

ISSN 0233-7673

КРИОБИОЛОГИЯ

3|90



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

В. И. Грищенко (главный редактор), А. М. Белоус (зам. гл. редактора), С. И. Аксенов, Г. А. Бабийчук, М. Е. Бекер, Ю. П. Благой, Л. Вонг, А. Н. Гольцев, К. Дж. Грин, Г. Ф. Жегунов, В. И. Луговой, В. Я. Малеев, Г. Маттес, П. Мнержичка, Е. Я. Панков, Ф. А. Приходько (отв. секретарь), Н. С. Пушкар, Б. П. Сандомирский, А. С. Снурников, А. А. Цуцаева, С. А. Шалимов, Т. Н. Юрченко, Э. З. Эмирбеков

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

А. Д. Бугров (Харьков), В. Я. Волков (Оболensk, Моск. обл.), В. М. Гордиенко (Киев), В. Н. Запорожан (Одесса), П. А. Калиман (Харьков), С. С. Лаврик (Киев), В. В. Лемешко (Харьков), В. Д. Мануильский (Киев), В. А. Моисеев (Харьков), А. С. Попов (Москва), Н. Г. Соломонов (Якутск), Ю. С. Суханов (Москва), В. В. Шенталь (Москва), М. И. Шраго (Харьков)

EDITORIAL BOARD

V. I. Grishchenko (Editor-in-Chief), A. M. Belous (Associated Editor), S. I. Aksenov, G. A. Babiychuk, M. E. Beker, Yu. P. Blagoj, L. Wang, A. N. Goltsev, C. J. Green, G. F. Zhegunov, V. I. Lugovoj, V. Ya. Maleyev, G. Matthes, P. Mërička, E. Ya. Pankov, F. A. Prikhodko, N. S. Pushkar, B. P. Sandomirsky, A. S. Snurnikov, A. A. Tsutsayeva, S. A. Shalimov, T. N. Yurchenko, E. Z. Emirbekov

EDITORIAL COUNCIL

A. D. Bugrov (Kharkov), V. Ya. Volkov (Obolensk, Moscow Region), V. M. Gordiyenko (Kiev), V. N. Zaporozhan (Odessa), P. A. Kaliman (Kharkov), S. S. Lavrik (Kiev), V. V. Lemeshko (Kharkov), V. D. Manuilsky (Kiev), V. A. Moiseyev (Kharkov), A. S. Popov (Moscow), N. G. Solomonov (Yakutsk), Yu. S. Sukhanov (Moscow), V. V. Shental (Moscow), M. I. Shrago (Kharkov)

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ОТДЕЛЕНИЕ ФИЗИОЛОГИИ

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ
И ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

КРИОБИОЛОГИЯ

3 1990

ВСЕСОЮЗНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ОСНОВАН В ЯНВАРЕ 1985 ГОДА

ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

КИЕВ НАУКОВА ДУМКА 1990

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

- Белоус А. М. Роль белков цитоскелета в холодовой стабильности клеток
- Калинина Л. В. Современное состояние проблемы криоконсервации низших эукариотных организмов (одноклеточные водоросли и простейшие) 12
- Мак-Генн Л. Е., Янг Х., Вальтерсон М. Л. Участки криповреждения в клетках млекопитающих 18
- Воротилин А. М., Зинченко А. В., Моисеев В. А., Подопризгора Л. П. Механизм повреждения эритроцитов при размораживании 23
- Ткаченко С. И., Юрченко Т. Н., Козлова В. Ф. Динамика морфологических и функциональных характеристик сердца при общей гипотермии 27
- Яковцова А. Ф., Питенько Н. Н., Васюта В. С., Марковский В. Д., Невзоров В. В. Компенсаторно-приспособительные процессы в миокарде при инфаркте в условиях краниocereбральной гипотермии (экспериментальное исследование) 32
- Громченко И. А., Кукушкин А. И., Сергеев Б. М., Сергеев Г. Б., Лоевский М. М., Константинова Н. Р. Кинетика гидролиза п-нитрофенилацетата в замороженных водных растворах, содержащих криозащитные добавки 37
- Линник Т. П., Новиков А. Н., Рындин В. Ф., Хайкин Р. К., Терещенко А. В. Прогнозирование эффективных криопротекторов методом КССА при криоконсервировании спермы петуха. 41
- Морозова Т. Ф., Марковский А. Л., Нардид О. А. Влияние температуры на конформационное состояние миозина 46

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

- Кругликов В. Д., Кадетов В. В., Богданова Т. Ф., Терентьев А. Н. Влияние различных способов длительного хранения на жизнедеятельность лактобацилл и их антагонистическую активность 49

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- Липина О. В., Морозова Т. Ф., Пустовойт П. А. Влияние ПЭО-1500 на вязкостные и спектроскопические характеристики плазмы крови при температурах $0 \div 40^\circ\text{C}$ 53

ХРОНИКА

ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИЙ

© Издательство «Наукова думка», «Криобиология», 1990

This One



18HH-YU8-PB4Q

Матеріал, захищений авторським правом

CONTENTS

THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

<i>Belous A. M.</i> The role of cytoskeleton proteins in the cell stability to cold	3
<i>Kalinina L. V.</i> The current state of the problem of cryopreservation of lower eucaryotic organisms (unicellular algae and Protozoa)	12
<i>McGann Locksley E., Yang Hongyou, Walterson Michele L.</i> Sites of freezing injury in mammalian cells	18
<i>Vorotilin A. M., Zinchenko A. V., Moiseyev V. A., Podoprygora L. P.</i> A mechanism of erythrocyte damage upon thawing	23
<i>Tkachenko S. I., Yurchenko T. N., Kozlova V. F.</i> The dynamics of morphological and functional parameters of the heart upon total hypothermia	27
<i>Yakovtsova A. F., Pitenko N. N., Vasuta V. S., Markovsky V. D., Nevzorov V. V.</i> Compensatory and adaptive processes in myocardium with infarction under conditions of craniocerebral hypothermia (experimental study)	32
<i>Gromchenko I. A., Kukushkin A. I., Sergeyev B. M., Sergeyev G. B., Loyevsky M. M., Konstantinova N. R.</i> The hydrolysis kinetics of <i>p</i> -nitrophenyl acetate in frozen aqueous solutions containing cryoprotective additives	37
<i>Linnik T. P., Novikov A. N., Ryndin V. F., Khaykin R. K., Tereshchenko A. V.</i> Prediction of effective cryoprotectants by the QSAR method during cryopreservation of cock sperm	41
<i>Morozova T. F., Markovsky A. L., Nardid O. A.</i> The effect of temperature on the conformational state of myosin	46

CRYOPRESERVATION OF BIOLOGICAL SYSTEMS

<i>Kruglikov V. D., Kadetov V. V., Bogdanova T. F., Terentyev A. N.</i> The effect of different methods of long-term storage on the viability and antagonistic activity to lactobacilli	49
---	----

SHORT COMMUNICATIONS

<i>Lipina O. V., Morozova T. F., Pustovoyt P. A.</i> The effect of PEO-1500 on viscous and spectral parameters of blood plasma at temperatures from 0 to 40 °C	53
--	----

CHRONICLE

DEFENSE OF THESES

Адрес редакции:
310015, Харьков, 15,
ул. Переяславская, 23,
тел. 72-10-39
Научный редактор А. М. Белоус
Редактор З. В. Линевич
Технический редактор В. Н. Волкова

Сдано в набор 17.04.90. Подп. в печать 28.06.90. БЦ №15854. Формат 70×108^{1/16}. Бум. тип. № 1. Выс. печ. Усл. печ. л. 4,9. Усл. кр. отт. 5,6. Уч. изд. л. 5,46. Тираж 1000 экз. Зак. №53. Цена 65 к. Отпечатано с матриц Харьковской книжной фабрики им. М. В. Фрунзе в Харьковской типографии № 16. 310003, Харьков 3, ул. Университетская, 17. Зак. 890.

А. М. Белоус

РОЛЬ БЕЛКОВ ЦИТОСКЕЛЕТА В ХОЛОДОВОЙ СТАБИЛЬНОСТИ КЛЕТОК

Статья носит обзорно-теоретический характер и обращает внимание на необходимость более углубленного изучения свойств и механизмов регуляции структурно-метаболического состояния белков цитоскелета в условиях охлаждения и замораживания — отогрева. В рамках данной статьи белки цитоскелета рассматриваются как центральный механизм, обеспечивающий стабильность (или нестабильность) клеток при их консервировании, поскольку от их состояния и свойств зависят также важнейшие параметры клеток: форма, барьерные и структурные свойства плазматических и цитоплазматических мембран, транспорт ионов и метаболитов, энергообеспечение и синтетические процессы.

В естественных условиях обитания многие организмы в процессе эволюции приобрели способность к переживанию в условиях воздействия околонулевых и отрицательных температур [6]. Механизмы холодоустойчивости у разных животных существенно отличаются и зависят от многих причин: уровня развития и организованности структур, степени дифференцировки организма и т. д. У низших беспозвоночных и некоторых форм микроорганизмов, переносящих воздействие отрицательных температур, когда жидкая фаза клеток кристаллизуется в лед, механизм устойчивости связан с частичной дегидратацией тканей и накоплением в них биологических антифризов (сахаров, многоатомных спиртов, низкомолекулярных белков и т. д.), которые сильно снижают криоскопическую точку жидкой части. Клетки и ткани более высокоорганизованных позвоночных животных (пойкилотермные и зимнеящие) могут переживать только при температурах, близких к 0 °С, когда они впадают в состояние зимнего оцепенения или гибернации, но они плохо переносят воздействие отрицательных температур. Механизмы криоустойчивости у таких животных очень сложны и включают процессы на нейрогуморальном и структурно-метаболическом уровне [10, 11, 31], что позволяет снижать температуру их тела до околонулевых температур. Изолированные клетки и ткани гомойотермных организмов, в том числе и человека, утратили в процессе эволюции способность переносить воздействие отрицательных температур и при замораживании быстро разрушаются.

Таким образом, в природных условиях существует ряд организмов, которые располагают определенными механизмами, обеспечивающими их устойчивость при отрицательных и околонулевых температурах.

Однако в специальных условиях при использовании эффективных криопротекторов и сбалансированных защитных веществ можно искусственным путем индуцировать устойчивость клеток гомойотермных животных к воздействию отрицательных температур вплоть до —196 °С. Такой искусственный способ повышения устойчивости неприспособленных клеток к низкотемпературному воздействию широко используется в практике криоконсервации клеток и тканей. Так же как и в случае замораживания клеток беспозвоночных животных, хорошо переносящих действие отрицательных температур, низкотемпературное консервирование клеток теплокровных животных может быть успешно реализовано только в том случае, если они будут предварительно адаптированы к этому процессу. В частности, фактором, приводящим к адаптации таких клеток или организмов, может быть их частичная дегидратация либо накопление эндогенных антифризов [12],

которые перед вхождением биообъекта в анабиоз устраняют повреждающее действие «эффектов раствора» [25] и кристаллов льда. Частичная дегидратация клеток может быть достигнута либо путем медленного замораживания, когда в силу роста внешнего кристалла свободная вода вымораживается в лед, либо в результате использования непроникающих экзогенных криопротекторов, которые вызывают частичную элиминацию воды и некоторых ионов из клетки по осмотическому градиенту. Как в том, так и в другом случае реакция клетки в процессе дегидратации сопровождается двумя явными процессами: это, во-первых, изменение формы и объема клеток и, во-вторых, перераспределение ионов по обе стороны мембран. Если исключить другие альтернативные пути перестройки, то указанное выше можно рассматривать как первичные, пусковые механизмы, ведущие к перестройке мембранных структур и белков цитоплазмы, прежде всего цитоскелета и регуляторных белков, которые в своей совокупности изменяют устойчивость клеток к воздействию экстремальных факторов, в том числе и низких температур.

Развитие процессов дегидратации в клетках возникает не только на этапе эквilibрации с осмотическими веществами, но, особенно, при формировании фронта кристаллизации, когда клетки отодвигаются в жидкие микрофазы, содержащие высокогипертонические и осмотически активные среды. При контакте клеток с такой средой проходят два очень быстрых микроскопических процесса: сжатие клеток, локальная деформация плазматической мембраны, при которой часть мембраны может везикулироваться и отшнуровываться в виде микрофрагментов. Естественно, что в этих случаях эффективная площадь плазматической мембраны может уменьшаться. Результатом сжатия эритроцита человека является выход из нее молекул свободной H_2O (процесс дегидратации), а также K^+ , Cl^- и H^+ . При этом в клетку входит Na^+ , OH^- , HCO_3^- (процессы ко- и противотранспорта). В результате этих процессов вне и внутри клетки может несколько измениться величина pH [3]. Изменение уровня гидратации, pH и ионного гомеостаза оказывает сильное влияние на барьерные, функциональные свойства плазматической мембраны [4] и на структурное состояние белков цитоскелета, которые ответственны за пространственную организацию клетки, внутриклеточных органелл и ядра.

Белки цитоскелета, образуя сложную сеть волокон, определяют форму клеток, их адгезивную способность, передвижение и транспорт различных субстанций [14]. В клетках эукариотов цитоскелет представлен тремя основными видами филаментов, состоящих из глобулярных белковых субъединиц: актиновые филаменты (или микрофиламенты), микротрубочки и промежуточные филаменты, состоящие из фибриллярных белковых субъединиц. Кроме основных структурных компонентов цитоскелета, в цитозоле содержится множество различных низкомолекулярных вспомогательных белков (таблица), которые регулируют агрегатное, пространственное и конформационное состояния цитоскелета. Они формируют множественные связи друг с другом, внутриклеточными структурами и плазматической мембраной, влияют на скорость и степень полимеризации глобулярных и фибриллярных нитей белка. Входящие в состав цитоскелета актин, тубулин и фибриллярные белки по своей природе отличаются кислотностью и способностью форсировать спиральные структуры — полярные филаменты, функция и структура которых регулируется в основном АТФ, цАМФ, Ca^{2+} , цГМФ. Под влиянием различных внешних сигналов, поступающих через соответствующие рецепторы мембран в цитоплазму, актиновые филаменты и микротрубочки постоянно образуются из растворимого актина и тубулина и разрушаются под действием внутриклеточных протеаз. Образование актиновых филаментов и микротрубочек происходит в результате полимеризации G-мономеров, а разрушение — под влиянием деполимеризующих факторов. Актиновые глобулярные белки с молекулярной массой 42 кДа, состоящие из мономеров G-актина, имеют участки для связывания нуклео-

Природа белка	Характер действия на актин
Немышечный миозин (немышечная АТФаза)	При взаимодействии с актином индуцирует движение
Немышечный тропомиозин	Палочковидный белок, расположенный латерально вдоль актиновых филаментов
Филамин, α -актинин	Образует гибкие связи между актиновыми филаментами, в результате чего создается трехмерная сетчатая структура
Фимбрин	Сшивает отдельные активные филаменты в параллельные пучки
Профилин	Присоединен к активным мономерам; препятствует полимеризации актина
Виллин, гельзолин	Вызывают Ca^{2+} -зависимую фрагментацию актиновых филаментов, обеспечивают также нуклеацию при их сборке
Кэпирующие белки	Присоединяются к тому или иному концу актиновых филаментов; предотвращают добавление или отщепление актиновых мономеров
Спектрин	Образует связи с белками полосы 4.1, 4.9, анкирином и актином

тидов (АТФ, цАМФ, цГМФ) и бивалентных катионов (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} и др.). В результате полимеризации G-мономеров формируется F-актин, который представляет собой полимеризованный микрофиламент [17]). Микротрубочки, сконструированные из молекул тубулина, имеют α - и β - димерную структуру с молекулярной массой ~ 55 кДа и содержат связанный ГТФ или ГДФ [20]. Тубулин представляет собой сильно заряженный белок, полимеризация которого происходит по аналогичным закономерностям, характерным для актиновых мономеров.

Полимеризация цитоскелетных белков происходит в три стадии [27] (рис. 1). На первой стадии, лаг-фазе (или фазе нуклеации), происходит соединение 2—3 мономеров, т. е. формирование ди- или тримеров актина, которые являются матрицами для сборки полимера. На второй стадии — элонгации, происходит наращивание цепи тримера при участии

ионов Ca^{2+} и легких цепей меромиозина, АТФ и таких вспомогательных белков, как профилин, виллин, филамин, фибрин, винкулин и фрагмин, которые являются Ca^{2+} -чувствительными белками. На третьей стадии под влиянием фрагмина происходит фрагментация и соединение цепей друг с другом. В эритроцитах полимеризация актиновых филаментов происходит при участии спектрина, который является Ca^{2+} -нечувствительным белком. Полимеризация тубулина происходит под действием так называемых τ - и MAP-белков с молекулярной массой от 350 до 55 кДа под влиянием нуклеозиддифосфаткиназы и тубулин- α -тирозинлигазы. Существенное значение для состояния и функционирования актина и тубулина играют цАМФ-зависимые и цАМФ-независимые протеинкиназы, которые регулируют ковалентное фосфорилирование этих цитоскелетных белков [18].

На скорость процессов полимеризации актина и тубулина существенное влияние оказывают температура, внутриклеточная концентрация



Рис. 1. Принципиальная схема фаз полимеризации белков цитоскелета и факторы, влияющие на процесс сборки мономеров актина и тубулина

нуклеотидов, ионы Ca^{2+} , pH , ионная сила среды, комплексоны типа ЭДТА, ЭГТА и вспомогательные белки типа профилина, спектрина и гельзолина.

Таким образом, физико-химические факторы, оказывающие на клетку воздействие в процессе ее охлаждения или замораживания, например «эффекты раствора», могут проецировать свое действие не только на структурно-функциональные свойства плазматических мембран в аспекте формирования в них трансмембранных дефектов [3], но и на белки цитоскелета, изменяя их агрегатное состояние, интенсивность фокальных ассоциаций с мембраной и уровень фосфорилирования. Температура, ионы и особенно Ca^{2+} оказывают существенное влияние на состояние и функцию цитоскелетных белков. Пониженные температуры ($0 \div 4^\circ\text{C}$), нарушение ионного гомеостаза и высокая концентрация Ca^{2+} в клетке, а также некоторые биохимически активные препараты типа колхицина, винбластина, винкристина, цитохалазина вызывают деполимеризацию актиновых филаментов и микротрубочек. При повышении температуры до 37°C , удалении Ca^{2+} микротрубочки и филаменты очень быстро образуются вновь. На самосборку микротрубочек сильное действие оказывают MAP-белки [22] (microtubular associated proteins с молекулярной массой от 300 до 60 кДа) и ГТФ, молекулы которых могут присоединяться к димеру обратимо (легко диссоциирующая связь с ГТФ) либо необратимо (ковалентная связь с ГТФ). Последняя не участвует в полимеризации тубулина и ее функциональная роль не выяснена. Существенную роль в полимеризации актина играет регуляторный белок кальмодулин и целый ряд вспомогательных белков. Процессы самосборки актиновых филаментов и микротрубочек возможны потому, что они легко обмениваются с определенной долей молекул цитоплазматического пула актина и тубулина, находящихся в растворенном состоянии. Ассоциированные с актиновыми филаментами и микротрубочками вспомогательные белки, повышающие их устойчивость к охлаждению, содержатся, например, в тканях мозга крыс и *in vitro* повышают холодостойкость микротрубочек мозга быка [7]. В отличие от актиновых филаментов микротрубочки не формируют в клетке гель [14]. Процессы деполимеризации и полимеризации актина в клетках играют очень важную роль. В одних случаях процесс полимеризации актина может носить временный характер, в других — очень быстрый, взрывной. Например, мгновенное формирование акросомального отростка спермия для прободения оболочки яйцеклетки либо образование контрактильных нитей тромбоцитами для сжатия кровяного сгустка. Способность формировать такие локальные деформации поверхностной мембраны присуща клеткам различных животных и растений под влиянием разнообразных воздействий (температура, осмотически активные вещества, гормоны). Сформированные на поверхности мембраны локальные деформации в виде выпячиваний или спикул в своей сердцевине всегда содержат актиновые филаменты. Их способность удлиняться или укорачиваться основана на полимеризации и деполимеризации микротрубочек и актина, которые посредством вспомогательных белков формируют многочисленные точечные контакты с компонентами внутренней поверхности плазматической мембраны. Связь актина в мембранах эритроцитов осуществляется с помощью спектрина через специальный якорный белок анкирин либо посредством ионных связей [29] с заряженными молекулами липидов путем формирования Ca^{2+} -мостиков. Под влиянием деполимеризующих цитоскелетные белки веществ (колхицин, цитохалазины, антимиотические препараты) или факторов внешней среды (ионная сила, pH , концентрация Ca^{2+}), влияющих на характер связи или агрегатное состояние белков цитоскелета, латеральная подвижность белков и липидов мембраны очень сильно повышается, что может привести к распаду клетки. В присутствии других соединений, например таксола либо фаллоидиновых препаратов, структура белков цитоскелета, наоборот, стабилизируется [32], в результате чего клетка приобретает устойчивое состояние.

Экзогенные лиганды, к числу которых могут быть отнесены осмотически активные криопротекторы (например, ПВП, ПЭГ), гормональные препараты, антигены, растворы химических соединений и солей при обычных физиологических температурах вызывают перераспределение дисперсно расположенных мембранных белков и рецепторов, формируя агрегированные домены или локальные выпячивания мембраны. Такое перераспределение белков и рецепторов в мембране, отображающих реакцию белков цитоскелета, очень сильно влияет на ее барьерные свойства и функцию клетки в целом, поскольку при этом клетка теряет свою исходную форму, симметричность мембраны и устойчивость. Однако, если производить обработку клеток указанными выше экзогенными веществами при температуре $0 \div 4^\circ\text{C}$, то равномерность распределения белков в мембране сохраняется, а локальные деформации практически не образуются, т. е. в таких температурных условиях стабильность мембраны сохраняется. Вместе с тем повышение температуры до 37°C вызывает агрегацию мембранных белков, мембрана начинает изгибаться, формируются спиккулы. Подобного рода доменобразование и деформации мембраны клеток происходят в присутствии ингибиторов энергетического обмена (ДНФ, антимицин А и др.), синтеза белков (пурамицин, актиномицин Д), поскольку в присутствии этих соединений нарушается процесс фосфорилирования и обновления цитоскелетных белков. В результате блокирования процессов фосфорилирования прочность локальных связей белков цитоскелета с мембраной заметно ослабевает. Сейчас известно, что образование агрегированных доменов и выпячиваний на мембране сопровождается концентрацией в этих местах таких фосфорилированных белков цитоскелета, как, например, актинин [14], т. е. когда на поверхности мембраны генерируется и движется локальная волна деформации, в зону образования спиккул втягиваются белки цитоскелета, которые за счет своего сокращения или расслабления реализуют динамику поверхностной мембраны.

Белки мембраны реагируют по-разному на процесс локальной деформации: трансмембранные и якорные белки обычно удерживаются в местах своей локализации, а периферические вместе с деформационной волной перемещаются в зону скопления энергизированных микрофиламентов, где образуют с ними временные связи. Такая внутримембранная транслокация белков, контролируемая сократительными микрофиламентами цитоскелета, может происходить при условии их постоянного фосфорилирования молекулами АТФ и способности фосфолипидов перемещаться в плоскости бислоя. Поэтому поддержание нормального пула макроэргов в клетке является важным условием функционирования белков цитоскелета.

Транслокация и сегрегация компонентов мембраны, особенно белков, под влиянием низкой (либо высокой) температуры и осмотических воздействий оказывает существенное влияние на сродство поверхностных рецепторов к различным лигандам, изменяет функциональную активность ионтранспортирующих систем, адгезивные, метаболические и динамические свойства клеток. Это означает, что характер внешнего сигнала с рецепторами плазматической мембраны очень сильно влияет на внутреннюю организацию и функциональное состояние мембранных структур и цитоскелетных белков клетки.

Правда, до настоящего времени очень мало известно о механизмах, которые лежат в основе включения цитоскелетных белков в биохимическую и структурную динамику клетки при внешних температурно-осмотических воздействиях. Здесь может быть рассмотрено несколько альтернативных путей. Во-первых, таким механизмом может явиться система внутриклеточной сигнализации (аденилатциклаза, инозитфосфатный цикл, Ca^{2+} и другие вторичные мессенджеры). Если принять во внимание поступление соответствующего сигнала через аденилатциклазную систему (рис. 2), можно ожидать появление в клетках вторичных «растворимых» внутриклеточных сигналов (цАМФ, цГМФ, Ca^{2+}), которые оказывают влияние на

состояние белков цитоскелета различными путями: активированием процессов ковалентного фосфорилирования, изменением полимерного состояния и некоторыми другими [18]. В результате ковалентной модификации белков цитоскелета последние изменяют свое агрегатное и конформационное состояние, что влияет на изгибные и эластические свойства плазматической

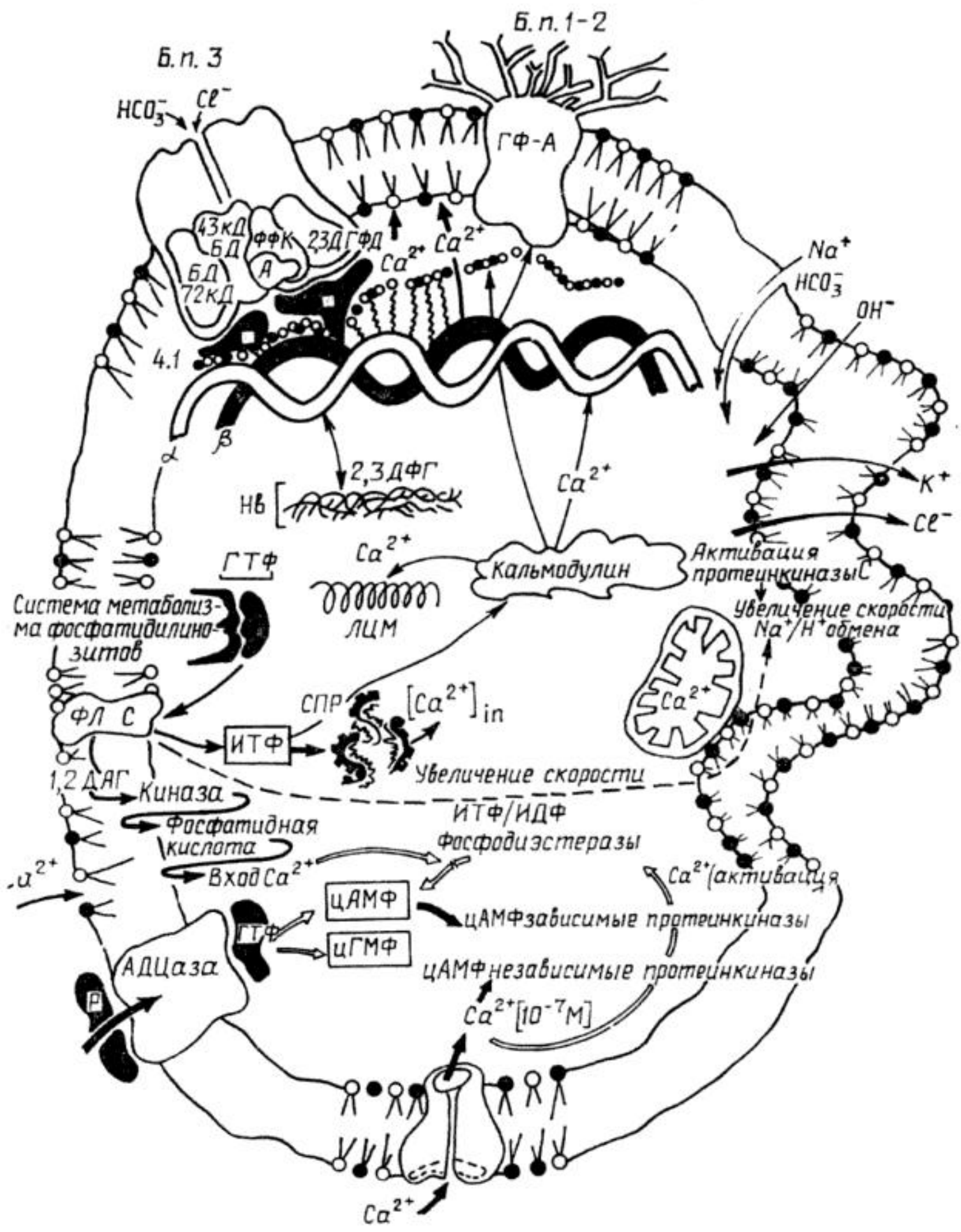


Рис. 2. Альтернативные пути инициации механизмов регуляции структурно-функционального состояния белков цитоскелета при температурно-осмотических воздействиях. Объяснения в тексте

мембраны и функцию встроенных в нее ферментных и транспортных систем. Поскольку микрофиламенты и микротрубочки практически пронизывают всю клетку, образуя точечные контакты с внешней мембраной, мембранами ядра, внутриклеточных органелл и хроматином, внешнее воздействие (температура, гипертонические среды), способствуя локальной деформации мембраны, вызывает прямую механохимическую реакцию белков цитоскелета, которые изменяют структурное и пространственное состояние указанных выше мембран и, следовательно, их функцию. Сейчас не ясно, может ли в действительности реализоваться такой механизм включения белков

цитоскелета в структурно-метаболическую динамику клетки путем реализации прямого сигнала, полученного непосредственно с поверхностной мембраны, однако не исключено, что такой механизм может существовать (рис. 2). Известно, что мембранные структуры клеток являются весьма чувствительными к температурному и осмотическому воздействию [1,2], и любая внешняя деформация мембраны изменяет свойства связанного с ней белкового цитоскелета, который формирует прямые связи с хроматином клетки. Это делает возможным участие цитоскелета в формировании ответа генома клетки на экзогенные воздействия [26], поскольку между генетическим аппаратом и цитоскелетом существует двойная обратная связь, т. е. цитоскелет, с одной стороны, поставляет «растворимые» и механохимические сигналы в ядро клетки, а с другой — синтез белков цитоскелета регулируется геномом.

