

ISSN 0233-7673

КРИОБИОЛОГИЯ

1|90



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

EDITORIAL BOARD

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

EDITORIAL COUNCIL

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

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ОТДЕЛЕНИЕ ФИЗИОЛОГИИ

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ
И ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

КРИОБИОЛОГИЯ

1 1990

ВСЕСОЮЗНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ОСНОВАН В ЯНВАРЕ 1985 ГОДА
ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

КИЕВ НАУКОВА ДУМКА 1990

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

Козлова В. Ф., Юрченко Т. Н. Теория гомеостаза в качестве методологической основы определения характера действия на организм химических и физических факторов	3
Диллер К. Р. Измерение и моделирование осмотического поведения клеток при замораживании	11
Михайлик В. А., Давыдова Е. О., Манк В. В. О ложных тепловых эффектах в сканирующей калориметрии влагосодержащих объектов	17
Бровкович В. М., Ярмыш Н. В. Перекисное окисление липидов при гипотермической защите мембран саркоплазматического ретикулума ишемизированного миокарда	21
Чекурова Н. Р., Кислов А. Н., Вепринцев Б. Н. Действие криопротекторов на электрические характеристики клеточной мембраны эмбрионов мыши	25
Верховская Л. З., Карташов В. Ф., Кощий С. В., Ханина Л. А. Действие алкоксизамещенных глицерина на морфофункциональные свойства перевиваемой культуры клеток	30
Сергеев Б. М., Лоевский М. М., Константинова Н. Р., Сергеев Г. Б., Громченко И. А., Белоус А. М., Кукушкин А. И. Кинетика гидролиза п-нитрофенилацетата в замороженных водных растворах желатины	34
Эмирбеков Э. З., Абдуллаев Р. А. Аминокислотный состав белковых фракций мозга сусликов во время зимней спячки	37

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

Новиков А. Н., Олейчик С. Т., Липина О. В., Черчыш Е. Н. Использование ПЭО-1500 при криоконсервировании эритроцитов в больших объемах	41
Максудов Г. Ю., Панченко В. Г. Опыт криоконсервации спермы журавлей	44

КРИОГЕННОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Боженков Ю. Г., Афанасьев В. А. Перспективные направления в создании криохирургических аппаратов и инструментов	47
---	----

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Белочкина И. В., Малышев А. Б. Спектр негистоновых белков и соотношение РНК и ДНК в хроматине печени крыс после криовоздействия	52
---	----

ХРОНИКА	53
-------------------	----

ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИЙ	54
------------------------------	----

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

This One



3G9Q-8B6-GXOU

CONTENTS

THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

<i>Kozlova V. F., Yurchenko T. N.</i> The homeostasis theory as a methodological basis to determine the effect of chemical and physical factors on organisms	3
<i>Diller K. R.</i> Measurement and modeling of the osmotic behavior of cells during freezing	11
<i>Mikhaylik V. A., Davydova E. O., Mank V. V.</i> On false heat effects in scanning calorimetry of moisture containing objects	17
<i>Brovkovich V. M., Yarmysh N. V.</i> Lipid peroxidation in ischemic myocardium sarcoplasmic reticulum membranes protected by hypothermia	21
<i>Chekurova N. R., Kislov A. N., Veprintsev B. N.</i> The effect of cryoprotectants on electric parameters of mouse embryo cell membranes	25
<i>Verkhovskaya L. Z., Kartashov V. F., Koshchiy S. V., Khanina L. A.</i> The effect of glycerol alcoxy-derivatives on morphological and functional properties of continuous cell culture	30
<i>Sergeyev B. M., Loyevsky M. M., Konstantinova N. R., Sergeyev G. B., Gromchenko I. A., Belous A. M., Kukushkin A. I.</i> The kinetics of <i>p</i> -nitrophenyl acetate hydrolysis in frozen water-gelatin solutions	34
<i>Emirbekov E. Z., Abdullayev R. A.</i> The amino acid composition of ground squirrel brain protein fractions during hibernation	37

CRYOPRESERVATION OF BIOLOGICAL SYSTEMS

<i>Novikov A. N., Oleynik S. Tu., Lipina O. V., Chernysh E. N.</i> Cryopreservation of large volumes of erythrocytes using PEO-1500	41
<i>Maxudov G. Yu., Panchenko V. G.</i> The experience of freezing of crane semen	44

CRYOGENIC EQUIPMENT

<i>Bozhenkov Yu. G., Afanasyev V. A.</i> Perspective approaches in creating cryosurgical equipment	47
--	----

SHORT COMMUNICATIONS

<i>Belochkina I. V., Malyshev A. B.</i> The spectrum of non-histone proteins and the RNA/DNA ratio in rat liver chromatin after cryoapplication	52
---	----

<i>CHRONICLE</i>	53
----------------------------	----

<i>DEFENSE OF THESES</i>	54
------------------------------------	----

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

Сдано в набор 6.10.89. Подп. в печать 18.12.89. БЦ 23489. Формат 70×108^{1/16}. Бум. тип. № 1. Выс. печ. Усл. печ. л. 4,9. Усл. кр.отт. 5,6. Уч. изд. л. 5,43. Тираж 1000 экз. Зак.9-404. Цена 65 к. Отпечатано с матриц Харьковской книжной фабрики им. М. В. Фрунзе в Харьковской типографии № 16. 310003, Харьков 3, ул. Университетская, 16. Зак. 51.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

УДК 616-092.13:612.014.4:57.043

В. Ф. Козлова, Т. Н. Юрченко

ТЕОРИЯ ГОМЕОСТАЗА В КАЧЕСТВЕ МЕТОДОЛОГИЧЕСКОЙ ОСНОВЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХАРАКТЕРА ДЕЙСТВИЯ НА ОРГАНИЗМ ХИМИЧЕСКИХ И ФИЗИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

В работе изложены современные представления о приспособительных процессах организма к физическим и химическим факторам, отражены дискуссионные положения и концепции, касающиеся механизмов адаптации и их структурного обеспечения. Предлагается системный морфофункциональный подход с позиций учения о гомеостазе в качестве надежной методологической платформы при исследовании характера взаимодействия биообъектов с различными факторами внешней среды.

Фундаментальной проблемой криобиологии является раскрытие механизмов криоповреждения и криозащиты биологических систем различных уровней организации.

Наиболее приемлемой методологической основой познания в этом отношении может служить системный подход с позиций учения о гомеостазе, позволяющий определять специфическое и неспецифическое, избирательное и общее в действии физических и химических факторов, а также ответную компенсаторно-приспособительную реакцию организма.

Следует отметить, что идея гомеостаза, выдвинутая более века назад К. Бернаром (1878) и развитая в трудах В. Кеннона [24, 25], разрабатывалась в основном в рамках физиологических аспектов, отражающих «относительное динамическое постоянство внутренней среды (крови, лимфы, тканевой жидкости) и устойчивость основных физиологических функций (кровообращения, дыхания, терморегуляции, обмена веществ и др.) организма» [22].

Указанная устойчивость не означает стабильности процессов, поскольку они постоянно меняются, хотя и в узких рамках физиологических показателей. В связи с этим были предложены термины «гомеокинез», «энантиостаз» [4, 5], однако они не нашли широкого применения. Понятие гомеостаза включает не только динамическое постоянство различных физиологических констант организма, но и процессы адаптации, обеспечивающие единство организма в норме и при изменившихся условиях существования [4, 5]. Тема адаптации — одна из центральных в биологии, но она до конца не разработана. Многочисленные исследования адаптации, проводимые в различных аспектах, наряду с выявленными закономерностями обусловили обилие субъективных представлений, усложняющих понимание сущности, в связи с чем возникла необходимость унификации ее терминологии.

В настоящее время критическому анализу подлежит классическое определение адаптации как процесса приспособления организма или другой биологической системы к изменившимся условиям среды (функционирования), в основе которого лежит выработанная в процессе эволюции совокупность морфофизиологических изменений, направленных на сохранение гомеостаза [22]. По мнению А. И. Воложина и Ю. К. Субботина [2], оно не отражает взаимоотношения организма и среды, не раскрывает механизма самой адаптации, ограничивает процесс приспособления организмов, подчеркивая одну внутреннюю пассивную сторону отношения без учета компенсации. Авторы [2] предлагают следующее определение: «адаптация — это составная часть приспособительных реакций биологической системы на изменение условий среды существования, выражающаяся в том, что система,

реагируя на изменение существенных для нее параметров и факторов среды, перестраивает, изменяет свои структурные связи для сохранения функций, обеспечивающих ее существование как целого в изменившейся среде». Результатом адаптации является сохранение гомеостаза, но такого, при котором структурные связи системы приводятся в соответствие со структурой изменившейся среды для того, чтобы система могла продолжать функционировать, то есть здесь речь уже идет о новом уровне гомеостаза [7, 8, 10].

Следовательно, приспособительные реакции включают как адаптивные, так и компенсаторные ответы на повреждение, «выражающиеся в возмещении нарушенной функции организма за счет деятельности неповрежденных систем отдельных органов или их составных частей» [23], носящие защитный характер.

В литературе [2, 18] рассматривается единство и противоположность адаптации и компенсации, поскольку их механизмы относительны. Процесс адаптации направлен от более глубоких уровней системы к внешним и сопровождается компенсаторными реакциями этих более высоких уровней, направленных на прекращение адаптации. При этом система, компенсируя функцию элемента, изменяет свою структуру и адаптируется сама. Ввиду тесного переплетения этих явлений между собой, в настоящее время общепринято употреблять термин «компенсаторно-приспособительные реакции организма» [17, 18], хотя, возможно, правильнее было бы говорить о приспособительных или адаптационно-компенсаторных процессах. Эти вопросы требуют специального рассмотрения, термины — уточнения.

Адаптация организма к поступлению токсического вещества из окружающей среды выражается в том, что «первоначальная реакция на это вещество полностью и навсегда исчезает, т. е. не может быть обнаружена с помощью современных методов исследований» [22].

Взаимоотношения процессов физиологической адаптации и компенсации скрыто протекающего патологического процесса в организме при действии физических и химических факторов весьма сложны, трудно дифференцируемы, хотя установление границ между ними имеет решающее значение при определении степени их вредности. В токсикологии И. В. Саноцким, И. П. Улановой [12] сделана попытка сформулировать принципы этих различий, основанных на биологических законах сохранения численности вида, единства организма со средой обитания, целостности организма как единой биологической системы. По патогенетическим показателям ими определен порог вредного действия веществ как такая минимальная концентрация (доза), при воздействии которой в организме возникают изменения, выходящие за пределы физиологических приспособительных реакций, или скрытая (компенсированная) патология. Притом пороги острого действия могут приближаться к порогам хронического. Выделяют несколько стадий хронической интоксикации, отражающих процессы приспособления или аккумуляции действия первичных реакций (первичной декомпенсации), адаптации, компенсации, вторичной декомпенсации. Стадии могут чередоваться, изменяться, но в большинстве случаев на низких уровнях действия стадия компенсации патологии наступает в течение 1—2 недель. Этот срок желательно учитывать при определении токсико-фармакологических свойств веществ, а также при действии физических агентов [3, 12].

Нами при изучении характера действия на организм новых криопротекторов, оксиэтилированных производных многоатомных спиртов (ОПМС): этиленгликоля (ПЭО), глицерина (ОЭГ), пентаэритрита (ОЭП), а также отечественного 1,2-пропандиола (1,2-ПД), установлены критерии перехода физиологической регенерации в репаративную структур наиболее чувствительных органов (печени и почек) по усилению ДНК-синтезирующей способности и митотической активности клеток, выходящих за пределы физиологических колебаний, что в комплексе с другими морфофункциональными показателями систем позволило охарактеризовать адаптационные и компен-

саторные процессы и определить пороговые и практически безвредные дозы веществ.

При субхроническом применении близкими к пороговым относятся дозы: для ОПМС 1/10 ЛД-50 в 20 %-ной концентрации и выше, для 1,2-ПД 1/10 ЛД-50 в 5 %-ной или 1/20 ЛД-50 в 10 %-ной концентрации.

Практически безвредными дозами являются: для ОПМС 1/10 ЛД-50 в 15—10 %-ной концентрации и ниже при повторном кратковременном парентеральном введении; 1/20, 1/30 ЛД-50 в 15—10 %-ной концентрации и ниже при многократном продолжительном применении; для 1,2-ПД—1/20 ЛД-50 в 5 %-ной концентрации и ниже при ежедневном продолжительном введении. Отсутствие морфофункциональных сдвигов в жизненно важных органах при введении практически безвредных доз веществ свидетельствует о высокой адаптационной способности организма, особенно к криопротекторам-полимерам. Эти дозы служат исходной точкой для расчета допустимого количества криопротектора при парентеральном введении в организм с размороженными биообъектами, а также для определения объемов клеточных суспензий, применяемых в клинике.

Клиническое применение препаратов возможно лишь при положительном решении Фармакологического комитета МЗ СССР, обоснованием которому служат соответствующие их токсико-фармакологические характеристики, установленные на этапе доклинических испытаний. Они же являются методологической основой использования веществ при разработке способов криоконсервирования клеток, тканей и органов, а также при лечении патологических состояний организма.

Комплексными исследованиями *in vivo* показана низкая токсичность, отсутствие кумулятивных эффектов и широкий спектр фармакологических свойств синтезированных в Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР экзоцеллюлярных криопротекторов ОПМС, представлены также реакции организма при введении летальных и сублетальных доз веществ [6]. Нарушения гомеостаза находятся в прямой зависимости от степени токсического действия препаратов и физических факторов: подпороговая доза соответствует компенсированному гомеостазу, пороговая — субкомпенсированному; при минимальной токсической дозе наблюдаются существенные отклонения отдельных сторон гомеостаза; при минимальной смертельной дозе — у части животных экстремальные сдвиги; смертельная доза влечет общее экстремальное состояние и гибель животных [3, 12].

Гомеостатические механизмы чрезвычайно многообразны и представлены на всех уровнях регуляции от молекулярного до организменного. Биохимические «стратегии» [20] адаптации осуществляются тремя путями:

1. Поддержание структурной целостности макромолекул (ферментов, сократительных белков, нуклеиновых кислот и др.) при их функционировании в специфических условиях.

2. Достаточное снабжение клетки: а) «энергетической валютой» — аденозинтрифосфатом (АТФ), б) восстановительными эквивалентами, необходимыми для протекания процессов биосинтеза, в) предшественниками, используемыми при синтезе запасных веществ (гликогена, жиров и т. п.), нуклеиновых кислот и белков.

3. Поддержание систем, регулирующих скорости и направления метаболических процессов в соответствии с потребностями организма и их изменениями в связи с условиями среды [20].

Таким образом, авторы П. Хочачка и Д. Сомеро рассматривают вопросы приспособления макромолекулярных компонентов клеток или межтканевых жидкостей организма, микросреды, в которой функционируют макромолекулы, и метаболической регуляции — адаптации на функциональном уровне [20]. В методологическом плане в данном случае правильнее было бы говорить о соотношении структуры и функции, исходя из философских категорий материи и движения.

В последние годы с учетом функциональных систем, «такого комплекса

избирательно вовлеченных компонентов, у которых взаимодействия и взаимоотношения принимают характер взаимодействия компонентов на получение фокусированного полезного результата» [1], выделены газовый, кислотно-щелочной, осмотический, калиевый, тепловой, микроциркуляторный и другие гомеостазы, изучены их биохимические, иммунологические, генетические механизмы [4, 10].

К сожалению, на протяжении длительного времени разработка морфологического аспекта гомеостаза значительно отставала от темпа изучения функций, что как бы лишало его материальной основы, ставило неправильные акценты на структурно-функциональных отношениях, признавая первичными функциональные изменения и вторичными морфологические. В теории и практике медицины укоренилось ложное представление о чисто функциональных нарушениях, в то время как они всегда вторичны, и первые клинические признаки болезни обычно не предшествуют структурным изменениям, а следуют за ними, но чем выше компенсаторные возможности организма, тем они меньше проявляются [13, 17, 18]. Мощные приспособительные процессы, направленные на сохранение гомеостаза, часто обеспечивают длительное функциональное благополучие организма и его систем при нарастающих морфологических изменениях тканей. В данном случае значение морфологических исследований трудно переоценить, так как они позволяют установить начальные стадии патологических процессов и констатировать момент их завершения.

Благодаря возросшим научно-техническим возможностям, применению гистохимических, электронно-микроскопических, радиоавтографических и других методов исследования, а также использованию системных методологических подходов, в настоящее время раскрыты структурные основы адаптации и компенсации нарушенных функций организма. Приоритет этих разработок принадлежит советским ученым [13, 14, 17, 18]. Наиболее универсальным принципом структурного обеспечения гомеостаза, действующим на всех уровнях организации, является триада: варьирование числа активно функционирующих структур из числа имеющихся в норме, изменение скорости их обновления и увеличение их числа. Независимо от этиологии и патогенеза заболевания это проявляется на молекулярном уровне в амплификации числа идентичных генов, политенизации хромосом, индукции адаптивных ферментов; на органоидном — в гиперплазии органелл клеток и их субъединиц; на клеточном — в размножении клеток, на тканевом и органном — в пропорциональном увеличении числа компонентов данной ткани или органа [13, 18].

Некоторыми исследователями [19] избыточность и резервирование функционирующих элементов причисляются к ключевым структурным факторам надежности организма и гомеостаза. В. И. Федоров [19] выделяет три фундаментальных свойства избыточности для физиологических систем: обеспечение режима перемежающегося функционирования; сохранение базальной нагрузки на элемент при увеличении функциональной нагрузки на систему в целом за счет увеличения числа активно функционирующих структур; компенсация «отказа» элементов до определенного критического уровня, обеспечивающая непрерывность функционирования систем в условиях экстремальных нагрузок. Однако, несмотря на избыточность структур в системе, т. е. наличия их в большем количестве, чем это необходимо для обеспечения нормальной работы при обычных условиях, принцип их перемежающейся активности реализуется в основном при умеренных нагрузках.

В экстремальных ситуациях, по данным электронно-микроскопической радиоавтографии, происходит полная мобилизация всех ресурсов органа [14, 18].

Основным механизмом материального поддержания гомеостаза как при адаптационных колебаниях, так и при высоких напряжениях, а также в процессе восстановления систем после повреждения является новообразование (гиперплазия) структур на всех уровнях организации.

В настоящее время доказано, что регенерация, как физиологическая, так и репаративная, всегда разворачивается стереотипным комплексом реакций на базе сохранившихся структур. Одним из определяющих моментов полного восстановления элементов является целостность мембранных образований клетки, будь то мембраны митохондрий, системы эндоплазматической сети, ядерные или цитоплазматические мембраны, что объясняет необходимость их защиты или стабилизации в ходе криобиологических воздействий [13, 14, 17, 18].

Новые структуры всегда образуются из аналогичных. Источником клеточного обновления являются стволовые и камбиальные элементы, митотически делящиеся дифференцированные клетки. За счет их происходит восстановление кроветворной ткани, эпидермиса, слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта и др. Такие ткани, с преимущественно клеточной формой регенерации, согласно классификации [13, 29], относятся к постоянно обновляющимся. Для ряда органов (печень, почки, легкие, поджелудочная железа, надпочечники и др.) характерны как клеточная, так и внутриклеточная формы регенерации, в связи с чем их относят к растущим.

Стабильными популяциями считаются ганглиозные клетки центральной нервной системы и кардиомиоциты, в постнатальном онтогенезе первым присуща исключительно, вторым — преимущественно внутриклеточная форма регенерации. Последняя является универсальной, свойственной всем клеткам и тканям. Она включает молекулярную (биохимическую), внутриорганoidную и органoidную регенерации. Благодаря ее расшифровке, коренным образом изменились представления об адаптации систем организма, о вторичном развитии у млекопитающих, подтверждающих не потерю в филогенезе способности к восстановлению тканей после повреждения, а приобретение новых, более экономичных, при адекватных воздействиях, почти неисчерпаемых форм обновления [13, 14, 18, 30].

Нами определена многоуровневая сопряженность деструктивных и репаративных процессов в связи с дозой и режимом введения криопротекторов, обуславливающих развитие компенсаторно-приспособительных реакций организма даже при применении суммарных доз, в десятки раз превышающих ЛД-50. Морфогенез альтераций проявляется в диффузной форме зернистой и гидропической дистрофии клеток преимущественно органов-мишеней (печени, почек), а также в виде апоптоза лимфоцитов герминативных центров селезенки и энтероцитов крипт кишечника.

