с концентрацией 10×10^6 кл/мл добавляли равный объем рабочего раствора криопротекторов. Добавление этих растворов проводили дробными порциями, медленно, в течение 5–7 мин. Полученную суспензию клеток разливали в полиэтиленовые ампулы емкостью 1 мл и после 30-мин экспозиции замораживали в программном замораживателе УОП-8 производства СКТБ с ОП ИПК и К АН Украины по методу, разработанному нами [11]. Жизнеспособность клеток культуры изучали по суправитальному окрашиванию клеток трипановым блау [6]. Пролиферативную активность клеток СПЭВ изучали путем определения митотического индекса [3].

Результаты исследований цитотоксичности оксиэтилированных амидов на клетки СПЭВ приведены в табл. 1. Как видно из табл. 1, после контакта клеток с оксиэтилированным формилэтаноламином сохранность клеток снижалась до 29,5%, а с повышением концентрации этого вещества до 10% сохранность клеток уменьшилась до 0,85%.

Оксиэтилированный ацетилэтаноламин при концентрации в клеточной взвеси 2,5–10% не оказывает выраженного цитотоксического действия на клеточную культуру СПЭВ, после эквilibрации сохраняется 85–98% жизнеспособных клеток. Остальные исследованные вещества, как следует из приведенных данных, проявляют значительную цитотоксичность по отношению к клеточной культуре СПЭВ. Так, оксиэтилированный метилацетамид оказывал токсическое действие, вызывая гибель 42–48% клеток. Оксиэтилированный ацетилацетамид со степенью полимеризации $p=6$ при концентрации 10% по-

вреждает около 50% клеток. Значительной токсичностью по отношению к клеткам СПЭВ обладал и оксиэтилированный трифторацетилэтанолламин со степенью полимеризации п-7. Увеличение концентрации указанных веществ в суспензии клеток до 10% приводит практически к полной гибели клеток.

Т а б л и ц а 1

Влияние оксиэтилированных амидов с различной степенью полимеризации на сохранность клеточной культуры СПЭВ в зависимости от концентрации защитных веществ

Оксиэтилированные амиды	Степень полимеризации, п	Средняя молекулярная масса	Концентрация веществ, %	Количество сохранившихся клеток, %
Формилэтанолламин	3	177	2,5	31,4±0,6,
			5	29,5±0,6,
			10	0,85±0,02
Ацетилэтанолламин	4	213	2,5	97,3±1,9
			5	96,0±1,9
			10	85,5±1,7
Метилацетамид	4	230	2,5	51,3±1,7
			5	49,2±1,0
			10	42,5±0,9
Ацетилацетамид	6	409	2,5	86,2±1,7
			5	84,0±1,7
			10	50,0±1,0
Ацетилдиэтанолламин	5-6	410	2,5	97,6±1,9
			5	95,7±1,9
			10	97,7±1,9
Ацетилдиэтанолламин	8-9	499	2,5	96,2±1,9
			5	95,7±1,9
			10	88,2±1,8
Трифторацетилэтанолламин	7	421	2,5	7,0±0,1
			5	4,5±0,1
			10	0

Наименьшей токсичностью в отношении клеточной культуры СПЭВ обладают ацетилдиэтанолламин с молекулярной массой 410, 499 и степенью полимеризации п=5-6, 8-9. Экспозиция клеточной культуры с данными веществами в исследуемом диапазоне концентраций не приводит к значительным повреждениям, количество сохранных клеток находилось на уровне контроля (см. табл. 1). Жизнеспособность нативных клеток культуры СПЭВ составляла 94,2±1,8%.

В табл. 2 представлены результаты исследования цитотоксичности оксиэтилированных амидов в зависимости от времени эквilibрации этих веществ с клетками в течение 3 ч культивирования.

Как видно из табл. 2, наименьшей цитотоксичностью в отношении клеточной культуры СПЭВ в исследуемом диапазоне концентраций при 3-х часовой эквilibрации обладает оксиэтилированный ацетилэтанолламин со степенью полимеризации 3-4.

Оксиэтилированные ацетилдиэтанолламины со степенью полимеризации п=5-6, 8-9 при концентрации в клеточной взвеси 2,5-10% также не оказывают выраженного цитотоксического действия на клеточную культуру СПЭВ. Значительное повреждающее действие на клеточную культуру СПЭВ оказывает оксиэтилированный ацетилацетамид со степенью полимеризации п-6 при концентрации 10% и увеличении времени эквilibрации до 3 ч.

В табл. 3 представлены результаты исследования криопротекторных свойств оксиэтилированных амидов на культуре клеток СПЭВ. В качестве контроля использовали клеточную культуру, криоконсервированную под защитой ПЭО-400 (в 5%-й концентрации).

Как видно из табл. 3, наибольшей криопротекторной активностью обладает оксиэтилированный ацетилэтанолламин со степенью полимеризации 3-4 и молекулярной массой 213. Количество сохранившихся клеток под защитой этого криопротектора составляет 96% при применении 2,5%-й концентрации вещества.

Т а б л и ц а 2

Цитотоксическое действие оксиэтилированных амидов по отношению к клеточной культуре СПЭВ в зависимости от времени эквilibрации с растворами веществ

Оксиэтилированные амиды	Степень полимеризации, п	Концентрация веществ, %	Жизнеспособность клеток, %		
			Время эквilibрации		
			1 ч	2 ч	3 ч
Ацетилэтаноламин м.м. 213	3-4	2,5	97,0±1,9	96,0±1,9	96,0±1,9
		5	9,5±1,9	94,0±1,9	94,0±1,9
		10	84,0±1,7	84,0±1,7	84,0±1,7
Ацетилацетамид м.м. 409	6	2,5	85,0±1,7	85,0±1,7	84,0±1,7
		5	83,0±1,7	83,0±1,7	82,0±1,6
		10	50,0±1,0	50,0±1,0	50,0±1,0
Ацетилдиэтаноламин м.м. 410	5-6	2,5	86,0±1,7	88,0±1,8	90,0±1,8
		5	98,0±1,9	92,0±1,8	86,0±1,7
		10	87,0±1,7	86,0±1,7	86,0±1,7
Ацетилдиэтаноламин м.м. 499	8-9	2,5	85,0±1,7	85,0±1,7	84,0±1,7
		5	85,0±1,7	84,0±1,7	84,0±1,7
		10	83,0±1,7	83,0±1,7	83,0±1,7

Оксиэтилированный ацетилацетамид со степенью полимеризации п-6 и молекулярной массой 409 также проявляет криопротекторную активность. Сохранность клеток перевиваемой культуры СПЭВ в присутствии оксиэтилированного формилэтанолamina со степенью полимеризации п-3 (м.м. 177) показало, что это вещество не проявляет криозащитного действия.

Т а б л и ц а 3

Сохранность клеток СПЭВ после замораживания под защитой оксиэтилированных амидов

Оксиэтилированные амиды	Средняя молекулярная масса	Степень полимеризации, п	Концентрация веществ, %	Жизнеспособность клеток после замораживания, %
Контроль (ПЭО-400)			5	77,0±2,1
Формилэтаноламин	177	3	2,5	0
			5	0
			10	0
Ацетилэтаноламин	213	3-4	2,5	96,0±1,9
			5	95,0±1,9
			10	81,0±1,6
Метилацетамид	230	4	2,5	23,6±0,5
			5	21,5±0,9
			10	21,2±0,9
Ацетилацетамид	409	6	2,5	88,3±1,7
			5	87,5±1,8
			10	19,8±0,8
Ацетилдиэтаноламин	499	8-9	2,5	2,3±0,04
			5	0,98±0,02
			10	0
Трифторацетилэтаноламин	421	7	2,5	2,3±0,05
			5	1,8±0,1
			10	9,7±0,4

Как следует из представленных данных, под защитой оксиэтилированного метилацетамид со степенью полимеризации п-4 (м.м. 230) удастся сохранить жизнеспособными 23% клеток после криоконсервирования, а в присутствии оксиэтилированного ацетилдиэтанолamina со степенью полимеризации п-8 (м.м. 499) клетки полностью погибают. Оксиэтилированный трифторацетилэтаноламин со степенью полимеризации п-7 (м.м. 421) также не проявляет криозащитного действия в 10%-й концентрации, сохраняет при этом только 10% жизнеспособных клеток. При замораживании клеток с оксиэтилированным формилэтанолamiном клетки полностью погибают. Приведенные выше данные указывают на то, что наибольшей криозащитной активностью обладают оксиэтилированный ацетилэтаноламин со степенью полимеризации п-3-4

(м.м. 213) и оксиэтилированный ацетилацетамид со степенью полимеризации п-7 (м.м. 409). Эти вещества можно рекомендовать для дальнейшего изучения в качестве криопротекторов на клеточной культуре и других клеток.

Была изучена также митотическая активность клеток СПЭВ, криоконсервированных с оксиэтилированным N-ацетилэтанолламином (м.м. 213) (табл. 4). Из табл. 4 видно, что митотическая активность клеток СПЭВ, криоконсервированных

Т а б л и ц а 4

Влияние оксиэтилированного N-ацетилэтанолламина м.м. 213 на митотический индекс клеток СПЭВ, подвергшихся криоконсервированию

Криопротектор	Митотический индекс, %		
	после 24 ч роста	после 48 ч роста	после 72 ч роста
Контроль (нативная культура)	33,3±1,5	39,0±6,1	43,0±1,5
ПЭО-400 5%	3,7±1,0	14,0±4,0	32,0±2,0
Оксиэтилированный ацетилэтанолламин п=3-4, 5%	38,2±3,4	42,3±1,2	42,6±2,6

с ПЭО-400, после размораживания была значительно снижена по сравнению с контролем и составила 3,7%, а оксиэтилированным ацетилэтанолламином — 38,2%. Через 48 ч при использовании ПЭО-400 митотическая активность размороженных клеток была ниже, чем в контроле. В культурах, криоконсервированных с оксиэтилированным ацетилэтанолламином митотическая активность и через 48 ч, и через 72 ч сохранялась на уровне контроля, и составила 42,6%, в то время как с ПЭО-400 на 3-и сут роста митотический индекс оставался ниже контрольного.