Имеются сведения о том, что при стрессовых температурных воздействиях структурная реорганизация цитоскелетной сети сопровождается переходом цитоскелетного белка с молекулярной массой 45 кДа из микросом в ядро [21, 30] и его одновременным фосфорилированием. При этом происходит агрегация около ядра актиновых и других филаментов, которые формируют так называемые виментиновые структуры [15]. Однако до сих пор остается не выясненным вопрос, принимают ли эти структуры участие в изменении экспрессии генов при изменении внешней температуры. Не исключено, что температурно-осмотическое воздействие, опосредованное через актиновые филаменты, может оказывать влияние на электронно-транспортную цепь и мембраны митохондрий [23], и в результате перестройки липид-белковых комплексов митохондриальных мембран появляется белок, несущий информацию о необходимости изменения экспрессии ядерных генов [16, 26]. Эти предположения основаны на результатах работ, в которых сообщается о появлении термолабильных факторов, образующихся *in vitro* в цитоплазме и митохондриях дрозофилы в ответ на температурное воздействие [19, 28].

Кроме сигнальных систем, регулирующих образование циклических нуклеотидов, существуют кальций-мобилизующие рецепторы, эффекты которых опосредуются через гидролиз фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата. Этот так называемый полифосфатидилинозитный цикл активизируется при осмотических деформациях клеток [9]. Установление фосфатидилинозитного цикла в процессе метаболизма липидов при осмотической деформации эритроцитов является весьма важным для объяснения возможных механизмов модификации белков цитоскелета. В результате распада фосфатидил-4,5-дифосфата образуется инозитол-1,4,5-трифосфат и 1,2-диацилглицерин, которые являются вторичными мессенджерами [5]. При этом липофильный 1,2-диацилглицерин локализуется в мембране (рис. 2), а водорастворимый низкомолекулярный инозитол-трифосфат поступает в цитозоль, где связывается с рецепторами эндоплазматического ретикулума, вызывая высвобождение Ca^{2+} из мембраны. Мембранновстроенный 1,2-диацилглицерин активирует протеинкиназу и фосфолипазу, под влиянием которой в клетке образуются биологически активные вещества. Под действием специфической киназы 1,2-диацилглицерин превращается в фосфатидную кислоту, которая обладает Ca^{2+} -ионоформными свойствами, т. е. способна индуцировать поступление экзогенного Ca^{2+} в клетку. Таким образом, при деформации клеток создаются условия для повышения концентрации $[\text{Ca}^{2+}]_{in}$, что немедленно отражается на состоянии белков цитоскелета. Как известно, концентрация ионизированного Ca^{2+} внутри клетки достаточно постоянна и поддерживается на уровне ниже 10^{-7} М за счет активного функционирования Ca^{2+} АТФазы эндоплазматического ретикулума и Ca^{2+} -связывающих белков, которые являются быстрыми и эффективными буферами Ca^{2+} [24]. Последние отвечают за эффект повышения концентрации внутриклеточного Ca^{2+} при изменении *pH* цитоплазмы, поскольку Ca^{2+} и H^{+} конкурируют за общие места связывания в цитоплазме [8]. При увеличении концентрации

выше 10^{-7} М очень сильно изменяется структурное и агрегатное состояние вспомогательных белков и белков цитоскелета, которые из состояния геля переходят в состояние золя. Такое снижение вязкости геля, при повышении концентрации $[Ca^{2+}]_{in}$, происходит благодаря активации действия актинфрагментирующих белков типа виллина и гелъзолина, которые локализованы почти во всех клетках позвоночных. Повышение $[Ca^{2+}]_{in}$ приводит также к активации молекул миозиноподобных белков, которые обеспечивают сохранение вязкоэластических свойств клетки. В результате функционирования тонкосбалансированной системы депонирования и мобилизации Ca^{2+} цитоскелетная сеть способна обратимо изменить свои механохимические свойства в зависимости от концентрации ионизированного $[Ca^{2+}]_{in}$ и участия в этих процессах актинфрагментирующих белков. Процессы депонирования и мобилизации Ca^{2+} , которые регулируются Ca^{2+} -депонирующим белком кальмодулином, сопровождаются повышением либо, наоборот, понижением вязкости цитоплазмы, что влияет на стабилизацию или дестабилизацию клетки в целом. Система кальмодулин — ионизированный $[Ca^{2+}]_{in}$ регулирует свойства фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов, аденилатциклазы, мембранной АТФазы, киназы, фосфорилазы, легких цепей миозина, т. е. ферментный комплекс, контролирующий состояние белков цитоскелета. Некоторое количество кальмодулина связано с микрофиламентами актина, т. е. этот белок способен регулировать также активность трехмерной сети цитоскелета.

Из представленных выше данных следует, что температурно-осмотическое воздействие электролитными или неэлектролитными (экзогенными криопротекторами) средами способно вызывать каскад структурно-функциональных изменений на уровне мембрановстроенных сигнальных систем (фосфоинозитидный цикл, аденилатциклаза), которые формируют внутриклеточные растворимые сигналы (цАМФ, цГМФ, Ca^{2+} , 1,4,5-трифосфоинозиты), оказывающие модифицирующее влияние на состояние и свойства белков цитоскелета, контролирующие форму, объем и динамику клетки в целом. Однако при этом нельзя исключить и чисто физико-химический аспект этой проблемы, при котором ведущими механизмами в стабилизации или дестабилизации белков цитоскелета играют процессы частичной дегидратации клеток и прямого действия температуры. Очевидно, в оптимальных режимах действия экзогенных факторов могут возникнуть условия, при которых белки цитоскелета приобретают способность стабилизировать мембраны и биоструктуры клеток при охлаждении и даже замораживании. Такая способность белков цитоскелета может возникнуть в случае сохранения в цитоплазме клеток метаболического механизма, регулирующего соотношение мономерных и полимерных форм актиновых белков, степени их фосфорилирования и ассоциативных связей со вспомогательными белками и мембраной. Эта возможность значительно повышается в связи с тем, что микротрубочки и актиновые мономеры под влиянием оптимальных (регулируемых) температурных воздействий могут, очевидно, сохранять свое мономерное состояние и тем самым повышать устойчивость клеток к механическим деформациям. В опытах на растительных объектах было отмечено, что морозостойкие клетки отличаются высокой динамичной подвижностью и способностью к структурным перестройкам. На первых этапах внеклеточного кристаллообразования происходит структурная адаптация клеток, что выражается в изменении формы протопласта, формируются скопления цитоплазматического ретикулума у внутренней поверхности мембраны, наблюдается транслокация митохондрий в цитоплазме. При этом происходит разжижение геля цитоплазматического матрикса за счет частичной дезагрегации надмолекулярных белковых структур [7, 13], в результате чего клетки приобретают повышенную устойчивость к холоду.

В этой связи представляется, что трехмерные сети цитоскелетных белков можно рассматривать как центральный механизм, обеспечивающий стабильность или нестабильность клеток при их охлаждении и заморажива-

нии, поскольку от их состояния и свойств зависят такие важнейшие параметры клеток, как форма, барьерные и структурные свойства плазматических и внутренних мембран, транспорт ионов и метаболитов, энергообеспечение и синтетические процессы.

Вместе с тем вполне целесообразно заметить, что детальные функциональные и структурные перестройки указанного выше механизма на молекулярном уровне в условиях температурно-осмотических воздействий и замораживания остаются во многом неясными, что требует дальнейших исследований на молекулярном, надмолекулярном и клеточном уровнях. В частности, представляется целесообразным более детальное выяснение вклада таких иницилирующих факторов, как вспомогательные белки цитозоля, Ca^{2+} и другие вторичные мессенджеры (цАМФ, цГМФ, 1, 4, 5-инозитолтрифосфаты) в регуляцию системы внутриклеточного метаболизма и температурно-осмотическую резистентность клеток при их консервировании.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоус А. М., Бондаренко В. А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении.— Киев: Наук. думка, 1982.— 254 с.
2. Белоус А. М., Бондаренко В. А., Бабийчук Л. А. и др. Единый механизм повреждения клетки при термальном шоке, замораживании и постгипертоническом лизисе // Криобиология.— 1985.— № 2.— С. 25—32.
3. Белоус А. М., Бондаренко В. А., Гулевский А. К. Молекулярно-клеточная концепция криповреждений клетки: роль трансмембранных дефектов // Там же.— 1987.— № 2.— С. 3—11.
4. Гулевский А. К., Бондаренко В. А., Белоус А. М. Барьерные свойства биомембран при низких температурах.— Киев: Наук. думка, 1988.— 205 с.
5. Евстигнеева Р. П. Структурно-функциональные исследования липидов биологических мембран // V Всесоюз. биохим. съезд.— М.: Наука, 1985.— Т. 1.— С. 168.
6. Лозина-Лозинский Л. К. Очерки по криобиологии.— Л.: Наука, 1972.— 262 с.
7. Красавцев О. А. Свойства плазмалеммы морозостойких растительных клеток // Успехи совр. биол.— 1988.— 106, № 1 (4).— С. 143—157.
8. Миронов С. Л., Тепикин А. В., Белан П. В. Механизмы регуляции внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в изолированных нейронах моллюсков, выявляемые по флуоресценции зонда ФУРА-2 // Внутриклеточная сигнализация.— М.: Наука, 1988.— С. 21—32.
9. Орлов С. Н., Покудин Н. И., Котелевцев Ю. В. и др. О механизме индукции ионного транспорта при сжатии эритроцитов // Внутриклеточная сигнализация.— М.: Наука, 1988.— С. 118—127.
10. Поленов А. Л. Гипоталамо-гипофизарная и нейросекреторная система в зимний период у низших позвоночных и гибернирующих млекопитающих // Эволюционные аспекты гипобриоза и зимней спячки.— Л.: Наука, 1986.— С. 18—24.
11. Попова Н. К., Науменко Е. В., Колпаков В. Г. Серотонин и поведение.— Новосибирск: Наука, 1978.— 304 с.
12. Смит О. Биологическое действие замораживания и переохлаждения.— М.: Иностран. лит., 1963.— 503 с.
13. Туманов И. И. Физиология закаливания и морозостойкости растений.— М.: Наука, 1979.— 350 с.
14. Фултон А. Цитоскелет. Архитектура и хореография клетки.— М.: Мир, 1987.— 117 с.
15. Biessmann H., Falkner F. A., Saumweber H. et al. Disruption of the vimentin cytoskeleton may play a role in heat-shock response // Heat Shock From Bacteria to Man.— Harbor: Cold Spring, 1982.— P. 275—287.
16. Bonner J. J. Induction of *Drosophila* heat shock puffs in isolated polytene nuclei // Developm. Biol.— 1987.— 86, № 4.— P. 409—418.
17. Carlsson L., Nyström L. E., Sundkvist A. et al. Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells // J. Mol. Biol.— 1977.— 115, № 4.— P. 465—483.
18. Cohen P. The role of protein phosphorylation in neural and hormonal control of cellular activity // Nature.— 1982.— 296.— P. 613—620.
19. Craine B. L., Kornberg T. Activation of the major *Drosophila* heat-shock genes in vitro // Cell.— 1981.— 25, № 6.— P. 671—681.
20. Dustin P. Microtubules // Sci. Am.— 1980.— 243, N 2.— P. 66—76.
21. Falkner T. A., Saumweber A., Biessmann H. Two *Drosophila melanogaster* proteins related to intermediate filament proteins of vertebrate cells // J. Cell. Biol.— 1981.— 91, № 2.— P. 175—183.
22. Kim H., Binder L. I., Rosenbaum J. L. The periodic association of MAP—2 with brain microtubules in vitro // J. Cell. Biol.— 1979.— 80, N 3.— P. 266—276.

3. Leenders H. J., Berendes H. D., Helmsing P. J. et al. Nuclear mitochondrial interactions in the control of mitochondrial respiratory metabolism // Sub. Cell. Biochem.— 1974.— 3, N 2.— P. 119—147.
24. Means A. R., Dedman J. R. Calmodulin — an intracellular calcium receptor // Nature.— 1980.— 285.— P. 73—77.
25. Meryman H., Williams R. J., Douglas M. S. Freezing injury from solution effect and its prevention by natural or artificial cryoprotections // Cryobiology.— 1977.— 14, N 3.— P. 287—302.
26. Nover L., Hellmund D., Neumann B. et al. The heat shock response of eukaryotic cells // Biol. Zbl. Baud.— 1984.— 103, № 4.— P. 357—435.
27. Pollard T. D., Craig S. W. Mechanism of actin polymerization // Trends Biochem. Sci.— 1982.— 7, № 1.— P. 55—58.
28. Sin Y. T. Induction of puffs in *Drosophila* gland cells by mitochondrial factor(s) // Nature.— 1975.— 258.— P. 159—160.
29. Singer S. J., Nicolson G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membrane // Science.— 1972.— 175, N 4023.— P. 720—731.
30. Tonqvay R. M., Vincent M. Intracellular translocation of cellular and heat shock induced proteins upon shock in *Drosophila* cells // Canad. J. Biochem.— 1982.— 60, № 3.— P. 308—315.
31. Wang L. C. H. Mammalian hibernation // The Effect of Low Temperatures on Biological Systems.— London: Publ. Edward Arnold, 1987.— P. 349—387.
32. Wilson L. Action of drugs on microtubules // Life Sci.— 1975.— 17, N 3.— P. 303—310.

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

Поступила 12.03.90

A. M. BELOUS

THE ROLE OF CYTOSKELETON PROTEINS IN THE CELL STABILITY TO COLD

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

The paper is of review and theoretical type with special reference to further investigations of properties and mechanisms of regulation of the structure — functional state of cytoskeleton proteins under conditions of cooling and freeze—thawing. In the framework of this paper, cytoskeleton proteins are considered as a central mechanism providing for the stability (or instability) of cells during cryopreservation, because their state and properties are responsible for such important cell parameters as shape, barrier and structural features of plasma and cytoplasmic membranes, transport of ions and metabolites, energy supply and synthetic processes.

УДК 57.043

Л. В. Калинина

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ КРИОКОНСЕРВАЦИИ НИЗШИХ ЭУКАРИОТНЫХ ОРГАНИЗМОВ (ОДНОКЛЕТОЧНЫЕ ВОДОРОСЛИ И ПРОСТЕЙШИЕ)

Обобщены данные, полученные при исследовании одноклеточных водорослей и простейших, культивируемых в условиях низких температур. Обсуждаются способы сохранения эукариотных организмов и оптимальные режимы долгосрочного их хранения.

Одноклеточные эукариоты (*Protista*) представляют «единую неразрывную группу, охватывающую все формы жизни, предшествующие по истории своего возникновения многоклеточным растениям и животным» [5]. Одним представителям этой группы живых существ в большей мере присущи черты организации клеток высших животных (это *Protozoa*), другим — высших растений (одноклеточные водоросли), третьи представляют проме-

жуточные варианты. Организмы-клетки являются важным компонентом биосферы. Они составляют одно из начальных звеньев в экологических системах разных типов.

Многочисленные сведения, полученные цитозоологами и протистологами, свидетельствуют о том, что происходящее в настоящее время нарушение «естественного равновесия» в природе происходит и за счет оскуднения мира протистов. Еще не всегда и не всем очевиден неподдающийся подчас прямому учету тот моральный и материальный ущерб, который наносят экономике природы и человеческого общества антропогенные факторы, поражающие одноклеточных. Не трудно, однако, представить себе, что загрязнение водоемов и почв отходами химического производства, тяжелыми металлами выводит из строя наиболее чувствительные звенья водных и почвенных биоценозов. В первую очередь погибают одноклеточные организмы, составляющие основу пищевых цепей, меняется их численность и видовой состав.

Решению проблемы сохранения одноклеточных способствуют коллекции клеточных культур, активно и уже на протяжении многих лет работающие в ряде стран. В США — это ATCC, (American Type Culture Collection), в Англии — CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa), во Франции — Collection de Protistes «Faure — Fremiet». В нашей стране коллекции свободноживущих одноклеточных водорослей и простейших существуют в Биологическом институте Ленинградского университета и в Институте цитологии АН СССР. При этих коллекциях интенсивно идут криобиологические исследования. Изучается природная устойчивость различных видов и штаммов *Protista* к действию низких и ультранизких температур, исследуются биологические эффекты гипотермии: изыскиваются способы их длительного низкотемпературного хранения. На основе данных фундаментальных исследований и результатов эмпирического подхода определяются оптимальные режимы долгосрочного хранения одноклеточных при низких температурах.

До настоящего времени, несмотря на очевидные достижения современной криобиологии, многие виды свободноживущих пресноводных форм, в особенности *Protozoa*, остаются «трудными» для криобиологов объектами. Следующие самые общие соображения до некоторой степени могут объяснить нестандартность ответа одноклеточных организмов, находящихся на вегетативной стадии роста, на замораживание. Во-первых, вполне вероятно, что их высокая чувствительность к ультранизкой температуре обусловлена организменным уровнем организации. Следует также помнить, что каким бы образом не осуществлялась репродукция *Protista* практически всем видам простейших присуща одна особенность — у них отсутствует дифференцировка на сом и зародышевый путь. По этой причине консервация генома простейшего всегда сводится к консервации целого организма. Как отмечает А. В. Иванов, «первичным и более древним типом организации животной клетки следует считать одноядерное простейшее со всеми его свойствами самостоятельного индивида. Тканевая клетка метазоона, напротив, представляет собой более позднюю и, следовательно, вторичную, специализированную и, в известном смысле, обедненную модификацию клеточной организации» [1]. Во-вторых, *a priori* можно сказать, что «рецепты», пригодные для криоконсервации представителей одних групп одноклеточных, окажутся неудовлетворительными для других, так как подчас даже внутри одного и того же таксона существуют огромные эволюционные дистанции. И, наконец, необходимо иметь в виду, что «клетка простейшего в своем строении может достигать всех ступеней усложнения, какие только доступны клетке» [5]. Такие особенности морфологии, как, например, твердый кортекс (или, напротив, его полное отсутствие), наличие сложно устроенных органоидов движения (реснички, жгутики), питания и осморегуляции (пищеварительные, сократительные вакуоли), полиморфизм ядерного аппарата и многие другие делают одноклеточный организм на стадии активного роста

более уязвимым к действию отрицательных температур, чем соматические клетки млекопитающих или растений.

В природных условиях в ответ на неблагоприятные факторы, такие как истощение пищевых ресурсов, изменение pH среды, отклонение температуры среды в ту или другую сторону от оптимальной, одноклеточные отвечают образованием цисты покоя. Циста — это форма своего рода аутоконсервации, в процессе которой организм-клетка развивает ряд адаптивных реакций, направленных на повышение его устойчивости как системы в целом. Этот процесс имеет видовые особенности, но так как стратегическая цель всегда сходна — переход в более надежное физиологическое состояние — то и достигается она с помощью арсенала в основном сходных средств. В предцистных формах активно идет процесс дегидратации, клетка отдает химически несвязанную воду, при этом она заметно уменьшается в размерах, округляется. Кортикальные структуры резорбируются, система вакуолей практически исчезает, цитоплазматические структуры (микрофиламенты, ретикулум) либо дезинтегрируются путем аутофагоцитоза, либо выбрасываются наружу. Соматические ядра в некоторых случаях распадаются на фрагменты, которые затем сливаются и образуют одно ядро, иногда они полностью дегенерируют. Напротив, число половых ядер возрастает за счет распада на фрагменты предсуществовавших. Очень серьезные преобразования при инцистировании и зиготообразовании происходят с наружной мембраной. В предцистных формах образуются так называемые предшественники оболочек цисты, часть из которых состоит из белков и других материалов, синтезируемых *de novo*. За счет этих структур формируется, как правило, трехслойная оболочка цисты. Ее наружный слой (экоциста) содержит в основном мукополисахариды, средний (мезоциста) — белки и липиды, внутренний (эндоциста) — мукополисахариды и белки. У некоторых видов одноклеточных в состав оболочки входит целлюлоза или хитин. Инцистирование сопровождается накоплением гликогена и жиров. Эти запасные вещества, по-видимому, способствуют повышенной устойчивости цист к замораживанию.

В связи с вышеизложенным не вызывает удивления тот факт, что прошедшие через аутоконсервацию клетки являются более устойчивыми к ультранизкой температуре, чем вегетативные особи. В ходе этого «биотехнологического» процесса клетка сама провела те необходимые преобразования, которые, как известно, повышают криорезистентность.

Исходно высокая устойчивость к замораживанию характерна для таких видов одноклеточных водорослей, как *Scenedesmus*, *Chlamydomonas nivalis*, *Chlorella protothecoides*: при замораживании до -196°C в отсутствии криопротектора их выживаемость равна соответственно 60 и 100 %. По всей вероятности, такая высокая криорезистентность данных форм объясняется тем, что они являются «природными» криофилами, адаптированными к существованию в условиях низких температур. Однако и криофильные виды в естественных местах обитания не встречаются с ультранизкой температурой и в ходе эволюции у них не могут возникнуть к ней специальные адаптационные механизмы. Криобиологами установлено [4], что для каждого типа клеток существует зона особо опасных низких температур (в области $0 \div -30^{\circ}\text{C}$). Если в ходе замораживания организм проходит эту зону, сохранив жизнеспособность, есть основания считать, что дальнейшее понижение температуры уже не приведет к летальному исходу. Возможно, что для криофилов эта зона совпадает с тем рангом отрицательных температур, с которыми они сталкиваются в естественных местах обитания.

Как уже было сказано, высокая криотолерантность свойственна морским одноклеточным водорослям: в течение многих месяцев и др. *Phalbatillum*, *Nannochloris*, *Dunaliella* сохраняют жизнеспособность в 40—60 % случаев. Обработка клеток 5 %-ным глицерином повышает уровень их сохранности до 100 %. Обращает на себя внимание тот факт, что успешная криоконсервация организмов, обитающих в морской воде, осуществляется

при скорости заморозки 1 °С/мин, т. е. по режиму, сходному с режимом замораживания соматических клеток. По всей вероятности, это не случайное совпадение, а еще одно доказательство того, что исход замораживания в большой степени определяется осмотическими параметрами наружной клеточной мембраны. Очевидно, что эти параметры сравнимы у столь эволюционно отдаленных клеток потому, что они обитают в средах, имеющих сходный уровень гипертоничности (морская вода, внутренняя среда организма млекопитающего). Следует добавить, что и многие паразитические простейшие хорошо переносят замораживание до —196 °С, так как способны легко отдавать «свободную» воду при наступлении кристаллизации внеклеточной жидкости.

Вегетативные клетки многих водорослей пресноводных форм не удается хранить при —196 °С, замораживая их по режимам, пригодным для клеток высших растений или животных. К таким видам как *Chlorella emersoni*, *Ch. ellipsoidea*, *Euglena gracilis*, *Prototheca* sp. и др. необходимо применить предварительные экспериментальные воздействия, чтобы получить уровень выживаемости, равный 30 %. Работами Морриса установлено, что наиболее эффективным криопротектором для многих видов одноклеточных водорослей является 2,5 М метанол. Повышению выживаемости после замораживания до —196 °С способствует холодовая акклимация (14—21 день при 4 °С), перевод клеток на стадию G₂, смена гетеротрофного характера питания на аутотрофный, снижение питательной ценности среды культивирования. Перечисленные воздействия переводят клетки на низкий уровень метаболической активности; при этом, как известно, уровень устойчивости к стрессам замораживания возрастает (ср. с цистами).

Следует сказать, что перечисленные воздействия не всегда оказываются эффективными и способствуют выживанию клеток при ультранизкой температуре. Предварительная холодовая акклимация не способствует повышению устойчивости к замораживанию у *Chlamydomonas reinhardtii*, *Euglena gracilis* и у представителей *Protozoa*, *Amoeba*, *Infusoria*.

Свободноживущие пресноводные *Protozoa* (одноклеточные животные организмы) являются самыми чувствительными к замораживанию формами низших эукариот.

Целый ряд экспериментальных воздействий приводит к расширению нижних границ существования *Protozoa* вплоть до 0 °С. Обработка амёб, *A. borokensis*, глицерином, сахарозой, CaCl₂, липосомами из яичного ФХ, а также предварительное культивирование при 4 °С повышает их устойчивость к переохлаждению, но не способствует переживанию при замораживании.

Имеющийся в литературе фактический материал позволяет считать, что тот или иной уровень устойчивости одноклеточных к ультранизким температурам определяется функциональным состоянием не какого-либо одного компартмента, а сопряженной деятельностью различных клеточных подразделений и входящих в их состав биомакромолекул.

Тем не менее можно утверждать, что в развитии криповреждений пресноводных одноклеточных организмов очень большую роль играет система сократительных вакуолей — органоида, который балансирует осмотические концентрационные различия между клеткой и средой.

С присутствием сократительной вакуоли, как правило, связана очень низкая проницаемость наружной клеточной мембраны для воды. В связи с этим при замораживании пресноводных клеток чрезвычайно трудно подобрать оптимальный режим охлаждения. При низких скоростях охлаждения для того, чтобы клетка потеряла воду осмотическим путем, требуется много времени, и повреждающий эффект успеют оказать повышающиеся концентрации солей и/или криопротективных агентов. Гибель клетки, в которой присутствует большая активно функционирующая вакуоль, может наступить и из-за того, что находящаяся в ней вода, не содержащая солей, замерзнет в первую очередь и инициирует внутриклеточную кристал-

лизацию. При слишком высоких скоростях охлаждения произойдет внутриклеточная кристаллизация; значительная доля внутриклеточного льда при этом образуется за счет обводненной вакуоли.

Имеется еще одна возможность. В ряде работ установлено, что изменение состава мембранных липидов клеток растений при замораживании связано с активацией внутриклеточных фосфолипаз, локализованных в сократительной вакуоли [7]. Не исключено, что при этом в первую очередь страдают мембраны самой вакуоли и жизненно важный орган разрушается.

Большая роль сократительной вакуоли в определении уровня криорезистентности пресноводных одноклеточных очевидна. Однако абсолютизировать значение и этого органоида не представляется возможным; *Chlamidomonas nivalis* содержит сократительную вакуоль, но относится к числу весьма криоустойчивых форм. В наших экспериментах показано, что условия культивирования, снижающие активность сократительной вакуоли (голодание, низкая температура), не повышают устойчивость *Amoeba proteus* к замораживанию.

Несмотря на многочисленные попытки исследователей, до сих пор лишь в единичных случаях удается получить жизнеспособные особи при их хранении в жидком азоте. В настоящее время для замораживания крупных пресноводных амёб оказывается продуктивным лишь один подход — замораживание индивидуальных клеток путем их быстрого погружения на тонкой алюминиевой подложке в смесь жидкого и твердого азота («шуга»). При таком способе замораживания развивается очень высокая скорость охлаждения объекта, до 5000 °C/с. Визуально можно констатировать «остекленение» клеток. При адекватных, очень быстрых скоростях отогрева выживаемость, оцениваемая по эффективности клонирования, достигает 100 %. Этот метод пригоден и для консервирования паразитических простейших.

Для криоконсервации генома некоторых простейших определенные перспективы открывает метод пересадки ядер. В частности, это справедливо для крупных свободноживущих амёб, которые хорошо выдерживают это микрургическое воздействие. *Amoeba* не выдерживает образования льда во внешней среде, и после отогревания 100 % клеток погибает. Данные электронной микроскопии показали, что у клеток разрушены все мембранные структуры цитоплазмы, в то время как морфология «замороженного» ядра практически не отличается от морфологии интактного. При замораживании до —196 °C в ядрах не выявлено повреждений, которые можно было бы связать с образованием кристаллов льда. Ядра, пересаженные из мертвых после замораживания клеток в интактную предварительно энуклеированную цитоплазму своего или другого, трансплантационно совместимого штамма, оказывались физиологически полноценными и были способны реактивировать энуклеированную цитоплазму. Искусственно полученные «гибриды» с замороженным ядром и нормальной цитоплазмой прикреплялись к субстрату, фагоцитировали и в ряде случаев (6—55 %) были способны обеспечить деление [6]. Эти данные могут дать определенные предпосылки для поисков оптимальных режимов криоконсервации геномов биологических объектов, к которым применимы методы цитохирургии.

У *Protista*, как и у других типов клеток, развитие криоповреждений в значительной степени определяется свойствами наружной клеточной мембраны. То обстоятельство, что внутриклеточная кристаллизация у простейших наступает практически одновременно с появлением кристаллов льда во внешней среде, показывает, что одним из «дефектов» (с точки зрения криобиолога) их мембраны могут быть поры, через которые мельчайшие кристаллы льда проникают в цитоплазму [3]. Другой особенностью мембраны пресноводных одноклеточных организмов, как уже было сказано, является ее низкая проницаемость для молекул воды. Например, для клеток *Amoeba* она составляет 0,026 мк/мин/атм, т. е. в 100 раз ниже, чем у эритро-

цитов. Это затрудняет дегидратацию клеток при замораживании и способствует внутриклеточной кристаллизации, губительной для клеток простейших.

Предпринятые рядом авторов [7] попытки найти корреляцию между устойчивостью одноклеточных к стрессам замораживания — отогревания и состоянием липидного бислоя наружной мембраны не дали определенных результатов. Например, степень «текучести» наружной мембраны, оцениваемая относительным содержанием в фосфолипидах ненасыщенных и насыщенных жирных кислот, у *Chlamydomonas reinhardtii* лишь незначительно ниже этой величины у *Chlorella prothotecooides*. Между тем первый вид является в высшей степени чувствительным к замораживанию (клетки погибают в 100 % случаев уже при $-2,5^{\circ}\text{C}$), в то время как выживаемость клеток хлореллы при замораживании до -196°C равна почти 100 %. Не обнаружено больших различий по степени ненасыщенности фосфолипидов между криоустойчивым видом *Dunaliella salina* и криочувствительным — *Chlamydomonas reinhardtii*. Степень ненасыщенности жирных кислот в фосфолипидах *T. pyriformis* — вида, чувствительного к замораживанию до -196°C , такова, как и у *Chl. prothotecooides* — организма, устойчивого к ультранизкой температуре.