По данным радиоавтографии, показано преобладание в экстремальных условиях более экономичных внутриклеточных процессов восстановления структур не только растущих органов (печень, почки, поджелудочная железа, надпочечники), но и обновляющихся тканей (слизистая оболочка желудка и кишечника, селезенка). Доказательством этого является увеличение количества ДНК-синтезирующих клеток по сравнению с количеством гибнущих и делящихся.

Обнаружен феномен ускоренного обновления энтероцитов слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки при применении ПЭО и особенно ОЭГ, что представляет научный интерес в проблеме управления регенерацией тканей.

Особое внимание исследователей привлекает проблема репарации ДНК, обуславливающая целостность хромосом и жизнеспособность клеток. Ф. З. Меерсон увеличению синтеза нуклеиновых кислот и белков в клетках придает большое значение в плане формирования так называемого структурного следа фенотипической адаптации организма к данному фактору среды [7, 8].

По интенсивности синтеза ДНК и последующего новообразования клеточных органелл судят о напряженности в тканях регенераторных процессов. Последние носят волнообразный характер, обусловленный как ритмами патогенного воздействия, например при применении низких температур [26] или введении четыреххлористого углерода [13], так и биологическими

ритмами организма с включением периодов эндогенного снижения репарации. При соответствии ритмов повреждение — восстановление можно говорить о высоких приспособительных возможностях организма [13, 18, 26].

Исходя из представлений о структурных основах гомеостаза, следует более дифференцированно подходить к вопросу о грани норма — патология, повреждающий и защитный эффект. По мнению Д. С. Саркисова [18], многие процессы организма, классифицируемые в настоящее время как типовые общепатологические, могут быть отнесены к компенсаторно-приспособительным.

В каждом конкретном случае необходимо обращать внимание на обе стороны явления и их взаимопереходы. Примером может служить классическая стресс-реакция или общий адаптационный синдром по Г. Селье [15]. Г. Селье при патологоанатомическом вскрытии подопытных животных обнаружил триаду неспецифических изменений в виде гипертрофии надпочечников, уменьшения веса лимфоидных органов, кровоизлияний в желудке [15].

В настоящее время механизмы стресса хорошо изучены при различных воздействиях, в том числе при общем охлаждении организма и отравлениях химическими веществами. В зависимости от конкретных условий описаны особенности и многие варианты стресс-реакции, однако, как правило, в основе ее развития лежат три стадии: тревоги, резистентности и истощения [3, 10, 15, 16]. Стадия тревоги начинается сразу после действия повреждающих агентов на организм с напряжения гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы и увеличения продукции катехоламинов и глюкокортикоидов, вызывающих гипергликемию. Последняя осуществляется в основном за счет гликонеогенеза, поэтому в тканях преобладают катаболические процессы, отрицательный азотистый баланс, отмечается потеря веса тела, атрофия лимфоидных органов, кровоизлияния в желудочно-кишечном тракте и т. п.

В связи с усиленным переводом пластического материала в энергетический происходит повышение неспецифической резистентности организма, т.е. максимальная мобилизация функциональной активности, работа на износ.

Если сила действия раздражителя превышает пределы компенсаторных возможностей организма, то его сопротивляемость снижается и может наступить смерть; в противном случае развивается стадия резистентности или адаптации к стрессу. При этом стабилизируется состояние гипертрофии клеток коры надпочечников, отмечается накопление в них липидов, обеспечивающих повышенную секрецию кортикостероидов. В тканях преобладают анаболические процессы, обеспечивающие восстановление структур, положительный баланс азота, повышение специфической сопротивляемости организма. При возвращении его в прежнее функциональное состояние устанавливается характерный метаболизм и уровень глюкокортикоидов, катехоламинов и инсулина.

При длительном чрезмерном действии стрессора истощаются приспособительные реакции организма, развивается стадия истощения с необратимыми изменениями в органах и тканях, с потерей липидов клетками пучковой зоны коры надпочечников и резкой гипогликемией. Происходит снижение как специфической, так и неспецифической резистентности организма и, как правило, гибель животного.

Таким образом, в зависимости от силы и продолжительности действия раздражителя стресс может переходить в дистресс, или в организме, наряду с повреждениями, развивается сложная цепь адаптационно-компенсаторных реакций, направленных на восстановление гомеостаза. Выделяют [8] следующие эффекты стресс-реакции, принимающие участие в формировании адаптации на уровне клеток, тканей и органов:

— мобилизация структурных и энергетических ресурсов организма в виде увеличения концентрации в крови глюкозы, аминокислот, жирных кислот, нуклеотидов;

— передача этих ресурсов из неактивных зон в функциональную систему со структурным следом адаптации;

— липотропный эффект «стрессорных» гормонов, катехоламинов и глюкокортикоидов, направленный на обновление липидного бислоя мембран, коррекцию функции жизненно важных ферментов, рецепторов и каналов ионного транспорта;

— активация аденилатциклазы, кальмодулина, обеспечивающих функцию и энергообеспечение клеток путем гликолиза;

— смена катаболической фазы анаболической, усиление синтеза ДНК и белков, формирующих системный структурный след, обеспечивающий расширение звена, лимитирующего функцию клеток и тем самым увеличивающий физиологическую мощность функциональной системы, ответственной за адаптацию. При повторном воздействии физических и химических агентов структурный след может закрепляться и приводить к становлению гомеостаза на новом уровне [7, 8, 10].

Переход на новый уровень гомеостаза предполагает не только изменение промежуточных величин, но и области допустимых колебаний жизненно важных характеристик гомеостатических систем, в связи с чем к понятию «норма» следует относиться не как к среднему статистическому показателю, а более дифференцированно, с учетом конкретных условий окружающей среды [10]. С другой стороны, создавая определенные условия, можно целенаправленно регулировать протекающие процессы и моделировать заданное состояние организма, например более устойчивое к гипоксии, к охлаждению и т. п. Адаптивная перестройка может осуществляться лишь при адекватных соотношениях воздействие — ответная реакция структур организма.

Используя указанный принцип [9], удалось достичь повышения резистентности почек к охлаждению путем направленной перестройки их метаболизма еще в организме донора, вводя его в состояние гипобии или применяя такие фармакологические среды, как токоферол или диметилсульфоксид.

Нами установлена адаптогенная роль криопротекторов к действию низких температур на биологические системы различных уровней организации, выявлена неспецифическая реакция адаптации организма на используемые в криобиологии полиолы и их оксипроизводные. Отмечено, что под влиянием криопротекторов происходит сложная метаболическая перестройка жизненно важных органов в виде переключения энергетического обмена веществ на анаэробный путь окислительно-восстановительных процессов и активации ДНК-синтезирующей способности клеток, отражающих формирование структурного следа адаптации, что в комплексе с наблюдаемым обезвоживанием тканей, как подтвердили экспериментальные исследования, характеризует перевод организма на новый уровень гомеостаза, более устойчивый к охлаждению [6, 11, 21]. Показано [27, 28] увеличение резистентности животных к различным стрессорным ситуациям при адаптации к холоду — положительное перекрестное влияние.

Таким образом, системный морфофункциональный подход с позиций учения о гомеостазе вооружает исследователей надежной методологической платформой в оценке механизма взаимодействия биообъектов с различными факторами внешней среды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ачохин П. К. Очерки по физиологии функциональных систем. — М.: Медицина, 1975. — 448 с.
2. Воложин А. И., Субботин Ю. К. Адаптация и компенсация — универсальный биологический механизм приспособления. — М.: Медицина, 1987. — 176 с.
3. Голиков С. Н., Саноцкий И. В., Тиунов Л. А. Общие механизмы токсического действия. — Л.: Медицина, 1986. — 280 с.
4. Гомеостаз / Под ред. П. Д. Горизонтова. — М.: Медицина, 1981. — 576 с.
5. Казначеев В. П. Современные аспекты адаптации. — Новосибирск: Наука, 1980. — 191 с.
6. Козлова В. Ф., Шенберг М. Г., Гучок В. М. и др. Неспецифическая реакция адап-

- тации организма на оксипропан-2-ол // Эндокринная система организма и токсические факторы внешней среды: Материалы конф. (Ленинград, 1979). — Л.: Б. и., 1980. — С. 157—164.
7. Меерсон Ф. З. Адаптация, стресс и профилактика. — М.: Наука, 1981. — 276 с.
 8. Меерсон Ф. З., Пшенникова М. Г. Адаптация к стрессорным ситуациям и физическим нагрузкам. — М.: Медицина, 1988. — 256 с.
 9. Очищенко Н. А., Кирпатовский В. И., Данилов М. А. Температурные и медикаментозные средства повышения эффективности защиты от криповреждения // Достижения и перспективы развития криобиологии и криомедицины: Тез. докл. Международ. конф., 10—12 февраля 1988 г. — Харьков, 1988. — С. 76.
 10. Панин Л. Е. Биохимические механизмы стресса. — Новосибирск: Наука, 1983. — 233 с.
 11. Панков Е. Я., Шенберг М. Г., Юрченко Т. Н. и др. Морфологические аспекты адаптации клеток и тканей к действию низких температур за счет неспецифических адаптогенов — криопротекторов // VII Укр. респ. конф. анатомов, гистологов и эмбриологов, посвящается 100-летию со дня рождения академ. В. П. Воробьева. — Харьков: Б. и., 1976. — С. 85.
 12. Саноцкий И. В., Уланова И. П. Критерии вредности в гигиене и токсикологии при оценке опасности химических соединений. — М.: Медицина, 1975. — 328 с.
 13. Саркисов Д. С. Очерки по структурным основам гомеостаза. — М.: Медицина, 1977. — 351 с.
 14. Саркисов Д. С., Пальцын А. А., Втюрин Б. В. Электронно-микроскопическая радиоавтография клетки. — М.: Медицина, 1980. — 264 с.
 15. Селье Г. Очерки об адаптационном синдроме. — М.: Медгиз, 1960. — 254 с.
 16. Селье Г. Стресс без дистресса. — М.: Прогресс, 1982. — 127 с.
 17. Струков А. И., Хмельницкий О. К., Петленко В. П. Морфологический эквивалент функции (Методологические основы). — М.: Медицина, 1983. — 208 с.
 18. Структурные основы адаптации и компенсации нарушенных функций / Под ред. Д. С. Саркисова. — М.: Медицина, 1987. — 448 с.
 19. Федоров В. И. Структурные факторы надежности организма и гомеостаз // Надежность биологических систем. — Киев: Наук. думка, 1987. — С. 155-159.
 20. Хочачка П., Сомеро Дж. Биохимическая адаптация. — М.: Мир, 1988. — 568 с.
 21. Шенберг М. Г., Козлова В. Ф. Адаптационная роль криопротекторов в проблеме холодового анабиоза // Экспериментальный анабиоз: Тез. докл. II Всесоюз. конф. по анабиозу. — Рига: Б. и., 1984. — С. 106—107.
 22. Энциклопедический словарь медицинских терминов. — М.: Медицина, 1982. — Т. 1. — 464 с.
 23. Энциклопедический словарь медицинских терминов. — М.: Медицина, 1983. — Т. 2. — 448 с.
 24. Cannon W. Organization for physiological homeostasis // *Physiol. Rev.* — 1929. — 9, N 2. — P. 399—431.
 25. Cannon W. Homeostasis. The maintenance of steady state in the organism // *Colloid Chemistry. Theoretical and Applied by Selected International Contributors.* — 1944. — 5, N 6. — P. 985—994.
 26. Helpap B. Der kryochirurgische Eingriff und seine Folgen. Morphologische und zellkinetische Analyse. — Stuttgart; New York: Georg Thieme, 1980. — Bd. 40. — 88 S.
 27. Jansky L. Non-shivering thermogenesis and its thermoregulatory significance // *Biol. Rev.* — 1973. — 48, N 1. — P. 85—132.
 28. Kuroshima A., Habara G., Uehara A. et al. Cross adaptation between stress and cold in rats // *Pflüg. Arch.* — 1984. — 402, N 3. — S. 402—408.
 29. Leblond C. P., Messier B., Kopriwa B. Thymidine- H^3 as a tool for the investigation of the renewal of cell populations // *Lab. Invest.* — 1959. — 8, N 1. — P. 296—308.
 30. Reinert J., Ursprung H. Origin and continuity cell organelles. — New York: Pergamon Press, 1971. — 343 p.

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

Поступила 18.04.89

V. F. KOZLOVA, T. N. YURCHENKO

THE HOMEOSTASIS THEORY AS A METHODOLOGICAL BASIS TO DETERMINE THE EFFECT OF CHEMICAL AND PHYSICAL FACTORS ON ORGANISMS

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

Modern ideas about adaptive processes in organisms in response to physical and chemical factors have been presented along with those concerning adaptation mechanisms and their structural peculiarities. A system morphologically-functional approach basing on the homeostasis theory has been proposed for investigations of the interrelations between biological systems and various environmental factors.

ИЗМЕРЕНИЕ И МОДЕЛИРОВАНИЕ ОСМОТИЧЕСКОГО ПОВЕДЕНИЯ КЛЕТОК ПРИ ЗАМОРАЖИВАНИИ

Для количественной оценки осмотических свойств живых клеток при температурах ниже 0°C использованы дополнительные экспериментальные и аналитические методы. Суспензии клеток замораживали и оттаивали под криомикроскопом с программируемой и контролируемой на компьютере скоростью. Происходящие изменения размера и формы отдельных клеток измеряли путем анализа видеоизображений на компьютере. В клетках возникал осмотический стресс в результате формирования внеклеточного льда при постоянной температуре ниже 0°C . Термодинамическая модель процесса замораживания рассматривает данные изменяющегося объема с целью определения проницаемости плазматической мембраны для воды. Эксперименты, проведенные при разных температурах, позволили получить данные, необходимые для определения температурного коэффициента проницаемости. Измерены энергии активации порядка 50—60 кДж/моль для различных типов клеток человека.

Процессы замораживания и оттаивания приводят к осмотическому стрессу в живых клетках вследствие постепенного концентрирования внеклеточных растворенных веществ при снижении температуры системы ниже точки фазового перехода. Реакция на стресс усиливается при замедлении скорости охлаждения вследствие обширной дегидратации и ослабевает при ее увеличении, повышая вероятность внутриклеточной кристаллизации. Любое из этих двух явлений может привести к необратимому повреждению клеток при несоблюдении соответствующих параметров замораживания — оттаивания. Величина порога, отделяющего медленное охлаждение от быстрого, для каждого вида клеток зависит непосредственно от осмотических свойств мембраны, что определяется в первую очередь ее проницаемостью для воды и криопротекторов при субнулевых температурах. Следовательно, возможность количественного прогноза реакции клеток на замораживание для данного температурного режима основана на знании *a priori* проницаемости мембраны и ее температурного коэффициента при низких субнулевых температурах. Таких данных очень мало и их трудно получить.

Разработаны и описаны термодинамические модели, объясняющие осмотическое поведение клеток при замораживании. В 1963 г. Мейзур [21] на основании многочисленных исследований нашел путь математического описания поведения клеток в присутствии внеклеточного льда. Оказалось, что в процессе замораживания трансмембранные потоки в основном представляют собой потоки воды. Поэтому многие термодинамические модели для замораживания клеток ограничиваются описанием движения одного химического вещества, то есть воды [15, 31]. Однако для успешного криоконсервирования живых клеток необходима их модификация до замораживания, которая осуществляется добавлением криопротекторов. В большинстве случаев они представляют собой неэлектролиты, которые проникают через плазматическую мембрану. Таким образом, при добавлении или удалении такого агента одновременно будут идти потоки воды и криопротектора через мембрану. Поскольку эти два потока в общем случае сопряжены, для строгого моделирования этого процесса необходимо использовать аппарат термодинамики необратимых процессов. Для описания дополнительного удаления криопротекторов [16, 27] использованы уравнения Кедем-Качальского [13]. Этот метод применим при описании процесса замораживания [12] и перепада концентраций веществ на плазматической мембране [10], а также потоков растворенного вещества и растворителя [11]. Позднее использовали обобщенный подход, основанный на принципах сетевой термодинамики [24] для моделирования сопряженных мембранных потоков, связанных со всеми этапами процесса криоконсервирования, включая осмотический стресс клеток [23].

Результаты экспериментов по непрерывному измерению объема отдельных клеток при замораживании и оттаивании совместно с дополнительно разработанными термодинамическими моделями использовали для создания метода определения проницаемости мембраны при температурах ниже 0 °C. В данной работе приводятся экспериментальное и аналитическое обоснования этого метода и полученные в качестве примера результаты.

Криомикроскопия представляет собой экспериментальный метод, который успешно используется уже сто лет для изучения реакции живых клеток на стресс, вызванный замораживанием. В первых исследованиях девятнадцатого столетия определены основные явления, от которых зависит возникновение повреждений в клетках в процессе замораживания. Например, четко определялись образование внутриклеточного льда при быстром охлаждении и дегидратация и деформация клеток при медленном замораживании. Многие ученые проводили качественные исследования процесса замораживания и представили их в виде интересных графических изображений.

В течение последних 15—20 лет в криомикроскопии преобладают количественные методы изучения этих процессов [7]. В световой микроскопии используются снабженные компьютером столики для замораживания, которые позволяют влиять на процессы охлаждения и отогрева в широком диапазоне величин этих параметров [4, 30]. Первоочередной задачей теперь является создание точно предопределенной «температурной истории» клеточной суспензии с помощью криосталика. Это позволило бы проводить систематическую оценку влияния специфических температурных параметров на поведение и реакцию клеток в процессе замораживания. Например, можно независимо задавать и контролировать скорость охлаждения [8], переохлаждение [3] и температуру внеклеточной нуклеации льда [28] в пределах одного эксперимента. Это позволит систематически исследовать влияние температурных параметров на криоконсервацию методами криомикроскопии.

В нашей лаборатории клеточные суспензии замораживают по строго определенным температурным режимам в криомикроскопе, оснащем компьютером [22, 29]. Специальный способ используется для получения данных, наиболее важных для анализа проницаемости мембраны. В этих опытах клеточную суспензию переохлаждают до определенной температуры ниже 0 °C, которая поддерживается постоянной на протяжении всего опыта. Нуклеацию внеклеточного льда на столике вызывают струей жидкого азота, которую направляют из пневматического насоса на периферическую область образца за пределами поля зрения. После образования льда считается, что концентрация внеклеточного растворенного вещества определена и известна по данным диаграммы фазового равновесия среды суспендирования. Опыты проводятся при разных дискретных температурах, каждая из которых создает соответствующий потенциал для движения веществ через мембрану в соответствии с фазовой диаграммой. Движущая сила осмотического потока увеличивается при снижении температуры системы из-за повышения концентрации внеклеточного растворенного вещества и соответственно увеличивает сопротивление мембраны потоку. С практической точки зрения, эксперименты должны проводиться в пределах определенным образом подобранного температурного диапазона. С одной стороны, необходимо использовать температуру, достаточно низкую для того, чтобы поддерживать стабильность фазы внеклеточного льда. На другой границе этого температурного диапазона в результате того, что сопротивление транспорту воды достигает порогового значения при более низких температурах, невозможен адекватный выход внеклеточной воды после нуклеации внеклеточного льда, которая приводит к внутриклеточному замораживанию и препятствует дальнейшему транспорту через мембрану.

По этому методу проводились эксперименты на гранулоцитах, моноцитах и кератиноцитах человека с целью измерения проницаемости их мембран для воды при температурах ниже 0 °C и ее температурного коэффи-

циента. Видео- и/или кинозапись изображения клеток осуществлялась в процессе замораживания, и определялись контуры изображений для последующего компьютерного видеоанализа. Произведен расчет на компьютере изменения размера клеток в ответ на осмотический стресс при замораживании, от мануального слежения на мониторе до полностью автоматического анализа границ и формы [1, 2, 9, 14]. Нами установлено, что основной аспект всех этих алгоритмов — необходимость ввода из какого-то источника информации о форме исследуемых клеток и их изображении [5]. Каждый подход имеет свои преимущества и недостатки, поэтому мы в течение ряда лет использовали различные методы, пытаясь установить изменения размера клеток при замораживании и оттаивании.