Следовательно, на основании приведенных выше данных можно сделать вывод, что оксиэтилированный ацетилэтанолламин со степенью полимеризации п=3-4 и м.м. 213 можно считать эффективным криопротектором и рекомендовать для практического применения при криоконсервировании культуры клеток СПЭВ и, возможно, других клеточных суспензий или тканей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Глушко Т.А. Особенности пролиферации клеточных культур после контакта с криопротекторами: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Харьков, 1986. — 14 с.
2. Гордиенко О.М. Замораживание культур с ПЭО-400 в жидком азоте // Современные вопросы криобиологии. — Киев: Наук. думка, 1976. — С. 29-31.
3. Дьяконов Л.П., Глухов В.Ф., Поздняков А.А. и др. Культура клеток и тканей животных. — Ставрополь: Ставропольский сельхоз. ин-т, 1980. — 110 с.
4. Петренко Т.Ф. Влияние криоконсервирования на морфофункциональные свойства клеток переливаемых культур: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Харьков, 1986. — 14 с.
5. Пушкар Н.С., Шраго М.И., Белоус А.М. и др. Криопротекторы. — Киев: Наук. думка, 1978. — 204 с.
6. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / Под ред. М.О.Биргер. — М.: Медицина, 1982. — 462 с.
7. Цуцаева А.А., Аграненко В.А., Федорова Л.И. и др. Криоконсервирование клеточных суспензий. — Киев: Наук. думка, 1983. — 240 с.
8. Шраго М.И., Луговой В.И., Белокоп В.С. и др. Консервирование клеточных культур под защитой вновь синтезированных криопротекторов // Тез. докл. III Всесоюз. конф. по науч. основам технологии промышленного производства ветеринарных препаратов. — М.: Б. и., 1987. — 28 с.
9. А.с. 1089090 СССР, С 07 Д295/08, А 01 № 1/02. N-оксиэтилгепта(оксиэтилен)-морфолин в качестве криопротектора / Л.А.Ханина, Т.П.Линник, М.И.Шраго и др. // Открытия. Изобретения. — 1984. — № 16. — С. 3-6.
10. А.с. 1192762 СССР, 01 № 1/00. Среда для консервирования клеточных культур / М.И.Шраго, Л.А.Ханина, Ю.В.Калугин и др. // Открытия. Изобретения. — 1985. — № 43. — С. 1-2.
11. А.с. 1448627 СССР, А I С 07 С 103/38 А 01 № 1/02. Способ получения криопротектора / В.И.Грищенко, Л.А.Ханина, М.И.Шраго и др. // Открытия. Изобретения. — 1988. — № 10. — С. 3-4.

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

Поступила 29.09.93

В.В.ЧЕКАНОВА, Л.А.ХАНИНА, В.Й.ЛУГОВИЙ, Т.Ф.ПЕТРЕНКО

ЦИТОТОКСИЧНІСТЬ ТА КРІОПРОТЕКТОРНА АКТИВНІСТЬ ОКСІЕТИЛЬОВАНИХ АМІДІВ ПРИ КРІОКОНСЕРВУВАННІ КЛІТИННОЇ КУЛЬТУРИ СПЕВ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини АН України, м. Харків

У роботі наведені результати досліджень цитотоксичності та кріопротекторних властивостей ряду оксиетильованих аліфатичних амідів на культурі клітин СПЕВ. Встановлено, що найбільша кріопротекторна активність притаманна оксиетильованому N-ацетилетаноламіну зі ступенем полімеризації 3-4, а також N-ацетилацетаміду зі ступенем полімеризації n-7. Ці речовини можна рекомендувати для подальшого вивчення як кріопротекторів на клітинній культурі і інших клітин.

V.V.CHEKANOVA, L.A.KHANINA, V.I.LUGOVOY, T.F.PETRENKO

CYTOTOXICITY AND CRYOPROTECTIVE ACTIVITY OF OXYETHYLATED AMIDES DURING CRYOPRESERVATION OF A REVIVED PEKC CULTURE

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov, Ukraine

The given work presents the results of investigating cytotoxicity and cryoprotective properties of the series of oxyethylated aliphatic amides on porcine embryonic kidney cell (PEKC) culture. It has been found that oxyethylated N-acetyl ethanolamine with the degree of polymerization of 3-4, and N-acetyl amide with the degree of polymerization of n=7, possess the highest cryoprotective activity. These substances may be recommended for subsequent investigation of their cryoprotective action on cell culture and other cells.

УДК 57.043 + 57.084

В.Ф.Козлова, Т.Н.Юрченко

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕКОТОРЫХ ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ ЖИВОТНЫХ ПОСЛЕ ГЛУБОКОЙ ГИПОТЕРМИИ С ПРЕМЕДИКАЦИЕЙ МЕТРОНИДАЗОЛОМ

В работе представлены экспериментальные данные о морфофункциональном состоянии внутренних органов животных после глубокой гипотермии. Показано снижение альтернативных процессов структур под влиянием метронидазола, что способствует повышению устойчивости организма к общему охлаждению.

Поиск новых эффективных защитных препаратов при охлаждении организма является актуальной проблемой кріобіології і медицини. Этой теме посвящено настоящее исследование, проведенное согласно договору с Институтом травматологии и ортопедии ВСФ СО РАМН (г. Иркутск). В качестве предполагаемого кріопротектора испытан метронидазол, относящийся к соединениям нитро-имидазолов, обладающих многогранным "хамелеонским" характером действия, в основе одного из механизмов которого лежат электронно-акцепторные свойства, обуславливающие радиосенсибилизирующий и антиоксидантный эффект в гипоксических условиях [2, 3]. Гипометаболическая активность хорошо проникающего в ткани препарата в анаэробных средах проявляется явлениями брадикардии и гипотермии, что позволяет прогнозировать эффективность его применения при общем охлаждении организма. Имеется сообщение о корреляции метронидазолом водносолевого гомеостаза при холодовой травме путем стабилизации показателей осмолярности плазмы, концентрации Ca^{2+} и уровня аргининвазопрессина [1].

Целью настоящего исследования явилось определение характера действия метронидазола на морфофункциональный статус организма животных

при переохлаждении. Эксперименты проведены на половозрелых белых крысах-самцах линии Вистар, подвергнутых глубокой гипотермии ($PT - 16,5 \div 17,5^\circ C$) при активном погружении их в холодовую баню (температура воды $3^\circ C$) при активном плавании до потери способности держаться на воде. Время плавания составило $9,0 \div 12,0$ мин. За 5 мин до охлаждения крысам внутрибрюшинно вводили 1 %-й раствор метронидазола (0,04 г/кг массы тела). Забой животных путем декапитации осуществляли через 3 ч после самосогревания по достижении $PT - 20^\circ C$ (IV гр.) и через сутки в раннем восстановительном периоде (V гр.). Контролем служили интактные животные (I гр.) и находящиеся при комнатной температуре после внутрибрюшинного введения соответствующего количества метронидазола (II гр.), а также плавающие крысы в холодовой бане до потери возможности держаться на воде ($5,5 \div 6,0$ мин, $PT - 15,5 \div 18,0^\circ C$) без предварительной фармакологической подготовки (III гр.).

По окончании экспериментов проводили патолого-анатомическое вскрытие животных и отбор образцов внутренних органов (сердца, печени, почек) для гистологического и гистохимического исследований. С этой целью материал фиксировали в 10 %-м растворе формалина, целлоидин-парафиновые срезы толщиной 7 мкм окрашивали гематоксилином Эрлиха и эозином, а также реактивом Шиффа и альциановым синим по Моури для выявления гликопротеинов и гликозаминогликанов (ГАГ). Их содержание оценивалось полуколичественно в условных единицах по 5-ти бальной шкале. Учитывалось количество (в %) двуядерных и поврежденных клеток печени.

В результате проведенного исследования установлено, что внутрибрюшинное введение животным метронидазола способствует повышению их устойчивости к общему охлаждению, что проявилось увеличением в 1,5–2 раза времени плавания их в холодной воде. При патологоанатомическом вскрытии крыс I и II контрольных групп выраженных изменений со стороны внутренних органов и систем не обнаружено за исключением пониженной свертываемости крови после введения метронидазола. У животных III контрольной группы макроскопически отмечалась бледность кожи и слизистых оболочек носа, рта, глотки, гортани, трахеи и пищевода, полнокровие слизистых оболочек желудка и кишечника, мягких мозговых оболочек, тканей мозга и внутренних органов. Имели место кровенаполнение и увеличение размеров сердца, печени, почек, селезенки, выпотевание транссудата в грудную и брюшную полости, отек почек. В легких эмфизематозные участки чередовались с очагами ателектазы. Наряду с гиперемией в слизистых оболочках желудка и 12-перстной кишки выявлены точечные кровоизлияния.

При патолого-анатомическом вскрытии животных IV подопытной группы также обнаружено кровенаполнение сосудов внутренних органов и мягких мозговых оболочек, однако печень, почки и селезенка не увеличены в размерах и выпотевания транссудата в естественные полости тела не выявлено. Легкие воздушные, местами полуспавшиеся. У крыс, забитых через сутки после охлаждения с предварительным введением метронидазола отмечается восстановление перераспределения крови между поверхностью и “ядром” тела, признаки дистрофии печени.

Как показали результаты патолого-анатомического вскрытия животных, наиболее реагирующими системами и органами организма при охлаждении явились сердечно-сосудистая система, а также печень и почки, в связи с чем они были подвергнуты более глубокому микроскопическому исследованию.

