

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

ISSN 0233-7673

4 ' 91



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 (Канада), А. Н. Гольцев, К. Дж. Грин (Великобритания), Г. Ф. Жегунов, В. И. Луговой, В. Я. Малеев, Г. Маттес (ФРГ), П. Мнержичка (ЧСФР), Е. Я. Панков, Ф. А. Приходько (отв. секретарь), Н. С. Пушкарь, Б. П. Сандомирский, А. С. Снурников, А. А. Цуцаева, С. А. Шалимов, Т. Н. Юрченко, Э. З. Эмирбеков

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

EDITORIAL BOARD

V. I. Grishchenko (Editor-in-Chief), A. M. Belous (Associated Editor), S. I. Aksenov, G. A. Babiychuk, M. E. Beker, Yu. Blagoj, L. Wang (Canada), A. N. Goltsev, C. J. Creen (Great Britain), G. F. Zhegunov, V. I. Lugovoj, V. Ya. Maleyev, G. Matthes (FRG), P. Mericka (CSFR), 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, V. Ya. Volkov, V. M. Gordiyenko, V. N. Zaporozhan, P. A. Kaliman, V. V. Lemeshko, V. D. Manuil'sky, V. A. Moiseyev, A. S. Popov, N. G. Solomonov, Yu. S. Sukhanov, V. V. Shental, M. I. Shrago

Адрес редакции:

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

Научный редактор *В. И. Луговой*

Редактор *Л. А. Рябина*

Технический редактор *В. Н. Волкова*

Сдано в набор 17.07.91. Подп. в печ. 30.09.91. Формат 70×108/16. Бум. тип. № 1. Выс. печ. Усл. печ. л. 4,9. Уч.-изд. л. 5,4. Усл. кр.-отт. 5,6. Тираж 660 экз. Зак. . Цена 1 р. 20 к.

Отпечатано с матриц Харьковской книжной фабрики им. М. В. Фрунзе в Харьковской городской типографии № 16. 310003, Харьков, ул. Университетская, 16. Зак. 1139.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ОТДЕЛЕНИЕ ФИЗИОЛОГИИ

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ
И ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

ВСЕСОЮЗНЫЙ

НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ОСНОВАН В 1985 ГОДУ
ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

НИИВ НАУКОВА ДУМКА 1991

4 1991

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

- Мавур С. П., Белоус А. М., Петренко А. Ю. Изучение причин угнетения активности системы биотрансформации *p*-нитроанизола в изолированных гепатоцитах крыс после криоконсервирования 3
- Вережкин А. Г., Березняк Е. Г., Семенов М. А., Малеев В. Я. ИК-спектроскопическое изучение влияния низких температур на структуру и гидратацию ДНК 5
- Волков В. Я., Сахаров Б. В., Волкова Л. А. Природа повреждения и гибели бактерий *Francisella tularensis* при медленном замораживании 10
- Новиков А. Н., [Вепринцев Б. Н.] Утешев В. К., Смолихина Т. И., Линник Т. П. Токсическое действие криопротекторов на зародышей вьюна и лягушки 16
- Нокс П. П., Щеголева Т. Ю., Оксюк Д. Ю., Маргшвили Г. Ш., Кононенко А. А. Гидратация мембранных белков фотосинтетических реакционных центров пурпурных бактерий: исследование методом СВЧ-диэлектрометрии 21
- Нардид О. А. Исследование взаимодействия ионов марганца в водных и водно-гликолевых растворах глицина 26
- Эмирбеков Э. З., Сфиев А. А., Кличханов Н. К. Исследование устойчивости эритроцитов крыс при гипотермии 31
- Жегунов Г. Ф., Кудогоцева Е. В., Котляров А. О. Белковые перестройки в клетках лягушек *Rana terrestris* при акклимации к различным температурам 33
- Львова С. П., Магомедова М. Х. Интенсивность глюконеогенеза в ткани печени лягушки при искусственной гипотермии и зимней спячке 40
- Войтенко Н. Н., Корякина Л. А. Особенности функционирования моноаминоксидазы типа А мозга крыс и зимоспящих сусликов под влиянием гипотермии 43
- Кузьмина Л. Н. Криочувствительность системы транспорта кальция мембран саркоплазматического ретикулума развивающихся мышц 47

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

- Мануильский В. Д., Соломко Э. Ф. Криоконсервация вегетативного мицелия высших базидиомицетов 51

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- Стрибуль Т. Ф. Изменение амилазной и липазной активности семян кукурузы под воздействием низких температур 54

- ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИЙ 56

© Издательство «Наукова думка», «Проблемы криобиологии», 1991 г.

This One



QWUH-61R-AX8X

Закончен авторским правом

CONTENTS

THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

<i>Mazur S. P., Belous A. M., Petrenko A. Yu.</i> The investigation of causes of inhibition of the activity of biotransformation system in isolated rat hepatocytes after cryopreservation	3
<i>Verevkin A. G., Bereznyak E. G., Semenov M. A., Maleyev V. Ya.</i> The IR spectroscopic study on the influence of low temperatures on the structure and hydration of DNA	5
<i>Volkov V. Ya., Sakharkov B. V., Volkova L. A.</i> The nature of the damage and death of <i>Francisella tularensis</i> bacteria by slow freezing	10
<i>Novikov A. N., [Veprintsev B. N.,] Uteshev V. K., Smolikhina T. I., Linnik T. P.</i> The toxic effect of cryoprotectants on loach and frog embryos	16
<i>Noks P. P., Shchegoleva T. Yu., Oksuk D. Yu., Margishvili G. Sh., Kononenko A. A.</i> Hydration of membrane proteins as the photosynthetic reaction centers of purple bacteria studied by SHF dielectrometry	21
<i>Nardid O. A.</i> A study on the interaction between manganese ions in aqueous and water-glycol-glycine solutions	26
<i>Emirbekov E. Z., Sfiyev A. A., Klichkhanov N. K.</i> The investigation of the resistance of rat erythrocytes under hypothermia	31
<i>Zhegunov G. F., Kudokotseva E. V., Kotlyarov A. O.</i> Protein reconstructions in cells of <i>Rana terrestris</i> frogs during acclimation to various temperatures	33
<i>Lyova S. P., Magomedova M. Kh.</i> The intensity of gluconeogenesis in frog liver tissue upon artificial hypothermia and hibernation	40
<i>Voitenko N. N., Koryakina L. A.</i> The peculiarities of action of brain MAO-A of rats and hibernating ground squirrels under hypothermia	43
<i>Kuzmina L. N.</i> The cryosensitivity of sarcoplasmic reticulum membrane calcium transport system of developing muscles	47

CRYOPRESERVATION OF BIOLOGICAL SYSTEMS

<i>Manuilsky V. L., Solomko E. F.</i> Cryopreservation of vegetative mycelium of higher Basidiomycetes	51
--	----

SHORT COMMUNICATIONS

<i>Stribul T. F.</i> Changes in amylase and lipase activities of maize seeds at low temperatures	54
--	----

DEFENSE OF THESES	56
--------------------------	----

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

УДК 57.043 : 612.354.2.014.43

С. П. Мазур, А. М. Белоус, А. Ю. Петренко

ИЗУЧЕНИЕ ПРИЧИН УГНЕТЕНИЯ АКТИВНОСТИ СИСТЕМЫ БИОТРАНСФОРМАЦИИ *p*-НИТРОАНИЗОЛА В ИЗОЛИРОВАННЫХ ГЕПАТОЦИТАХ КРЫС ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ

Исследовали скорость 0-деметилирования *p*-нитроанизола свежевыделенными и криоконсервированными гепатоцитами одинаковой жизнеспособности. Образование продукта реакции *p*-нитрофенола криоконсервированными клетками в процессе изотермической инкубации было снижено на 20 % и коррелировало с изменением жизнеспособности клеток. В экспериментах на изолированных микросомах и пермеабиллизированных клетках в присутствии экзогенного NADPH показана высокая устойчивость цитохром Р-450-зависимой системы к циклу замораживания-отогрева и нарушению целостности плазматической мембраны. Делается вывод, что снижение скорости метаболизма *p*-нитроанизола после криоконсервирования связано с повреждением плазматической мембраны части клеток при инкубации с ксенобиотиком и вызванной этим потерей эндогенного NADPH.

Широкое использование изолированных клеток печени в экспериментальных исследованиях в качестве модели метаболизма чужеродных веществ и стероидов, а также возможность применения их в медицинской практике с целью детоксикации крови больных с печеночной недостаточностью обуславливают необходимость дальнейшей разработки методов их криоконсервирования и изучения механизмов нарушения метаболизма ксенобиотиков в деконсервированных клетках. Целью нашего исследования явилось изучение изменений активности монооксигеназной системы после криоконсервирования гепатоцитов, а также возможных причин, приводящих к этим изменениям.

Исследования проводили на гепатоцитах самцов крыс линии Вистар с массой тела 250—300 г, выделенных с помощью коллагеназной перфузии [6]. Жизнеспособность свежевыделенных гепатоцитов, определяемая по прокрашиванию трипановым синим, составляла 88 ± 1 %. Для криоконсервирования суспензию гепатоцитов разводили в 2 раза сахарозной средой (280 мМ сахарозы, 5 мМ KCl, 0,8 мМ KH_2PO_4 , 0,8 мМ MgSO_4 , 1,2 мМ CaCl_2 , 20 мМ HEPES, 1 % бычьего сывороточного альбумина, pH 7,4), содержащей 20 %-ный ДМСО. Суспензию подвергали двухступенчатому замораживанию до -196°C с остановкой при -25°C и хранили в жидком азоте. Отогревали пробы на водяной бане (40°C) до 0°C , после чего дважды промывали для удаления криопротектора.

Монооксигеназную активность определяли по 0-деметилированию *p*-нитроанизола (*p*-НА) при концентрации субстрата в среде инкубации (буфер Krebs — Henseleit с 1 % БСА) 0,4 мМ и концентрацией клеток 2 млн/мл. Содержание общего продукта реакции — *p*-нитрофенола (*p*-НФ) — определяли спектрофотометрически [4].

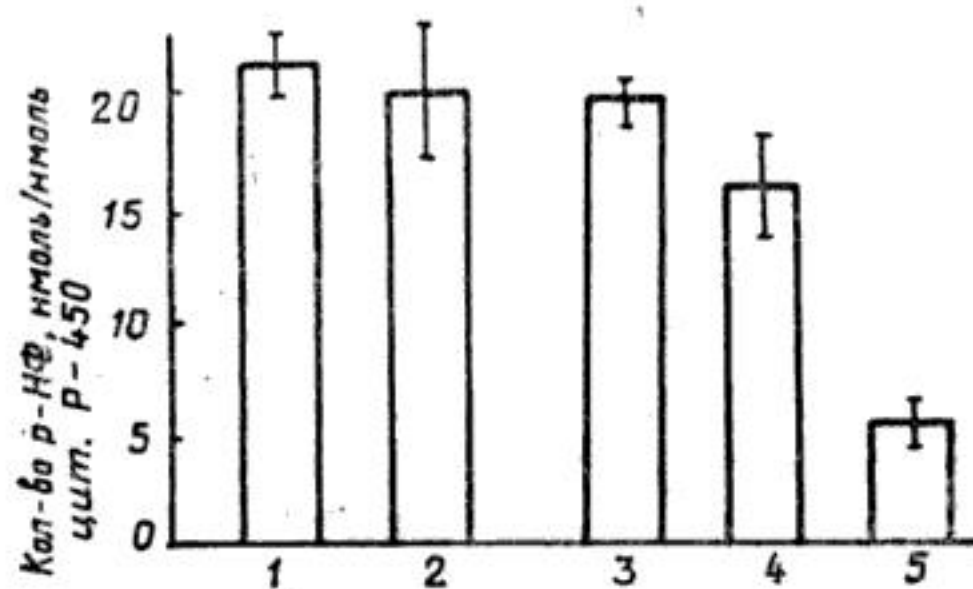
Для получения суспензии с высокой жизнеспособностью, не отличающейся от жизнеспособности нативных клеток, после криоконсервирования гепатоциты центрифугировали в градиенте плотности перколлы, что позволяло получить 87 ± 1 % жизнеспособных клеток.

Сравнение 0-деметилирующей активности свежевыделенных и криоконсервированных клеток одинаковой жизнеспособности показало, что ско-

рость метаболизма *p*-НА после криовоздействия снижается: криоконсервированные гепатоциты за 15 мин инкубации образуют $16,1 \pm 2,38$ нмоль *p*-НФ/нмоль цитохрома Р-450, тогда как свежевыделенные клетки за это же время образуют $19,9 \pm 1,19$ нмоль Р-НФ/нмоль цитохрома Р-450 (рис.).

Снижение детоксикационной активности после криоконсервирования и последующего разделения в перколле отмечали и в другой работе, когда исследовали деалкилирование и гидроксилирование ксенобиотиков [5].

Снижение монооксигеназной активности в криоконсервированных клетках может быть связано с угнетением активности ферментов, участвующих в биотрансформации ксенобиотиков и, в частности, со снижением содержания цитохрома Р-450 в цикле замораживания-отогрева [3, 5]. Для проверки этого предположения были проведены эксперименты с микросомами печени крыс [2]. При этом никаких отличий ни в содержании цитохрома Р-450, ни в скорости О-деметилирования *p*-НА между нативными и замороженно-отогретыми микросомами не было



Образование общего *p*-нитрофенола при инкубации нативных (1) и замороженно-отогретых (2) микросом, свежевыделенных (3), криоконсервированных (4) и пермеабиллизированных (5) гепатоцитов крыс (время инкубации — 15 мин)

выявлено. Это свидетельствует о том, что цитохром Р-450 и зависимые от него реакции устойчивы даже к жесткому замораживанию без криопротектора и поэтому вряд ли могут являться причиной угнетения монооксигеназной активности после криоконсервирования.

Другой возможной причиной угнетения скорости биотрансформации *p*-НА может быть повреждение плазматической мембраны части клеток в процессе инкубации при наличии в среде ксенобиотика. В отсутствие *p*-НА жизнеспособность клеток печени не изменялась, а после добавления снижалась на 11 % в свежевыделенных клетках и на 24 % — в криоконсервированных. Таким образом, в процессе инкубации возрастает число клеток с нарушенной плазматической мембраной. Роль барьерных свойств мембраны исследовали в экспериментах с пермеабиллизированными гепатоцитами. Для этого плазматическую мембрану свежевыделенных клеток специфически повреждали внесением низких концентраций дигитонина [1]. Жизнеспособность такой суспензии варьировала в пределах 9—16 %.

Оказалось, что пермеабиллизированные клетки метаболизировали *p*-НА с очень низкой скоростью (рис.), если в среде инкубации отсутствовал экзогенный NADPH. При добавлении 2 мМ NADPH количество образованного *p*-НФ не отличалось от количества, образованного интактными клетками. На основании этого можно заключить, что: 1 — в пермеабиллизированных клетках полностью сохранены активность и количество ферментов цитохром Р-450-зависимой системы микросомального окисления; 2 — снижение детоксикационной активности обусловлено снижением концентрации NADPH во внутриклеточной среде, вызванное нарушением целостности плазматической мембраны клетки. Очевидно, что аналогичные процессы происходят и при обнаруженном в работе снижении жизнеспособности криоконсервированных клеток печени при инкубации с ксенобиотиком.

Таким образом, результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что снижение скорости О-деметилирования *p*-НА криоконсервированными гепатоцитами связано с повреждением плазматической мембраны части клеток в ходе изотермической инкубации и потерей эндогенного NADPH, необходимого для биотрансформации ксенобиотиков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Грищук В. П., Петренко А. Ю. Распределение липофильного катиона тетрафенилфосфония в изолированных гепатоцитах крыс после замораживания-отогрева // Биохимические аспекты криоповреждения и криозащиты клеточных систем.— Харьков; Б. и., 1989.— С. 98—103.
 2. Мазур С. П., Петренко А. Ю. Криоустойчивость цитохром Р-450-зависимого 0-деметилирования *p*-нитроанизола в изолированных микросомах печени крыс // Биохимические аспекты криоповреждения и криозащиты клеточных систем.— Харьков: Б. и., 1989.— С. 104—108.
 3. Coundoris J., Hannah C., Grant H., Hawksworth G. Cryopreservation of isolated hepatocytes // Biochemical society Transaction.— 1986.— 14, N 4.— P. 692—693.
 4. Holme J. A., Eek-Hansen A., Jervell K. F. Inhibition of paranitroanisole and antipyrine monooxygenation in isolated rat hepatocytes by compound interacting with mitochondrially related carbohydrate metabolism // Acta Pharmacology et Toxicology.— 1982.— 50.— P. 272—282.
 5. Powis S., Santone K. S., Melder D. C. et al. Cryopreservation of rat and dog hepatocytes for studies of xenobiotic metabolism and activation // Drug Metabolism and Disposition.— 1987.— 15, N 6.— P. 826—832.
 6. Seglen P. O. Preparation of isolated rat liver cells // Meth. Cell Biology.— 1976.— 13.— P. 29—83.
- Ин-т проблем криобиологии и криомедицины
АН УССР, г. Харьков

Поступила 28.01.91.

S. P. MAZUR, A. M. BELOUS, A. Yu. PETRENKO

THE INVESTIGATION OF CAUSES OF INHIBITION OF THE ACTIVITY OF BIOTRANSFORMATION SYSTEM IN ISOLATED RAT HEPATOCYTES AFTER CRYOPRESERVATION

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

The rate of 0-demethylation of *p*-nitroanisole by isolated fresh and cryopreserved hepatocytes with similar viability were studied. The formation of the reaction product *p*-nitrophenol by cryopreserved cells during isothermal incubation decreased by 20 % and correlated with changes in cell viability. A high resistivity of cytochrome P-450-dependent system to freeze-thawing and changes in plasma membrane integrity has been demonstrated in experiments on isolated microsomes and permeated cells in the presence of NADPH. It has been concluded that a decrease in rate of metabolism of *p*-nitroanisole due to cryopreservation may be associated with the injury to plasma membranes of some cells during incubation with the xenobiotic and with a loss in endogenous NADPH.

УДК 577.323.425

А. Г. Веревкин, Е. Г. Березняк, М. А. Семенов, В. Я. Малеев

ИК-СПЕКТРОСКОПИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР НА СТРУКТУРУ И ГИДРАТАЦИЮ ДНК

Методом ИК-спектроскопии изучено влияние низких температур (до 80 К) на спектры поглощения азотистых оснований, сахаро-фосфатной цепи и связанной воды в увлажненных пленках тимусной ДНК. Найдено, что понижение температуры приводит к обратимому укорочению длин Н-связей между молекулами воды и фосфатными группами и, следовательно, к уменьшению поперечных размеров желобков ДНК. Подробный анализ спектров воды при низких температурах позволил установить величины вымерзающей и невымерзающей фракций воды гидратной оболочки ДНК и их зависимости от солевого состава системы ДНК-вода-ионы, что имеет важное значение для выбора оптимальных условий консервации нуклеиновых кислот.

Интерес к изучению структурного состояния ДНК и ее гидратной оболочки при низких температурах связан с практической потребностью выбора оптимальных условий криоконсервации и хранения генома, для чего необходимы сведения о молекулярных механизмах действия на ДНК низких температур и криопротекторов [1]. Кроме того, при исследовании нуклеиновых кислот при низких температурах [6] удается получить уникальную информацию о молекулярно-динамических свойствах ДНК, что важно для выяснения особенностей ее функционирования. Однако в настоящее время

почти нет сведений о влиянии низких температур на структуру ДНК и ее гидратно-ионное окружение, определяющее стабильность конформационных состояний ДНК при обычных температурах. Такие данные могут быть получены с помощью ИК-спектроскопии, которая, как известно, весьма чувствительна к конформации ДНК и физическому состоянию воды [4]. Поэтому целью настоящей работы было изучение влияния понижения температуры в интервале от 20 °С до —190 °С на ИК-спектры ДНК в пленках и сорбированной на нее воды при различных относительных влажностях (ОВ).

В работе использовалась ДНК тимуса теленка производства фирмы «Серва» (ФРГ), в которой на один моль фосфатов приходится один моль ионов натрия. Выращивание, увлажнение пленок ДНК и обработку спектров ДНК и сорбированной воды в области 700—2800 см⁻¹ проводили так же, как и в работе [4]. Для получения спектра сорбированной воды в области поглощения О—D валентных колебаний НDО изотопных молекул насыщенные растворы солей готовились с помощью воды, содержащей 10 % D₂O и 90 % H₂O.

Пленки ДНК готовились на подложках из флюорита и германия. Охлаждение кюветы с образцом производилось с помощью жидкого азота в криостате производства фирмы «Карл Цейс» ГДР. Температура кювет измерялась железо-константановой термопарой. Для поддержания заданной температуры использовались электрические нагреватели, управляемые датчиком температуры.

Понижение температуры пленки ДНК производилось после удаления из кюветы стаканчика с насыщенным раствором соли. Контроль содержания воды в образцах ДНК осуществлялся по поглощению воды в области 3400 см⁻¹.

Обработку спектров проводили, как в работе [4], путем построения зависимостей от влажности частоты (ν) и интенсивности (R) в относительных единицах $R = D_i^j / D_{20^\circ\text{C}}$, где D_i^j и $D_{20^\circ\text{C}}$ — оптические плотности в максимуме полосы поглощения соответственно при i — температуре, j — влажности и при 20 °С в сухом образце ДНК.

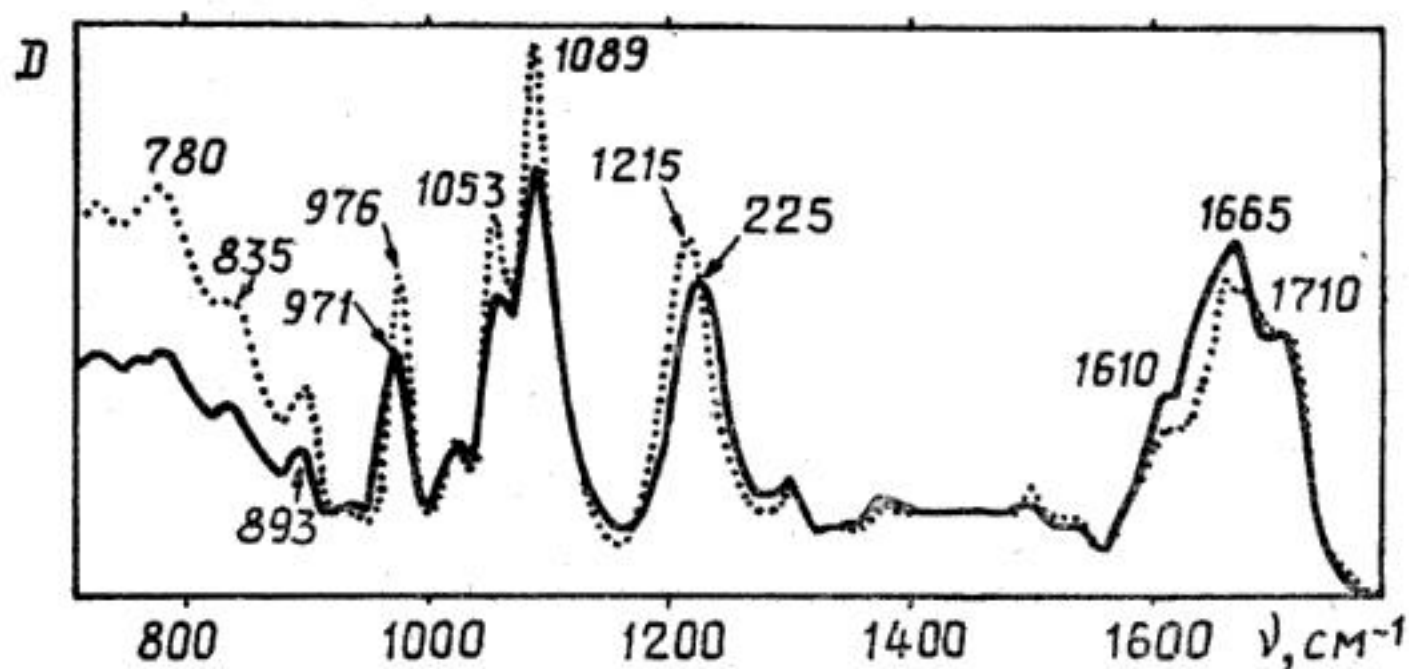


Рис. 1. ИК-спектры пленки ДНК, увлажненной при 86 % ОВ, при температурах 20 °С (—) и —190 °С (...)

Разделение спектра воды в области поглощения OD (2300—2700 см⁻¹) производили методом деформируемого многогранника [5] на ЭВМ БЭСМ-6. В качестве аналитической функции была выбрана линейная комбинация функций Гаусса и Лоренца. Авторы благодарят Е. Б. Старикова за составление и отладку соответствующей программы.

На рис. 1 приведены ИК-спектры в области 800—1800 см⁻¹ пленки ДНК при 86 % ОВ и различных температурах. Хорошо заметные изменения в спектрах характерны также для пленок, увлажненных при ОВ выше 56 %. Для образцов, увлажненных при ОВ ниже 56 %, изменений практически не наблюдается. Рассмотрим более подробно зависимости частот и интенсивностей от температуры t для полос поглощения сахаро-фосфатного остова, азотистых оснований и сорбированной на ДНК воды.

Полосы поглощения дезоксирибозного кольца. На рис. 2 представлены типичные зависимости ν и R от t для полосы поглощения дезоксирибозного кольца при 970 см^{-1} (колебания атомов $\text{O}-\text{C}_1-\text{C}_2$). Видно, что с уменьшением температуры интенсивность этой полосы поглощения нелинейно возрастает, а частота увеличивается. Интересно заметить, что качественно такие же эффекты наблюдаются и в случае денатурированной ДНК. Нелинейный рост интенсивности трудно объяснить только температурным изменением заселенности колебательных уровней. Поэтому мы полагаем, что такие изменения частоты и интенсивности данной полосы связаны с усилением водородных связей между молекулами воды и дезоксирибозой и изменением ее конформационного состояния.

Ранее подобные зависимости для ν и R наблюдались при увлажнении ДНК при комнатной температуре и объяснялись аналогичным образом [4]. Возможно, что понижение температуры, как и гидратация, вследствие увеличения силы водородных связей приводит к ограничению псевдовращения

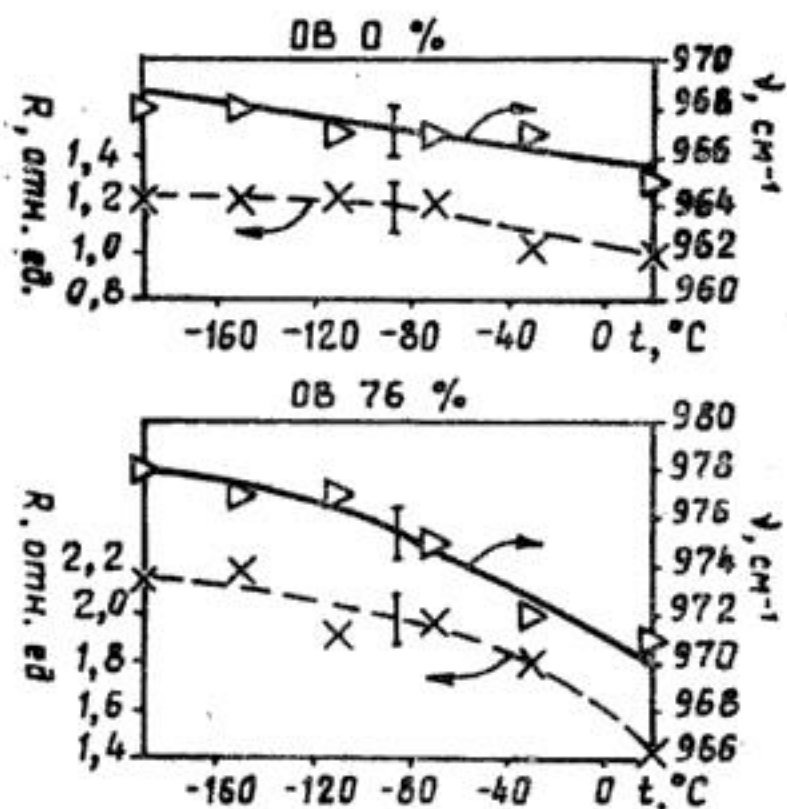
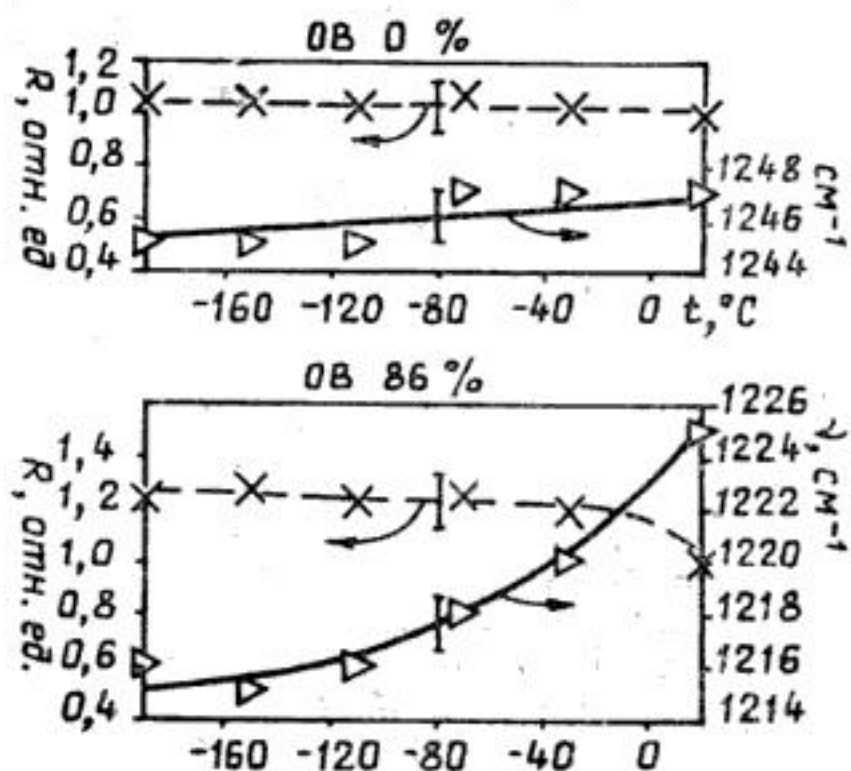


Рис. 2. Зависимости частоты (ν) и интенсивности (R) полосы поглощения дезоксирибозы при 970 см^{-1} от температуры для пленок ДНК при 0 % и 76 % ОВ

Рис. 3. Зависимости частоты (ν) и интенсивности (R) полосы поглощения антисимметричного колебания фосфата 1223 см^{-1} от температуры для пленок ДНК при 0 % и 86 % ОВ



дезоксирибозного кольца. В пользу этого вывода свидетельствуют незначительные изменения спектральных параметров полосы поглощения при 970 см^{-1} для сухих и малоувлажненных образцов ДНК.

Полосы поглощения фосфатных групп. На рис. 3 приведены зависимости ν и R от t для полосы поглощения антисимметричного колебания фосфата ДНК. Видно, что с уменьшением температуры наблюдается низкочастотный сдвиг и рост интенсивности полосы. Одновременно в 1,5—2 раза увеличивается интенсивность полосы поглощения симметричного колебания фосфата. Заметим, что величина этих эффектов зависит от степени увлажнения пленки ДНК. Ранее обнаруженные низкочастотные сдвиги ν_{as} и ν_s , а также рост интенсивности при гидратации ДНК были объяснены установлением водородных связей между молекулами воды и PO_2^- -группами [4]. Поэтому наблюдаемое низкотемпературное смещение полос поглощения фосфатов и рост их интенсивности свидетельствует об усилении этих связей. Такой характер изменения водородных связей приводит к локализации молекул воды на фосфатных группах и увеличению жесткости двойной спирали ДНК, что естественно приведет к определенным структурным изменениям. Отсутствие заметных спектральных изменений полос поглощения фосфатных групп в сухих образцах ДНК свидетельствует о том, что молекулы воды являются основной причиной структурных изменений ДНК при низких температурах.