Не решена до сих пор проблема количественной оценки морфологических параметров клеток в процессе замораживания и оттаивания, которая никогда адекватно не ставилась при определении истинного объема клеток под криомикроскопом. Типичные микроскопические изображения представляют собой в лучшем случае поперечный срез плоскости клетки, который затем можно экстраполировать на трехмерную клетку, чтобы определить наблюдаемый объем. Такие экстраполяции могут быть крайне сомнительными в результате сильного искажения формы, часто наблюдающегося при замораживании. Хотя до сих пор все криомикроскопические методы анализа замораживания клеток основывались на двумерной проекции изображения, тем не менее желательно было определить размер клеток по истинным данным трехмерного изображения. Чтобы приблизиться к решению этой проблемы, мы использовали управляемый компьютером сканирующий механизм в криомикроскопе для получения оптических серий срезов клеток, претерпевающих изменения размера [20]. Фокусирующий механизм микроскопа укреплен на шаговом двигателе, чтобы можно было сдвигать фокальную плоскость с заданным шагом по глубине образца. Сканирование осуществлялось синхронно со скоростью видеосъемки, а информация о фокусирующей плоскости сохранялась на аудиоканале видеоманитофона с помощью акустической связи между компьютером и магнитофоном. Обычно мы получали изображение в 128 плоскостях, которые затем автоматически обрабатывались с помощью компьютера и подвергались трехмерному силовому спектральному фильтрованию для уменьшения нефокусной информации и увеличения резкости отдельных полей зрения в плоскости каждого серийного среза [17, 18]. Однако возможность формирования изображения в оптической системе микроскопа ограничивает его разрешение, которое может быть достигнуто вдоль оси z , снижая таким образом количество достоверной трехмерной информации, получаемой этим методом [19]. Эта проблема обостряется в криомикроскопии при использовании воздушной межфазной оптики, ограничивающей возможности цифровой аппаратуры и, следовательно, снижающей разрешение системы изображения. Таким образом, наибольшие возможности для осуществления трехмерной криомикроскопии предоставляет конфокальная оптика [32], которая позволяет получать изображение от очень мелкого поля и имеет потенциально более высокое пространственное разрешение, чем стандартная оптика.

На рис. 1 представлены данные о замораживании гранулоцитов человека при заданных постоянных температурах в криомикроскопе. По этим данным видно, что с течением времени происходит постепенное уменьшение объема клетки. Хорошо видна осмотическая активность клеток после окружения их внеклеточным льдом.

Аналогичные данные для моноцитов человека, замороженных в присутствии и в отсутствие криопротекторов, представлены на рис. 2 и 3. Клетки, суспендированные в 1 М ДМСО, можно исследовать при более низких температурах, чем клетки, суспендированные только в изотонической солевой среде. Можно получить данные вблизи -20°C , если клетки предварительно обработать криопротектором в концентрации, обеспечивающей их защиту.

На рис. 4 показана типичная реакция кератиноцитов в однотипных экспе-

риментах. Полученные экспериментальные данные проанализированы с помощью термодинамической модели с целью определения проницаемости мембраны для воды в используемом диапазоне температур.

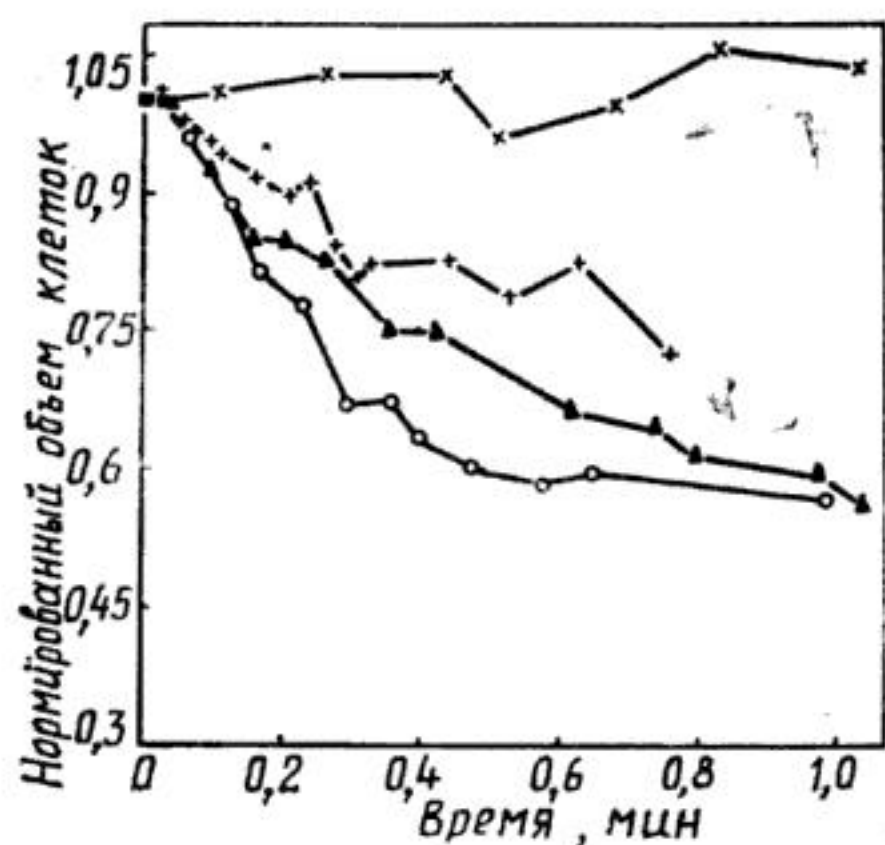


Рис. 1

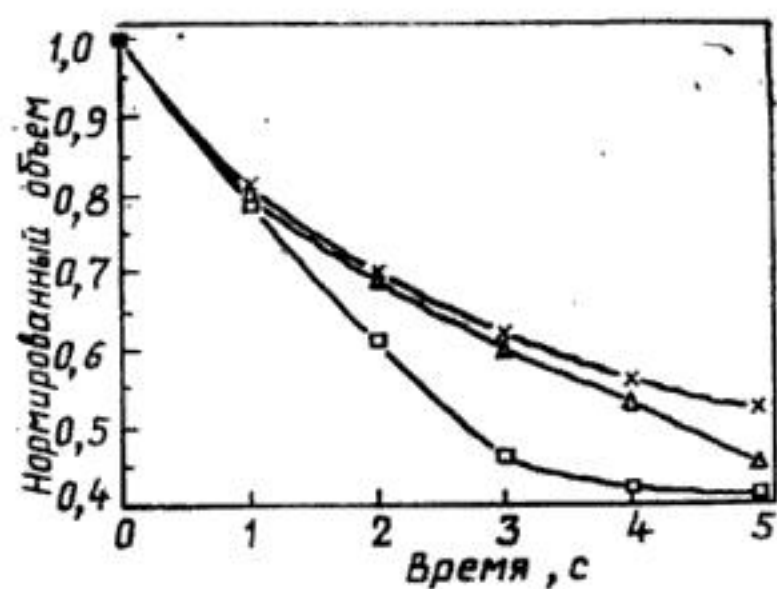


Рис. 2

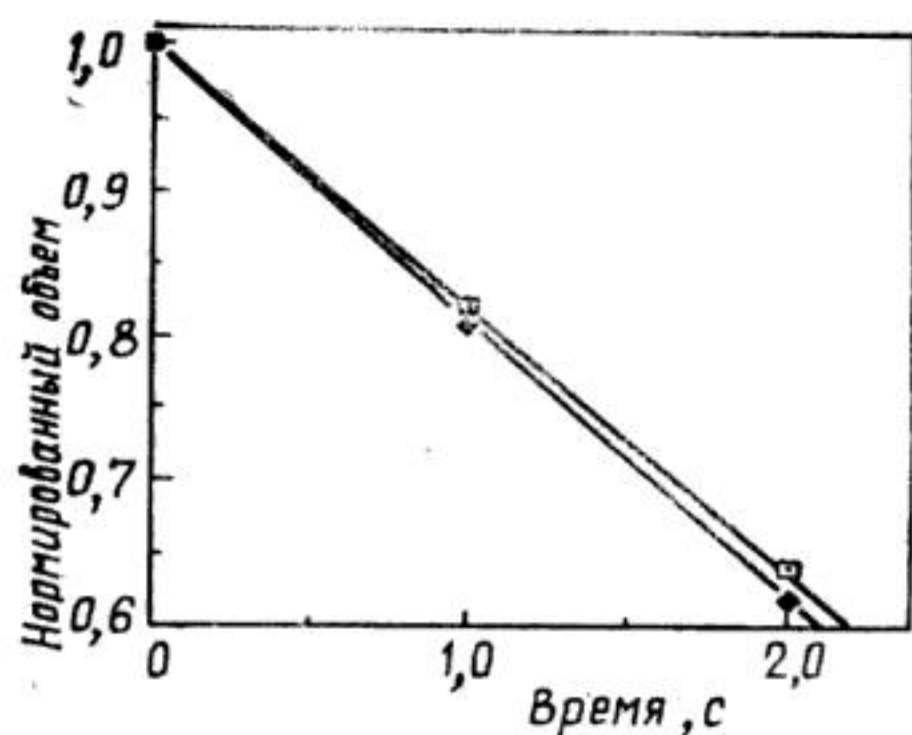


Рис. 3

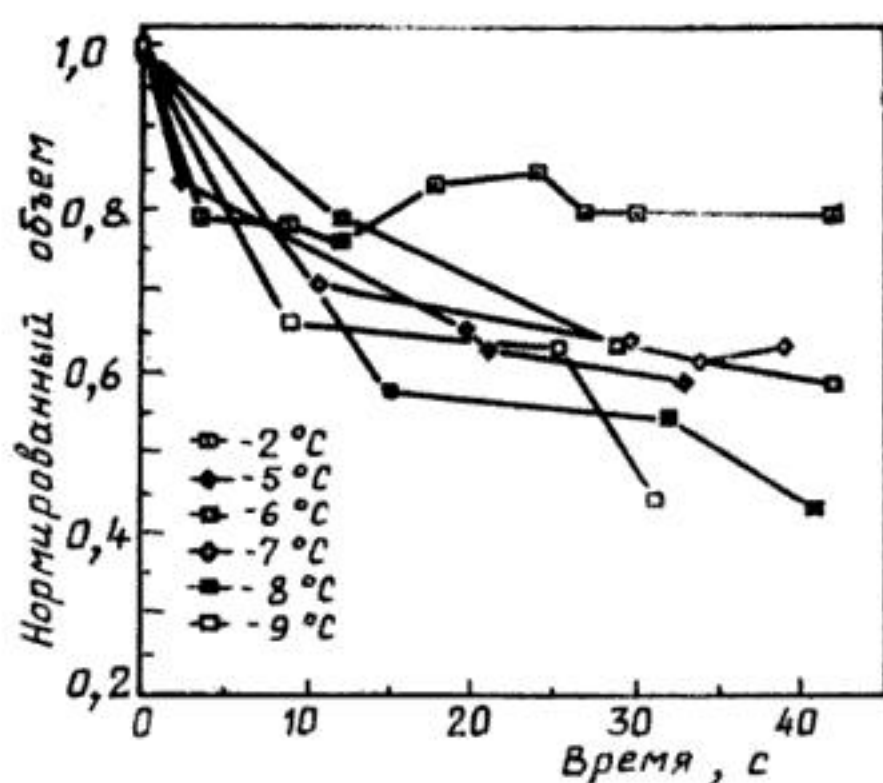


Рис. 4

Рис. 1. Изменение объема гранулоцитов человека, измеренное в криомикроскопе при постоянных температурах от -2 до -13°C при замораживании без криопротектора. Температура нуклеации ($^{\circ}\text{C}$): -2 ($\circ$); -6 ($\blacktriangle$); -10 ($+$); -13 ($\times$)

Рис. 2. Изменение объема моноцитов человека, суспендированных в 1 М ДМСО и замороженных в криомикроскопе при постоянных температурах от -7 до -10°C : -7°C ($\square$); -8°C ($\triangle$); -10°C ($\times$)

Рис. 3. Изменение объема моноцитов человека, измеренное при замораживании без криопротектора в криомикроскопе при -7 и -8°C : -8°C ($\square$); -10°C ($\blacksquare$)

Рис. 4. Изменение объема кератиноцитов человека, измеренное при замораживании без криопротектора в криомикроскопе при постоянных температурах

Модели, основанные на сетевой термодинамике

Транспорт молекул через клеточные мембраны можно моделировать в виде процессов, управляемых соответствующими феноменологическими законами. Из-за нелинейной зависимости мембранного импеданса от температуры и связи скорости изменения объема с натуральным логарифмом абсолютного объема уравнения, управляющие этим процессом, нелинейны и часто создают трудности в процессе получения стабильных числовых решений. Нами применяются методы сетевой термодинамики для упрощения интерпретации управляющих параметров процесса и ускорения решения на легкодоступных микрокомпьютерах с использованием мощных алгоритмов

для решения нелинейных дифференциальных уравнений [6]. Модель, описывающая поведение динамических систем, представляется в виде графа [25, 26]. Такой граф представлен на рис. 5, на котором обозначены потоки воды и проникающих через мембрану добавок. На термодинамической сети показаны эффекты рассеивания, сохранения и соединения многочисленных потоков, одновременно проходящих через мембрану. Граф автоматически ставится в соответствие с дифференциальными уравнениями, управляющими этой системой. Эту модель можно использовать для моделирования осмотической реакции клеток на добавление и удаление криопротекторов, а также осмотического стресса при замораживании и оттаивании либо приспособить для обработки экспериментальных данных с применением параметров оптимизации по определению значений коэффициентов проницаемости мембраны

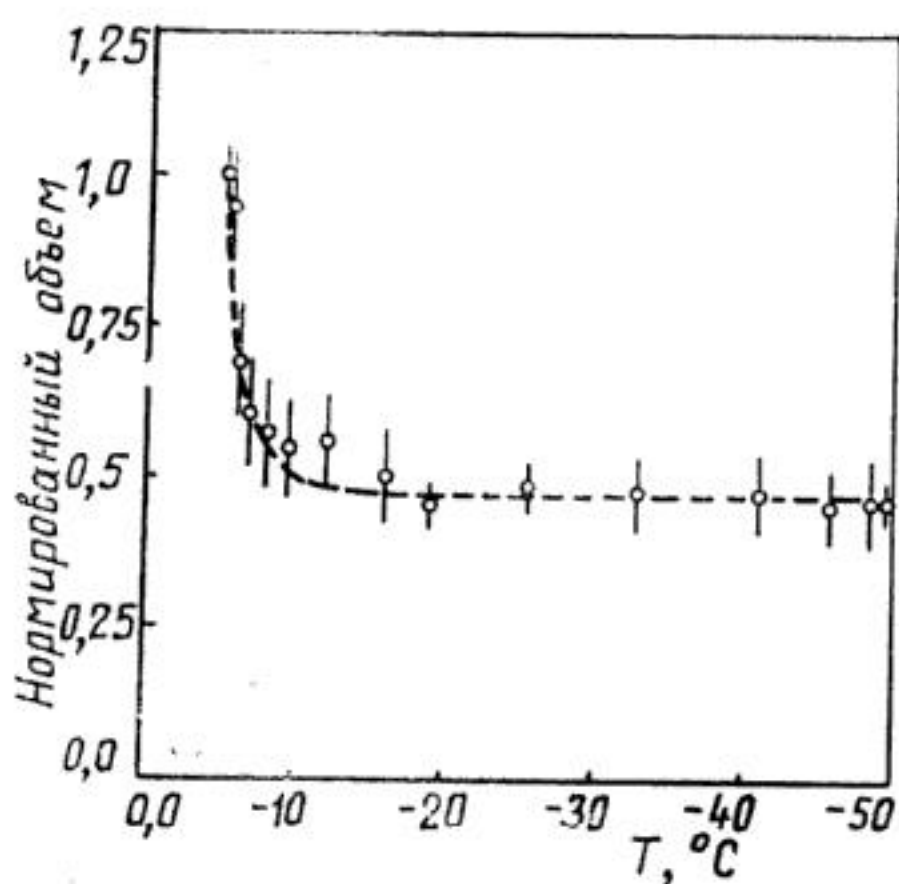
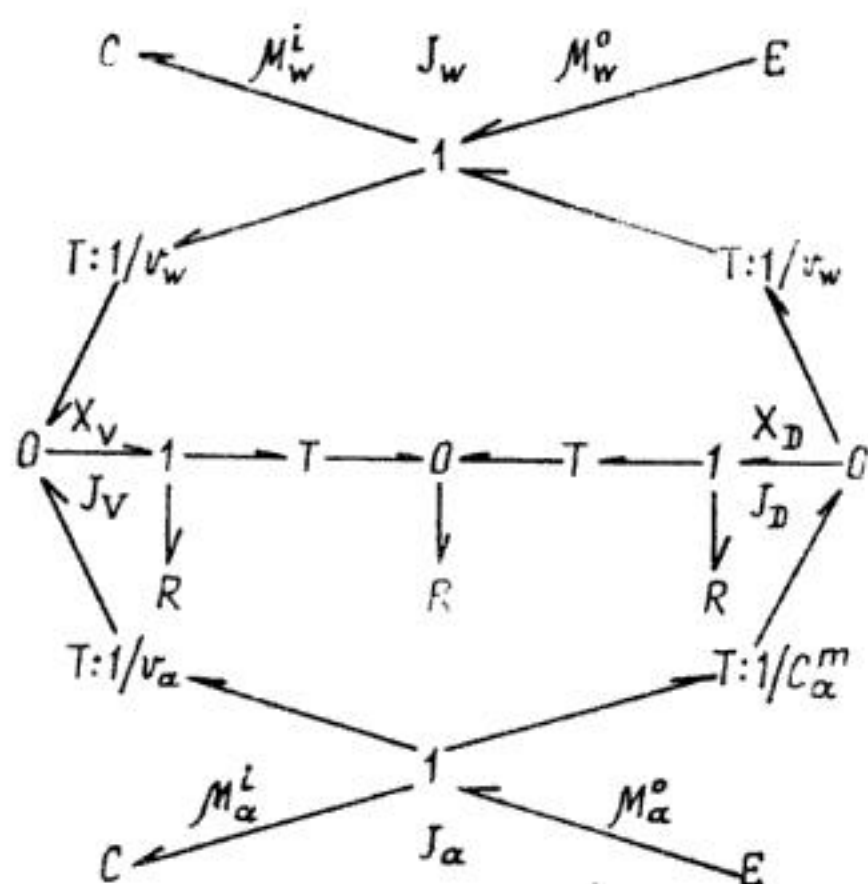


Рис. 5. Модель графа для одновременного транспорта воды и криопротектора в клетке

Рис. 6. Изменение объема гранулоцитов при замораживании с постоянной скоростью 2°С/мин после внеклеточной нуклеации льда при —5°С. Экспериментальные данные и стандартные отклонения обозначены кружками с вертикальной чертой. Модельное описание аналогичного температурного режима представлено пунктирной линией

для воды, L_p , растворенного криопротектора, ω , и коэффициента отражения, σ .

Значения проницаемости, полученные при различных температурах, представлены на графике Аррениуса для определения соответствующего температурного коэффициента, выраженного в терминах энергии активации. Измерены энергии активации порядка 50—60 кДж/моль для изученных клеток. Наблюдается тенденция к значительной вариации данных, в частности, сам экспериментальный метод имеет ограничения в точности и воспроизводимости, с которыми может быть измерен объем клетки, что может привести к разбросу рассчитанных температурных коэффициентов. Тем не менее полученные значения энергии активации не выходят за рамки диапазона, принятого для температур ниже 0 °С.