В ряде случаев при сравнительном анализе липидов мембран контрольных культур и культур с экспериментально измененной криорезистентностью выявлены значительные различия по содержанию отдельных жирных кислот. В результате роста при 4°C в клеточных липидах *Chlamydomonas nivalis* доля ненасыщенных жирных кислот 18 : 3 и 16 : 4 возрастает соответственно с 14 до 21 % и с 19 до 31 % [7]. После культивирования на обедненной питательной среде в клетках *Chlorella emersonii* увеличивается доля жирной кислоты 16 : 4 от 14 % в контроле до 17 % в опыте. Следствием перевода клеток *Chlorella prothotecooides* на гетеротрофный тип питания (при этом их криорезистентность падает) является изменение относительного содержания всех жирных кислот, но наиболее серьезные изменения происходят с жирной кислотой 18 : 3. Ее содержание падает с 44 % (в аутотрофных, криорезистентных клетках) до 7 % (рост в темноте) и 9 % (рост на свету) в гетеротрофно питающихся особях. Можно предполагать, что эти компенсаторные реакции, протекающие в клеточной мембране, являются у одноклеточных водорослей, так же как у клеток высших животных и растений [2], одним из звеньев биохимического механизма адаптации к низкой температуре и стрессам замораживания — отогревания. Немаловажную роль, по-видимому, играет и процесс накопления липидов, наблюдавшийся у одноклеточных [7] в условиях, способствующих повышению криорезистентности.

Обобщенные в настоящей работе данные свидетельствуют о том, что низшие эукариотические организмы являются интересным и методически удобным объектом для решения не только частных вопросов биологического действия низких температур на клеточном уровне, но и ряда общекриобиологических проблем. Полученные в работах с этими организмами результаты показывают, сколь перспективным является поиск условий, вскрывающих резервные механизмы клеточной адаптации, благодаря которым удается повысить устойчивость и к ультранизкой температуре. Такие условия зачастую позволяют отказаться от применения криозащитных агентов, которые, как известно, вносят свой вклад в развитие криоповреждений. Сравнительная простота методов культивирования одноклеточных водорослей и простейших на искусственных средах позволяет получать большую биомассу. Это открывает дополнительные возможности для проведения интенсивных биохимических исследований, направленных на выяснение молекулярных механизмов криоповреждений. Совокупность фактов, полученных в ходе криобиологических исследований клеток *Protista*, не позволяет отдать предпочтение какой-то одной из гипотез, объясняющих причины летального действия ультранизких температур. Эти факты скорее подтверж-

дают предложенную Л. К. Лозина-Лозинским многофакторную теорию криповреждений [4].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Иванов А. В. Происхождение многоклеточных животных. Филогенетические очерки.— Л.: Наука, 1968.— 252 с.
2. Крепс Е. М. Липиды клеточных мембран.— Л.: Наука, 1981.— 339 с.
3. Кулешова Л. Г. Кинетика льдообразования в живых клетках и модельных системах: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Харьков, 1983.— 24 с.
4. Лозина-Лозинский Л. К. Действие охлаждения на клетки как мультифакторный процесс // Цитология.— 1982.— 24, № 4.— С. 371—390.
5. Мошковский Ш. Д. О природе простейших (*Protozoa*) и границах протозоологии // Тр. Ленинград. о-ва естествоиспытателей.— 1957.— Т. 53, № 4.— С. 129—137.
6. Kalinina L., Morris G. Nuclear transplantation as a means of genome preservation in non-viable frozen — thawed *Amoeba proteus* // CRYO-Lett.— 1982.— 3, N 2.— P. 239—244.
7. Morris G., Coulson G., Clarke K. et al. Freezing injury in *Chlamidomonas*: a synoptic approach // Effects of Low Temperatures on Biological Membranes.— London; New York: Acad. Press, 1981.— P. 390—399.

Ин-т цитологии АН СССР,
г. Ленинград

Поступила 30.11.89

L. V. KALININA

THE CURRENT STATE OF THE PROBLEM OF CRYOPRESERVATION OF LOWER EUKARYOTIC ORGANISMS (UNICELLULAR ALGAE AND PROTOZOA)

Institute for Cytology of the USSR Academy of Sciences, Leningrad

The results of investigation of unicellular algae and Protozoa cultured at low temperatures are reviewed. Methods of preservation of eukaryotic organisms and optimal regimens of their long-term storage are discussed.

УДК 57.043

Л. Е. Мак-Генн, Х. Янг, М. Л. Вальтерсон

УЧАСТКИ КРИПОВРЕЖДЕНИЯ В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Природу повреждения клетки и плазматической мембраны исследовали сразу после оттаивания с помощью функциональных тестов. Фибробласты хомячка, лимфоциты и гранулоциты человека охлаждали без криопротектора со скоростью 1 °С/мин до температур от —10 до —40 °С, затем отогревали непосредственно в воде при 37 °С или быстро охлаждали до —196 °С и быстро отогревали. После оттаивания функцию митохондрий в клетках оценивали по содержанию 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенил-тетразолий-бромид (МТТ), определяли флуоресценцию флуоресцеин-диацетата (ФДА), эффективность клонирования и осмотическую реакцию в гипертоническом растворе. Выяснено, что после охлаждения до низких температур со скоростью 1 °С/мин клетки ведут себя как идеальные осмометры. Это свидетельствует о сохранности полупроницаемости плазматической мембраны и указывает на то, что она не является первичным участком повреждения при медленном охлаждении. Измерение уровня флуоресценции ФДА показывает, что этот метод не позволяет определить целостность мембраны, хотя и отражает в основном специфическую проницаемость плазматической мембраны для флуоресцеина.

Природу повреждения, которое претерпевают живые клетки и ткани при замораживании и оттаивании, исследовали многие авторы. В настоящее время общепринято, что плазматическая мембрана повреждается при замораживании в первую очередь, хотя точные механизмы криповреждения пока неясны [7]. Некоторые исследователи указывают на важную роль митохондрий [12, 14], лизосом [10] и других органелл [15, 11] в криповреждении клетки.

Механизмы криповреждения обычно исследуют, оценивая функцию или целостность мембраны, характеризующих процессы восстановления в клетках или модельных мембранных системах. Летальное повреждение клеток различными агентами определяется степенью нарушения полупроницаемости плазматической мембраны, независимо от места первичного повреждения. Стресс при замораживании и оттаивании может приводить к изменениям более чувствительных компонентов или структур клетки. Затем повреждение постепенно распространяется на другие области клетки, что в итоге нарушает все ее функции, включая полупроницаемость плазматической мембраны. Следовательно, измерение повреждения целостности плазматической мембраны после замораживания-оттаивания неизбежно приведет к выводу о том, что эта структура является участком криповреждения, независимо от того, повреждается ли она в первую очередь.

Нами исследованы участки криповреждения живых клеток после медленного замораживания—оттаивания и оценены изменения целостности мембраны и ее полупроницаемость, функция митохондрий и общая степень репарации клетки.

Периферическую кровь здоровых добровольцев собирали в гепаринизированные пробирки, осаждали с декстраном для удаления эритроцитов и разделяли при постоянном градиенте плотности перкола (1,02—1,13 г/мл) на эритроциты, гранулоциты, лимфоциты и моноциты. Полученные клеточные суспензии обычно состояли из 95 % гранулоцитов с примесью эритроцитов или 95 % лимфоцитов с примесью моноцитов.

Фибробласты хомячка (V79) в виде монослоев выращивали во флаконах для культуры ткани (Corning, США), содержащих минимальную среду Игла (GIBCO) с 10 % сывороткой плода теленка (GIBCO).

Замораживание и оттаивание осуществляли таким образом, чтобы вызвать постепенное повреждение клетки [7]. Аликвоты клеточных суспензий по 0,2 мл в стеклянных пробирках погружали в спиртовую баню (FTG, Stoneridge, США) при -5°C , индуцировали кристаллообразование и охлаждали со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Образцы быстро оттаивали ($300^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) от разных температур ниже 0°C в воде при 37°C . Часть образцов быстро охлаждали ($600^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) путем погружения в жидкий азот, хранили в течение 30 мин и быстро оттаивали при 37°C .

Фибробласты хомячка засеивали во флаконы для культивирования ткани и инкубировали в течение 7 дней. Колонии затем окрашивали метиленовым синим и подсчитывали. На всех рисунках восстановление клеток выражено в процентах от значений необработанного контроля с указанием стандартной ошибки средней трех репликатных образцов.

Для оценки активности различных дегидрогеназ можно использовать соли тетразолия [13], поскольку они расщепляются только в живых митохондриях, т. е. метаболически активных клетках. Использовали метод, аналогичный описанному ранее [8]. После экспериментальной обработки клетки помещали в раствор, содержащий 0,5 мг/мл МТТ (Sigma), инкубировали при 37°C в течение 2 ч, суспендировали в изопропаноле, после чего измеряли абсорбцию света при длине волны 570 нм.

Объемы клеток и интенсивности флуоресценции ФДА измеряли и сравнивали после экспериментальной обработки с помощью цитометра Coulter EPICS V.

Осмотическое поведение клеток оценивали по методу, описанному ранее [3]. Распределение объемов клеточных суспензий измеряли в электронном счетчике частиц Coulter ZBI (Coulter Electronics, США). После экспериментальной обработки делали два измерения: в изотоническом фосфатно-буферном солевом (ФБС) растворе (280 мосм/кг) и в гипертоническом растворе ФБС (1,350 мосм/кг). Клетки экспонировали в соответствующем растворе в течение 5 мин при комнатной температуре перед измерением. Экспозиция в гипертонических условиях сама по себе не приводила ни к каким изменениям в восстановлении клеток при измерении указанными методами.

Из рис. 1, а видно, что клетки, охлажденные со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до температур ниже 0°C без криопротектора, претерпевают существенные повреждения. Результаты исследования восстановления фибробластов хомячка методом клонирования свидетельствуют о том, что повреждение начинается при температуре ниже -10°C и усиливается при более низких температурах. Уровень восстановления был низким в образцах, охлажденных до -196°C от более высоких субнулевых температур, повышался при промежуточных и снижался при более низких температурах, что согласовывалось с данными других наблюдений [5]. В период роста колоний сублетальные криоповреждения могли восстанавливаться [6].

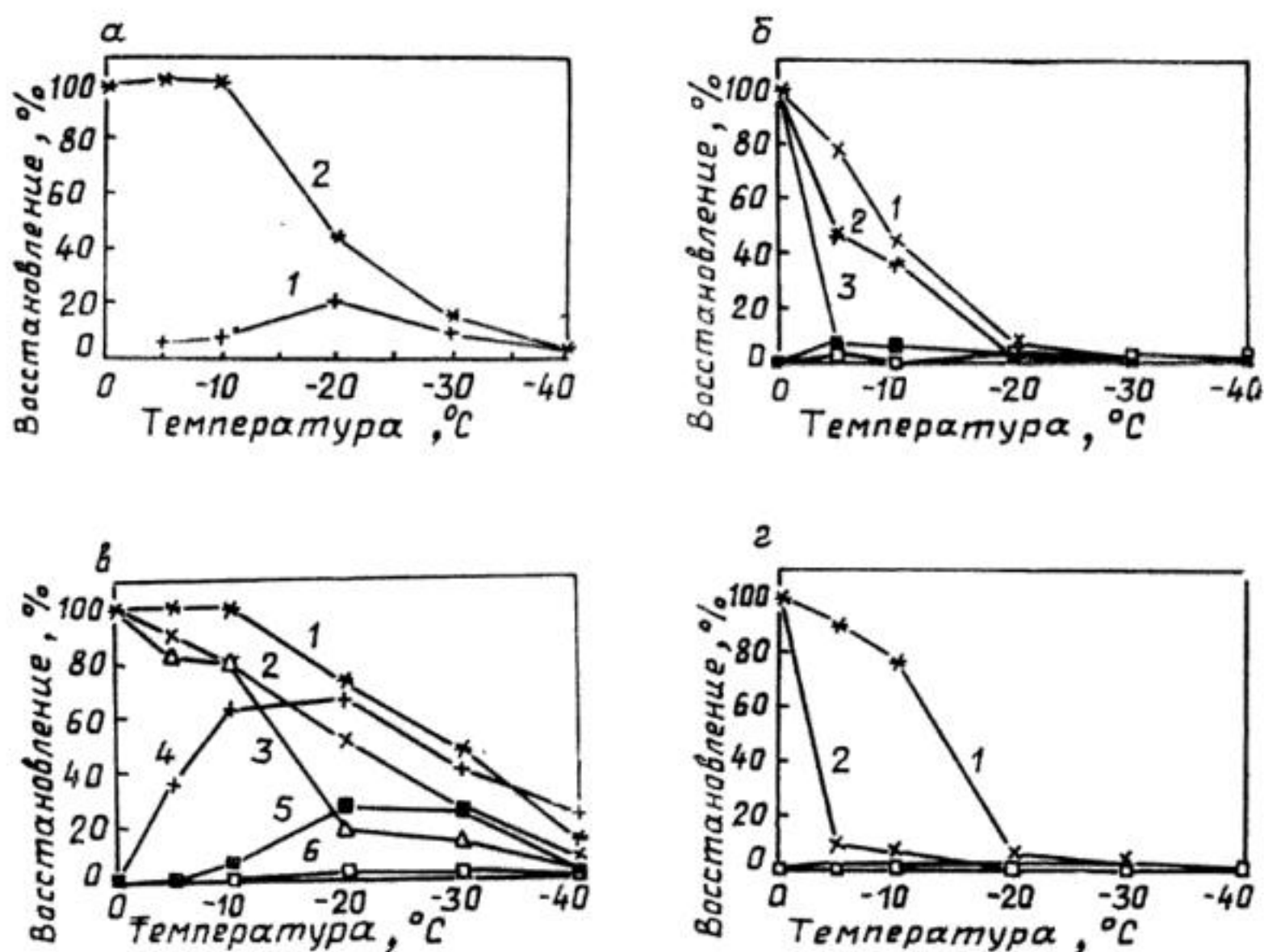


Рис. 1. Реакция клеток, охлажденных со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до разных температур ниже 0°C и затем оттаянных со скоростью $300^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ или охлажденных со скоростью $600^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -196°C перед отогревом. Уровень восстановления клеток оценивали: а — методом клонирования фибробластов хомячка после замораживания (1) и отогрева (2); б — методом измерения МТТ в лимфоцитах (1), фибробластах (2) и гранулоцитах (3) после оттаивания; в — методом определения флуоресценции ФДА сразу после оттаивания (без инкубации) фибробластов (1), лимфоцитов (2), гранулоцитов (3) и после замораживания, соответственно кривые 4, 5 и 6; г — методом определения флуоресценции ФДА через 2 ч инкубации после оттаивания лимфоцитов (1) и гранулоцитов (2)

валось с данными других наблюдений [5]. В период роста колоний сублетальные криоповреждения могли восстанавливаться [6].

На рис. 1, б показано, что уровень восстановления фибробластов хомячка, измеренный методом определения МТТ, был выше, чем по результатам клонирования, а реакция лимфоцитов человека на аналогичный стресс замораживания — оттаивания была такой же, как и у фибробластов хомячка. Однако гранулоциты человека были гораздо более чувствительными к повреждению и имели низкий уровень восстановления после оттаивания суспензии от -5°C . Такая реакция гранулоцитов совпадала с описанной в других работах, в которых в качестве оценки восстановления использовали фагоцитоз [1, 2, 4].

На рис. 1, в показано восстановление клеток по данным измерения флуоресценции ФДА. Сразу после оттаивания в фибробластах хомячка наблюдалась картина восстановления ФДА, аналогичная наблюдаемой при клонировании, но с более высоким уровнем при всех температурах выше 0°C . Уровень восстановления лимфоцитов и гранулоцитов человека также был более высоким по флуоресценции ФДА, чем по результатам определения МТТ, но даже по оценкам ФДА гранулоциты не восстанавливались

после оттаивания от -196°C . Через 2 ч инкубационного периода (рис. 1, 2) уровень восстановления лимфоцитов и гранулоцитов, по флуоресценции ФДА, соответствовал значениям МТТ.

На рис. 2, а показаны зависимости между изотоническим объемом фибробластов и лимфоцитов и флуоресценцией ФДА. Объем клеток относительно не менялся в режиме замораживания—оттаивания, в котором отсутствовала флуоресценция ФДА, следовательно летально поврежденные клетки оставались интактными.

По способности клеток осмотически реагировать в гипертоническом растворе судили о полупроницаемости плазматической мембраны. Из рис. 2, б видно, что клетки ведут себя как осмометры сразу после замораживания—оттаивания в режиме, вызывающем существенное повреждение по данным клонирования, измерения МТТ и флуоресценции ФДА. Это свидетельствует о том, что плазматическая мембрана сохраняет свойства полупроницаемости сразу после летального повреждения при медленном охлаждении. Для клеток, охлажденных от 0 до -196°C со скоростью $400^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, условия внутриклеточной кристаллизации были одинаковы, значительная часть клеток была осмотически неактивной сразу после оттаивания, это указывало на то, что условия, приводящие к внутриклеточной кристаллизации, влияют на полупроницаемость плазматической мембраны.

После медленного охлаждения клеток мембрана сохраняет свойства полупроницаемости в условиях, в которых митохондрии не функционируют (по данным определения МТТ) и клетки не способны удерживать флуоресценцию. Это свидетельствует о том, что плазматическая мембрана интактна и, следовательно, не является первичным участком повреждения при медленном охлаждении.

После быстрого замораживания могут возникнуть условия для внутриклеточной кристаллизации. В этом случае изменение полупроницаемости плазматической мембраны наблюдалось в части клеточной популяции сразу после оттаивания. Это означает, что плазматическая мембрана может непосредственно повреждаться в условиях, ведущих к внутриклеточной кристаллизации.

В инкубационном периоде после оттаивания имеется временной интервал для развития вторичных повреждений, как это показали эксперименты с ФДА. Нарушение функции митохондрий наступало сразу после оттаивания в некоторых условиях, когда по данным флуоресценции ФДА никаких изменений не было выявлено. Однако оценки ФДА указывают на суще-

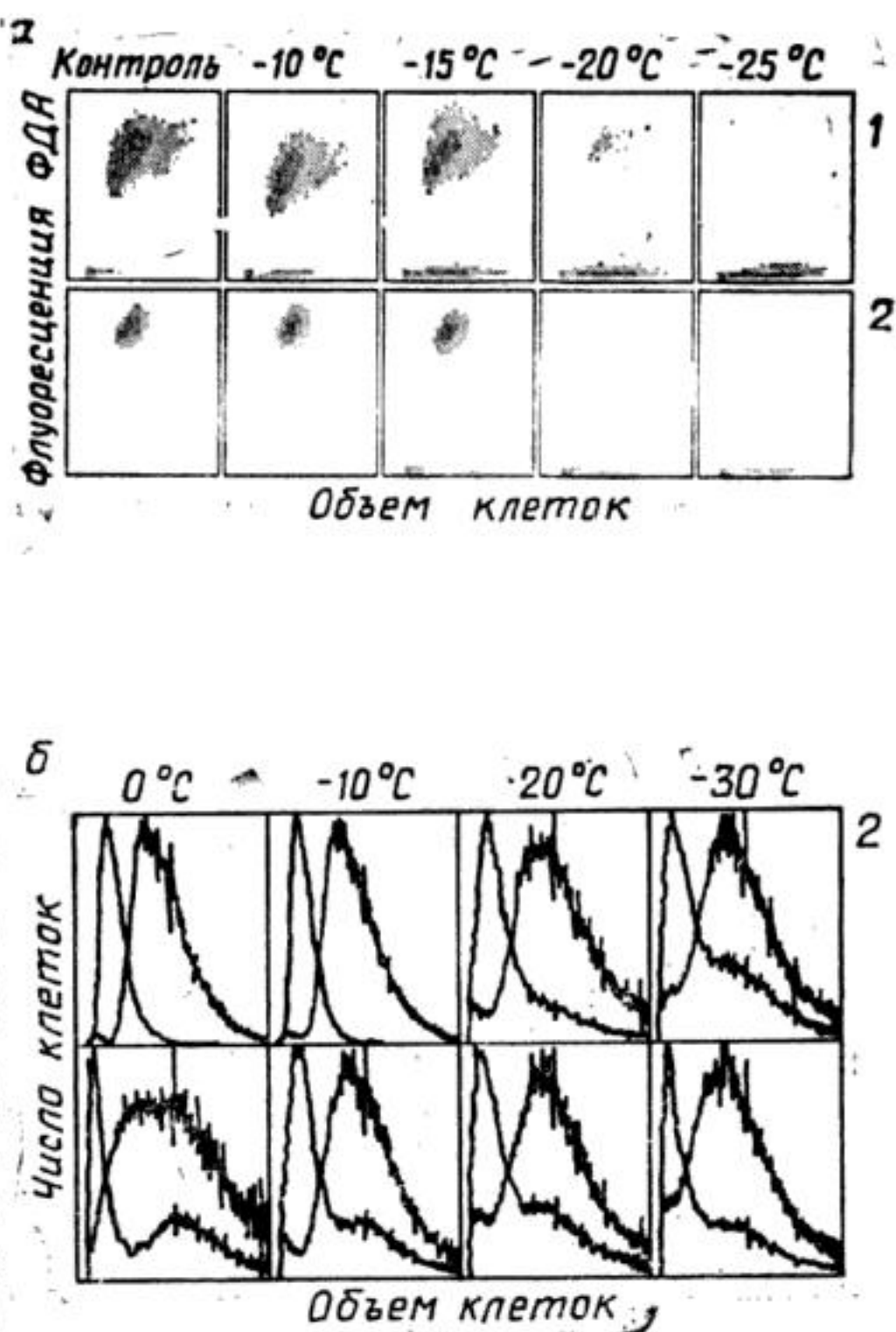


Рис. 2. а — Зависимость между объемом фибробласта (1) и лимфоцита (2) и интенсивностью флуоресценции ФДА после охлаждения со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до разных температур ниже 0°C ; б — распределение объемов фибробластов хомячка в изотоническом (— 280 мосм/кг) или гипертоническом (— 1350 мосм/кг) растворе после охлаждения (2) со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до разных температур ниже 0°C и оттаивания (1)

ственные повреждения именно в инкубационный период. Вместе с тем инкубационный период после оттаивания можно рассматривать как интервал для восстановления сублетального повреждения [6], о чем свидетельствуют различия по данным роста колоний и определения МТТ. Уровень восстановления клеток после замораживания до субнулевых температур был выше по данным клонирования, чем по результатам измерения МТТ. Следовательно, какое-то повреждение (по данным МТТ) должно восстанавливаться в период инкубации. О восстановлении сублетального криоповреждения этих клеток сообщалось ранее [6].

Ротман и Пейпмастер [9] обнаружили, что после замораживания, оттаивания и инкубации флуоресценция интактных клеток полностью отсутствует, в то время как активность эстеразы повышается во внеклеточных экстрактах. Авторы цитируемой выше работы пришли к выводу, что внутриклеточная флуоресценция ФДА является критерием целостности плазматической мембраны. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что плазматическая мембрана, по оценкам МТТ и флуоресценции ФДА, сохраняет полупроницаемость сразу после оттаивания в условиях значительного повреждения других структур клеток. Маловероятно, что общая потеря целостности мембраны, достаточная для возникновения утечки флуоресцеина (молекулярная масса 416.39), позволит сохранить полупроницаемость клетки. Очевидно, повреждение клетки, например при замораживании — оттаивании, вызывает изменения в каналах, по которым флуоресцеин движется через плазматическую мембрану, в результате чего ускоряется его потеря. Таким образом, измерение флуоресценции ФДА представляет собой еще один специфический метод и не является общим критерием целостности мембраны.

Имеются данные о том, что при быстром охлаждении повреждение плазматической мембраны происходит в условиях возникновения внутриклеточной кристаллизации, которое может быть причиной или результатом повреждения мембраны.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dooley D. C., Takahashi T. The effect of osmotic stress on function of the plasma membrane // *Exp. Hematol.*— 1981.— 9.— P. 731—741.
2. Lancaster M. G., Allison F. Studies on the pathogenesis of acute inflammation. VII. The influence of osmolality upon the phagocytic and clumping activity by human neutrophils // *Am. J. Pathol.*— 1966.— 49.— P. 1185—1200.
3. Law P., Rule G., Sprott D. A. et al. Cell size in hypertonic medium for estimation of freeze — thaw survival in mammalian cells // *CRYO-Lett.*—1980.— 1.— P. 28—34.
4. McGann L. E., Grant M., Turner A. R., Turc J.-M. Osmotic limits of human granulocytes // *Cryobiology.*— 1981.— 18.— P. 622.
5. McGann L. E., Walterson M. L. Cryoprotection by dimethyl sulfoxide and dimethyl sulfone // *Ibid.*— 1987.— 24.— P. 11—16.
6. McGann L. E., Kruuv R. J., Frey H. E. Repair of freezing damage in mammalian cells // *Ibid.*— 1972.— 9.— P. 496—501.
7. Morris G. J. Liposomes as a model system for investigating freezing injury // *Effects of Low Temperature on Biological Membranes.*— New York: Acad. Press, 1981.— P. 241—262.
8. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays // *J. Immunol.*— 1963.— 65.— P. 55—63.
9. Rotman B., Papermaster B. W. Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters // *PNAS.*— 1966.— 55.— P. 134—141.
10. Rowe A. W., Lenny L. L. Cryopreservation of granulocytes for transfusion studies of human granulocyte lysosomes, kinetics of glycerol uptake and cryopreservation with dimethyl sulfoxide and glycerol // *Cryobiology.*— 1980.— 17.— P. 198—212.
11. Sawant P. L., Desai I. D., Tappel A. L. Digestive capacity of purified lysosomes // *Biochim. biophys. acta.*— 1964.— 85.— P. 93—102.
12. Sherman J. K. Comparison of in vitro and in situ ultrastructural cryoinjury and cryoprotection of mitochondria // *Cryobiology.*— 1972.— 9.— P. 112—122.
13. Slater T. F., Sawyer B., Strauli U. D. Studies on succinate — tetrazolium reductase system: III. Points of coupling of four different tetrazolium salts // *Biochim. biophys. acta.*— 1963.— 77.— P. 383—393.

14. *Tsvetkov T., Tsonev L., Minkov I.* A quantitative evaluation of the extent of intermitochondrial membrane destruction after freezing and thawing based on functional studies // *Cryobiology*.— 1986.— 23.— P. 433—439.
15. *Volger H., Heber U., Berzborn R. J.* Loss of function of biomembrane proteins during freezing // *Biochim. biophys. acta*.— 1978.— 511.— P. 455—469.

Альбертский ун-т,
г. Эдмонтон, Канада;
Джамусский медицинский колледж,
Китай

Перевод с англ. З. В. Линевиц
Поступила 21.03.88

LOCKSLEY E. McGANN, HONGYOU YANG, MICHELE L. WALTERSON SITES OF FREEZING INJURY IN MAMMALIAN CELLS

*Department of Pathology, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada;
Jiamusi Medical College, Jiamusi, China; Skin Bank, University of Alberta
Hospital, Edmonton, Alberta, Canada*

The nature of damage immediately after thawing was investigated by monitoring several functional tests of the cell and the plasma membrane. Three cell types (hamster fibroblasts, human lymphocytes, and granulocytes) were cooled in the absence of cryoprotective compound at 1 °C / min to temperature between — 10 and —40 °C, then either warmed directly in water at 37 °C or cooled rapidly to —196 °C before rapid warming. After thawing, cells were assessed using 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) for mitochondrial function, fluorescein diacetate (FDA), colony growth, and the ability to respond osmotically in a hypertonic solution. Cells behaved as osmometers after cooling at 1 °C/min to low temperatures at which there were no responses measured by other assays, demonstrating that the plasma membrane retained its semipermeable properties, and is therefore not a primary site for injury sustained during slow cooling. These results also indicate that the FDA test does not measure membrane integrity, but reflects the specific permeability of the plasma membrane to fluorescein.

УДК 57.043 : 612.11 : 536.54

*А. М. Воротилин, А. В. Зинченко, В. А. Мусеев,
Л. П. Подопригора*

МЕХАНИЗМ ПОВРЕЖДЕНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ РАЗМОРАЖИВАНИИ

Изучали влияние режимов замораживания и нагрева на сохранность эритроцитов в защитных средах на основе 1,2-пропандиола (1,2-ПД) и глицерина. В бинарных системах «вода — 1,2-ПД» и «вода — глицерин» методом дифференциальной сканирующей калориметрии найдены диапазоны концентраций, в которых метастабильные аморфные состояния растворов устойчивы. Такие растворы удается перевести в стеклообразное состояние при охлаждении, минуя процесс кристаллизации, который может развиваться в определенном интервале концентраций при нагреве. Для эритроцитов подбирали такие режимы нагрева, чтобы их либо подвергнуть действию кристаллизации на этапе нагрева, либо пройти этот температурный интервал в течение короткого времени. Показано, что степень гемолиза эритроцитов тем больше, чем больше они находятся в температурной зоне кристаллизации.

Среди различных факторов криоповреждения значительное место занимают процессы, связанные с кристаллизацией льда внутри и вне клеток. В некоторых случаях при использовании соответствующих криопротекторов и достаточно быстрого охлаждения удается избежать кристаллизации и перевести консервируемые биологические объекты в твердоаморфное состояние. Однако в таких образцах кристаллизация может развиваться на этапе нагрева и вызвать действие связанных с нею факторов повреждения [8]. Эмпирически установлено, что эффективность криоконсервирования, кроме прочих известных факторов, определяется соотношением скоростей замораживания и нагрева [7]. Количество образовавшегося льда при этом зависит от режимов термической обработки образца. Это в итоге определяет степень воздействия кристаллов льда на клетки, состав и повреждающее действие жидкой фазы при нагреве.