Область поглощения азотистых оснований. На рис. 4 приведены зависимости R от t для полосы поглощения при 1660 см^{-1} для дейтерированных

образцов ДНК. Видно, что независимо от влажности или структурного состояния ДНК, в отличие от сахаро-фосфатных групп, полосы поглощения азотистых оснований практически не изменяют своих параметров при понижении температуры. По-видимому, это связано с тем, что азотистые основания, по сравнению с сахаро-фосфатным остовом, более жестко связаны как с «вертикальными» взаимодействиями (стэкинг-взаимодействие), так и уотсон-криковскими водородными связями. Поэтому, по оценкам из рентгеноструктурного анализа, они имеют малую подвижность [6].

В заключение рассмотрения спектров ДНК отметим, что повышение температуры до комнатной приводит к полной обратимости наблюдаемых спектральных изменений, что свидетельствует об обратимости структурных изменений ДНК.

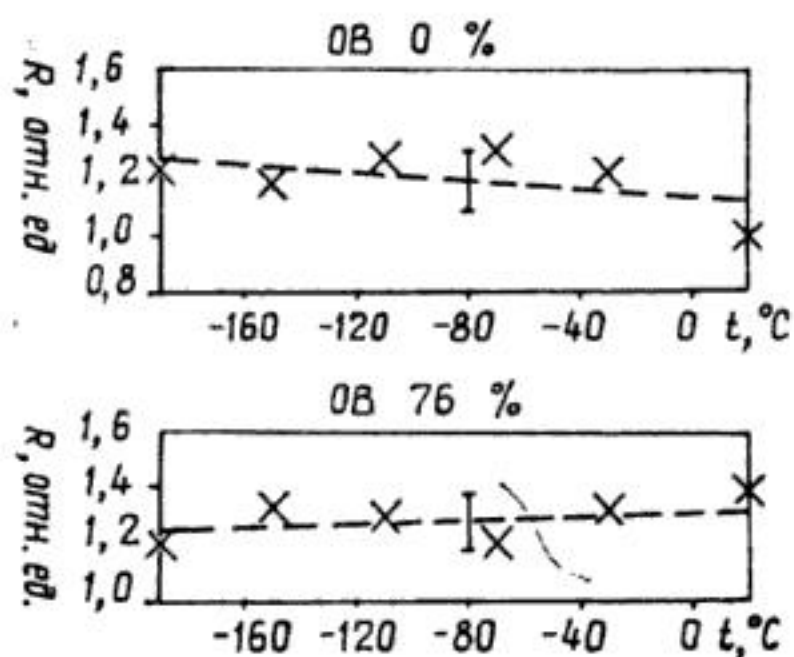


Рис. 4. Зависимости частоты (ν) и интенсивности (R) полосы поглощения карбонильного колебания азотистых оснований 1660 см^{-1} от температуры для дейтерированной пленки ДНК и 0 % и 76 % ОВ

Область поглощения сорбированной воды. На рис. 5 (а, б) показаны спектры сорбированной на ДНК воды в области поглощения ОД-групп при 80 % и 90 % ОВ. Видно, что понижение температуры до -190°C приводит, как и в случае полос поглощения фосфатных групп, к низкочастотному сдвигу и значительному росту интенсивности полосы. Это свидетельствует о том, что понижение температуры системы ДНК-связанная вода сопровождается усилением водородных связей молекул воды с гидратно-активными группами ДНК. Этот эффект, очевидно, должен привести к структурным изменениям самой ДНК.

На спектре сорбированной воды при 90 % ОВ на низкочастотном крыле полосы при -70°C появляется острый пик с частотой максимума 2410 см^{-1} , который соответствует вымерзшей воде (льду). Ранее факт образования при низкой температуре двух фракций воды был описан в работах [2, 7]. По термодинамическим свойствам эти фракции воды заметно отличаются [2]. Как видно из рис. 5, б, невымерзающая фракция по частоте колебаний О-Д

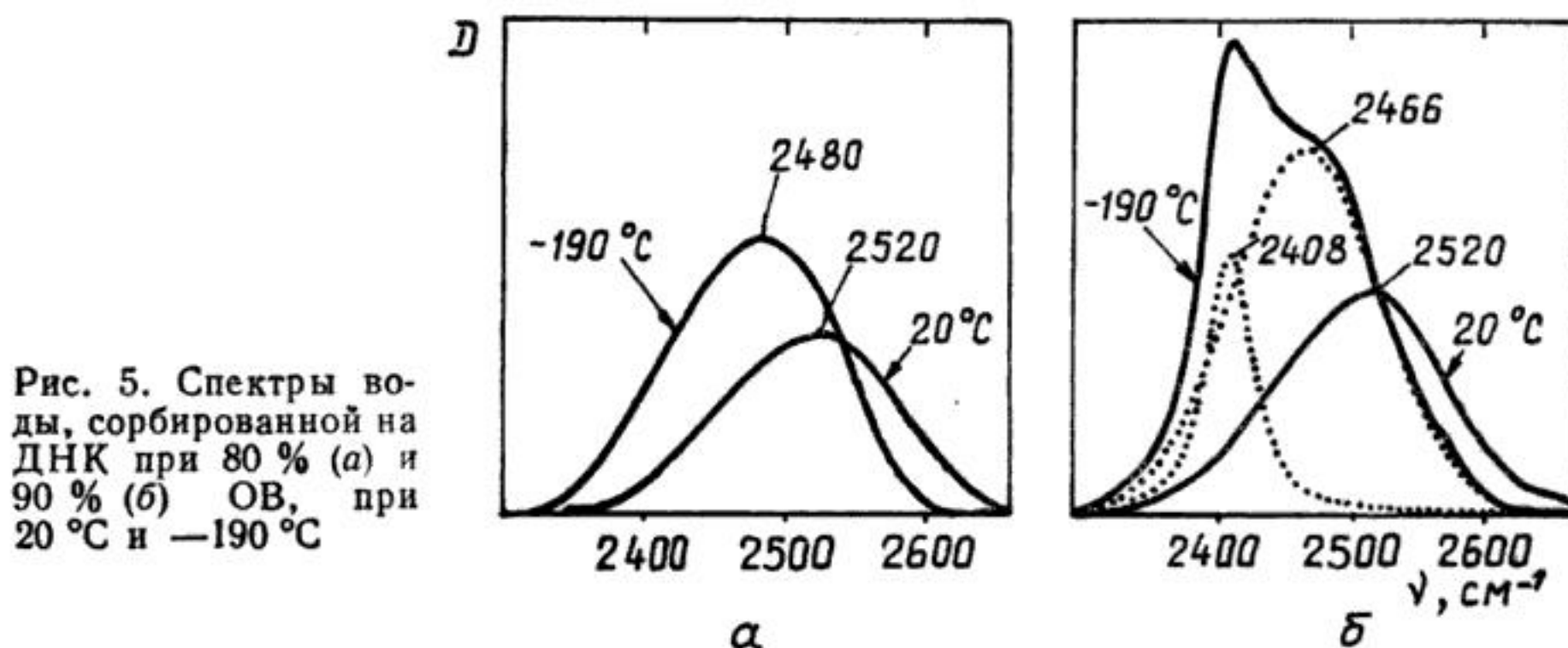


Рис. 5. Спектры воды, сорбированной на ДНК при 80 % (а) и 90 % (б) ОВ, при 20°C и -190°C

отличается приблизительно на $50\text{--}60\text{ см}^{-1}$, что свидетельствует о более низких значениях энергии водородной связи молекул в ней, по сравнению с вымерзающей фракцией.

Анализ интегральной интенсивности полос поглощения соответствующих фракций воды показал, что при 90 % ОВ величина невымерзающей и вымерзающей фракций составляют соответственно 12 и 3 молекулы воды на нуклеотид. При увеличении количества примесной соли невымерзающая фракция воды уменьшается и при 8 % NaCl она составляет 9 молекул воды.

По-видимому, часть молекул воды связывается с солью, а ионы натрия частично выполняют функцию воды в структуре ДНК. Подобный эффект был установлен Ричем с соавторами на монокристаллах дуплексов нуклеотидов [8, 9].

Таким образом, низкотемпературные спектры ДНК и сорбированной на ней воды свидетельствуют о том, что понижение температуры вызывает усиление водородных связей молекул воды с гидратно-активными центрами сахаро-фосфатной цепи. Образование более сильных водородных связей в условиях, когда тепловые колебания сводятся к минимуму, приводит к замораживанию подвижности атомных групп сахаро-фосфатного остова и к изменению водного хребта в желобках, поскольку при низких температурах длина водородных связей сокращается [3]. Это должно привести к сокращению размеров желобков ДНК, что в свою очередь окажет влияние на структуру сахаро-фосфатных цепей ДНК.

Оценим сокращение цепочки водородных связей, состоящей из 3—5 молекул воды, которые реально могут разместиться поперек желобков ДНК. Поскольку при понижении температуры частота валентного колебания O-D смещается в красную область (рис. 5) по отношению к частоте этого колебания при комнатной температуре, то экстраполяция к 16 К (—257 °С) дает величину частотного смещения приблизительно 80 см^{-1} . Из теории и эксперимента известно [3], что

$$\Delta\nu/\nu_0 \simeq 5,1 \Delta r,$$

где ν_0 — частота изолированной связи, $\Delta\nu$ — сдвиг по частоте при образовании водородной связи, Δr — уменьшение длины связи O-D. Из зависимости длины этой связи и длины водородной связи [3] можно найти, что «красному» сдвигу $\Delta\nu = 80 \text{ см}^{-1}$ отвечает уменьшение Δr на $0,01 \text{ \AA}$, что соответствует укорочению длины водородной связи на $0,1 \text{ \AA}$. Для водной цепочки из 3—5 молекул воды, связывающих два фосфата в противоположных сахаро-фосфатных цепях, сокращение водородных связей приведет к поперечному уменьшению желобка на $0,3\text{—}0,5 \text{ \AA}$. Эти оценки согласуются с величиной сокращения размеров минорного и главного желобков в додекамере [6], обнаруженного при 16 К (—257 °С). Таким образом, низкочастотные сдвиги полос поглощения связанной воды и фосфатных групп ДНК объясняют ранее неизвестную природу уменьшения поперечных размеров желобков ДНК при низких температурах.

В заключение укажем, что обнаруженная при низких температурах высокая обратимость структурных изменений ДНК, а также зависимость от солевого состава величины невымерзающей фракции воды в системе ДНК-вода-ионы позволяют выбрать такие условия хранения ДНК, при которых существенно уменьшено повреждающее действие низких температур вследствие кристаллизации воды при консервации, т. е. в системе должна быть только прочно связанная (гидратная) вода, доля которой в образце может регулироваться содержанием соли в консервируемой системе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Грищенко В. И. Достижения и перспективы развития криобиологии и криомедицины: Тез. докл. Международной конференции. Харьков, ИПКиК АН УССР, 1988. — С. 4.
2. Мревлишвили Г. М. Низкотемпературная калориметрия биологических макромолекул. — Тбилиси: Мецниереба, 1984. — 188 с.
3. Пиментел Д., Мак-Келлан О. Водородная связь. — М.: Мир, 1964. — 462 с.
4. Сухоруков Б. И., Семенов М. И., Малеев В. Я., Шабарчина Л. И. Исследование структурных превращений сахаро-фосфатной цепи и азотистых оснований гидрата ДНК методом ИК-спектроскопии // Биофизика. — 1979. — 24, N 4. — С. 611—619.
5. Химмельблау Л. Прикладное нелинейное программирование. — М.: Мир, 1975. — 534 с.
6. Drew H. R., Samson S., Dickerson R. Structure of B-DNA dodecamer at 16 K // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1982. — 79. — P. 4040—4044.
7. Falk M., Poole A. Y., Joutour C. J. Infrared study of the state of water in the hydration shell of DNA // Can. J. Chem. — 1970. — 48. — P. 1536—1542.

8. Rosenberg J. M., Seeman N. C., Day R. O., Rich A. RNA Double-Helical Fragments at Atomic Resolution: II. The Crystal Structure of Sodium Guanylyl-3,5-Cytidine Nonahydrate // J. Mol. Biol.— 1976.— 104.— P. 145—167.

9. Seeman N. C., Rosenberg J. M., Sudath F. I. et al. RNA Double-Helical Fragments at Atomic Resolution: I The Crystal and Molecular Structure of Sodium Adenylul-3,5-Uridine Hexahydrate // J. Mol. Biol.— 1976.— 104.— P. 109—144.

Ин-т радиопизики и электроники
АН УССР, г. Харьков

Поступила 27.06.90

A. G. VEREVKIN, E. G. BEREZNYAK, M. A. SEMENOV, V. Ya. MALEYEV

THE IR SPECTROSCOPIC STUDY ON THE INFLUENCE OF LOW TEMPERATURES ON THE STRUCTURE AND HYDRATION OF DNA

Institute for Radiophysics and Electronics of the UkrSSR Academy of Sciences, Kharkov

The effect of low temperatures (to 80 K) on the absorption spectra of nitrogen bases, sugar-phosphate chain and bound water in humid films of thymus DNA was studied. It has been found that decreasing the temperature leads to reversible shortening of H bonds between water molecules and phosphate groups, thus narrowing the DNA grooves. A detailed analysis of water spectra at low temperatures allowed to determine the amounts of frozen and unfrozen water of the DNA hydrate envelope versus the composition of the DNA-water-ions system. This appeared to be important for choice of optimum conditions for preservation of nucleic acids.

УДК 539.143.43 : 577.352.3

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

ПРИРОДА ПОВРЕЖДЕНИЯ И ГИБЕЛИ БАКТЕРИЙ *FRANCISELLA TULARENSIS* ПРИ МЕДЛЕННОМ ЗАМОРАЖИВАНИИ

Методами ЯМР-релаксации и ЭПР-спектроскопии исследовано медленное замораживание клеток вакцинного штамма *F. tularensis* в физрастворе. Показано, что гибель бактерий связана в основном с повреждением клеточных оболочек при набухании клеток в узких каналах незамерзшего раствора между кристаллами льда при температуре несколько ниже точки эвтектической кристаллизации соли.

Методами ЯМР-релаксации и ЭПР-спектроскопии исследованы явления, протекающие в клеточной суспензии при медленном замораживании, и реакция клеток вакцинного штамма туляремиального микроба на вымерзание воды и эвтектическую кристаллизацию солей KCl, NaCl, LiCl. Показано, что в доэвтектической зоне температур гибель бактерий связана с повреждением цитоплазматической мембраны (ЦПМ) в результате осмотического обезвоживания клеток и сжатия цитоплазматического пространства до «минимального объема». Нарушенные при этом барьерные свойства ЦПМ для ионов у значительной части клеток *F. tularensis*, шт. 15 восстанавливаются после отогрева при 37 °С, в результате выживаемость бактерий после завершения цикла «замораживание-оттаивание» оказывается достаточно высокой (> 40 %).

При замораживании клеточных суспензий до температур ниже точки эвтектической кристаллизации солей гибель бактерий после медленного отогрева составляет несколько порядков. Это объясняется повреждением клеточных оболочек, включая ЦПМ и клеточную стенку, при осмотическом набухании клеток в ответ на кристаллизацию соли (когда концентрация раствора в незамерзших жидких микрофазах резко падает). Такому набуханию препятствует встречное сужение каналов между кристаллами льда, наблюдаемое в ходе кристаллизации, что вызывает появление градиента осмотического давления на мембране и в конечном итоге приводит к разрыву клеточных оболочек и массовой гибели бактерий. По-видимому, репарация клеточной стенки — более сложный процесс, чем репарация ЦПМ, вследствие чего такие повреждения и оказываются летальными для микроорганизмов.

Разработка и усовершенствование вакцин на основе живых микроорганизмов (живых вакцин) неразрывно связаны с повышением выживаемости бактерий в процессе приготовления и хранения этих препаратов. Ослабленные (аттенуированные) штаммы микробов, применяемые для вакцинации, как правило хуже переносят экстремальные воздействия в сравнении с родительскими клетками. Это усугубляет проблему создания щадящей технологии производства высокоэффективных «живых вакцин», тем более, что на состав защитных сред накладываются жесткие медицинские ограничения, призванные исключить возникновение побочных реакций организма на чужеродные вещества. Слабая изученность процессов повреждения при «консервировании» микроорганизмов замораживанием или высушиванием не позволяет до настоящего времени сформулировать четкие научно обоснованные рекомендации по этому поводу [1].

В настоящей работе для исследования природы повреждений клеток при замораживании были использованы методы магнитной радиоспектроскопии: ядерный магнитный и электронный парамагнитный резонансы (ЯМР и ЭПР). «Прозрачность» замороженных биоматериалов для радиоволн позволяет применять эти методы для анализа структуры, фазового состояния и молекулярно-динамических свойств замороженных растворов и клеточных суспензий в присутствии фазы льда [3, 4].

В качестве объекта исследования был выбран один из наиболее лабильных микроорганизмов: *F. tularensis*, вакцинный штамм 15 Гайского [5], в качестве среды суспендирования — физраствор (0,15 М NaCl), широко применяемый в медицинской практике.

Клетки *F. tularensis*, шт. 15 выращивали в стерильных условиях, исключающих контаминацию посторонней микрофлорой, в колбах Эрленмейера на жидкой питательной среде, приготовленной на физрастворе и содержащей глюкозу, дрожжевой экстракт и цистин (суммарная осмолярность растворенных в питательной среде веществ $\sim 0,45$ осм), при 37°C и 160 об/мин в течение 18 ч (ранняя стационарная фаза роста). После окончания процесса культивирования клетки отмывали физраствором, а при необходимости (в исследовательских целях) изотоническими растворами KCl или LiCl; при необходимости вводили 2—20 мМ MnCl_2 , концентрировали до 5×10^{11} кл/мл, пробы по 0,3—0,5 мл вносили в 10 мм фторопластовые ампулы для ЯМР исследований и по 50—100 мкл в капилляры для записи ЭПР-спектров.

Исходные растворы NaCl, KCl, LiCl, MnCl_2 готовили в 1 М концентрации. Для приготовления использовали перекристаллизованные соли марки «ХЧ» и бидистиллированную воду.

ЯМР измерения (амплитуды сигналов — f_m и времена релаксации T_1 , T_2 протонов воды) проводили на приборе SXP-100/15 фирмы «Брукер», ФРГ, на частоте 90 МГц с использованием ЭВМ BNC-12. Амплитуды сигналов определяли экспоненциальной экстраполяцией релаксационных кривых T_1 и T_2 на нулевой момент времени. Данные совпадали между собой с точностью до 5 %. Ошибка измерения времен релаксации T_1 и T_2 при этом не превышала 10 %.

ЭПР спектры ионов Mn^{2+} записывали на приборе ER-200tt (этой же фирмы). Ширину спектра (ΔH) измеряли от первого максимума до последнего минимума шестикомпонентного сигнала аквакомплексов марганца. Замораживание образцов осуществляли непосредственно в датчиках ЯМР и ЭПР-спектрометров. Температуру в обоих случаях поддерживали с точностью $\pm 1^\circ\text{C}$ и контролировали с помощью температурной приставки, работающей на парах жидкого азота. Измерения проводили через 10—20 мин после установления теплового равновесия, фиксируемого по стабильным показаниям приборов (f_m , $\Delta H \simeq \text{const}$). Выживаемость бактерий после медленного отогрева ампул ($1\text{—}3^\circ\text{C}/\text{мин}$) определяли чашечным методом на эритроцит-агаре.

На рис. 1, б приведены зависимости амплитуд сигналов ЯМР протонов незамерзшей фракции воды от температуры, полученные при заморажи-

вании исходных растворов KCl, NaCl, LiCl. Образование льда в образцах инициировали при -5°C внесением крупинок снега, образующегося на кончике стеклянного капилляра при охлаждении в парах азота. Результаты измерения времен релаксации подвижных протонов и амплитуд сигналов ЯМР до и после завершения процесса первичной кристаллизации (образование льда при -5°C) в образцах 0,15 М и 1,0 М концентрации приведены

в таблице. После замораживания резко уменьшается время спин-спиновой релаксации T_2 и, соответственно, увеличивается отношение T_1/T_2 , причем в тем большей степени, чем ниже исходная концентрация соли в растворе и меньше амплитуда сигнала незамерзшей воды. Это объясняется тем, что размер каналов между кристаллами льда в первом случае меньше (0,15 М), чем во втором (1,0 М). Концентрация рассола и подвижность молекул воды (T_1) в жидких микрофазах в разных

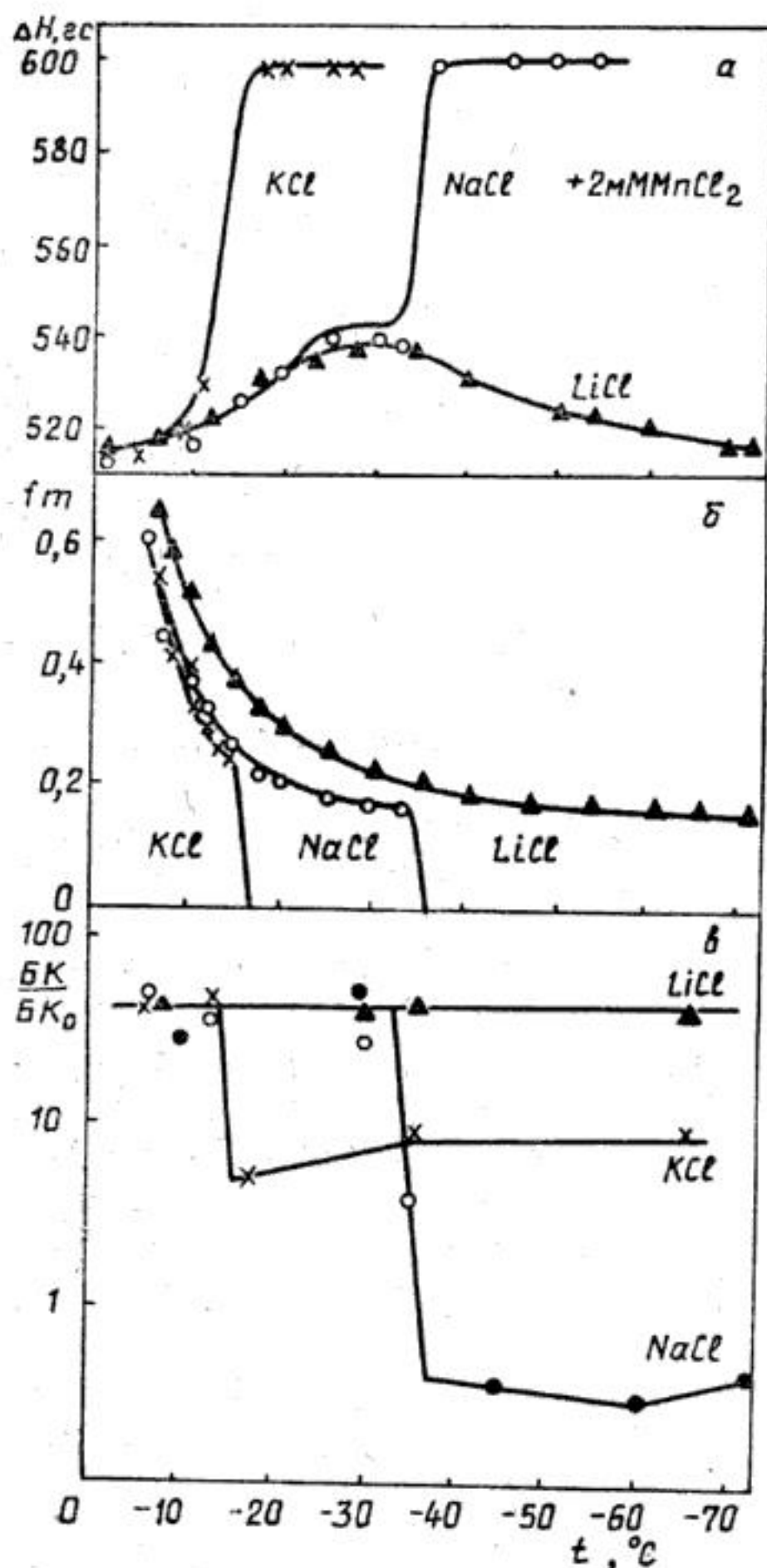


Рис. 1. Концентрация растворенных ионов (а) и количество незамерзшей воды (б) в жидких микрофазах (каналах) при медленном замораживании 1 М растворов KCl (x), NaCl (o) и LiCl (Δ) по данным методов ЭПР и ЯМР (ΔH — ширина шестикомпонентного спектра ЭПР примесных ионов двухвалентного марганца 2 мМ MnCl_2 , гаусс; fm — нормированная к 0°C амплитуда сигнала ЯМР протонов жидкой воды); (в) — выживаемость медленно замороженных и медленно отогретых клеток *F. tularensis*, шт. 15, суспендированных в физрастворе (o) и 0,15 М растворах KCl (x) и LiCl (Δ) в зависимости от глубины замораживания; (●) — данные Мазура и др. [9]

образцах при этом, как и следовало ожидать, оказывается примерно одинаковой.

При дальнейшем охлаждении образцов количество льда в системе возрастает, и отношение T_1/T_2 продолжает увеличиваться. Это связано с дальнейшим уменьшением объема жидкой фазы (рис. 1, в) и увеличением концентрации соли в ней. Рассчитанные по формуле $C = C_0/fm$ значения концентрации рассолов в жидких микрофазах хорошо совпадают с табличными данными по насыщенным растворам при соответствующих температурах (см. последнюю колонку таблицы). Это наблюдение было использовано нами ранее для определения осмолярности растворов в замороженных образцах и изучения осмотической реакции клеток в присутствии фазы льда [6].

Концентрирование солей при замораживании подтверждается и прямыми измерениями методом ЭПР. Как известно [3], при сближении (увеличении концентрации) парамагнитных ионов Mn^{2+} ширина их спектра ЭПР возрастает. На рис. 1, а приведены результаты измерения ширины спектра ЭПР ионов марганца, введенного в исследуемые растворы в концентрации 2 мМ. При замораживании наблюдается монотонное уширение спектра, которое прерывается резким увеличением ширины линии сигнала ЭПР ионов Mn^{2+}

Относительное количество незамерзшей воды ($fm = A/A_0$), времена ЯМР-релаксации подвижных протонов (T_1 и T_2) и концентрация солей в жидких микрофазах ($C = C_0/fm$) до и после замораживания растворов при -5°C

Образец	Концентрация соли C_0 , моль	До замораживания при -5°C			После замораживания при -5°C				
		T_1^0 , с	T_2^0 , с	$\frac{T_1^0}{T_2^0}$	fm	T_1 , с	T_2 , с	$\frac{T_1}{T_2}$	$\frac{C_0}{fm}$, моль
H_2O	0	1,28	1,16	1,10	Нет жидкой фазы				0
KCl	0,15	1,35	1,17	1,15	0,085	1,11	0,275	4,0	1,76
	1,0	1,43	1,25	1,14	0,569	1,20	0,580	2,1	1,76
NaCl	0,15	1,25	1,07	1,17	0,079	0,93	0,26	3,5	1,90
	1,0	1,10	0,95	1,18	0,526	0,95	0,59	1,6	1,90
LiCl	0,15	1,20	1,11	1,10	0,100	0,86	0,26	3,3	1,50
	1,0	1,00	0,91	1,11	0,654	0,88	0,58	1,5	1,53

при температуре $-12 \div -18^\circ\text{C}$ для раствора KCl и $-30 \div -35^\circ\text{C}$ для NaCl, то есть на $2-8^\circ\text{C}$ ниже точки эвтектики для KCl ($T_{\text{эвт}} = -10,5^\circ\text{C}$) и на $10-15^\circ\text{C}$ ниже $T_{\text{эвт}}$ для NaCl ($-20,7^\circ\text{C}$). Сигнал ЯМР протонов жидкой фазы при этом быстро уменьшается до нуля («вымерзает»). Это однозначно объясняется кристаллизацией соли из пересыщенного (переохлажденного ниже температуры эвтектики) раствора и последующим замерзанием оставшейся жидкой воды (вторичной кристаллизацией).

Для хлористого лития ($\text{LiCl} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; $T_{\text{эвт}} = -65,6^\circ\text{C}$) скачкообразного уширения спектра ЭПР, а также резкого исчезновения сигнала ЯМР не наблюдается. По-видимому, при таких низких температурах подвижность в системе достаточно мала, что препятствует быстрому пространственному перераспределению компонентов. В результате исследуемый раствор затвердевает аморфно.

На рис. 1, в приведены результаты определения выживаемости бактерий *F. tularensis*, шт. 15 после медленного замораживания-оттаивания в физрастворе и 0,15 М растворах KCl и LiCl. Темными точками обозначены показатели, приведенные в работе [9], полученные при исследовании устойчивости к замораживанию вирулентного штамма *F. tularensis*, *Schu S4*. Можно видеть, что в доэвтектической зоне температур во всех растворах погибает не более 30–60 % бактерий, причем основная их часть получает летальные повреждения в процессе первичной кристаллизации (образование льда). При охлаждении образцов ниже точек вторичной кристаллизации (для KCl и NaCl) выживаемость микроорганизмов после оттаивания катастрофически падает. Этого не происходит в растворе LiCl. Нетрудно заметить, что эти результаты связаны с особенностями замерзания этих растворов, обнаруживаемыми методами ЯМР и ЭПР.

Применение этих методов помогает разобраться и в механизме повреждающего действия замораживания на клетки. Известно, что добавление небольшого количества (2–5 мМ) парамагнитной соли MnCl_2 во внеклеточный раствор резко уменьшает времена ЯМР-релаксации протонов внеклеточной воды. Время релаксации протонов внутриклеточной воды при этом также уменьшается, но в значительно меньшей степени, определяемой водопроницаемостью мембран [8]. Этот прием позволяет оценивать целостность клеточных мембран и определять внутриклеточный объем клеток. Нами было показано, что эта методика пригодна и для исследования осмотической реакции клеток при замораживании в присутствии фазы льда [4, 6, 7].