Светооптически установлено, что сердце крыс I и II контрольных групп имеет характерное строение. Миокард представлен поперечно-исчерченными кардиомиоцитами с гиперхромными овальновытянутыми ядрами и эозинфильной саркоплазмой. Последняя содержит умеренное количество гликогена, располагающегося, в основном, на уровне изотропных дисков миофиб-

рилл, контрастируя поперечную исчерченность мышечных волокон при окраске реактивом Шиффа. Соединительная ткань миокарда в виде межклеточного вещества, тонковолокнистых структур и покоящихся фибробластов в составе эндомизия и перимизия тесно прилегает к сарколемме кардиомиоцитов и к стенкам многочисленных капилляров, формируя единую морфофункциональную систему, обеспечивающую процессы микроциркуляции и трофики тканей (рис. 1). Соединительнотканые элементы богаты гликопротеинами и практически не содержат гликозаминогликанов.

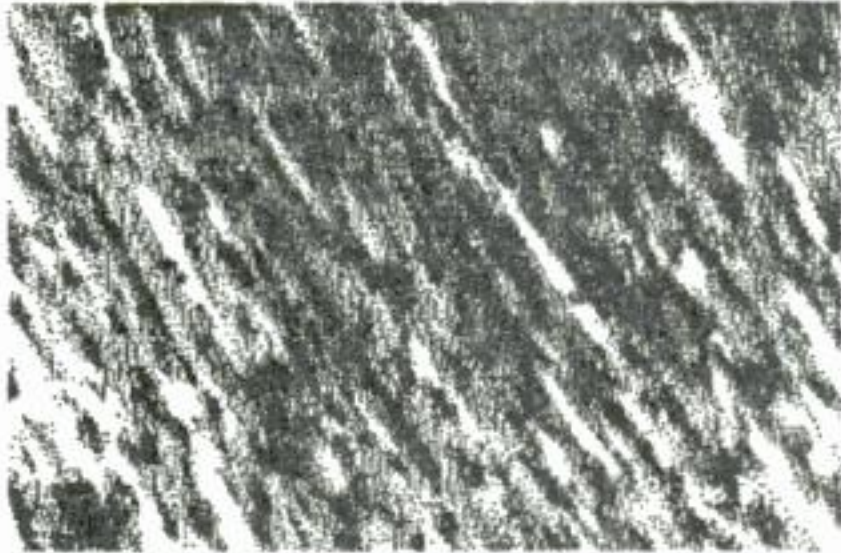


Рис. 1. Плотное расположение кардиомиоцитов и соединительнотканной основы миокарда животных после введения метронидазола. Окраска по Моури $\times 340$. Уменьшение при репродуцировании 2/3

лаброциты, которые свидетельствуют о сдвиге среды в кислую сторону и нарушении гомеостаза органа. Известна роль молекулярных цепей ГАГ в удержании внеклеточной жидкости, чем можно объяснить отек тканей.

У животных IV подопытной группы морфофункциональное состояние миокарда близко к уровню III контрольной группы. Однако в меньшей мере выявляются контрактурные изменения кардиомиоцитов и отек тканей. Соединительнотканые элементы богаты гликопротеинами и бедны ГАГ, то есть выравнивается кислотно-основное равновесие тканей. В раннем восстановительном периоде у животных V подопытной группы отмечается умеренное кровенаполнение миокарда, гипертрофия ядер кардиомиоцитов при сохраненной поперечной исчерченности саркоплазмы. Глыбки гликогена обнаруживаются только на уровне изотропных дисков миофибрилл.

Активным функциональным состоянием характеризуются структурные элементы стромы. Фибробласты увеличиваются в объеме, волокна соединительной ткани интенсивно окрашиваются реактивом Шиффа. В межклеточном веществе миокарда вдоль сарколеммы мышечных волокон определяются следы ГАГ и альцианофильные лаброциты. Таким образом, в наблюдаемый период у животных как в паренхиме, так и в строме миокарда преобладают гипертрофические адаптивные процессы, направленные на восстановление морфофункционального состояния органа.

Печень крыс I контрольной группы имеет обычную структуру. Паренхима представлена полигональными гепатоцитами, расположенными рядами и формирующими дольки. Ядра клеток отличаются полиморфизмом, но среди них преобладают округлые светлые с 2–3 ядрышками и диффузно расположенным хроматином. До 20% встречается двуядерных клеток. Гепатоциты содержат умеренное количество гликогена (2–3 усл. ед.) (рис. 2). Междольковая соединительная ткань печени слабо развита, практически не содержит ГАГ. В основном она просматривается в портальной, или воротной зоне, представленной воротной веной, печеночной артерией, желчным протоком и лимфатическим сосудом.

Внутридольковые капилляры слегка расширены, заполнены кровью. В выстилке стенок синусоидов различаются тонкие, плоские и звездчатые эндотелиоциты (Купферовы клетки). Отличительной особенностью морфофунк-

У животных III контрольной группы отмечается гипертрофия сердечных миоцитов, потеря ими гликогена и в ряде случаев поперечной исчерченности. В клетках преобладают крупные светлые овальные ядра с периферическим расположением гетерохроматина. Встречаются кардиомиоциты с контрактурными миоцитами I и II степени. В миокарде отмечается расширение межмышечных пространств, кровенаполнение сосудов, отек стромы. В соединительнотканной основе органа появляются ГАГ и молодые альцианофильные

ционального состояния печени крыс II контрольной группы является наличие в портальных зонах "темных", функционально-полноценных гепатоцитов, содержащих большое количество гликогена (4–5 усл. ед.) (рис. 3). Базофильные ядра этих клеток характеризуются компактно расположенным хроматином.

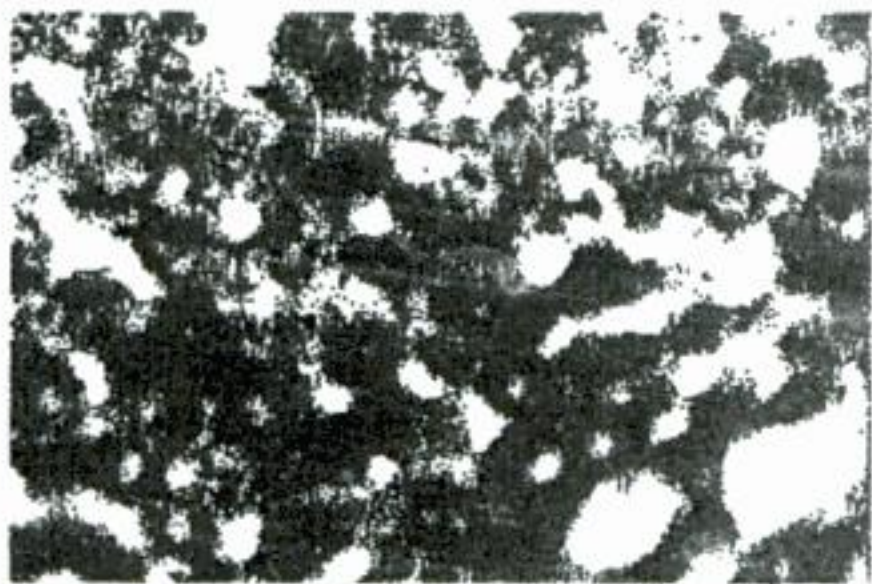


Рис. 2. Умеренное количество гликогена в печени интактной крысы. Окраска по Моури $\times 340$. Уменьшение при репродуцировании 2/3



Рис. 3. Увеличение содержания гликогена в гепатоцитах после введения животным метронидазола. Окраска по Моури $\times 340$. Уменьшение при репродуцировании 2/3

В печени животных III контрольной группы обнаружен целый комплекс патологических изменений, проявляющихся в нарушении микроциркуляции органа, отека и набухания тканей. Большинство гепатоцитов увеличены в размерах, бедны гликогеном и содержат крупные светлые ядра с периферическим расположением хроматина. Отмечается микроочажковый некроз паренхимы, до 10% клеток теряют свои границы, в них идут процессы кариолиза и цитолиза. В строме органа появляются ГАГ и наблюдается активация клеток Купфера. В некоторых кровеносных сосудах имеет место альцианофилия плазмы.

У животных IV подопытной группы явления отека и набухания тканей печени менее выражены, хотя наблюдаются кровенаполнение сосудов, особенно микроциркуляторного русла. Паренхима органа характеризуется относительно однородной морфологической картиной в виде крупных гепатоцитов с округлыми светлыми ядрами и богатой гликогеном цитоплазмой. Это свидетельствует, с одной стороны, о функциональном напряжении органа, с другой — об интенсивно идущих синтетических процессах в клетках. Наряду с этим встречаются гепатоциты с признаками зернистой дистрофии, кариопикнозом и кариорексисом, до 5% клеток лизированы. Эндотелиоциты синусоидов увеличены в размерах, в клетках Купфера выявляются фагоцитарные пузырьки, что подтверждает их реактивное состояние. Строма органа интенсивно окрашивается реактивом Шиффа и слабо альциановым синим.

Печень животных V подопытной группы характеризуется полиморфизмом клеточного состава. В паренхиме наряду с крупными светлыми гепатоцитами, содержащими в плазме умеренное количество гликогена, появляются оптически плотные, богатые гликогеном клетки с гиперхромными ядрами. Встречаются также гепатоциты с признаками зернистой и гидропической дистрофии, а также единичные лизированные и митотически делящиеся клетки. Отмечается активация морфофункционального состояния стромы, гипертрофия эндотелиоцитов синусоидов, накопление гликопротеинов в ретикулиновых волокнах слабо развитой междольковой соединительной ткани. Таким образом, через сутки после глубокой гипотермии в печени крыс выявляются деструктивные и репаративные процессы, обуславливающие дальнейший исход жизнедеятельности органа.