Целью настоящей работы явилось установление взаимосвязи между степенью криповреждения клеток и характером фазовых превращений в замороженных суспензиях на этапе нагрева. Для этого мы исследовали сохранность эритроцитов после замораживания — нагрева в защитных средах на основе 1,2-пропандиола (1,2-ПД) и глицерина. Скорость замораживания образцов изменяли, добиваясь таким способом различного количества аморфного вещества в замороженной матрице, а на этапе нагрева образцы выдерживали в течение различного времени в температурных зонах фазовых переходов. Таким методическим приемом мы определяли вклад фактора повреждения, обусловленного развитием кристаллизации при нагреве.

Информацию о фазовых превращениях в растворах получали, используя метод дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Температурные зависимости теплотогощения (термограммы) регистрировали с помощью калориметра с системой программного регулирования температуры, разработанного в Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР [6]. Максимальная чувствительность прибора составляла около 10^{-5} Вт, погрешности измерения температуры $\pm 0,2$ К. Образцы водных растворов 1,2-ПД и глицерина массой 100 мг охлаждали вне калориметрического блока до температуры 77 К со следующими скоростями ($\text{К} \cdot \text{с}^{-1}$): 3,3; 1,2; 0,3; $3,3 \cdot 10^{-2}$; $3,3 \cdot 10^{-5}$. Охлажденные образцы помещали в контейнер с жидким азотом, быстро переносили в охлажденный до 77 К калориметрический блок и снимали термограммы при нагреве со скоростью $6,67 \cdot 10^{-3} \text{ К} \cdot \text{с}^{-1}$.

Растворы готовили весовым методом, используя глицерин марки «ЧДА», 1,2-ПД марки «Ч» и бидистиллированную воду. Для приготовления суспензии эритроцитов использовали кровь донора, стабилизированную раствором «глюгидир». После центрифугирования и отделения плазмы эритроцитную массу смешивали в соотношении 1 : 1 с криоконсервантом на основе 1,2-ПД (массовая доля): 35 % 1,2-ПД; 3 % сахарозы; 0,6 % NaCl [2] или 30 % глицерина, 4 % маннита, 0,7 % NaCl [1] и охлаждали до 77 К со скоростями порядка 0,216 и $3,3 \text{ К} \cdot \text{с}^{-1}$, затем нагревали со средней скоростью $3,7 \cdot 10^{-2} \text{ К} \cdot \text{с}^{-1}$ до различных температур с последующим быстрым размораживанием в водяной бане с температурой 318 К. Степень повреждения клеток после размораживания оценивали фотокалориметрическим методом по выходу гемоглобина в надосадочную фракцию.

На рис. 1 и 2 представлены диаграммы физического состояния водных растворов глицерина и 1,2-ПД, построенные на основании термограмм, снятых при нагреве. Цифрами на диаграммах отмечены скорости охлаждения. Диаграммы отражают закономерности образования стеклообразных, кристаллических и жидких фаз в широком диапазоне концентраций и температур, а также влияние режима охлаждения на кристаллизацию льда в исследуемых системах. Как указывалось ранее [4,5], линия 1 на диаграммах соответствует расстеклованию, т. е. возникновению трансляционных и вращательных движений молекул; линия 2 — кристаллизации льда из аморфной фазы при нагреве; линия 3 соответствует завершению кристаллизации льда на этапе нагрева; линия 4 — плавлению системы. Ниже линии 1 эти растворы находятся в твердом состоянии и представляют собой смесь кристаллов льда и стеклообразных включений. Такое расслоение наблюдается вплоть до концентраций 31,9 % 1,2-ПД и 42 % глицерина. При дальнейшем увеличении концентрации криопротекторов растворы затвердевают в аморфном состоянии. Выше линии 1 твердоаморфные растворы переходят в состояние переохлажденной жидкости. Выше линий 2 и 3, после завершения кристаллизации, системы расслаиваются на кристаллическую фазу и переохлажденный раствор, состав которого близок к эвтектическому. При температурах $223 \pm 233 \text{ К}$ в системах «вода — глицерин» и «вода — 1,2-ПД», согласно данным рентгенографии [5], наблюдается рекристаллизация льда. Выше линии 4 система находится в жидком состоянии.

В отличие от системы «вода — 1,2-ПД», система «вода — глицерин» при охлаждении полностью переходит в стеклообразное состояние при более высоком содержании глицерина — 42 %. Этот факт указывает на то, что последняя система менее стабильна в аморфном состоянии.

В связи с тем, что в исследуемых системах нас интересовали неравновесные состояния ниже «ликвидус» и концентрационные диапазоны их существования, мы исследовали бинарные системы «вода — глицерин» и «вода — 1,2-ПД», охлаждая их с различными скоростями. Из рис. 1 видно, что с понижением скорости охлаждения концентрационные области существования неравновесных стеклообразных состояний сужаются. Например, при уменьшении скорости охлаждения водных растворов 1,2-ПД до $3,3 \times 10^{-2} \text{ К} \cdot \text{с}^{-1}$ на диаграмме исчезает линия 3; это говорит о том, что процесс кристаллизации льда завершился полностью на этапе охлаждения. При охлаждении этих же растворов со скоростью $3,3 \cdot 10^{-3} \text{ К} \cdot \text{с}^{-1}$ на диаграммах исчезает линия 2, что также указывает на то, что вода закристаллизовалась еще при охлаждении. Однако несмотря на столь низкую скорость охлаждения, при низких температурах в системах присутствует стеклообразная фаза. Таким образом, изучаемые системы в этих условиях остаются неравновесными.

В отличие от системы «вода — 1,2-ПД», в системе «вода — глицерин» при снижении скорости замораживания до $3,3 \cdot 10^{-3} \text{ К} \cdot \text{с}^{-1}$ процесс кристаллизации на этапе замораживания не завершается и линии 2 и 3 на диаграммах не исчезают. Этот факт указывает, вероятно, на то, что на структуру данных

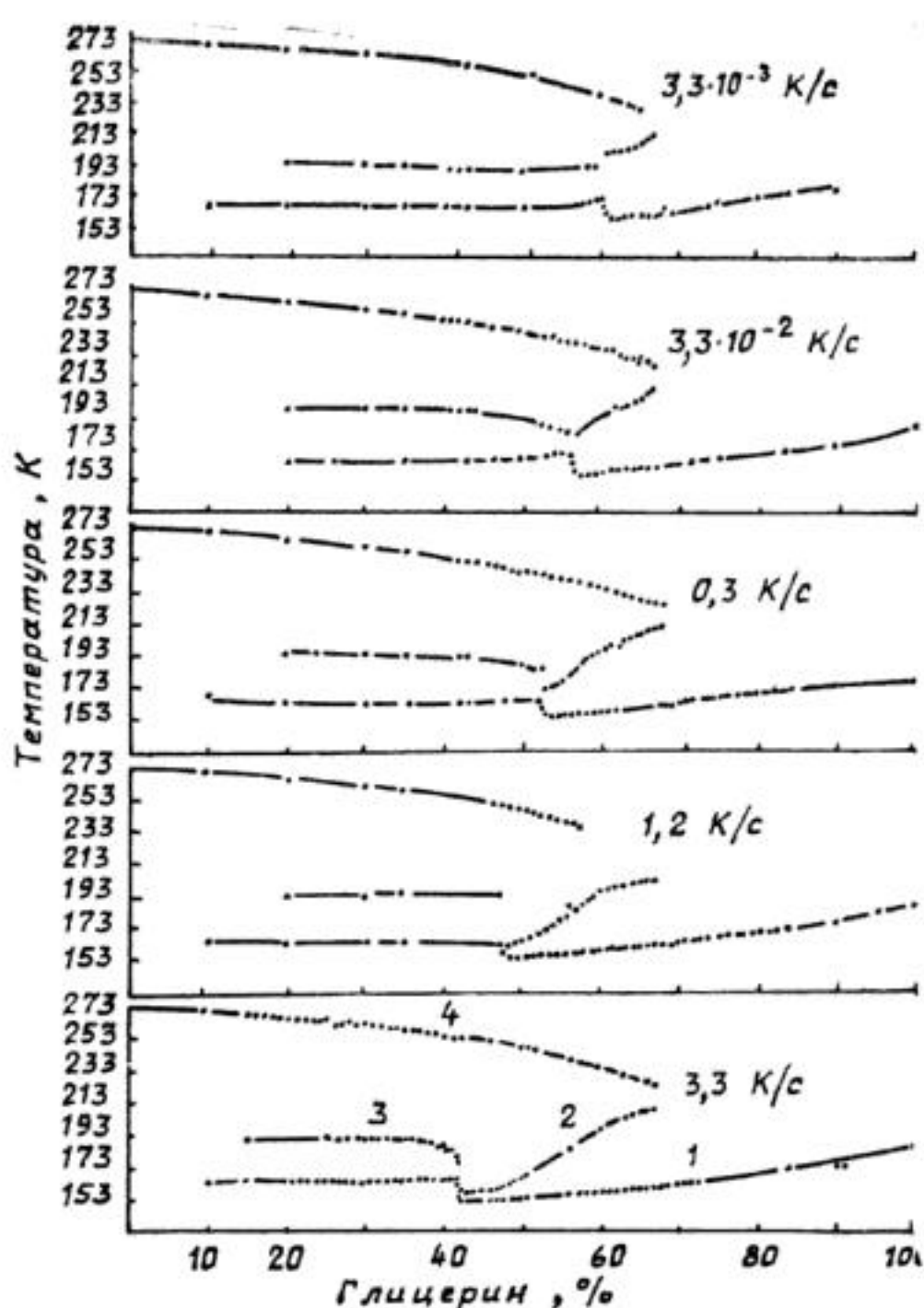


Рис. 1. Диаграмма физических состояний системы «вода — глицерин». Пояснения в тексте

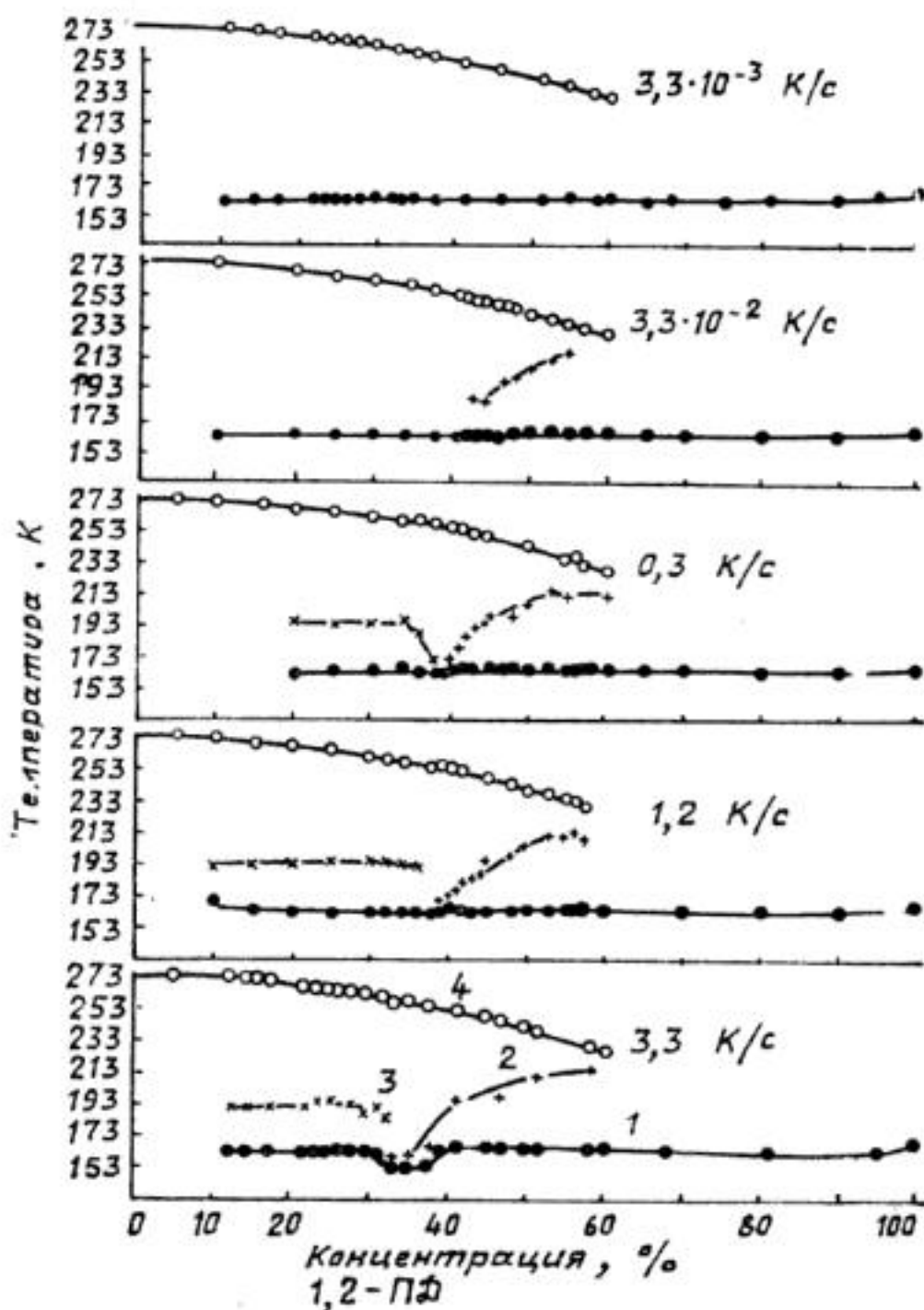


Рис. 2. Диаграмма физических состояний системы «вода — 1,2-ПД». Пояснения в тексте

Растворы оказывают влияние не только скорости охлаждения, но и межмолекулярные взаимодействия, а также конформация растворенных веществ. Отличие в поведении растворов 1,2-ПД можно объяснить несимметричной формой молекул 1,2-ПД, в результате чего образуются клатраты несимметричной формы, для которых кристаллизация при охлаждении затруднена.

Как в растворах криопротекторов, так и в суспензиях эритроцитов в присутствии глицерина и 1,2-ПД в области температур 77—153 К отсутствуют какие-либо превращения, которые можно было бы зарегистрировать по сопровождающим их тепловым эффектам. При нагреве выше температуры стеклования эритроциты подвергаются влиянию происходящих в растворах физических процессов, температурные зоны которых отражены на

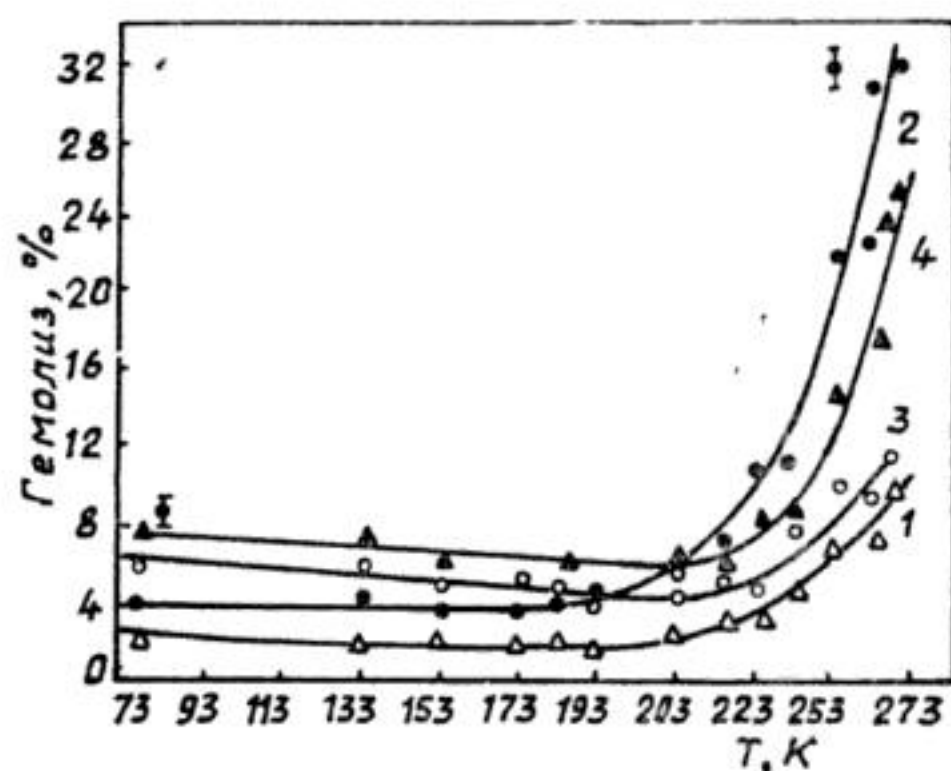


Рис. 3. Влияние скорости охлаждения на гемолиз эритроцитов при медленном нагреве со скоростью $3,7 \cdot 10^{-2} \text{ К} \cdot \text{с}^{-1}$: 1 и 4 — под защитой 1,2-ПД; 2 и 3 — под защитой глицерина. Скорости охлаждения: 1 и 3 — $0,216 \text{ К} \cdot \text{с}^{-1}$; 2 и 4 — $3,3 \text{ К} \cdot \text{с}^{-1}$

диаграммах. Для установления повреждающего действия этих факторов на эритроциты в присутствии 1,2-ПД или глицерина исследовали изменение степени гемолиза в зависимости от скорости охлаждения суспензий клеток. Для этого образцы объемом 1,5 мл охлаждали с указанными выше скоростями, затем медленно нагревали до различных температур в интервале от 77 К до 273 К с последующим быстрым размораживанием образцов в водяной бане. Зависимости степени гемолиза от скорости охлаждения эритроцитов под защитой глицерина или 1,2-ПД во всем температурном диапазоне представлены на рис. 3. Как видно из рис. 3, уровни гемолиза при медленном нагреве

до температуры 193 К практически не изменяются и связано это, вероятно, с отсутствием фазовых переходов в растворах. Наблюдаемый при этом гемолиз обусловлен предшествующим замораживанием и последующим быстрым размораживанием клеток. Некоторое уменьшение гемолиза после медленного нагрева до 173—213 К обусловлено, вероятно, частичным исключением повреждений клеток термомеханическими напряжениями, возникающими в объеме при быстром размораживании образца [3].

В суспензиях, охлажденных со скоростью $3,3 \text{ К} \cdot \text{с}^{-1}$, гемолиз в области фазовых переходов (выше 193 К) резко возрастает (рис. 3, кривые 4 и 2), в то время как после охлаждения со скоростью $0,216 \text{ К} \cdot \text{с}^{-1}$ наблюдается гораздо меньший рост гемолиза (рис. 3, кривые 1 и 3). Объяснением этого факта может служить то, что при медленном охлаждении вся вода, за исключением эвтектического состава, кристаллизуется, а та часть воды, которая входит в эвтектический состав, прочно связана с криопротектором и стеклует вместе с ним. Эритроциты, вытесненные при медленном замораживании в аморфную фазу, подвергаются значительно меньшему влиянию процессов кристаллизации при нагреве, в то время как при быстром охлаждении не вся вода успевает закристаллизоваться; докристаллизация ее происходит при медленном нагреве, и клетки повреждаются в большей степени. В суспензиях эритроцитов под защитой 1,2-ПД (рис. 3, кривые 1 и 4) гемолиз при медленном нагреве начинает расти при температуре выше 213 К и увеличивается в меньшей степени по сравнению с замораживанием под защитой глицерина. Этот факт обусловлен, вероятно, более высокой стабильностью растворов 1,2-ПД при низких температурах по сравнению с растворами глицерина (рис. 1 и 2).

Таким образом, резкое увеличение гемолиза после быстрого охлаждения и медленного нагрева в области фазовых переходов можно объяснить повреждением клеток кристаллами льда из-за незавершенности процессов кристаллизации при быстром охлаждении и интенсивном ростом кристаллов льда при нагреве.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аграненко В. А., Федорова Л. И. Замороженная кровь и ее клиническое применение.— М.: Медицина, 1983.— 96 с.
2. Воротилин А. М. Замораживание клеток крови до -196°C под защитой низкомолекулярных гликолей и глицерина. Повышение эффективности криоконсервации / Криобиология.— 1985.— № 3.— С. 15—20.
3. Воротилин А. М., Зинченко А. В., Моисеев В. А., Аненко В. И. Влияние механического фактора на повреждение клеток при нагреве // Там же.— 1988.— № 3.— С. 31—35.
4. Зинченко А. В., Манк В. В., Овчаренко Ф. Д. и др. Строение и фазовые состояния водно-глицериновых растворов // Докл. АН УССР. Сер. Б.— 1982.— № 8.— С. 38—42.
5. Зинченко А. В., Манк В. В., Моисеев В. А. и др. О фазовых переходах и физических состояниях системы вода — пропандиол // Докл. АН УССР.— 1983.— 296, № 1.— С. 144—146.
6. Зинченко А. В., Моисеев В. А. Исследование низкотемпературных фазовых переходов в водных растворах ПЭГ-400 калориметрическим методом // Криобиология и криомедицина.— 1979.— Вып. 5.— С. 27—30.
7. Недельский Г. Т., Рождественская М. А., Михнович Е. П. и др. Разработка оптимальных режимов криоконсервации эритроцитов // Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины.— Киев: Наук. думка, 1974.— С. 164—167.
8. Nei T. Growth of ice crystals in frozen specimens // J. Microsc.— 1973.— 99, N 2.— P. 227—233.

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

Поступила 19.01.8

A. M. VOROTILIN, A. V. ZINCHENKO, V. A. MOISEYEV, L. P. PODOPRYGORA
A MECHANISM OF ERYTHROCYTE DAMAGE UPON THAWING

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

The effect of freeze — thawing regimes on the preservation of erythrocytes in protective media containing 1,2-propane diol (1,2-PD) and glycerol was studied. The concentration ranges in which metastable amorphous solutions became stable are found for such binary systems as water — 1,2-PD and water — glycerol using differential scanning calorimetry. The solutions can be taken into glass upon cooling without crystallization which may develop in a definite concentration range on warming. For erythrocytes, the warming regimes were selected so that to induce crystallization during warming or to pass this temperature range as soon as possible. It has been shown that the longer the period of exposition of erythrocytes in the crystallization range, the higher the extent of hemolysis.

УДК 612.014.43

С. И. Ткаченко, Т. Н. Юрченко, В. Ф. Козлова

ДИНАМИКА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК СЕРДЦА ПРИ ОБЩЕЙ ГИПОТЕРМИИ

Изучение морфологических и функциональных характеристик сердца на этапах гипотермии показало, что общее охлаждение организма сопровождается качественными изменениями сердечной деятельности на всех уровнях организации с разворачиванием комплекса компенсаторно-приспособительных реакций и в некоторых случаях с развитием дистрофии кардиомиоцитов. Восстановление проводимости по сердечной мышце после гипотермического воздействия происходит на органном уровне в течение самосогревания, в то время как структурные характеристики миокарда на тканевом и ультраструктурном уровнях приближаются к контролю только на 3—7 сут.

Одной из актуальных задач криобиологии и криомедицины является изучение действия охлаждения на биологические системы, в том числе и на сердечно-сосудистую.

Сведения, приведенные в научной литературе, посвященной проблеме реактивных изменений сердца в ответ на гипотермию, характеризуют в основном функциональные изменения [2,3], морфологические данные носят фрагментарный характер [4,6].

В связи с этим целью настоящего исследования явилось изучение морфологических и функциональных характеристик сердца на этапах гипотермии и в восстановительном периоде.

Эксперименты проводились на крысах-самцах линии Вистар массой 180—230 г. В каждой группе 3—5 животных. Гипотермия осуществлялась предварительным введением нейроплегической смеси, состоящей из амина-



Рис. 1. Динамика биоэлектрической активности сердца в течение гипотермии

зина, пипольфена и дополнительно оксибутирата натрия, что позволило вызвать неглубокий наркоз при минимальной дозе препаратов [2] и понижение ректальной температуры (РТ) через 20—40 мин на $2 \div 4^\circ\text{C}$. Через 30 мин после введения (максимум действия смеси) животных фиксировали на иммобилизационном столике и помещали в холодовую камеру (температура воздуха $2 \div 6^\circ\text{C}$) до достижения РТ30 ($30,5 \div 29$) и 20 ($20,5 \div 18$) $^\circ\text{C}$. В течение охлаж-

дения производилась термометрия и запись биоэлектрической активности сердца электрокардиографом ЭКІК-01. Контролем служили животные, которым вводились вышеуказанные препараты и которые находились при комнатной температуре.

Другая серия экспериментов заключалась в изучении реакции сердца на этапе самосогревания и через 1, 3, 7 сут после гипотермии.

По окончании эксперимента, т. е. при достижении необходимой РТ, животных забивали декапитацией. Для микроскопического исследования кусочки миокарда левого желудочка фиксировали в 10 %-ном растворе нейтрального формалина с последующей окраской гематоксилином и эозином, прямым красным, альциановым синим и реактивом Шиффа по Моури. Часть гистологических препаратов окрашивали пикросириусом красным и последующим проведением топооптического анализа межклеточного вещества соединительной ткани с определением степени рефракции. Для электронной микроскопии иссекали папиллярную мышцу левого желудочка и обрабатывали по общепринятой методике с заключением в эпон-аралдитовую смесь, после чего исследовали в электронном микроскопе ЭМ-125. Микрофотографии объектов подвергали морфометрии [1]. Статистическая обработка полученных данных осуществлялась по программе Stat, разработанной в ВЦ ИПКиК АН УССР.

В результате проведенного исследования установлено, что гипотермия у животных развивалась со скоростью $(0,27 \pm 0,06)^\circ\text{C}/\text{мин}$ до РТ 30°C и $(0,109 \pm 0,023)^\circ\text{C}/\text{мин}$ до 20°C .

Биоэлектрическая активность сердца изменялась в зависимости от глубины гипотермии. При гипотермии 30°C происходило уменьшение частоты сердечных сокращений в среднем от 400 до 330, удлинение предсердной

(зубец *P*), атриовентрикулярной (интервал *PQ*), внутрижелудочковой проводимости (комплекс *QRS*) (рис. 1).

При патологоанатомическом вскрытии у животных 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.

При световой микроскопии наблюдалось умеренное полнокровие сосудов миокарда, некоторое разрыхление мышечных волокон. Местами встречались кардиомиоциты (КМЦ) с потерей поперечной исчерченности, очаговой гомогенизацией саркоплазмы. Ядра КМЦ заметно контурировались и хорошо прокрашивались гематоксилином, хотя некоторые из них были увеличены в размере, имели диффузно просветленную нуклеоплазму. Большинство КМЦ сохраняло характерную структуру: фибриллярность мышечных волокон была хорошо выражена, они равномерно окрашивались гематоксилином и эозином.

Электронномикроскопически при охлаждении организма до 30 °С, по сравнению с контролем, отмечались изменения ультраструктур КМЦ в виде умеренного набухания части митохондрий с «размытостью» контуров крист, некоторые миофибриллы были в состоянии пересокращения, уменьшено количество гранул гликогена, расширены каналцы *T*-системы. Местами миофибриллы были разволокнены, в этих же клетках отмечалась в ряде митохондрий очаговая деструкция крист. Капилляры в большинстве случаев тесно прилегали к КМЦ, в некоторых участках миокарда происходило незначительное увеличение перикапиллярного пространства. Разрывов мембран эндотелиальных клеток микроциркуляторного русла миокарда и КМЦ не наблюдалось.

Глубокая гипотермия (20 °С) сопровождалась значительным нарушением деятельности сердечно-сосудистой системы и организма в целом. Это преимущественно проявлялось в повреждении гистогематических барьеров, повышении проницаемости сосудов, плазморрагиях, скоплении трансудата в грудной и брюшной полостях, кровенаполнении внутренних органов с признаками паренхиматозной дистрофии, что обусловлено развивающейся централизацией кровообращения и гиперволемией. Сердце было несколько увеличено в объеме, темно-вишневого цвета, в полостях сердца и крупных сосудах имелась темная кровь, более густая, чем в контроле. Полости сердца умеренно расширены. В некоторых случаях под эпикардом отмечались единичные мелкоточечные кровоизлияния.

Исследование данных электрокардиографии позволило установить удлинение проводимости по миокарду в 1,7—2 раза, по сравнению с контрольной группой, при сохранении синусного ритма (рис. 1). Это сопровождалось уменьшением амплитуды, расширением на ЭКГ зубца *P*, интервала *PQ*, комплекса *QRS*, смещением сегмента *ST* кверху, инверсией зубца *T*, причем в большей степени увеличивалась атриовентрикулярная проводимость (в 2 раза и более). Изучение биоэлектрической активности сердца при гипотермии показало, что наряду с постепенным изменением электрокардиографических параметров при 26 ÷ 24 °С отмечается и их качественное различие. Это выражается в изменении внутрипредсердной проводимости с чередованием узких и высоких зубцов *P* с широкими и пологими. Изменение конфигурации зубца *P*, носящее интермиттирующий характер, появляясь в районе 25 °С, исчезает при дальнейшем охлаждении до 24 ÷ 22 °С и, вероятно, может рассматриваться как часть компенсаторно-приспособительной реакции сердца на гипотермию. Необходимо заметить, что температура тела при гипотермии около 25 °С [3,4] является пределом устойчивого функционирования сердца, отделяет умеренную гипотермию от глубокой и сопровождается перестройкой структурных и функциональных характеристик.

При исследовании на светооптическом уровне глубокая гипотермия характеризуется преимущественно отеком как мышечных клеток, так и стромы

миокарда. Отмечалось неравномерное наполнение сосудов с явлениями полнокровия и стаза, расширение околососудистых пространств в эндо- и перимизии с элементами мукоидного набухания. Встречались мышечные клетки с неравномерной окраской эозином, исчезновением поперечной исчерченности, признаками зернистой дистрофии. Часть мышечных волокон была разрыхлена, промежутки между ними увеличены. Строма миокарда была отеочной и разволокненной. При исследовании состояния межклеточного вещества соединительной ткани отмечалось падение степени рефракции в 1,5—1,8 раза, причем в большей мере в околососудистой зоне. Падение степени рефракции свидетельствует о нарушении ориентационной упорядоченности макромолекул коллагена и отражает дезорганизацию соединительнотканых структур миокарда, что сказывается на обменных процессах в системе кровь — ткань.