В предварительных опытах было установлено, что MnCl_2 в концентрации 2–40 мМ не оказывает токсического влияния на туляремиальные микробы, а ионы Mn^{2+} в течение суток и более практически не проникают внутрь клеток *F. tularensis*, шт. 15. На рис. 2 показана кинетика уменьшения количества незамерзающей воды и связанного с ней осмотического сжатия клеток *F. tularensis*, шт. 15 (в физрастворе), а на рис. 3 — рассчитанная по

этим данным зависимость (обозначенная точками) водного объема клеток от осмотического давления в жидких микрофазах, построенная в координатах Бойля-Вант-Гоффа (V_a , л⁻¹). Крестиками на этом рисунке показана зависимость объема клеток от осмолярности раствора, полученная путем варьирования концентрации NaCl при положительной температуре (5 °C в отсутствие фазы льда). Из этих данных следует, что клетки *F. tularensis*, шт. 15 способны выдерживать без повреждения почти двукратное на-

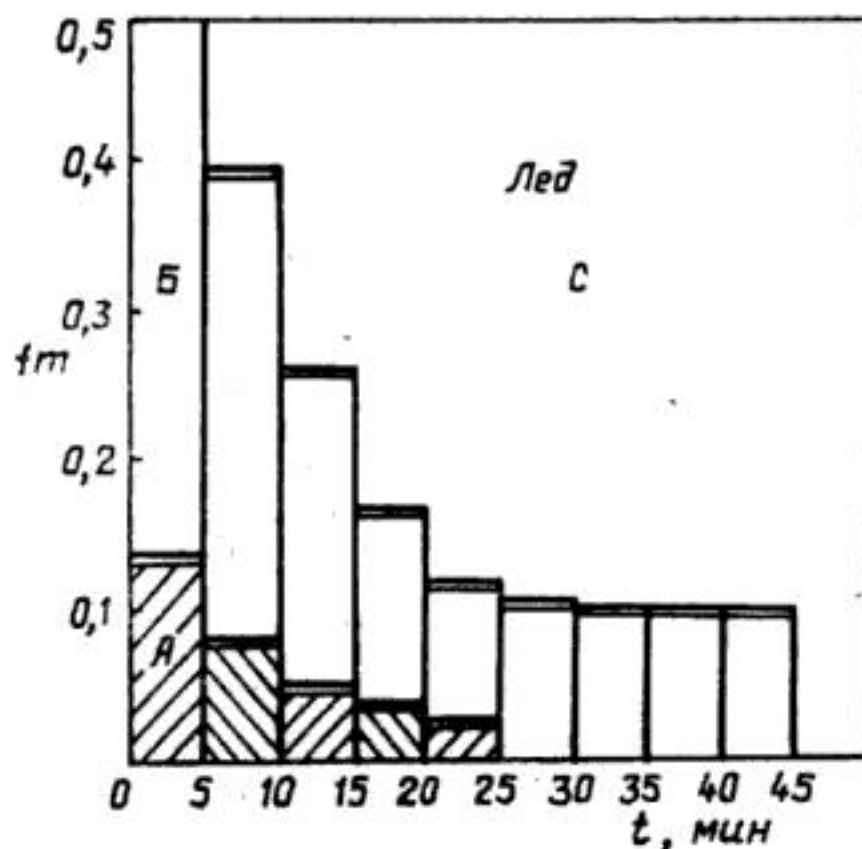


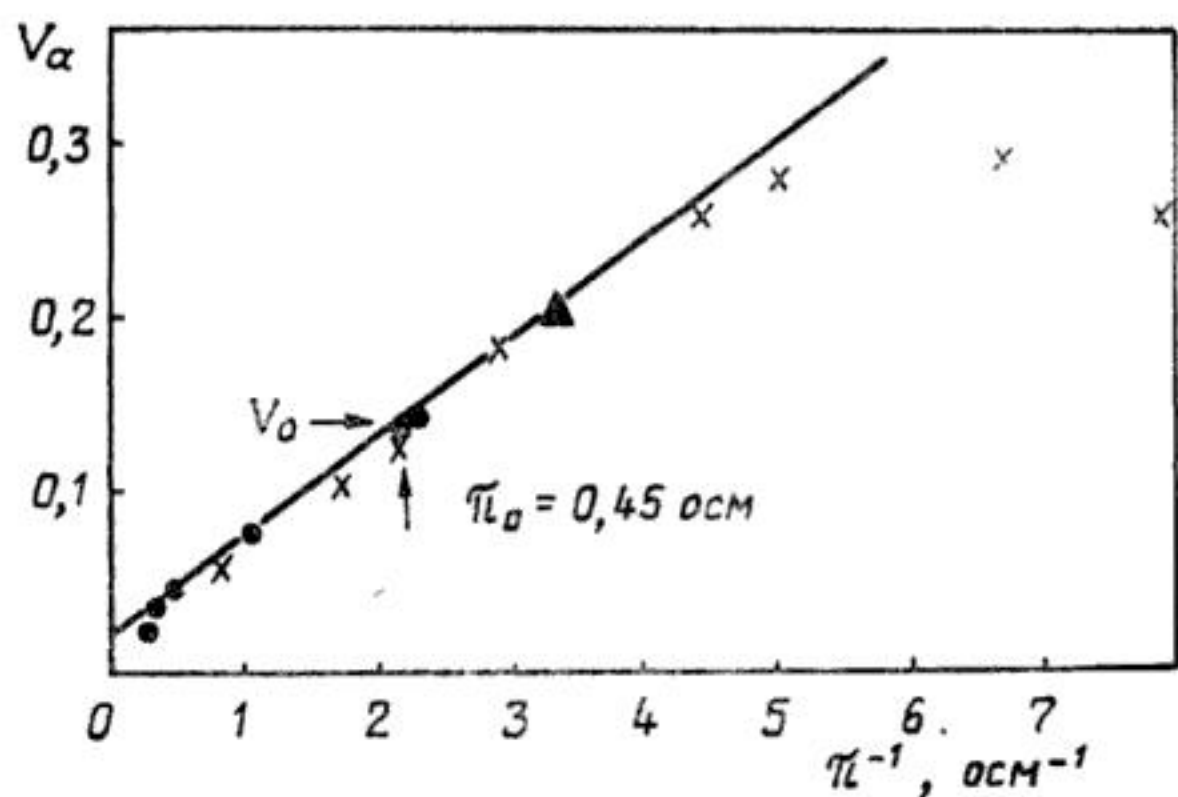
Рис. 2. Изменение количества незамерзшей внеклеточной воды (незаштрихованные столбики, Б) и суммарного внутриклеточного объема неповрежденных клеток *F. tularensis*, шт. 15 (заштрихованные столбики, А) от времени замораживания суспензии 0,15 М NaCl при -5 °C в датчике ЯМР-релаксометра (объем пробы 1 см³, диаметр пробирки 10 мм). Сумма (А+Б) характеризует общее количество незамерзшей воды в системе (fm), а незаштрихованная область над столбиками (С) соответствует количеству льда в образце

бухание и четырехкратное сжатие по сравнению с равновесным объемом в среде роста (V_0 , при $\pi_0 = 0,45$ осм), причем, изменение водного объема клеток подчиняется закону идеального осмометра в широком диапазоне осмолярностей от 0,25 до 2,5 осм при температурах как выше, так и ниже точки фазового перехода вода-лед.

Когда вымерзает около 90 % исходного количества воды в образцах, осмолярность раствора в жидких микрофазах достигает 3 осм, при этом исчезает различие между сигналами ЯМР релаксации внутри и внеклеточных протонов (рис. 2). Это означает, что ионы марганца проникли внутрь клеток, то есть барьерная функция мембран нарушилась у всей популяции бактерий. Однако, как отмечалось выше (рис. 1,в), после замораживания до температуры не ниже -30 °C (в NaCl) и отогрева выживает более 40 % клеток. Зондирование целостности мембран показывает, что их барьерная

функция восстановилась. Это наблюдение согласуется с литературными данными о «самозалечивании» бислойных модельных мембран и эритроцитов после оттаивания при температуре выше точки фазового перехода липидов в мембранах [2].

Рис. 3. Зависимость внутриклеточного водного объема $V_a = \frac{A}{A+B}$ клеток *F. tularensis* шт. 15 от осмотического давления в жидких микрофазах при -5 °C (●) и осмолярности в суспензии, задаваемой концентрацией NaCl при 5 °C (×), в координатах Вант-Гоффа. ○ — объем цитозоля клеток в среде роста, ▲ — то же, при переносе в физраствор (0,15 М NaCl)



В своих опытах мы воспроизвели эти результаты и, кроме того, установили, что клетки эритроцитов, освобожденные от гемоглобина (т. н. «тени» эритроцитов) сжимаются при возрастании осмотического давления в среде до 4—5 осм практически до нулевого объема цитоплазмы и не по-

вреждаются при этом. В то же время нативные эритроциты повреждаются уже при 4-кратном сжатии при $\pi = 2$ осм. Не вызывает сомнений, что повреждение мембран в этом случае связано с достижением «минимального объема» (обусловленного, в основном, внутриклеточными белками) и происходит оно вследствие нарастания градиента осмотического давления на ЦПМ при появлении «точки опоры» в виде уплотненного внутриклеточного содержимого [6].

Опыты с «теньями» в растворах KCl с добавкой 2—5 мМ $MnCl_2$ позволяют прояснить картину повреждений и в процессе вторичной кристаллизации. Поскольку они не повреждаются при первичной кристаллизации, сигналы ЯМР внутри- и внеклеточных протонов наблюдаются отдельно вплоть до точки эвтектики [7]. При дальнейшем более глубоком охлаждении насыщенный солевой раствор не замерзает, пока температура не достигнет $-12 \div -15^\circ C$. Затем происходит быстрая кристаллизация соли, осмолярность раствора в жидких микрофазах снижается, освободившаяся вода постепенно замерзает, и система затвердевает. Метод ЯМР-релаксации фиксирует увеличение внутриклеточного объема (набухание) в момент начала вторичной кристаллизации, которое быстро сменяется увеличением числа поврежденных клеток (падением V_a) [7]. Как в предыдущем случае, ионы марганца проникают внутрь клеток, и сигнал ЯМР становится однокомпонентным. Однако механизм повреждения при этом несколько иной. Градиент осмотического давления на мембране возникает не из-за сжатия клетки, а в результате растяжения ЦПМ при наличии препятствий для набухания в виде стенок капилляров между кристаллами льда, расстояние между которыми неотвратно сужается в процессе замерзания внеклеточной воды. При исследовании живых эритроцитов и бактерий *F. tularensis* реакцию клеток на кристаллизацию соли не удается наблюдать непосредственно, так как ионы марганца проникают в цитоплазму еще в процессе первичного льдообразования (рис. 2). Однако это не может изменить представленной картины процесса повреждения. Увеличение осмолярности внутриклеточного содержимого в результате проникновения внеклеточного раствора внутрь клеток в ходе первичной кристаллизации только усилит набухание клеток и их повреждение в процессе эвтектического затвердевания. То, что барьерные свойства мембран восстанавливаются после завершения первичной кристаллизации и выравнивания осмотических давлений вне и внутри клетки подтверждает определение выживаемости клеток, отогретых из доэвтектической зоны (рис. 1, в), а также опыты с добавлением марганца после замораживания. Необходимо также отметить, что повреждение ЦПМ при растяжении может произойти только одновременно с повреждением клеточной стенки, которая в данном случае играет роль подложки. По-видимому, такое повреждение является более серьезным для клетки, что и вызывает массовую гибель бактерий *F. tularensis* после отогрева из послеэвтектической зоны температур.

Полученные данные и их интерпретация хорошо согласуются со многими известными фактами из области криобиологии, в частности, полностью объясняют зависимость выживаемости клеток от осмолярности добавок и размера каналов в образцах после замораживания [10].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоус А. М., Цветков Ц. Д. Научные основы технологии сублимационного консервирования. — Киев: Наук. думка, 1985. — 208 с.
2. Белоус А. М., Бондаренко В. А., Бондаренко Т. П. Молекулярные механизмы криоповреждений биомембран // Биофизика (Итоги науки и техники. М., ВИНТИ АН СССР), 1978. — 9. — С. 80—114.
3. Вишневская Г. М., Гумеров К. М. Изучение структурных переходов в замороженных растворах Mn (II) методом ЭПР // ЖФХ. — 1978. — 32. — С. 1882—1886.
4. Волков В. Я., Сахаров Б. В., Волкова Л. А. Радиоспектроскопические методы в криобиологии // Криобиология. — 1985. — № 4. — С. 3—10.
5. Олсуфьев Н. Г. Таксомания, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии. — М.: Медицина, 1975. — 193 с.

6. Сахаров Б. В., Волков В. Я. Проницаемость и повреждение мембран эритроцитов при температурах от -1 до -9°C по данным метода ЯМР-релаксации // Биофизика. — 1984. — 29, № 2. — С. 264—267.

7. Сахаров Б. В., Волков В. Я. Факторы, вызывающие повреждения биологических мембран при медленном замораживании. Исследование замкнутых теней эритроцитов методом ЯМР-релаксации // Криобиология. — 1989. — № 3. — С. 13—18.

8. Conlon T., Outhred R. Water diffusion permeability of erythrocytes using an N. M. R. technique // BBA. — 1972. — 288. — P. 354—361.

9. Mazur P., Rhian M. A., Mahlandt B. G. Survival of *Pasteurella tularensis* in Gelatin-Saline After Cooling and Warming at Subzero Temperatures // Arch. Biochem. Biophys. — 1957. — 71. — P. 31—51.

10. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications // Am. J. Physiol. — 1984. — 247 (Cell Physiol., 16): C125—C142.

ВНИИ прикладной микробиологии,
Оболensk, Моск. обл.

Поступила 30.01.90

V. Ya. VOLKOV, B. V. SAKHARKOV, L. A. VOLKOVA

THE NATURE OF THE DAMAGE AND DEATH OF *FRANCISELLA TULARENSIS* BACTERIA BY SLOW FREEZING

All-Union Research Institute of Applied Microbiology, Obolensk

Slow freezing of the vaccine strain *Francisella tularensis* suspended in 0.15 M NaCl was studied by the methods of NMR relaxation and ESR spectroscopy. It has been found that bacterial death is due to damage of cell membranes during swelling of cells in narrow channels of unfrozen solutions between ice crystals below the eutectic temperature of salt precipitation.

УДК 57.043 : 591.3.044

А. Н. Новиков, Б. Н. Вепринцев, В. К. Утешев,
Т. И. Смолихина, Т. П. Линник

ТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ КРИПРОТЕКТОРОВ НА ЗАРОДЫШЕЙ ВЬЮНА И ЛЯГУШКИ

Изучено токсическое действие 28 веществ — представителей различных классов химических соединений на зародышей вьюна *Misgurnus fossilis* L. и лягушки *Rana temporaria* L. Показано, что токсическое действие веществ в пределах гомологического ряда коррелирует с их гидрофобностью. Рекомендованы в качестве нетоксичных крипротекторов для зародышей вьюна: диметилсульфоксид, α -пропиленгликоль, 1,3-бутандиол, 2,3-бутандиол; для зародышей лягушки — диметилсульфоксид.

Создание банка геномов редких и исчезающих видов животных требует разработки эффективной технологии глубокого замораживания зародышей. Для некоторых видов млекопитающих такие методы криоконсервирования созданы, но зародыши рыб и амфибий до настоящего времени не удается успешно заморозить. При разработке метода криоконсервирования одним из важных этапов является выбор крипротектора. Крипротектор должен эффективно защищать объект от повреждающего действия низких температур и в то же время не оказывать на него токсического действия. В настоящей работе представлено исследование токсического действия веществ — представителей различных классов химических соединений, применяемых в качестве крипротекторов, на зародышей вьюна и лягушки.

Работа выполнена на ранних эмбрионах вьюна *Misgurnus fossilis* L. и лягушки *Rana temporaria* L. Стимуляцию созревания ооцитов, инкубацию оплодотворенной икры и развивающихся зародышей вьюна проводили по методу А. А. Нейфаха [3]. В опытах использовали зародышей вьюна на стадии средней бластулы (стадия № 7). Стимуляцию созревания ооцитов лягушки проводили методом гипофизарной инъекции, 1—2 дозы гипофиза на самку. Искусственное оплодотворение икры, инкубацию зародышей проводили общепринятым методом [1]. В опытах использовали зародышей лягушки на стадии средней гаструлы (стадия № 14—15). Зародыши вьюна и лягушки на указанных стадиях развития помещали в 10 %-ные растворы

криопротекторов на 0,2 М *трис*-HCl буфере с pH 7,2—7,3. Брали по 0,1 мл раствора на 1 зародыш и выдерживали их в течение часа при температуре 20 °С. После экспозиции раствор криопротектора удаляли в течение 30 мин трехкратной отмывкой отстоявшейся водопроводной водой. Зародыши культивировали в чашках Петри до стадии вылупления личинок. Токсическое действие криопротекторов оценивали в процентах по количеству зародышей, дошедших до стадии вылупления. Погрешность определения выживаемости зародышей составила для вьюна $\pm 4,0\%$, для зародышей лягушки $\pm 7,5\%$ при $p = 0,05$. В опытах использовали икру одновременно от нескольких самок, количество повторов (т. е. чашек с икрой) указано в таблицах.

Для исследований были использованы 28 веществ — представителей следующих классов соединений: амиды, сульфоксиды, двух-, трехатомные спирты (марки «ХЧ», СССР) и их эфиры, полиэтиленоксиды с молекулярной массой 100—40000 (Лоба Хеми, Австрия). Для поиска корреляционной зависимости между токсическим действием криопротекторов и их свойствами были использованы ранее опубликованные данные физико-химических характеристик [2, 4]. Математическая обработка результатов проведена методами регрессионного и корреляционного анализа на ЭВМ СМ-4 [5].

В табл. 1 представлены результаты определения токсического действия веществ ряда диолов и глицерина на зародышей вьюна, в табл. 2 — повреждающего действия веществ ряда амидов и сульфоксидов на зародышей

Таблица 1

Влияние веществ ряда диолов и глицерина на зародышей вьюна ($n = 6$)

Вещество	Молекулярная масса,	Коэффициент распределения K_p , [4]	Поверхностная активность, 10^{-3} н/м · моль г, [4]	Выживаемость зародышей вьюна, %	Количество личинок вьюна с дефектами строения, %
Этиленгликоль	62,1	0,04	2,06	47 ± 3	6
α -пропиленгликоль	76,1	0,076	7,4	85 ± 4	2
β -пропиленгликоль	76,1	0,064	16,6	90 ± 4	6
Метилловый эфир этиленгликоля	76,1	0,121	11,8	82 ± 4	14
1,3-бутандиол	90,1	0,181	17,3	88 ± 5	6
1,4-бутандиол	90,1	0,137	16,9	92 ± 4	2
2,3-бутандиол	90,1	0,227	16,9	98 ± 2	2
Глицерин	92,0	—	—	0	—
Монометилловый эфир глицерина	106,0	—	—	0	—
Диметилловый эфир глицерина	120,0	—	—	78 ± 3 94 ± 4	6 2
Контроль					

вьюна, в табл. 3 — результаты исследования токсического действия ряда полиэтиленоксидов на зародышей вьюна и лягушки. И наконец, в табл. 4 приведены данные о токсическом действии ряда проникающих криопротекторов на зародышей лягушки. Как видно из приведенных данных (табл. 1—4), многие вещества, среди которых имеются широко применяемые криопротекторы, значительно повреждают зародышей вьюна (глицерин, этиленгликоль) и зародышей лягушки (глицерин, этиленгликоль, диметилформамид) на этапе эквilibрации при 20 °С. При этом видно, что уровень повреждения в результате действия изученных веществ выше на зародышах лягушки (см. табл. 3 и 4). Как следует из таблиц 1 и 2, обнаруживаются также нарушения в развитии личинок вьюна под действием некоторых из исследованных веществ. Так, в присутствии метилового эфира этиленгликоля, диметилацетамида, метилацетамида и ацетилморфолина количество личинок вьюна с дефектами строения выше, чем в контроле.

Таблица 2

Влияние веществ ряда амидов и сульфоксидов на зародышей вьюна ($n=4$)

Вещество	Молекулярная масса	Коэффициент распределения, K_p [2]	Поверхностная активность, 10^{-3} н/м. моль г, [2]	Выживаемость зародышей вьюна, %	Количество личинок с дефектами строения, %
Формаид	45,0	$3 \cdot 10^{-3}$	11,2	90 ± 4	—
Ацетаид	59,1	$6 \cdot 10^{-3}$	14,7	74 ± 4	6
Диметилформаид	73,1	0,87	19,4	80 ± 4	8
Диметилацетаид	87,1	0,99	27,2	72 ± 3	24
Метилацетаид	73,1	0,063	20,6	89 ± 5	21
Изопропилацетаид	101,0	0,81	32,3	0	—
Ацетилпиперидин	127,2	1,62	78,3	0	—
Ацетилморфолин	129,1	1,42	28,5	92 ± 4	14,5
Ацетилаэаноламин	103,1	0,03	18,0	12 ± 2	3
Ацетилдиэаноламин	147,0	0,38	39,8	90 ± 3	4
Диметилсульфоксид (ДМСО)	78,0	0,05	26,4	96 ± 3	—
Диэтилсульфоксид (ДЭСО)	106,0	0,45	26,5	82 ± 5	—
Контроль				98 ± 2	6

Таблица 3

Влияние полиэтиленоксидов (ПЭО) на зародышей вьюна и лягушки ($n=6$)

Вещество	Коэффициент распределения, K_p	Поверхностная активность, г	Выживаемость зародышей вьюна, %	Выживаемость зародышей лягушки, %
ПЭО-100	0,03	30,0	96 ± 3	25 ± 2
ПЭО-400	0,27	115,0	87 ± 3	45 ± 3
ПЭО-1500	3,5	176,0	88 ± 3	65 ± 3
ПЭО-3000	4,5	189,0	63 ± 3	45 ± 3
ПЭО-40000	5,3	226,0	38 ± 2	40 ± 3
Контроль			98 ± 2	74 ± 5

Таблица 4

Влияние некоторых криопротекторов на зародышей лягушки ($n=4$)

Криопротектор	Выживаемость зародышей лягушки, %
Этиленгликоль	20 ± 2
α -пропиленгликоль	40 ± 3
Глицерин	0
Диметилсульфоксид	68 ± 5
Диэтилсульфоксид	15 ± 2
Формаид	15 ± 1
Диметилформаид	20 ± 2
Ацетаид	63 ± 5
Диметилацетаид	68 ± 5
Контроль	74 ± 5

Считается [6], что для криозащитных веществ существует два вида проявления их токсичности: химический (или биохимический) и осмотический. При этом первый вид зависит от структуры и физико-химических свойств веществ явным образом, второй — в большей степени зависит от концентрации, температуры и способа введения вещества в клетки, чем от его природы. В рядах изученных веществ (табл. 1—3) молекулярная масса варьирует в достаточно широких пределах (соответственно и осмотичность сред, так как использована процентная концентрация криопротекторов). Следовательно, можно оценить преимущественный вклад того или иного вида токсичности в повреждения, получаемые зародышами вьюна и лягушки от действия веществ. Так, повреждающее действие криопротекторов ряда полиэтиленоксидов (ПЭО) на зародышей вьюна и лягушки прямо пропорционально коррелирует с молекулярной массой веществ, а следовательно, — обратно пропорционально с осмотичностью их растворов. Видимо, токсическое действие данных веществ на зародышей носит специфический характер. Это подтверждает и более сложная зависимость влияния ПЭО на зародышей лягушки от их молекулярной массы (имеет-

ся экстремум при молекулярной массе 1500). В рядах диолов (табл. 1) и амидов (табл. 2), а также в ряду некоторых проникающих криопротекторов (табл. 4) четкой зависимости от молекулярной массы веществ не обнаружено. Эти данные позволяют предположить, что преимущественный вклад в повреждающее действие изучавшихся веществ вносит их «химическая токсичность». Такая точка зрения подтверждается, в частности, при сравнении результатов влияния формамида и ацетилдиэтанолamina (табл. 2) или 1,3-бутандиола, 2,3-бутандиола и глицерина (табл. 1) на зародышей вьюна. В связи с этим предпринята попытка выявить корреляционную зависимость повреждающего действия изученных веществ на зародышей вьюна и лягушки от некоторых их физико-химических свойств — коэффициента распределения в системе вода-н-октанол (K_p) и поверхностной активности на границе раздела фаз вода-гептан (g). Выбор указанных физико-химических характеристик для этих целей основан на имеющихся данных [2, 4], которые были получены для других биологических объектов, о том, что цитотоксическое влияние криопротекторов на клетки в основном определяется этими свойствами веществ. Получены следующие результаты парной корреляции исследуемых параметров: в ряду ПЭО для выживаемости зародышей вьюна от K_p коэффициент корреляции $r = -0,84$ ($p = 0,05$), от g — $r = -0,9$ ($p = 0,05$); для выживаемости зародышей лягушки от K_p — $r = -0,76$, от g достоверная корреляция не обнаружена. Для ряда амидов ($n = 10$) достоверная корреляция ни от K_p , ни от g не выявлена (см. табл. 2).

В ряду проникающих криопротекторов (табл. 4), обеспечивающих выживаемость зародышей лягушки, наблюдается тенденция зависимости от K_p — $r = 0,45$ ($p = 0,2$) и от g — $r = 0,44$ (при $p = 0,2$). В ряду диолов ($n = 7$) для выживаемости зародышей вьюна корреляция от K_p выявлена, $r = 0,71$ ($p = 0,05$) и от g — $r = 0,91$ ($p = 0,05$). Таким образом, значимую зависимость повреждающего действия веществ на зародышей вьюна и лягушки удастся наблюдать только для гомологических рядов: для ПЭО и диолов. При этом, чем выше коэффициент распределения ПЭО, тем ниже выживаемость зародышей вьюна и лягушки в их присутствии. В ряду диолов зависимость обратная, но и уровень значений коэффициента распределения диолов на порядок ниже по сравнению с ПЭО. Видимо, существует пороговое значение K_p , при достижении которого вещества становятся токсичными. Зависимость повреждающего действия диолов на зародышей вьюна от K_p и g описывается уравнениями вида:

$$y = 32,3 + 706 K_p - 1950 K_p^2, \quad (1)$$

$$y = 24,7 + 9,1 g - 0,3 g^2, \quad (2)$$

где y — выживаемость зародышей вьюна, %.

Уравнения, описывающие токсическое действие ПЭО на зародышей вьюна и лягушки, имеют вид:

$$y_1 = 84,6 + 0,39 g - 0,003 g^2, \quad (3)$$

$$y_1 = 91,0 + 5,8 K_p - 2,96 K_p^2, \quad (4)$$

где y_1 — выживаемость зародышей вьюна, %.

$$y_2 = 32,0 + 17,3 K_p - 3,01 K_p^2, \quad (5)$$

$$y_2 = 6,81 + 0,62 g - 0,002 g^2, \quad (6)$$

где y_2 — выживаемость зародышей лягушки, %. В принципе полученные уравнения можно с определенной степенью приближения использовать для прогноза повреждающего действия еще не изученных соединений на данные объекты. Для этого требуется знать величину g или K_p для вещества, и в зависимости от уровня значений K_p или g выбирать соответствующее уравнение для прогноза. Подобный путь позволяет производить только грубый расчетный скрининг нетоксичных криопротекторов.

Наиболее реальным путем снижения токсического действия любого криопротектора остается выбор оптимальных условий экспозиции в нем объекта (концентрация, температура, время экспозиции). В табл. 5 пред-

Таблица 5
Результаты изучения влияния ДМСО
на зародышей вьюна и лягушки в планируемом
трехфакторном эксперименте

Концентрация ДМСО, % (в/в)	Время экспозиции, мин	Температура экспозиции, °С	Выживаемость зародышей, %	
			вьюна n = 6	лягушки n = 6
5	30	0	85 ± 4	98 ± 2
15	30	0	72 ± 3	98 ± 2
5	120	0	85 ± 4	70 ± 5
15	120	0	0	0
5	30	20	91 ± 4	90 ± 7
15	30	20	71 ± 3	90 ± 6
5	120	20	90 ± 4	85 ± 6
15	120	20	85 ± 4	0

ставлены результаты исследования токсического действия ДМСО на зародышей вьюна и лягушки в планируемом трехфакторном эксперименте. Варьировали три фактора: концентрацию ДМСО (x_1), время (x_2) и температуру (x_3) экспозиции. Использовали следующие стадии развития: для зародышей вьюна — поздняя бластула (№ 9), для зародышей лягушки — поздняя гаструла (№ 17). Рассчитанные по данным трехфакторного эксперимента адекватные уравнения регрессии со значимыми коэффициентами имеют вид для зародышей вьюна:

$$y_1 = 72,2 - 15,3 x_1 - 7,4 x_2 + 11,8 x_3 - 7,2 x_1 x_2 + 9 x_1 x_3 + 10,7 x_2 x_3, \quad (7).$$

Для зародышей лягушки:

$$y_2 = 66,9 - 19,4 x_1 - 28,1 x_2 - 19,4 x_1 x_2 + 4,4 x_2 x_3, \quad (8)$$

где y_1, y_2 — соответственно выживаемость зародышей вьюна и лягушки в %; x_1, x_2, x_3 — кодированные значения концентрации ДМСО, времени и температуры экспозиции соответственно. Уравнения адекватны при $p = 0,01$, коэффициенты регрессии значимы при $p = 0,05$.

Величина и знаки коэффициентов при факторах x_1 и x_2 в уравнениях (7) и (8) показывают, что при повышении концентрации ДМСО и увеличении времени экспозиции выживаемость зародышей вьюна и лягушки уменьшается пропорционально значениям соответствующих коэффициентов, что вполне согласуется с общепринятыми представлениями. Следует отметить более существенное повреждающее действие ДМСО на зародыши лягушки при увеличении времени экспозиции (x_2). Влияние температуры экспозиции более существенно проявляется на зародышах вьюна, при этом повышение температуры экспозиции способствует увеличению выживаемости зародышей. Это дает основание предположить, что в повреждающее действие ДМСО на зародышей вьюна вносит свой вклад и осмотическая токсичность. Следовательно, при выборе оптимальных условий экспозиции ДМСО с зародышами вьюна важное значение приобретает скорость введения криопротектора. Наличие в уравнениях (7) и (8) значимых коэффициентов парных влияний указывает на существенную зависимость повреждающего действия ДМСО от всех исследованных факторов одновременно. Таким образом, для снижения токсического действия ДМСО на зародышей вьюна можно рекомендовать следующие условия экспозиции: концентрация ДМСО — 5 %, температура — 20 °С, время — 30 мин; на зародыши лягушки: концентрация ДМСО — 5 %, температура — 0 °С, время экспозиции — 30 мин. В табл. 6 представлены результаты изучения токсического действия ДМСО на зародышей вьюна, полученные от разных самок. Как видно, наблюдается существенная вариабельность свойств самого биологического

Таблица 6
Влияние ДМСО на зародышей вьюна,
полученных от различных самок
(концентрация ДМСО 10 %, время
экспозиции 60 мин)

Самка	Контроль, %	Выживаемость зародышей вьюна в % после экспозиции с ДМСО при температуре	
		0° С	20° С
I	95 ± 4	58 ± 2	82 ± 3
II	87 ± 4	82 ± 3	88 ± 4

объекта. Учитывая температурную зависимость выживаемости зародышей [6], можно предположить, что самка I более чувствительна к повреждениям, обусловленным осмотической токсичностью, по сравнению с самкой II.

Таким образом, анализ полученных результатов свидетельствует о сложном характере повреждающего действия криопротекторов на зародышей вьюна и лягушки еще до замораживания, зависящего не только от свойств самого объекта. Среди изученных веществ (28 соединений) в качестве нетоксичных криопротекторов для зародышей вьюна можно рекомендовать ДМСО, ПЭО-100, α -пропиленгликоль, 1,3-бутандиол, 2,3-бутандиол: для зародышей лягушки — ДМСО.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дабаян Н. В., Слепцова Л. А. Травяная лягушка *Rana temporaria* L. // Объекты биологии развития. — М.: Наука, 1975. — 520 с.

2. Линник Т. П. Зависимость криопротекторной активности соединений ряда амидов от их физико-химических свойств: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Харьков, 1986. — 18 с.

3. Нейфах А. А. Использование метода радиоактивной инактивации ядер для исследований их фракций в раннем развитии рыб // Журн. общ. биол. — 1959. — 20. — С. 202—213.

4. Пичугин Ю. И. Зависимость цитотоксичности и криопротекторной активности диолов от их структуры и физико-химических свойств: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Харьков, 1988. — 18 с.

5. Стьюпер Э., Брюггер У., Джурс П. Машинный анализ связи химической структуры и биологической активности. — М.: Мир, 1982. — 232 с.

6. Фаррант Дж. Консервирование и стеклование // Криобиология. — 1988. — № 3. — С. 12—14.

Ин-т биологической физики АН СССР, г. Пущино,

Поступила 05.04.89

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

A. N. NOVIKOV, [B. N. VEPRINTSEV], V. K. UTESHEV, T. I. SMOLIKHINA,

T. P. LINNIK

THE TOXIC EFFECT OF CRYOPROTECTANTS ON LOACH AND FROG EMBRYOS

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

The toxic effect of 28 substances, representatives of various groups of chemical compounds, on loach and frog embryos was studied. It has been shown that the toxic effects of substances within the limits of homologous line correlates with their hydrophobicity. Dimethyl sulfoxide, 1,2-propane diol, 1,3-butane diol, 2,3-butane diol are recommended for loach embryos as non-toxic cryoprotectants and dimethyl sulfoxide — for frog embryos.