Почка крыс I контрольной группы имеет характерное строение нефронов и стромы. Сосудистые клубочки умеренно кровенаполнены, их структурные элементы богаты гликопротеинами и ГАГ. Полость капсулы клубочков просматривается. Эпителий проксимальных извитых канальцев содержит хорошо развитую щеточную каемку, интенсивно воспринимающую реактив Шиффа.

Клетки дистальных извитых канальцев и прямых, а также собирательных трубок имеют четкие границы и выраженную базальную мембрану, их округлые светлые ядра с 2–3 ядрышками занимают центральное положение. Просветы дистальных отделов нефронов и собирательных трубок лишены постороннего содержимого. Волокнистая соединительная ткань почек развита слабо, обнаруживается, в основном, по ходу кровеносных сосудов. Межклеточное вещество мозгового слоя богато ГАГ.

При введении метронидазола (II контрольная группа) морфофункциональный статус почек крыс мало изменен. Однако в корковом веществе органа обнаружен эффект легкого обезвоживания тканей, что проявляется уплотнением клеток, уплотнением цитоплазмы эпителиоцитов и расширением полостей дистальных извитых и прямых канальцев (рис. 4). Базальные мембраны сосудистых клубочков и канальцев почек интенсивно Шифф-положительны.

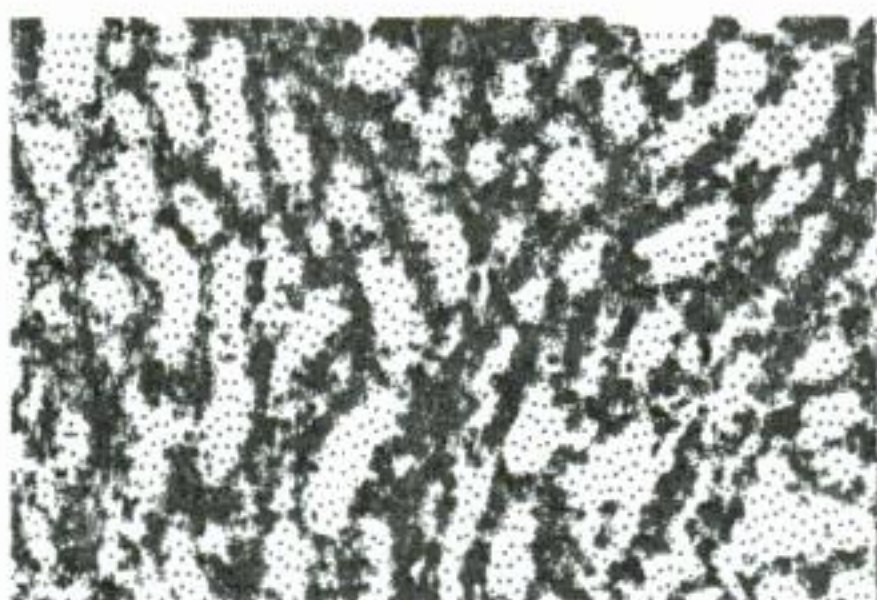


Рис. 4. Легкое обезвоживание тканей почки после введения животным метронидазола. Окраска гематоксилином и эозином $\times 340$. Уменьшение при репродуцировании 2/3

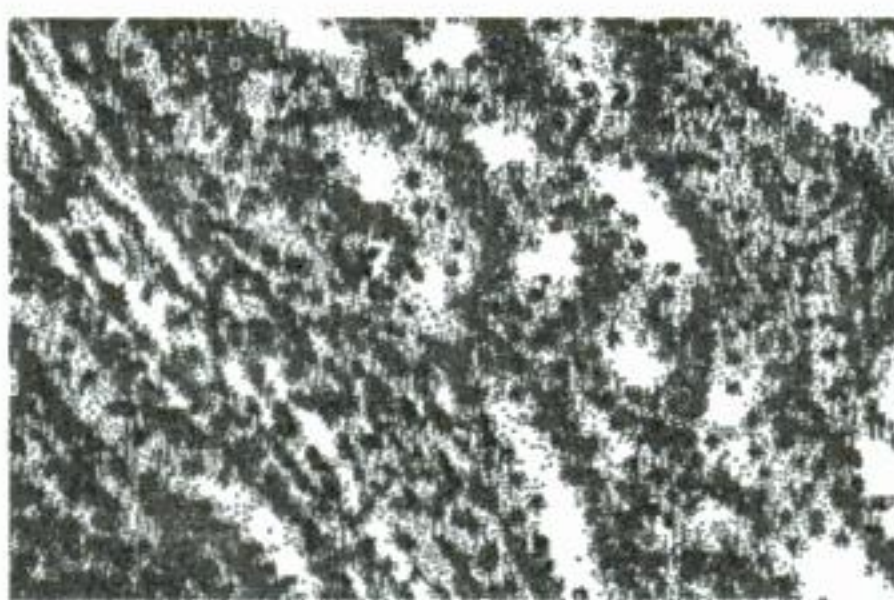


Рис. 5. Гиперпластические процессы в тканях почек подопытных крыс в восстановительном периоде. Окраска гематоксилином и эозином $\times 340$. Уменьшение при репродуцировании 2/3

У животных III контрольной группы отмечается отек почечных телец и набухание тканей, потеря границ клеток не только проксимальных, но и дистальных извитых канальцев, особенно в переходной юкстамедуллярной зоне. В основном веществе соединительной ткани идет накопление ГАГ, наблюдается альцианофилия плазмы крови, содержимого лимфатических сосудов, а также канальцев и собирательных трубок мозгового слоя. Имеет место кровенаполнение междольковых, междольковых, дуговых и внутريدольковых артерий.

В почках крыс IV подопытной группы выявляются признаки паренхиматозной дистрофии эпителиоцитов извитых канальцев. Явления отека тканей менее выражены, но у некоторых животных имеется локальный отек нефронов, чаще их юкстамедуллярных сосудистых клубочков. Отмечается полнокровие органа, однако содержание ГАГ в его соединительнотканной основе меньше, чем у животных III контрольной группы. Волокнистые структуры стромы богаты гликопротеинами.

У животных V подопытной группы нормализуется кровообращение почек, исчезают признаки отека тканей, хотя в ряде случаев имеет место зернистая дистрофия эпителиоцитов извитых канальцев, отслоение щеточной каемки в просвет проксимальных извитых канальцев при сохраненных базальных мембранах. В наблюдаемый период активизируются стромальные элементы, однако без выраженной пролиферации. Фибробласты междольковой и внутридольковой соединительной ткани увеличены в размерах, их волокна ярко Шифф-положительны. Мезангиальные клетки сосудистых клубочков приобретают звездчатую форму, продуцируют комплекс полисахаридных соединений. Это свидетельствует о том, что в почках идут активные гиперпластические процессы, направленные на восстановление нарушенного гомеостаза органа (рис. 5).

Таким образом, в результате проведенного морфофункционального исследования установлено, что глубокая гипотермия животных вызывает целый комплекс деструктивных и компенсаторно-приспособительных изменений в сердечно-сосудистой системе и паренхиматозных органах.

Премедикация крыс метронидазолом повышает их устойчивость к общему охлаждению, снижая явления альтерации, отека и набухания тканей внутренних органов, увеличивая содержание гликогена в гепатоцитах и гликопротеинов в соединительнотканых структурах сердца, печени, почек.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бородин А.В., Бровкович В.М., Лопырев В.А. и др. Применение метронидазола для коррекции некоторых параметров водно-солевого гомеостаза при общем охлаждении организма в воде // Биохимические аспекты холодовых адаптаций. – Харьков: Б.и., 1991. – С. 44–45.
2. Рождественский Л.М., Воронина С.С., Сморянова О.Т. и др. Влияние метронидазола на интенсивность клеточного дыхания // Медрадиология. – 1984. – № 12. – С. 38–43.
3. Offenhaus L. Metronidasol Kameleon at rapacee // Med. T. Genees. – 1977. – 121, № 40. – P. 1550–1554.

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

Поступила 19.01.94

В.П.КОЗЛОВА, Т.М.ЮРЧЕНКО

СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕЯКИХ ВНУТРІШНІХ ОРГАНІВ ТВАРИН ПІСЛЯ ГЛИБОКОЇ ГІПОТЕРМІЇ З ПРЕМЕДИКАЦІЄЮ МЕТРОНІДАЗОЛОМ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини АН України, м. Харків

Представлені експериментальні дані про морфофункціональний стан внутрішніх органів після глибокої гіпотермії. Показане зниження пошкодження структур під впливом метронідазолу, що сприяє підвищенню стійкості організму до загального охолодження.

V.F.KOZLOVA, T.N.YURCHENKO

STRUCTURE-FUNCTIONAL CHARACTER OF SOME INNER ORGANS OF ANIMALS FOLLOWING PROFOUND HYPOTHERMIA WITH PREMEDICATION BY METRANIDASOLE

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov, Ukraine

The given report presents the experimental data on the functional state of the inner organs of animals after profound hypothermia. A metranidasole-induced reduction in the alternative process in the structures is reported, which facilitates increasing organism resistance to profound cooling.

УДК 57.043:612.44/45

**В.А.Чуйко, Л.Г.Карпенко, Е.Г.Иванова, Н.Ф.Губина,
Е.И.Легач**

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ

Представлены данные о влиянии замораживания и криопротекторов на связывание ^3H -дигидроалprenолола, активность аденилатциклазы клеток адренокортикальной ткани и секрецию кортизола в органотипической культуре. Отмечены различия в криочувствительности исследуемых биохимических процессов в адренокортикальной ткани, особенности действия на них криопротекторов.