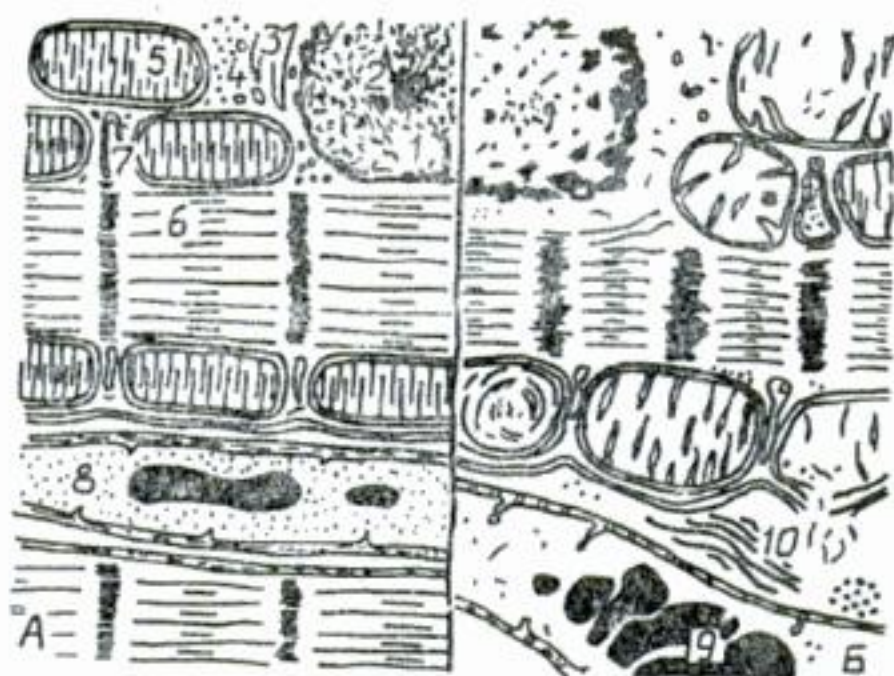


Рис. 2. Схематическое изображение изменений ультраструктуры КМЦ при глубокой гипотермии (20 °C): А — контроль; Б — гипотермия; 1 — ядро; 2 — ядрышко; 3 — аппарат Гольджи; 4 — гликоген; 5 — митохондрии; 6 — миофибриллы; 7 — Т-система; 8 — капилляр; 9 — эритроциты; 10 — коллагеновые фибриллы

распределения глыбок хроматина вдоль нуклеолеммы. Митохондрии набухшие, матрикс их просветлен, пространство внутри крист расширено. Кристы некоторых митохондрий принимали дугообразную или кольцевидную форму. У ряда КМЦ наблюдалась очаговая деструкция крист митохондрий, фрагментация и разрушение как наружных, так и внутренних мембран митохондрий. Помимо изменения состояния митохондрий с увеличением объемной плотности этих органелл на 8—10 %, происходило нарушение структуры миофибрилл с уменьшением их объемной плотности на 5—6 % по сравнению с контролем. При этом нарушалась продольная ориентация миофибрилл, увеличивалось расстояние между ними, местами отмечалось разволокнение миофиламентов на уровне Z-полос и вставочных дисков. Часть саркомеров миофибрилл находилась в состоянии пересокращения, при этом соседние участки растянуты. Канальцы саркоплазматического ретикулума были расширены, местами разрушены и вакуолизированы. Трубочки и каналы Т-системы клеток расширялись. В некоторых КМЦ наблюдалась дезорганизация и распад Т-трубочек, в связи с чем они с трудом идентифицировались. Во всех КМЦ резко уменьшалось количество гранул гликогена и цитоплазматических гранул (рис. 2).

Наряду с повреждением структуры КМЦ, существенные изменения происходили в системе микроциркуляции миокарда. Деформация просвета капилляров сочеталась с нарушением структуры эндотелиальных клеток. В просвете капилляров отмечалась агрегация эритроцитов (от 3—4 до 10—15) в виде «монетных столбиков». При этом наблюдалось увеличение деформированных форм эритроцитов. Повышение проницаемости капил-

Электронномикроскопическое изучение позволило дать более подробную, чем световая микроскопия, характеристику влияния глубокого охлаждения (РТ 20 °C) на структуру миокарда. Отмечалась взаимосвязь нарушений системы микроциркуляции и КМЦ. В общей картине преобладали признаки вне- и внутриклеточного отека. Некоторые КМЦ как бы окружены отеочной жидкостью: в которой находились остатки мембранных образований. У единичных КМЦ можно было наблюдать деформацию и разрыв сарколеммы, выход фрагментов мембран и продуктов диссоциации органелл в межклеточное и перикапиллярное пространство.

Отмечалось изменение ядер в виде разрежения карิโอплазмы,

лярной стенки сопровождалась наличием единичных свободнолежащих митохондрий в просвете капилляра, а также выходом форменных элементов крови из сосудистого русла. В перикапиллярном пространстве, расширенном за счет отека, отмечалось увеличение количества микрофибрилл коллагена, пучки коллагеновых фибрилл были раздвинуты (рис. 2). В околососудистой зоне некоторые фибробласты, окруженные пучками коллагеновых фибрилл, находились в активном состоянии.

По нашему мнению, нарушение ориентации коллагеновых волокон, отмечаемое при поляризационной микроскопии, расширение перикапиллярного пространства, разволокнение коллагеновых фибрилл и увеличение количества микрофибрилл, наряду с нарушением проницаемости капиллярной стенки и сарколеммы КМЦ, приводит к нарушению перикапиллярного и интерстициального транспорта веществ и, как следствие, к нарастанию

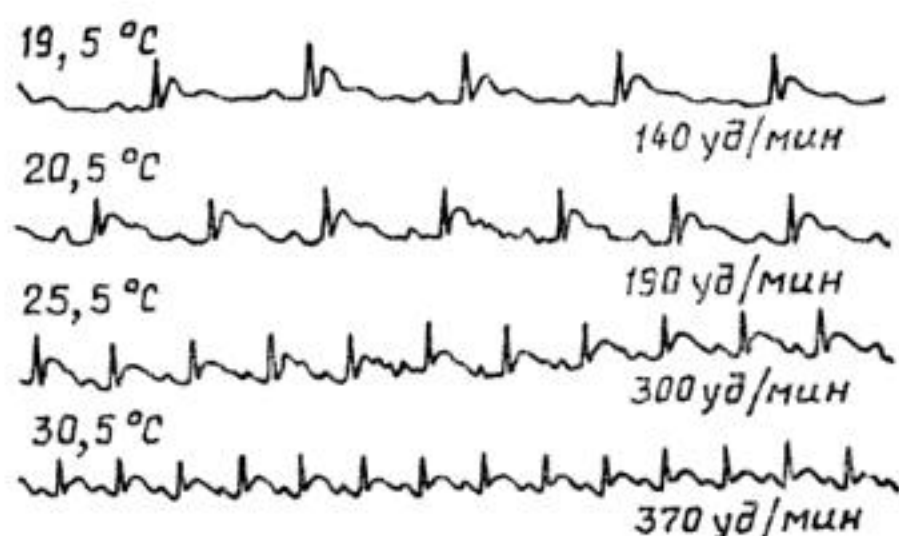


Рис. 3. Динамика биоэлектрической активности сердца при самосогревании после гипотермического воздействия

Рис. 4. Микрофотография участка КМЦ через 7 сут после общего охлаждения. Нормализация структуры КМЦ. $\times 4000$

паренхиматозной дистрофии, ухудшению функционирования КМЦ и сердца в целом, что согласуется с данными других авторов [5, 6, 7].

В течение самосогревания до $PT\ 28 \div 30\ ^\circ C$ при комнатной температуре происходит постепенное восстановление сердечной проводимости с приближением электрокардиографических показателей к контролю (рис. 3) через 4,5—5 ч у подопытных животных.

Уже через сутки отмечается значительное улучшение морфофункциональных характеристик миокарда. Отек ткани гораздо менее выражен, восстанавливается структура органоидов КМЦ. Капилляры тесно прилегают к КМЦ, хотя в некоторых участках отмечаются признаки отека, нарушения ориентации коллагеновых волокон, увеличение межклеточных промежутков. Через 3 и 7 сут после гипотермического воздействия происходит нормализация структуры миокарда на всех изучаемых уровнях организации. При этом восстанавливается послойное расположение митохондрий и миофибрилл, увеличивается количество гранул гликогена, особенно в области ядра, которое в ряде случаев приобретает лопастную форму (рис. 4), в околоядерной зоне увеличивается число свободных рибосом и цепочек полирибосом, что позволяет предположить усиление активации биосинтетических процессов в КМЦ.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что общее охлаждение организма сопровождается качественным изменением сердечной деятельности на всех уровнях организации с развертыванием комплекса компенсаторно-приспособительных реакций и в некоторых случаях с развитием дистрофии КМЦ. Восстановление проводимости по сердечной мышце после гипотермического воздействия происходит на органном уровне в течение самосогревания, в то время как структурные характеристики миокарда на тканевом и ультраструктурном уровнях приближаются к контролю только на 3—7 сут.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Автандилов Г. Г., Невзоров В. П., Невзорова О. Ф. Системный стереометрический анализ ультраструктур клеток.— Кишинев: Штиинца, 1984.— 168 с.
2. Марфина Л. Л. Опыт получения искусственного гипобиоза у крыс: Автореф. дис. . канд. биол. наук.— М., 1970.— 14 с.
3. Покровский В. М., Шейх-Заде Ю. Р., Воверейдт В. В. Сердце при гипотермии.— Л: Наука, 1984.— 141 с.
4. Сумбатов Л. А. Искусственная гипотермия.— М.: Медицина, 1985.— 85 с.
5. Чернух А. М., Александров П. Н., Алексеев О. В. Микроциркуляция.— М.: Медицина, 1984.— 432 с.
6. Black P. R., Devanter S. V., Cohn L. H. Effects of hypothermia on systematic and organ metabolism and function // J. Surg. Res.— 1976.— 20, N1.— P. 49—63.
7. Zarins C. K., Skinner D. V. Circulation in profound hypothermia // J. Surg. Res.— 14, N 1.— P. 97—104.

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

Поступила 24.11.89

S. I. TKACHENKO, T. N. YURCHENKO, V. F. KOZLOVA

THE DYNAMICS OF MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL PARAMETERS OF THE HEART UPON TOTAL HYPOTHERMIA

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

Morphological and functional parameters of the heart during hypothermia show that total cooling of the body is accompanied by qualitative changes of the heart activity at all levels of organization along with development of compensatory and adaptive reactions and sometimes with dystrophia of cardiomyocytes. Reparation of the coronary muscle conductivity after hypothermal application occurred at the organ level during self-rewarming, while structural parameters of myocardium approached to the control value at the tissue and ultrastructural levels only in 3 to 7 days.

УДК 616.127-005.8 : 615.832.9 : 616-003.96

**А. Ф. Яковцова, Н. Н. Питенько, В. С. Васюта, В. Д. Марковский,
В. В. Невзоров**

КОМПЕНСАТОРНО-ПРИСПОСОБИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В МИОКАРДЕ ПРИ ИНФАРКТЕ В УСЛОВИЯХ КРАНИОЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ГИПОТЕРМИИ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Краниocereбральная гипотермия ($32 \div 30^\circ\text{C}$ в течение 6 ч), проводимая в первые часы при экспериментальном инфаркте миокарда и в течение первых суток после него, замедляя процессы метаболизма, создает благоприятные условия для восстановления структуры кардиомиоцитов и уменьшает очаг некроза в 3,2 раза за счет сокращения перинфарктной зоны. Проведенное исследование при дальнейшей разработке позволит обосновать рациональное и адекватное применение краниocereбральной гипотермии в клинике для лечения больных инфарктом миокарда.

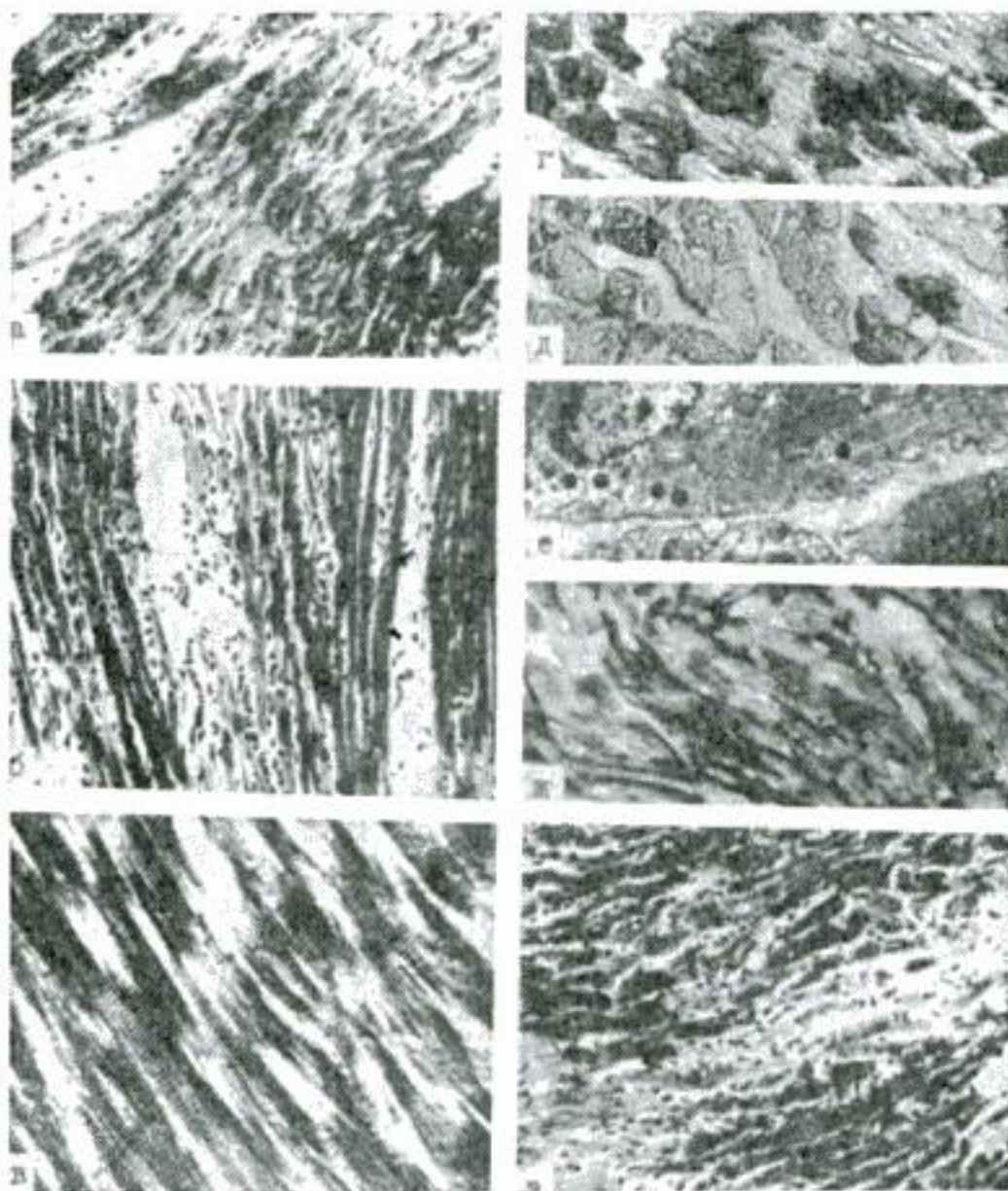
В настоящее время наряду с исследованиями лекарственных препаратов, направленными на повышение устойчивости организма и его систем к гипоксии, ведутся работы по использованию немедикаментозных средств для снижения интенсивности метаболических процессов в миокарде с целью уменьшения зоны ишемии и стабилизации размеров инфаркта миокарда [1, 2, 3]. К немедикаментозным средствам относится и краниocereбральная гипотермия (КЦГ).

Настоящее исследование предпринято с целью изучения компенсаторно-приспособительных процессов (КПП) в миокарде белых крыс при экспериментальном некрозе его в условиях КЦГ. Материалом исследования по-

служили 60 сердец беспородных белых крыс с экспериментальным инфарктом миокарда (ЭИМ) и ЭИМ + КЦГ. ЭИМ воспроизводился путем перевязки нисходящей ветви левой межжелудочковой венечной артерии. Спустя 6 ч — 2 сут после воспроизведения модели ЭИМ животные подвергались действию КЦГ в среднем режиме ($32 \pm 30^\circ\text{C}$) в течение 6 ч. Забой крыс производили через 30 мин — 2 сут после эксперимента.

Применен комплекс морфологических методов исследования: гематоксилин-эозин, пикрофуксин по ван Гизону; специальные гистологические методы для определения ранних стадий повреждения кардиомиоцитов (КМЦ): железный гематоксилин по Гейденгайну, Рего, основной функции по Ли; гистохимическое определение общего белка по Даниелли, гликогена

Морфологические изменения в миокарде при инфаркте его и КЦГ: а — обратимые повреждения кардиомиоцитов. Окраска по Ли. $\times 180$; б — очаговый сладж-феномен. Окраска по Ли. $\times 180$; в — снижение реакции на общий белок в кардиомиоцитах. Реакция Даниелли. $\times 400$; г — уменьшение гликогена в кардиомиоцитах. Реакция по Шабадашу. $\times 400$; д — почти полное исчезновение гликогена в кардиомиоцитах. Реакция по Шабадашу. $\times 400$; е — перинуклеарный отек кардиомиоцита. Электронограмма. $\times 15000$; ж — снижение реакции на щелочную фосфатазу в капиллярах. Реакция по Гомори. $\times 400$; з — четкая граница зоны некроза. Окраска по Ли. $\times 180$



по Шабадашу, гликозаминогликанов (ШИК+Хейл), РНК по Браше, ДНК по Фельгену; ряда ферментов: сукцинатдегидрогеназы (СДГ), цитратдегидрогеназы (ЦДГ), малатдегидрогеназы (МДГ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-Ф), НАД- и НАДФ-диафораз по Нахласу, щелочной фосфатазы по Гомори. Гистохимические изменения реакций на ДНК и общий белок в миокарде контролировались биохимическими показателями скорости синтеза ДНК и белка в миокарде крыс по методу Каннелля. Для изучения миофибриллярного аппарата и характеристики повреждений КМЦ были использованы поляризационная и фазово-контрастная микроскопия. В части случаев проведено электронно-микроскопическое исследование.

Основные гемодинамические показатели и ЭКГ-контроль исследовались в лаборатории гипотермии Института проблем криобиологии и криомедицины АН УССР.

Для сравнения размеров зоны некроза миокарда (ЭИМ без КЦГ и ЭИМ + КЦГ) и определения достоверности положительного эффекта КЦГ при ЭИМ нами предложен фоторепродукционный способ выявления зоны некроза миокарда крыс на послойных гистотопограммах. Гистологические срезы окрашивались железным гематоксилином по Рего с последующим планиметрическим исследованием их (макро-микроскопический, серийно-планиметрический способ определения относительного объема зоны некроза миокарда).

Нами показано, что КЦГ, проводимая в среднем режиме ($32 \pm 30^\circ\text{C}$) в течение 6 ч, обладает оптимальным кардиопротекторным действием, что соответствует данным литературы [2].

У экспериментальных животных с ЭИМ изменения в зоне ишемии в основном соответствовали известной стадийности ферментативной активности, описанной при «чистом» ЭИМ [3].

У крыс с ЭИМ+КЦГ спустя 6 ч после 6-часовой гипотермии были обнаружены различия в динамике инфаркта миокарда, индуцированные КЦГ. В интрамуральных отделах передней стенки левого желудочка определялась зона инфарктирования с резким снижением активности окислительно-восстановительных ферментов и исчезновением гликогена. Большая часть кардиомиоцитов (КМЦ) зоны ишемии с признаками необратимых контрактурных изменений. Краевые отделы зоны ишемии представлены КМЦ с минимальными обратимыми повреждениями (рисунок, а). Обращает на себя внимание тот факт, что изменения миоциркулярного русла (МЦР) этой зоны хотя и имеются, но меньше, чем при «чистом» ЭИМ. Сосуды капиллярного русла неравномерно расширены с очаговым развитием сладж-феномена (рисунок, б), проницаемость же их стенок выражена меньше. Вокруг ишемического очага изменения определялись преимущественно в сосудистом русле и проявлялись в основном дистонией МЦР. В КМЦ этой зоны КПП выражались равномерным снижением реакции на общий белок (рисунок, в), уменьшением количества гранул гликогена (рисунок, г), равномерным уменьшением активности окислительно-восстановительных ферментов.

К 12 часам эксперимента четко выделялась зона некроза в связи с избирательным окрашиванием некротизированных КМЦ основным фуксином и железным гематоксилином. На гистотопографических срезах сердец крыс очаги некроза четко выявлялись визуально. Спустя 1 сут определялся сформированный участок некроза.

Для планиметрического определения относительного объема некроза сердца крыс фиксировали в 10 %-ном растворе нейтрального формалина и заливали в парафин. Из каждого сердца изготавливали серийные гистотопографические срезы толщиной 5 мк, которые окрашивали железным гематоксилином по Рего. Гистотопографические срезы просматривали при малом увеличении микроскопа, выявляли локализацию участков некроза черного цвета и дифференцировали их от артефактов. Затем срезы помещали в фотоувеличитель. При увеличении в 7 раз непосредственно на фотобумаге получали отпечаток-негатив гистотопографического среза сердца. Для планиметрического исследования использовали две тест-системы с разной постоянной решетки (длина одной стороны квадрата 1 и 0,2 см). Тест-систему накладывали на фотографию всего гистотопографического среза сердца. Подсчитывали N квадратов, полностью лежащих на срезе, и $N_{1/2}$ квадратов, частично совпадающих с площадью среза. Затем по формуле вычисляли площадь среза органа $S_1 = \left(N + \frac{1}{2} N_{1/2} \right) \cdot S_{01}$, где S_1 — площадь среза органа; S_{01} — площадь квадрата тест-системы; N — количество квадратов, полностью располагающихся на площади среза; $N_{1/2}$ — количество квадратов, частично попадающих на площадь среза. S_{01} выбирали таким образом, чтобы на площадь среза сердца ложилось не менее нескольких полных квадратов.

Для определения зоны некроза использовали тест-систему с постоянной решетки 0,2 см и аналогичным образом подсчитывали число квадратов n , полностью, и $n_{1/2}$, частично укладываемых на площади некроза миокарда. Подставляя эти данные в формулу, получали площадь зоны некроза

$$S_2 = \left(n + \frac{1}{2} n_{1/2} \right) \cdot S_{02},$$

где S_2 — площадь зоны некроза миокарда; S_{02} — площадь квадрата тест-системы; n — количество квадратов, полностью располагающихся на зоне

некроза; $n_{1/2}$ — количество квадратов, частично попадающих на площадь некроза.

Так как отношение площадей сечения равно отношению объемных долей фракций, составляющих этот объем, то относительный объем определяли по формуле:

$$V_i = \frac{S_2}{S_1} \cdot 100 \text{ \%}.$$

Вычисляли среднее значение V_i , являющееся относительным объемом для данного случая, по формуле:

$$\bar{x} = \frac{1}{k} \sum_{i=1}^k V_i,$$

где K — число срезов случая. Так, при ЭИМ + КЦГ $\bar{x}_2 = 0,75$, а при ЭИМ $\bar{x} = 2,4$. Таким образом, относительный объем некроза при ЭИМ+КЦГ уменьшился в 3,2 раза по сравнению с относительным объемом при ЭИМ. Это различие является достоверным ($p < 0,001$). Уменьшение размеров некроза миокарда сопровождалось улучшением гемодинамических показателей, что подтверждалось данными ЭКГ.

Под действием КЦГ отмечались изменения во взаимоотношениях между тремя зонами активности окислительно-восстановительных ферментов в зоне инфаркта. Центральная зона уменьшилась, промежуточная (периинфарктная) также сокращалась за счет уменьшения зоны ишемии [1]. В последней изменения имеют менее выраженный характер в сравнении с таковыми при «чистом» инфаркте. Отмечалось равномерное снижение активности ферментов, почти полное исчезновение гликогена (рисунок, *д*). Электронномикроскопически в цитоплазме КМЦ умеренный внутриклеточный отек преимущественно околоядерной зоны (рисунок, *е*), миофибриллы разобщены с сохранением обычного строения. Митохондрии набухшие, гетерогенны, мозаичны. Ближе к зоне некроза встречались группы КМЦ с преимущественно обратимыми контрактурными изменениями, выявляемыми основным фуксином. Изменения МЦР выражались равномерным умеренным снижением тонуса с некоторым разрыхлением и нечеткостью базальных мембран, дающих ШИК-положительную реакцию и слабую реакцию на щелочную фосфатазу (рисунок, *ж*). Межклеточный отек менее выражен (по сравнению с «чистым» ЭИМ) с умеренным содержанием кислых гликозаминогликанов.

Граница между участком некроза и периинфарктной зоной более четкая с видимым переходом необратимых изменений в поверхностные контрактурные изменения в периинфарктной зоне (рисунок, *з*). Отмечено снижение выхода клеточных элементов из капилляров и инфильтрации ими зоны некроза и периинфарктной зоны.

Нами изучена скорость синтеза ДНК и белка в миокарде вышеуказанных двух экспериментальных групп (таблица). Установлено, что скорость синтеза ДНК и белка существенно снижалась по сравнению с ЭИМ и в основном находилась на уровне 6-часовой КЦГ без ЭИМ.

Особый интерес представляли изменения, обнаруженные в предсердиях крыс с ЭИМ+КЦГ. Отмеченные повреждения КМЦ предсердий отличаются как по глубине, так и по распространенности. Среди поврежденных КМЦ преобладающим был миоцитолизис, который сопровождался значительной дистонией капиллярного русла и замедлением кровотока. Количество специфических предсердных гранул резко увеличено. Они гетерогенны и разнятся между собой по размерам и степени электронной плотности. Изменения комплекса Гольджи и специфических гранул сопровождалось разрозненностью элементов и расположением их на значительном удалении от ядра, что, по-видимому, связано с повреждением КМЦ и внутриклеточным отеком. Полагаем, что более выраженные, скорее всего метаболические, изменения преимущественно правого предсердия следует, вероятно, объяс-

Скорость синтеза ДНК и белка в миокарде крыс при ЭИМ и ЭИМ + КЦГ *

Группа	Сравне- ние	Скорость синтеза ДНК, имп/мин · мг ДНК				
		ЛП	ПП	ЛЖ	ПЖ	МЖП
ЭИМ	—	1001±91,6	999±100	985±85,5	1640±100	1260±121,1
ЭИМ + КЦГ	—	410±42,5	796±41,8	350±60,1	495±121,1	560±99,6
	1/2	<0,002	>0,1	<0,001	<0,001	<0,001
Скорость синтеза белка, имп/мин · мг белка						
ЭИМ	—	1340±110	2010±816	1370±91,1	2450±860	1250±21,0
ЭИМ + КЦГ	—	610±91,4	850±61,1	650±91,8	899±61,1	3100±121,0
	1/2	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

* В норме в миокарде скорость синтеза нуклеиновых кислот: ДНК — $950 \pm 14,5$ имп/мин · мг ДНК; белка — $3760 \pm 98,6$ имп/мин · мг белка; ЛП — левое предсердие, ПП — правое предсердие, ЛЖ — левый желудочек, ПЖ — правый желудочек, МЖП — межжелудочковая перегородка.

нить высокой концентрацией и депонированием содержимого специфических гранул до конца воздействия низкой температуры в указанных отделах сердца.

Как показали наши исследования, КПП при ЭИМ с 6-часовой КЦГ проявлялись изменением взаимоотношения в миокарде между тремя зонами активности окислительно-восстановительных ферментов, причем центральная зона (инфаркт) уменьшилась в 3,2 раза за счет сокращения перинфарктной или принекротической зоны, в которой изменения, благодаря кардиопротекторному действию КЦГ, были обратимыми. Граница между зоной некроза и перинфарктной зоной была более четкая с видимым переходом зоны некроза в поверхностные обратимые повреждения перинфарктной зоны с очаговой инфильтрацией демаркационной линии клеточными элементами крови. При «чистом» инфаркте миокарда в указанной зоне преобладали более тяжелые необратимые изменения КМЦ.

В околоинфарктной зоне отмечено снижение скорости синтеза ДНК и белка компенсаторно-приспособительного характера, удерживающегося на уровне КЦГ.

Тяжелые, скорее всего метаболические изменения, преимущественно правого предсердия, следует, очевидно, объяснить высокой концентрацией и депонированием содержимого предсердных гранул до конца действия низкой температуры.

Полученные данные свидетельствуют о том, что КЦГ, проводимая в первые часы при ЭИМ и в течение первых суток после него, может замедлить процессы развития ишемии и некроза миокарда. Это происходит за счет быстрого и значительного угнетения метаболических процессов в ишемизированных и интактных участках миокарда, замедления скорости кровотока, включая МЦР, и синтеза ДНК и белка, тем самым увеличивая порог переносимости гипоксии.

Следовательно, КПП, вызванные КЦГ при ЭИМ, замедляют процессы дистрофии и гибели, чем создают благоприятные условия для внутриклеточной компенсации и более быстрого восстановления структуры мышечных клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арцин Л. И., Бабаева А. Г., Гельфанд В. Б. и др. Структурные основы адаптации и компенсации нарушенных функций: Руководство АМН СССР. — М.: Медицина, 1987. — 448 с.
2. Бабийчук Г. А. Механизмы нейрохимических и патофизиологических процессов в организме животных при краниocereбральной гипотермии: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — Харьков, 1986. — 33с.

3. Струков А. И., Лушников Е. Ф., Горнак К. А. Гистохимия инфаркта миокарда.— М.: Медицина 1967.— 303 с.
4. Яковцова А. Ф., Гейко Д. Е., Питенько Н. Н. и др. Структурно-функциональные изменения в миокарде и синтезе белка при краниocereбральной гипотермии (экспериментальное исследование) // Всесоюз. конф., 2-я, Механизмы криповреждения и криозащиты биологических объектов: Тез. докл.— Т. II.— Харьков: Б. и., 1984.— С. 189.