УДК 577.3

П. П. Нокс, Т. Ю. Щеголева, Д. Ю. Оксюк,
Г. Ш. Маргишвили, А. А. Коноченко

ГИДРАТАЦИЯ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРОВ ПУРПУРНЫХ БАКТЕРИЙ: ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ СВЧ-ДИЭЛЕКТРОМЕТРИИ

Методом СВЧ-диэлектрометрии исследованы параметры гидратации фотосинтетических реакционных центров (РЦ) двух видов пурпурных бактерий в водно-буферной среде и при добавлении криорастворителей. Зафиксировано отличие в величине и характере изменений гидратации РЦ при замене криопротекторов в зависимости от присутствия цитохромной субъединицы. Изменения комплексной диэлектрической проницаемости свидетельствуют о возможном проникновении криорастворителей в структуру РЦ, при котором меняется их функциональная активность.

Фотосинтетические реакционные центры (РЦ) — мембраносвязанные пигмент-белковые комплексы, несущие кофакторы электронного переноса, — являются уникальными природными системами преобразования световой энергии в энергию пространственно разделенных и стабилизированных разноименных электрических зарядов. Есть основания полагать [6, 7, 11, 12], что высокие квантовая и энергетическая эффективности этого процесса обеспечиваются, в частности, структурно-динамическими факторами, определяющими возможность формирования функционально активных электронно-колебательных и электронно-конформационных состояний РЦ. Известно, что важным фактором регуляции конформационной подвижности белков является состояние их гидратной (сольватной) оболочки. Ранее на РЦ пурпурных бактерий в составе фотосинтетических мембран и в изолированном виде показана существенная зависимость ряда элементарных актов фотопереноса заряда от степени гидратации препаратов [2, 6, 7, 9]. Оказалось также, что заметное влияние на функциональные процессы в РЦ оказывает и частичная замена воды криопротективными веществами [11, 22], модифицирующими состояние гидратного слоя окружения белков. Представлялось интересным продолжить исследования параметров гидратации РЦ различных видов, расширив их на препараты, находящиеся непосредственно в водно-буферных суспензиях, включающих криопротекторы. Это потребовало привлечения новых экспериментальных подходов, в качестве одного из которых был выбран метод СВЧ-диэлектрметрии [7].

Объектами изучения явились: а) препараты РЦ из *Rhodobacter sphaeroides*, белковый компонент которых состоит из трех гидрофобных полипептидов общей молекулярной массой около 100 кД, содержащие солюбилизирующий цвиттерионный детергент лаурилдиметиламиноксид (ЛДАО) до 50 % по массе. Использовали суспензии РЦ в 10 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7,0; содержание белка составляло около 6 мг/мл; б) препараты РЦ из *Chromatium minutissimum*, которые помимо близких по аминокислотному составу к трем указанным выше полипептидам включали прочно связанную с ними и несколько более гидрофильную субъединицу моногемового белка — цитохрома С с молекулярной массой около 50 кД. Содержание детергента, в данном случае — неионного, Тритона X-100, составляло до 50 % и более от массы комплекса. Эти препараты суспендировали в 40 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7,0, включающем 0,3 % детергента; исходная концентрация белка равнялась 2—4 мг/мл. Методики выделения и характеристики использованных препаратов приведены в работах [4, 13].

Измерения диэлектрической проницаемости суспензий фоторецепторных комплексов проведены на длине волны 7,6 мм (в области дисперсии свободной воды) с помощью СВЧ-диэлектрметра [16], позволяющего измерять комплексную диэлектрическую проницаемость водных растворов и суспензий в микроколичествах с точностью 2 % по ϵ' и 3 % по ϵ'' . В основу метода положено определение изменений параметров стоячей волны в волноводе при полном заполнении сечения волновода образцом.

В области дисперсии свободной воды основным характеристическим параметром системы является водный компонент. Исследованные растворы содержали относительно небольшие добавки низкомолекулярных агентов, которые не могли внести существенный вклад в релаксационный процесс, тем не менее их собственная гидратация и их участие в формировании гидратного окружения комплексов явно проявляется в относительных характеристиках поляризационной компоненты диэлектрической проницаемости, а также в потерях. Не оценивая абсолютную величину гидратации препаратов, что требует привлечения специальных моделей, которые для подобных мембранных белков не разработаны*, можно, тем не менее, констатировать

* Известные теоретические модели [20] можно использовать для достаточно плотно упакованных белков типа гемоглобина, миоглобина и т. п. [5], но и они приемлемы практически только для двухкомпонентной системы: белок-вода. К тому же их применимость довольно относительна, если сравнивать получаемые с их помощью числа гидратации с данными рентгеноструктурного анализа [15, 23].

большие отличия в характеристиках гидратного окружения РЦ *Chr. minutissimum* от *Rb. sphaeroides*. Из полученных данных (табл. 1 и 2) следует, что количество связываемой РЦ *Chr. minutissimum* воды более чем в 8 раз превышает таковое для РЦ *Rb. sphaeroides*. Регистрируемые отличия обусловлены, по-видимому, прежде всего наличием в препаратах РЦ *Chr. minutissimum* более гидрофильного, по сравнению с основным белком РЦ, цитохромного компонента, поскольку структура основного белка РЦ у обоих видов бактерий очень близка. Различия в детергенте (ЛДАО — в РЦ *Rb. sphaeroides*, Тритон X-100 — в препаратах РЦ *Chr. minutissimum*), скорее всего, также не являются определяющими, поскольку замена в РЦ *Rb. sphaeroides* ЛДАО на Тритон X-100 не отражается на поглощении образцом миллиметрового излучения (измерения выполнены Б. Г. Емцем, ХГУ, г. Харьков).

Таблица 1

Диэлектрические параметры (ϵ' , ϵ''), измеренные на длине волны 7,6 мм, для раствора белка РЦ *Rb. sphaeroides* в чистом 10 мМ натрий-фосфатном буфере и буфере, содержащем добавки криопротекторов, а также ϵ' и ϵ'' отдельно для среды суспендирования РЦ

Среда суспендирования	РЦ в среде суспендирования					
	ϵ'_1	ϵ''_1	ϵ'_2	ϵ''_2	$\Delta\epsilon' = \epsilon'_1 - \epsilon'_2$	$\Delta\epsilon'' = \epsilon''_1 - \epsilon''_2$
Чистый буфер	18,8	31,9	18,1	29,0	0,7	2,9
Буфер +50 % пропиленгликоля	8,1	8,7	8,6	7,6	-0,5	1,1
Буфер +50 % ДМСО	10,1	9,8	9,3	9,5	0,8	0,3
Буфер +50 % глицерина	10,0	6,8	8,9	6,1	1,1	0,7
Буфер +90 % глицерина	7,7	1,9	7,1	1,7	0,6	0,2

Таблица 2

Диэлектрические параметры (ϵ' , ϵ'') измеренные на длине волны 7,6 мм, для раствора белка РЦ *Chr. minutissimum* в чистом 40 мМ натрий-фосфатном буфере и буфере, содержащем добавки криопротекторов, а также ϵ' и ϵ'' отдельно для среды суспендирования РЦ

Среда суспендирования	РЦ в среде суспендирования					
	ϵ'_1	ϵ''_1	ϵ'_2	ϵ''_2	$\Delta\epsilon' = \epsilon'_1 - \epsilon'_2$	$\Delta\epsilon'' = \epsilon''_1 - \epsilon''_2$
Чистый буфер	18,3	29,0	13,1	16,4	5,2	12,6
Буфер +50 % пропиленгликоля	10,3	11,3	7,9	5,1	2,4	6,2
Буфер +50 % ДМСО	9,9	10,0	8,4	6,7	1,5	3,3
Буфер +50 % глицерина	9,3	6,6	8,6	5,7	0,7	0,9
Буфер +90 % глицерина	7,6	1,9	7,3	1,8	0,3	0,1

Существенные различия во влиянии белков двух видов РЦ на состояние растворителя (напомним, что регистрируются ϵ' и ϵ'' в области дисперсии свободной воды) наблюдаются и в системах, содержащих также, помимо буфера и РЦ, различные криопротекторы. Последние брались в концентрациях, при которых наблюдается их модифицирующее воздействие на функциональные свойства РЦ [11, 22]. Наиболее «активным» по этому показателю агентом является диметилсульфоксид (ДМСО), затем следует пропиленгликоль, а глицерин оказывает функциональные эффекты, близкие по величине к таковым для ДМСО, только при концентрации около 90 %. Само по себе влияние криопротекторов в тех же объемах, что использовались для функциональной модификации РЦ, на диэлектрические показатели непосредственно водно-буферной среды («растворителя» для РЦ) иллюстрируют столбцы 2, 3 табл. 1 и 2. Видно, что степень уменьшения ϵ' и ϵ'' среды при

введении криопротекторов возрастает в ряду 50 % (по объему) пропиленгликоля, 50 % ДМСО, 50 % глицерина, 90 % глицерина. Данная зависимость отражает величину связывания воды исследованными веществами, коррелирующую с показателями их гидратации и концентрацией. По результатам ультразвуковых измерений [10] степень гидратации для данных криопротекторов составляет, в экстраполяции к бесконечному разведению, для пропиленгликоля — 3,7, ДМСО — 4,0, глицерина — 7,0 молекул воды на молекулу криопротектора. Можно было бы ожидать, что добавление к водно-буферной среде, содержащей изучаемые вещества, белков РЦ, приведет к дальнейшему уменьшению регистрируемых значений ϵ' и ϵ'' за счет влияния РЦ, причем величина изменения этих показателей ($\Delta\epsilon$) будет убывать в соответствии с увеличением степени гидратации криопротектора, присутствующего в образце. Иными словами, чем в большей степени связывает воду криопротектор, тем в меньшей степени должно проявляться влияние на ϵ' и ϵ'' добавления белков РЦ. В случае *Chr. minutissimum* так действительно и происходит (табл. 2). Однако для образцов с РЦ *Rb. sphaeroides* присутствие этого белка приводит к противоположному, по сравнению с *Chr. minutissimum*, результату: наибольшие изменения ϵ' и ϵ'' наблюдаются для образцов, содержащих 50 % глицерина, меньшие изменения — для системы с 50 % ДМСО, а в препаратах с 50 % пропиленгликоля введение этих РЦ приводит даже к возрастанию абсолютных значений ϵ' .

Очевидно, в отмеченном характере поведения $\Delta\epsilon'$ для образцов с РЦ *Rb. sphaeroides*, отличающихся, напомним, отсутствием по сравнению с *Chr. minutissimum* более гидрофильного цитохромного компонента, существенную роль играет собственно комплекс триады полипептидов реакционного центра. Можно было бы предположить, что наибольшие изменения $\Delta\epsilon'$ для образцов с *Rb. sphaeroides*, содержащих глицерин, связаны с более выраженным эффектом предпочтительной гидратации белка, обусловленной этим веществом, а именно — термодинамической невыгодностью контакта глицерина с белком, его вытеснением с поверхности последнего при концентрациях меньше некоторого порога и стабилизацией гидратной оболочки белка [17—19]. В таком случае, однако, можно было бы ожидать, что подобный эффект будет в еще большей степени выражен для образцов с РЦ *Chr. minutissimum*, содержащих дополнительно значительную массу более гидрофильного цитохромного компонента. Этого, как следует из табл. 1 и 2, не наблюдается. Регистрируемое поведение $\Delta\epsilon'$ для образцов с *Rb. sphaeroides*, содержащих исследуемые криопротекторы, по-видимому, обусловлено спецификой взаимодействия мембранного белка РЦ с конкретными криорастворителями. Если последние проникают в структуру белка РЦ, в той или иной мере вытесняя оттуда воду и формируя некую общую водно-сольватную оболочку, то это может приводить к определенным конформационным перестройкам поверхности белковой глобулы. В свою очередь, это может сопровождаться дальнейшими изменениями величины гидратируемой площади и даже, вероятно, изменениями «знаков» гидратации. Для последнего эффекта часто оказывается достаточно небольших изменений взаимной ориентации взаимодействующих с растворителем молекулярных групп или атомов. Например, показано, что маннитол оказывает структурирующее влияние на окружающую воду, в то время как его стереоизомер — сорбитол, отличающийся только позицией одной гидроксильной группы, — проявляет уже структуроразрушающим эффект [21]. Или же: мочевины в растворе обладают структуроразрушающим действием на воду — из-за тесной сближенности двух атомов водорода в N-H связях, находящихся в транс-положении к карбонильной группе [3]. Однако по мере увеличения расстояния между этими атомами водорода в N-алкилированных производных мочевины вклад отрицательной гидратации быстро уменьшается [14]. Иными словами, можно предполагать, что определенные изменения структуры поверхности белка полипептидного комплекса РЦ, связанные со свойствами данного комплекса, могут при добавлении криопро-

текторов даже снимать (по диэлектрическим показателям) эффект влияния РЦ на состояние окружающего водного компонента. Все определяется, очевидно, как говорилось выше, способностью криорастворителей проникать в структуру РЦ и спецификой их взаимодействия с этим белком.

О том, что рассмотренные криопротекторы действительно модифицируют структуру по крайней мере поверхности полипептидного комплекса белка РЦ, свидетельствуют результаты экспериментов, проведенных на РЦ *Rb. sphaeroides*. Методом малоуглового рентгеновского рассеяния определялся радиус инерции R_g (характеризующий распределение рассеивающих частиц относительно центра массы) для РЦ в водно-буферной среде и при добавлении ДМСО или пропиленгликоля. R_g для РЦ в водно-буферном растворе составил 26 ± 1 Å, при добавлении ДМСО до 30 % это значение не изменялось, и R_g возрастал до 30 Å при концентрации ДМСО 50 %, для препаратов, содержащих 50 % пропиленгликоля, R_g равнялся 28,2 Å.

Проникновение ДМСО в гидратную оболочку белков, сопровождающееся вытеснением им молекул воды, зарегистрировано также методом ЯМР в работе [1]. Отметим, что и для глицерина при его высоких концентрациях наблюдаются эффекты проникновения в гидратные оболочки белков с формированием общей водно-сольватной оболочки [8, 17—19]. В какой-то мере отражением этого является, по-видимому, уменьшение величины $\Delta\epsilon'$ в препаратах с белком РЦ, содержащих высокую концентрацию (90 %) глицерина, хотя эффект, очевидно, и маскируется дальнейшим связыванием воды избытком криопротектора.

Итак, полученные результаты показывают, что при добавлении ряда криопротекторов к трехсубъединичным мембранным белковым комплексам фотосинтетических РЦ пурпурных бактерий эти растворители, очевидно, могут проникать в структуру РЦ, индуцируя определенные конформационные изменения по крайней мере поверхности белковой глобулы. Следствием такой модификации является изменение функциональной активности РЦ [11, 22]. Заслуживает также внимания факт значительной разницы в величине гидратации двух видов препаратов РЦ, отличающихся наличием цитохромного компонента, что требует дальнейшего изучения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аксенов С. И., Гаерилова И. И., Гантард М. Г., Ревокатов О. П. Исследование взаимодействия диметилсульфоксида с макромолекулами белков методом спинного эха ЯМР // Криобиол.— 1985.— № 4.— С. 31—33.
2. Годик В. И., Нокс П. П., Кононенко А. А. и др. Влияние обезвоживания на первичные пикосекундные стадии разделения зарядов у *Rhodospirillum rubrum* // Мол. биол.— 1984.— 18.— С. 1562—1568.
3. Завизион В. А., Кудряшов В. А., Хургин Ю. Г. Эффекты положительной и отрицательной гидратации в водных растворах мочевины и ее алкилпроизводных // Миллиметровые волны в медицине и биологии.— М.: Ротапринт ИРЭ АН СССР, 1989.— С. 269—275.
4. Захарова Н. И., Фабиан М., Успенская Н. Я. и др. Структурно-функциональные характеристики фотосинтетических реакционных центров, выделенных с лаурилодиметиламинноксидом из *Rps. sphaeroides* // Биохимия.— 1981.— 46.— С. 1703—1710.
5. Кашпур В. А., Малеев В. Я., Щеголва Т. Ю. Исследование гидратации сывороточного альбумина при N-F переходе методом СВЧ-спектроскопии // Докл. АН СССР.— 1974.— 215.— С. 218—220.
6. Кононенко А. А., Нокс П. П., Чаморовский С. К. и др. Перенос электрона и внутримолекулярная динамика фотосинтетических реакционных центров // Хим. физика.— 1986.— 5.— С. 795—804.
7. Кононенко А. А., Рубин А. Б. Бактериальный фотосинтез: динамика белков и перенос зарядов // Журнал ВХО им. Д. И. Менделеева.— 1986.— 31.— С. 502—507.
8. Куринов И. В., Крупянский Ю. Ф., Генкин М. В. и др. Изучение влияния состава и вязкости растворителя на молекулярную динамику САЧ методом рэлеевского рассеяния мессбауэровского излучения // Биофизика.— 1988.— 33.— С. 407—412.
9. Нокс П. П., Кононенко А. А., Рубин А. Б. Функциональная активность фотосинтетических реакционных центров из *Rps. sphaeroides* при фиксированной гидратации препаратов // Биоорг. хим.— 1979.— 5.— С. 879—885.
10. Пушкарь Н. С., Емец Б. Г., Калуга Ю. В. и др. Гидратация криопротектантов // Препринт Ин-та проблем криосл. и криомед. АН УССР.— Харьков, 1972.— 24 с.

11. Рубин А. Б., Кононенко А. А., Пащенко А. А. и др. Молекулярные механизмы трансформации энергии в первичных процессах фотосинтеза // Итоги науки и техники. Биофизика. — 20. — М.: ВИНТИ, 249 с.
12. Рубин А. Б., Кононенко А. А., Шайтан К. В. Электронно-конформационные взаимодействия в первичных процессах фотосинтеза // Итоги науки и техники. Биофизика. — 21. — М.: ВИНТИ, 161 с.
13. Сабо Я., Захарова Н. И., Успенская Н. Я. и др. Выделение и свойства фотосинтетических реакционных центров, содержащих цитохромы из хроматофоров *Chromatium minytilissimum* // Докл. АН СССР. — 1989. — 305. — С. 732—735.
14. Самойлов О. Я. Структура водных растворов электролитов и гидратация ионов. — М.: Изд. АН СССР, 1957, 182 с.
15. Щеголева Т. Ю. Гидратное окружение белка по данным пространственной структуры // Биофизика. — 1983. — 28. — С. 937—943.
16. Щеголева Т. Ю. Измерение электрических параметров тонких пленок образцов полидисперсных, жидких и твердых диэлектриков с большим поглощением в микроволновом диапазоне // Радиотехника и электроника. — 1981. — 2. — С. 2328—2333.
17. Arakava T., Timasheff S. N. Mechanism of polyethylene glycol interaction with proteins // Biochem. — 1981. — 24. — P. 6756—6762.
18. Crowe J. N., Crowe L. M., Carpenter J. F. и др. Interactions of sugar with membranes // Biochim. Biophys. Acta. — 1988. — 947. — P. 367—384.
19. Gekko K., Timasheff S. N. Thermodynamic and kinetic examination of protein stabilization by glycerol // Biochem. — 1981. — 20. — P. 4676—4667, 4677—4686.
20. Haggis G. H., Hasted J. B., Bachanan T. J. The dielectric properties in solution // J. Chem. Phys. — 1952. — 20. — P. 1452—1455.
21. Goodrich R. P., Handel T. M., Baldeschuyel J. D. Modification of lipid phase behavior with membrane — bound cryoprotectors // Biochim. Biophys. Acta. — 1988. — 938. — P. 143—154.
22. Paschenko V. Z., Korvatovsky B. N., Logunov S. L. et al. Modification of protein hydrogen bonds influences the efficiency of picosecond electron transfer in bacterial photosynthetic reaction centres // FEBS Lett. — 1987. — 214. — P. 28—34.
23. Watenpaugh K. D., Margulis T. N., Sieker L. C., Jensen L. H. Water structure in a protein crystal: Rubredoxin at 1.2 Å resolution // J. Mol. Biol. — 1978. — 122. — P. 175—190.

Ин-т радиофизики и электроники АН УССР, г. Харьков,
МГУ им. М. В. Ломоносова, г. Москва

Поступила 27.06.90

P. P. NOKS, T. Yu. SHCHEGOLEVA, D. Yu. OKSUK, G. Sh. MARGISHVILI,
A. A. KONONENKO

HYDRATION OF MEMBRANE PROTEINS OF THE PHOTOSYNTHETIC REACTION CENTERS OF PURPLE BACTERIA STUDIED BY SHF DIELECTROMETRY

*Institute for Radiophysics and Electronics of the UkrSSR Academy of Sciences, Kharkov;
M. V. Lomonosov State University of Moscow*

The hydration parameters of two kinds of purple bacterium photosynthetic reaction centers (RC) were studied in the water-buffer medium and with added cryosolvents. The quantitative and qualitative differences caused by the replacement of cryoprotectant have been observed as a function of the presence of cytochrome unit. Changes in complex dielectric permeability indicate that cryosolvents may permeate the structure of RC modifying their functional activity.

УДК 541.49 : 537.635 : 539.124

О. А. Нардид

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ИОНОВ МАРГАНЦА В ВОДНЫХ И ВОДНО-ГЛИКОЛЕВЫХ РАСТВОРАХ ГЛИЦИНА

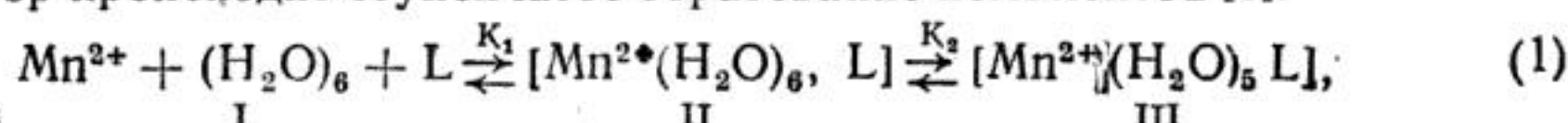
С целью оценки эффекта гиперконцентрации солей при замораживании биообъектов исследовано комплексообразование ионов марганца (II) с глицином вблизи изоэлектрической точки глицина (pH 6,0) и в средней точке первой стадии диссоциации глицина (pH 2,34). Показано, что при pH 6,0 константа устойчивости образующихся комплексов несколько выше, чем при pH 2,34. Исследование комплексообразования в растворах, содержащих хлорид марганца, глицин и этиленгликоль, свидетельствует об аддитивности комплексов Mn^{2+} с компонентами раствора. Изучено влияние диэлектрической постоянной среды в водноэтиленгликолевых растворах на образование $MnCl^+$.

Даны предположительные объяснения уменьшения возможного повреждающего воздействия гиперконцентрации солей на биологические структуры при замораживании в результате процессов комплексообразования.

Одним из факторов, вызывающих повреждение биологических структур, является повышение концентрации солей, возникающее при замораживании [6]. Существенное влияние, в частности, оказывают соли на структуру биомакромолекул [2]. Это может быть обусловлено «сшиванием» ионами звеньев пептидной связи, что в конечном итоге может приводить к агрегации белков. Поскольку защитное действие криопротекторов заключается в снижении чувствительности биообъектов к повреждающему воздействию, представляют интерес исследование влияния криопротекторов на комплексообразование аминокислот с биологически важными ионами металлов, так называемыми «биометаллами» [3], возможности образования смешанных комплексов, а также оценка устойчивости комплексов ионов металлов с аминокислотами и криопротекторами.

Цель данной работы — изучение методом ЭПР особенностей комплексообразования глицина с марганцем при различных pH и воздействия этиленгликоля на процессы образования комплексов.

Известно [5], что метод ЭПР позволяет определить концентрацию свободных ионов марганца и его можно использовать для исследования комплексов марганца. В водных растворах хлорида марганца в области малых концентраций ионов (до 0,05 моль/л) интенсивность сигнала ЭПР является линейной функцией концентрации ионов марганца. При добавлении лиганда в раствор происходит ступенчатое образование комплексов [1]:



где I — гидратированный ион марганца, II — внешнесферный комплекс, III — внутрисферный комплекс. Спектры ЭПР образующихся внутрисферных комплексов не детектируются из-за значительного искажения первоначально высокой октаэдрической симметрии гидратированного иона марганца, в результате чего наблюдается уменьшение интенсивности спектра ЭПР, тогда как образование внешнесферных комплексов вносит вклад в уширение линий спектров ЭПР. Эти обстоятельства были использованы в данной работе.

Спектры ЭПР снимались на спектрометре Брукер ER-100 D (ФРГ) при комнатной температуре. Для приготовления растворов использовался хлорид марганца марки «ч. д. а.», дополнительно очищенный этиленгликоль марки «ч», глицин фирмы «Реанал». Комплексообразование марганца с глицином изучалось вблизи изоэлектрической точки для глицина при pH 6,0 в буфере *трис*-HCl и в средней точке первой стадии диссоциации глицина при pH 2,34 в буфере Na_2HPO_4 -лимонная кислота.

При добавлении глицина в раствор хлорида марганца наблюдалось уменьшение интенсивности и увеличение ширины линий спектра, что свидетельствует об образовании комплексов глицина с марганцем. На рис. 1 представлены изменения интенсивности, а на рис. 2 — ширины четвертой линии спектра ЭПР со стороны низкого поля. Измерение параметров именно этой линии обусловлено тем, что она самая узкая, менее всего подвержена влиянию эффектов второго порядка и поэтому предпочтительна для измерения ширины. Из представленных рисунков видно, что характер изменения интенсивности и ширины линии одинаков для исследованных pH растворов.

Для каждого значения pH были вычислены константы устойчивости комплексов Mn (II) с глицином $K = K_1 \cdot K_2$, где

$$K_1 = \frac{C_0}{(M - C_0 - C_l)(L - C_0 - C_l)}, \quad (2)$$

$$K_2 = \frac{C_l}{C_0}, \quad (3)$$

M и L — общая концентрация Mn^{2+} и глицина, C_0 и C_i — концентрация внешне- и внутрисферных комплексов соответственно. Расчет концентраций внутрисферных и внешнесферных комплексов и соответствующих констант устойчивости проводили аналогично описанному подходу [6], используя изменения интенсивности и ширины линии спектра ЭПР Mn^{2+} . В результате проведенных расчетов мы определили, что константы устойчивости комплексов Mn^{2+} с глицином при pH 6,0 составили $K = K_1 \cdot K_2 = 1,83 \pm \pm 0,32$ (л/моль), при pH 2,34 — $K = K_1 \cdot K_2 = 1,49 \pm 0,32$ (л/моль). Более высокое значение константы устойчивости при pH 6,0 обусловлено усилением образования внутрисферных комплексов, что видно из рис. 1. Это

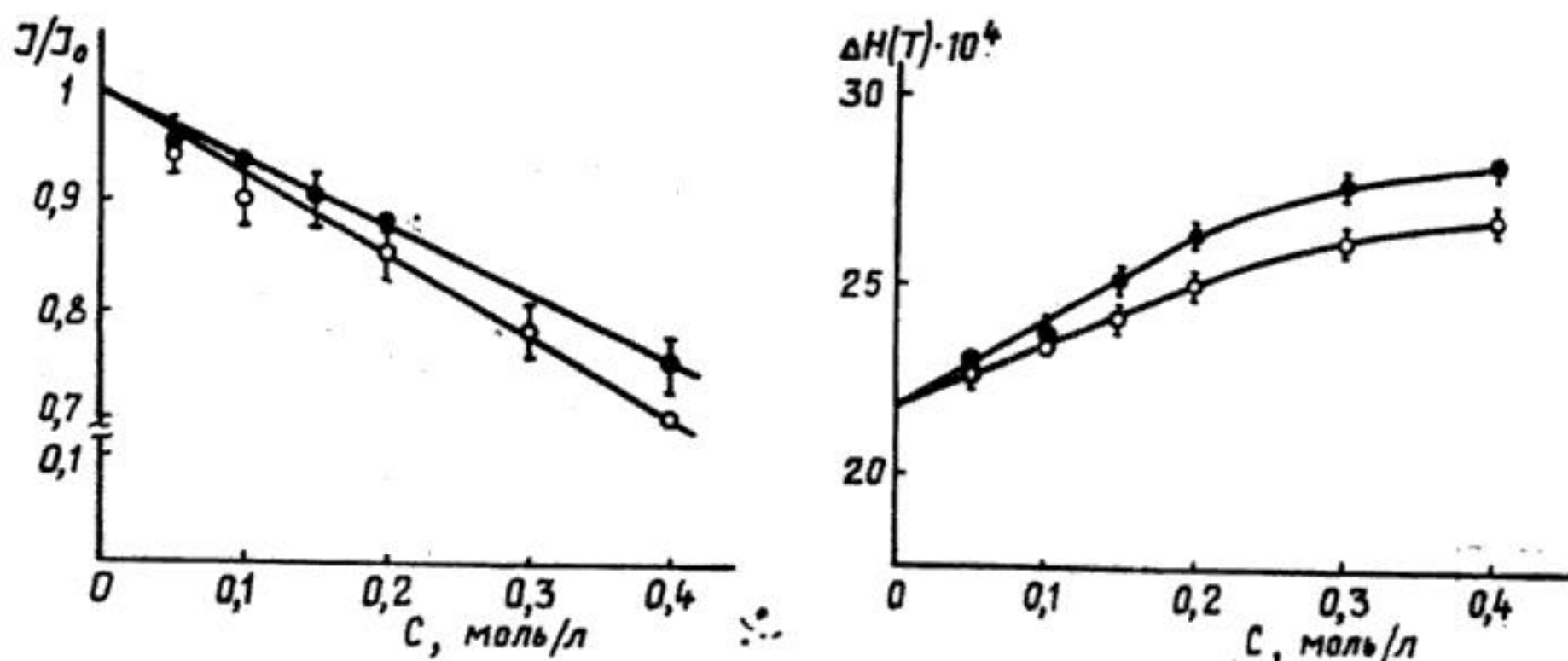


Рис. 1. Изменение интенсивности сигнала ЭПР Mn^{2+} (в относительных единицах) в зависимости от концентрации глицина при постоянной концентрации Mn^{2+} равной $5 \cdot 10^{-2}$ моль/л: $\circ$ — pH 6,0, $\bullet$ — pH 2,34

Рис. 2. Изменение ширины линии спектра ЭПР Mn^{2+} в зависимости от концентрации глицина при постоянной концентрации Mn^{2+} равной $5 \cdot 10^{-2}$ моль/л: $\circ$ — pH 6,0, $\bullet$ — pH 2,34

можно объяснить тем, что вблизи изоэлектрической точки глицина (pH 5,97) большинство молекул аминокислоты находится в цвиттерионной форме.

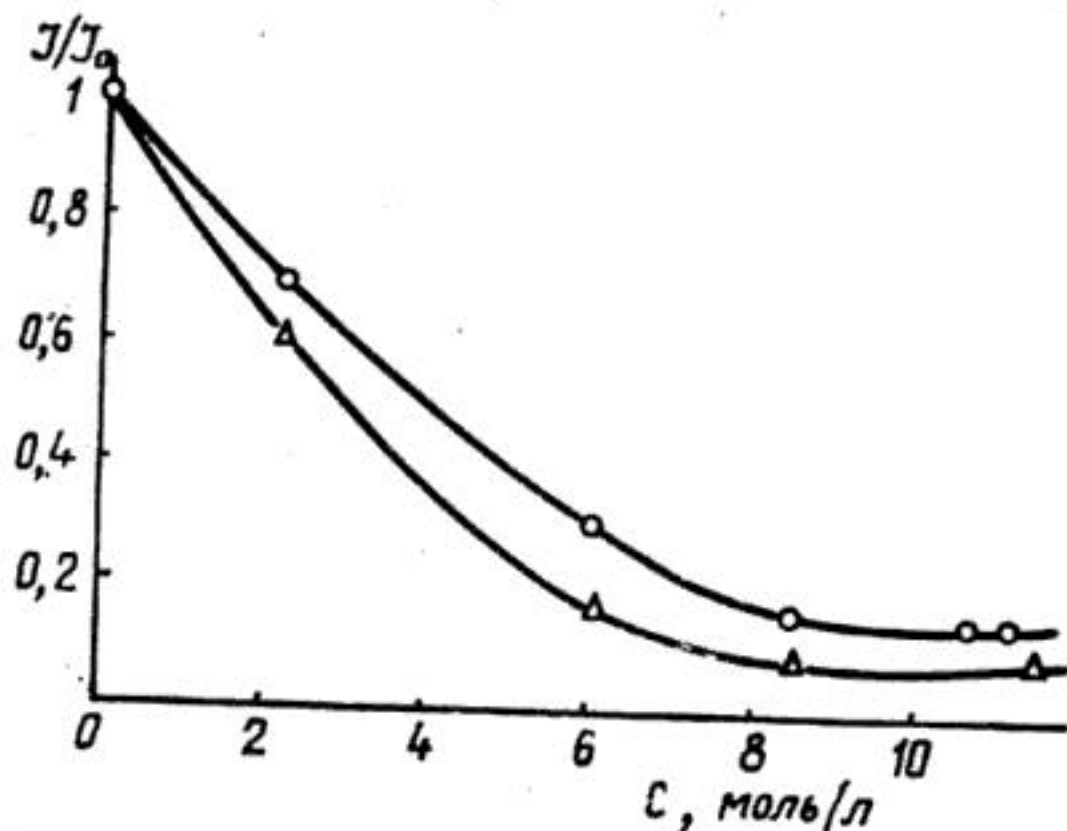
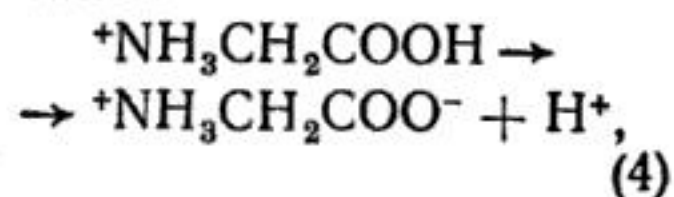


Рис. 3. Изменение интенсивности сигнала ЭПР Mn^{2+} (в относительных единицах) в зависимости от концентрации этиленгликоля: $\circ$ — раствор содержит этиленгликоль, Δ — раствор содержит этиленгликоль и глицин

имеющего общий положительный заряд с катионом марганца.