Первые научные исследования, посвященные криоконсервированию коры надпочечников, были выполнены О.Смит [2]. При трансплантации адренокортикальной ткани в капсулу почки уже через 2 недели отмечалось восстановление строения и функции трансплантата. При подкожной пересадке структура трансплантата нормализовалась несколько медленнее. Наиболь-

шая выживаемость отмечена при трансплантации под кожу 4 половинок свежих надпочечников, из которых было удалено мозговое вещество.

В другой серии опытов [5] кору надпочечников, обработанную 15%-м глицерином, охлаждали до -79°C , через 1 ч отогревали и проводили аутоотрансплантацию под кожу. Из 28 животных выжили только 7. В группе, где для трансплантации использовали железы, замороженные с 20%-м глицерином, из 10 адреналэктомизированных крыс выжило 9. В группе из 10 крыс, где производилась трансплантация коры надпочечников, замороженных с 15%-м глицерином, также выжили 9 животных [5]. На основании полученных данных авторы делают вывод, что клетки коры надпочечников крысы, замороженные с глицерином до -79°C , сохраняются в функционально активном состоянии.

Изучено [6] влияние предварительного культивирования на выживаемость трансплантатов коры надпочечников. Ткань трансплантировали либо сразу после выделения, либо после культивирования в течение 1 недели (при 24°C в присутствии 95% кислорода). Установлено, что культивирование ткани донора в течение 1 недели и краткосрочная обработка реципиентов циклоспорином А способствует долгосрочному функционированию (до 30 сут) трансплантированной ткани коры надпочечников у подопытных животных.

В работах В.А.Чуйко и соавт. [3] исследовалось влияние димексида на связывание ^3H -дигидроалprenолола (ДГА), активность аденилатциклазы и секрецию кортизола корой надпочечников свиней. Для изучения состояния адренорецепторов и активности аденилатциклазы получали мембраны клеток коры надпочечников, которые выделяли по методу Дазорд [4]. Замораживалась адренокортикальная ткань со скоростью $85\text{--}100^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -196°C (быстрое замораживание) и со скоростью $1\text{--}3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ (медленное замораживание). Установлено, что добавление 1%-го димексида к адренокортикальной ткани приводит к увеличению базальной активности аденилатциклазы и снижению чувствительности к фториду и синактену. Увеличение концентрации димексида до 5% сопровождается сохранением чувствительности фермента к фториду, повышением его базальной активности, снижением чувствительности к синактену. Применение 10%-го раствора димексида приводит к увеличению базальной активности аденилатциклазы при проявлении стимулирующего действия фторида и синактена. Представленные данные позволяют заключить, что димексид в концентрациях 5 и 10%, которые обычно используются с целью криопротекции, а также в концентрации 1%, оказывает выраженное влияние на активность аденилатциклазы — центрального звена, обеспечивающего регуляцию образования гормонов, их секрецию, воздействие лигандов с адренорецепторами.

Данные экспериментов по изучению влияния димексида, свидетельствуют, что базальная секреция кортизола, содержание которого определялось по методу [1], клетками адренокортикальной ткани новорожденных поросят составляет 2468 нмоль/л. После добавления в культуральную среду синактена уровень кортизола в ней увеличивается в 2 раза, что свидетельствует о сохранении в клетках рецепторного аппарата "узнавания" и связывания АКТГ с последующей реализацией его внутриклеточного влияния. После инкубации ткани с 10%-м димексидом секреция кортизола снижается с 2468 до 1667 нмоль/л, но сохраняется чувствительность к синактену. Возможная причина этого явления — действие димексида на проницаемость мембран и транспорт в клетку субстратов, ионов и других биологически активных соединений, а также на функционально связанный с секрецией процесс эндоцитоза. Таким образом, димексид в концентрациях 5 и 10% влияет на активность аденилатциклазы и секрецию кортизола модулирующим образом. При этом сохраняется чувствительность к специфическим стимуляторам.

Изучения связывания ^3H -дигидроалprenолола и мембранной системы клеток коры надпочечников быка и свиньи после их замораживания до -196°C без криопротектора показало, что этот процесс насыщаемый и носит обратимый характер. Константа диссоциации лиганд-рецепторного комплекса K после быстрого замораживания срезов коры надпочечников до -196°C возрастает в 5 раз, что свидетельствует о снижении сродства адренорецепторов к лиганду. После быстрого замораживания количество мест связывания увеличивается с 0,92 нмоль/мг белка. Возможно это обусловлено модификацией липидных компонентов мембран, участвующих в гормон-рецепторном взаимодействии, и изменением белок-липидных взаимодействий в мембранах клеток коры надпочечников, которые возникают под действием низких температур. При изучении влияния быстрого замораживания на аденилатциклазу обнаружено, что ее базальная активность не изменяется и сохраняется ее чувствительность к фториду. Установлен также факт снижения активности аденилатциклазы, стимулируемой синактеном. Под влиянием медленного замораживания увеличивается базальная активность и сохраняется чувствительность фермента к синактену.

Исследования криозащитного действия димексида (1, 5, 7,5, 10%) на процесс образования гормон-рецепторного комплекса после замораживания коры надпочечников со скоростью $1-3^\circ\text{C}/\text{мин}$ показали, что константа сродства K_d -лиганд-рецепторного комплекса увеличивается с 6,56 нмоль до 10,99 нмоль после замораживания с 7,5%-м ДМСО, что свидетельствует о некотором увеличении сродства адренорецепторов к дигидроалprenололу. Замораживание адренокортикальной ткани с 1, 5 и 10%-м ДМСО свидетельствует о некотором увеличении сродства адренорецепторов к данному лиганду. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что 1, 5 и 10%-е концентрации димексида не оказывают криозащитного действия при замораживании срезов коры надпочечников свиньи при медленном замораживании до -196°C .

При изучении влияния замораживания до $-196^\circ\text{C}/\text{мин}$ на активность аденилатциклазы было установлено, что применение 1%-го димексида приводит к увеличению базальной активности фермента в 5 раз. Добавление 5 и 7,5%-х растворов димексида также увеличивает базальную активность. Однако содержание цАМФ в пробах после медленного замораживания с указанными концентрациями криопротекторов ниже, чем при использовании 1%-го димексида. Замораживание ткани коры надпочечников с 10%-м димексидом влияет на базальную активность аденилатциклазы аналогично действию 1%-го димексида. После медленного замораживания активность чувствительной к фториду аденилатциклазы сохраняется при использовании всех используемых концентраций димексида. При замораживании адренокортикальной ткани с димексидом стимуляция аденилатциклазы синактеном отмечается только при использовании 5%-й концентрации. Применение других концентраций димексида в качестве криопротектора не приводит к сохранению стимулирующего влияния синактена. При исследовании влияния замораживания с криопротекторами на секрецию кортизола опыты проводились на адренокортикальной ткани новорожденных поросят и зрелых животных. Было установлено, что адренокортикальная ткань новорожденных поросят сохраняет в процессе органотипического культивирования способность к образованию кортизола, причем этот процесс зависит от сроков культивирования. Наиболее высокие значения выделения кортизола в среду инкубации на 2-е и 7-е, наименее — на 5-е и 12-е сут.

Различен характер реакции адренокортикальной ткани на добавление специфического стимулятора — синактена, являющегося аналогом адренокортикотропного гормона. Так, незначительный прирост кортизола в среде инкубации обнаруживается на 5-е, а выраженный — на 7, 9 и 12-е сут культи-

вирования. Таким образом, в процессе органотипического культивирования в адренокортикальной ткани сохраняется способность к образованию и секреции кортизола, а также чувствительность к синактену. Последний факт свидетельствует о сохранении в мембране культивируемых клеток соответствующих рецепторов и сопряженных с ними систем для его "узнавания" и связывания. Стимулирующее действие синактена проявляется на 7, 9-е сут культивирования, что, по-видимому, связано со сроками восстановления функциональной организации ткани.

Вторая серия экспериментов была посвящена исследованию способности адренокортикальной ткани новорожденных поросят после ее глубокого охлаждения к росту в органотипической культуре и ее реакции на синактен. Адренокортикальная ткань подвергалась криоконсервации с применением 10%-го димексида. Результаты этих исследований показали, что деконсервированная адренокортикальная ткань новорожденных поросят сохраняет способность продуцировать и секретировать кортизол, что обнаруживается уже на 2-е сут культивирования. Количество кортизола в зависимости от сроков культивирования варьирует от 7,39 до 12,49 нмоль/л. Добавление в среду инкубации синактена (0,2 мкл/мл) повышает выделение кортизола в среду инкубации. Это увеличение, как и в опытах с незамороженной тканью, обнаружено на 5, 7, 9 и 12-е сут. При исследовании влияния криопротекторов на секрецию кортизола установлено, что добавление 1, 5 и 10%-го димексида или 1,2-пропандиола оказывает незначительное влияние на исследуемый процесс и не влияет на чувствительность адренокортикальной ткани к синактену.

Во всех экспериментах под влиянием синактена содержание кортизола увеличивается вдвое. Глубокое охлаждение ткани до -196°C без криопротекторов приводит к снижению количества выделившегося в среду инкубации кортизола с 31,06 нмоль/л до 18,76 нмоль/л. Замораживание с 1%-м димексидом не оказало стабилизирующего влияния на исследуемый процесс. Криозащитный эффект димексида и 1,2-пропандиола обнаруживался только при использовании 5 и 10%-й концентрации, хотя в полном объеме восстановление уровня кортизола не происходило. Реакция адренокортикальной ткани на синактен (100%-я стимуляция) сохранялась при использовании обоих криопротекторов. Изучалось влияние криопротекторов: димексида и 1,2-пропандиола на секрецию кортизола адренокортикальной тканью зрелой свиньи. При инкубации нативная адренокортикальная ткань выделяет в среду инкубации 22,37 нмоль/л кортизола. Добавление 1, 5 и 10%-го димексида и 1,2-пропандиола не влияет на этот процесс. При этом сохраняется стимулирующее влияние (70%) синтетического аналога адренокортикотропного гормона — синактена. Представленные данные позволяют заключить, что инкубация ткани коры надпочечников взрослых свиней с криопротекторами — димексидом и 1,2-пропандиолом не влияет на базальный уровень секреции кортизола и чувствительность к синактену.