Значения проницаемости мембраны для воды и ее температурного коэффициента можно использовать для моделирования независимых опытов, в которых клетки замораживаются согласно общепринятым температурным режимам, в которых температура меняется как функция времени. На рис. 6 показана температурная зависимость изменения объема гранулоцитов человека, замороженных со скоростью 2 °С/мин после внеклеточной нуклеации льда при —5 °С. Данные криомикроскопии о проницаемости мембраны, полученные при постоянной температуре в отдельных экспериментах, использовали затем для описания идентичного температурного режима с термодинамической моделью. Результаты моделирования были сопоставлены с экспериментальными данными. Для случая, в котором реакция клеток на

замораживание в основном определяется осмотическими эффектами, установлено хорошее количественное согласование между модельными и экспериментальными данными. Мы стремимся к более точному и многостороннему развитию моделирования и экспериментальных методов, которые могли бы быть использованы для лучшего понимания и описания важных аспектов процесса замораживания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dietz T. E., Davis L. S., Diller K. R., Aggarwal J. K. Computer recognition and analysis of freezing cells in noisy, cluttered images // *Cryobiology*.— 1982.— 19.— P. 539—549.
2. Dietz T. E., Diller K. R., Aggarwal J. K. Automated computer evaluation of time-varying cryomicroscopical images // *Cryobiology*.— 1984.— 21.— P. 200—208.
3. Diller K. R. Intracellular freezing: Effects of supercooling // *Cryobiology*.— 1975.— 12.— P. 480—485.
4. Diller K. R. Quantitative low temperature optical microscopy of biological systems // *J. Microsc.*— 1982.— 126.— P. 9—28.
5. Diller K. R., Aggarwal S. J. Computer automated cell size and shape analysis in cryomicroscopy // *J. Cryomicrosc.*— 1987.— 146.— P. 209—219.
6. Diller K. R., Beaman J. J., Montoya J. P., Breedfeld P. C. Network thermodynamic modeling with bond graphs for membrane transport during cell freezing // *Transact. ASME, J. Heat Transfer*.— 1988.— 110.— P. 938—945.
7. Diller K. R., Cravalho E. G. A cryomicroscope for the study of freezing and thawing process in biological cells // *Cryobiology*.— 1970.— 7.— P. 191—199.
8. Diller K. R., Cravalho E. G., Huggins C. E. Intracellular freezing in biomaterials // *Cryobiology*.— 1972.— 9.— P. 429—440.
9. Diller K. R., Knox J. M. Automated computer analysis of cell size changes during cryomicroscope freezing: A biased trident convolution mask technique // *CRYO-Lett.*— 1983.— 4.— P. 77—92.
10. Diller K. R., Lynch M. E. An irreversible thermodynamic analysis of cell freezing in the presence of membrane permeable additives. II. Transient electrolyte and additive concentrations // *CRYO-Lett.*— 1984.— 5.— P. 117—130.
11. Diller K. R., Lynch M. E. An irreversible thermodynamic analysis of cell freezing in the presence of membrane permeable additives. III. Transient water and additive fluxes // *CRYO-Lett.*— 1984.— 5.— P. 131—144.
12. Diller K. R., Lynch M. E. An irreversible thermodynamic analysis of cell freezing in the presence of membrane permeable additives. I. Numerical model and transient cell volume data // *CRYO-Lett.*— 1983.— 4.— P. 295—308.
13. Kedem O., Katchalsky A. Thermodynamic analysis of the permeability of biological membranes to nonelectrolytes // *Biochem. et biophys. acta*.— 1958.— 27.— P. 229—246.
14. Kim N. H., Wysocki A. B., Bovik A. C., Diller K. R. A microcomputer based vision system for area measurement // *Comp. Med. Biol.*— 1987.— 17.— P. 173—183.
15. Levin R. L., Cravalho E. G., Huggins C. E. Water transport in a cluster of closely packed erythrocytes at subzero temperatures // *Cryobiology*.— 1977.— 14.— P. 549—558.
16. Levin R. L., Miller T. E. An optimum method for the introduction or removal of permeable cryoprotectants: Isolated cells // *Cryobiology*.— 1981.— 14.— P. 32—48.
17. Macías-Garza F., Bovik A. C., Diller K. R. The missing cone of frequencies and low pass distortion in 3-D microscopic images // *Optic Eng.*— 1988.— 27.— P. 461—465.
18. Macías-Garza F., Bovik A. C., Diller K. R., Aggarwal J. K. Digital reconstruction of three-dimensional serially sectioned optical images // *IEEE Transact. Acoust., Speech and Signal Processing*.— 1988.— 36.— P. 1067—1075.
19. Macías-Garza F., Diller K. R., Bovik A. C., Aggarwal S. J. Analysis and limitations of automated 3-D Microscopy // *Comp. Med. Biol.*, 1988.
20. Macías-Garza F., Diller K. R., Bovik A. C. et al. Improvement in the resolution of three-dimensional data sets collected using optical serial sectioning // *J. Microsc.*— 1989.— 133.— P. 205—221.
21. Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing // *J. Gen. Physiol.*— 1963.— 47.— P. 347—369.
22. McCaa C., Diller K. R. A new convection cryostage design based on simplified fabrication procedures // *CRYO-Lett.*— 1987.— 8.— P. 168—175.
23. Montoya J. P., Diller K. R., Beaman J. J., Breedfeld P. C. A network thermodynamic model for coupled membrane transport: Application to cell cryopreservation // *Proc. of the 1987 ASME - JSM Therm. Eng. Joint. Conf.*— New York : ASME, 1987.— Vol. 3.— P. 357—542.
24. Oster G. F., Perelson A. S., Katchalsky A. Network thermodynamics: Dynamic modeling of biophysical systems // *Quart. Rev. Biophys.*— 1973.— 6.— P. 1—134.

25. *Paynter H. M.* Analysis and Design of Engineering Systems.— Cambridge: MIT Press, 1961.
26. *Rosenberg R. C., Karnopp D. C.* Introduction to Physical System Dynamics.— New York: McGraw-Hill Book Co., 1983.
27. *Rubinsky B., Cravalho E. G.* An analytical model for the prediction of the local concentration of cryophyllactic agents in perfused organs // *Cryobiology*.— 1979.— 16.— P. 362—371.
28. *Schwartz G. J., Diller K. R.* Analysis of the water permeability of human granulocytes in the presence of extracellular ice // *Trans. ASME, J. Biomech. Eng.*— 1983.— 105.— P. 360—366.
29. *Schwartz G. J., Diller K. R.* Design and fabrication of a simple, versatile cryomicroscopy stage // *Cryobiology*.— 1982.— 19.— P. 529—538.
30. *Shah S. J., Diller K. R., Aggarwal S. J.* A personal computer based temperature control system for cryomicroscopy // *Cryobiology*.— 1987.— 24.— P. 163—168.
31. *Silvares O. M., Cravalho E. G., Toscano W. M., Huggins C. E.* The thermodynamics of water transport for biological cells during freezing // *Trans. ASME, J. Heat Transfer*.— 1975.— 98.— P. 582—588.
32. *Wilson T., Sheppard C.* Theory and Practice of Scanning Optical Microscopy.— London: Acad. Press., 1984.

Перевод с англ. З. В. Линевиц
Поступила 21.03.88

Техасский ун-т, г. Остин, США

K. R. DILLER

MEASUREMENT AND MODELING OF THE OSMOTIC BEHAVIOR OF CELLS DURING FREEZING

University of Texas, Austin, TX 78712 USA

Complementary experimental and analytical methods have been applied to quantify the osmotic properties of living cells at subzero temperatures. Suspensions of subject cells are frozen and thawed at computer programmed and controlled rates on a cryomicroscope. Size and shape changes produced in the individual cells are measured by computer vision analysis methods. Defined osmotic stress is produced in the cells by exposure to extracellular ice at a constant subzero temperature. A network thermodynamic model for the freezing process is fit to the transient volume data to determine an apparent permeability of the plasma membrane to water. Experiments at different temperature provide data requisite to determine the temperature coefficient of permeability. Activation energies in the order of 50—60 kJ/mol have been measured for a number of human cell types.

УДК 536.62.088.6

В. А. Михайлик, Е. О. Давыдова, В. В. Манк

О ЛОЖНЫХ ТЕПЛОВЫХ ЭФФЕКТАХ В СКАНИРУЮЩЕЙ КАЛОРИМЕТРИИ ВЛАГОСОДЕРЖАЩИХ ОБЪЕКТОВ

Раскрыты причины появления ложных тепловых эффектов в низкотемпературной сканирующей калориметрии влагосодержащих объектов. Даны рекомендации по их выявлению, предотвращению или уменьшению.

Сканирующая калориметрия постепенно становится в ряд методов повседневной практики исследователей в области физики, химии и биологии [4—7]. К сожалению, не всегда интерпретация полученных данных проста и безупречна. Наиболее часто со всякого рода трудностями расшифровки полученной информации сталкиваются при изучении свойств и состояния воды в различных объектах при температурах ниже 273 К [1—3]. При этом нередко артефакты, связанные с несовершенством приборов и методик исследования [8], приписываются свойствам изучаемого объекта [9].

Одним из наиболее важных требований в низкотемпературной сканирующей калориметрии является соответствие температуры исследуемого образца задаваемому значению и максимальное обеспечение ее однородности.

В образце при его нагреве или охлаждении возникает температурный градиент, величина которого зависит от многих факторов [7]. При правильно

организованном теплообмене тепловое равновесие внутри калориметрических камер устанавливается практически мгновенно [5]. В противном случае несбалансированный теплообмен между внешней поверхностью калориметрических камер и окружающей средой приводит к резкой неоднородности теплового поля внутри контейнера с образцом, появлению градиента температуры, не исчезающего даже в изотермическом режиме работы.

Обычно для градуировки сканирующих калориметров используют хорошо очищенную, закрытую в герметичный контейнер воду, которая, находясь в кристаллическом состоянии, при нагревании дает классическую кривую плавления [2]. Однако нередко в процессе градуировки получают кривые плавления с некоторым искажением формы (рис. 1, кривая 1). Если же контейнер с водой, дающей искажение кривой плавления, далее подвергнуть многократному охлаждению и нагреву, то с каждым последующим нагревом будем наблюдать кривую плавления воды, все

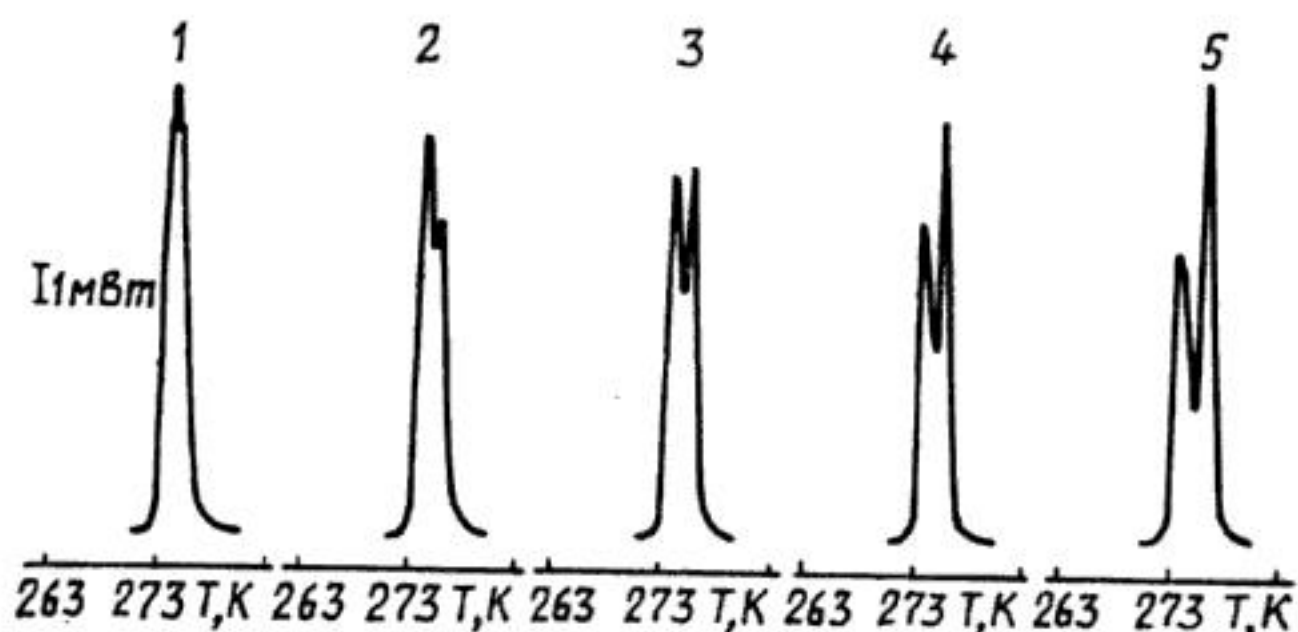


Рис. 1. ДСК: кривые плавления 1,23 мг воды при нагревании со скоростью $4 \text{ K} \cdot \text{мин}^{-1}$ в первом (1), третьем (2), пятом (3), седьмом (4) и девятом (5) циклах «охлаждение — нагрев»

более отличающуюся от классической (рис. 1, кривые 2—5). Как видно, первоначальное незначительное искажение термограммы плавления в последующих циклах превращается в явное раздвоение пика теплопоглощения.

Причина такого аномального поведения воды заключается в следующем. При комнатной температуре в замкнутом объеме контейнера ($0,05 \text{ см}^3$) устанавливается давление насыщенных паров. Охлаждение контейнера в калориметре вызывает конденсацию водяного пара как на поверхности жидкой фазы, так и на внутренней поверхности контейнера. Можно показать, что искажение термограммы плавления в первом цикле «охлаждение — нагрев» вызывается тепловым эффектом плавления воды, образующейся из пара и локализованной на отдельной поверхности ($1 \cdot 10^{-6} \text{ г}$). Интенсивное перераспределение площадей пиков и смещение второго максимума в область положительных температур при многократном повторении циклов указывает на существование мощного перетока воды и разрыва единства жидкой фазы в контейнере даже при незначительном (6 K) перегреве выше 273 K (рис. 1).

Подтверждением могут быть опыты, в которых после записи термограмм плавления срезалась крышка контейнера. В тех случаях, когда наблюдалось искажение картины плавления воды, всегда обнаруживали ее на внутренней поверхности крышки контейнера в виде мелких капель.

Переток воды с доньшка на крышку контейнера может происходить при наличии только одной движущей силы: разницы парциальных давлений паров у соответствующих поверхностей, что в свою очередь может быть только следствием отличия их температур. А это значит, что в данном случае по высоте калориметрической камеры существует градиент температуры, величину которого с определенным приближением можно оценить по расстоянию между максимумами пиков плавления, представленных на рис. 1.

Аналогичные эффекты встречаются при исследовании фазовых переходов в биологических объектах растительного происхождения при низких

температурах с помощью дифференциального сканирующего калориметра ДСМ-2М. Покажем это на следующем примере.

Согласно отработанной методике, тонкий срез растительной ткани герметически запечатывали в алюминиевый контейнер и помещали в измерительную камеру. После сушки калориметрического блока газообразным гелием и установки задатчика температуры в положение 173 К термостат калориметра заполняли жидким азотом. Так осуществлялось первое неконтролируемое охлаждение (средняя скорость $33 \text{ К} \cdot \text{мин}^{-1}$). Выдержав образец в течение 5 мин при 173 К, его нагревали со скоростью $4 \text{ К} \cdot \text{мин}^{-1}$. В повторных циклах скорость охлаждения составляла $64 \text{ К} \cdot \text{мин}^{-1}$.

На кривых нагревания образца 4 (таблица) паренхимной ткани сахарной свеклы видны два пика теплотогощения (рис. 2). При 273 К явно выделяется пик свободной воды. Амплитуда и соотношение между площадями пиков зависят от многих факторов и методических приемов. Оказалось, что для водонасыщенных образцов растительной ткани, закрытых в герметичные контейнеры, как и для чистой воды, при многократном охлаждении и нагреве наблюдается перераспределение тепловых эффектов плавления.

В качестве доказательства перетока воды с образца на крышку контейнера могут быть результаты опытов, в которых переток оценен количественно. Для этого было проведено сравнение массы воды на крышке контейнера, полученной взвешиванием ее после опыта с рассчитанной по тепловому эффекту плавления (таблица). Небольшое отличие в абсолютных величинах связано с потерей воды за счет испарения в процессе срезания крышки, ее переноса и взвешивания. В этих опытах контейнер из калориметра извлекался при 273 К.

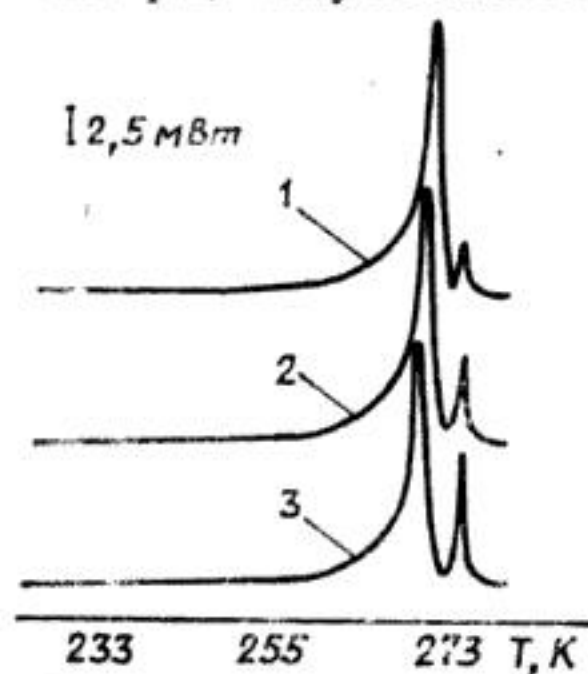


Рис. 2. ДСК: кривые нагревания 7,50 мг паренхимной ткани сахарной свеклы со скоростью $4 \text{ К} \cdot \text{мин}^{-1}$ в первом (1), втором (2) и третьем (3) циклах «охлаждение — нагрев»

и температурной шкалы при градуировке калориметра. Маскируясь под «свободную» воду образца, он может приводить к ошибочной интерпретации полученной информации. Но наиболее существенное влияние переток жидкой фазы оказывает на состояние исследуемого объекта, свойства которого меняются в связи с потерей части влаги.

В качестве мер борьбы с указанным явлением могут быть рекомендованы следующие методические приемы. Прежде всего необходимо позабо-

Результаты опытов по изучению перетока воды с образцов паренхимной ткани сахарной свеклы на внутреннюю поверхность крышки герметического контейнера

№ п/п	Масса образца, мг	Масса воды в образце, мг	Масса воды на крышке контейнера, мг			
			Взвешенная после последнего нагрева	Рассчитанная по теплоте плавления		
				Циклы «охлаждение — нагрев»		
				Первый	Второй	Третий
1	7,26	5,19	0,10	0,11	—	—
2	13,76	9,67	0,16	0,20	—	—
3	7,30	5,27	0,17	0,12	0,26	—
4	7,50	5,52	0,33	0,14	0,30	0,48
5	7,20	4,81	0,03	0,07	—	—
6	8,01	5,49	0,27	0,06	0,20	0,30

и нагреве наблюдается перераспределение тепловых эффектов плавления.

Если контейнер с образцом свеклы после первого охлаждения и нагрева выдержать в изотермическом режиме при 293 К в течение 5 мин, то количество воды на крышке контейнера увеличивается в 8—9 раз.

Как показали проведенные нами исследования, интенсивность перетока зависит от температуры в калориметрической камере, а количество воды на крышке контейнера — от времени выдержки образца при данной температуре, его влажности и геометрических размеров. Наблюдаемый переток жидкой фазы приводит к ошибкам в определении калибровочного коэффициента

таться о хорошем тепловом контакте контейнера с калориметрической камерой [5] и при подготовке эксперимента остерегаться перегрева образца в калориметре выше 273 К. Для уменьшения интенсивности перетока следует закрывать калориметрические камеры специальными крышками из комплекта к прибору. Результаты такого приема видны на примере опытов 5 и 6 в таблице. Переток можно предотвратить полностью, обеспечив условия неразрывности жидкой фазы в контейнере. Например, это реализуется при работе с растворами, когда имеется возможность использовать объемы жидкости, смачивающие поверхности крышки и доньшка контейнера одновременно. В тех случаях, когда нет необходимости в глубоком охлаждении объекта исследования, температурный градиент по высоте камеры можно уменьшить путем замены жидкого азота другим хладагентом с более высокой температурой.

В известной степени изложенные факты накладывают некоторые ограничения в применении калориметров данной конструкции для исследования водосодержащих образцов. В каждом конкретном случае требуется всесторонний критический анализ не только возможностей прибора, но и самой методики исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Вода в пищевых продуктах* / Под ред. Р. Д. Дакуорта. — М.: 1980. — 376 с.
2. *Вода в полимерах* / Под ред. С. Роуланда. — М.: Мир, 1984. — 555 с.
3. *Вода и водные растворы при температурах ниже 0 °C* / Под ред. Ф. Франкса. — Киев: Наук. думка, 1985. — 387 с.
4. Котельников Г. В., Сидорович А. В. Микрокалориметр ДСМ-2М при исследовании полимеров // *Высокомолекулярные соединения*. — 1983. — А25, № 12. — С. 2622—2626.
5. Мревлишвили Г. М. Низкотемпературная калориметрия макромолекул // *Новые физические методы в биологических исследованиях*. — М.: Наука, 1987. — С. 180—204.
6. Топор Н. Д., Огородова Л. П., Мельчакова Л. В. Термический анализ минералов и неорганических соединений. — М.: Изд-во МГУ, 1987. — 190 с.
7. Уэндландт У. Термические методы анализа // Под ред. В. А. Степанова и В. А. Берштейна. — М.: Мир, 1978. — 526 с.
8. Franks F., Mathias S. F., Parsonage P., Tang T. B. Differential scanning calorimetric study on ice nucleation in water and in aqueous solutions of hydroxyethyl starch // *Thermochim. Acta*. — 1983. — 61, № 2. — P. 195—202.
9. Pedley D., Tighe B. Water binding properties of hydrogel polymers for reverse osmosis and related applications // *Brit. Polymer J.* — 1979. — 11, N 3. — P. 130—136.