Харьковский мед. ин-т

Поступила 06.07.88

A. F. YAKOVTSOVA, N. N. PITENKO, V. S. VASUTA, V. D. MARKOVSKY,
V. V. NEVZOROV

COMPENSATORY AND ADAPTIVE PROCESSES IN MYOCARDIUM WITH INFARCTION UNDER CONDITIONS OF CRANIOCEREBRAL HYPOTHERMIA (EXPERIMENTAL STUDY)

Medical Institute of Kharkov

Cranocerebral hypothermia (32 to 30 °C for 3 hr) performed during the first hours of experimental myocardial infarction and for the day after its completion appeared to inhibit metabolic processes and to create favorable conditions for the reparation of cardiomyocyte structure, thus diminishing the necrosis area by 3.2-fold due to a decrease of the peri-infarction zone. Further investigations may allow to substantiate the proper use of cranocerebral hypothermia in clinic for treating patients with myocardial infarction.

УДК 541.117 : 57.043

**И. А. Громченко, А. И. Кукушкин, Б. М. Сергеев,
Г. Б. Сергеев, М. М. Лоевский, Н. Р. Константинова**

КИНЕТИКА ГИДРОЛИЗА П-НИТРОФЕНИЛАЦЕТАТА В ЗАМОРОЖЕННЫХ ВОДНЫХ РАСТВОРАХ, СОДЕРЖАЩИХ КРИОЗАЩИТНЫЕ ДОБАВКИ

В работе проведена оценка физико-химических свойств замораживаемых водных систем с помощью кинетического анализа реакции гидролиза *п*-нитрофенилацетата. Показано, что глицерин стабилизирует *pH* среды, способствуя сохранению компонентов фосфатного буферного раствора в растворенном состоянии. С другой стороны, криопротектор способен активировать гидролитические реакции, что может приводить к частичной деградации биоструктур в присутствии глицерина. Этот факт следует принимать в расчет при определении времени эквilibрации биологического материала в криозащитной среде перед замораживанием.

Для оценки изменений структурно-фазового состояния и физико-химических свойств водных систем в ходе замораживания и понижения температуры может быть использован кинетический метод, основанный на определяющем влиянии физико-химических условий, формирующихся в образцах при низкотемпературном воздействии, на кинетику модельных химических и биохимических реакций [4]. В качестве модельных могут быть рекомендованы реакции гидролиза природных или синтетических субстратов. Преимуществом гидролитических реакций, делающим их чувствительными к изменениям свойств водных систем, является то, что вода участвует в них не только как растворитель, но и как один из реагентов.

В работе для оценки изменений физико-химических свойств водных растворов в области умеренно низких температур в качестве тест-реакции выбран гидролиз *п*-нитрофенилацетата (*п*-НФА). Реакцию изучали в K^+ -фосфатном буферном растворе с добавками глицерина и NaCl — веществ, являющихся составными частями большинства используемых в настоящее время для низкотемпературной консервации крови и ее компонентов криозащитных сред.

Очистка п-НФА, приготовление его исходных растворов и определение их концентраций описаны ранее [6]. Для приготовления растворов использовали $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ и KH_2PO_4 марки «ч.д.а.», NaCl марки «х. ч.», глицерин марки «ч. д. а.» и дважды перегнанную воду. За кинетикой гидролиза п-НФА следили спектрофотометрически по увеличению оптической плотности реакционной смеси на длине волны 400 нм, связанному с накоплением продукта реакции — п-нитрофенола (п-НФ) ($\epsilon_{400}^{п-НФ} = 1,8 \cdot 10^4$ при $pH = 8,5$ [1,8]). Измерения проводили на регистрирующем спектрофотометре «Спекорд М-40» (ГДР). При $T > 273$ К реакцию проводили непосредственно в термостатируемой кювете спектрофотометра. Кинетические кривые гидролиза в замороженных растворах измеряли по точкам, периодически размораживая замороженные образцы, термостатируемые при температуре опыта в криостате МК-70 (ГДР). Точность поддержания температуры составляла в обоих случаях $\pm 0,1$ К.

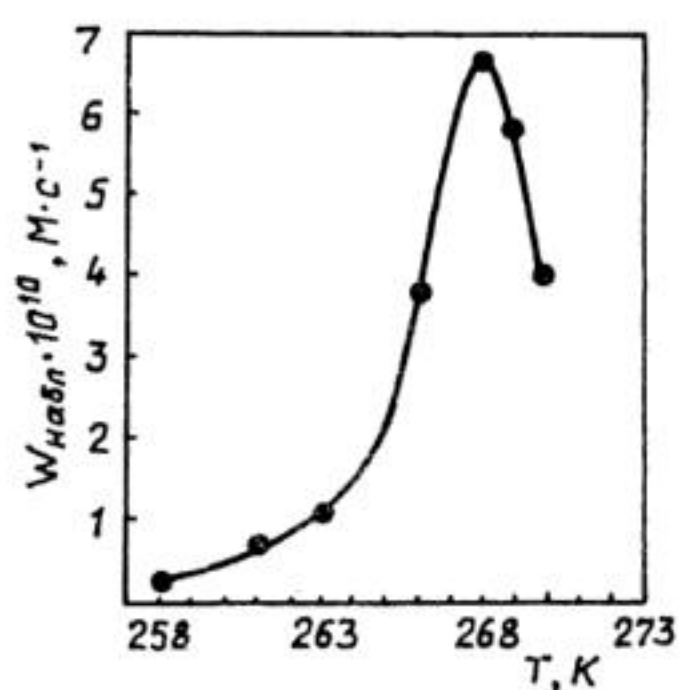


Рис. 1. Температурная зависимость наблюдаемой начальной скорости гидролиза п-НФА в замороженных 0,05 М K^+ -фосфатных буферных растворах ($pH_{298K} = 8,5$). $[п-НФА]_0 = 5 \times 10^{-5}$ М

0,05 М K^+ -фосфатных буферных растворах ($pH_{298K} = 8,5$). Характерная колоколообразная форма зависимости объясняется одновременным и противоположно направленным действием на скорость реакции двух факторов: ускоряющего, связанного с концентрированием п-НФА и катализирующих гидролиз анионов в незамерзающих жидких областях, и тормозящего, обусловленного уменьшением каталитических констант гидролиза при понижении температуры в соответствии с законом Аррениуса [4]. Важно отметить, что, согласно фазовой диаграмме системы $K_2HPO_4 - KH_2PO_4 - H_2O$ [10], ни одна из солей, присутствующих в K^+ -фосфатном буфере ($pH_{298K} = 8,5$), по крайней мере, до 259 К, не кристаллизуется, т. е. все растворенные вещества полностью концентрируются в сосуществующей со льдом жидкой фазе. Существенных изменений pH при этом не происходит [10].

При добавлении в замораживаемый раствор NaCl ситуация меняется: в системе становится возможной кристаллизация не только льда, но и Na_2HPO_4 — наименее растворимой соли из гидро- и дигидрофосфатов натрия и калия. Следствием кристаллизации щелочных компонентов фосфатных буферных растворов является уменьшение их pH и концентрации аниона HPO_4^{2-} [10]. Скорость гидролиза п-НФА в замороженных фосфатных буферных растворах в условиях кристаллизации Na_2HPO_4 должна уменьшаться. Действительно, как видно из рис. 2, на котором приведен график зависимости $W_{набл,0}$ при 268 К от концентрации глицерина, в замораживаемом растворе, содержащем, помимо фосфатов калия, 0,15 М NaCl, в отсутствие глицерина $W_{набл,0} = 3,4 \cdot 10^{-11}$ М · с⁻¹, т. е. почти в 20 раз ниже скорости гидролиза при той же температуре в 0,05 М K^+ -фосфатном буфере без добавок NaCl ($W_{набл,0} = 6,6 \cdot 10^{-10}$ М · с⁻¹). Как видно из

Начальные скорости гидролиза п-НФА ($W_{набл,0}$) определяли по тангенсам углов наклона касательных, проведенных к участкам кинетических кривых, соответствующим 5—10 % превращения. Полученные значения $W_{набл,0}$ использовали для расчета наблюдаемых констант скоростей реакции:

$$K_{набл} = W_{набл,0} / [п-НФА]_0.$$

Результаты измерений обрабатывали по методу наименьших квадратов на миниЭВМ «Электроника ДЗ-28». Ошибки в определении начальных скоростей гидролиза в замороженных растворах составляли ± 15 —20 %.

На рис. 1 приведен график температурной зависимости наблюдаемой начальной скорости гидролиза п-НФА в замороженных

рис. 2, увеличение концентрации глицерина в замораживаемом растворе до $\sim 6\%$ вызывает почти пропорциональное возрастание скорости гидролиза; при более высоких концентрациях глицерина зависимость $W_{\text{набл},0}$ от $[\text{Гл}]_0$ ослабевает.

Для объяснения вида зависимости $W_{\text{набл},0}$ в замороженных растворах от концентрации глицерина (рис. 2) было изучено его влияние на скорость гидролиза п-НФА в жидкой фазе при 298 К. Как видно из рис. 3, при $pH \geq 7,5$ добавка 5% (0,68 М) глицерина увеличивает наблюдаемую константу скорости реакции, причем с ростом pH ускоряющий эффект усиливается. По нашему мнению, увеличение скорости гидролиза при $[\text{Гл}]_0 =$

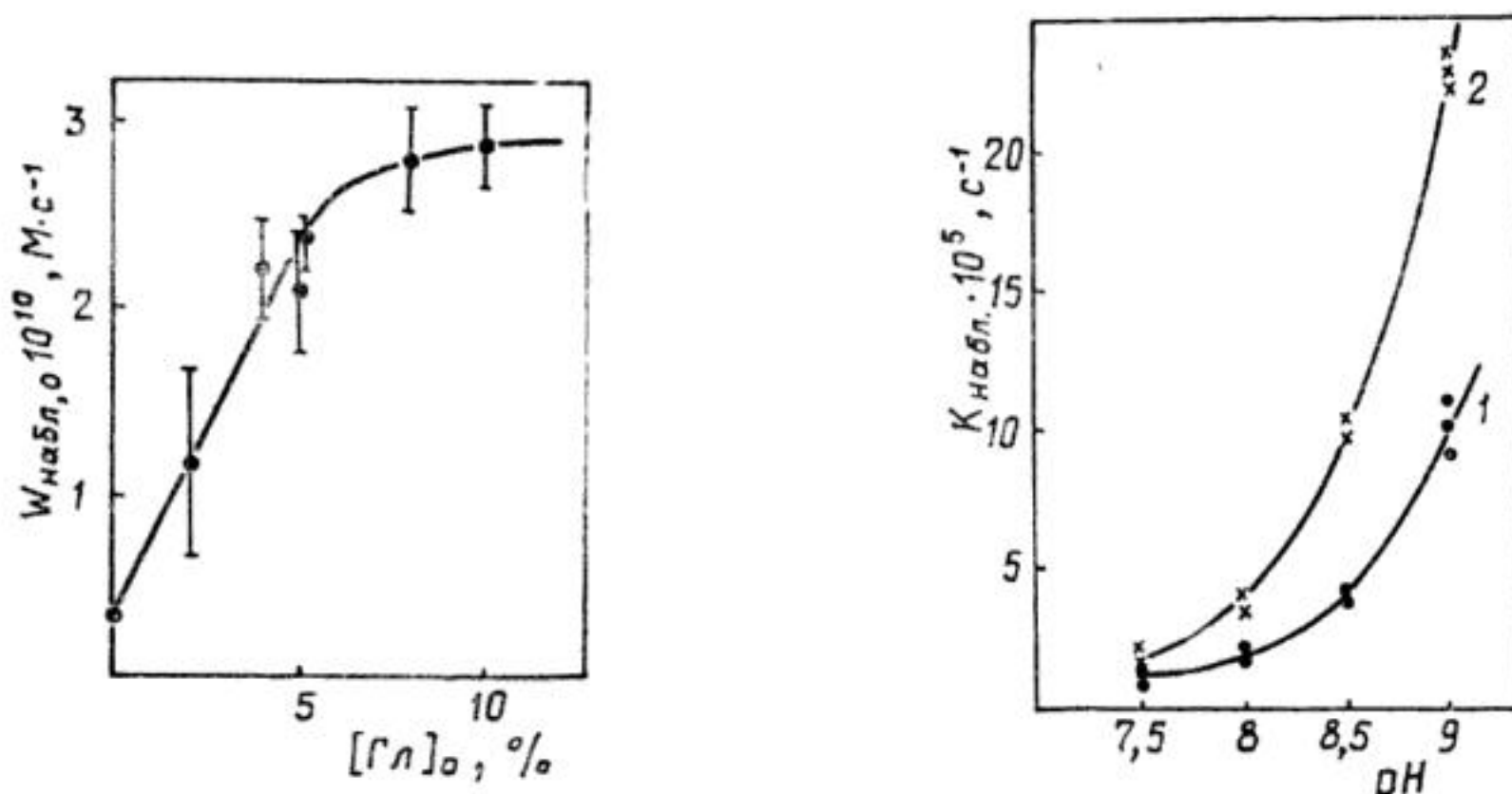


Рис. 2. Зависимость наблюдаемой скорости гидролиза п-НФА в замороженном 0,05 М K^+ -фосфатном буферном растворе ($pH_{298K} = 8,5$), содержащем 0,15 М NaCl при 268 К, от концентрации глицерина. $[п-НФА]_0 = 5 \cdot 10^{-5}$ М

Рис. 3. Зависимость наблюдаемой константы скорости гидролиза п-НФА от величины pH 0,038 М K^+ -фосфатного буферного раствора, содержащего 0,15 М NaCl, при 298 К: 1 — в отсутствие глицерина; 2 — $[C_3H_8O_3]_{\text{общ}} = 0,68$ М (5%)

$= 0,68$ М и $pH > 7$ связано с катализом реакции депротонированной формой молекул глицерина ($K_1 = 1,2 \cdot 10^{-14}$ [2]). В этом случае для наблюдаемой константы скорости гидролиза п-НФА при $pH > 7$ можно записать

$$K_{\text{набл}} = K_0 [H_2O] + K_{\text{Гл}} [\text{Гл}] + K_{\text{ОН}^-} [OH^-] + K_{\text{HPO}_4^{2-}} [HPO_4^{2-}] + K [\text{Гл}^-] \quad (1)$$

где в правой части стоит сумма произведений концентраций катализирующих гидролиз молекул и ионов на соответствующие каталитические константы [3]. Из уравнения (1) видно, что каталитическая константа ионизированной формы глицерина может быть рассчитана как тангенс угла наклона графика зависимости величины $\Delta K = K_{\text{набл},0} - K_{\text{ОН}^-} [OH^-] - K_{\text{HPO}_4^{2-}} [HPO_4^{2-}]$ от $[\text{Гл}^-]$; величина отрезка, отсекаемого графиком в координатах $\Delta K - [\text{Гл}^-]$ на оси ординат, будет в этом случае равна $K_0 [H_2O] + K_{\text{Гл}} [\text{Гл}]$. Для построения этой зависимости использовали полученные в работе значения $K_{\text{набл}}$ (рис. 3), известные значения $K_{\text{ОН}^-} = 12,8 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ и $K_{\text{HPO}_4^{2-}} = 5,4 \cdot 10^{-4} \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ [5]; величины $[HPO_4^{2-}]$ и $[\text{Гл}^-]$ при различных pH рассчитывали, зная общие концентрации фосфата (0,038 М) и глицерина (0,68 М) в реакционной смеси и соответствующие значения констант ионизации ортофосфорной кислоты ($K_2 = 6,2 \cdot 10^{-8}$ [8]) и глицерина ($K_1 = 1,2 \cdot 10^{-14}$ [2]). График зависимости величины ΔK от $[\text{Гл}^-]$ при 298 К приведен на рис. 4. Рассчитанная из его наклона константа катализа реакции депротонированной формой глицерина равна $(14,3 \pm \pm 0,2) \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$, т. е. близка к каталитической константе аниона OH^- .

Таким образом, анализируя вид зависимости $W_{\text{набл},0}$ от содержания глицерина в замораживаемом растворе, следует принимать во внимание не только изменение фазового состояния замороженной водно-солевой системы при добавлении глицерина, но и способность его депротонированной формы катализировать гидролиз п-НФА. Выражение для наблюдаемой константы скорости гидролиза п-НФА в замороженных растворах по форме совпадает с (1), однако входящие в его правую часть константы и концентрации должны отвечать условиям, сформировавшимся в незамерзающей жидкой фазе при температуре опыта.

Равновесные концентрации компонентов раствора, сосуществующего при температуре опыта с твердой фазой, очевидно, определяются фазовой диаграммой многокомпонентной системы, а значения констант, помимо температуры опыта как таковой, еще и такими физико-химическими свойствами

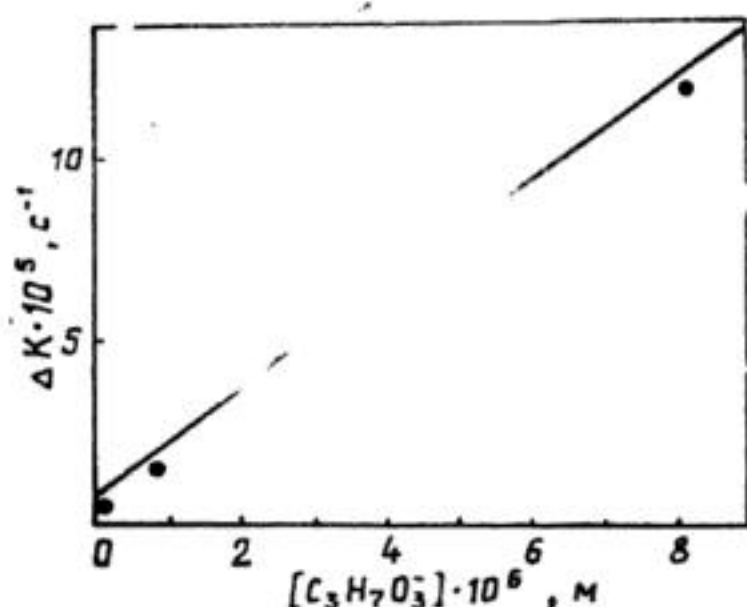


Рис. 4. Зависимость величины ΔK от концентрации депротонированной формы глицерина в 0,038 М K^+ -фосфатном буферном растворе, содержащем 0,15 М NaCl. $T = 298 K$, $[C_2H_5O_3]_{\text{общ}} = 0,7 M$ (5 %)

среды, как диэлектрическая проницаемость, которая, кстати, влияет на константы ионизации, а следовательно, и на величины концентраций ионизированных и неионизированных форм растворенных веществ. Известно, что в присутствии глицерина температура замерзания водных растворов солей и водно-солевых эвтектик понижается [7]. Вследствие этого обусловленное кристаллизацией солей закисление фосфатных буферных растворов при замораживании в присутствии глицерина оказывается значительно слабее выраженным, чем в его отсутствие [9]. Исходя из этих данных, качественную картину влияния глицерина на кинетику гидролиза п-НФА в замороженных K^+ -фосфатных буферных растворах, содержащих NaCl, можно представить следующим образом. Увеличением скорости гидролиза п-НФА в замороженных растворах в области малых добавок глицерина (рис. 2, $[Гл]_0 \leq 6 \%$) обусловлено ослабление тормозящего реакцию сдвига pH в кислую сторону, связанным с уменьшением количества кристаллизующегося при замораживании и понижении температуры гидрофосфата натрия, а также каталитическим действием самого глицерина. С ростом исходной концентрации криопротектора объем незамерзающей жидкой фазы при температуре опыта будет расти, приводя к разбавлению реакционной смеси в зоне реакции и торможению гидролиза. Результатом этого является наблюдаемое в эксперименте при $[Гл]_0 \leq 6 \%$ -ное ослабление зависимости наблюдаемой скорости реакции от концентрации глицерина.

Таким образом, результаты работы содержат полученные кинетическим методом обоснования некоторых аспектов влияния глицерина на физико-химические свойства замораживаемых водных систем, в частности на величину pH незамерзающей жидкой фазы. Способствуя сохранению компонентов фосфатного буферного раствора в растворенном состоянии, глицерин тем самым стабилизирует pH . Наряду с этим положительным, с точки зрения криобиологии, фактом отмечено, что в малых концентрациях глицерин способен активировать гидролитические реакции, это может приводить к частичной деградации биоструктур в присутствии криопротектора. Это обстоятельство следует принимать в расчет при определении времени эквilibрации биологического материала в криозащитной среде перед замораживанием.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гордон А., Форд Р. Спутник химика.— М.: Мир, 1976.— 72 с.
2. Гороновский И. Т., Назаренко Ю. П., Некряч Е. Ф. Краткий справочник по химии.— Киев: Наук. думка, 1987.— 351 с.

3. *Дженкс В. П.* Катализ в химии и энзимологии. — М.: Мир, 1972. — 468 с.
4. *Сергеев Г. Б., Сергеев Б. М., Батюк В. А., Громченко И. А.* Формирование замороженных образцов и кинетика реакций при низких температурах // Криобиология. — 1986. — № 4. — С. 5—10.
5. *Сергеев Г. Б., Сергеев Б. М., Калнина И. А., Батюк В. А.* Изучение *pH* среды при замораживании и кинетика кислотно-основного гидролиза *p*-нитрофенилацетата в замороженных растворах // Кинетика и катализ. — 1983. — 24, № 2. — С. 341—346.
6. *Сергеев Г. Б., Сергеев Б. М., Калнина И. А.* Гидролиз *p*-нитрофенилацетата в водно-солевых системах, способных к образованию эвтектик // Журн. физ. химии. — 1984. — 58, № 10. — С. 2431—2434.
7. *Fahy G. M.* Analysis of «solution effects» injury. Equations for calculating phase diagram information for the ternary systems NaCl — dimethylsulfoxide — water and NaCl — glycerol — water // Biophys. J. — 1980. — 32, N 3. — P. 837—850.
8. *Goren H. J., Fridkin M.* The hydrolysis of *p*-nitrophenyl acetate in water. Mechanism and method of measurement // Eur. J. Biochem. — 1974. — 41, N 2. — P. 263—272.
9. *Orli Y., Morita M.* Measurement of the *pH* of frozen buffer solutions by using *pH* indicators // J. Biochem. — 1977. — 81, N 1. — P. 163—168.
10. *Van den Berg L., Rose D.* Effect of freezing on the *pH* and composition of sodium and potassium phosphate solutions: the reciprocal system KH_2PO_4 — Na_2HPO_4 — H_2O // Arch. Biochem. Biophys. — 1959. — 81, N 2. — P. 319—329

МГУ им. М. В. Ломоносова;
Ин-т проблем криобиологии и
криомедицины АН УССР, г. Харьков

Поступила 04.07.88

I. A. GROMCHENKO, A. I. KUKUSHKIN, B. M. SERGEYEV, G. B. SERGEYEV,
M. M. LOYEVSKY, N. R. KONSTANTINOVA

THE HYDROLYSIS KINETICS OF *p*-NITROPHENYL ACETATE IN FROZEN AQUEOUS SOLUTIONS CONTAINING CRYOPROTECTIVE ADDITIVES

M. V. Lomonosov State University of Moscow; Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the UkrSSR Academy of Sciences, Kharkov

Physico-chemical properties of frozen aqueous systems were studied by the kinetics of *p*-nitrophenylacetate hydrolysis. Glycerol has been shown to stabilize *pH*, favoring the maintenance of phosphate buffer solutes. On the other hand, the cryoprotectant activated hydrolysis and might lead to a partial degradation of biostructures. This fact should be taken into account when determining the time of equilibration of biological material in a cryoprotective medium before freezing.

УДК 57.043 : 591.463.11.044 : 51 —7

**Т. П. Линник, А. Н. Новиков, В. Ф. Рындин, Р. К. Хайкин,
А. В. Терещенко**

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНЫХ КРИОПРОТЕКТОРОВ МЕТОДОМ КССА ПРИ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИИ СПЕРМЫ ПЕТУХА

Предложен способ прогноза эффективных криопротекторов, основанный на математическом моделировании зависимости «криопротекторная активность — структура вещества». «Расчетный скрининг» — вычисление активности новых соединений — проведен по полученному для их аналогов уравнению регрессии. Получено удовлетворительное совпадение расчетных и экспериментальных значений показателей сохранности спермиев петуха в процессе замораживания под защитой исследованных веществ.

Одним из важных этапов при разработке метода криоконсервирования конкретного биологического объекта является выбор криопротектора, но до настоящего времени эта задача решается эмпирически. Поэтому создание подходов к рациональному поиску эффективных криопротекторов

и устранению побочного действия используемых защитных агентов остается по-прежнему одной из ключевых проблем криобиологии. Для решения подобных задач в фармакологии разработаны и достаточно успешно используются методы, основанные на количественных соотношениях «структура — активность» (КССА) [4]. В настоящей работе предлагается способ прогноза эффективных криопротекторов, основанный на математическом моделировании зависимости «криопротекторная активность — структура вещества». Применение математических функций, описывающих указанную зависимость, можно использовать при отборе химических соединений для биологических испытаний. «Расчетный скрининг», вычисление активности нового соединения, в том числе еще не синтезированного, проводится по полученному для его аналогов уравнению. При этом условия, позволяющие применять модели для прогноза активности вещества, в первую очередь определяются законами математической статистики.

Исследования выполнены на веществах ряда амидов: формамид, ацетамид, диметилформамид, диметилацетамид, акриламид (марки «х. ч.», СССР), метилацетамид, диэтилацетамид, изопропилацетамид, ацетилморфолин, ацетилпиперидин, *N*-(β -оксиэтил)-ацетамид, *N*, *N*-(β -диоксиэтил)-ацетамид, синтезированные методом ацилирования соответствующих аминов [1,7]. В опытах использовали сперму петухов породы миноров и австролорпов, а также сперму петухов коллекционных пород при УНИИП (Украинский научно-исследовательский институт птицеводства). Для оценки сохранности половых клеток до и после замораживания определяли подвижность спермиев, целостность мембран головок и состояние акросом [6]. В качестве криозащитных растворов использованы среды ЛКС-1 и Б-20, *pH* 7,2—7,4, концентрация исследуемых веществ 6—8 %. Разбавление спермы средами проводили при 20 °С в соотношении 1 : 1, добавление криопротектора при 4 °С, время эквilibрации с криопротектором 15 мин. Замораживание проведено двумя методами, которые дали лучшие результаты: в гранулах с интегральной скоростью охлаждения 120—130 °С/мин и в пластиковых ампулах объемом 1 мл по следующему режиму: время плато кристаллизации 2,0—2,5 мин, скорость охлаждения от —8 до —20 °С (25—30 °С/мин); от —20 до —80 °С (50—70 °С/мин); от —80 до —196 °С (30—50 °С/мин). Оттаивание в водяной бане при 40 °С. Для замораживания использованы лабораторные установки.

Для получения математической зависимости криопротекторной активности веществ от их физико-химических характеристик применяли методы корреляционного и регрессионного анализа [5,2]. Расчеты выполнены на ЭВМ СМ-4. В качестве параметров, отражающих структуру веществ, использованы физико-химические показатели, значения которых опубликованы ранее [3]. В табл. 1 приведены результаты определения сохранности спермиев петуха на этапах замораживания под защитой веществ ряда амидов, включенных в обучающую выборку для получения искомой математической зависимости. Для каждого из указанных в табл. 1 показателей сохранности спермиев проводили поиск уравнения регрессии, адекватно описывающего их зависимость от физико-химических свойств веществ. Представленные в табл. 1 данные о сохранности спермиев петуха получены при замораживании в гранулах.