Результаты исследований содержания кортизола в среде инкубации незамороженной ткани зрелой свиньи составляют 25,37 нмоль/л. После замораживания ($3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) без использования криопротекторов выделение кортизола в среду инкубации снизилось до 8,42 нмоль/л. Димексид оказывал неодинаковый эффект: добавление 1%-го раствора не приводило к восстановлению нормального уровня секреции кортизола, в то время как при использовании 5 и 10%-го димексида уровень кортизола в среде инкубации не отличался от контроля.

Замораживание адренокортикальной ткани без использования криопротекторов приводило к исчезновению стимулирующего эффекта синактена. Не обнаруживался он и при замораживании с 1%-м димексидом, в то время как при использовании 5 и 10%-х концентраций димексида уровень кортизола в среде инкубации не отличался от контроля. При этом сохранялась чувстви-

тельность к синактену. При исследовании влияния 1,2-пропандиола было установлено, что криозащитное действие этого соединения проявляется при использовании 5%-й концентрации. Этот эффект выражается в сохранении высокого (но на 35% ниже контрольного) уровня выделения кортизола в среду инкубации и чувствительности к синактену. Использование 10%-го 1,2-пропандиола не имеет преимуществ перед использованием 5%-го: он обеспечивает 50%-е сохранение уровня выделения кортизола в среду инкубации при сохранении чувствительности к синактену.

Представленные данные, таким образом, показывают, что эффективными криопротекторами при консервации адренокортикальной ткани новорожденных поросят и зрелых свиней являются димексид и 1,2-пропандиол, используемые в концентрациях 5 и 10%.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Резников А.Г. Методы определения гормонов // Киев: Наук. думка, 1980. – 400 с.
2. Смит О. Биологическое действие замораживания и переохлаждения. – М.: Изд-во иностр. лит., 1963. – 505 с.
3. Чуйко В.А., Карпенко Л.Г., Бондарева И.М. и др. Влияние димексифдиаза на активность аденилатциклазы и секрецию кортизола клетками коры надпочечников // Физико-химические свойства и биологическое действие криопротекторов. – Харьков: Б. и., 1990. – С. 154-157.
4. Dazord A., Morrer A.M., Bertran J., Saez J.M. // Endocrinology. – 1987. – 121, № 2. – P. 746-748.
5. Parkes A.S. // Proc. Roy. Soc. B. – 1955. – 144. – P. 314-328.
6. Ricordi C., Sartiago J.V., Lacy P.E. // Endocrinology. – 1987. – 121, № 2. – P. 746-748.

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

Поступила 30.05.94

В.А.ЧУЙКО, Л.Г.КАРПЕНКО, Е.Г.ІВАНОВА, Н.Ф.ГУБІНА, Е.І.ЛЕГАЧ
КРІОКОНСЕРВУВАННЯ КОРИ НАДНИРКОВИХ ЗАЛОЗ

Інститут проблем криобіології і криомедицини АН України, м. Харків

Представлені дані про вплив заморожування та криопротекторів на зв'язування ³H-дігідреоалпренололу, активність аденілатциклази клітин адренокортикальної тканини та секреції кортизолу в органотипічній культурі. Виявлені відмінності в кріочутливості досліджуваних біохімічних процесів в адренокортикальній тканині, особливості дії на них криопротекторів.

V.A.CHUIKO, L.G.KARPENKO, E.G.IVANOV, N.F.GUBINA, E.I.LEGACH

CRYOPRESERVATION OF ADRENAL CORTEX

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov, Ukraine

The given work presents the data on the action of freezing and cryoprotectants on the binding of ³H-dihydroalprenolol, activity of adenylate cyclase in adrenocortical tissue cells and secretion of cortisol in the organotypical culture. The differences in cryosusceptibility of the studied biochemical processes in the adrenocortical tissue, and the distinguishing features of cryoprotectants upon them are discussed.

КРИОГЕННОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

УДК 57.043: 519.876.2

В.И.Резников, А.С.Снурников

СИНТЕЗ ОПТИМАЛЬНЫХ МОДЕЛЕЙ УСТРОЙСТВ ПРОГРАММНОГО ЗАМОРАЖИВАНИЯ БИООБЪЕКТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭВМ

Разработан простой и эффективный метод структурного и параметрического синтеза, позволяющий конструктору разрабатывать на ЭВМ новые оптимальные модели программного замораживания биобъектов. Предложенный метод может использоваться конструктором для разработки и оптимизации на ЭВМ моделей устройств программного охлаждения биобъектов в ходе машинного эксперимента.

[6], в основу которой положен принцип получения отклика ОУ на ступенчатые управляющие воздействия различной длительности ($K=0,1; 0,2;\dots;1$). Затем на ЭВМ полученные переходные характеристики аппроксимировались степенным рядом на каждом из температурных диапазонов ΔT с помощью метода наименьших квадратов [4]:

$$V_i = \sum_{i=0}^N B_{i1} \cdot t_{\text{шим}}^i, \quad (2)$$

где B_{i1} – коэффициенты модели, составляющие матрицу $B = N \times N$. Выражение (2) представляет собой математическую модель поля скоростей ОУ без учета его инерционных свойств. С учетом интегрирующих свойств камеры замораживания была получена математическая модель поля скоростей ОУ с учетом его инерционных свойств:

$$V(\Delta T_i, t_{\text{шим}}(t)) = V_n \sum_{i=k-n}^k V(\Delta T_i, t_{\text{шим}}(t_i)), \quad (3)$$

где $n = \Delta t / H$; H – временная дискрета; Δt – текущий временной интервал; t_i – дискретные моменты текущего времени. Интегрируя выражение (3) по времени, получаем математическую модель температурного поля ОУ, которая устанавливает функциональную зависимость температуры ОУ от длительности управляющего импульса и теплофизических свойств объекта управления:

$$T(t) = \int_0^t V(\Delta T_i, t_{\text{шим}}(t)) dt + T_0, \quad (4)$$

где T_0 – начальная температура объекта управления.

Анализ современных методов разработки устройств программного охлаждения показывает, что на этапе предварительной разработки часто используется неэффективное и дорогостоящее реальное макетирование устройств программного охлаждения, что не позволяет быстро и качественно проработать множество вариантов разрабатываемого устройства, чтобы отобрать вариант, удовлетворяющий заданным требованиям [2]. То обстоятельство, что численное моделирование на ЭВМ недостаточно используется на этапе предварительной проработки схем моделей УПО, объясняется сложностью внедрения в инженерную практику диалоговых систем схемотехнического проектирования (ССП) (в частности сложностью и ограниченностью применения режима пакетной обработки данных на универсальных и мини-ЭВМ конструкторами-разработчиками). Поэтому большое значение приобретает возможность создания простых, гибких и эффективных методов предварительной проработки вариантов оптимальных схем моделей устройств, которые были бы приемлемы и доступны для конструктора-разработчика [1].

Данная работа является продолжением работы, начатой в [6], где приведено описание разработанной математической модели программного замораживателя биообъектов, рекомендованной для использования ее конструкторами-разработчиками для разработки на ЭВМ новых оптимальных моделей ПЗБ в ходе машинного эксперимента. Однако в данной модели ПЗБ для управления и контроля заданной многоступенчатой программы замораживания-отогрева вместо модели блока дифференцирования была использована специально разработанная модель дифференцирующего устройства, осуществляющего точное измерение скорости процесса программного охлаждения – отогрева с точностью 0,1% в широком температурном ($40 \div -160$ °C) и скоростном ($\pm 0,001 \div \pm 150$) °C/мин диапазонах, реальная модель которого (БЗП5.000.000) используется в ПЗБ серии УОП, разработанных СКТБ с ОП ИПК и К АН Украины. Математическое описание модели дифференцирующего устройства, рисунки основных его звеньев и принцип работы изложены в статье [5].

Целью данной работы явилось разработка и апробация более эффективного, чем существующие, подхода к конструированию программных замораживателей биообъектов с использованием численного моделирования процессов, протекающих в управляющем устройстве и камере замораживания (КЗ), на ЭВМ. В качестве основного критерия оценки приняты простота, гибкость и эффективность разработанных методов синтеза моделей УПО и качество переходных и установившихся процессов в камере замораживания и в контейнерах с биообъектом. Исследования по разработке методов синтеза моделей УПО проводились на ЭВМ СМ-4, где была реализована разработанная ранее [6] математическая модель УПО, адекватно соответствующая реальному ПЗБ.

Адекватность разработанной математической модели ПЗБ позволяет конструктору-разработчику использовать математическую модель ПЗБ для проведения на ЭВМ структурного и параметрического синтеза при разработке новых моделей УПО. Такая возможность обусловлена тем, что описание математической модели УУ было получено в виде последовательной совокупности математических описаний моделей его звеньев, т.е. в простой, точной и наглядной форме, удобной для проведения структурного и параметрического синтеза в ходе машинного эксперимента. Эти преимущества дают возможность конструктору-разработчику производить замену существующих или (и) вставку новых математических описаний моделей звеньев или корректирующих цепей, не требующих существенной корректировки математической модели УУ для дальнейшего проведения структурного синтеза в ходе машинного эксперимента. Таким образом, методика разработки математической модели ПЗБ позволяет конструктору-разработчику проводить структурный синтез моделей УУ, предварительно внося в программу численных расчетов модели уравнений цепей или звеньев, вводимых в структурную схему УУ с целью ее модификации. С клавиатуры ЭВМ организуется при этом ввод в программу синтезируемых параметров этих цепей и звеньев и вывод на дисплей и (или) принтер контролируемых параметров этих звеньев (цепей) в виде графиков и (или) таблиц.