Ин-т технической теплофизики АН УССР,
г. Киев

Поступила 17.12.87

V. A. MIKHAYLIK, E. O. DAVYDOVA, V. V. MANK

ON FALSE HEAT EFFECTS IN SCANNING CALORIMETRY OF MOISTURE CONTAINING OBJECTS

Institute of Physics of Heat of the UkrSSR Academy of Sciences, Kiev

The nature of false heat effects in scanning calorimetry of moisture containing objects is disclosed. The recommendations for their identification, prevention or decreasing are given.

В. М. Бровкович, Н. В. Ярмыш

ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ ПРИ ГИПОТЕРМИЧЕСКОЙ ЗАЩИТЕ МЕМБРАН САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА ИШЕМИЗИРОВАННОГО МИОКАРДА

Изучены Ca^{2+} -транспортирующая активность саркоплазматического ретикулума, аккумуляция ТБК-активных продуктов в мембранах при гипотермической защите ишемизированного миокарда и *in vitro* при различных температурах для того, чтобы оценить роль перекисного окисления липидов в повреждении мембранной функции при нормо- и гипотермической ишемии. Показано, что Fe^{3+} -аскорбат-индуцированное липоперекисное окисление зависит от температуры среды, в то время как содержание эндогенных ТБК-активных продуктов в СР, полученном из сердец, ишемизированных при различных температурах, сходно. С другой стороны, перекисная резистентность мембран саркоплазматического ретикулума увеличивается с уменьшением температуры ишемии. Сделано заключение о том, что уменьшение Ca^{2+} -транспортирующей функции ретикулума, вызванное неглубокой гипотермической ишемией, по сравнению с нормотермической ишемией, обусловлено не изменением активности перекисного окисления липидов, а какими-то другими патогенетическими процессами.

Ишемия приводит к быстрому снижению сократимости сердца, что может быть вызвано нарушением мембранных механизмов, контролирующей насосную функцию. Ранее показано [2] снижение при ишемии миокарда Ca^{2+} -транспортирующей активности саркоплазматического ретикулума (СР), который является основной внутриклеточной структурой, обеспечивающей поддержание низкого уровня Ca^{2+} в миоплазме, следовательно, и осуществление цикла сокращения — расслабления сердца. Поэтому исследование состояния мембран СР при протекции миокарда имеет важное значение.

В настоящее время одним из основных методов защиты ишемизированного сердца является охлаждение органа. Создание гипотермических условий замедляет распад макроэргических соединений, задерживает время развития ишемической контрактуры [6]. Кроме того, гипотермия может влиять на степень повреждения мембран ишемизированного сердца. Обнаружено, например, что часовая гипотермическая ишемия приводит к 2-кратному снижению скорости поглощения Ca^{2+} СР [5], в отличие от часовой нормотермической ишемии, которая сопровождается 3—4-кратным уменьшением Ca^{2+} -транспортирующей активности [4]. Более того, в работе [5] показано, что степень защитного эффекта гипотермии зависит от ее глубины, так как СР, выделенный из сердец после 60 мин ишемии в условиях гипотермии при 13°C , обладал большей Ca^{2+} -транспортирующей активностью, чем СР из сердец, подвергнутых менее продолжительной (30 мин) ишемии при более высокой (19°C) температуре.

Скорость поглощения Ca^{2+} в везикулы СР определяется активностью фермента Ca^{2+} -АТФазы, а также наличием непроницаемой для Ca^{2+} бислоидной липидной мембраны, поэтому снижение скорости поглощения Ca^{2+} может определяться увеличением проницаемости мембраны. Одним из основных мембраноповреждающих процессов, активирующихся в условиях ишемии, является перекисное окисление липидов (ПОЛ). Недавно было показано, что неидентифицированные липоперекисные продукты, образующиеся при индукции ПОЛ, увеличивают проницаемость мембран для Ca^{2+} [8], и это может приводить к снижению Ca^{2+} -насосной функции СР. В подтверждение приведенным выше экспериментам *in vitro* обнаружено, что снижение Ca^{2+} -транспортирующей активности СР при нормотермической ишемии миокарда коррелирует с увеличением аскорбат-индуцируемой липоперекисной хемилюминесценции мембран, что также свидетельствует об участии ПОЛ в нарушении Ca^{2+} -транспортирующей функции СР [1].

Таким образом, на основании данных литературы можно предположить, что гипотермия приводит к изменению скорости протекания мембраноповреждающих процессов, активирующихся при ишемии (возможно, ПОЛ). В данной работе были изучены Ca^{2+} -транспортирующая активность СР, накопление перекисных продуктов, а также перекисная резистентность мембран при гипотермической защите ишемизированного миокарда и *in vitro* при различных температурах для того, чтобы оценить роль ПОЛ в повреждении функции мембран СР при нормо- и гипотермической ишемии.

Крыс линии Вистар умерщвляли цервикальным смещением. Миокард быстро извлекали и инкубировали 1 ч в 0,9 % NaCl при различных температурах. Затем сердца гомогенизировали в среде, содержащей 100 мМ KCl, 5 мМ азид натрия, 40 мМ трис-HCl, pH 7,4. Гомогенат использовали для

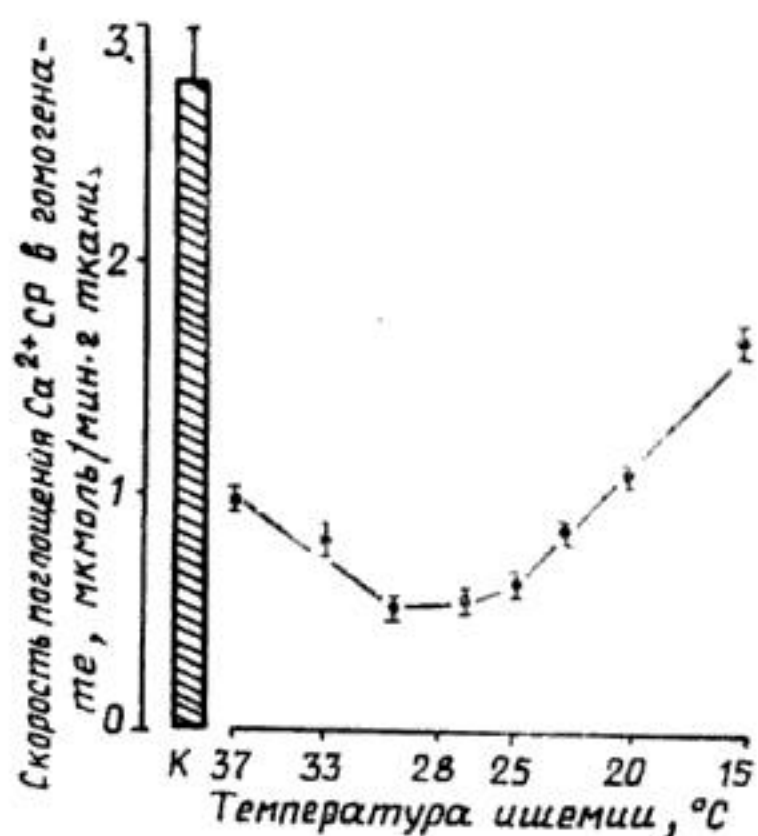


Рис. 1. Зависимость скорости поглощения Ca^{2+} саркоплазматическим ретикулом от температуры ишемии сердца крыс. Ишемия в течение 1 ч в 0,9 % NaCl; К — контроль; $n = 4$

измерения Ca^{2+} -транспортирующей активности СР либо для выделения изолированной фракции ретикулума. Мембраны СР получали дифференциальным центрифугированием и суспендировали в среде, содержащей 100 мМ KCl, 5 мМ азид натрия, 20 % сахарозы, 20 мМ трис-HCl, pH 7,0. Измерение скорости поглощения Ca^{2+} проводили с помощью Ca^{2+} -селективного электрода 9320 фирмы «Orion Research». Реакционная среда содержала 100 мМ KCl, 6 мМ MgCl_2 , 5 мМ азид натрия, 5 мМ АТФ, 25 мкМ CaCl_2 , 15 мМ оксалат калия, 25 мМ имидазол, pH 7,0 при 37°C. Содержание ТБК-активных продуктов определяли по методу [10]. Перекисную резистентность мембран оценивали по накоплению ТБК-активных продуктов при инкубации мембран с прооксидантной системой Fe^{3+} -аскорбат (5 и 50 мкМ соответственно) в течение 15 мин при 37°C.

Присутствие азид натрия и оксалата калия в среде измерения скорости транспорта Ca^{2+} определяет поглощение Ca^{2+} исключительно везикулами СР. На рис. 1 показано, что часовая нормотермическая тотальная ишемия сердца приводит к 3-кратному снижению скорости поглощения Ca^{2+} СР в гомогенате, что согласуется с данными других авторов [4]. При снижении температуры ишемии сердца до 30°C Ca^{2+} -транспортирующая активность СР уменьшается по сравнению с нормотермической ишемией. Нельзя исключить, однако, что в сердце и неглубокая гипотермия приводит к большей сохранности функции СР по сравнению с нормотермией при ишемии, поскольку в наших опытах в условиях *in vitro* Ca^{2+} -транспортирующая активность СР в гомогенате измерялась при 37°C. В сердце при различной температуре ишемии может существовать определенная взаимосвязь между активностью Ca^{2+} -АТФазы и пассивной проницаемостью везикул СР для ионов кальция, которая зависит от структурно-функционального состояния липидного бислоя мембраны при данной температуре. Прямая корреляция между величиной Ca^{2+} -транспортирующей активности СР и глубиной гипотермии наблюдается при температурах ниже 25°C. Необходимо отметить, что уже при температуре ишемии 20°C скорость поглощения Ca^{2+} СР в гомогенате достоверно выше, чем при нормотермической ишемии, а при 15°C превышает последнюю в 1,7 раза (рис. 1). Прогрессирующее увеличение степени защиты Ca^{2+} -аккумулирующей активности СР при температурах ишемии меньших, чем 25°C, объясняет показанную ранее другими авторами большую Ca^{2+} -транспортирующую активность СР из сердец после 60 мин ишемии при 13°C по сравнению с активностью СР из сердец, ишемизированных 30 мин при 19°C [5].

Нелинейный характер влияния температуры ишемии на степень сохранности Ca^{2+} -поглощающей способности обусловлен, вероятно, ее регуляторным влиянием на патогенетические мембраноповреждающие процессы, активирующиеся при ишемии. Одним из таких процессов может являться ПОЛ. Нами показано, что скорость накопления ТБК-активных продуктов при Fe^{3+} -аскорбат-индуцированном ПОЛ зависит от температуры среды реакции (рис. 2). Сходные результаты получены ранее другими авторами [9]. Причем они обнаружили также, что накопление МДА сопровождается снижением Ca^{2+} -транспортирующей активности СР. Как видно из рис. 2, изменение температуры с 37°C до 10°C вызывает уменьшение скорости накопления перекисных продуктов более чем в 2,5 раза. Интересно отметить, что при температурах выше $15 \div 20^\circ\text{C}$ происходит значительное увеличе-

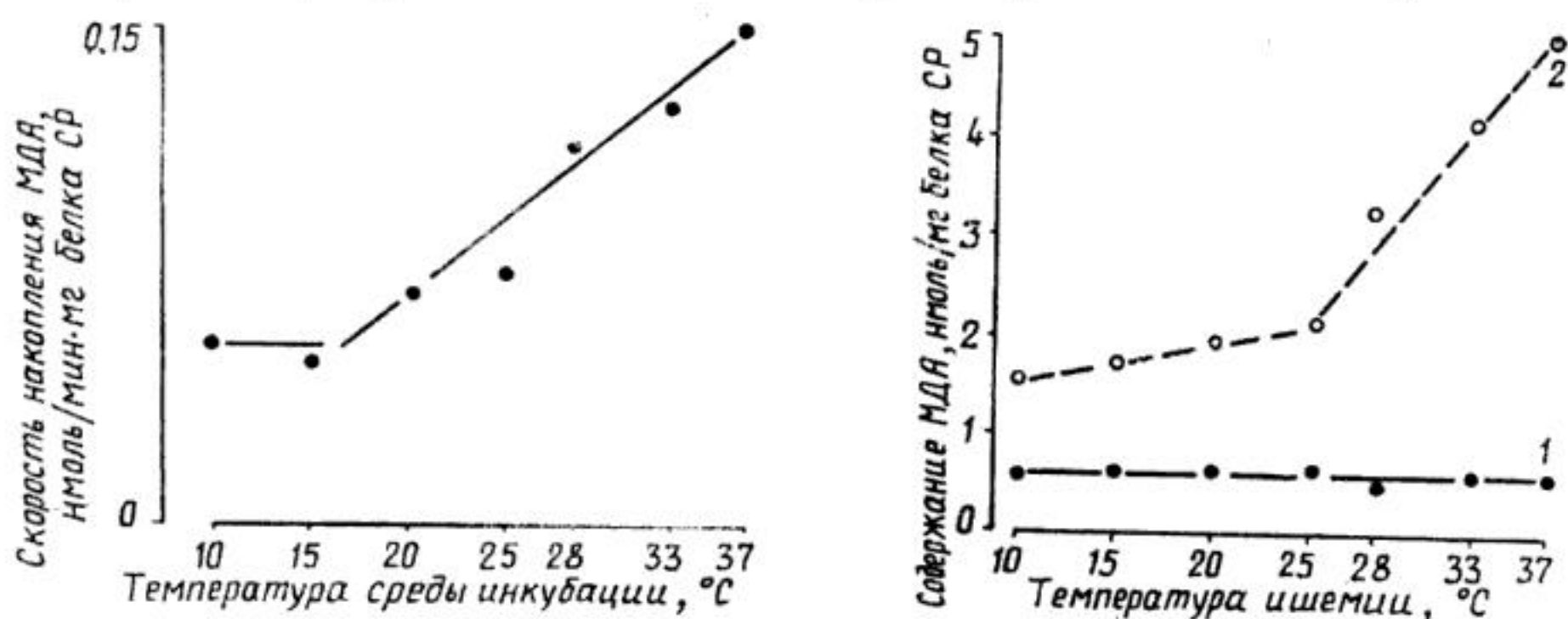


Рис. 2. Зависимость скорости накопления ТБК-активных продуктов в мембранах саркоплазматического ретикулума от температуры среды инкубации с прооксидантной системой

Рис. 3. Индуцированное инкубацией при 37°C с прооксидантной системой (2) и эндогенное (1) содержание ТБК-активных продуктов в мембранах ретикулума, выделенного из сердец, ишемия которых проводилась при разных температурах

ние скорости накопления ТБК-активных продуктов, что связано, вероятно, с изменением физического состояния липидного бислоя мембран СР.

Таким образом, можно было ожидать, что гипотермия приведет к ингибированию ПОЛ в ишемизированном миокарде. Неожиданным оказался тот факт, что содержание эндогенных ТБК-активных продуктов в СР, выделенном из сердец, ишемизированных при различных температурах, сходно (рис. 3, кривая 1). Поскольку скорость ПОЛ зависит от температуры (рис. 2), остается предположить, что в ишемизированном сердце активность как прооксидантных, так и антиоксидантных систем имеет одинаковую температурную зависимость.

Ранее была показана существенная роль ПОЛ в повреждении функции СР при нормотермической ишемии сердца [1]. Оказалось, что ПОЛ имеет важное значение и при гипотермической ишемии. Поэтому для эффективной защиты ишемизированного миокарда представляется перспективным сочетанное применение гипотермии и антиоксидантов, тем более, что антиоксиданты способствуют нормализации липидного спектра мембран, изменяющегося при глубокой гипотермии миокарда [3].

Исследование резистентности мембран СР, выделенных из сердец, ишемизированных при различных температурах, показало, что с увеличением глубины гипотермии возрастает липоперекисная резистентность (рис. 3, кривая 2). Перекисная резистентность зависит от ряда факторов, в том числе от степени дезинтеграции мембран, которая может определяться, например, накоплением в мембранах лизолипидов и свободных жирных кислот, обладающих детергентноподобным действием [7], активацией эндопротеаз либо другими патогенетическими процессами. Как показали наши исследования, в СР из сердец, ишемия которых проходила при температурах 25°C и выше,

инкубация с прооксидантной системой вызывает значительное накопление ТБК-активных продуктов, что свидетельствует об увеличенной «разрыхленности» мембран. Эти результаты служат подтверждением наших данных о защитном эффекте только глубокой гипотермии (рис. 1), но по-прежнему оставляет открытым вопрос о том, какими именно механизмами обусловлено снижение Ca^{2+} -транспортирующей активности СР при неглубокой гипотермической ишемии по сравнению с нормотермией.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что гипотермия обладает защитным эффектом в отношении мембран СР при ишемии сердца, однако прямая корреляция между сохранностью функции СР и глубиной гипотермии наблюдается только при температурах ниже 25 °С. Снижение Ca^{2+} -транспортирующей активности СР при неглубокой гипотермической ишемии по сравнению с нормотермией вызвано, вероятно, не изменением активности ПОЛ, а стимуляцией какого-то другого патогенетического процесса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бровкович В. М., Никитченко Ю. В., Лемешко В. В. Нарушение Ca^{2+} -транспортирующей функции и липидного компонента мембран саркоплазматического ретикула при тотальной ишемии миокарда крыс // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 1987. — № 11. — С. 546—548.
2. Мхитарян А. С. Кальций-аккумулирующая способность некоторых мембранных структур миокарда при экспериментальной коронарной недостаточности // Укр. биохим. журн. — 1984. — № 1. — С. 78—81.
3. Утчо Л. Я., Витолин С. П. Изменения в липидах мембран миокарда при глубокой гипотермии // Биол. мембраны и патология клетки. — Рига: Зинатне, 1986. — С. 81—87.
4. Feher J. J., Briggs F. N., Hess M. L. Characterization of cardiac sarcoplasmic reticulum from ischemic myocardium: comparison of isolated sarcoplasmic reticulum with unfractionated homogenates // J. Mol. Cell. Cardiol. — 1980. — 12, N 5. — P. 427—432.
5. Hess M. L., Krause S. M., Robbins A. D., Greenfield L. J. Excitation — contraction coupling in hypothermic ischemic myocardium // Amer. J. Physiol. — 1981. — 240, N 3. — P. H336—H341.
6. Jennings R. B., Reimer K. A., Jones R. N., Repton R. B. High energy phosphates, aerobic glycolysis and irreversibility in ischemia // Myocardial Injury. — New York: Publ. Plenum. Corp., 1983. — P. 403—419.
7. Katz A. M., Messineo F. C. Lipid — membrane interactions and the pathogenesis of ischemic damage in the myocardium // Circ. Res. — 1981. — 48, N 1. — P. 1—16.
8. Lebedev A. V., Levitsky D. O., Loginov V. A. Oxygen as an inductor of divalent cation permeability through biological and model lipid membrane // Adv. Myocardiol., Vol. 3. — New York: Plenum Publ. Corp., 1982. — P. 425—438.
9. Player I. J., Hultin H. O. The effect of lipid peroxidation on the calcium-accumulating ability of the microsomal fraction isolated from chicken breast muscle // Biochem. J. — 1978. — 174, N 1. — P. 17—22.
10. Schlafer M., Shepard B. M. A method to reduce interference by sucrose in the detection of thiobarbituric acid-reactive substances // Anal. Biochem. — 1984. — 137, N 2. — P. 269—276.

Харьковский НИИ терапии МЗ УССР

Поступила 12.12.87

V. M. BROVKOVICH, N. V. YARMYSH

LIPID PEROXIDATION IN ISCHEMIC MYOCARDIUM SARCOPLASMIC RETICULUM MEMBRANES PROTECTED BY HYPOTHERMIA

Research Institute for Therapy of Kharkov of the UkrSSR Ministry of Health

The Ca^{2+} transport activity of sarcoplasmic reticulum, accumulation of TBA-reactive substances in membranes of ischemic myocardium protected by hypothermia *in vitro* at different temperatures to evaluate the role of lipid peroxidation in the damage of membrane function under normo- and hypothermic ischemia has been studied. The Fe^{3+} ascorbate induced lipid peroxidation has been shown to change with the medium temperature while the contents of endogenous TBA — reactive substances in SR of hearts subjected to ischemia at different temperatures were similar. On the other hand, the peroxidation resistance of SR membranes increased with decreasing the ischemia temperature. It has been concluded that decreasing the Ca^{2+} transport function of SR induced by slight hypothermic ischemia, as compared to normothermic ischemia, is due to some pathogenetic processes other than changes in lipid peroxidation.