При добавлении этиленгликоля к растворам, содержащим 0,05 моль/л хлорида марганца и 0,05 моль/л глицина, наблюдалось значительное уменьшение интенсивности спектров ЭПР (рис. 3). Из сравнения графиков зависимостей интенсивности от концентрации этиленгликоля в 0,05 моль/л растворе хлорида марганца и в 0,05 моль/л растворе хлорида марганца, содер-

В такой диполярной форме молекула не несет суммарного электрического заряда. Вблизи же средней точки первой стадии диссоциации глицина (pH 2,34), описываемой уравнением



присутствуют в концентрациях, близких к эквимолярным, два вида ионов: донор протонов ($^+NH_3CH_2 \times COOH$) и акцептор протонов ($^+NH_3CH_2COO^-$). При этом маловероятно взаимодействие донора протонов,

жащем 0,05 моль/л глицина, видно, что в пределах ошибки эксперимента концентрация связанного марганца в последнем случае является суммой концентраций связанного марганца в растворе хлорида марганца, содержащем 0,05 моль/л глицина, и связанного марганца в растворе хлорида марганца, содержащем этиленгликоль.

В общем случае уменьшение интенсивности сигнала ЭПР в растворах $MnCl_2$ с этиленгликолем обусловлено как вхождением в первую координационную сферу катиона молекул этиленгликоля, так и образованием $MnCl^+$. Для того, чтобы выявить влияние молекул растворителя, необходимо знать изменение относительной интенсивности сигнала ЭПР, обусловленное только взаимодействием катиона с ионом Cl^- . Изменение интенсивности за счет такого взаимодействия можно определить, сравнив интенсивность сигнала ЭПР в растворах соли $Mn(ClO_4)_2$, анион которой не входит в первую координационную сферу. Тогда изменение откорректированной таким образом интенсивности сигнала ЭПР будет характеризовать только комплексообразование $Mn(II)$ с ионом Cl^- .

Взаимодействие $Mn(II)$ с анионами может быть описано уравнением, аналогичным (1), где под L в данном случае подразумевается анион A^{n-} .

Константы устойчивости при этом определяются из соотношений

$$K_1^{\text{ж}} = \frac{[Mn^{2+}, A^{n-}]}{[Mn^{2+}][A^{n-}]}, \quad (5)$$

$$K_2^{\text{ж}} = \frac{[MnA^{(2-n)}]}{[Mn^{2+}, A^{n-}]}, \quad (6)$$

где квадратные скобки обозначают активность.

Полная константа равновесия для образования комплекса катиона с анионом может быть вычислена из следующего уравнения

$$K^{\text{ж}} = \frac{[Mn^{2+}, A^{n-}] + [MnA^{(2-n)}]}{(Mn^{2+})(A^{n-})\gamma_{\pm}^2}, \quad (7)$$

где квадратные скобки обозначают активность, а круглые — концентрацию. Коэффициент активности $\gamma_{\pm}$ может быть вычислен из уравнения Дебая-Хюккеля:

$$\log \gamma_{\pm} = -\frac{A(Z_1Z_2)\sqrt{\mu}}{1 + Ba\sqrt{\mu}} + b\mu, \quad (8)$$

$A = 0,5091/(dt)^{3/2}$; $B = 0,3286 \cdot 10^8/(dt)^{1/2}$; $d = \epsilon/78,54$, $t = T/298,16$, где ϵ — диэлектрическая постоянная среды, а T — температура в градусах Кельвина, a — расстояние максимального сближения для ионов, b — эмпирический параметр.

Так как при увеличении концентрации ионов хлора не происходит уширения спектра ЭПР $Mn(II)$, исключая высокие температуры, то, по-видимому, ион хлора не входит в состав внешней сферы комплекса с Mn^{2+} .

Таким образом, константа равновесия образования ионной пары $MnCl^+$ может быть вычислена по полному уравнению следующего вида:

$$K_{Cl} = \frac{[MnCl^+]}{[Mn^{2+}][Cl^-]} = \frac{(MnCl^+)\gamma_{MnCl^+}}{(Mn^{2+})(Cl^-)\gamma_{\pm}^2}. \quad (9)$$

Константы равновесия, вычисленные по уравнению (9), представлены в таблице. Концентрация комплексов $MnCl^+$ определялась из откорректированной интенсивности линий ЭПР, а коэффициенты активности рассчитывались с использованием уравнения (8). Для этих вычислений было принято $a = 4 \text{ \AA}$ и $b = 0,1$.

Из значений констант равновесия, приведенных в таблице, следует, что равновесие в растворах, содержащих этиленгликоль, при увеличении его содержания резко сдвигается в сторону образования $MnCl^+$.

Таким образом, результаты проведенных исследований показывают, что в водногликолевых растворах ион $Mn(II)$ образует комплексные соеди-

Константы равновесия для формирования $MnCl^+$ в смеси H_2O -ЭГ

Мольная доля этиленгликоля	Диэлектрическая постоянная	K_{Cl}
0	78,48	1,6*
0,02	77,32	3,5
0,05	75,49	16,2
0,07	74,63	21,9
0,15	70,82	95,5
0,22	68,6	113,3
0,32	64,5	364,0
0,41	60,34	629,0
0,52	56,83	765,0

Примечание.*— Значение константы равновесия для водного раствора $MnCl_2$ взято из работы [4].

лением ассоциации противоионов. Такое комплексообразование приводит к уменьшению активности ионов и ионной силы среды. В связи с этим свойство катионов образовывать комплексные соединения создает благоприятные условия для биологических структур при низкотемпературном консервировании. Лабильность образуемых комплексов гарантирует обратимость происходящих процессов при возвращении в исходное состояние.

нения, в состав первой координационной сферы которых входят молекулы глицина, этиленгликоль и анионы. При этом понижение pH среды, что реально происходит при замораживании, несколько снижает константу равновесия комплексов с глицином. Это уменьшает вероятность образования солевых мостиков с пептидными группами при замораживании биологических структур. Кроме того, наличие в среде консервирования криопротекторов вызывает формирование комплексов, в состав первой координационной сферы которых входят анионы, что обусловлено уменьшением диэлектрической постоянной среды, а значит уси-

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ленгфорд К., Грей Г. Процессы замещения лигандов. — М.: Мир, 1969. — 159 с.
2. Розанова Е. Д., Науменко Е. И., Мусеев В. А. Влияние замораживания-отогрева на структуру и функцию цитохромоксидазы // Укр. биохим. журнал. — 1985. — 57, № 1. — С. 61—64.
3. Яцимирский К. В. Бионеорганическая химия и ее перспективы // Вестник АН СССР. — 1974. — № 7. — С. 34—39.
4. Bard J. R., Wear J. O. An ESR Study of Mn (II) Complexes in Water-Methanol Mixed Solvents // Z. Naturforsch. — 1971. — 266. N 11. — P. 1091—1096.
5. Cohn M., Townsend J. A study of Manganous Complexes by Paramagnetic Resonance Absorption // Nature. — 1954. — 173, N 4414. — P. 1090—1091.
6. Luyet B. J. Anatomy of the freezing process in biological material // Cryobiology. — London — New York. — 1966. — P. 115—137.

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

Поступила 21.03.91

O. A. NARDID

A STUDY ON THE INTERACTION BETWEEN MANGANESE IONS IN AQUEOUS AND WATER-GLYCOL GLYCINE SOLUTIONS

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

To estimate the effect of increased salt concentrations upon freezing of biological systems, the complex formation of manganese ions (II) with glycine has been studied near the glycine isoelectric point (pH 6.0) and at the mean point of the first stage of glycine dissociation (pH 2.34). It has been shown that the stability constant of forming complexes is somewhat higher at pH 6.0 than at pH 2.34. The additivity of Mn^{2+} complexes with solution components has been demonstrated in solutions containing manganese chloride, glycine and ethylene glycol. The effect of dielectric constant of the medium in water-ethylene glycol solutions on the production of $MnCl^{2+}$ was studied. A decrease in possible damaging effect of increased salt concentrations on biological structures upon freezing due to complex formation processes are explained.

Э. З. Эмирбеков, А. А. Сфиев, Н. К. Кличханов

ИССЛЕДОВАНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ КРЫС ПРИ ГИПОТЕРМИИ

Приведены данные по изучению устойчивости эритроцитов к кислотному гемолизу и уровню свободного гемоглобина в плазме крови крыс при гипотермии 20 °С различной длительности, а также через сутки после их самосогревания. Обнаружено снижение устойчивости эритроцитов к кислотному гемолизу и повышение уровня свободного гемоглобина в плазме крови во время гипотермии. Через сутки после самосогревания изученные параметры полностью не нормализуются.

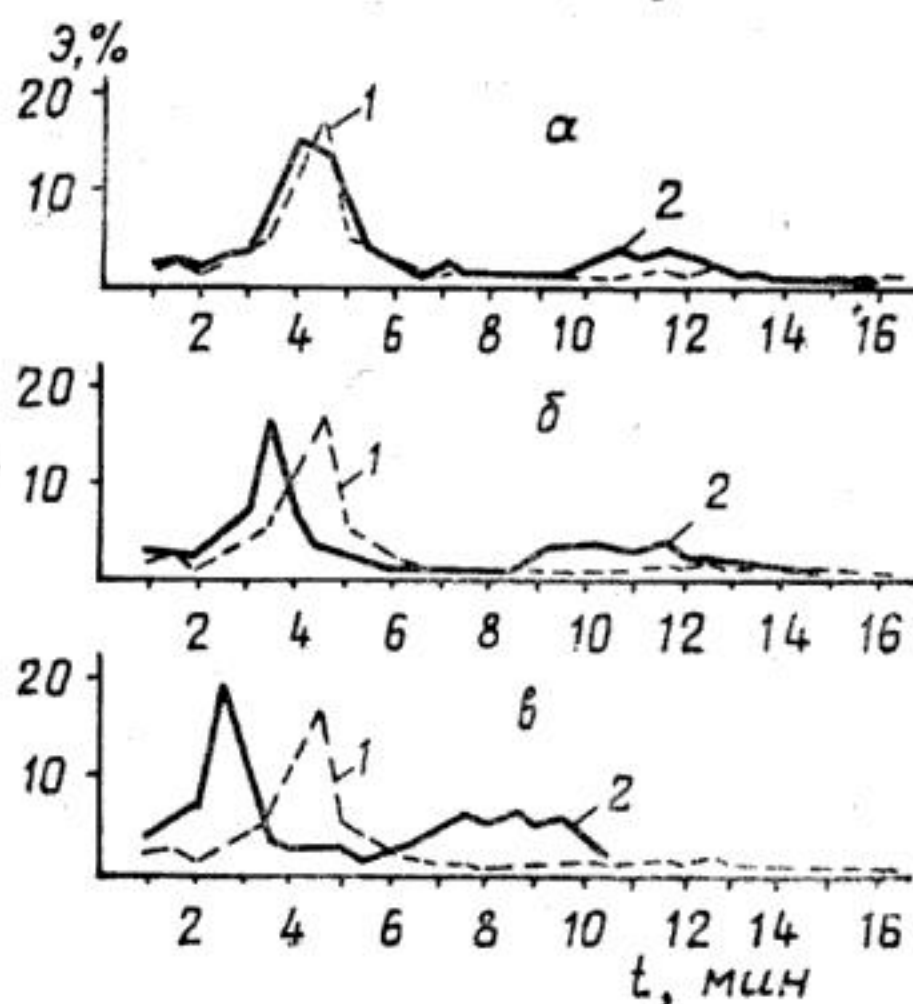
Наиболее чувствительной к низким температурам структурой клетки являются мембраны [3, 6]. Для исследования влияния различных экстремальных факторов, в том числе и гипотермии, на структуру мембран наиболее удобным объектом являются эритроциты [9]. Нарушение структуры мембраны приводит не только к изменению кислородотранспортной функции эритроцита, но и к выходу гемоглобина в плазму крови. В то же время гемоглобин и продукты его деструкции инициируют дальнейшее развитие патологических процессов [7]. Одним из чувствительных тестов, характеризующих изменение структуры мембраны в целом, является устойчивость эритроцитов к кислотному гемолизу. О степени стабильности эритроцитарной мембраны и уровне внутрисосудистого гемолиза можно судить также по концентрации свободного гемоглобина в плазме крови.

В этой связи целью нашей работы явилось исследование кислотной резистентности эритроцитов и уровня свободного гемоглобина в плазме крови крыс в условиях гипотермии и последующего самосогревания.

Опыты проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 170—200 г. Гипотермию у животных вызывали в холодových камерах с циркулирующей холодной водой. Температуру тела животных снижали до 20 °С равномерно в течение 55—60 мин. В другой группе крыс гипотермию 20 °С пролонгировали 2 ч. Этих же животных исследовали также через сутки после самосогревания. Контролем служили интактные крысы, содержащиеся в обычных условиях вивария.

Подопытных и контрольных животных декапитировали, собирали смешанную кровь в гепаринизированные пробирки. Эритроциты осаждали при 300g в течение 10 мин. Плазму осторожно отбирали, а эритроциты 3 раза промывали охлажденным 0,145 М NaCl в 0,01 М трис-HCl буфере (pH 7,4), каждый раз осаждая клетки при 300 g в течение 10 мин. Кислотную резистентность эритроцитов определяли по методу И. А. Терскова и И. И. Гительзона [8] с 0,004 н HCl. Уровень свободного гемоглобина в плазме крови определяли по реакции с бензидином [5].

Как видно на рисунке, у охлажденных до температуры тела 20 °С крыс наблюдается смещение эритрограммы влево, свидетельствующее о том, что наиболее многочисленная группа эритроцитов в крови охлажденного животного имеет стойкость меньшую, чем основная группа эритроцитов крови интактных крыс.



Средняя кислотная эритрограмма крыс при гипотермии 20 °С: а — кратковременная гипотермия; б — пролонгированная 2 ч гипотермия; в — через сутки после самосогревания. 1 — контроль; 2 — опыт

Более значительные изменения резистентности эритроцитов происходят при пролонгированной 2 ч гипотермии (табл. 1). При этом снижается количество эритроцитов с повышенной устойчивостью на 38 %, а количество клеток с пониженной резистентностью в 2,6 раза возрастает. Появление на эритрограмме второго максимума и сохранение длины ее правой ветви, видимо, свидетельствует о 2 популяциях эритроцитов с различными свойствами, о выходе из депо в кровяное русло высокостойких эритроцитов при гипотермии.

Таблица 1

Распределение эритроцитов по группам стойкости к кислотному гемолизу
(в % к общему числу эритроцитов) у крыс при гипотермии 20° С
($M \pm m$; $n = 10$)

Группа стойкости	Время гемолиза, мин	Состояние животного			
		Контроль	Гипотермия	Пролонгированная 2 ч гипотермия	Через сутки после самосогревания
Сферуляционные изменения	0,5 — 2,5	$5,9 \pm 0,51$	$7,1 \pm 0,44$	$7,1 \pm 0,47$	$12,1 \pm 1,35^*$
Пониженностойкие	2,5 — 3,5	$6,4 \pm 0,59$	$4,7 \pm 0,48^*$	$16,5 \pm 1,57^*$	$36,6 \pm 2,88^*$
Среднестойкие	3,5 — 5,0	$30,0 \pm 1,34$	$40,9 \pm 3,01^*$	$30,2 \pm 1,44$	$7,9 \pm 0,80^*$
Повышенностойкие	5,0 — 7,5	$17,3 \pm 1,50$	$11,9 \pm 1,15^*$	$10,7 \pm 0,70^*$	$10,7 \pm 0,72^*$
Высокостойкие	7,5 — 9,5	$5,7 \pm 0,34$	$6,4 \pm 0,27$	$6,0 \pm 0,46$	$18,4 \pm 1,92^*$
Сверхвысокостойкие, выше	9,5	$29,8 \pm 2,19$	$22,9 \pm 1,43$	$31,7 \pm 1,56$	$7,9 \pm 1,61^*$
Время выхода основного пика, мин		$4,4 \pm 0,16$	$3,8 \pm 0,18$	$3,7 \pm 0,08$	$2,2 \pm 0,17^*$

Примечание. Здесь и в табл. 2 * — достоверные ($P < 0,05$) относительно контроля различия.

Снижение резистентности эритроцитов, обнаруженное во время гипотермии, значительно усиливается через сутки после самосогревания животных (рис. в; табл. 1). У самосогревшихся после перенесенной гипотермии 20° С крыс резко возрастает количество пониженностойких эритроцитов при одновременном снижении среднестойких, повышенностойких и сверхстойких эритроцитов. Одновременно в крови этой группы животных увеличивается количество высокостойких эритроцитов (табл. 1).

Таблица 2

Уровень свободного гемоглобина в плазме крови крыс при гипотермии 20° С ($M \pm m$; $n = 8$)

Состояние животного	Концентрация гемоглобина, мг %
Контроль	$9,3 \pm 0,43$
Гипотермия	$31,5 \pm 1,81^*$
Пролонгированная 2 ч гипотермия	$40,1 \pm 2,51^*$
Через сутки после самосогревания	$6,4 \pm 0,54$

Следствием увеличения проницаемости мембран эритроцитов или частичного гемолиза является возрастание уровня свободного гемоглобина в плазме крови. По нашим данным (табл. 2), концентрация свободного гемоглобина в плазме повышается при кратковременной гипотермии в 3,4 раза, а при пролонгированной в 4,3 раза. Вместе с тем через сутки после восстановления температуры тела у крыс, подвергнутых пролонгированной гипотермии 20° С, концентрация свободного гемоглобина не только нормализуется, но и оказывается ниже контрольного уровня.

Таким образом, при снижении температуры тела и продлении этого состояния до 2 ч устойчивость основной массы эритроцитов к кислоте снижается, что сопровождается повышением уровня свободного гемоглобина в плазме крови. При этом снижение устойчивости клеток к кислоте может быть не единственным условием для их последующего гемолиза, поскольку, как упоминалось, в постгипотермический период не обнаружено повышения свободного гемоглобина в плазме крови крыс, хотя кислотная резистент-

ность эритроцитов в этих условиях оказалась сниженной. Можно предположить, что в процессе гипотермии дополнительно реализуются и другие механизмы, способствующие более глубокой дестабилизации плазматической мембраны гемолизу эритроцитов.

Так, известно, что при снижении температуры тела наблюдается спазм сосудов и повышение периферического сопротивления крови [2]. В то же время при низкой температуре увеличивается вязкость липидов мембран [9]. Эти обстоятельства, возможно, затрудняют прохождение эритроцитов через узкие капилляры и увеличивают степень внутрисосудистого гемолиза. Кроме того, при гипотермии, особенно на начальных ее этапах, обнаружена активизация процессов перекисного окисления липидов в крови [4]. Перекиси и продукты их распада, окисляя ненасыщенные жирные кислоты мембранных липидов, способствуют увеличению проницаемости мембран эритроцитов [1] и лизису клеток. Показано также, что снижение устойчивости циркулирующих в крови эритроцитов может происходить под влиянием изменений химического состава плазмы крови при снижении температуры тела [10].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Атауллаханов Ф. И., Витвицкая В. М., Жаботинская А. М. и др. Метаболические изменения, ведущие к окислительному лизису эритроцитов, поддерживаемых в нормальном состоянии *in vitro* // Биохимия. — 1986. — 51. Вып. 9. — С. 1562—1569.
2. Волколаков Я. В., Лацис А. Т. Глубокая гипотермия в кардиохирургии детского возраста. Л.: Медицина. — 1977. — 151 с.
3. Гулевский А. К., Бондаренко В. А., Белоус А. М. Барьерные свойства биомембран при низких температурах. Киев: Наук. думка. — 1988. — 208 с.
4. Долгова З. Я. Изменение активности каталазы и угольной ангидразы в условиях легкой и глубокой гипотермии // Биологические науки. — 1981. — № 1. — С. 30—32.
5. Кассирский И. А. Справочник по функциональной диагностике. М.: Медицина. — 1970. — 848 с.
6. Крепс Е. М. Липиды клеточных мембран. Л.: Наука. — 1981. — 339 с.
7. Кричевская А. А., Лукаш А. И., Шугалей В. С., Бондаренко Т. И. Аминокислоты, их производные и регуляция метаболизма. — Ростов-на-Дону: Изд-во Ростовского ун-та. — 1983. — 112 с.
8. Терсков И. А., Гительзон И. И. Метод химических (кислотных) эритрограмм // Биофизика. — 1957. — № 2. — С. 259—265.
9. Черницкий Е. А., Воробей А. В. Структура и функции эритроцитарных мембран. — Минск: Наука и техника. — 1981. — 216 с.
10. Эмирбеков Э. З., Львова С. П. Механизмы биохимических изменений при низких температурах тела. — Ростов-на-Дону: Изд-во Ростовского ун-та. — 1985. — 80 с.

Дагестанский гос. ун-т, г. Махачкала

Поступила 21.11.88

E. Z. EMIRBEKOV, A. A. SFIYEV, N. K. KLICHKHANOV

THE INVESTIGATION OF THE RESISTANCE OF RAT ERYTHROCYTES UNDER HYPOTHERMIA

V. I. Lenin State University of Dagestan, Makhachkala

The resistance of erythrocytes to acid hemolysis and level of free hemoglobin was studied in rat blood plasma during hypothermia at 20 °C of different duration and in a day after self-heating. Decreasing the resistance of erythrocytes to the acid hemolytic and increasing the level of free hemoglobin in blood plasma upon hypothermia have been found. The parameters studied were not normalized completely in a day after self-heating.

УДК 577.352.334 : 612.36.014.43

Г. Ф. Жегунов, Е. В. Кудокоцева, А. О. Котляров

БЕЛКОВЫЕ ПЕРЕСТРОЙКИ В КЛЕТКАХ ЛЯГУШЕК *RANA TERRESTRIS* ПРИ АККЛИМАЦИИ К РАЗЛИЧНЫМ ТЕМПЕРАТУРАМ

Изучались интенсивность синтеза белков, белковый состав, спектр синтезируемых белков, их физические свойства в клетках сердца и печени *Rana terrestris* в различных температурных условиях. Показано, что при акклимации лягушек происходят изме-

нения интенсивности синтеза общих белков и при этом синтезируются специфические протеины, характерные только для определенной группы животных. Вновь синтезированные протеины обнаруживаются в первую очередь в мембранных фракциях клеток. Интенсивность и положение $\lambda_{\text{макс}}$ триптофановой флуоресценции белков отличаются в разных группах животных, однако вязкость липидов мембран при исследованных условиях акклимации не изменяется. Можно заключить, что в процессах акклимации пойкилотермных животных к различным температурным условиям основную роль играют белковые перестройки в клетках. Наряду с сезонными биохимическими изменениями в клетках и их мембранах в ответ на изменение температурных условий существуют непосредственные модификации структурно-функциональных свойств макромолекул.

Известно, что в процессе адаптации пойкилотермных животных к пониженным или повышенным температурам существенную роль играют липидные перестройки мембранных систем клеток [5, 8, 10, 11]. В 1974 г. Синенским [11] был введен термин «гомеовязкостная адаптация», подразумевающий, что приспособление клеток холонокровных организмов к различным температурным условиям происходит, в первую очередь, благодаря снижению вязкости мембран при пониженных температурах и увеличению указанного параметра при повышении температуры тела. Модификация физических свойств мембран происходит путем изменения степени ненасыщенности жирных кислот, входящих в состав липидов бислоев [7, 8]. Считается, что как следствие описанного процесса происходит изменение свойств мембрановстроенных ферментов, которые приобретают способность адекватно функционировать в изменившихся температурных условиях [5, 7]. Однако существуют единичные работы, указывающие на возможность не только «липидной», но и «белковой» адаптации у пойкилотермных животных. В частности, указывается, что изменение кинетических свойств транспортных АТФ-аз может происходить за счет изменения полипептидных цепей ферментов, т. е. путем образования их изоформ [7]. Однако не имеется достаточно ясного представления о возможности участия и роли белков в приспособительных реакциях, о возможности синтеза новых форм энзимов, обеспечивающих нормальное функционирование клеток в различных температурных условиях. Целью данной работы было изучение интенсивности синтеза, спектра синтезируемых белков и их физических свойств в клетках сердца и печени в процессе акклимации лягушек к различным температурам.

Опыты проводились в ноябре-декабре на остромордых лягушках *Rana terrestris*.

Акклимированные	1 группа («холодные») — обитавшие в аквариуме в течение 15 дней при 5 °С,
	2 группа («теплые») — обитавшие в аквариуме в течение 15 дней при 20 °С,
Акклимирующиеся	3 группа — пересаженные из теплой в холодную воду на 15 ч,
	4 группа — пересаженные из холодной в теплую воду на 15 ч.

В ряде экспериментов использовали лягушек спустя 5 и 10 ч после перемещения животных из одних условий в другие. С целью изучения интенсивности синтеза общих белков и спектра синтезируемых протеинов животным внутрибрюшинно вводили ^{35}S -метионин из расчета 0,5 мК на 100 г массы тела. После декапитации лягушек температуру их органов измеряли медь-константановой термопарой. Кусочки тканей животных массой 20 мг гомогенизировали в ручном стеклянном гомогенизаторе в 0,1 М растворе NaCl, аликвоты брали для проведения электрофореза по методу Лэмли [9]. После проведения электрофореза гель высушивали и накладывали на рентгеновскую пленку РМВ-640 для автордиографического выявления синтезируемых белков [6]. Интенсивность включения метки в белки определяли путем фильтрования через фильтры по методу Кеннела [4]. Печень и сердце амфи-

бий фракционировали в забуференной солевой среде методом дифференциального центрифугирования [2]. Фракции микросом и растворимых белков печени использовали для изучения конформационного состояния протеинов методом флуоресцентной спектроскопии [3]. О вязкости мембран судили по поляризации флуоресценции 1,6-дифенилгексатриена [8], добавленного к суспензии микросом при комнатной температуре.

На рис. 1 представлены температура внутренних органов и тканей лягушек, адаптированных в течение 15 дней к 5 и 20 °С, а также динамика этого параметра при перемене температуры окружающей среды. Видно, что этот параметр у адаптированных к холоду лягушек всегда на несколько градусов выше температуры окружающей среды. При переносе животных из

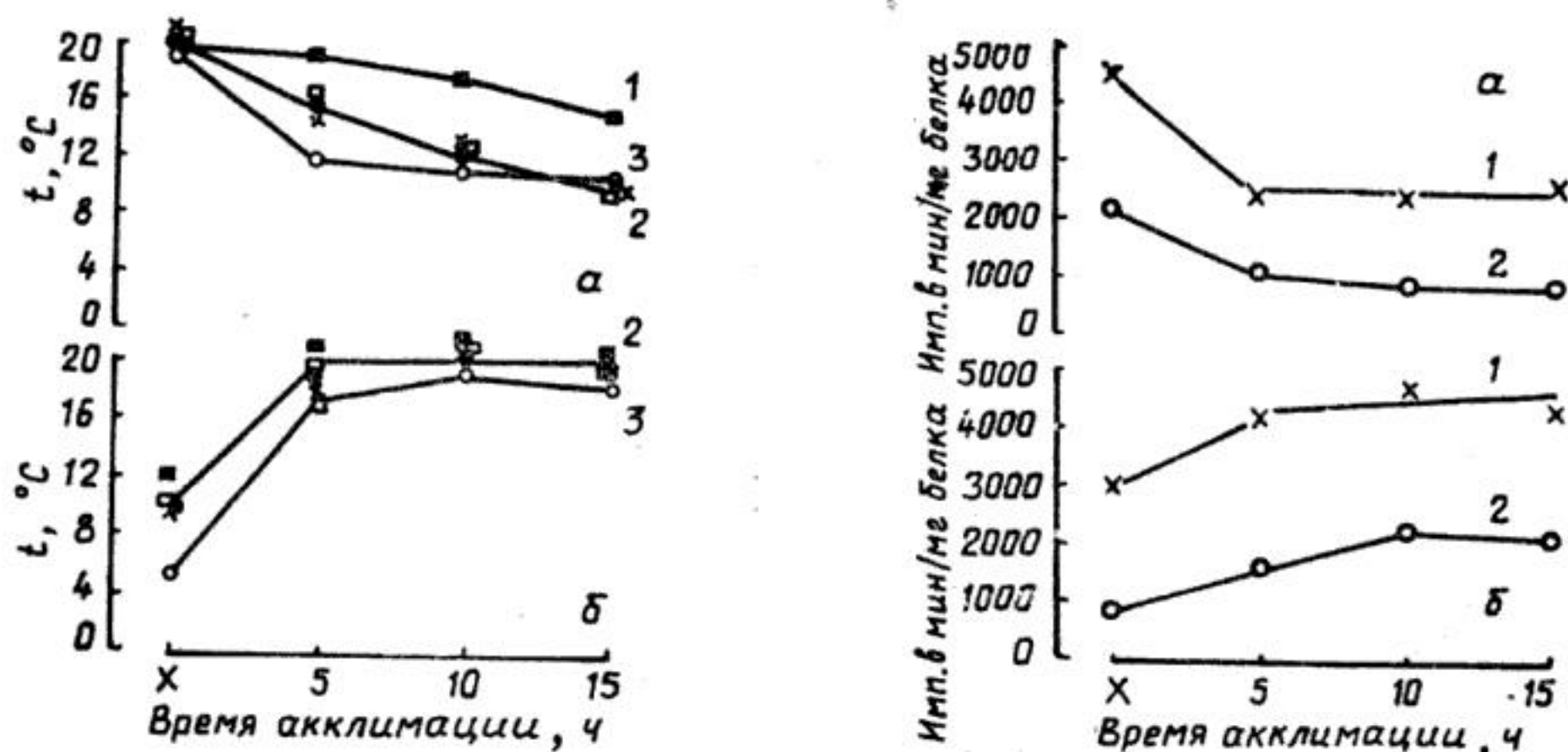


Рис. 1. Динамика температуры внутренних органов акклимирующихся лягушек: а — акклимация к 5 °С (пересадка животных из температурных условий 20 °С в аквариум с температурой 5 °С), б — акклимация к температуре 20 °С (пересадка животных из температурных условий 5 °С в аквариум с температурой 20 °С); 1 — мышца бедра (■); 2 — мозг (●), сердце (×), печень (□); 3 — кожа (○)

Рис. 2. Интенсивность синтеза общих белков в печени и сердце у акклимированных и акклимирующихся лягушек: а — акклимация к 5 °С, б — акклимация к 20 °С; 1 — печень; 2 — сердце

холода в тепло происходит довольно быстрое повышение температуры внутренних органов, и спустя 5 ч их температура соответствует таковой у амфибий, акклимированных к 20 °С (рис. 1, б). При переносе лягушек из тепла в холод температура внутренних органов изменяется значительно медленнее: только спустя 15 ч она приближается к температуре акклимированных к холоду амфибий (рис. 1, а). Это может свидетельствовать о наличии терморегуляторных механизмов у холоднокровных животных. Видимо, роль генератора тепла при охлаждении амфибий выполняет в первую очередь мышечная ткань задних конечностей лягушек, температура которой во всех случаях была выше температуры внутренних органов (рис. 1).