В табл. 2 приведены результаты линейной парной корреляции физико-химических свойств веществ, включенных в обучающую выборку, между собой и с показателями сохранности спермиев петуха в процессе замораживания — оттаивания. Цифра «1» в табл. 2 означает наличие значимой корреляции с коэффициентом $> 0,6$ по абсолютной величине при $p = 0,05$, а цифра «0» — отсутствие корреляции с коэффициентом $< 0,6$ по абсолютной величине. Как видно, физико-химические характеристики в пределах изученного ряда амидов разделить на группы взаимно некоррелирующих свойств не удастся, что значительно затрудняет поиск многофакторной модели [2,5]. Ранее [3], используя допустимые приближения, были получены

Таблица 1

Сохранность спермиев петуха при криоконсервировании под защитой веществ ряда амидов ($n = 6$)

Вещество	Подвижность спермиев петуха до замораживания, %	Подвижность спермиев после замораживания, %	Число спермиев с целыми головками после замораживания, %	Число спермиев с целыми акросомами после замораживания, %
Формамид	45 ± 4	8 ± 2	44 ± 4	20 ± 3
Ацетамид	77 ± 6	18 ± 2	25 ± 3	35 ± 5
Диметилформамид	94 ± 3	55 ± 6	78 ± 4	28 ± 4
Диметилацетамид	90 ± 5	45 ± 5	55 ± 5	26 ± 4
Диэтилацетамид	0	0	0	0
Изопропилацетамид	40 ± 3	5 ± 1	31 ± 2	26 ± 5
Ацетилморфолин	64 ± 4	10 ± 2	38 ± 4	3 ± 1
Ацетилпиперидин	0	0	0	0
<i>N</i> -(β -оксиэтил)-ацетамид	75 ± 4	15 ± 3	46 ± 4	23 ± 4
<i>N, N</i> -(β -диоксиэтил)-ацетамид	52 ± 3	10 ± 2	41 ± 4	5 ± 1

Таблица 2

Результаты корреляционного анализа исследуемых параметров (1 — есть корреляция; 0 — нет корреляции)

№ п/п	Исследуемый параметр	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	Молекулярная масса		1	1	1	1	0	0	0	1	0	0
2	Размер молекулы			1	1	1	0	1	0	1	0	1
3	Молекулярная рефракция				1	1	0	0	0	1	0	1
4	Коэффициент распределения					1	1	1	1	1	0	1
5	Поверхностная активность						0	0	0	1	0	1
6	Константа растворимости KCl							1	0	1	0	1
7	Константа растворимости NaCl								0	1	1	1
8	Число водородных связей									0	0	0
9	Теплота смешения с H_2O										1	1
10	Число гидратации											1
11	Вязкость											
12	Подвижность спермиев петуха до замораживания	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
13	Подвижность спермиев петуха после замораживания	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
14	Число спермиев с целыми головками после замораживания	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
15	Число спермиев с целыми акросомами после замораживания	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0

уравнения регрессии зависимости криопротекторной активности амидов от их физико-химических свойств при замораживании спермы петуха с включением одновременно нескольких факторов (т. е. свойств). Однако трудоемкость получения экспериментальным путем значений физико-химических веществ и большая ошибка при использовании теоретически рассчитанных величин делает такие модели неработоспособными для прогноза. Уравнения регрессии, включающие один фактор (максимум два), имеют ряд преимуществ при прогнозировании активных криопротекторов, главные из которых — несложность вычислений и доступность значений физико-химических свойств либо экспериментальным, либо расчетным путем. В результате корреляционного анализа выявлена зависимость исследованных показателей сохранности спермиев петуха на этапах замораживания от некоторых физико-химических свойств амидов (см. табл. 2). Наблюдается корреляция с параметрами гидрофобности амидов: с коэффициентом распределения в системе вода — хлороформ, более высокая с поверхностной актив-

ностью на границе раздела фаз вода—гептан. Коэффициенты корреляции: —0,81; —0,69; —0,73; —0,68 при $p = 0,05$ соответственно с показателями № 12, 13, 14, 15 в табл. 2. Поэтому для получения уравнения регрессии использована поверхностная активность амидов (g), данные взяты из работы [3]. Рассчитанные уравнения регрессии имеют следующий вид:

$$Y_1 = 88,3 - 0,86g - 0,005g^2, \quad (1)$$

$$Y_2 = 28,2 - 0,3g - 0,002g^2, \quad (2)$$

$$Y_3 = 55,0 - 0,39g - 0,005g^2, \quad (3)$$

$$Y_4 = 40,8 - 1,03g - 0,006g^2, \quad (4),$$

где Y_1 — подвижность спермиев петуха до замораживания, %; Y_2 — подвижность спермиев петуха после замораживания, %; Y_3 — число спермиев с целыми головками после замораживания, %; Y_4 — число спермиев с целыми акросомами после замораживания, %.

Таблица 3

Сохранность спермиев петуха в процессе криоконсервирования под защитой амидов, рассчитанная по уравнениям

Вещество	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4
Диметилацетамид *	61,3	19,0	40,7	17,4
Диметилформамид *	69,8	21,8	45,6	23,2
Метилацетамид	70,1	15,6	46,7	19,1
Метилформамид	75,1	23,6	48,9	24,9
Диметилсульфоксид	65,5	20,3	44,6	13,4
Глицерин	76,3	24,0	49,5	26,4
Этиленгликоль	81,9	26,0	52,1	33,2
Этилформамид	58,3	17,5	39,0	15,3
Этилацетамид	54,2	16,0	36,5	13,1
<i>N, N</i> -(метил, β -окси-этил) ацетамид	64,5	19,7	42,6	19,3
<i>N, N</i> -(этил, β -окси-этил)-ацетамид	50,1	14,5	34,0	11,1

Примечание. * Соединения, включенные в обучающую выборку для «скользящего контроля» [2] при получении уравнения регрессии.

текторную активность не проверялись ни на одном объекте. Данные расчета показывают, что наиболее эффективными криопротекторами при замораживании спермы петуха являются следующие соединения: этиленгликоль > глицерин > метилформамид > диметилформамид > метилацетамид > *N, N*-(метил, β -оксиэтил)ацетамид > диметилацетамид. Остальные повреждают около 50 % клеток еще на этапе эквilibрации до замораживания.

В табл. 4 представлены экспериментально полученные результаты определения сохранности спермиев петуха при замораживании под защитой некоторых из указанных в табл. 3 веществ. Остальные вещества проверить на криопротекторную активность в отношении спермы петуха пока не удалось. Как видно из табл. 4, лучшие результаты после криоконсервирования спермиев получены с метилацетамидом и этиленгликолем, за ними следуют по эффективности диметилформамид и глицерин, диметилацетамид и диметилсульфоксид уступают вышеназванным соединениям. Результаты сохранности спермиев, представленные в табл. 4, получены при замораживании спермы петуха в ампулах. Ошибка расчета криопротекторной активности данных веществ по уравнениям составляет в среднем по всем показателям около 30 % (ср. табл. 3 и 4). Таким образом, удовлетворительное совпадение расчетных и экспериментальных значений показателей сохранности спермиев в процессе замораживания под защитой рассмотренных веществ подтверждает возможность применения полученных уравнений и использо-

с целыми головками после замораживания, %; Y_4 — число спермиев с целыми акросомами после замораживания, %. Модели адекватны при $p = 0,01$, F — статистика соответственно 3,66; 3,63; 2,21 и 0,74. Коэффициенты в уравнениях (1), (2), (3) значимы при $p = 0,1$, в уравнении (4) при $p = 0,05$. В табл. 3 приведены расчеты предполагаемой криопротекторной активности соединений на основании полученных уравнений, т. е. представлен пример использования уравнения регрессии в целях прогноза криопротекторов. Для этого использованы как вещества, зарекомендовавшие себя криопротекторами, так и неизвестные. Последние четыре вещества в табл. 3 на криопро-

Сохранность спермиев петуха в процессе криоконсервирования, полученная экспериментально под защитой «рассчитанных» криопротекторов ($n = 6$)

Вещество	Подвижность спермиев до замораживания, %	Подвижность спермиев после замораживания, %	Число спермиев с целыми головками после замораживания, %	Число спермиев с целыми акросомами после замораживания, %
Диметилформамид	75 ± 7	43 ± 3	$85,4 \pm 0,5$	33 ± 2
Метилацетамид	80 ± 5	53 ± 3	$82,9 \pm 0,7$	67 ± 9
Этиленгликоль	80 ± 5	43 ± 2	$75,8 \pm 0,9$	47 ± 4
Глицерин	90 ± 5	45 ± 4	$84,0 \pm 5,1$	37 ± 11
Диметилацетамид	70 ± 5	35 ± 5	$71,2 \pm 6,4$	$17,5 \pm 4,2$
Диметилсульфоксид	70 ± 5	30 ± 5	$65,3 \pm 5,7$	15 ± 5

ванного приема (метода КССА) для математического поиска новых криопротекторов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вейнганд-Хильгетах З. Методы эксперимента в органической химии.— М.: Химия, 1968.— 1450 с.
2. Ландау М. А. Молекулярная природа отдельных физиологических процессов.— М.: Наука, 1985.— 264 с.
3. Линник Т. П. Зависимость криопротекторной активности соединений ряда амидов от их физико-химических свойств.— Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Харьков, 1986.— 19 с.
4. Раевский О. А., Сапегин А. М. Возможности и перспективы конструирования биологически активных веществ // Успехи химии.— 1988.— LVII, № 9.— С.1665—1685.
5. Стьюпер Э., Брюггер У., Джурс П. Машинный анализ связи химической структуры и биологической активности.— М.: Мир, 1982.— 235 с.
6. Терещенко А. В., Сахацкий Н. И., Артеменко А. Б. Экспресс-метод оценки оплодотворяющей способности замороженно-оттаянной спермы сельскохозяйственной птицы // С.-х. биология.— 1987.— № 12.— С. 77—80.
7. Хитрин С. В., Зильберман Е. Н., Спасская Р. И. Ацилирование этаноламина // Изв. вузов «Химия и хим. технология».— 1983.— 26, № 6.— С. 765—776.

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

Поступила 05.04.89

T. P. LINNIK, A. N. NOVIKOV, V. F. RYNDIN, R. K. KHAYKIN,
A. V. TERESHCHENKO

PREDICTION OF EFFECTIVE CRYOPROTECTANTS BY THE QSAR METHOD DURING CRYOPRESERVATION OF COCK SPERM

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

The method for prediction of effective cryoprotectants basing on mathematical modeling of the dependence of the cryoprotective efficiency on the substance structure has been suggested. Calculation screening, or calculation of the efficiency of new compounds, has been carried out using regression equations obtained for their analogues. Calculated and experimental values for preserved cock spermatozoa have been shown to be in satisfactory agreement during freezing under protection of the studied substances.

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА КОНФОРМАЦИОННОЕ СОСТОЯНИЕ МИОЗИНА

Методами оптической спектроскопии показано наличие термоиндуцированных конформационных перестроек миозина в области положительных температур. Исследовано изменение количества связанной с белком воды при этих переходах. Обсуждены природа и особенности конформационных изменений.

Известно, что миозин при положительных температурах претерпевает конформационные изменения в области термоденатурации белка (температуры выше 40 °С [6—8]). На наличие термоиндуцированных перестроек фермента при температурах ниже 40 °С указывают экспериментальные результаты, полученные различными методами, однако наиболее показательными в этом отношении являются данные по оптической спектроскопии в УФ-области (собственная флуоресценция белка, двухволновой метод) [1, 5].

В настоящее время о природе термоиндуцированных переходов миозина в области положительных температур (до термоденатурации белка) известно немного. Есть лишь предположения о том, что этот переход связан с изменением состояния глобулярной части макромолекулы миозина, т. е. его «головок» [1].

Малоизученным остается вопрос и о влиянии температуры на количество гидратной воды миозина при конформационных перестройках фермента в области физиологических температур.

Поэтому для выяснения особенностей конформационного состояния миозина в области положительных температур проведено изучение белка методами спектрофотометрии, флуориметрии, диэлектromетрии.

Миозин был получен по методу Перри с некоторыми модификациями [8]. Исследование белка проводили при добавлении в растворы 5 мМ ЭДТА, т. е. в отсутствие двухвалентных катионов в растворе.

Спектры флуоресценции записывали на спектрофлуориметре «Хитахи МПФ-2А» (Япония) со стандартной поляризационной приставкой, а спектры поглощения — на спектрофотометре «Пай Уникам СП-8000».

Для исследования диэлектрических параметров биообъектов был использован СВЧ диэлектromетр с частотой измерения 10 ГГц. Так как в этом диапазоне начинает проявляться дисперсия молекул свободной воды, а дисперсия воды, находящейся под влиянием растворенного вещества, так называемой «связанной» воды, — в более длинноволновом диапазоне, то по значениям диэлектрической проницаемости мы можем производить оценку соотношения «связанная» вода/свободная вода для исследуемых систем [3].

Изучение влияния температуры на состояние миозина, находящегося в водно-солевом растворе, показало, что белок претерпевает ряд конформационных изменений при положительных температурах. Из рис. 1 и 2, на которых представлены температурные зависимости интенсивности и ширины спектров собственной флуоресценции миозина при возбуждении свечения $\lambda = 280$ и 296 нм, следует, что параметры спектров флуоресценции белка отклоняются от линейных при температурах $9 \div 11$ °С, $18 \div 24$ °С, $34 \div 37$ °С и выше температуры 41 °С ($pH = 6,8$). Полученные результаты согласуются с данными работы [1], в которой использованы другие методические подходы.

Согласно общепринятой интерпретации поляризационных характеристик флуоресценции, падение степени поляризации около 37 °С (рис. 3) указывает на уменьшение изотропности свечения и увеличение подвижности излучающих центров фермента [4]. Увеличение поляризации при темпера-

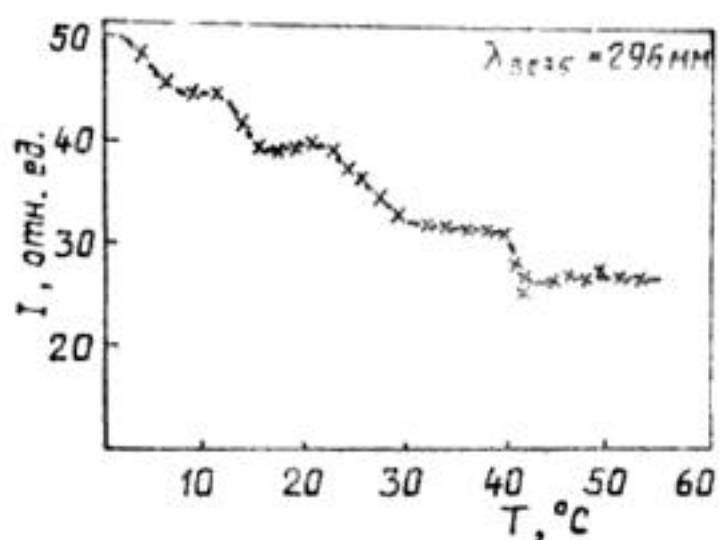


Рис. 1

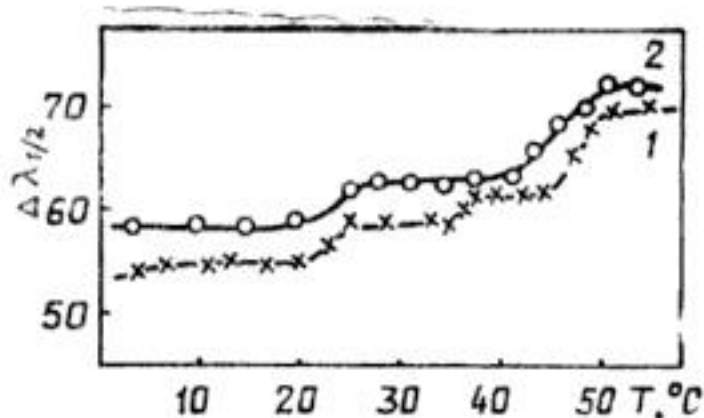


Рис. 2

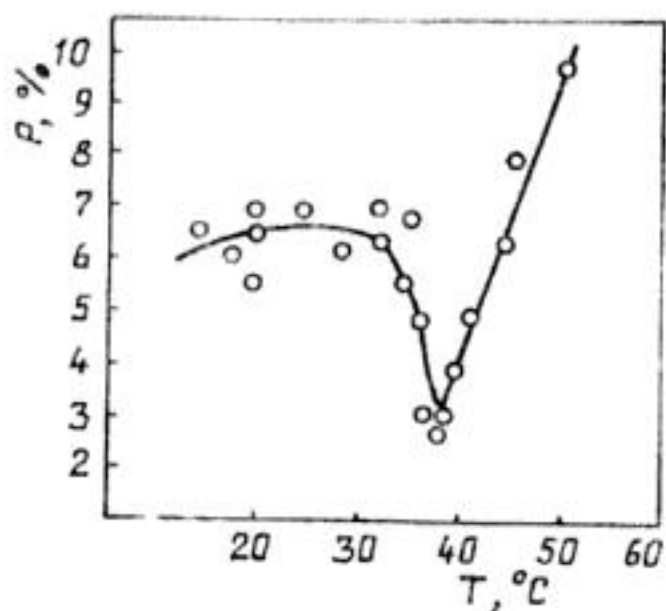


Рис. 3

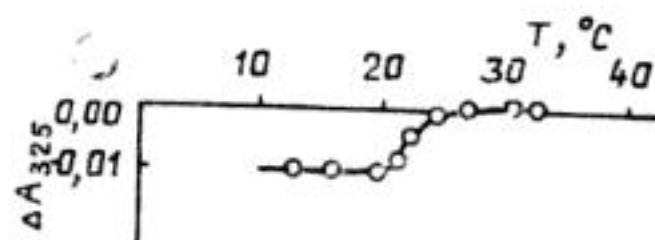


Рис. 4

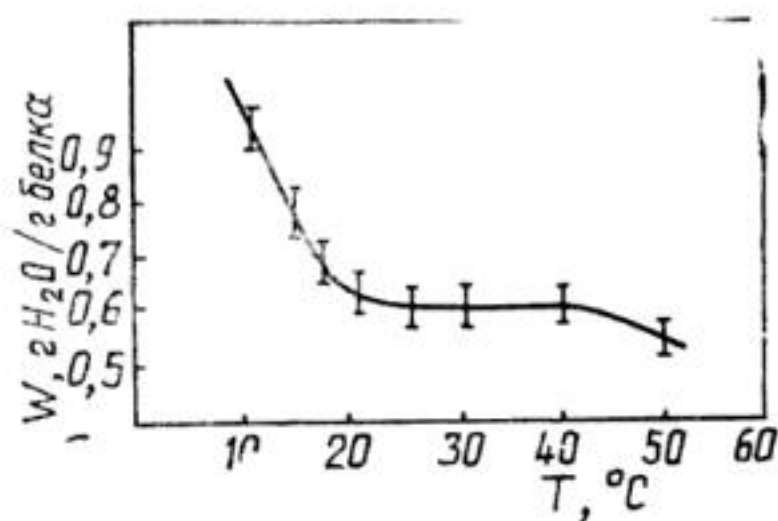


Рис. 5

Рис. 1. Температурная зависимость интенсивности флуоресценции миозина (I , осн. ед.). Условия: 0,5 М КСI, 5 мМ ЭДТА, pH 6, 8, концентрация белка 1 мг/мл. $\lambda_{\text{возб}} = 296$ нм

Рис. 2. Значения ширины спектров флуоресценции миозина при разных температурах. Условия те же, что на рис. 1. 1 — $\lambda_{\text{возб}} = 296$ нм; 2 — $\lambda_{\text{возб}} = 280$ нм

Рис. 3. Температурная зависимость поляризации флуоресценции миозина

Рис. 4. Температурная зависимость мутности растворов белка (λ измерения 325 нм). Концентрация белка соответствует $A_{278} = 1,0$. Температура в кювете с образцом изменялась от 10 до 32 °С; температура в кювете сравнения 32 °С

Рис. 5. Температурная зависимость количества связанной воды в растворе миозина, 0,35 М КСI, 5 мМ ЭДТА, pH 6,8

турах более 40 °С соответствует, по-видимому, меньшей подвижности белка в агрегатах.

Данные, приведенные на рис. 4, хорошо согласуются с экспериментальными результатами по флуоресценции и подтверждают наличие конформационного перехода миозина около 20 °С, сопровождающегося изменением мутности растворов.

Известно, что наиболее адекватным спектроскопическим методом изучения внутримолекулярных изменений белков при разных значениях светорассеяния растворов являются первые производные спектров поглощения [2]. Анализ первых производных спектров поглощения миозина показал, что внутримолекулярные изменения белка в результате перехода в районе 20 °С не сопровождаются появлением дополнительных пиков на первых производных спектров. Максимумы производных при pH 6,8 и 20 °С соответствуют 286 и 294 нм, соотношение интенсивностей в пиках — около 1 : 1.

Кроме измерения спектральных характеристик, была предпринята попытка проследить за состоянием водной компоненты растворов, имеющей большое значение для структурно-функционального состояния различных

белков. Как видно из рис. 5, изменение количества связанной воды наблюдается не только при температурах термоденатурации белка, но и при физиологических температурах (соответственно более 40 °С и около 20 °С). Таким образом, конформационный переход миозина при 20 °С сопровождается изменением количества гидратной воды в растворе. В связи с этим представлялось интересным выяснение возможного влияния pH среды на этот термоиндуцированный переход. Как известно, сдвиг pH приводит к нарушению баланса прежде всего сил электростатического характера, поддерживающих конформацию белка. Однако проведенные нами эксперименты показали, что изменение pH не оказывает заметного влияния на температуру этого перехода. По-видимому, на данный переход слабо влияет ионизация аминокислотных остатков, входящих в основном в хвостовую часть миозина. Очевидно, решающим фактором в реализации конформационного перехода является изменение состояния «головки» миозина. Можно предположить, что воздействие именно на эту часть молекулы белка (например добавлением диоксана [6]) будет оказывать значительное влияние на термоиндуцированный переход миозина при 20 °С. Возможно также, что переход реализуется вследствие изменения конформационного состояния некоторых внешних участков макромолекулы миозина. Возможны и другие механизмы, реализация которых приводит в конечном итоге к наблюдаемым изменениям состояния водно-белковой матрицы. Полученные в настоящей работе данные не позволяют остановиться на каком-то конкретном механизме термоиндуцированных перестроек белка.

Таким образом, изменение температуры среды вызывает конформационные или структурные переходы изолированного миозина при температурах около 10, 20 и 37 °С, сопровождающиеся изменением количества связанной с белком воды. Проведенные исследования дают возможность высказать предположение о ведущей роли глобулярной части фермента в осуществлении перестройки при 20 °С.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Богач П. Г., Зима В. Л., Данилова В. М., Дубонос В. Н. Биофизические и физико-химические свойства миозина гладких и скелетных мышц // Молекуляр. генетика и биофизика. — 1976. — Вып. 1. — С. 3—10.
2. Демченко А. П. Ультрафиолетовая спектрофотометрия и структура белков. — Киев: Наука. думка, 1981. — 208 с.
3. Душейко А. И., Муравьев Б. В., Степин Л. Д. Изучение диэлектрических свойств клеточных взвесей // Биофизика. — 1971. — 16, № 2. — С. 254—259.
4. Маршелл Э. Биофизическая химия. — М.: Мир, 1981. — 358 с.
5. Медведева Н. В., Рууге Э. К. О температурной зависимости флуоресценции миозина // Биофизика. — 1975. — 20, № 1. — С. 148—150.
6. Поглазов Б. Ф., Левицкий Д. И. Миозин и биологическая подвижность. — М.: Наука. — 160 с.
7. Потехин С. А., Трапков В. А., Привалов П. Л. Стадийность тепловой денатурации спиральных фрагментов миозина // Биофизика. — 1979. — 24, № 1. — С. 46—51.
8. Тартаковский А. Д. Методы выделения и характеристика миозина и его субъединиц из поперечнополосатых мышц // Биофиз. и биохим. методы исслед. мышечных белков. — Л.: Наука, 1978. — С. 55—76.

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

Поступила 28.10.88

T. F. MOROZOVA, A. L. MARKOVSKY, O. A. NARDID

THE EFFECT OF TEMPERATURE ON THE CONFORMATIONAL STATE OF MYOSIN

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

Thermally induced conformational changes in myosin at temperatures above 0 °C have been demonstrated by the methods of optical spectroscopy. Quantitative changes in protein-bound water were studied. The nature and peculiarities of conformational changes are discussed.

В. Д. Кругликов, В. В. Кадетов, Т. Ф. Богданова, А. Н. Терентьев

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБОВ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ НА ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТЬ ЛАКТОБАЦИЛЛ И ИХ АНТАГОНИСТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ

Проведено сравнительное изучение влияния лиофилизации и криоконсервирования на жизнеспособность лактобацилл и их антагонистическую активность по отношению к холерным вибрионам группы 01 и не 01. На основании анализа экспериментальных данных показано, что криоконсервирование обеспечивает более высокий процент живых клеток лактобацилл и стабильность их биологических свойств.

Наиболее щадящими методами, обеспечивающими длительное хранение микробных клеток, являются методы лиофилизации и криоконсервирования. Наряду с данными, демонстрирующими незначительные колебания уровня биологической активности и количественной характеристики жизнеспособных клеток лактобацилл в результате лиофилизации [2], имеются указания на выраженные изменения ферментативной активности и снижение количества жизнеспособных клеток в зависимости от режима лиофилизации [1, 3, 4, 5].

Целью настоящей работы является изучение принципиальной возможности использования методов лиофилизации и криоконсервирования для сохранения выраженного антагонизма лактобацилл по отношению к холерным вибрионам, а также сравнительный анализ эффективности применения данных методов для длительного хранения лактобацилл.

В работе использованы 6 штаммов лактобацилл, из них *Lactobacillus acidophilus* ВКМВ-845 и *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* ВКМВ-574 были получены из Всесоюзной коллекции микроорганизмов; *L. lactis* ATCC 8000, *L. plantarum* ATCC 10241 и *L. casei* subsp. *casei* № CDO 151 получены из коллекции кафедры микробиологии Тартусского государственного института; производственный штамм *L. acidophilus* слизистых рас, предоставлен Ростовским-на-Дону молочным комбинатом; антагонистическое действие лактобацилл изучали на 10 штаммах *V. cholerae* eltor и 10 штаммах *V. cholerae* non-01, полученных из музея живых культур Ростовского-на-Дону противочумного института. Лактобациллы выращивали в течение 48 ч при 37 °С на плотной питательной среде МРС-1n, затем физиологическим раствором ($pH\ 7,0 \pm 0,1$) смывали выросшие культуры. В опыт брали пробы (по 0,5 мл) с установленной по оптическому стандарту мутности (10 ед.) концентрацией лактобацилл $1 \cdot 10^9$ микробных клеток/мл. Регидратацию лиофилизированных культур осуществляли физиологическим раствором при температуре $(18 \pm 2)^\circ\text{C}$ доведением образцов до исходного объема.

Определение антагонистической активности лактобацилл до и после лиофилизации и криоконсервирования основывалось на применении метода перпендикулярных штрихов и использования среды, имеющей следующий состав (г/л): автолизат селезенки — 7—13; лактоза — 8—14; NaCl — 8—12; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ — 0,12; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,36; агар-агар — 23; дистиллированная вода — 1 л; $pH\ 6,5\text{—}6,8$. Суспензированную в физрастворе 48-часовую агаровую культуру лактобацилл засеивали по диаметру чашек с данной средой. Посевы инкубировали в аэробных условиях в течение 2-х суток при 37 °С. Выросшую культуру обрабатывали парами хлороформа (40 мин), а затем перпендикулярными штрихами к лактобациллам наносили 6-часовые бульонные культуры вибрионов. Антагонистическую активность лактобацилл определяли по ширине зоны угнетения роста тест-микроорганизмов (мм) с использованием следующей шкалы оценки степени антимикробной активности: 5—10 мм — слабая; 11—20 мм — средняя, 21 мм и более — сильная. Опыты имели трое кратную повторность.

Лиофильное высушивание проводили на лиофилизаторах LZ-9 CP фирмы Фригера (ЧССР). Защитная среда: сахароза — 5 %, желатина — 1,5 %, тиомочевина — 1 %, pH 7,0. Замораживание производили на обкаточном столе ZZ-150/50 при -50°C , выкачивали, после чего образцы хранились в течение 16—18 ч в низкотемпературном холодильнике HC-250/75 фирмы Фригера (ЧССР) при -50°C . Начало подогрева осуществляли через 2 ч после загрузки в лиофилизатор. Начальная температура подогрева -5°C , скорость подогрева $-5^{\circ}\text{C}/\text{ч}$, режим подогрева — автоматический, максимальный. Конечная температура подогрева 25°C . Длительность сушки 20 ч. Материал хранился при температуре 8°C в запаянных ампулах, заполненных осушенным воздухом, так как в работе использовались адаптированные к аэробным условиям штаммы лактобацилл. Определение жизнеспособности лактобацилл и их антагонистических свойств проводили непосредственно после лиофилизации через 1, 2 и 3 мес.

При криоконсервировании культур лактобацилл замораживание суспензий бактерий на физрастворе проводили путем погружения материала,

Таблица 1

Влияние лиофилизации и криоконсервирования на жизнеспособность лактобацилл

Штамм	Количество жизнеспособных клеток по отношению к исходному уровню, %	
	Непосредственно после лиофилизации	После криоконсервирования в течение 1 ч
<i>L. acidophilus</i> 845	$45 \pm 7,0$	$70 \pm 13,4$
<i>L. casei</i> subsp. <i>rhannosus</i> 574	$49 \pm 10,1$	$75 \pm 7,8$
<i>L. lactis</i> ATCC 8000	$39 \pm 2,5$	$78 \pm 2,0$
<i>L. plantarum</i> (ATCC 10241)	$40 \pm 14,0$	$70 \pm 14,5$
<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> NCDO 151	$47 \pm 6,1$	$67 \pm 8,3$
<i>L. acidophilus</i> слизистых рас	$55 \pm 11,7$	$80 \pm 5,0$
среднее количество жизнеспособных клеток	$45,8 \pm 5,9$	$73,3 \pm 4,9$

разлитого в полиэтиленовые криопробирки по 0,5 мл, в жидкий азот (-196°C). Оттаивание производили при 37°C на водяной бане. Высевы криоконсервированных образцов проводили через 1 ч и 3 мес. В результате изучения жизнеспособности лактобацилл непосредственно после завершения процесса лиофилизации установлено, что среднее количество живых клеток по отношению к исходному уровню составило $(45,8 \pm \pm 5,9) \%$ ($P > 0,001$), что на 27,5 % меньше средней величины жизнеспособных клеток лактобацилл ($73,3 \pm 4,9$; $P > 0,001$) после криоконсервирования в течение одного часа (табл. 1). Последующие ежемесячные исследования об-

разцов лиофилизированных культур, хранившихся при температуре 8°C выявили тенденцию к дальнейшему понижению процента живых клеток. Так сравнение данных, полученных через 3 мес. хранения лиофилизированных образцов, с результатами, полученными непосредственно после лиофилизации, свидетельствует о снижении жизнеспособности лактобацилл в среднем на 15,8 %. При этом продолжительность низкотемпературного хранения штаммов лактобацилл, даже без использования криоеротекторов, практически не влияла на их жизнеспособность (табл. 2). Кроме того, у взятых в исследование культур отмечались индивидуальные различия в чувствительности к условиям длительного хранения. Так, для лиофилизированного штамма *L. casei* subsp. *rhannosus* 574 выявлено наиболее выраженное снижение числа живых клеток от $(49 \pm 10,1) \%$ (непосредственно после лиофилизации) до $(24 \pm 7,1) \%$ (в результате хранения в течение 3 мес.), т. е. на 25 % ($P > 0,001$). Наибольшее число жизнеспособных клеток, как в результате хранения в лиофилизированном состоянии ($50 \pm 10,9 \%$), так и после криоконсервирования ($80 \pm 5 \%$) отмечалось у штамма *L. acidophilus* слизистых рас.

При определении антагонистической активности лактобацилл по отношению к вибрионам был проведен сравнительный анализ исходного уровня

антагонистических свойств лактобацилл и степени выраженности антагонизма данных культур в различные сроки после лиофилизации и криоконсервирования. Результаты проведенного исследования оценивали по относительному количеству штаммов вибрионов, на которые лактобациллы действовали как сильные антагонисты.