Н. Р. Чекурова, А. Н. Кислов, Б. Н. Вепринцев

ДЕЙСТВИЕ КРИОПРОТЕКТОРОВ НА ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КЛЕТОЧНОЙ МЕМБРАНЫ ЭМБРИОНОВ МЫШИ

В экспериментах показано, что криопротекторы ДМСО, этиленгликоль, формамид вызывают уменьшение проводимости мембраны для ионов и уменьшение мембранного потенциала клетки. Степень изменения электрических характеристик мембраны зависит от типа криопротектора и от его концентрации. ДМСО и формамид при комнатной температуре в концентрациях до 5 М не нарушают электрические свойства клеточной мембраны эмбрионов мыши, этиленгликоль токсичен для этих клеток при концентрациях выше 3 М. Процедура замораживания — оттаивания, несмотря на присутствие криопротектора в среде, вызывает нарушение электрических свойств мембраны эмбрионов. Параметры мембраны восстанавливаются через два часа после культивирования размороженных клеток в среде, содержащей клеточные метаболиты.

Криопротектор, обеспечивающий наилучшую защиту клеточных структур от повреждений при криоконсервации и являющийся одновременно наименее токсичным, для каждого типа клеток подбирается пока эмпирически. Эффективность действия криопротектора определяют обычно уже после процедуры замораживания — оттаивания по сохранности морфологии клеток и их способности к дальнейшему развитию. Критериев, по которым можно было вести предварительный отбор эффективных криопротекторов до замораживания, пока недостаточно. Для решения этой проблемы необходимо изучение действия криопротекторов на различные клеточные структуры, понимание механизма их криозащитного действия, выяснение корреляции между действием криопротекторов на структуры и функции клеток и их криопротективными свойствами. По литературным данным [8], наиболее чувствительной к действию низких температур является клеточная мембрана, и, возможно, защитное действие криопротекторов в первую очередь направлено на сохранность этой структуры.

Целью данной работы было изучение общих и индивидуальных особенностей действия различных криопротекторов на электрические свойства клеточной мембраны. В связи с этим были поставлены следующие задачи. Во-первых, исследовать действие диметилсульфоксида, этиленгликоля, формамида — типичных представителей трех различных классов криопротекторов, на электрические характеристики клеточной мембраны мышечных эмбрионов. Во-вторых, определить условия, способствующие нормализации электрических свойств клеточной мембраны после воздействия криопротекторов при комнатной температуре и после процедуры замораживания — оттаивания клеток.

Одно- и двухклеточные эмбрионы были выделены из яйцеводов суперовулированных мышей линии CBA/Lac [4]. Все манипуляции с клетками проводили в физиологическом растворе следующего состава: 139 мМ NaCl; 6 мМ KCl; 1,2 мМ MgCl₂; 2 мМ CaCl₂; 2 мМ *трис*-буфер; pH 7,2. Опыты проводили при температуре (20±2) °C, поскольку при температуре 37 °C клетки с введенным в них микроэлектродом, как правило, погибали в течение нескольких минут.

Электрофизиологические измерения проводили по стандартной методике с помощью одного внутриклеточного стеклянного микроэлектрода, позволявшего одновременно регистрировать потенциал и стимулировать клетки. Изучали изменения мембранного потенциала, входного сопротивления, амплитуды и длительности потенциалов действия в растворах с различными криопротекторами.

Растворы криопротекторов добавляли в камеру с клеткой через 5—10 мин после стабилизации регистрируемых параметров мембраны. В качестве криопротекторов использовали: диметилсульфоксид (ДМСО), этиленгликоль, формамид, метиловый спирт (фирмы «Серва» и «Сигма»).

Криоконсервацию двухклеточных эмбрионов мышей проводили по известной методике [2]. В качестве криопротектора использовали 1,5 М раствор ДМСО на основе среды Виттена. Клетки выдерживали при температуре жидкого азота в течение двух часов. После процедуры замораживания — оттаивания ДМСО отмывали путем постепенного разбавления средой Виттена в течение 20 мин при комнатной температуре.

Сразу после добавления в камеру растворов криопротекторов наблюдалось быстрое изменение объема клетки. Степень и скорость изменения объема зависели от типа криопротектора и от его концентрации. Наибольшие изменения объема регистрировались в растворах ДМСО, менее выраженные — в формамиде. Одновременно с этим явлением следовало быстрое уменьшение мембранного потенциала клетки, который в течение 5—7 мин выходил на некоторый стационарный уровень. В течение этого времени клетка, как правило, восстанавливала свой первоначальный объем.

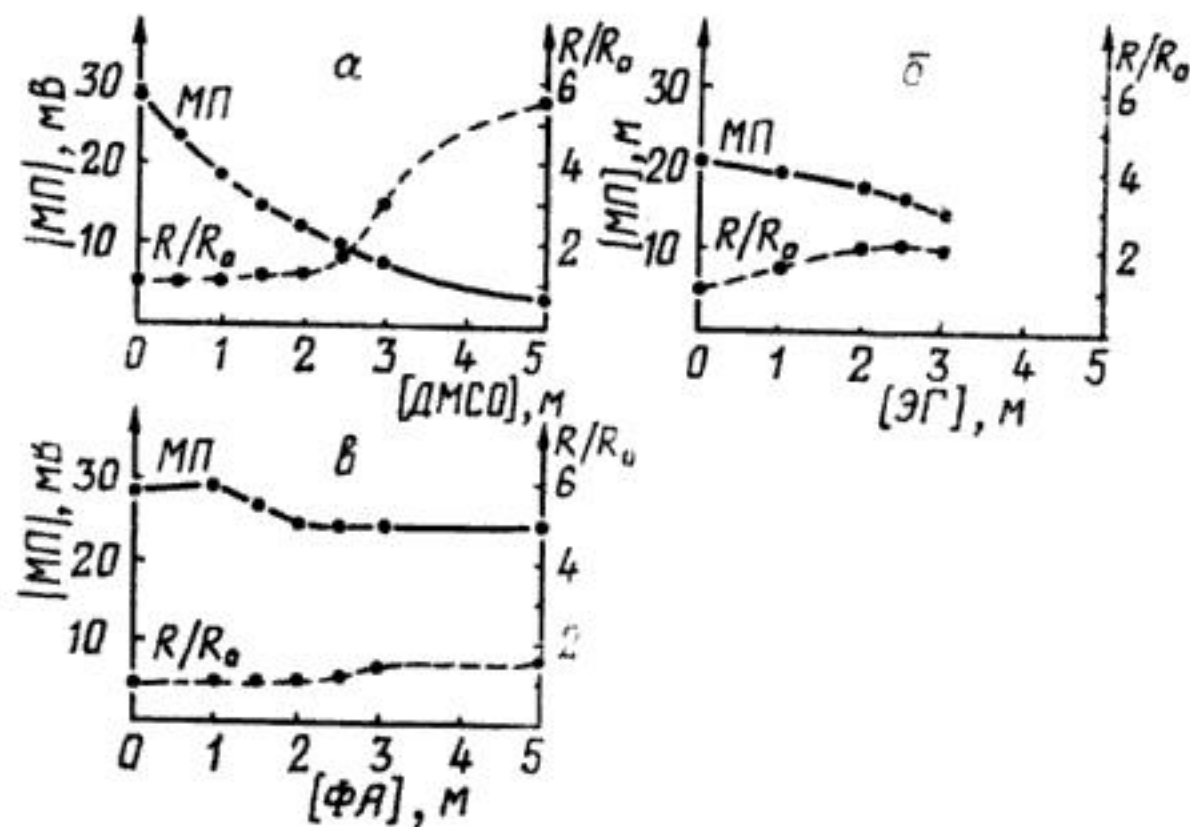


Рис. 1. Примеры зависимостей величин мембранного потенциала (МП) и относительного изменения входного сопротивления клетки (R) по отношению к контрольному значению (R_0) от концентраций криопротекторов: α — ДМСО; β — этиленгликоля (ЭГ); ν — формамида (ФА)

В первых опытах использовали 1,5 М концентрации криопротекторов, т. е. те, которые обычно используют при криоконсервации. Наибольшие изменения мембранного потенциала (МП) и входного сопротивления клетки ($R_{вх}$), регистрируемых после их выхода на стационарный уровень, наблюдали в ДМСО. В 1,5 М растворах этиленгликоля и формамида МП и $R_{вх}$ изменялись существенно меньше. В 1,5 М растворах криопротекторов при искусственной гиперполяризации МП до -70 мВ и последующей стимуляции регистрировали потенциалы действия (ПД), но, как правило, с несколько уменьшенной амплитудой.

Увеличение времени воздействия 1,5 М растворов криопротекторов от 10 до 60 мин при комнатной температуре не сказывалось на электрических характеристиках клеточной мембраны.

Изменения электрических параметров мембраны мышинных эмбрионов имели разный характер при различных концентрациях ДМСО, этиленгликоля, формамида. Во всех этих экспериментах концентрации криопротекторов увеличивали постепенно без отмывки предыдущего раствора. Проводимость среды при добавлении криопротекторов практически не изменялась.

Наиболее выраженные изменения МП и $R_{вх}$ наблюдали в ДМСО. На рис. 1, α показаны результаты характерного эксперимента, в котором использовались мышинные эмбрионы на двухклеточной стадии. Изменения МП, как правило, носили относительно монотонный характер, постепенно уменьшаясь по мере увеличения концентрации ДМСО. В противоположность этому $R_{вх}$ клетки резко увеличивалось в интервале 2—3 М ДМСО, достигая максимума в 5 М растворе криопротектора. Обычно регистрировались 3—5-кратные увеличения $R_{вх}$, в редких случаях в 10 раз. Следует отметить, что в растворах с криопротектором изменялась зависимость между $R_{вх}$ и МП: так, если $R_{вх}$ измеряли при обычно регистрируемом МП $= -25 \div$

$\div -35$ мВ, то оно оказывалось несколько больше, чем $R_{вх}$, измеренное при искусственном гиперполяризованном МП $= -70$ мВ (рис. 2). В физиологическом растворе наблюдали прямо противоположное явление: $R_{вх}$, измеренное при МП $= -25 \div -35$ мВ, было меньше, чем при гиперполяризованном потенциале.

Регистрация потенциалов действия (ПД) при различных концентрациях ДМСО показала, что амплитуда ПД постепенно, практически линейно, уменьшается по мере увеличения концентрации ДМСО. При этом изменений длительности ПД не происходило. В интервале 2,5—3 М ДМСО генерация ПД полностью прекращалась.

На рис. 1, б показаны результаты эксперимента с применением этиленгликоля. По мере увеличения концентрации этиленгликоля также наблюдали постепенное уменьшение МП, но таких резких изменений $R_{вх}$ клетки, как в ДМСО, не происходило. Во всех опытах с этиленгликолем клетки погибали при концентрациях больше 3 М. При этом генерация ПД сохранялась вплоть до 2,5—3 М концентраций, причем амплитуда ПД также постепенно уменьшалась вплоть до полного прекращения ПД.

Опыты с формамидом показали, что он существенно меньше, чем предыдущие криопротекторы, изменяет регистрируемые параметры мембраны (рис. 1, в).

Таким образом, исследованные нами криопротекторы вызывали изменения электрических характеристик клеточной мембраны эмбрионов мышей, а именно: уменьшение МП, увеличение $R_{вх}$, уменьшение амплитуды ПД. Степень изменения параметров клеточной мембраны зависела от типа криопротектора и от его концентрации.

В опытах был использован еще один криопротектор: метиловый спирт в концентрациях 1,5 и 3 М. Этот криопротектор практически не изменял электрические параметры мембраны.

Для выяснения характера изменений параметров мембраны при возвращении клеток в нормальную физиологическую среду клетки отмывали физиологическим раствором. Чтобы избежать осмотического шока при удалении криопротектора использовали шаговую отмывку: раствор с криопротектором разбавляли физиологической средой в 2 раза через каждые 3—5 мин в течение 20 мин. Тем не менее в большинстве опытов электрические характеристики клеточной мембраны при возвращении клетки в физиологический раствор были ниже исходного уровня. В процессе отмывки от криопротектора довольно часто наблюдались спонтанные скачки МП, а визуально — образование мелких везикул вокруг клеточной мембраны. В опытах было найдено, что электрические свойства мембраны после отмывки от криопротектора восстанавливались существенно быстрее при увеличении в физиологическом растворе концентрации ионов Ca^{2+} в 10 раз.

Таким образом, нормализации электрических свойств мембраны после действия высоких концентраций криопротекторов способствовало постепенное уменьшение концентрации криопротектора во время отмывки и увеличение в среде концентрации ионов Ca^{2+} .

В опытах сравнивали действие криопротекторов на электрические свойства мембраны одно- и двухклеточных эмбрионов мышей. Существенных различий в действиях криопротекторов на эмбрионы на этих стадиях развития не обнаружили.

Влияние процедуры замораживания — оттаивания на электрические свойства мембраны изучали на двухклеточных эмбрионах. Параметры мембраны измеряли сразу после размораживания клеток. Они были существен-

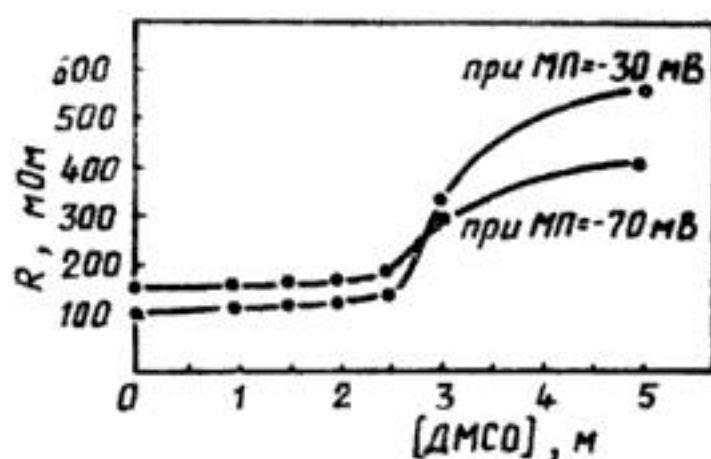


Рис. 2. Значения входного сопротивления клетки (R) в растворах ДМСО, измеренные при различных величинах мембранного потенциала (МП)

но ниже контроля, при этом клетки не генерировали потенциалы действия. Но через 2—3 ч после культивирования размороженных клеток в условиях *in vitro* в среде Виттена [10], содержащей, помимо солей, бычий сывороточный альбумин, пируват, лактат, функциональное состояние клеточной мембраны возвращалось к норме: МП увеличивался до $-30 \div -40$ мВ; $R_{вх}$ — до $80 \div 110$ МОм, возобновлялась генерация ПД. После культивирования размороженных эмбрионов в физиологическом растворе значения электрических параметров не восстанавливались.

В данной работе на мышинных яйцеклетках было показано, что ДМСО, этиленгликоль, формамид вызывают увеличение входного сопротивления клетки и уменьшение мембранного потенциала. При изучении действий этих криопротекторов на мембрану нейронов моллюска мы наблюдали также увеличение входного сопротивления, но мембранный потенциал при этом увеличивался [3]. Возможно, различия в изменениях мембранного потенциала этих клеток связаны с тем, что у нейронов при температуре 20°C продолжает нормально функционировать $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -насос [7] и на фоне общего уменьшения проводимости мембраны усиливается его роль в формировании отрицательного значения мембранного потенциала. У мышинных яйцеклеток при температуре 20°C вклад $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ электрогенного насоса в генерацию мембранного потенциала незначительный, как было показано в наших экспериментах, а уменьшение проводимости мембраны для различных ионов, по-видимому, неодинаковое, что в конечном итоге приводит к деполяризации мембранного потенциала.

Наряду с общими эффектами, существуют количественные различия в действиях исследованных криопротекторов на свойства мембраны мышинных яйцеклеток. Во-первых, наблюдались различия в проницаемости цитоплазматической мембраны для криопротекторов. Об этом можно судить по изменению клеточного объема во время добавления криопротектора: чем меньше изменяется объем клетки, тем быстрее криопротектор проникает через мембрану. Наименьшей проницаемостью мембраны была для ДМСО, наибольшей — для формамида. Во-вторых, если судить по входному сопротивлению клетки, криопротекторы в разной степени изменяют проводимость мембраны для электролитов. Наименьшей она была в растворах ДМСО, наибольшей — в растворах формамида. Изменение свойств мембраны, возможно, обусловлено замещением связанных с мембранными структурами молекул воды и в результате уменьшением проводимости ионных каналов мембраны для электролитов. Различия в действиях ДМСО, этиленгликоля, формамида могут определяться степенью взаимодействия молекул криопротектора с заряженными группами мембраны. Вполне вероятно, что наиболее эффективным криопротектором является тот, который сможет заменить большее количество воды в мембране и тем самым предотвратить образование кристаллов льда.

У мышинных яйцеклеток в стандартном физиологическом растворе увеличение мембранного потенциала всегда сопровождалось увеличением входного сопротивления клетки. В растворах ДМСО эта зависимость изменялась прямо противоположным образом: чем больше было значение МП, тем меньшее значение $R_{вх}$ мы регистрировали (рис. 2). Это явление может быть связано с конформационными изменениями в мембране при добавлении высоких концентраций определенных криопротекторов, в частности ДМСО, который образует с водой более сильные водородные связи, чем водородные связи, существующие между молекулами воды [5].

По литературным данным, при криоконсервации эмбрионов мышей наиболее эффективными из известных криопротекторов являются ДМСО, этиленгликоль [9, 6]. Криопротекторы из ряда амидов не обеспечивают криопroteкцию этих клеток [6]. Сопоставляя эти данные с результатами, полученными в наших опытах, где ДМСО и этиленгликоль вызывали существенные изменения электрических свойств мембраны, а формамид — незначительные, можно допустить, что существует корреляция между степенью

действия криопротекторов на электрические свойства клеточной мембраны и их криопротективными свойствами: чем сильнее криопротектор уменьшает проводимость клеточной мембраны для ионов, тем он более эффективен при криоконсервации.

Кроме криозащиты, криопротекторы могут оказывать токсичное действие на клетки и вызывать повреждения еще до замораживания. Наши опыты показали, что мембрана мышинных эмбрионов сохраняет свою целостность при использовании 5 М концентраций ДМСО и формамида, а этиленгликоль токсичен для этих клеток при концентрациях выше 3 М.

Критическим фактором, влияющим на функциональное состояние клеточной мембраны, является процесс отмывки клеток от криопротектора. Увеличение объема клетки во время отмывки приводит к нарушению целостности мембраны. Такие нарушения можно свести к минимуму путем постепенного уменьшения концентрации криопротектора в среде. На нормализацию свойств мембраны после действия криопротекторов благоприятно влияет также увеличение экстраклеточной концентрации ионов Ca^{2+} . Такое явление, вероятно, обусловлено более быстрой самосборкой мембраны в местах ее микрповреждений.

Как полагают, узким звеном при криоконсервации клеток являются мембранные структуры [8]. В какой-то степени целостность клеточных мембран при замораживании обеспечивается присутствием в среде криопротектора. Но в данной работе было показано, что электрические свойства мембраны эмбрионов мышей сразу после размораживания отличаются от нормы, что свидетельствует о наличии повреждений в клеточной мембране. Свойства мембраны восстанавливаются через определенный промежуток времени после культивирования размороженных эмбрионов в среде, содержащей, помимо солей, бычий сывороточный альбумин, лактат, пируват. Присутствие в среде клеточных метаболитов, скорее всего, необходимо клетке для нормального протекания репаративных процессов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гахова Э. Н., Чекурова Н. Р., Кислов А. Н., Вепринцев Б. Н. Восстановление электрических свойств нейронов после замораживания мозга прудовика в жидком азоте до -196°C // Простые нервные системы.— Л.: Наука, 1988.— С. 63—66.
2. Межевикича Л. М., Березовская О. П., Вепринцев Б. Н. Низкотемпературная консервация 2-клеточных эмбрионов мышей в среде Виттена с добавлением органического буфера *Нерес* // Криобиология.— 1988.— № 3.— С. 42—45.
3. Чекурова Н. Р., Кислов А. Н., Вепринцев Б. Н. Действие некоторых криопротекторов на ионные каналы мембраны нейронов // Криобиология.— 1987.— № 1.— С. 21—25.
4. Beaumont H. M., Swith A. F. Embryonic mortality during the pre- and postimplantation periods of pregnancy in mature mice after superovulation // J. Reprod. Fert.— 1975.— 45, N 1.— P. 437—448.
5. Dimethyl Sulfoxide / Ed. S. W. Jacob, E. E. Rosenbaum, D. C. Wood.— New York : Dekker, 1971.— P. 147—188.
6. Kasai H., Niwa K., Iritani A. Effects of various cryoprotective agents on the survival of unfrozen and frozen mouse embryos // J. Reprod. Fert.— 1981.— 63, N 1.— P. 175—180.
7. Marmor M. F., Gorman A. L. F. Membrane potential as the sum of ionic and metabolic components // Science.— 1970.— 167, N 3914.— P. 65—67.
8. Meryman H. T. Review of biological freezing // Cryobiology.— New York: Acad. Press, 1966.— P. 1—114.
9. Urano Kouji. Studies of the effect of various cryoprotective agents on the survival of frozen-thawed mouse embryos // Jap. J. Vet. Res.— 1986.— 34, N 2.— P. 164.
10. Whitten W. K. Nutrient requirements for the culture of preimplantation embryos *in vitro* // Adv. Biosci.— 1971.— 6, N 1.— P. 129—141.