При изучении процесса синтеза белка показано, что его интенсивность в сердце лягушек 1-й группы примерно в 1,5 раза ниже, чем у адаптированных к теплу животных 2-й группы (рис. 2). В печени указанный процесс протекает в 2 раза интенсивнее у «теплых» животных по сравнению с «холодными». При переносе животных из тепла в холод интенсивность синтеза понижается и спустя 5 ч составляет примерно половину величины, характерной для «теплых» лягушек. При этом интенсивность синтеза белков падает быстрее, чем снижается температура органов (рис. 1, а и 2, а). Это говорит о наличии специфических физиологических механизмов в регуляции синтеза белков у амфибий независимо от прямого действия холода. При переносе животных из холода в тепло (рис. 2, б) спустя 5 ч наблюдается интенсификация синтеза общих белков, и через 10—15 ч интенсивность изу-

чаемого процесса стабилизируется на уровне, характерном для «теплых» амфибий. При изучении интенсивности обмена общих белков в клеточных фракциях ткани печени отмечено, что даже при 5 °С происходит довольно значительный обмен вновь синтезируемых белков (табл. 1). Спустя 15 ч

Таблица 1

Интенсивность включения меченых аминокислот в белки субклеточных фракций печени лягушек (имп/мин/мг белка), $n = 4-5$

Условия акклимации	Фракции клетки		
	Митохондрии	Микросомы	Растворимые белки цитоплазмы
5° С в течение 15 сут	34300 ± 2800	32000 ± 2900	28300 ± 3100
20° С в течение 15 сут	42600 ± 3300	39200 ± 3100	34500 ± 2200
20° С → 5° С в течение 15 ч	24100 ± 2100	22500 ± 1900	17400 ± 1500
5° С → 20° С в течение 15 ч	43200 ± 3700	36500 ± 2500	32800 ± 2800

акклимации как при 5 °С, так и 20 °С вновь синтезированные белки определяются во всех полученных клеточных фракциях, что свидетельствует о существенных белковых перестройках в клетках при приспособлении животных, причем наиболее активно обмениваются белки митохондрий. Следует отметить, что интенсивность обмена белков при акклимации «холодных» лягушек к 20 °С примерно в 1,5—2,0 раза выше по сравнению с лягушками, акклимирующимися к холоду.

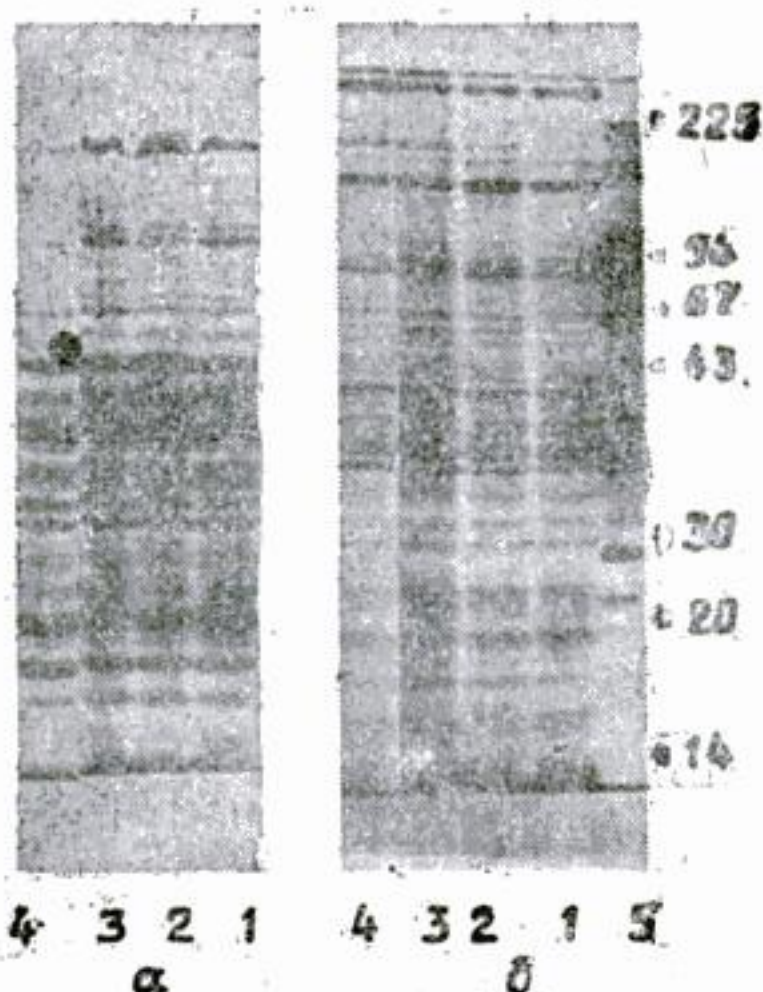


Рис. 3. Электрофореграмма клеточных фракций печени у разных групп лягушек: а — микросомы печени, б — растворимые белки печени; 1 — препарат 4-й группы животных, 2 — препарат 3-й группы, 3 — препарат 2-й группы, 4 — препарат 1-й группы, 5 — маркеры молекулярной массы белков

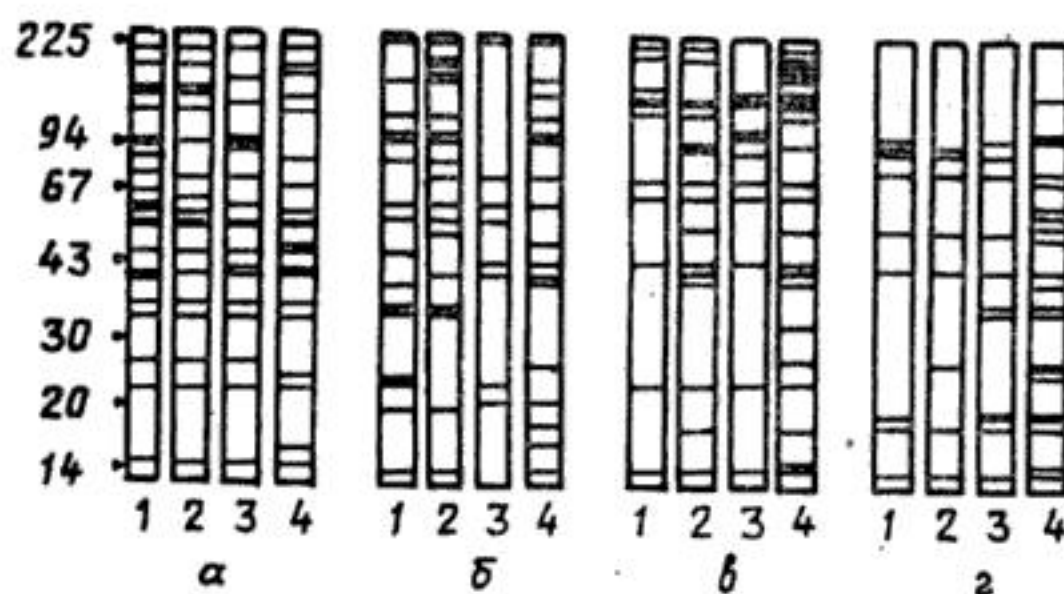
При проведении электрофореза гомогенатов различных органов и их фракций показано, что акклимация лягушек при 5 или 20 °С приводит к незначительному изменению в белковом составе клеток печени. Некоторые отличия обнаружены только после электрофореза фракций микросом и растворимых белков печени, что проявляется в изменении плотности и толщины ряда полос на геле (рис. 3). Аналогичная картина наблюдается при переносе лягушек из одних температурных условий в другие. Представленные данные свидетельствуют о возможности белковых перестроек при акклимации лягушек.

Авторадиографическое выявление вновь синтезированных белков (являющееся более чувствительным методом) показало, что при различных температурных условиях у холоднокровных животных на фоне основных групп белков синтезируются и специфические протеины (рис. 4). При пересадке лягушек из одних температурных условий в другие в зависимости от условий акклимации в субклеточных фракциях и гомогенате органов обнаруживаются вновь синтезированные специфические белки.

На рис. 4 видно, что при пересадке «теплых» животных в холод через 15 ч происходит уменьшение количества синтезируемых протеинов, но на фоне этих изменений появляются полосы специфических белков. При переносе «холодных» лягушек в тепло количество синтезируемых белков не увеличивается по сравнению с исходным состоянием, однако появляются протеины, не характерные ни для одной группы животных.

Показано, что в результате акклимации лягушек в течение 15 дней к температурам 5 или 20 °С изменяются физические свойства мембран микросом. Об этом свидетельствует смещение $\lambda_{\text{макс}}$ триптофановой и тирозиновой флуоресценции примерно на 5 нм на графике температурной зависимо-

Рис. 4. Схема автордиограммы полиакриламидных гелей клеточных фракций печени и сердца в разных группах животных: а — препарат гомогената печени лягушек, б — микросомы печени лягушек, в — растворимые белки печени лягушек, г — микросомы сердца лягушек; 1 — препарат из 1-й группы лягушек, 2 — препарат из 2-й группы лягушек, 3 — препарат из 3-й группы животных, 4 — препарат из 4-й группы животных



сти (рис. 5); причем углы наклона кривых существенно отличаются, что свидетельствует о разной температурной чувствительности мембран [2]. При акклимации амфибий к температурам в течение 15 ч не отмечено достоверных изменений измеряемого параметра при пересадке лягушек из условий 5 °С в аквариум с температурой 20 °С по сравнению со 2-й группой животных.

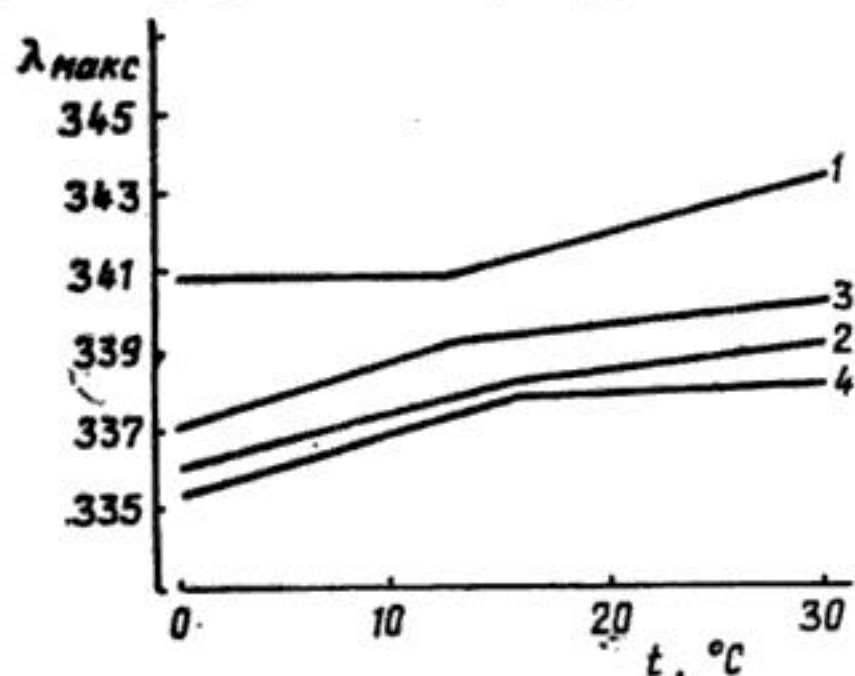


Рис. 5. Температурная зависимость максимума белковой флуоресценции микросом печени (1, 2, 3, 4 — см. рис. 4)

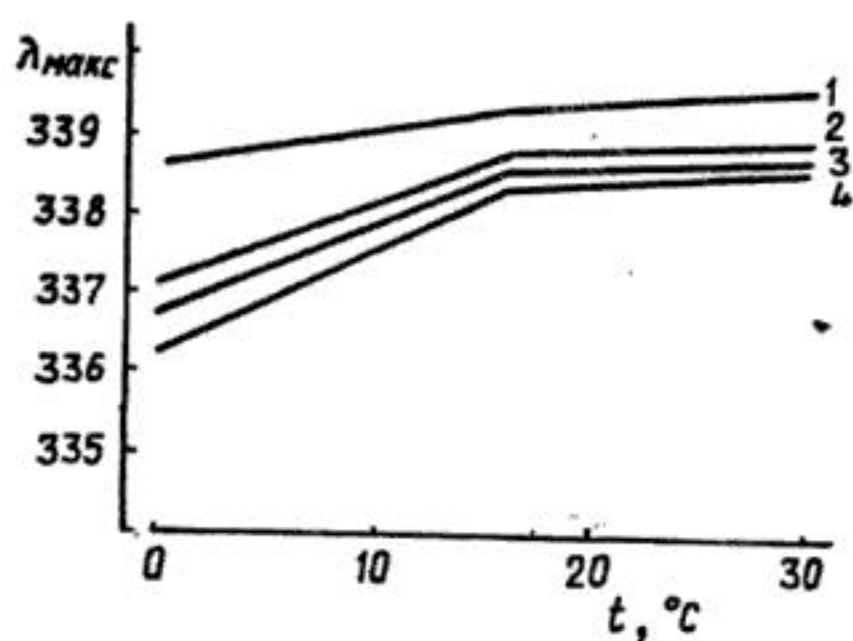


Рис. 6. Температурная зависимость максимума флуоресценции растворимых белков печени (1, 2, 3, 4 — см. рис. 4)

микросом: происходит смещение $\lambda_{\text{макс}}$ флуоресценции примерно на 2 нм (рис. 6). При акклимации лягушек в течение 15 ч достоверных изменений в измеряемых параметрах растворимых белков не обнаружено, а точка перегиба проявляется в районе 15—16 °С (рис. 6).

Однако при пересадке «теплых» лягушек в холод спустя 15 ч происходит достоверное смещение $\lambda_{\text{макс}}$ в сторону приближения к параметру, характерному для «холодных» лягушек. Показано, что точка перегиба у «холодных» амфибий определяется при 13 °С, а у животных, акклимированных при 20 °С, точка перегиба определяется при 16 °С. Приведенные факты могут свидетельствовать о различном конформационном состоянии белков в мембранах микросом печени лягушек, акклимированных к различным температурным условиям. При пересадке животных и быстрой акклимации отмечено, что спустя 15 ч точка перегиба на кривой у лягушек из 3-й группы соответствует точке на кривой у животных из 1-й группы, а у лягушек из 4-й группы — 2-й. Таким образом, в процессе приспособления происходит изменение физических свойств белков в сторону тех параметров, которые характерны для уже акклимированных амфибий.

При измерении белковой флуоресценции растворимых белков печени отмечено, что при длительной акклимации лягушек наблюдаются такие же изменения, как и в случае

Таблица 2

Интенсивность поляризации флуоресценции 1,6-дифенилгексатриена в мембранах микросом печени ($n = 5$)

Группы лягушек	Поляризация флуоресценции, отн. ед.
1-я — акклимация к 20° С	$0,170 \pm 0,023$
2-я — акклимация к 5° С	$0,163 \pm 0,017$
3-я — пересадка животных из 20° С в 5° С	$0,145 \pm 0,021$
4-я — пересадка животных из 5° С в 20° С	$0,178 \pm 0,012$

способления на молекулярном уровне протекает относительно быстро, и спустя 15 ч мембраны амфибий приобретают другие физико-химические свойства. Можно предположить наличие нескольких механизмов изменения свойств мембран: 1 — под действием температуры на организм животного может изменяться конформация белков; 2 — свойства мембранных белков могут модифицироваться в результате изменения структурного состояния липидов; 3 — за время акклимации в клетках пойкилотермных животных синтезируется некоторое количество специфических белков (по-видимому, ключевых ферментов), обладающих другими физико-химическими свойствами. Подобные пути приспособления применительно к сезонной адаптации описаны в книге Хочачки и Сомеро [7]. Однако исходя из полученных данных, мы считаем, что возможны не только сезонные, но и более быстрые изменения свойств биомембран у акклимирующихся пойкилотермных животных. Причем, поскольку изменений вязкости мембранных липидов при этом не происходит, следует полагать, что главную роль при акклимации лягушек играют перестройки белковых компонентов мембран.

Опыты на растворимых белках клеток печени показывают, что изменения их физических свойств, в отличие от мембранных белков, не столь значительны при акклимации земноводных.

Не было обнаружено различий в вязкости липидов биомембран печени всех экспериментальных групп лягушек, что не согласуется с гипотезой «гомеовязкостной адаптации» [6, 8, 11], которая, однако, определяется как сезонная. Поэтому вполне вероятно, что у лягушек изменения липидов биомембран являются сезонными, т. е. происходят только осенью, накануне периода оцепенения, а в период проведения экспериментов, несмотря на разные температурные условия, свойства липидного компонента биомембран уже не изменяются.

При пересадке лягушек из одних температурных условий в другие в субклеточных фракциях и гомогенате органов обнаруживаются вновь синтезированные белки, характерные только для определенных условий акклимации. На рис. 4 видно, что при пересадке адаптированных к теплу животных в холод через 15 ч происходит уменьшение количества вновь синтезированных протеинов во фракции микросом печени и на фоне этого появляются полосы специфических белков. При переносе адаптированных к холоду лягушек в тепло количество синтезированных белков не увеличивается по сравнению с исходным состоянием, однако появляются протеины, не характерные ни для одной группы животных. Аналогичную картину мы наблюдаем на примере фракции растворимых белков печени.

В сердце интенсивность обмена белков несколько ниже. Но как и в случае с печенью, в разных состояниях обнаруживаются специфические протеины, изменяется также и количество некоторых синтезируемых белков. Однако молекулярные массы специфических протеинов разные в различных температурных условиях. Из этого следует, что процесс приспособления

Установлено также, что вязкость мембран микросом, выделенных из печени акклимированных лягушек всех групп, примерно одинакова и не изменяется при пересадке животных (табл. 2). Следовательно, изменения в физических свойствах мембран микросом связаны непосредственно с изменением структуры белков.

В связи с тем, что через 15 ч переходного состояния животных обнаружено почти полное сближение физических параметров биомембран клеток, можно сделать вывод, что процесс при-

земноводных к теплу или к холоду требует синтеза разных белков, что говорит о разных направлениях адаптации и функционировании при этом разных генов. На основании этого можно говорить о наличии специальных генетических программ приспособления пойкилотермных животных.

Следует отметить также, что не существует сходства реакции в ответ на изменение температурных условий в препаратах различных органов. В микросомах сердца появляются специфические белки, отличные по своей молекулярной массе от таковых в микросомах печени. Все это может свидетельствовать о том, что при адаптации в различных органах функционируют свои генетические программы приспособления, характерные только для того или иного органа или ткани.

Существует точка зрения, что главную роль в приспособлении пойкилотермных животных к различным температурам играют изменения липидного и жирнокислого состава биомембраны их вязкостных свойств [5, 7, 8]. Считается также, что подготовка к периоду оцепенения эктотермов на уровне организма, клеток и мембран происходит осенью и затем не претерпевает существенных модификаций в течение всего периода торпидности [8]. Однако представленные данные показывают, что даже в зимний период при изменении температурных условий происходят существенные перестройки белкового метаболизма в клетках лягушек и обновление белкового состава субклеточных фракций.

Известно, что интенсивность и направленность анаболических и катаболических процессов регулируются главным образом качественным составом белков клеток [1], причем указанным путем возможна регуляция всех метаболических процессов, в том числе и структурно-функциональных свойств биомембраны. Следовательно, исходя из наших и литературных данных, можно заключить, что в процессах быстрой акклимации пойкилотермных животных к различным температурным условиям важную роль играют белковые перестройки в клетках, а наряду с сезонными изменениями в клетках и их мембранах существуют непосредственные модификации структурно-функциональных свойств макромолекул в ответ на изменение температурных условий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж. *et al.* Молекулярная биология клетки. — М.: Мир, 1986, 3. — 230 с.
2. Биохимические исследования мембран / Под ред. Медди Э. — М.: Мир, 1979. — 460 с.
3. Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. — М.: Наука, 1980. — 320 с.
4. Кеннед Д. Использование фильтров для разделения радиоактивных ДНК, РНК и белка // Методы исследования нуклеиновых кислот. — М.: Мир, 1970. — С. 138—144.
5. Крепс Е. М. Липиды клеточных мембран. — Л.: Наука, 1981. — 339 с.
6. Остерман Л. А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами. М.: Наука, 1983. — 304 с.
7. Хочачка П., Сомеро Дж. Стратегия биохимической адаптации. — М.: Мир, 1977. — 1998 с.
8. Cossins A. R. Adaptation of biological membranes to temperature. The effect of temperature acclimation of goldfish upon the viscosity of synaptosomal membranes // Biochim. Biophys. Acta. — 1977. — 470, N 3. — P. 395—411.
9. Jalmmlä U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4 // Nature. — 1970. — 227, N 3174. — P. 680—685.
10. Morris G. T., Clarke A. Cells at low temperatures // The effects of low temperatures on biological systems. — London: Edward Arnold, 1987. — P. 72—119.
11. Sinensky M. Homeoviscous adaptation — a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli* // Proc. natl. Acad. Sci. — 1974. — 71, N 4. — P. 522—525.

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

Поступила 27.03.90

PROTEIN RECONSTRUCTIONS IN CELLS OF *RANA TERRESTRIS* FROGS DURING ACCLIMATION TO VARIOUS TEMPERATURES

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

The intensity of protein synthesis, composition, spectrum of synthesized proteins and their physical properties were studied in heart and liver cells of *Rana terrestris* at different temperatures. Changes in intensity of synthesis of total proteins have been shown to occur upon acclimation of frogs with synthesis of specific proteins characteristic of definite group of animals. Newly synthesized proteins are revealed first of all in cell membrane fractions. The intensity and position of $\lambda_{\max}$ tryptophane fluorescence of proteins were different in various groups of animals, however the viscosity of membrane lipids remained unchanged under the acclimation conditions studied. It can be concluded that protein reconstructions play an important role in acclimation processes of poikilothermal animals. Along with seasonal biochemical changes in cells and membranes, certain modifications of structure-functional properties of macromolecules occur in response to temperature changes.

УДК 612.015.3 : 597.8 : 612.57 : 591.543.42

С. П. Львова, М. Х. Магомедова

ИНТЕНСИВНОСТЬ ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗА В ТКАНИ ПЕЧЕНИ ЛЯГУШКИ ПРИ ИСКУССТВЕННОЙ ГИПОТЕРМИИ И ЗИМНЕЙ СПЯЧКЕ

Исследовали синтез глюкозы из неуглеводных предшественников в срезах печени озерной лягушки при 3- и 6-недельной искусственной и физиологической гипотермии (2—4 °C) и согревании. Найдено, что искусственная гипотермия и согревание существенно не меняют интенсивности глюконеогенеза. При зимней спячке активность этого процесса снижается в начале гибернации и возрастает в 1,5—2,5 раза при 6-недельной спячке.

Синтез глюкозы из неуглеводных предшественников, играющий важную роль в регуляции уровня глюкозы, проявляет широкие адаптационные возможности. Его активность существенно интенсифицируется при адаптации теплокровного организма к низкой температуре [3]. Высокий уровень глюконеогенеза сохраняется при зимней спячке млекопитающих и, особенно, при периодических пробуждениях [1, 7—9]. Гибернация эктотермных позвоночных (амфибии, рептилии), в отличие от млекопитающих, является непрерывной. Поскольку восполнения убыли глюкозы с пищей при этом не происходит, глюконеогенез приобретает важную роль в энергетическом обеспечении тканей. Целью нашей работы явилось изучение интенсивности глюконеогенеза из различных субстратов в срезах печени озерной лягушки при искусственной и естественной (зимняя спячка) гипотермии одинаковой глубины и длительности.

Опыты проведены на озерных лягушках (*Rana ridibunda*) массой 40—60 г. Исследовали состояние искусственной гипотермии (3 и 6 недель, температура тела 2—4 °C), зимней спячки (1, 3, 6 недель, температура тела 2—4 °C) и согревания (температура тела 20—22 °C). Опыты по гипотермии проведены в мае-июне, по зимней спячке — в октябре-декабре. Контролем служили нормотермические (20—22 °C) животные в этот же сезон года. Об интенсивности глюконеогенеза судили по приросту содержания глюкозы в срезах печени, инкубируемых 1 ч при 37 °C в кребс-рингер-фосфатном буфере, pH-7,3. В качестве субстратов глюконеогенеза добавляли аланин, глутаминовую кислоту, пируват натрия, оксалоацетат натрия, глицерин в конечной концентрации 0,01 М [2]. Глюкозу определяли глюкозооксидазным методом [4]. Прирост глюкозы выражали в мкМ на грамм влажной

ткани за час. Летом в период максимальной биологической активности животных скорость глюконеогенеза из различных субстратов в ткани печени лягушек довольно велика и составляет 12,5—15,7 мкм/г/ч (табл. 1).

Таблица 1

Интенсивность глюконеогенеза из различных субстратов в срезах печени озерных лягушек при длительной искусственной гипотермии, мкм/г/ч, май-июнь

Варианты	Без субстрата	Аланин	Глутамат	Пируват	Оксалоацетат	Глицерин
Контроль	12,5±0,5	13,7 ± 1,2	15,7 ± 0,73	13,6 ± 0,9	13,3 ± 1,8	15,7 ± 1,0
Гипотермия 2—4° С:						
3 недели	9,7±1,2	13,3 ± 0,5	13,0 ± 0,75	13,2 ± 0,9	12,3 ± 0,6	14,8 ± 0,1
6 недель	7,6±0,8*	11,6 ± 1,0	9,3 ± 0,85*	11,7 ± 0,7	11,2 ± 0,9	12,5 ± 1,0*
Согревание до 20° С	9,3±0,6*	12,2 ± 1,4	13,6 ± 1,8	14,6 ± 1,1	14,0 ± 1,3	14,0 ± 1,4

Примечание. Каждая величина — среднее из 5—8 опытов. * — Достоверные ($p < 0,05$) различия по сравнению с контролем.

При 3-недельной гипотермии лягушек глюконеогенез в ткани печени не претерпевает статистически достоверных изменений, наблюдается лишь некоторая тенденция к понижению его интенсивности. При удлинении искусственной гипотермии до 6 недель эта тенденция усиливается. Статистически достоверное снижение синтеза глюкозы в срезах печени лягушек при этом отмечено в пробах без добавления субстрата (на 39 %), с добавлением глутамата (на 40,7 %) и глицерина (на 20 %). Ткань согревающихся лягушек после 6-недельной глубокой гипотермии обладает способностью к усилению глюконеогенеза как на основе эндогенных, так и из всех исследованных экзогенных субстратов. Скорость синтеза глюкозы из неуглеводных предшественников при этом возвращается к уровню интактных животных. Следовательно, ткань печени при длительной искусственной гипотермии лягушек характеризуется пониженной интенсивностью глюконеогенеза из различных субстратов. Указанный процесс нормализуется с нормализацией температуры тела.

Глюконеогенез у лягушек, как и другие процессы, связанные с синтезом и распадом гликогена [6], подвергается значительным сезонным изменениям. Так осенью перед зимней спячкой, когда биологическая активность лягушек существенно понижается, наблюдается снижение интенсивности глюконеогенеза в печени (табл. 2). В наибольшей мере это касается син-

Таблица 2

Интенсивность глюконеогенеза из различных субстратов в срезах печени озерной лягушки при зимней спячке, мкм/г/ч, октябрь-декабрь

Вариант опыта	Без субстрата	Аланин	Глутамат	Пируват	Оксалоацетат	Глицерин
Контроль	6,4 ± 0,19	8,4 ± 0,23	8,8 ± 0,1	10,0 ± 0,16	12,5 ± 0,3	7,1±0,2
Зимняя спячка, 2—4° С:						
1 неделя	4,3 ± 0,1*	6,0 ± 0,15*	9,5 ± 0,8	5,0 ± 0,3*	10,1 ± 0,6*	4,6±0,3*
3 недели	9,0 ± 0,17*	10,2 ± 0,5*	8,3 ± 0,42	10,8 ± 0,92	13,2 ± 0,4	7,8±0,17*
6 недель	12,3 ± 0,36*	17,9 ± 0,26*	20,8 ± 1,4*	14,0 ± 0,38*	19,3 ± 1,5*	17,3±0,27*
Согревание до 20° С	13,7 ± 0,36*	18,1 ± 0,9*	20,1 ± 0,7*	20,8 ± 1,21*	19,9 ± 0,7*	18,1±1,4*
Через сутки после выхода из спячки	4,5 ± 0,42*	10,2 ± 1,0	11,3 ± 1,2	11,1 ± 0,66	11,1 ± 0,77	10,4±0,75*

Примечание. Достоверные ($p < 0,05$) различия по сравнению с контролем.

теза глюкозы из глутамата и глицерина, который понижается соответственно в 1,7 и 2,2 раза; в наименьшей мере изменяется синтез глюкозы из оксалоацетата. Таким образом, осенью перед гибернацией, в отличие от лета, интенсивность глюконеогенеза из различных субстратов существенно отличается. Максимальная активность синтеза глюкозы наблюдается из оксалоацетата, минимальная — из глицерина.

При недельной зимней спячке лягушек интенсивность глюконеогенеза снижается в еще большей степени из всех исследованных предшественников, исключая глутаминовую кислоту. Особенно значительно понижается синтез глюкозы из глицерина и пирувата, ненамного превышая активность этого процесса в пробах без экзогенных субстратов.

Удлинение зимнего оцепенения до 3 недель ускоряет глюконеогенез в ткани печени лягушек по сравнению с недельной гибернацией в 1,5—2 раза. При этом его интенсивность возвращается к контрольному уровню. Дальнейшее пролонгирование зимней спячки лягушек до 6 недель приводит к значительной интенсификации глюконеогенеза. Изменения глюконеогенеза в ткани печени лягушек в динамике спячки хорошо коррелируют с изменениями количества гликогена в этом органе [5].

Наши данные по изменению интенсивности глюконеогенеза в печени гибернирующего эктотермного животного хорошо согласуются с материалами, полученными на зимоспящих млекопитающих. Так, при зимней спячке млекопитающих отмечено поддержание высокого уровня глюконеогенеза в период гибернации и, особенно, в периоды эутермии [1, 7—9].

При пробуждении лягушек от зимней спячки сразу после достижения нормальной температуры тела интенсивность глюконеогенеза в срезах печени не подвергается существенным изменениям по сравнению с гибернирующими животными. Исключение составляет глюконеогенез из пирувата, интенсивность которого увеличивается на 49 %. Через сутки после пробуждения глюконеогенез в печени лягушек возвращался к контрольным значениям и лишь синтез глюкозы из глицерина поддерживался на более высоком уровне.

Отсутствие усиления процессов глюконеогенеза при пробуждении амфибий (в отличие от млекопитающих), видимо, связано с тем, что пробуждение эктотермных животных идет не за счет эндогенных источников энергии, а за счет притока тепла извне. Запасы углеводов в тканях при этом не подвергаются существенной убыли [6] и, следовательно, не возникает необходимости в компенсации этих потерь за счет глюконеогенеза.

Таким образом, наши результаты показывают, что динамика глюконеогенеза в ткани печени при зимней спячке лягушек отличается от таковой при искусственной гипотермии такой же глубины и длительности.