Оптимизация параметрического синтеза осуществляется специально разработанным алгоритмом, в основе которого лежит идея организации управляемого оптимального выхода переходного процесса на заданное программное значение по скорости или температуре за счет максимального открытия клапана исполнительного органа в начальный момент переходного процесса ($t_{\text{шим}} = 1$), на короткий промежуток времени, с последующим уменьшением длительности управляющих импульсов до значения, обеспечивающего апериодический выход управляемого процесса на заданное программное значение. Применение такого алгоритма обусловлено еще и тем, что при малом открытии клапана ($\sim 10 \div 30\%$) в начале процесса стабилизации выход на заданное программное значение затягивается вследствие инерционных свойств КЗ и теплофизических свойств хладагента или вообще, для заданных малых программных скоростей ($< 1^\circ\text{C}/\text{мин}$), не осуществляется, что в целом затягивает поиск оптимальных параметров синтезируемых УУ.

В процессе синтеза для конструктора-разработчика организована печать на дисплее и (или) на принтере, в виде таблиц, входных и выходных параметров всех звеньев УУ, а при необходимости и их внутренних параметров, а также графиков синтезируемых переходных процессов. Была разработана специальная программа анализа переходных процессов, оценивающая качество переходного и установившегося процессов: математическое ожидание, дисперсию, колебательность, время успокоения, что позволяет конструктору-разработчику получить полный анализ синтезируемого процесса. Такая организация проведения синтеза моделей УУ дает конструктору-разработчику полную информацию о синтезируемом устройстве, а при необходимости - при анализе входных и выходных параметров звеньев и цепей - получить и подсказку, ка-

кое звено ухудшает качество синтезируемого процесса, что, в целом, обеспечивает быструю и эффективную разработку синтезируемых структурных схем моделей устройств и их параметров.

Разработанная методика синтеза на ЭВМ УУ была успешно апробирована конструкторами-разработчиками СКТБ с ОП ИПК и К НАН Украины, в результате чего были разработаны новые эффективные модели ПЗБ. Ниже, в качестве примера, приводится результат проведенного синтеза закона управления, обеспечивающего оптимальный выход на заданное значение программной скорости (минимизация времени выхода и перерегулирования). Для этого из приведенной серии законов управления [6] был выбран суммарный закон управления по температуре и скорости:

$$\Delta T_{\Sigma} = A_T (T - T_3) + A_V (\dot{T} - \dot{T}_3), \quad (5)$$

приведенный затем конструктором-разработчиком к синтезируемому виду:

$$\Delta T_{\Sigma} = A_T (T - T_3) \dot{T}_3 / \dot{T} + A_V (\dot{T} - \dot{T}_3) \Delta T_3 / \Delta T, \quad (6)$$

где ΔT , ΔT_3 – текущая и заданная разность температур.

В результате проведенного синтеза на ЭВМ по разработанной выше методике был найден оптимальный закон управления:

$$\Delta T_{\Sigma} = A_T (T - T_3) \dot{T}_3 / \dot{T} + A_V (\dot{T} - \dot{T}_3), \quad (7)$$

который обеспечивает оптимальный выход на заданную программную скорость при обязательном выполнении дополнительного условия: включение программного задатчика температуры в момент появления азота в камере замораживания в начале переходного процесса.

При этом был получен дополнительный положительный эффект, заключающийся в значительном расширении диапазона стабилизации скоростей с одной установки настроечных коэффициентов A_T и A_V синтезированного (7) закона управления (до ± 10) °С/мин. Графики оптимального выхода на заданные программные значения скорости охлаждения биообъектов (сплошная линия) приведены на рис. 2. Пунктирной линией изображены процессы без коррекции закона управления. Оптимальный выход на заданное значение скорости обеспечивается за счет вставки $(\dot{T}_3 / \dot{T})$,

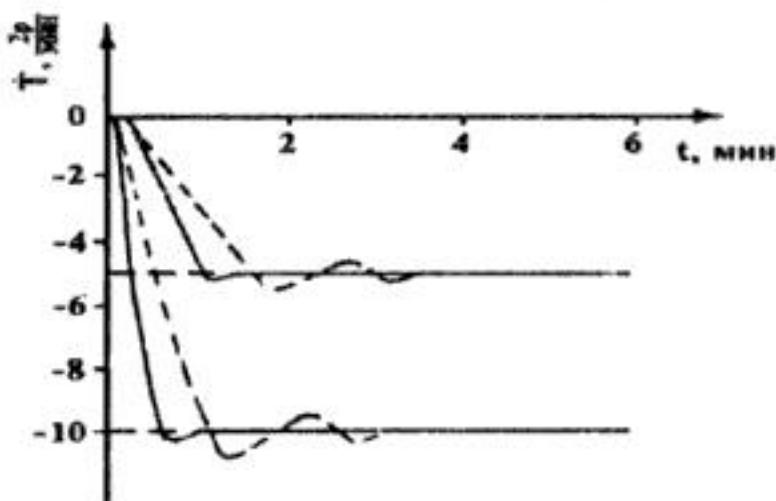


Рис. 2. Графики оптимального выхода на заданные программные скорости охлаждения биообъектов (сплошная линия — оптимальный выход; пунктирная — без коррекции закона управления)

возрастающей до бесконечности в начале переходного процесса, за счет $\dot{T} = 0$, и стремящейся к единице при выходе на заданную скорость стабилизации ($\dot{T} = \dot{T}_3$). Этим множителем и обеспечивается также расширение диапазона скоростей при стабилизации скоростей с одной установки A_T и A_V .

Предложенная математическая модель программного замораживателя и разработанный метод синтеза на ЭВМ оптимальных моделей УПО могут использоваться конструктором-разработчиком для разработки на ЭВМ новых оптимальных моделей программного замораживателя биообъектов в ходе машинного эксперимента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анисимов В.И., Дмитриевич Г.Д., Скобельцин и др. Диалоговые системы схемотехнического проектирования. – М.: Радио и связь, 1988. – 288 с.
2. Ларин А.Г., Томашевский Д.И., Шумков Ю.М. и др. Машинная оптимизация электронных узлов РЭА. – М.: Сов. радио, 1978. – 192 с.
3. Пушкарь Н.С., Белоус А.М., Цуцаева А.А. и др. Низкотемпературное консервирование костного мозга. – Киев: Наук. думка, 1976. – 287 с.
4. Раскин Л.Г. Анализ сложных систем и элементы теории оптимального управления. – М.: Сов. радио, 1976. – 344 с.

5. Резников, Ткаченко С.И. Физико-математическая модель дифференцирующего устройства, измеряющего скорости замораживания и отогрева биоматериалов при консервировании // Криобиология. — 1985. — № 4. — С. .
6. Ткаченко С.И., Хайкин Р.К., Резников В.И. Математическое обеспечение системы автоматического управления процессом замораживания биологических объектов // Криобиология. — 1985. — № 4. — С. 45–50.

Ин-т проблем криобиологии
и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Поступила 24.06.94

В.І.РЕЗНИКОВ, О.С.СНУРНИКОВ

СИНТЕЗ ОПТИМАЛЬНЫХ МОДЕЛЕЙ ПРИСТРОЙ ПРОГРАМНОГО ЗАМОРОЖИВАНИЯ БИОБЪЕКТОВ С ВИКОРИСТАННЯМ ЕОМ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Розроблено простий і ефективний метод структурного і параметричного синтезу, який дозволяє конструктору розробляти на ЕОМ нові оптимальні моделі програмного заморозувача біоб'єктів. Запропонований метод може використовуватися конструктором для розробки і оптимізації на ЕОМ моделей пристроїв програмного охолодження в ході машинного експерименту.

V.I.REZNIKOV, A.S.SNURNIKOV

COMPUTERIZED SYNTHESIS OF THE OPTIMAL MODELS OF THE DEVICES FOR PROGRAMMABLE FREEZING OF BIOSYSTEMS

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov, Ukraine

We have elaborated a simple and effective method of structural and parametric synthesis, which enables a designer to use PC for developing models of programmable freezer of biosystems. The proposed method may be successfully used for computerized development and optimization of the models of the devices for programmable cooling directly in the course of a PC-aided experimentation.

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 616,41:615,361.36.014.413:611.013:577.213.3