Ин-т биол. физики АН СССР,
г. Пущино, Московской обл.

Поступила 09.02.89

THE EFFECT OF CRYOPROTECTANTS ON ELECTRIC PARAMETERS OF MOUSE EMBRYO CELL MEMBRANES

Institute of Biological Physics of the USSR Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region

It has been shown that such cryoprotectants as DMSO, ethylene glycol, and formamide decrease both the cell membrane permeability for ions and the membrane potential. Changes in membrane electric parameters depended on the cryoprotectant type and concentration. DMSO and formamide in concentrations lower than 5 M did not change membrane electric properties at room temperature while ethylene glycol appeared to exert a toxic effect in concentrations higher than 3 M. The freeze-thawing procedure changed membrane electrical properties independently of the presence of cryoprotectants. Membrane parameters of thawed cells in 2 hr culture restored in a medium containing cellular metabolites.

УДК 541.49:576.5

Л. З. Верховская, В. Ф. Карташов, С. В. Кощий, Л. А. Ханина

ДЕЙСТВИЕ АЛКОКСИЗАМЕЩЕННЫХ ГЛИЦЕРИНА НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ПЕРЕВИВАЕМОЙ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК

Клетки эквilibрировали с алкоксизамещенными эфирами глицерина 15 мин при комнатной температуре. Показано отсутствие выраженного цитотоксического действия у 1-монометилового эфира глицерина (1-ММЭГ) и 1,3-диэтоксиглицерина (1,3-ДЭГ). В 5 %-ной концентрации 1,3-диметиловый эфир (1,3-ДМЭГ) не оказывал влияния на жизнеспособность клеток. При повышении концентрации вещества отмечалось снижение этого показателя. Изомер данного вещества, 1,2-ДМЭГ, проявил ярко выраженные цитотоксические свойства. Для дальнейшего криобиологического скрининга предложены 1-ММЭГ и 1,3-ДЭГ.

Скрининг химических соединений является центральным звеном поиска новых криопротекторов. Перевиваемые монослойные клеточные культуры применяются в качестве объекта скрининга, поскольку обеспечивают удовлетворительную воспроизводимость и стабильность получаемых результатов, неограниченное количество однородного клеточного материала, возможность изучения влияния веществ на функциональные свойства живых клеток. В целях изучения связи структура — активность представляет интерес исследование криозащитной активности алкоксизамещенных глицерина. Предварительная оценка действия химических веществ на морфофункциональные свойства клеток перевиваемой культуры позволяет выявить химические соединения, обладающие цитотоксическим эффектом во время эквilibрации, т. е. до криоконсервирования.

В настоящей работе представлены результаты исследования следующих алкоксизамещенных глицерина: 1-монометиловый эфир глицерина (1-ММЭГ); 1,3-диметиловый эфир глицерина (1,3-ДМЭГ); 1,2-диметиловый эфир глицерина (1,2-ДМЭГ); 1,3-диэтоксиглицерин (1,3-ДЭГ). В качестве контроля использовали глицерин марки «ч. д. а.».

1-ММЭГ получали взаимодействием 1-монохлоргидрина глицерина с метанолятом натрия [3], 1,3-ДМЭГ и 1,3-ДЭГ — взаимодействием 1,3-дихлоргидрина глицерина с метанолятом и гликолятом натрия [6], 1,2-ДМЭГ — промышленный образец марки «ч», очищенный вакуумной перегонкой. Идентификацию 1-ММЭГ, 1,3-ДМЭГ, 1,2-ДМЭГ проводили путем сравнения показателей преломления и плотности с литературными данными, 1,3-ДЭГ — по температуре плавления. Строение подтверждалось молекулярной рефракцией, ИК спектроскопией. Чистоту веществ контролировали с помощью газожидкостной хроматографии.

Перед исследованием биологической активности вещества стерилизовали на кипящей водяной бане в течение 40 мин и два часа под бактерицид-

ными лампами. После стерилизации идентификация изучаемых веществ проводилась путем сравнения значений показателя преломления с данными, полученными до стерилизации, а также методом газожидкостной хроматографии.

Опыты проводили на клетках перевиваемой культуры линии почки теленка (ПТ). Клетки культивировали при 37 °С в ростовой среде (среда 199—45 %, гидролизат лактальбумина — 45 %, сыворотка крови крупного рогатого скота — 10 %, канамицина сульфат — 100 мкг/мл). Конфлюэнтный клеточный монослой, полученный в культуральных сосудах, обрабатывали диспергирующей смесью (трипсин/версен — 1/9). Клеточный концентрат получали бесцентрифужным методом. Концентрацию клеток во всех опытах определяли в камере Горяева. Оценивали исходную жизнеспособность по трипановому синему. Клеточный концентрат разбавляли исследуемыми веществами и ростовой средой до конечной концентрации клеток $1-3 \times 10^6$ клеток/мл и вещества 5—15 %. Клетки эквилибировали с исследуемыми веществами в течение 15 мин при комнатной температуре.

Из каждой серии отбирали аликвоту клеточной суспензии и разбавляли ее ростовой средой в 10 раз (до $1-3 \times 10^5$ клеток/мл). Часть суспензии помещали в культуральные флаконы и инкубировали при 37 °С в термостате. Через сутки среду, содержащую следы криопротекторов, заменяли свежей. В течение 3-х пассажей с помощью светового микроскопа наблюдали характер и динамику формирования клеточного монослоя. Параллельно из разведенной суспензии отбирали пробы для определения концентрации и жизнеспособности клеток по трипановому синему. Жизнеспособность клеток выражали следующим показателем: $A = \frac{a_i \cdot c_i}{a_k \cdot c_k} \cdot 100 \%$, где a_i — процент неокрашенных клеток и c_i — концентрация клеток в суспензии, подвергнутой воздействию; a_k — процент неокрашенных клеток и c_k — концентрация клеток в суспензии до воздействия.

Статистическая оценка результатов проводилась с помощью ЭВМ «СМ-4». Средние величины и их стандартные ошибки рассчитывали по данным 5—14 независимых опытов. В каждом опыте по 3 параллели с 4 определениями в каждой. Для сравнения средних использовали двусторонний критерий Стьюдента—Фишера для независимых выборок. Различия сравниваемых величин считали существенными при $p < 0,05$.

Важнейшие константы полученных веществ приведены в таблице, где они сравниваются с литературными данными.

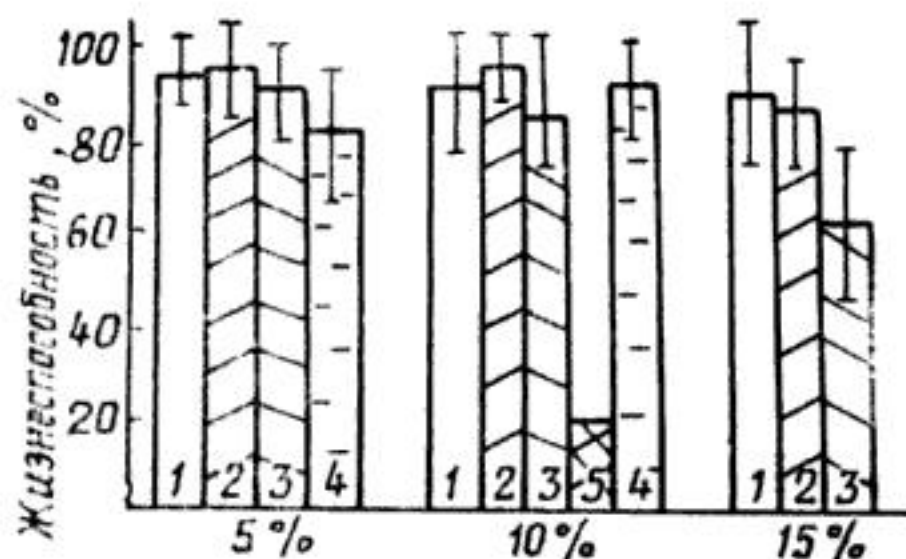
Основные константы алкоксизамещенных эфиров глицерина

Вещество	Общая формула	Коэффициент преломления, n_D^{20}	Плотность	Температура плавления, °С	Молекулярная рефракция		Примеси (по данным ГЖХ), %
					Найдено	Вычислено	
1-ММЭГ	$C_4H_{10}O_3$	1,4444	1,1169	—	25,23	25,37	Не обнаружено
		1,4470 [3]	1,1118 [3]	—	25,84 [3]	—	—
		1,4445 [2]	1,1163 [2]	—	25,28 [2]	—	—
1,2-ДМЭГ	$C_5H_{12}O_3$	1,4206	1,0199	—	25,85	30,11	Менее 0,2 Не обнаружено
		1,4200	1,0080	—	30,16	30,11	
1,3-ДМЭГ	$C_5H_{12}O_3$	1,4192 [6]	1,0085 [6]	—	30,10 [6]	—	—
1,3-ДЭГ	$C_7H_{16}O_3$	—	—	31	—	—	Менее 1 —
		—	—	30 [6]	—	—	

В ИК спектрах 1-ММЭГ, 1,3-ДМЭГ, 1,3-ДЭГ, 1,2-ДМЭГ имеются полосы поглощений, характеризующие следующие группы (см^{-1}): 3400—3200 (ОН); 2930 (CH_2); 1465 (CH_2); 2830 ($\text{O}-\text{CH}_3$); 1365 (CH_3); 1190, 1000 ($\text{C}-\text{OC}$).

По данным ИК спектроскопии и газожидкостной хроматографии, изменений в веществах после стерилизации не обнаружено.

1-ММЭГ в 5—15 %-ных и 1,3-ДЭГ в 5, 10 %-ных концентрациях не изменяли показатель жизнеспособности клеток культуры ПТ (А) по сравнению с глицерином, применявшимся в тех же концентрациях (рисунок). При культивировании клетки, подвергавшиеся воздействию этих веществ, формировали монослой примерно в те же сроки, что и интактные, не теряли способности пассироваться, в течение трех пассажей без каких-либо трудностей снимались со стекла и пересевались. После пересевов монослой непрерывен, клетки ПТ сохраняли исходные морфологические признаки эпителиоподобного типа, полигональной формы с хорошо выраженными границами. Однако следует отметить, что



Жизнеспособность клеток культуры ПТ после эквипирации с алкоксизамещенными глицерина в 5—15 %-концентрациях: 1-глицерин; 2-1-ММЭГ; 3-1,3-ДМЭГ; 4-1,3-ДЭГ; 5-1,2-ДЭГ

в зависимости от сроков хранения цитотоксические свойства 1-ММЭГ менялись, что требует установления срока годности для данного вещества.

1,3-ДМЭГ в 5 %-ной концентрации не оказывал влияния на жизнеспособность клеток культуры ПТ (рисунок). При повышении концентрации вещества до 15 %-ной отмечалось снижение этого показателя до $(62,0 \pm 7,4) \%$. Культивирование клеток после контакта с 1,3-ДМЭГ выявило формирование монослоя при 5 и 10 %-ных концентрациях и полную неспособность клеток об-

разовывать монослой после воздействия 15 %-ной концентрации вещества.

Изомер данного вещества 1,2-ДМЭГ проявил ярко выраженные цитотоксические свойства. Тест с окраской трипановым синим показал, что использование 15 %-ной концентрации этого эфира глицерина привело к гибели всех клеток ($A = 0$). Результат воздействия 10 %-ного 1,2-ДМЭГ был практически таким же (гибель 80 % клеток). При культивировании после воздействия 1,2-ДМЭГ не наблюдалось прикрепления клеток культуры ПТ к поверхности культурального флакона через 24 ч после начала культивирования.

Полученные нами данные указывают на то, что тест с окрашиванием трипановым синим коррелирует с реальной сохранностью клеток. На образование монослоя не влияло наличие в клеточной суспензии 20—30 % клеток, окрашенных трипановым синим, возможно, благодаря применявшейся оптимальной концентрации клеток, а также репарации повреждений клеточной мембраны. Поэтому оценка сохранности клеток культуры ПТ после воздействия химических соединений базируется не только на данных, полученных по тесту с окрашиванием трипановым синим, но и на изучении пролиферативной активности клеток.

Таким образом, экспресс-оценка действия производных глицерина на морфофункциональные свойства культуры клеток ПТ позволила «отсеять» из изучаемого ряда соединений 1,2-ДМЭГ. Для 1,3-ДМЭГ показана безопасность применения его в 5 и 10 %-ных концентрациях, однако выраженный дозозависимый эффект может реализоваться в процессе криоконсервирования. В последнее время в литературе придается все большее значение исследованию собственно повреждающего действия криопротектора, которое может вносить существенный вклад в исход всего процесса криоконсервирования биологических объектов.

Введение одной метильной группы в молекулу глицерина не приводило к изменению цитотоксических свойств изучаемого алкилпроизводного, что согласуется с ранее полученными данными при определении параметров острой токсичности на лабораторных животных. Показано, что ЛД-50 1-ММЭГ существенно не отличалось от соответствующего показателя для глицерина [4]. Однако введение двух метильных групп вызвало усиление цитотоксических свойств производных по сравнению с исходным продуктом. В данном случае использование клеточных культур для определения безопасности изучаемых химических соединений оказалось более чувствительным, чем определение параметров острой токсичности на организменном уровне, так как ранее было показано, что введение диметилового радикала в молекулу глицерина путем образования эфирной связи не вызывает изменения токсичности полученного эфира по сравнению с исходным веществом [5]. Необходимость изучения безопасности используемых концентраций криопротекторов на клеточном уровне обуславливается также варьированием в широких пределах — от 1 : 1 до 1 : 400000, соотношения среднетоксических доз *in vitro* (на клеточных культурах) и *in vivo* (на лабораторных животных), т. е. токсичность *in vitro* и *in vivo* далеко не во всех случаях коррелирует ($r = 0,19$) [1]. Из полученных данных также следует, что при введении двух метильных групп в положение 1,3 цитотоксические свойства полученного эфира выражены значительно слабее, чем при введении их в положение 1,2.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов установлено отсутствие выраженного цитотоксического действия у 1-ММЭГ и 1,3-ДЭГ в 5—15 %-ных концентрациях, что позволяет предложить их для дальнейшего криобиологического скрининга.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Василос А. Ф., Шройт И. Г., Дмитриченко В. Д., Тодорова Е. А. Действие пестицидов на эксплантированные клетки // Гигиена труда и проф. заболевания. — 1982. — № 6. — С. 21—24.
2. Еременко Л. Т., Королев А. М. Синтез и исследование некоторых физических свойств 1-н алкиловых эфиров глицерина и их динитратов // Изв. АН Тадж. ССР. — 1977. — № 2. — С. 98—102.
3. Кимсанов Б. Х., Шланова Х. Х. Синтез моноалкиловых эфиров глицерина // Там же. — ССР. — 1981. — № 2. — С. 102—104.
4. Ханина Л. А., Коций С. В., Гучок В. М. и др. Влияние алкилирования на некоторые физико-химические свойства и токсичность водных растворов полиолов // Тез. докл. II Всесоюз. конф. по теорет. и прикладным вопросам криобиологии. — Харьков, 1984. — Т. 1. — С. 94.
5. Шраго М. И., Гучок В. М., Ханина Л. А., Линник Т. П. Показатели токсичности ряда полимеров на основе химической модификации полиолов и амидов // Тез. докл. VII Всесоюз. науч. конф. — Киев, 1985. — 172 с.
6. Kharash M. S., Nudenberg A. B. Condensation of epichlorhydrin with ethylene glycol: some new polyfunctional derivatives // J. Org. Chem. — 1943. — 8, N 1. — P. 189—193.

Ин-т проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР;

Поступила 23.11.87

НИИ животноводства, лесостепи и полесья УССР,
г. Харьков

L. Z. VERKHOVSKAYA, V. F. KARTASHOV, S. V. KOSHCHIY, L. A. KHANINA THE EFFECT OF GLYCEROL ALCOXY—DERIVATIVES ON MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF CONTINUOUS CELL CULTURE

*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the UkrSSR Academy of Sciences;
Research Institute For Animal Breeding, Forest-Steppe and Woodlands of the UkrSSR,
Kharkov*

Cells were equilibrated with glycerol alcoxy-derivatives for 15 min at room temperature. The absence of manifested cytotoxic effect of 1-MMEG and 1,3-DEG has been shown.

1,3-DMEG in a 5 % concentration exerted no effect on the cell viability. This parameter decreased with increasing the concentration of the agent. 1,2-DMEG had marked cytotoxic properties. 1-MMEG and 1,3-DEG have been suggested for further cryobiological screening.

УДК 541.117:57.043

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

КИНЕТИКА ГИДРОЛИЗА п-НИТРОФЕНИЛАЦЕТАТА В ЗАМОРОЖЕННЫХ ВОДНЫХ РАСТВОРАХ ЖЕЛАТИНЫ

На основании изучения кинетики гидролиза модельной реакции п-нитрофенилацетата в зоне умеренно низких температур показано, что желатина в качестве компонента замораживаемого раствора расширяет температурную область сохранения молекулярной подвижности, необходимой для осуществления реакций в замороженных водных системах при субнулевых температурах и проявляет каталитическую активность в отношении гидролиза сложных эфиров. Отмеченные обстоятельства могут ограничивать возможности использования биополимерных добавок как криопротекторов в области умеренно низких температур.

Замораживание и охлаждение до умеренно низких температур водных систем: растворов низко- и высокомолекулярных соединений, суспензий твердых веществ, эмульсий несмешивающихся с водой органических растворителей, мицеллярных растворов и т. д., как правило, приводит к образованию гетерогенных в фазовом отношении образцов. Неспособность воды, связанной с биополимерами, кристаллизоваться в этой области температур является важнейшим обстоятельством, обуславливающим холодоустойчивость многих видов растений и животных, одним из возможных механизмов которой является образование биополимерных гелей. Как показали исследования последних лет, процессы обратимого гелеобразования играют важную роль в обеспечении различных функций органелл и тканей [12]; гелевые матрицы могут использоваться для целей биотехнологии, в частности для иммобилизации биомакромолекул [9], а также для консервации биологических объектов при низких температурах [7]. Перечисленные обстоятельства диктуют необходимость детального изучения процессов, происходящих в водных системах, способных к гелеобразованию.

Одним из важных этапов подобной работы является, с нашей точки зрения, исследование закономерностей протекания модельных реакций в замороженных системах, содержащих полимерные гелеобразующие добавки. В качестве такой модельной реакции выбран гидролиз п-нитрофенилацетата — процесс, в котором вода играет роль как растворителя, так и реагента. Последнее обстоятельство делает реакции гидролиза весьма чувствительными к изменениям физико-химических свойств водных систем.

Очистка п-нитрофенилацетата, приготовление его исходных растворов и определение их концентраций описаны ранее [6]. В работе использовали $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ марки «ч. д. а.», желатину медицинского назначения производства объединения «Мосхимфармпрепараты», дважды перегнанную воду. Гидролиз п-нитрофенилацетата (п-НФА) изучали спектрофотометрически. Измерения проводили на регистрирующем спектрофотометре «Спекорд М-40» (ГДР). За кинетикой следили по накоплению продукта реакции — п-нитрофенола, измеряя увеличение оптической плотности на длине волны 400 нм ($\epsilon = 1,64 \cdot 10^4$ при pH 8,0 [8]). Регистрацию кинетических кривых осуществляли либо непрерывно (при $T > 273$ К), проводя реакцию непосредственно в термостатируемой кювете спектрофотометра, либо по точкам (при $T < 273$ К), выдерживая предварительно замороженные образцы реакционной смеси в криостате МК-70 (ГДР). В обоих случаях точность термостатирования составляла $\pm 0,1$ К.

Значения наблюдаемых констант скоростей гидролиза ($K_{\text{набл}}$) рассчитывали как отношение $W_{\text{набл},0} / [p\text{-HФА}]_0$, где $W_{\text{набл},0}$ — наблюдаемая начальная скорость реакции, определяемая из тангенсов углов наклона касательных, проведенных к участкам кинетических кривых, соответствующих 5—10 % превращения, а $[p\text{-HФА}]_0$ — начальная концентрация $p\text{-HФА}$ в реакционной смеси. Относительные ошибки определения $K_{\text{набл}}$, как правило, не превышали 15—20 %.