Изменения глюконеогенеза в печени амфибий при зимней спячке во многом совпадают с изменениями глюконеогенеза у гибернирующих млекопитающих, но различны при пробуждении.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Даудова Г. М., Усатенко М. С. Активность ферментов глюконеогенеза в печени сусликов *Citellus suslicus* // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. — 1970. — 6, № 1. — С. 35—41.
2. Ершиков С. М. Интенсивность глюконеогенеза и содержание углеводов в ткани печени крыс при гипокинезии // Вопр. мед. химии. — 1987. — № 2. — С. 87—90.
3. Исаакян Л. А. Метаболическая структура температурных адаптаций. — Л.: Наука, 1972. — 134 с.
4. Лукомская И. С., Городецкий В. К. Применение глюкозооксидазы для специфического количественного определения глюкозы в крови // Вопр. мед. химии. — 1960. — 6, № 3. — С. 193—198.
5. Львова С. П. Содержание гликогена, фосфоорилазная и глюкозо-6-фосфатазная активность в тканях суслика и лягушки при зимней спячке // Криобиология. — 1988. № 1. — С. 39—43.
6. Эмирбеков Э. З., Львова С. П. Механизмы биохимических изменений при низких температурах тела. — Ростов-на-Дону: ДГУ, 1985. — 80 с.

7. Craciun C., Dordea M., Craciun V. Etude ultrastructure sur les hepatocytes des hamster en etat d'activite acclimates an froid et en periode d'hibernation // *Evol. and Adapt.*— 1983.— N 3.— S. 849—267.

8. Galster W., Morrison P. R. Gluconeogenesis in arctic ground squirrel between periods in hibernation // *Amer. J. Physiol.*— 1975.— 222., N 1.— P. 325—330.

9. Gehrich S. C., Aprille J. R. Hepatic gluconeogenesis and mitochondrial function during hibernation // *Comp. Biochem. and Physiol.*— 1988.— 91, N 1, P. 11—16.

Дагестанский гос. ун-т, г. Махачкала

Поступила 21.02.90

S. P. LVOVA, M. Kh. MAGOMEDOVA

THE INTENSITY OF GLUCONEOGENESIS IN FROG LIVER TISSUE UPON ARTIFICIAL HYPOTHERMIA AND HIBERNATION

V. I. Lenin State University of Dagestan, Makhachkala

Glucose synthesis from non-hydrocarbon precursors in liver slices of *Rana ridibunda* was studied under artificial and physiological hypothermia (2 to 4 °C) for 3 and 6 weeks and on heating. Artificial hypothermia and heating did not affect the intensity of gluconeogenesis. The intensity of the process has been found to decrease at the beginning of hibernation and to increase in 6 weeks of hibernation by 1.5 to 2.5-fold.

УДК 517.15+612.58+591.543.42

Н. Н. Войтенко, Л. А. Корякина

ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ МОНОАМИНОКСИДАЗЫ ТИПА А МОЗГА КРЫС И ЗИМОСПЯЩИХ СУСЛИКОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ ГИПОТЕРМИИ

Изучалась MAO типа А мозга крыс и зимоспящих сусликов. У крыс при температуре холодого наркоза 25 °C коэффициент кооперативности Хилла n_H , рассчитанный для зависимости (v) от $[S]_0$, был меньше единицы (0,08), а через 14 сут. после выхода из гипотермии n_H становился выше единицы (1,69). У погружающихся в спячку сусликов при температуре 11 °C n_H был выше единицы (3,60), а через 14 сут. после пробуждения n_H достигал близкого к единице уровня (0,90). Обсуждается возможность необратимых конформационных изменений MAO типа А под влиянием гипотермии у крыс и обратимых у сусликов при погружении в спячку.

Пределы переносимости низких температур у гетеротермов шире, чем у гомойотермов [9]. Молекулярные механизмы регуляции метаболизма нейромедиаторов, в частности серотонина, способного определять температурную толерантность [7], изучены мало. Имеющиеся данные о регуляции катаболизма серотонина в мозге в условиях низких температур у гетеротермов [2] и гомойотермов [4] дают основания предполагать существование качественных различий. Целью настоящего исследования явилось изучение активности и кинетики функционирования моноаминоксидазы под влиянием гипотермии [(MAO) амин: кислород оксидоредуктаза (дезаминирующая) (содержащая флаavin) КФ 1.4. 3.4] типа А, дезаминирующей серотонин, у гомойотермов (крыс) по сравнению с гетеротермами (сусликами).

Работа выполнена на самцах крыс линии Вистар, гомойотермных животных, и на краснощеких сусликах, гетеротермных животных, которые 8 мес. в году проводят в состоянии зимней спячки при температуре тела 1—2 °C. Охлаждение крыс до 25 °C (состояния холодого наркоза) достигали содержанием этих животных в течение 2—3 ч в холодной камере при температуре —16 °C. Часть этих крыс по достижении температуры тела 25 °C немедленно декапитировали; другую часть крыс после охлаждения до 25 °C сразу разогревали в сухом термостате с температурой 30 °C до температуры тела 37 °C в течение 2 ч и после этого декапитировали; третью часть охлажденных до 25 °C крыс после разогревания в сухом термостате до 37 °C содержали при комнатной температуре еще 14 сут., после чего также декапити-

ровали. Контролем служили интактные крысы, содержащиеся при комнатной температуре. Суслики изучались в состоянии бодрствования с температурой тела 37 °С через 14 сут. после выхода из спячки и в состоянии погружения в спячку с температурой тела 11 °С.

После декапитации животных из головного мозга (за исключением мозжечка) выделяли неразделенную фракцию митохондрий P_2 , содержащую МАО. Инкубацию ферментного препарата проводили в 0,1 М — фосфатном буфере pH 8,5 при свободном доступе воздуха и встряхивании в течение 30 мин с серотином в качестве субстрата [3]. Инкубацию МАО крыс проводили при 37 и 25 °С, сусликов — при 37 и 11 °С. В каждой серии экспериментов по начальным скоростям реакции при 5 концентрациях серотонина (0,0625; 0,125; 0,250; 0,500; 1,00 мМ) для зависимости скорости (v) дезаминирования серотонина от его концентрации $[S]_0$ рассчитывали коэффициент кооперативности Хилла n_H [5], изменение которого служило показателем изменения конформации МАО А. Активность МАО выражали в нмоль аммиака, образованного за 1 мин в расчете на 1 мг белка. Белок определяли по Лоури. Аммиак определяли методом изотермической отгонки с последующим применением реактива Несслера и измерением оптической плотности при 410 нм на СФ-26. Статистическая обработка проведена по Стьюденту. Полученные данные свидетельствуют о том, что у контрольных интактных крыс с температурой тела 37 °С активность МАО при 37 °С существенно выше, чем при 25 °С. Коэффициент кооперативности Хилла n_H у интактных контрольных крыс при инкубации при 37 °С в области высоких концентраций серотонина близок к единице, в области низких концентраций серотонина — выше единицы. Инкубация МАО интактных крыс при 25 °С привела к появлению отрицательной кинетической кооперативности по субстрату в области высоких концентраций серотонина и к усилению положительной кинетической кооперативности по серотонину в области низких его концентраций (табл. 1).

Таблица 1

Моноаминоксидаза мозга крыс при гипотермии, нмоль аммиака/мг белка мин

Серии опытов	Температура, °С		Активность МАО мозга	Коэффициент кооперативности Хилла n_H	
	тела	инкуба- ции		0,062 0,125 0,250 мМ серотонина	0,250 0,500 1,00 мМ серотонина
Контроль, интактные	37	37	$3,42 \pm 0,21$ (5)	1,41	0,80
Охлаждение до 25° С	25	25	$2,24 \pm 0,19^*$ (6)	2,65	0,18
		37	$5,04 \pm 0,26$ (7)	0,80	1,35
Восстановление температу- ры тела до 37° С	37	25	$2,46 \pm 0,13^*$ (7)	2,74	0,08
		37	$2,81 \pm 0,35$ (6)	0,89	1,43
Через 14 сут. после охлаж- дения	37	25	$1,45 \pm 0,33$ (4)	1,58	1,69
		37	$3,60 \pm 0,48$ (4)	0,07	2,58

Примечание. * — $P < 0,05$ по сравнению с контролем при инкубации при 37° С. Активность МАО определялась при концентрации серотонина 1,0 мМ.

У охлажденных до 25 °С крыс при инкубации МАО при 25 °С, т. е. температуре, соответствующей реальной температуре тела, активность МАО была такой же низкой, как активность МАО контрольных крыс при инкубации МАО при 25 °С. Коэффициент кооперативности Хилла n_H в области высоких концентраций серотонина был значительно ниже единицы. Инкубация МАО охлажденных до 25 °С крыс при 37 °С (разогревание МАО *in vitro*) сопровождалось существенным повышением активности МАО, причем коэффициент кооперативности Хилла n_H в области высоких концентраций серотонина становился выше единицы, а в области низких концентраций серотонина приближался к единице (табл. 1).

У крыс с восстановленной до 37 °С температурой тела активность МАО при инкубации при 37 °С приближалась к уровню активности контрольных интактных крыс (табл. 1), хотя коэффициент кооперативности Хилла n_H в области высоких концентраций серотонина был выше единицы, в области низких концентраций — близок к единице. При инкубации МАО крыс с восстановленной до 37 °С температурой тела при 25 °С, т. е. при охлаждении *in vitro*, наблюдалось падение активности МАО и появление положительного кооперативного связывания серотонина в области высоких и низких его концентраций. Через 14 сут. после охлаждения крыс до 25 °С и последующего восстановления температуры тела до 37 °С активность МАО при ее инкубации при 37 °С не отличалась от соответствующего контроля, хотя коэффициент кооперативности Хилла n_H в области высоких концентраций серотонина продолжал оставаться выше единицы, а в области низких его концентраций — ниже единицы (табл. 1).

Реакция МАО мазга сусликов на охлаждение и нагревание имела определенные особенности. У бодрствующих сусликов при температуре тела и инкубации 37 °С активность МАО была близкой к активности этого фермента у крыс, однако n_H у сусликов был близок к единице как в области высоких концентраций серотонина, так и в области низких его концентраций (табл. 2). При инкубации МАО бодрствующих сусликов при 11 °С, т. е. при

Таблица

Моноаминоксидаза мозга сусликов при погружении в спячку,
нмоль аммиака/мг белка · мин

Серии опытов	Температура, °С		Активность МАО мозга	Коэффициент кооперативности Хилла n_H	
	тела	инкуба- ции		0,062 0,125 0,250 мМ	0,250 0,500 1,00 мМ серотонина
Бодрствование 14 сут.	37	37 11	$2,91 \pm 0,19$ (6) $0,60 \pm 0,07$ (6)	1,16 3,49	0,90 0,90
Погружение в спячку	11	37 11	$1,89 \pm 0,07^*$ (6) $0,69 \pm 0,07$ (6)	1,05 3,22	1,61 3,60

Примечание. * — $P < 0,05$ по сравнению с бодрствованием. Активность МАО определялась при концентрации серотонина 1,0 мМ.

охлаждении их МАО *in vitro*, наблюдалось понижение активности МАО и появление положительной кооперативности по серотонину в области низких его концентраций, а в области высоких концентраций n_H продолжал оставаться близким к единице. У сусликов при естественном погружении в спячку и соответствующем понижении температуры тела до 11 °С наблюдалось существенное понижение активности МАО головного мозга. Коэффициент кооперативности Хилла при этом превышал единицу в областях высоких и низких концентраций серотонина. Инкубация МАО погружающихся в спячку сусликов при 37 °С сопровождалась повышением активности МАО, приближением n_H к единице в области низких концентраций серотонина, в то время как в области высоких его концентраций коэффициент кооперативности Хилла продолжал оставаться высоким.

Данные приведенных исследований показали, что понижение температуры сопровождалось понижением активности МАО мозга как у крыс, так и у сусликов. Однако молекулярные механизмы, регулирующие это понижение активности МАО у гомойотермов и гетеротермов в условиях гипотермии по всей видимости, не были одинаковыми. Так, хотя при понижении температуры тела как у гомойотермов, так и у гетеротермов, образуются температурные конформеры МАО, но тип кинетических проявлений взаимодействий активных центров, связывающих серотонин, неодинаков. У крыс при температуре тела и инкубации 25 °С коэффициент кооперативности Хилла

n_H был равен 0,08 в области высоких концентраций серотонина, что указывает на появление отрицательной кооперативности по субстрату при гипотермии (табл. 2), которая делает фермент малочувствительным к изменению концентрации субстрата [1]. У погружающихся в спячку сусликов при температуре тела и инкубации 11 °С n_H равнялся 3,6 в области высоких концентраций серотонина и свидетельствовал о появлении положительной кооперативности по субстрату при естественной гипотермии, которая делает фермент более чувствительным к изменению концентрации субстрата и включает механизм температурной компенсации, показанной нами ранее [8]. Такое отличие гомойотермов от гетеротермов по типу кинетических проявлений взаимодействий активных центров МАО, связывающих серотонин, в условиях гипотермии может свидетельствовать о неодинаковых структурах высшего порядка МАО и, по-видимому, о различии в изменении метаболизма нейромедиаторов мозга при гипотермии.

Известно, что при отрицательной кооперативности по субстрату уменьшается каталитическая эффективность активных центров фермента по мере заполнения их субстратом [5]. Пониженная активность МАО мозга крыс, по-видимому, не противостоит действию низких температур на фермент, не компенсирует влияние гипотермии на метаболизм серотонина. Не исключено, что понижение активности МАО при гипотермии у крыс служит причиной повышенного уровня серотонина в мозге [6]. Температурный конформер МАО с отрицательной кооперативностью по субстрату, образовавшийся у крыс при температуре холодового наркоза 25 °С, в области высоких концентраций серотонина, при разогревании *in vitro* путем инкубации при 37 °С, подвергался дальнейшим конформационным превращениям. В результате этих превращений n_H становился выше единицы, указывая на появление положительного кооперативного взаимодействия между активными центрами МАО, связывающими серотонин.

У сусликов, погружающихся в спячку, при инкубации МАО при 37 °С наблюдается понижение положительного кооперативного связывания серотонина, так как n_H смещался от 3,6 до 1,61 в области высоких концентраций серотонина. Эти данные показывают, что у гетеротермов в противоположность гомойотермам при разогревании не изменялся тип кинетических проявлений взаимодействий центров МАО, связывающих серотонин, поскольку коэффициент кооперативности Хилла n_H приближался к единице, возвращаясь к значениям, которые наблюдались у бодрствующих сусликов. Полученные данные указывают также на то, что восстановление температуры тела крыс до 37 °С сопровождалось повышением активности МАО, положительным кооперативным взаимодействием активных центров, связывающих серотонин, в области высоких концентраций серотонина при инкубации МАО не только при 37 °С, но и при 25 °С. Видимо, образованный у разогретых до 37 °С крыс «температурный конформер» МАО с положительной кооперативностью по субстрату при охлаждении *in vitro* остается таким же, как при 37 °С, поскольку коэффициент кооперативности Хилла n_H практически не изменялся (1,43 и 1,69 соответственно). Этот факт может свидетельствовать о необратимости температурной модификации МАО у гомойотермов. Положительное кооперативное связывание серотонина в области его высоких концентраций активными центрами МАО у гомойотермов сохранялось и через 14 сут. после восстановления температуры тела. Поскольку период полужизни конstitutивных МАО находится в пределах 11—13 дней [10], существование положительной кооперативности по субстрату на 14-е сут. после гипотермии может являться еще одним свидетельством в пользу необратимых конформационных изменений МАО, возникающих у разогретых после гипотермии крыс.

Гетеротермы суслики через 14 сут. после выхода из спячки в противоположность гомойотермам характеризовались отсутствием кооперативных взаимодействий между центрами МАО, связывающими серотонин, и высокой активностью фермента (табл. 2). Следует отметить, что у сусликов об-

ласть низких концентраций серотонина оказалась более чувствительной к действию низких и высоких температур, поскольку у бодрствующих сусликов при инкубации MAO при 11 °C n_H сместился от 1,16 до 3,49, а у погружающихся в спячку сусликов при инкубации MAO при 37 °C n_H сместился от 3,22 до 1,05 (табл. 2). Можно думать, что снижение концентрации серотонина в мозге включает молекулярные механизмы, которые создают адекватный уровень катаболизма серотонина в мозге.

У крыс область низких концентраций серотонина не отличалась особой чувствительностью к температурным воздействиям. Найденные особенности активности MAO мозга при гипотермии у гомейотермов и гетеротермов, по-видимому, служат причиной того, что уровень серотонина при гипотермии у гомейотермов [6] и при погружении в спячку у гетеротермов [7] повышается, что способствует сну [7].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Васильевых Л. Г., Глушков Р. Г., Горкин В. З. и др. Кинетика ингибирования митохондриальной моноаминоксидазы инказаном // Хим.-фарм. журнал. — 1979. — № 7. — С. 20—24.
2. Войтенко Н. Н. Влияние низких температур на моноаминоксидазу мозга зимоспящих сусликов // Криобиология. — 1988. — № 1. — С. 334—39.
3. Горкин В. З., Вережкина И. В., Гряднева Л. И. и др. Методы исследования активности и специфического торможения моноаминоксидаз митохондрий // Современные методы. — М.: Медицина, 1968. — С. 155—177.
4. Горошинская И. А., Рудик Г. М. Влияние холодовой адаптации и кратковременного действия холода на устойчивость животных к гипоксигенной гипоксии // Физиол. журнал СССР. — 1987. — 73. — № 4. — С. 532—536.
5. Курганов Б. И. Аллостерические ферменты. — М.: Наука, 1978. — С. 29.
6. Молодцова Г. Ф. Моноаминоксидаза и метаболизм серотонина при холодовых воздействиях: Дис... канд. биол. наук. — Новосибирск, 1984. — С. 64.
7. Попова Н. К., Науменко Е. В., Колпаков В. Г. Серотонин и поведение. — Новосибирск: Наука СО, 1978. — С. 187—197.
8. Попова Н. К., Войтенко Н. Н., Слоним А. Д. Температурная компенсация метаболизма серотонина в мозге зимоспящих // Докл. АН СССР. — 1979. — 248, № 2. — С. 492—494.
9. Хочачка П., Сомеро Дж. Стратегия биохимической адаптации. — М.: Мир. — 1977. — 309 с.
10. Neff N. H., Gorridis C. Neuronal monoamine oxidase: specific enzyme types and their rates of formation // Adv. Biochem. Psychopharmacology. — 1972. — 5. — P. 307—323.

Ин-т цитологии и генетики СО АН СССР,
г. Новосибирск

Поступила 16.03.90

N. N. VOITENKO, L. A. KORYAKINA

THE PECULIARITIES OF ACTION OF BRAIN MAO-A OF RATS AND HIBERNATING GROUND SQUIRRELS UNDER HYPOTHERMIA

Institute for Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the USSR Academy of Sciences, Novosibirsk

Brain MAO-A of rats and hibernating ground squirrels was studied. In rats, the Hill's coefficient of cooperativeness n_H calculated for the dependence (v) versus $[S]_0$ was lower than unity (0.08) at the temperature of cold anesthesia and 1.69 in 14 days after arousal. In hibernating ground squirrels, n_H was 3.60 and 0.90 at 11 °C and 14 days after arousal, respectively. The possibility of irreversible conformational changes in MAO-A in rats under hypothermia and reversible changes in hibernating ground squirrels are discussed.

УДК 57.043 : 577.335 : 611.73.013

Л. Н. Кузьмина

КРИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ СИСТЕМЫ ТРАНСПОРТА КАЛЬЦИЯ МЕМБРАН САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА РАЗВИВАЮЩИХСЯ МЫШЦ

Исследование криочувствительности системы транспорта Ca^{2+} саркоплазматического ретикулума (СР) мышц кролика на 17, 20, 30, 120-й дни после рождения показало, что быстрое замораживание приводит к нарушению проницаемости мембран СР

для Ca^{2+} , не повреждая непосредственно молекулу Ca^{2+} -АТФазы. Степень нарушения проницаемости ретикулума в процессе развития снижается. Роль утечки Ca^{2+} через каналы, образуемые агрегатами Ca^{2+} -АТФазы после замораживания мембран, увеличивается с возрастанием содержания фермента в развивающемся ретикулуме.

Мембранная система саркоплазматического ретикулума (СР) является удобной моделью для изучения транспорта Ca^{2+} , так как 60 % общего белка в ней представлено Ca^{2+} -зависимой АТФазой. Поскольку в процессе постнатального развития скелетных мышц кролика наряду с возрастанием доли Ca^{2+} -АТФазы с 15 до 60 %б белка СР и ростом индекса ненасыщенности жирных кислот фосфолипидов происходит снижение соотношения липид/белок [5], можно ожидать, что криочувствительность этой ионотранспортирующей системы изменяется. В связи с этим в данной работе исследовали криочувствительность Ca^{2+} -транспортирующей системы СР в процессе развития мышц.

Везикулы СР получали из гомогената быстрых скелетных мышц кролика на 17, 20, 30 и 120-й дни после рождения методом дифференциального центрифугирования в среде 0,1 М КСl и 10 мм гистидина, рН 7,4. Суспензию везикул замораживали до -196°C путем быстрого погружения в жидкий азот. Скорость гидролиза АТФ и аккумуляции Ca^{2+} определялась рН-метрическим методом [4]. Уровень накопления Ca^{2+} везикулами измерялся в присутствии флуоресцентного зонда хлортетрациклина (ХТЦ) на спектрофлуориметре Хитачи-SP 850. Температурные зависимости исследуемых параметров определялись при температурах 10, 15, 20, 25, 30, 37°C . В экспериментах использовали антибиотики, обладающие ионофорными (A23187) и каналоформерными (аламетицин) свойствами, декансодержащие липосомы.

В работе [1] показано, что замораживание-отогрев суспензии везикул СР в солевой среде приводит к разобщению гидролиза АТФ и транспорта Ca^{2+} . Насколько выражены эти процессы при замораживании СР с изменяющимся составом мембран можно судить, сравнивая основные характеристики Ca^{2+} -транспортирующей системы на исследуемых нами сроках развития мышц. Из таблицы видно, что после замораживания-отогрева тенден-

Характеристики Ca^{2+} -транспортирующей системы СР после замораживания в процессе развития мышц

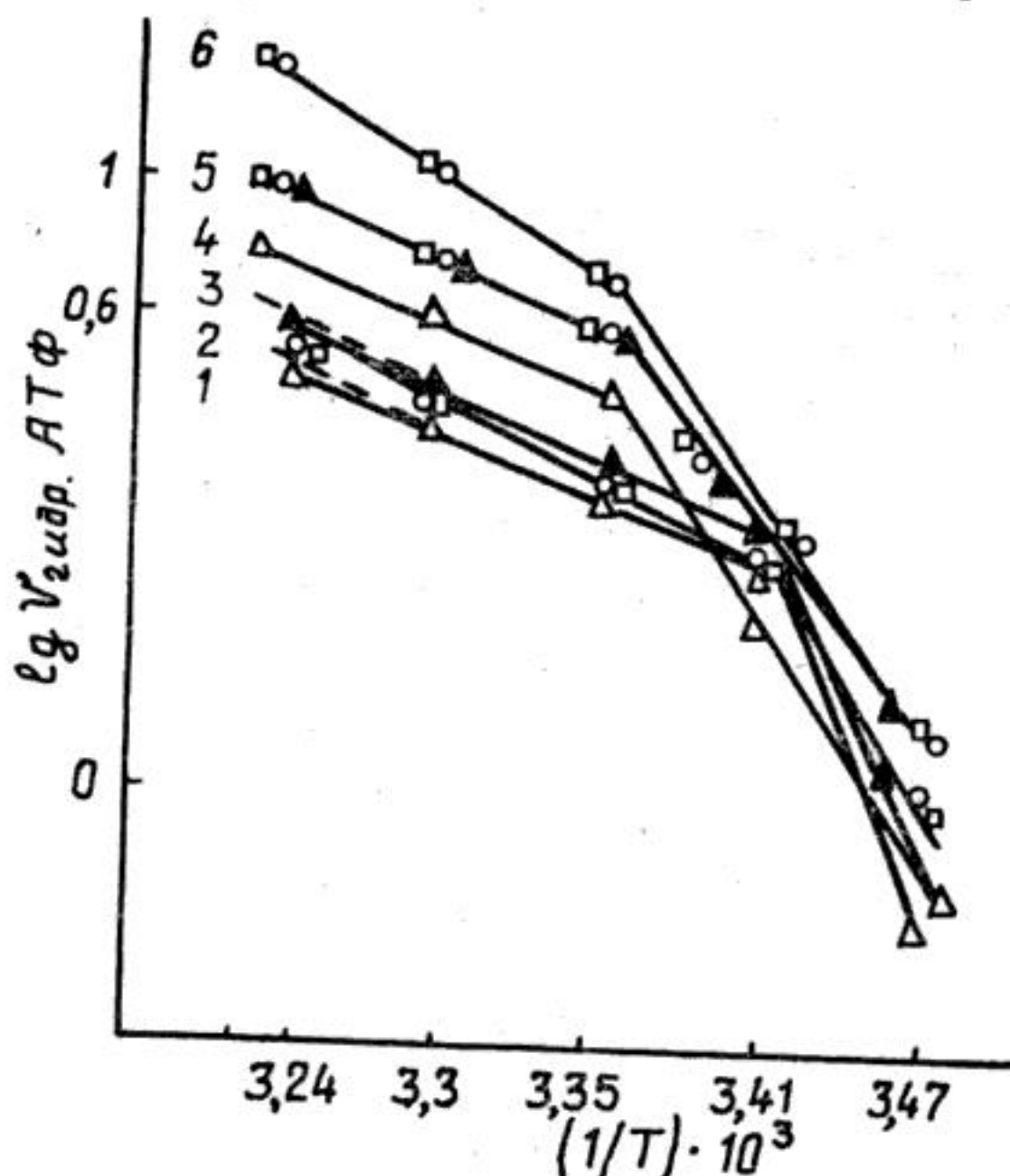
Возраст	17 дн.		20 дн.		30 дн.		3—4 мес.	
Варианты	Контроль БЗ		Контроль БЗ		Контроль БЗ		Контроль БЗ	
Параметры:	2,45		2,70		2,44		2,46	
Скорость гидролиза АТФ	$\pm 0,22$	$\pm 0,30$	$\pm 0,02$	$\pm 0,12$	$\pm 0,19$	$\pm 0,16$	$\pm 0,10$	$\pm 0,22$
Скорость аккумуляции Ca^{2+}	4,31	3,22	4,49	3,18	4,44	3,9	4,33	4,58
	$\pm 0,20$	$\pm 0,10$	$\pm 0,25$	$\pm 0,41$	$\pm 0,30$	$\pm 0,25$	$\pm 0,02$	$\pm 0,33$
Коэффициент $\text{Ca}/\text{АТФ}$	1,66	1,15	1,66	0,98	1,74	1,4	1,73	1,51
	$\pm 0,08$	$\pm 0,03$	$\pm 0,08$	$\pm 0,04$	$\pm 0,10$	$\pm 0,12$	$\pm 0,15$	$\pm 0,08$

ция к разобщению транспортных процессов выявляется для везикул всех исследуемых нами возрастов. При этом коэффициент эффективности транспорта Ca^{2+} $\text{Ca}/\text{АТФ}$ у 17- и 20-дневных кроликов был в 2 раза ниже, чем у 30-дневных и взрослых. На рис. 1 (1—3) приведены температурные зависимости скорости гидролиза АТФ для контрольных и замороженных везикул СР всех возрастов, в координатах Аррениуса. Степень наклона графика до температурного излома при 20°C для СР 17- и 20-дневных кроликов больше, чем для 30-дневных и взрослых животных, что, по-видимому, связано с меньшей вязкостью мембран СР на ранних сроках развития. Это обстоятельство отразилось на характере температурной-

зависимости после излома, где степень наклона графиков также определялась возрастом животных. Действие замораживания проявлялось в небольшом увеличении АТФазной активности при 37 °С для СР 17- и 20-дневных кроликов.

Известно, что измерение температурной зависимости активности фермента может быть искажено pH -зависимостью проницаемости мембран для Ca^{2+} [2]. Применение антибиотика А23187 позволило избежать целого ряда методических затруднений, включая предотвращение ингибирования Ca^{2+} -АТФазы внутривезикулярным Ca^{2+} . Результаты определения температурной зависимости АТФазной активности замороженных и контрольных везикул СР исследуемых возрастов в присутствии А23187 даны на рис. 1 (4, 5). Как видно, применение Са-ионофора внесло ряд изменений в харак-

Рис. 1. Температурная зависимость АТФазной активности везикул СР в процессе развития мышц: —△— СР 17-дневного кролика, —▲— СР 20-дневного кролика, —○— СР 30-дневного кролика, —□— СР взрослого кролика, — — — после быстрого замораживания (БЗ). 1—3—графики Аррениуса для контрольных и замороженных везикул СР, 4, 5 — то же, с А23187 (3 мкг/мл), 6 — то же, с аламетицином (5 мкг/мл)



тер графиков. Температура излома повышается до 25 °С. Гидролитическая активность СР 20- и 17-дневных кроликов перестала лимитироваться вязкостью мембран при 15—25 °С, и степень наклона аррениусовских кривых до и после излома стала одинаковой. Однако Ca^{2+} АТФазная активность ретикулума на 17-й день после рождения во всех температурных точках была значительно ниже, чем на последующих сроках развития мышц. Наиболее вероятной причиной этого явления может быть более низкое содержание АТФазы в мембране [5].

Присутствие А23187 в среде измерения АТФазной активности нивелировало различия по этому параметру контрольных и замороженных везикул СР. По-видимому, режим быстрого замораживания приводит лишь к нарушению проницаемости мембран СР, не повреждая непосредственно молекулу фермента.

Для более адекватного сравнения функционального состояния СР при изменении состава мембран в процессе развития мышц в экспериментах использовали антибиотик аламетицин, образующий в мембране водные поры до 20 Å в диаметре [2]. Применение аламетицина способствует выявлению АТФазной активности вывернутых везикул, обеспечивает доступность АТФ среды инкубации для активного центра обращенного фермента. Как видно из рис. 1 (6), по сравнению с действием А23187, аламетицин увеличивает АТФазную активность СР 30-дневных и взрослых кроликов на 20—25 % при 37 °С, что свидетельствует о присутствии в суспензии выдернутых ве-

везикул. При этом, как и в присутствии нонофтора, не выявлены различия в скорости гидролиза АТФ везикулами СР в контроле и после замораживания.