**Н.Г.Скоробогатова, Г.С.Лобынцева, И.А.Вотякова,
Ю.Е.Микулинский**

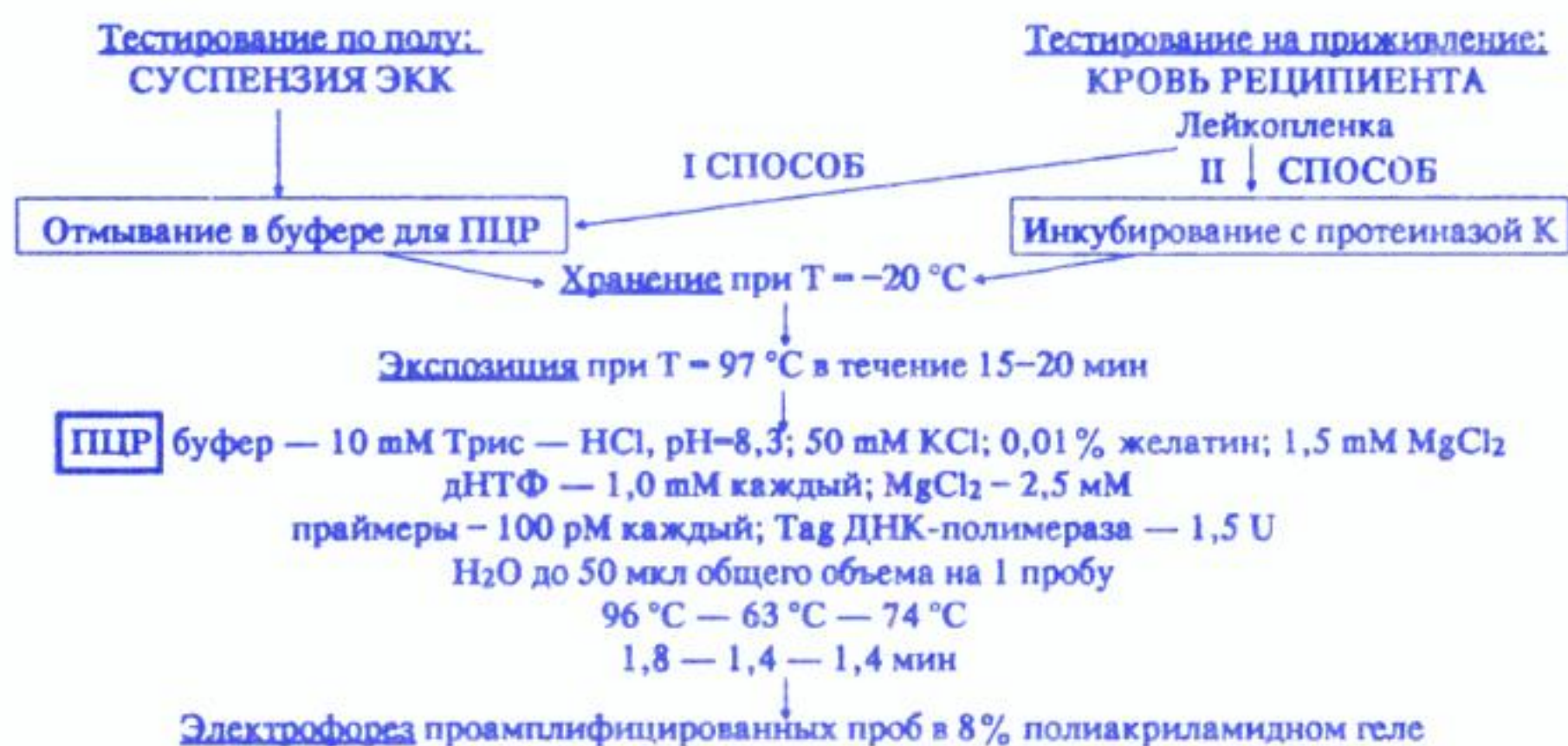
ОЦЕНКА ПРИЖИВЛЕНИЯ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ КРОВЕТВОРНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В ОРГАНИЗМЕ РЕЦИПИЕНТОВ С ПОМОЩЬЮ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Изучение гемопоэтических клеток-предшественников, полученных из эмбриональной печени человека (ЭПЧ), представляет большой интерес в связи с актуальностью проблемы трансплантации кроветворной ткани, поскольку область применения донорского костного мозга (КМ) крайне ограничена из-за редкой частоты совпадения основных трансплантационных антигенов донора и реципиента и опасностью развития вторичной болезни. Стволовые кроветворные клетки ЭПЧ способны к самоподдержанию и дифференцировке. Однако для трансплантации необходимо брать печень на самых ранних этапах эмбриогенеза (6–8 недель развития). Этот период характеризуется наличием толерантности эмбриональных клеток к антигенам хозяина, и кроветворное микроокружение взрослого КМ не угнетает пролиферацию эмбриональных кроветворных клеток (ЭКК). До сих пор не утратил своей актуальности вопрос поиска наиболее чувствительного, точного метода оценки приживления эмбриональных кроветворных клеток. В связи с этим целью нашей работы было исследование возможности применения полимеразной цепной реакции (ПЦР) для оценки приживления донорских ЭКК в организме реципиентов. Для проведения исследования отбирали протестированные по полу с помощью ПЦР мужские образцы ЭКК (6–8 недель гестации) и вводили больным женского пола. Затем на определенные сутки после трансфузии этим же методом определяли их приживление (т.е. наличие в крови реципиентов клеток с донорским — мужским генотипом). При этом использовали два праймера:

5' — АТТАЦАЦТААЦАТТЦЦТТЦЦА — 3'

5' — АГТГАААТТТТАТТТАГТТАГА — 3'

которые фланкируют специфический участок Y-хромосомы [1]. Особенность работы с эмбриональными клетками заключается в том, что от каждого эмбриона в зависимости от возраста получают 1–4 мл суспензии ЭКК, из них на определение пола эмбриона можно использовать 200–400 мкл. Выделение ДНК, необходимой для амплификации, из такого количества клеток достаточно трудоемкий процесс, и в ряде лабораторий отказались от этого этапа. В частности, А.И.Кузьмин и соавт. [2] предложили модификацию метода ПЦР — амплификацию с капли крови, помещенной на фильтр. Мы попытались повторить данный вариант метода с ЭКК, который довольно прост в техническом плане и состоит из следующих этапов (рис.): отмывание эмбриональных клеток в 1 х буфере для ПЦР (в таком виде материал хранится при $T = -20^{\circ}\text{C}$); денатурация ДНК и полная инактивация всех протеолитических ферментов перед амплификацией при $T = 97^{\circ}\text{C}$, экспозиция 15–20 мин; проведение ПЦР на модифицированной амплификационной смеси при экспериментально подобранных температурно-временных параметрах; электрофорез проамплифицированных проб в 8%-м полиакриламидном геле. С помощью модифицированного нами метода ПЦР было протестировано по полу 44 образца криоконсервированных гемопозитивских клеток ЭПЧ (6–11 недель гестации), хранящихся в низкотемпературном банке ИПК и К НАН Украины. По аналогии был также проведен поиск наиболее эффективного способа подготовки образцов крови к ПЦР, минуя стадию выделения ДНК с целью уменьшения объема крови, идущей на анализ, а также экономии времени работы и использования менее токсичных для исследователя реактивов. Были изучены два варианта подготовки крови к ПЦР. В каждом из них работа проводилась не с цельной кровью, а с лейкопленкой: I вариант — такой же, как и с ЭКК — отмывание лейкоцитов в 1 х буфере для ПЦР; II вариант — инкубирование лейкоцитов с протеиназой К. Проведение же самой ПЦР и электрофореза осуществлялось по той же методике, что и с



ПЦР для оценки приживления эмбриональных кроветворных клеток в организме реципиента

ЭКК (рис.). Оценка результатов анализа на приживление ЭКК с помощью ПЦР производилась по электрофореграмме. Появление полос на уровне, соответствующем мужскому положительно-му контролю, в случае ЭКК свидетельствовало о мужском поле данного эмбриона, а в случае крови реципиентов — о наличии в организме женского пола клеток донорского происхождения (с мужским генотипом). В случае женского пола эмбриона-донора и в отсутствие приживления у реципиента таких полос на электрофореграмме не было. В качестве контролей использовали: 1) холостая проба (не содержит ДНК); 2) ДНК лейкоцитов периферической крови доноров мужского пола; 3) ДНК лейкоцитов периферической крови доноров женского пола. С помощью вышеописанного метода нами было зафиксировано наличие донорских клеток в крови онкобольной на 5-е, 19-е сут после трансфузии ЭКК. Таким образом, нами предложена модификация методики ПЦР, которая позволяет работать с микроколичествами эмбриональных кроветворных клеток и на лейкоцитах периферической крови без этапа выделения ДНК. При этом объем крови, необходимой для анализа уменьшен в 5 раз. Предлагаемая модификация ПЦР рекомендуется как высокочувствительный метод определения приживления донорских ЭКК в организме реципиентов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кузьмин А.И., Хальчицкий С.Е., Скрябин Б.В. и др. Простые методы энзиматической амплификации для клинической практики // Молекулярная биология и генетика, микробиология и вирусология. — 1991. — № 8. — С. 6–9.
2. Handyside A.H., Kontogianni E.H., Hardy K et. al. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification // Nature. — 1990. — № 344. — P. 768–770.

Ин-т проблем криобиологии
и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Поступило 18.10.94

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

1 1995

Проводится подписка на журнал "Проблемы криобиологии". С 1985 г. научно-теоретическое издание выходило под названием "Криобиология", с 1991 г. – "Проблемы криобиологии". Издается на русском и английском языках. Объем 5,6 печ. л., периодичность четыре номера в год. В журнале публикуются научные работы по всем аспектам действия охлаждения и замораживания в биологии, медицине и пищевой промышленности, по проблемам гипотермии, низкотемпературному консервированию клеток и тканей, криохирургии, по сублимационному высушиванию, о криопротекторных веществах и их фармакологическом действии. Освещаются вопросы гибернации, зимостойкости растений, конструирования приборов и оборудования для низкотемпературного консервирования биологических объектов и криомедицины.

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

Our Journal PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY is published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the Ukrainian Academy of Sciences in Russian and in English. The journal provides basic information to researchers investigating the various phenomena involved in the interaction between low temperatures and living cells or tissue, as well as to clinicians who are undertaking trials of hypothermia. Particular emphasis is laid upon ongoing research on topics which are of utmost importance with regard to preservation of cells, tissues and organs, cell damage caused by freezing, cold acclimation and hardiness in plants, mechanisms of cold survival in animals and microorganisms. The journal draws from diverse related disciplines such as morphology, physiology, genetic molecular biology, pathology, biochemistry, immunology, pharmacology and pharmaceuticals, low temperature techniques and equipment. A subscription to PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY includes 4 issues a year.

Subscription orders should be addressed to
Editor-in Chief V.I. Grishchenko
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of the Ukraine
23 Pereyaslavskaya Str., 310015 Kharkov, The Ukraine
Tel. (0572) 72-41-43
Fax (0572) 72-00-84

ISSN 0233-7673 ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ. 1995. № 1. 1-56 ИНДЕКС 70474