Данные, представленные в табл. 3, демонстрируют снижение (непосредственно после лиофилизации) антагонистического действия на холерные

вибрионы группы О1 у трех из шести штаммов лактобацилл.

Если исходный уровень антагонистической активности каждого штамма принять за 100 %, то вышеуказанное снижение приобретало количественное выражение: на 11,0 — 18,3 %, а снижение антагонизма лактобацилл по отношению к холерным вибрионам группы О1 в результате трехмесячного хранения лиофилизированных образцов находилось в пределах 43,3—50,1 %. Наряду с этим, криоконсервирование продолжительностью 3 мес. незначительно понижало антагонизм по сравнению с исходным уровнем, принятым за 100 %,

только у штамма *L. casei subsp. casei* NCDO 151: на 11,0 %.

Антагонистическая активность лактобацилл по отношению к холерным вибрионам не О1 группы сразу после лиофилизации у пяти штаммов понизилась на 8,2—18,2 %, а антагонизм штамма *L. casei subsp. rhamnosus* 574

Таблица 2

Влияние различных сроков хранения на жизнеспособность лактобацилл

Штамм	Количество жизнеспособных клеток в культурах, %			
	После лиофилизации			После криоконсервирования в течение 3 мес.
	через 1 мес.	через 2 мес.	через 3 мес.	
<i>L. acidophilus</i> 845	40	38	30	70
<i>L. casei subsp. rhamnosus</i> 574	45	40	24	74
<i>L. lactis</i> ATCC 8000	30	30	23	78
<i>L. plantarum</i> ATCC 10241	36	25	20	70
<i>L. casei subsp. casei</i> NCDO 151	47	44	33	67
<i>L. acidophilus</i> слизистых рас	55	50	50	80

Таблица 3

Антагонистическая активность лактобацилл по отношению к холерным вибрионам группы О1

Штамм	Удельный вес штаммов холерных вибрионов группы О1, на которые лактобациллы действуют как сильные антагонисты, %						
	Исходное значение	После лиофилизации				После криоконсервирования в течение	
		непосредственно	через 1 мес.	через 2 мес.	через 3 мес.	1 ч	3 мес.
<i>L. acidophilus</i> 845	46,7	40,0	43,3	30,0	23,3	50,0	46,7
<i>L. casei subsp. rhamnosus</i> 574	30,0	30,0	26,7	16,7	16,7	33,3	33,3
<i>L. lactis</i> ATCC 8000	36,7	30,0	33,3	20,0	20,0	30,0	36,7
<i>L. phantarum</i> ATCC 10241	26,7	26,7	23,3	10,0	—	30,0	30,0
<i>L. casei subsp. casei</i> NCDO 151	30,0	26,7	26,7	6,7	—	30,0	26,7
<i>L. acidophilus</i> слизистых рас	50,0	50,0	46,7	36,7	36,7	50,0	53,3

сразу после лиофилизации и после воздействия низкотемпературного замораживания оставался на исходном уровне. Однако при хранении данной культуры в лиофилизированном состоянии установлено снижение сильного антагонистического действия на холерные вибрионы не О1 группы на 80 %.

Последующие исследования через 3 мес. хранения лиофилизированных культур показали, что штаммы *L. lactis* ATCC 8000 и *L. plantarum* ATCC 10241 не оказывали сильного антагонистического действия на вибрионы, а антагонизм штамма *L. acidophilus* слизистых рас изменился в меньшей степени по сравнению с остальными штаммами. Вместе с тем криоконсервирование не изменило уровень антагонистической активности данных культур. Штамм *L. acidophilus* слизистых рас в результате хранения в лиофилизированном состоянии, а также после криоконсервации обладал наиболее выраженной антагонистической активностью, что свидетельствует в пользу большей устойчивости данного штамма к воздействию различных условий длительного хранения (табл. 4).

Таблица 4

Антагонистическая активность лактобацилл по отношению к холерным вибрионам группы не 01

Штамм	Удельный вес штаммов холерных вибрионов группы не 01, на которые лактобациллы действуют как сильные антагонисты, %						
	Исходное значение	После лиофилизации				После криоконсервирования	
		непосредственно	через 1 мес.	через 2 мес.	через 3 мес.	через 1 ч	через 3 мес.
<i>L. acidophilus</i> 845	40,0	36,7	30,0	30,0	23,3	43,3	40,0
<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> 574	30,0	30,0	16,7	20,0	6,0	30,0	30,0
<i>L. lactis</i> ATCC 8000	36,7	30,0	30,0	20,0	—	40,0	40,0
<i>L. plantarum</i> ATCC 10241	30,0	26,7	23,3	13,3	—	30,0	30,0
<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> NCDO 151	33,3	30,0	13,3	10,0	—	30,0	30,0
<i>L. acidophilus</i> слизистых рас	60,0	50,0	46,7	50,0	46,7	60,0	56,7

Таким образом, сравнительный анализ примененных для длительного хранения методов лиофилизации и криоконсервирования выявил преимущества последнего. При лиофилизации и последующем хранении лиофилизированных образцов отмечается снижение, по сравнению с исходным уровнем, процента жизнеспособных клеток и степени выраженности антагонистических свойств лактобацилл по отношению к холерным вибрионам 01 и не 01 группы. Установлено, что количество живых клеток непосредственно после завершения процесса криоконсервирования на 27,5 % больше, чем непосредственно после лиофилизации. Отмечается индивидуальная чувствительность лактобацилл к условиям лиофильного высушивания. Наиболее устойчивым к лиофилизации является штамм *L. acidophilus* слизистых рас. Установлено, что низкотемпературное хранение в жидком азоте существенно не влияет на жизнеспособность лактобацилл и их антагонизм по отношению к вибрионам.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Березина Г. О., Хмельницкая Л. К. Влияние высушивания на физиологическую активность молочнокислых бактерий // Тр. Ин-та микробиологии и вирусологии АН Каз. ССР.— 1984.— Вып. 29.— С. 34—40.
2. Качура В. И. Способ высушивания молочнокислых бактерий // Виноделие и виноградарство СССР.— 1985, № 2.— С. 49—50.
3. Сидорова И. Н. Влияние длительного хранения в лиофилизированном состоянии на свойства термофильного стрептококка // Биология микроорганизмов и их использование в народном хозяйстве: Сб. науч. тр.— Иркутск: Б. и., 1980.— С. 11—15.

1. De Valdez G. F., Giori G. S., Ruiz H. A. P., Oliver G. Effect of drying medium on residual moisture content and viability of freeze-dried lactic acid bacteria // Appl. Environ. Microbiol.— 1985.— 49, N 2.— P. 413—415.
5. Fayed E. O., Sultan N. E., Yassein J. N., Shehata A. E. The effect of freezing on viability and activity of lactic acid bacteria cultivated in whey treated with certain proteolytic enzymes // Egyptian J. Dairy Sci.— 1985.— 13, N 2.— P. 149—158.

Ростовский-на-Дону ордена Трудового
Красного Знамени н.-и. противочумный ин-т

Поступила 25.04.88

V. D. KRUGLIKOV, V. V. KADETOV, T. F. BOGDANOVA, A. N. THERENTYEV
THE EFFECT OF DIFFERENT METHODS OF LONG-TERM STORAGE
ON THE VIABILITY AND ANTAGONISTIC ACTIVITY OF
LACTOBACILLI

*Order of the Red Banner of Labour Antiplague Research Institute of Rostov
on-Don*

A comparative study of the effects of lyophilization and cryopreservation on the viability of lactobacilli and their antagonistic activity against 01 and non-01 *Vibrio cholerae* has been performed. The obtained data showed that cryopreservation provides higher percentage of viable lactobacilli with stable biological properties.

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 611-018.54 : 612.014.462.7

О. В. Липина, Т. Ф. Морозова, П. А. Пустовойт

ВЛИЯНИЕ ПЭО-1500 НА ВЯЗКОСТНЫЕ И СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПЛАЗМЫ КРОВИ ПРИ ТЕМПЕРАТУРАХ 0÷40 °C

Отдельные подходы по коррекции гемореологических изменений, которые имеют место при охлаждении организма, в частности повышение вязкости крови и плазмы, заключаются в применении различных кровезаменителей и добавок. Большой интерес в этом отношении представляют экзоцеллюлярные криопротекторы, например полиэтиленоксиды (ПЭО), обладающие низкой токсичностью на организменном уровне и способностью снижать периферическое сопротивление и динамическую вязкость крови [1,2]. Однако до настоящего времени систематического исследования влияния этих веществ на различные характеристики крови и ее компонентов при изменении температуры в достаточно широком интервале проведено не было.

Целью данной работы явилось изучение температурной зависимости вязкости водных растворов ПЭО-1500 и плазмы крови при добавлении к ней растворов криопротектора при охлаждении. Параллельно исследовали структурно-функциональное состояние белковых компонентов плазмы с помощью различных спектрофотометрических подходов.

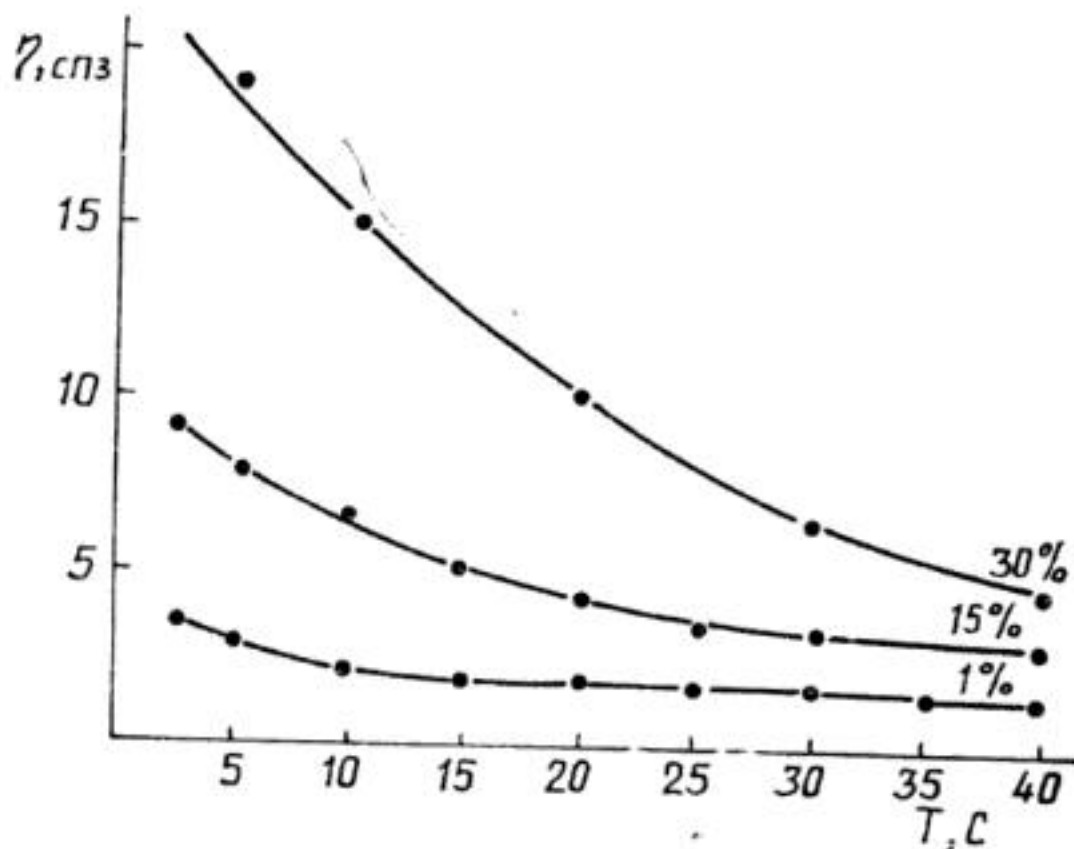


Рис. 1. Температурная зависимость вязкости водных растворов ПЭО-1500

Вязкостные характеристики растворов ПЭО-1500 и плазмы изучали с помощью модифицированного капиллярно-рамочного вискозиметра типа Копли [3] в диапазоне напряжений сдвига 3,7—9,5 дин/см² в интервале температур от 40 до 0 °С.

Спектрофотометрию образцов проводили на спектрофотометре «Пай Уникам СП 0000» (Англия) в вышеуказанном интервале температур.

Для экспериментов использовали донорскую плазму и плазму крови белых беспородных крыс, заготовленную на гепарине.

Результаты определения температурной зависимости вязкости 1-, 15-, 30%-ных водных растворов ПЭО-1500 приведены на рис. 1. При этом зависимость вязкости растворов полиэтиленоксида от сдвигового напряжения по мере снижения температуры не выявлялось, т. е. растворы вели себя как ньютоновские жидкости.

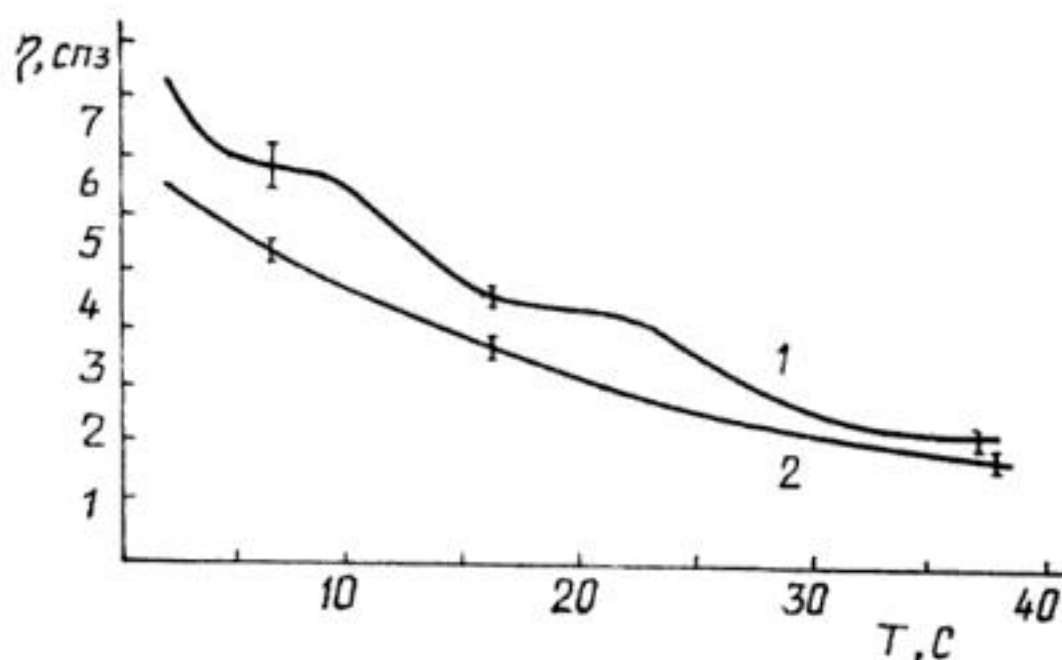


Рис. 2. Влияние охлаждения на вязкость плазмы (1) и вязкость плазмы в присутствии ПЭО-1500 (2) при напряжении сдвига, равном 3,7 дин/см²

Температурная зависимость вязкости плазмы крови в интервале температур 40 ÷ 0 °С имеет более сложный характер (рис. 2), чем температурные зависимости вязкости водных растворов полиэтиленоксида, что, безусловно, связано с наличием белков и предполагает существование сложной системы межмолекулярных взаимодействий.

Прибавление к плазме ПЭО-1500 (конечная концентрация около 1—2 %) приводит к упрощению температурной зависимости вязкости неразбавленной плазмы для значительной части образцов по сравнению с плазмой без полиэтиленоксида, что, очевидно, связано со взаимодействием ПЭО-1500 с белками плазмы.

По данным спектрофотометрии (измерение мутности растворов плазмы при 325 нм), структурно-функциональное состояние плазмы зависит от температуры и изменяется в интервалах 18 ÷ 24 °С и 30 ÷ 32 °С (диапазон исследованных температур 12 ÷ 36 °С). Особенно в этом отношении показателен интервал 18 ÷ 24 °С, что совпадает с данными вискозиметрии. Добавление ПЭО-1500 в концентрации 1—2 % к разбавленным растворам плазмы оказывает значительное влияние на термотропное поведение белков, приводя к сглаживанию термоиндуцированных перестроек (рис. 3).

В свою очередь первые производные спектров поглощения суммарных белков плазмы (для частот 250—305 нм) в присутствии ПЭО-1500 несколько отличаются от таковых для контроля. Эти данные подтверждают наличие влияния ПЭО-1500 на конформационное состояние протеинов.

Таким образом, добавление ПЭО-1500 к плазме приводит к изменению как вязкостных, так и спектроскопических характеристик одной из важнейших составных частей крови. При добавлении ПЭО-1500 наблюдается сглаживание влияния температуры на белки плазмы, вероятно, вследствие взаимодействия ПЭО-1500 с некоторыми белковыми компонентами.

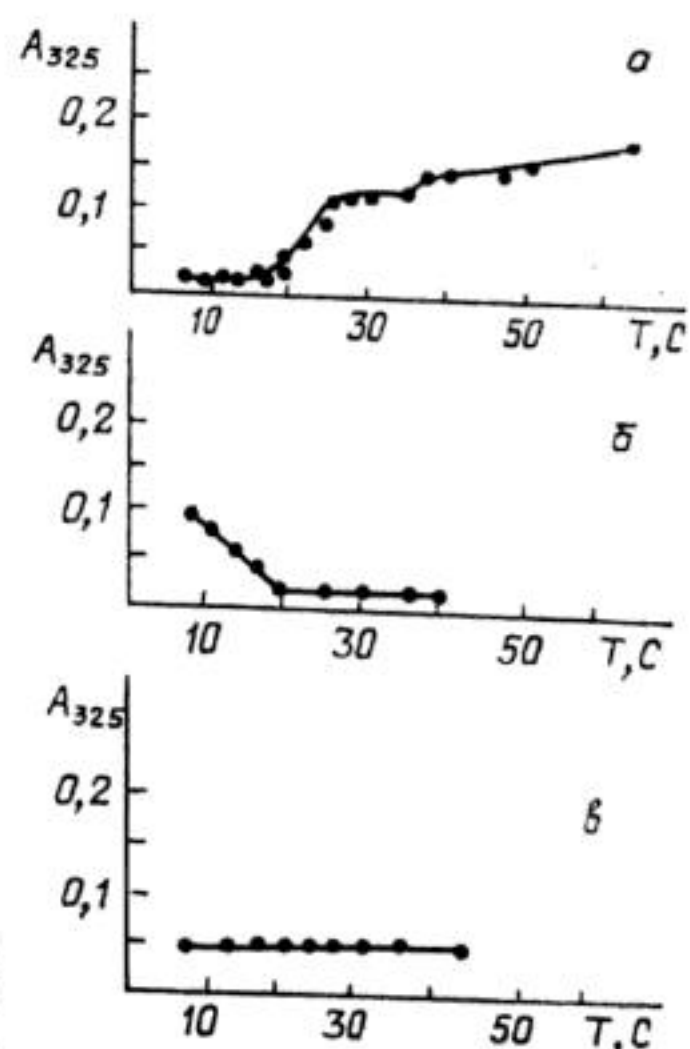


Рис. 3. Температурная зависимость мутности: а — плазмы; б — плазмы и 1% ПЭО-1500; в — плазмы и 2% ПЭО-1500 (разведение: 15 мкл цельной плазмы на 1 мл 0,9 NaCl)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Григорян С. С., Дамаскин Б. Б., Стенина Е. Б. и др. О механизме эффекта Томса // Докл. АН СССР.— 1979.— 248, № 5.— С. 1074—1076.
2. Михайлик Т. А. Состояние гипоталамо-нейрогипофизарной системы в условиях краниocereбральной гипотермии: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Харьков, 1981.— 19 с.
3. А. с. 667865 СССР, МКИ 01 N 11/08. Устройство для определения реологических свойств биологических жидкостей / Н. С. Пушкарь, М. И. Шраго, А. С. Черепнев и др.— Опубл. 30.05.79, Бюл. № 22.

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

Поступила 09.01.90

ХРОНИКА

IV СОВЕЩАНИЕ «КРИОГЕННЫЕ МЕТОДЫ В ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ»

С 20 по 24 ноября 1989 г. в г. Пущино Московской обл. проходило IV совещание «Криогенные и аналитические методы в электронной микроскопии», организованное Научным центром биологических исследований АН СССР. В работе совещания принимали участие ученые из гг. Москвы, Ленинграда, Харькова, Минска, Новосибирска, Кривого Рога, Иркутска, Мурманска и Саратова.

П. Эклин (Кембриджский университет) прочел лекции «Ограничения электронной микроскопии и микроанализа при низких температурах» и «Интерпретация и анализ электронно-микроскопического изображения».

Профессор Г. Руманс (из университета г. Ансала, Швеция) сделал сообщение на тему: «Ультракриотомия как препаративный метод для рентгеноспектрального микроанализа».

Я. Ю. Комиссарчик (Институт цитологии АН СССР, г. Ленинград) доложил о результатах электронно-микроскопического анализа встраивания доменов высокой водной проницаемости в апикальную мембрану эпителиальных клеток.

Большой интерес вызвала группа докладов из Института биологической физики АН СССР (г. Пущино), в которых обсуждались конкретные результаты электронно-микроскопических исследований надмолекулярной организации различных биологических структур (авторы В. И. Попов, В. И. Новоселов, Б. Л. Аллахвердов и др.).

В работе совещания приняли участие сотрудники лаборатории ультраструктурных основ клеточных реакций на охлаждение ИПКиК АН УССР. А. С. Капрельянцем было сделано сообщение «Метод замораживания-замещения и его техническое обеспечение» о новых разработках лаборатории. Интересные сообщения об использовании метода замораживания-замещения были сделаны В. Б. Григорьевым (НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, г. Москва) и В. Н. Дмитриевым (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР, г. Пущино).

А. С. Капрельянц

НИКОЛАЙ СИДОРОВИЧ ПУШКАРЬ

(к 60-летию со дня рождения)

3 августа 1990 г. исполняется 60 лет со дня рождения члена-корреспондента АН УССР Николая Сидоровича Пушкаря — известного ученого в области криобиологии и криомедицины, члена Общества криобиологов (США), одного из инициаторов и организаторов созданного в 1972 году в г. Харькове Института проблем криобиологии и криомедицины АН УССР, директором которого он являлся с 1972 по 1983 год.

После окончания в 1954 г. Днепропетровского медицинского института Н. С. Пушкарь работает заведующим отделом здравоохранения Никопольского райисполкома, ординатором хирургического отделения I больницы г. Никополя. С 1959 по 1962 г. — аспирант Украинского института усовершенствования врачей, с 1962 г. ассистент кафедры хирургии того же института. В 1963 г. защитил кандидатскую диссертацию. В том же году назначен заведующим облздравотделом Харьковского облисполкома.

В 1968 г. защитил докторскую диссертацию на тему: «Консервирование глубоким охлаждением (-196°C) костного мозга и его использование в клинических целях».

С 1968 г. — проректор Украинского института усовершенствования врачей МЗ СССР, руководитель проблемной лаборатории низкотемпературного консервирования костного мозга и крови того же института.

В 1970 г. Н. С. Пушкарю присвоено звание профессора, в 1972 г. он возглавил созданный Институт проблем криобиологии и криомедицины АН УССР.

За время работы в должности директора Н. С. Пушкарь проявил себя как талантливый организатор науки, сумевший объединить усилия ученых различных специальностей на развитие нового в нашей стране, перспективного научного направления, криобиологии и криомедицины.

Как руководитель академического института он отличался инициативностью, деловитостью, чувством нового, умением постановки научных и научно-организационных задач.

Под руководством и при непосредственном участии Н. С. Пушкаря выполнены и выполняются ряд важных фундаментальных исследований, направленных на выяснение механизмов криоповреждения и криозащиты биологических структур, а также многочисленные прикладные разработки, многие из которых уже нашли достаточно широкое применение в медицине и народном хозяйстве.

За работы в области фундаментальной криобиологии Н. С. Пушкарь удостоен премии им. А. А. Богомольца, за работы в области прикладной криобиологии и криомедицины — Государственной премии СССР.

Его вклад в развитие здравоохранения отмечен орденом «Знак Почета», знаком «Отличник здравоохранения».

Вклад Н. С. Пушкаря в развитие отечественной науки отмечен юбилейной медалью «За доблестный труд. В ознаменование 100-летия со дня рождения Владимира Ильича Ленина» и орденом Трудового Красного Знамени.

Перейдя в 1983 г. на научную работу, Н. С. Пушкарь возглавил отдел низкотемпературного консервирования в Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР и продолжает свою плодотворную научную и научно-организационную деятельность, работу по подготовке научных кадров.

Н. С. Пушкарь — автор 329 научных работ, в том числе 9 монографий, 41 изобретения. Им подготовлено 38 кандидатов наук. Он является членом специализированных советов по криобиологии и хирургии. Активно координирует работы в области криоконсервирования и трансплантации эндокринных органов. Является руководителем проводимых в возглавляемом им отделе работ в области криомикроскопии, теоретического и экспериментального моделирования криобиологических процессов.

ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИЙ

В специализированном совете при Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР защищена диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук В. Д. Мануильский в работе «Криорезистентность и вопросы консервации растений при низких температурах» провел оригинальные экспериментальные исследования, в результате которых установлен факт, что для криоконсервации растительных объектов требуется прохождение этапа формирования состояния криорезистентности, который обуславливает повышение устойчивости к низкотемпературным и дегидратационным стрессам. Возникновение этого состояния определяется усилением агрегации цитоплазматических и мембранных компонентов, конденсация которых стабилизирует структуру клетки и препятствует развитию криострессов. Предложены экспериментальные модели модификаций плазматических мембран криорезистентных и криолабильных клеток растений, объясняющие топографию структурных и биохимических изменений у отличающихся по устойчивости к действию низких температур доменов мембран. Впервые показано, что декорирование плазматических мембран веществами полифенольной природы способствует формированию состояния криорезистентности. Впервые выделен и исследован криолабильный Ca^{2+} -зависимый компонент мембран, чувствительность которого к криострессам выражается в изменении процессов агрегации входящих в него компонентов. На основе исследованных механизмов действия низких температур на растительные объекты предложен оригинальный способ криоконсервации тканей и эмбрионов растений.

Разработаны принципиально новые биотехнологические подходы создания криобанка растительных объектов, позволяющие с высокой функциональной и генетической стабильностью осуществлять длительное хранение генетических ресурсов растений в условиях низких температур.

В диссертационной работе на соискание ученой степени кандидата биологических наук Е. А. Грищенкова получила новые данные о влиянии диметилсульфоксида (ДМСО) на этапе эквilibрации в криозащитных средах на накопление аминокислот клетками асцитных опухолей и установила, что ДМСО в концентрации выше 20 % обратимо ингибирует транспорт глицина по неконкурентному типу.

В работе экспериментально доказано, что низкотемпературное воздействие с использованием ДМСО в качестве криозащитного агента приводит к существенному уменьшению накопления клетками аминокислот. Это связано в основном с двумя причинами: увеличением выхода аминокислот и непосредственным повреждением транспортных систем. Вклад каждого из этих факторов в нарушение накопления аминокислот при действии низких температур в значительной степени определяется программой замораживания. Полученные результаты свидетельствуют, что интенсивность транспорта аминокислот и их выход во внеклеточную среду согласуются с жизнеспособностью клеток, что позволяет предложить эти два показателя для определения биологической полноценности клеток.

Проводится подписка на 1990 год на всесоюзный научно-теоретический журнал «Криобиология». В журнале публикуются научные работы по всем аспектам действия охлаждения и замораживания в биологии, медицине и пищевой промышленности по проблемам гипотермии, низкотемпературному консервированию клеток и тканей, криохирургии, по сублимационному высушиванию, о криопротекторных веществах и их фармакологическом действии. Освещаются вопросы гибернации, зимостойкости растений, конструирования приборов и оборудования для низкотемпературного консервирования биологических объектов и криомедицины.

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

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

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

Our journal KRIOBIOLOGIYA (CRYOBIOLOGY) is published by Naukova Dumka Publ. Co. in Russian with abstracts in English. The journal is designated for the communication of papers on aspects of low temperature studies covering the chemical and life sciences and their associated technologies. Coverage includes: physical and chemical changes accompanying freezing and thawing, low temperature biophysics; biochemistry and molecular biology at sub-zero temperatures; preservation of cells, tissues and organs; effects of low temperatures on cell physiology; the use and mode of action of cryoprotectants; cell damage and its avoidance; freeze-drying and substitution; chill and frost injury, cold acclimation and hardiness in plants; cold survival mechanisms in animals and microorganisms; low temperature techniques and instrumentation, e. g. food and pharmaceuticals.

ISSN 0233-7673 . Криобиология 1990. № 3. 1—56.

Издательство «Наукова думка» выпустило в свет книгу:

Текучесть мембраны в биологии: Концепции мембранной структуры/ Балли М. Б., Бёстерлинг Б., Брейлсфорд Дж. Д. и др.; Под ред.. Элойа Р.; Пер. с англ. под ред. Белоуса А. М. и Репина Н. В. — Киев: Наук. думка, 1989. — 312 с.

В монографии детально обсуждаются современные представления о структуре и динамике биологических мембран. Даны подробные сведения о латеральной организации искусственных и природных мембран, структуре доменов и однокомпонентных бислоев, механизмах сосуществования твердой и жидкой фаз в липидном бислое при фазовых переходах, а также доменов монотектической и эвтектической фаз в многокомпонентных бислоях. Особое внимание уделено вопросам корреляции моделей мембраны и электронно-микроскопических данных. Дано подробное описание метода замораживания-скалывания и способов интерпретации полученных изображений структуры мембраны. Анализируются состав, структура и функция мембран различных клеток.

Для биологов, биофизиков, криобиологов, а также специалистов смежных дисциплин.

Наукова думка