Известно, что в процессе охлаждения клеточных и субклеточных мембран происходит образование белковых агрегатов, сопряженное с латеральным разделением липидов в плоскости мембраны [3]. На протеолипосомах с различной концентрацией Ca^{2+} -зависимой АТФазы было показано, что степень агрегации белка пропорциональна его концентрации в мембране. Причем образующиеся при агрегации неспецифические гидрофобные каналы утечки Ca^{2+} могут блокироваться алифатическими углеводородами [2]. Исходя из вышеизложенного, можно предположить, что вероятность агрегации Ca^{2+} -АТФазы после замораживания должна увеличиваться в мембранах

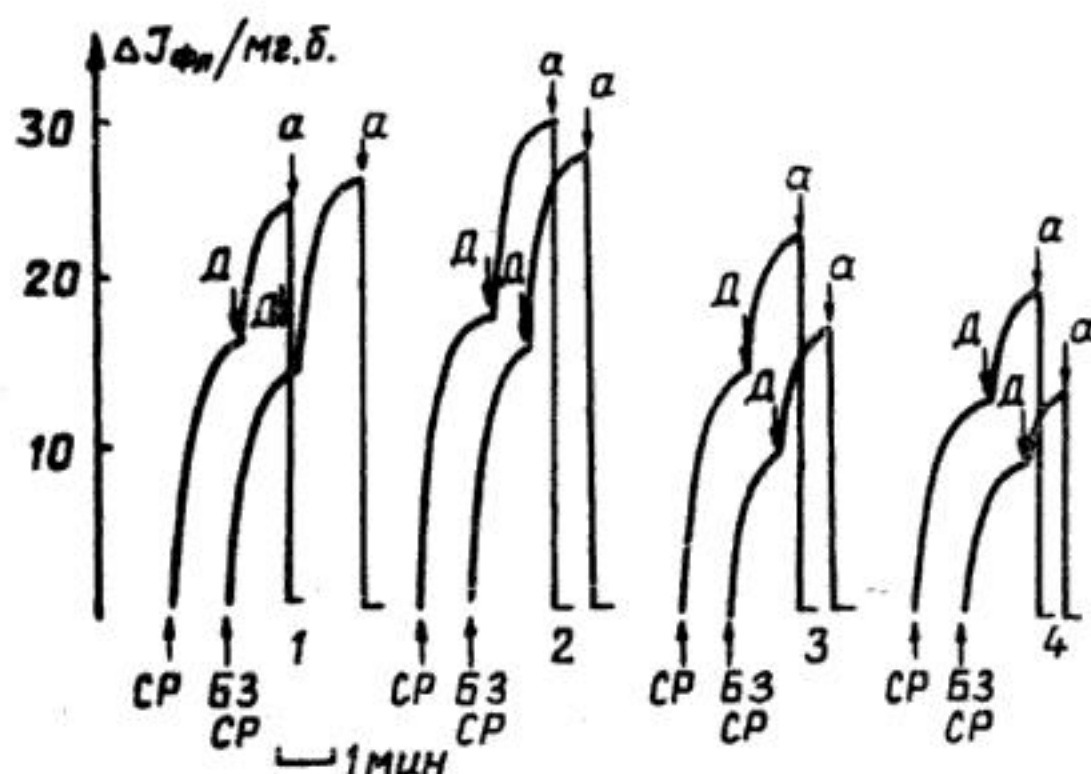


Рис. 2. Способность везикул СР к накоплению Ca^{2+} после замораживания. Действие декансодержащих липосом: 1 — СР взрослого кролика, 2 — СР 30-дневного кролика, 3 — СР 20-дневного кролика, 4 — СР 17-дневного кролика. Конечные концентрации: аламетицин (а) — 10 мкг/мл, декан (д) — 1,4 мкг/мл, дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ) — 2 мкг/мл

СР с большим содержанием фермента. Для проверки этого предположения была определена способность везикул СР с разной концентрацией АТФазы в мембране к активному транспорту Ca^{2+} после замораживания в присутствии декансодержащих липосом. Как видно из рис. 2, добавление ретикулума в инкубационную смесь, содержащую Ca^{2+} , Mg^{2+} , АТФ и хлортетрациклин (ХТЦ), приводит к возрастанию флуоресценции ХТЦ. Прирост флуоресценции связан с накоплением Ca^{2+} внутри везикул, так как внесение в среду аламетицина приводит к снижению флуоресценции до исходного уровня. Измеренная таким образом способность везикул к накоплению Ca^{2+} у 30-дневных и взрослых кроликов после замораживания снижалась на 10—12 %, а у 17- и 20-дневных — на 30 и 25 % соответственно. Добавление декановых липосом после выхода флуоресцентного ответа на плато рис. 2 приводит к дальнейшему росту флуоресценции ХТЦ. Для СР взрослых и 30-дневных животных введение декансодержащих липосом в среду инкубации полностью восстанавливает транспорт Ca^{2+} замороженных везикул. Ретикулум 17- и 20-дневных кроликов не достигал контрольного уровня АТФ-зависимого накопления Ca^{2+} . По-видимому, при низкой концентрации Ca^{2+} -зависимой АТФазы в мембране ее агрегация не вносит значительного вклада в нарушение проницаемости СР после быстрого замораживания до -196°C .

Таким образом, режим быстрого замораживания приводит к нарушению проницаемости мембран СР, не повреждая молекулу фермента. В этих условиях степень нарушения снижается в процессе развития ретикулума. При этом роль утечки Ca^{2+} через каналы, образуемые агрегатами Ca^{2+} АТФазы после замораживания мембран СР, увеличивается с возрастанием содержания фермента в развивающемся ретикулуме.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жегунов Г. Ф. Функциональное состояние кальциевого насоса мембран саркоплазматического ретикулума после замораживания в присутствии криопротекторов // Современные вопросы криобиологии. — Киев: Наук. думка, 1976. — 61 с.

2. Шевченко С. И., Чернова Т. Л., Меньшикова Е. В., Ритов В. Б. Блокирующее действие алифатических углеводов на каналы утечки Ca^{2+} , формируемые агрегатами Ca^{2+} -АТФазы саркоплазматического ретикулума // Биохимия. — 1989. — 54, № 9. — С. 1526—1532.

3. Hackenbrock C. R., Hochli M., Chan R. M. Calometric and freeze-fracture analysis of lipid phase transition and lateral transition motion of intermembrane particles mitochondrial membranes // Biochim. Biophys. Acta. — 1976. — 445, N 2. — P. 466—484.

4. Martonosi A., Fortier D. The effect of anti-ATPase antibodies upon the Ca^{2+} transport of sarcoplasmic reticulum // Biochem. and Res. Commun. — 1974. — 60, N 55. — P. 382—390.

5. Sarzala M. G., Pilarska M., Zubrzycka E., Michalak M. Changes in the structure, composition and function of sarcoplasmic reticulum membrane during development // Eur. J. Biochem. — 1975. — 57, N 1. — P. 25—34.

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

Поступила 25.03.91

L. N. KUZMINA

THE CRYOSENSITIVITY OF SARCOPLASMIC RETICULUM MEMBRANE CALCIUM TRANSPORT SYSTEM OF DEVELOPING MUSCLES

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

The investigation of the cryosensitivity of Ca^{2+} transport of sarcoplasmic reticulum (SR) of muscles of rabbits aging 17, 20, 30 or 120 days demonstrated that rapid freezing leads to changes in permeability of SR membranes to Ca^{2+} with the molecule of Ca^{2+} -ATPase being unchanged. The extent of damage appeared to decrease in the process of development. The role of leakage of Ca^{2+} through channels formed by Ca^{2+} -ATPase aggregates after freezing increased with increasing the content of the enzyme in developing reticulum.

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

УДК 516.8 : 578.68(088.8)

В. Д. Мануильский, Э. Ф. Соломко

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ ВЕГЕТАТИВНОГО МИЦЕЛИЯ ВЫСШИХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ

Предложен способ длительного хранения при низких температурах мицелиальной массы высших базидиальных грибов, являющихся продуцентами важных для микробиологической промышленности соединений. С помощью оригинальной технологии авторы увеличили выход жизнеспособной массы и упростили процедуры, связанные с криоконсервацией.

Разработка новых биотехнологий, позволяющих осуществлять стабильное хранение генофонда биологических объектов, является одной из основных задач поддержания генетического разнообразия биосферы. В настоящее время для этих целей единственно приемлемым способом является криоконсервация иницирующих тканей при температуре жидкого азота [2]. Однако существующие в настоящее время биотехнологии, как правило, трудоемки и недостаточно эффективны. Особенно много проблем возникает в связи с длительным хранением большого набора генотипов в коллекциях микроорганизмов [1, 3, 5]. Среди большого количества генотипов в последнее время наиболее интенсивно применяются продуценты белковой массы, а также биологически активных веществ. Для этих целей успешно используются целлюлозоразрушающие грибы, субстратом для которых может быть вторичное сырье деревообрабатывающей промышленности и сельско-

хозяйственного производства. Несмотря на то, что для хранения генотипов этих грибов приходится их регулярно пересевать на культуральных средах, методы криоконсервации практически не используются для поддержания жизнеспособности базидиомицетов. Это вызвано сложной технологией криоконсервации при которой используются программное замораживание, эквilibрация в криопротекторных веществах, а также процедуры удаления криопротекторов. Поэтому для удовлетворения требований, предъявляемых технологическими регламентами при размножении базидиомицетов, разработана более совершенная и легко воспроизводимая методика долгосрочного хранения мицелиальной массы высших базидиомицетов в замороженном состоянии.

В экспериментах использовались 2 штамма базидиальных грибов *Pleurotus ostreatus* K., зашифрованные под кодовыми названиями ИМБФ-1300 и ИБК-540, широко известные как продуценты обогащенной белком биомассы, а также исходного сырья для получения биологически активных веществ. Предварительное выращивание культур проводилось в стерильных флаконах, содержащих по 5 мл плотной сусло-агар или жидкой — пивное сусло 4 °С БАЛ питательных сред. После выдерживания в термостате при температуре 26 ± 1 °С в течение 7 сут мицелиальную массу помещали в герметически закрывающийся эксикатор над CaCl_2 , который устанавливали в холодильник при температуре около 5 °С. После дегидратации до влажности 5—10 % мицелиальную массу переносили в дьюар с жидким азотом, где ее замораживали со скоростью 280—325 °С мин⁻¹. Отогрев осуществляли в водяной бане при температуре 38—40 °С со скоростью 40—50 °С мин⁻¹. Для криоконсервации использовались стеклянные флаконы либо пластмассовые ампулы на 3—5 мл. Жизнеспособность мицелиальной массы после криоконсервации при температуре жидкого азота контролировали путем высева на плотную либо жидкую питательную среду. Для установления эффективности данной методики проводили сопоставление с традиционными методами криоконсервации, в которых используется программное замораживание и криопротекторы в виде 5 %-ного раствора ДМСО [5].

Представленные в табл. 1 данные свидетельствуют о том, что применение метода пролонгированной дегидратации, т. е. медленного обезвожива-

Таблица 1

Скорость роста и концентрация биомассы штаммов базидиомицетов, дегидратированных перед криоконсервацией при разной температуре

Варианты эксперимента	Штаммы базидиомицетов			
	ИМБФ-1300		ИБК-540	
	Скорость роста на плотной среде, мм/сут.	Концентрация биомассы на жидкой среде, г/л	Скорость роста на плотной среде, мм/сут.	Концентрация биомассы на жидкой среде, г/л
Мицелиальная масса без обработки (контроль)	$5,5 \pm 0,2$	$6,0 \pm 0,7$	$5,5 \pm 0,1$	$6,5 \pm 0,3$
Мицелиальная масса, дегидратированная до 10 % влажности	$5,5 \pm 0,4$	$5,8 \pm 0,9$	$5,6 \pm 0,2$	$5,9 \pm 0,7$
Криоконсервация дегидратированной массы мицелия при, °С:				
5	$5,5 \pm 0,2$	$6,1 \pm 0,8$	$5,6 \pm 0,3$	$6,3 \pm 0,2$
7,5	$5,5 \pm 0,3$	$6,0 \pm 0,5$	$5,5 \pm 0,4$	$6,6 \pm 0,4$
15	$5,4 \pm 0,4$	$5,9 \pm 0,3$	$5,5 \pm 0,6$	$5,9 \pm 0,7$
30	$5,0 \pm 0,6$	$4,5 \pm 0,2$	—	$4,0 \pm 0,5$

ния при пониженных температурах, позволяет сохранить жизнеспособность мицелиальной массы гриба на контрольном уровне. Подбор режимов дегидратации для производственных штаммов следует проводить эмпирически,

поскольку в зависимости от условий культивирования наблюдаются смещения режимов обезвоживания. В частности, показано, что при низких скоростях роста мицелиальной массы более эффективными оказались температуры в интервале от 3 до 5 °С, а для интенсивно растущих культур следует проводить более медленные режимы обезвоживания, применив дегидратацию на первом этапе на силикагеле, а затем над CaCl_2 .

Сохранение жизнеспособности мицелиальной массы при ее дегидратации до 10—12 % позволило исключить применение криопротекторных веществ и использование медленного программного замораживания. В связи с этим существующая технология криоконсервации базидиомицетов была изменена, и проведено сравнение используемой в Национальной коллекции (АТСС) процедуры длительного хранения с предлагаемой нами. Как свидетельствуют приведенные в табл. 2 данные, существующая технология крио-

Таблица 2

Сравнение эффективности предлагаемой и существующей методик [5]
криоконсервации базидиомицетов

Этапы технологий	Жизнеспособность, %			
	Технология с использованием пролонгированной дегидратации		Технология, применяемая в АТСС	
	ИМБФ-1200	ИБК-540	ИМБФ-1300	ИБК-540
Мицелиальная масса без обработки (контроль):	100	100	100	100
дегидратация до 10—12 %	100	100	Не предусмотрена	
эквilibрация с криопротектором 5 %-ным ДМСО	Не предусмотрена		98	97
программное замораживание до —35° С	Не предусмотрено		98	97
Криоконсервация при —196° С и хранение в жидком азоте				
270 сут.	100	100	98	97
более 2 лет	—	—	95	95

консервации [5] несколько снижает жизнеспособность мицелиальной массы базидиомицетов после инкубации их с криопротекторами. Поскольку в предлагаемом способе криопротекция не проводится, то в этом случае исключается цитотоксическое действие криопротектора и необходимость удаления его из мицелиальной массы. С другой стороны, использование в традиционной технологии ксенобиотиков вызывает усиление мутационного процесса. Поэтому преимущество предлагаемого метода заключается также и в большей стабильности генофонда и исключении химического мутагенеза [4].

Представленные в табл. 2 данные о длительности хранения при температуре жидкого азота мицелиальной массы штаммов ИМБФ-1300 и ИБК-540 по предлагаемой технологии [4] и традиционной технологии с использованием протекторных веществ показывают, что использование метода пролонгированной дегидратации позволяет поддерживать жизнеспособность вегетативных тканей базидиомицетов при криоконсервации на высоком уровне.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Какакуцкий Л. В., Сидякина Т. М. Анабиоз и консервация микроорганизмов // Криобиология. — 1988. — № 4. — С. 3—9.
2. Мануильский В. Д. Проблемы консервации генетических ресурсов растений // Криобиология. — 1987. — № 2. — С. 11—16.
3. Сидякина Т. М. Консервация микроорганизмов // Сер. Консервация генетических ресурсов. — Пущино: Из-во ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1985. — 63 с.
4. А. с. 1386653 СССР, МКИ⁴ А 01 N 1/00. Способ консервации мицелия макрогрибов / Э. Ф. Соломко, В. Д. Мануильский, Н. И. Даниляк. — Оpubл. 07.04.88. Бюл. № 13.

5. Jong S. C. Conservation of the cultures. The biology and cultivation of edible mushrooms. // Acad. Press N.-Y.— 1978.— P. 119—135.

Ин-т физиологии растений и
генетики АН УССР, г. Киев

Поступила 05.07.89

V. D. MANUILSKY, E. F. SOLOMKO

CRYOPRESERVATION OF VEGETATIVE MYCELIUM OF HIGHER BASIDIOMYCES

Institute for Plant Physiology and Genetics of the UkrSSR Academy of Sciences, Kiev

A method has been suggested for long-term storage of mycelium of higher Basidiomycetes fungi which are important compounds for microbiological industry. Using original technology, the yield of viable mass has been increased and cryopreservation procedures were simplified.

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 57.043.577.152.3

Т. Ф. Стрибуль

ИЗМЕНЕНИЕ АМИЛАЗНОЙ И ЛИПАЗНОЙ АКТИВНОСТИ СЕМЯН КУКУРУЗЫ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР

Известно, что хранение семян в условиях низких температур обеспечивает поддержание их биологических свойств на высоком уровне. Вместе с тем установлено, что криовоздействия могут приводить к травмированию семян, растрескиванию и разрыву сменной оболочки [4, 5]. Эти эффекты связаны с неоднородностью структуры эндосперма и могут быть частично устранены путем создания гомогенной структуры семян помощью их увлажнения перед криовоздействием. В то же время было замечено, что при равном уровне криоповреждений, связанных с механическими деформациями, одинаковые по всхожести семена различных сельскохозяйственных культур существенно различались по интенсивности начального роста, а в ряде случаев наблюдалась стимуляция этого процесса.

Таким образом, действие низких температур на семена сельскохозяйственных растений определяется не только особенностями физических свойств эндосперма семян, но также сопровождается увеличением интенсивности начального роста за счет эндогенных факторов, природа которых пока еще мало изучена.

Целью данной работы было изучение активности ключевых ферментов углеводного и липидного обмена — амилазы и липазы — прорастающих семян кукурузы с различной влажностью при замораживании их до различных температур.

В качестве объекта исследования были использованы семена кукурузы Черновицкая -21 полной физиологической спелости.

Криообработку семян проводили на программном замораживателе УНП-6 производства СКТБ с ОП Ин-та проблем криобиологии и криомедицины АН УССР в герметически закрываемых полиэтиленовых контейнерах емкостью 20 см³. Были испытаны 3 режима охлаждения [2]: экспоненциальный с интегральной скоростью 7 °C/мин до —30 °C; экспоненциальный, реализуемый с той же скоростью до —70 °C; нелинейный, осуществляемый прямым погружением контейнеров с семенами в жидкий азот. Время выдержки при конечной температуре охлаждения 60 мин. Отогрев — со скоростью 1—5 °C/мин. После отогрева семена находились при температуре 20 °C.

Активность кислой липазы определяли по [3] в свежесобраных семенах кукурузы с уровнем влажности 20 %. Величину активности выражали в см³ 0,1 н щелочи, израсходованной на нейтрализацию жирных кислот, образовавшихся под действием липазы в течение 24 ч в 1 г семян.

Общую амилолитическую активность определяли в семенах кукурузы этой же партии при 2 уровнях влажности: 8 % и 13 %. Семена с влажностью 13 % получали путем искусственного их увлажнения (с 8 %-ой исходной влажностью) в насыщенной водяными парами атмосфере в течение 15 ч при 20 °С. Активность амилазы измеряли на 2-й и 7-й день после деконсервирования и выражали в миллиграммах крахмала, гидролизованного за 1 ч инкубации при 4 °С одним граммом семян [1].

Результаты экспериментов свидетельствуют, что активность кислой липазы в семенах кукурузы (рис. 1), охлажденных до -30 °С, превосходит этот показатель у контрольных семян, не подвергавшихся криообработке, почти вдвое. Охлаждение семян до -70 и -196 °С приводит к возрастанию липазной активности почти в 3 раза по отношению к контролю. Эти факты свидетельствуют о стимуляции ферментативного гидролиза запасных липидов семян при низкотемпературном воздействии.

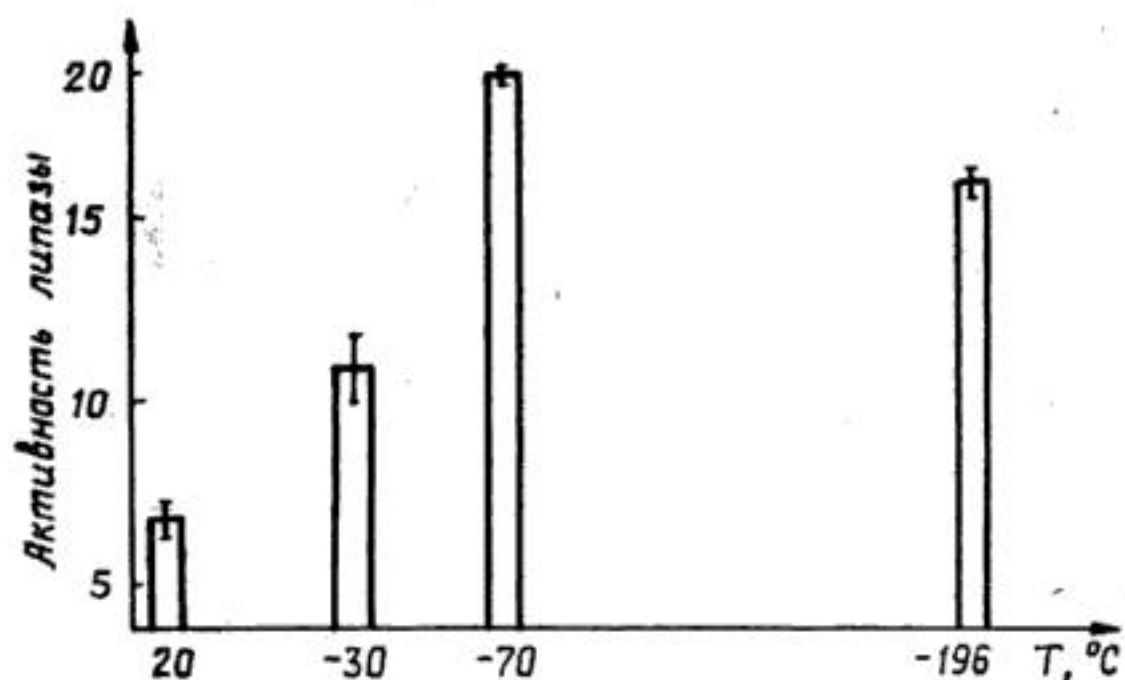


Рис. 1. Активность кислой липазы в семенах кукурузы после различных температур охлаждения (влажность семян 20 %)

Амилолитическая активность (рис. 2) в семенах с низким уровнем влажности на 2-й день после криовоздействия уменьшается с понижением температуры. На 7-й день в семенах, охлажденных до -30 и -70 °С, активность амилазы резко понижается, что

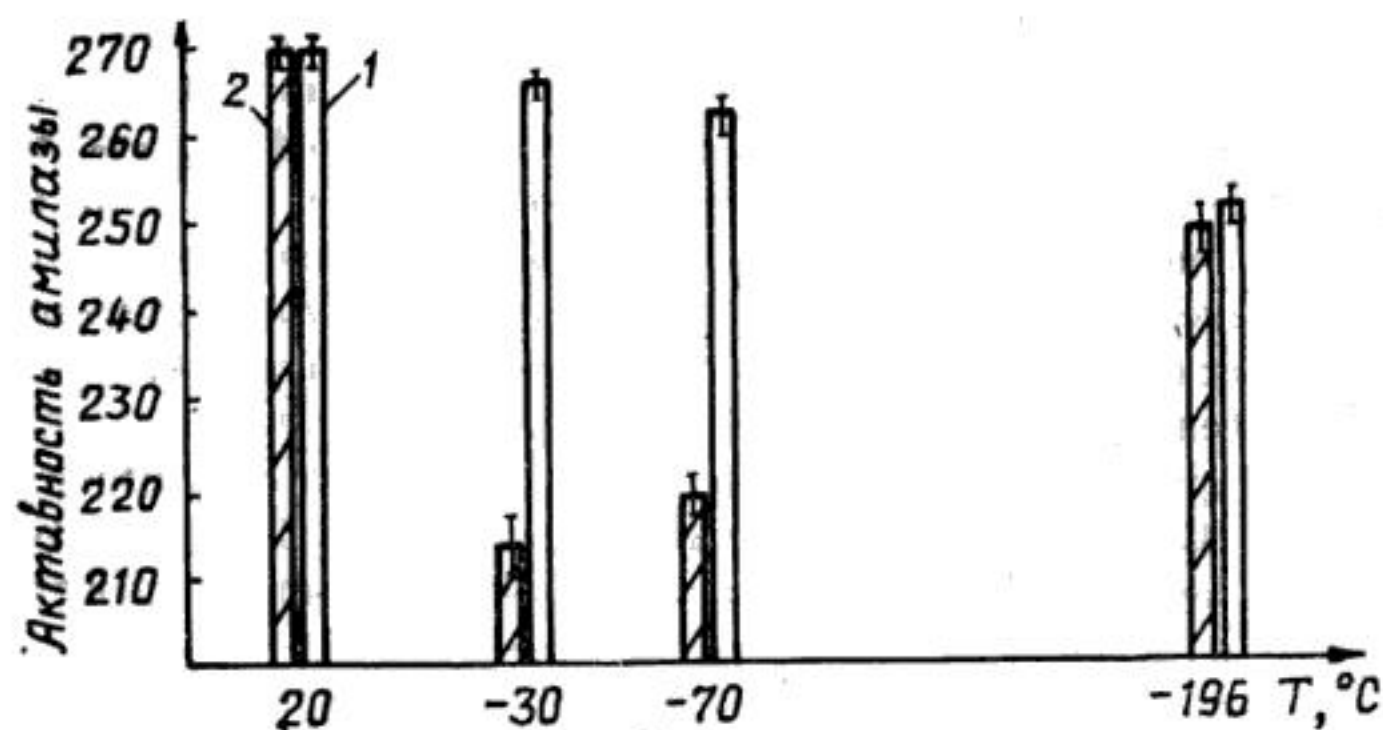


Рис. 2. Активность амилазы в семенах кукурузы (влажность 8 %) после различных температур охлаждения на 2-й (1) и на 7-й (2) день после криовоздействия

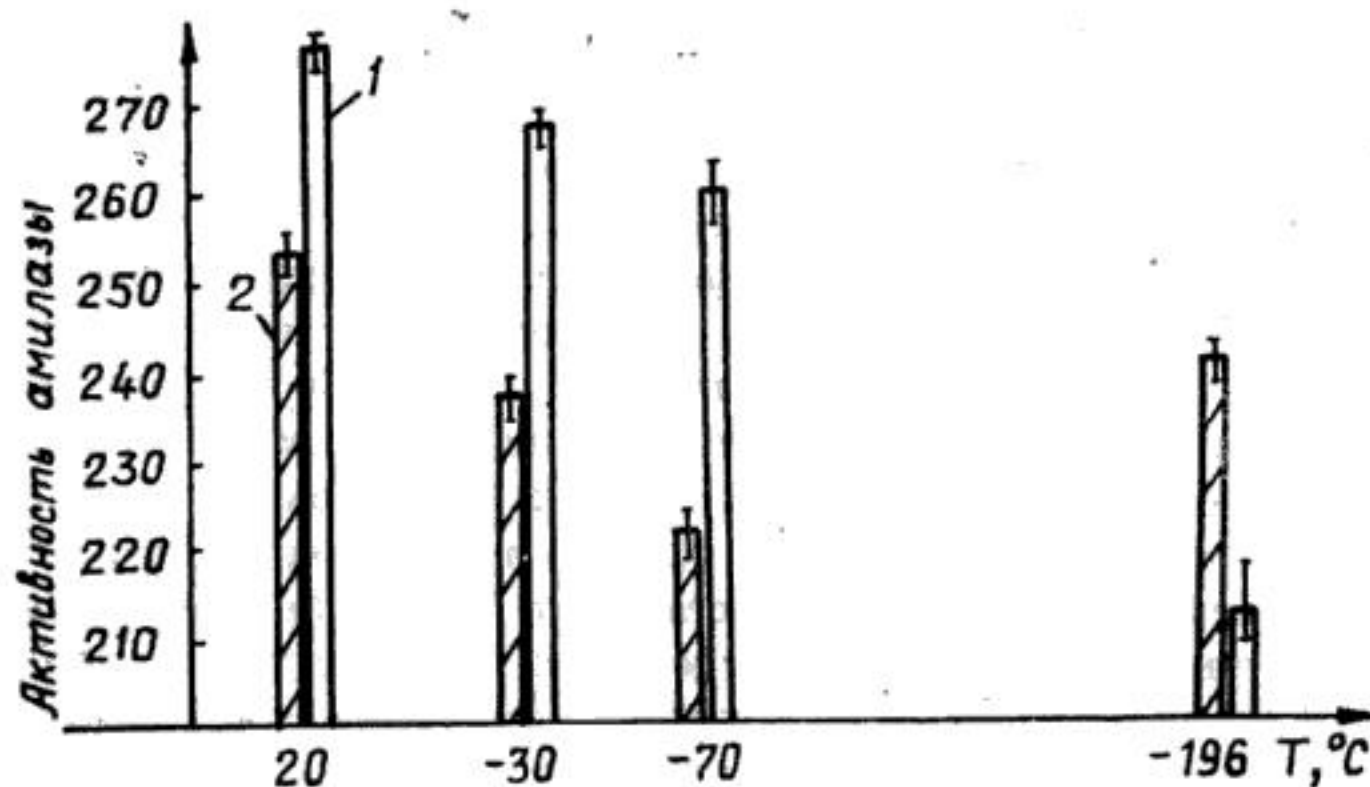


Рис. 3. Активность амилазы в семенах кукурузы (влажность 13 %) после различных температур охлаждения на 2-й (1) и на 7-й (2) день после криовоздействия

остаётся неизменной для семян, подвергнутых охлаждению до -196°C . В семенах с более высоким уровнем влажности (рис. 3) характер зависимости активности амилазы от температуры подобен предыдущему, с тем отличием, что на 2-й день процесс убывания активности протекает с большей интенсивностью. На 7-й день активность амилазы в семенах, охлажденных до -196°C , существенно превосходит значение этого показателя на 2-й день и почти приближается к контрольному уровню. На основании этих результатов можно предположить, что угнетение амилазной активности в результате криовоздействия, по-видимому, является обратимым процессом, и при большей выдержке семян после замораживания до -196°C возможна стимуляция этой активности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Методы биохимического исследования растений / Под ред. А. И. Ермакова. — Л.: Агропромиздат, 1987. — С. 54—57.
2. Новиков А. Н., Ткаченко С. И., Стрибуль Т. Ф., Рындин В. Ф. О возможности использования при криоконсервировании биологических объектов экспоненциальных режимов охлаждения // Биофизика. — 1985. — XXX. — Вып. 6. — С. 1042—1045.
3. Плешков Б. П. Практикум по биохимии растений. — М.: Колос, 1976. — С. 227—229.
4. Stanwood P. C. Cryopreservation of Seed Germplasm for Genetic Conservation // Cryopreservation of Plant Cells and Organs. — Boca Raton, Florida: CRC press, 1985. — P. 199—226.
5. Stanwood P. C. Seed cryopreservation // Cryobiology. — 1979. — 16. N 6. — P. 584—587.

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

Поступило 05.06.90

ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИИ

В специализированном совете при Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР в 1991 г. Н. Р. Землянских защищена диссертационная работа на соискание ученой степени кандидата биологических наук «Структурно-функциональные изменения мембран эритроцитов в процессе криоконсервирования под защитой ПЭО-1500». Поскольку устойчивость эритроцитов в процессе криоконсервирования в присутствии ПЭО-1500 определяется в значительной степени температурно-зависимыми перестройками плазматических мембран и прежде всего белков цитоскелета: уровнем фосфорилирования и особенностями структурной модификации белков, характером взаимодействия криопротектора с мембраной, показано, что снижение температуры инкубации с ПЭО-1500 до 0°C позволяет ограничить деформирование формы клеток и способствует сохранению барьерных свойств плазматической мембраны в процессе криоконсервирования.

Диссертационная работа А. Е. Ананьиной «Влияние криоконсервирования на стрептомицеты — продуценты антибиотиков» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук посвящена разработке эффективных методов криоконсервирования и лиофилизации производственных штаммов стрептомицетов, широко используемых в народном хозяйстве. Изучено влияние скоростей охлаждения-отогрева, физико-химических факторов, реализуемых на этапах криоконсервирования криопротекторов, а также параметров процесса лиофилизации на морфофункциональные свойства споровых и вегетативных форм стрептомицетов. Установлена положительная корреляция между изменениями морфофункциональных свойств и уровнем биосинтеза ДНК, РНК и белка в споровых и вегетативных формах стрептомицетов в условиях различных скоростей охлаждения культур — продуцентов антибиотиков. Впервые установлен факт повышения антибиотической активности стрептомицетов после криоконсервирования. Хранение криоконсервированных по оптимальным программам образцов стрептомицетов в течение 8 лет в низкотемпературном банке не вызывало изменения свойств микроорганизмов. Определены оптимальные условия лиофилизации (скорость охлаждения, начальная температура сублимации, остаточная влажность и защитные среды) для споровой культуры *Str. fradiae* — продуцента антибиотика тилозина. Результаты исследований внедрены во Всесоюзном научно-исследовательском институте генетики и селекции промышленных штаммов микроорганизмов Минмедпрома СССР.

Проводится подписка на всесоюзный научно-теоретический журнал «Проблемы криобиологии». 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. — 1 р. 20 к., на 6 мес. — 2 р. 40 к., на 12 мес. — 4 р. 80 к.

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

Our journal KRIOBIOLOGIYA (CRYOBIOLOGY) published by Naukova Dumka Publ. Co. is renamed to Problemy Kriobiologii (**Problems of Cryobiology**) in 1991. 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 biorhysics; 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 micro-organisms; low temperature techniques and instrumentation e. g. food and pharmaceuticals.

Problemy Kriobiologii will be published 4 times a year.

Наукова думка

ISSN 0233-7673. Проблемы криобиологии, 1991, № 4. 1-56.