Как видно из рис. 1, в жидкой фазе в интервале температур $283 \div 303$ К увеличение концентрации желатины от 0 до 3 % вызывает пропорциональное увеличение наблюдаемой константы скорости реакции при pH 8,0. Это свидетельствует о том, что желатина проявляет в отношении гидролиза $p\text{-нитрофенилацетата}$ каталитическую активность. В 1 %-ном растворе же-

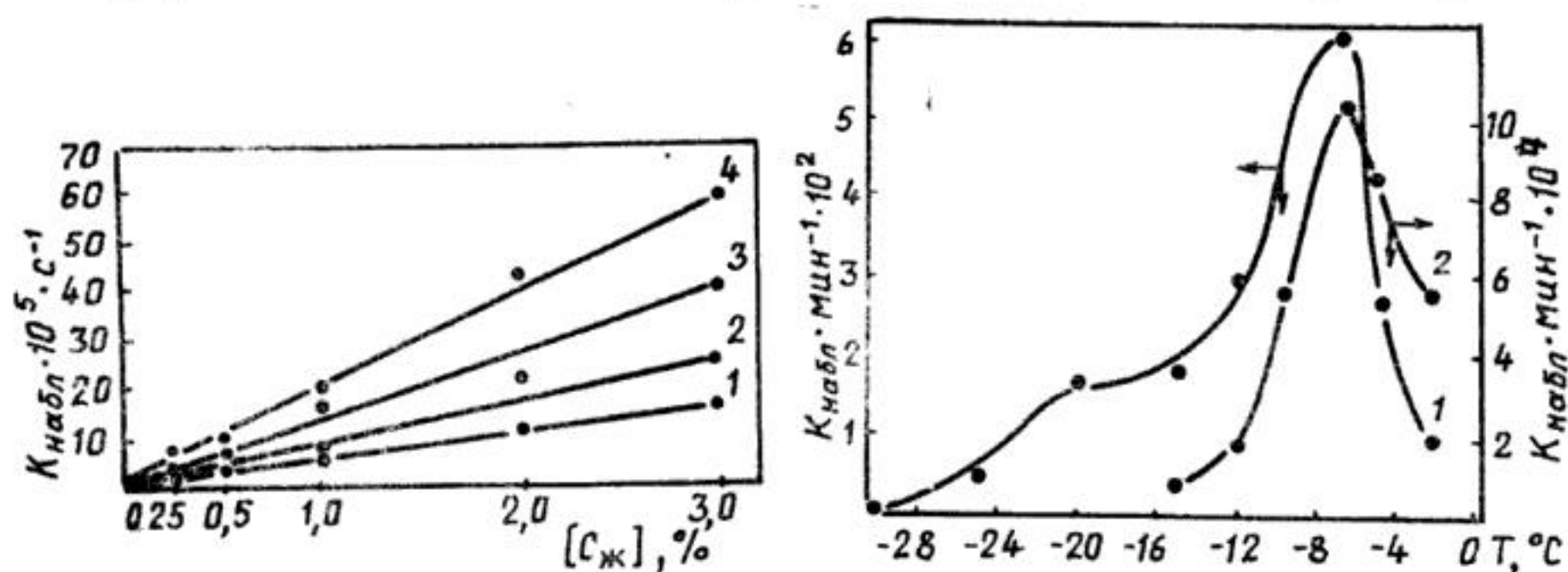


Рис. 1. Зависимость наблюдаемой константы скорости гидролиза $p\text{-HФА}$ ($K_{\text{набл}}$) от концентрации желатины при 283 К (1), 289 К (2), 290 К (3) и 303 К (4) в 0,02 М фосфатном буферном растворе (pH 8,0), концентрация NaCl — 0,15 М

Рис. 2. Зависимость наблюдаемой константы скорости гидролиза $p\text{-HФА}$ ($K_{\text{набл}}$) в замороженных 0,1 М растворах K_2HPO_4 от температуры в отсутствие (2) и в присутствии 1 %-ной желатины (1)

латины энергия активации, рассчитанная из данных, приведенных на рис. 1, составляет 12,1 ккал/моль. Природа каталитической активности желатины связана, по нашему мнению, с наличием в ее молекулах, несущих при pH 8,0 суммарный отрицательный заряд, аминокислотных остатков основной природы [2], оказывающих каталитическое действие на реакцию по механизму кислотно-основного катализа. Не исключено, что определенную роль в катализе может играть изменение структуры воды вблизи макромолекул желатины [10], а также известная сольбилизирующая способность желатины по отношению к малополярным, ограниченно растворимым в воде веществам, к числу которых принадлежит $p\text{-HФА}$.

Проявление неспецифической каталитической активности белковыми молекулами, находящимися, подобно желатине, в развернутой конформации [4], имеет, по нашему мнению, большое биологическое значение. Как известно, неблагоприятные режимы замораживания — отогрева биообъектов способны влиять на нативную архитектуру молекулярных комплексов, «разворачивать» глобулярные белки, нарушая их вторичную структуру [1], что может привести к появлению у таких макромолекул нехарактерных для них в нативном состоянии свойств.

В замороженных системах гидролиз $p\text{-HФА}$ изучали в интервале температур $243 \div 273$ К в 0,1 М растворах K_2HPO_4 ($pH_{298\text{K}} = 8,0$) в отсутствие и в присутствии 1 %-й желатины. Графики соответствующих температурных зависимостей наблюдаемых констант скоростей реакции приведены на рис. 2.

Характерная колоколообразная форма температурных зависимостей объясняется [5] тем, что на реакции в замороженных растворах действуют два противоположно направленных фактора: ускоряющий, связанный с концентрированием реагентов в незамерзающих жидких областях, и тор-

мозаичный, обусловленный уменьшением константы скорости в соответствии с законом Аррениуса. Обращает на себя внимание тот факт, что во всем изученном интервале температур наблюдаемая константа скорости гидролиза в 1 %-ных замороженных растворах желатины (кривая 1) существенно выше, чем в образцах, не содержащих белка (кривая 2). Ускорение, очевидно, связано с катализом реакции желатиной, а не с ее влиянием на фазовое состояние замороженных растворов, поскольку увеличение объема среды реакции за счет незамерзающей воды вблизи макромолекул [3], приводя к разбавлению реакционной смеси, не может быть причиной увеличения скорости, а наоборот — должно тормозить реакцию.

Как видно из рис. 2, в присутствии желатины (кривая 1) реакция со значительной скоростью может идти при температурах гораздо более низких, чем криогидратная точка системы $K_2HPO_4-H_2O$ ($T_{эвт} = 259,3$ К [11]). Это обстоятельство, по нашему мнению, связано с расширением области существования подвижной фазы в замороженных водно-солевых растворах, содержащих добавки желатины. Несимметричная форма кривой 1, а именно «плечо» на ее низкотемпературной части, может быть следствием кристаллизации водно-солевой эвтектики. Не исключено, что при этих температурах реакция идет уже не во включениях незамерзающего раствора, а в частицах желатинового геля, распределенных в твердой матрице.

Полученные в работе результаты свидетельствуют о том, что желатина в качестве компонента замораживаемого раствора, во-первых, расширяет температурную область сохранения молекулярной подвижности, необходимой для осуществления реакций в замороженных водных системах при субнулевых температурах, и, во-вторых, проявляет каталитическую активность в отношении гидролиза сложных эфиров. Отмеченные обстоятельства, с нашей точки зрения, могут ограничивать возможности использования биополимерных добавок как криопротекторов в области умеренно низких температур.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоус А. М., Бондаренко В. А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. — Киев: Наук. думка, 1972. — 259 с.
2. Долинный А. И. Исследование коацервации желатины: Автореф. дис. ... канд. хим. наук. — М., 1978. — 18 с.
3. Зинченко В. Д. Исследование межмолекулярных взаимодействий в водных растворах полиэтиленгликолей, некоторых белков и аминокислот методом ЯМР: Автореф. дис. ... канд. физ.-мат. наук. — Харьков, 1978. — 20 с.
4. Измайлова В. Н., Ребиндер П. А. Структурообразование в белковых системах. — М.: Наука, 1974. — 268 с.
5. Сергеев Г. Б., Батюк В. А. Криохимия. — М.: Химия, 1978. — 178 с.
6. Сергеев Г. Б., Сергеев Б. М., Калнина И. А. Гидролиз п-нитрофенилацетата в водно-солевых системах, способных к образованию эвтектик // Журн. физ. химии. — 1984. — 58, № 10. — С. 2431—2434.
7. Справочник по переливанию крови и кровезаменителей / Под ред. О. К. Гаврилова — М.: Медицина, 1982. — 275 с.
8. Goren H. J., Fridkin M. The hydrolysis of p-nitrophenyl acetate in water. Mechanism and method of measurement // Eur. J. Biochem. — 1974. — 41, N 2. — P. 263—272.
9. Kajiwara S., Maeda H. Coimmobilization of malate dehydrogenase and formate dehydrogenase in polyethyleneglycol (± 4000) diacrylate gel by droplet gel-entrapping method // Biotechnol. Bioeng. — 1986. — 28, N 12. — P. 1794—1801.
10. Ling G. N., Ochsenfeld M. M. Studies on the physical state of water in living cells and model systems. I. The quantitative relationship between the concentration of gelatin and certain oxygen-containing polymers and their influence upon the solubility of water for Na^+ salts // Physiol. Chem. Phys. — 1983. — 15, N 2. — P. 127—136.
11. Van den Berg L., Rose D. Effect of freezing on the pH and composition of sodium and potassium phosphate solutions: the reciprocal system $KH_2PO_4-Na_2HPO_4-H_2O$ // Arch. Biochem. Biophys. — 1959. — 81, N 2. — P. 319—329.
12. Weisenberg R. C., Flynn J., Gao B. et al. Microtubule gelation-contraction: essential components and relation to slow axonal transport // Science. — 1987. — 238, N 48—30. P. 1119—1122.

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

Поступила 04.07.88

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

THE KINETICS OF *p*-NITROPHENYL ACETATE HYDROLYSIS IN FROZEN WATER — GELATIN SOLUTIONS

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

Studying the hydrolysis kinetics of model reaction of *p*-nitrophenyl acetate at moderately low temperatures, it has been shown that gelatin as a component of frozen solution broadens the temperature region for maintainance of the molecular mobility necessary for proceeding the reactions in frozen aqueous solutions at subzero temperatures and demonstrates the catalytic activity in relation to the hydrolysis of complex esters. This may limit using of biopolymer additives as cryoprotectants in the region of moderately low temperatures.

УДК 612.015.3+591.42

Э. З. Эмирбеков, Р. А. Абдуллаев

АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ МОЗГА СУСЛИКОВ ВО ВРЕМЯ ЗИМНЕЙ СПЯЧКИ

В условиях недельной зимней спячки в водорастворимых белках мозга кавказских малых сусликов содержание аспарагиновой и глутаминовой кислот повышается на 14 %. При недельной и месячной зимней спячке в белках данной фракции сохраняется повышенное содержание дикарбоновых аминокислот и снижается количество аргинина (на 17 %), лейцина (на 17,8 %) и пролина (на 15,6 %). В водонерастворимых белках мозга изменения в аминокислотном составе наступают лишь на 30-е сутки зимней спячки: содержание глутаминовой, аспарагиновой кислот повышается, а изолейцина, пролина и аланина снижается. Вычисленная относительная гидрофобность исследуемых белков мозга в начале зимней спячки подвергается разнонаправленным изменениям, а к месячному сроку снижается.

В связи с широким применением метода гипотермии в медицинской практике [2] и расширением сферы влияния экологических факторов, связанных с холодом, изучение молекулярных механизмов зимней спячки приобретает, кроме теоретического, и практическое значение. Среди существующих представлений о механизмах, обеспечивающих зимнюю спячку, выдвигаются гипотезы [8], в которых центральное место занимает возможная модификация белков [5, 9]. При зимней спячке в мозге имеет место как посттрансляционная модификация, так и биосинтез новых белковых молекул [5—7], что приводит к изменению аминокислотного состава различных фракций белков.

С целью подтверждения указанного предположения в настоящей работе исследовали аминокислотный состав водорастворимой и водонерастворимой фракций белков головного мозга зимоспящих в различные периоды гибернации.

Опыты проводили на кавказских малых сусликах (*Citellus pygmaeus Pallas*), отловленных в низменной части Дагестана в мае—июне. До глубокой осени зверьков содержали в условиях вивария, не ограничивая пищей и водой. В ноябре сусликов одинаковой упитанности и массы (200—250 г) помещали в индивидуальные клетки и переносили в темное помещение с постоянной температурой ($5 \div 6^\circ\text{C}$), где они впадали в зимнюю спячку. Температура тела грызунов во время спячки составляла $6 \div 8^\circ\text{C}$. Для биохимического анализа белков мозга животных брали в опыт через 7, 15 и 30 сут после впадения их в состояние зимней спячки (в середине баута). В качестве контроля исследовали бодрствующих сусликов из вивария до впадения в состояние зимней спячки. При комнатной температуре $22 \div 20^\circ\text{C}$ температура тела этих сусликов составляла $36 \div 37^\circ\text{C}$. Контрольных и подопытных животных декапитировали и из черепной коробки быстро извлекали

большие полушария мозга, из которых готовили гомогенат на дистиллированной воде в соотношении 1 : 10 (вес : объем). Гомогенат тканей мозга замораживали и после оттаивания оставляли в холодильнике для экстракции белков на 14 ч. Центрифугированием отделяли водонерастворимые белки, которые выпадали в осадок, а водорастворимую фракцию белков в центрифугате осаждали добавлением 6 % ТХУ. Как известно [3], водорастворимая фракция белков представляет собой главным образом ферменты клеток нервной ткани. Водонерастворимая же фракция белков мозга гетерогенна и содержит преимущественно белки мембран. Осадки полученных белковых фракций освобождали от липидов и воды последовательной промывкой хлороформом, смесью этанола с эфиром (2 : 1), этанолом, смесью этанола с эфиром (2 : 1) дважды и эфиром трижды. Высушенные белки использовали для кислотного гидролиза в запаянных ампулах для последующего определения содержания аминокислот на автоматическом анализаторе ААА-881 (ЧССР).

Для характеристики физико-химических свойств фракций белков рассчитывали суммы содержания в них основных, кислых, общих заряженных, аполярных, гидрофильных, гидрофобных аминокислот, а также их соотношения. Относительную гидрофобность белковых фракций вычисляли, используя индекс гидрофобности радикалов входящих в них аминокислот [10].

Данные наших экспериментов (табл. 1 и 2) показали, что имеются отличия по количественному содержанию аминокислот в водорастворимых

Таблица 1

Аминокислотный состав водорастворимых белков больших полушарий головного мозга кавказских малых сусликов при зимней спячке с температурой тела $9 \div 8^\circ\text{C}$ (мкмоль/100 мг белка: $M \pm m$; $n = 7$)

Аминокислоты	Контроль (бодрствующие)	Длительность зимней спячки, сут		
		7	15	30
Аспартат	$44,6 \pm 1,2$	$51,3 \pm 1,3^*$	$51,7 \pm 1,2^*$	$51,9 \pm 1,1^*$
Глутамат	$54,7 \pm 1,3$	$62,3 \pm 1,2^*$	$63,2 \pm 1,2^*$	$63,7 \pm 1,4^*$
Гистидин	$33,3 \pm 1,1$	$34,2 \pm 1,0$	$34,7 \pm 1,1$	$33,7 \pm 1,0$
Лизин	$34,1 \pm 1,1$	$30,7 \pm 1,0$	$32,3 \pm 1,2$	$32,6 \pm 1,0$
Аргинин	$20,1 \pm 0,8$	$20,3 \pm 1,0$	$16,5 \pm 0,7^*$	$16,3 \pm 0,7^*$
Треонин	$20,6 \pm 1,0$	$20,9 \pm 1,0$	$20,6 \pm 0,9$	$20,3 \pm 0,8$
Серин	$28,9 \pm 1,1$	$28,7 \pm 1,1$	$28,9 \pm 0,9$	$28,7 \pm 1,1$
Валин	$26,6 \pm 1,0$	$24,7 \pm 0,9$	$28,7 \pm 0,9$	$29,1 \pm 0,8$
Лейцин	$32,3 \pm 1,0$	$28,7 \pm 1,1$	$27,9 \pm 0,9^*$	$28,1 \pm 0,9^*$
Изолейцин	$18,4 \pm 0,8$	$22,3 \pm 0,7$	$22,1 \pm 0,8$	$22,3 \pm 0,7$
Фенилаланин	$13,0 \pm 0,8$	$13,2 \pm 0,5$	$11,0 \pm 0,6$	$11,3 \pm 0,4$
Тирозин	$9,2 \pm 0,9$	$12,1 \pm 0,8$	$12,7 \pm 0,7$	$11,9 \pm 0,6$
Пролин	$25,6 \pm 0,6$	$22,1 \pm 0,7$	$21,6 \pm 0,5^*$	$21,7 \pm 0,5^*$
Аланин	$33,3 \pm 0,9$	$29,3 \pm 1,2$	$28,7 \pm 1,1$	$28,1 \pm 1,1$
Глицин	$27,6 \pm 1,0$	$26,0 \pm 1,3$	$26,7 \pm 1,1$	$27,1 \pm 1,1$

Примечание: Здесь и в табл. 2 звездочкой обозначены достоверные различия по сравнению с контролем.

и водонерастворимых фракциях белков головного мозга кавказских малых сусликов в состоянии бодрствования. В водорастворимой фракции содержание кислых аминокислот больше на 11,9 %, а в водонерастворимой — на 17,1 %, чем основных. Как видно по табл. 3, относительная гидрофобность водонерастворимой фракции белков мозга бодрствующих сусликов значительно выше (почти в 6 раз), чем водорастворимой. По аминокислотному составу исследуемые нами фракции белков мозга сходны с таковыми у гомойотермных животных [7]. Оказалось, что (табл. 1) впадение сусликов в состояние зимней спячки приводило к определенному изменению аминокислотного состава водорастворимой фракции белков больших полушарий головного мозга. Так, через неделю после наступления спячки в данной фракции белков увеличивалось содержание аспарагиновой и глутаминовой кис-

Таблица 2

Аминокислотный состав водонерастворимых белков больших полушарий головного мозга кавказских малых сусликов при зимней спячке (мкмоль/100 мг белка; $M \pm m$; $n = 7$)

Аминокислоты	Контроль (бодрствующие)	Длительность зимней спячки, сут		
		7	15	30
Аспартат	44,9 $\pm$ 1,3	44,8 $\pm$ 1,6	43,0 $\pm$ 1,4	51,2 $\pm$ 1,2*
Глутамат	50,1 $\pm$ 1,4	54,0 $\pm$ 1,5	53,0 $\pm$ 1,3	55,1 $\pm$ 1,2*
Гистидин	30,1 $\pm$ 1,1	30,6 $\pm$ 1,2	29,8 $\pm$ 1,3	29,7 $\pm$ 1,4
Лизин	33,2 $\pm$ 1,2	32,7 $\pm$ 1,1	32,2 $\pm$ 1,4	31,7 $\pm$ 1,3
Аргинин	16,0 $\pm$ 0,5	17,4 $\pm$ 0,7	15,5 $\pm$ 0,8	17,7 $\pm$ 0,6
Треонин	19,0 $\pm$ 0,8	18,7 $\pm$ 1,1	18,9 $\pm$ 0,9	19,6 $\pm$ 1,2
Серин	25,9 $\pm$ 1,2	26,6 $\pm$ 1,0	25,5 $\pm$ 1,1	26,1 $\pm$ 1,3
Валин	28,5 $\pm$ 1,3	28,6 $\pm$ 1,4	27,4 $\pm$ 1,1	27,9 $\pm$ 1,2
Лейцин	36,0 $\pm$ 1,4	36,6 $\pm$ 1,4	35,9 $\pm$ 1,3	35,6 $\pm$ 1,1
Изолейцин	22,1 $\pm$ 1,1	22,4 $\pm$ 1,2	21,9 $\pm$ 1,3	19,0 $\pm$ 1,2
Фенилаланин	19,9 $\pm$ 1,2	18,2 $\pm$ 1,2	18,6 $\pm$ 1,2	17,6 $\pm$ 1,1
Тирозин	10,1 $\pm$ 0,7	12,0 $\pm$ 0,6	11,4 $\pm$ 0,5	12,9 $\pm$ 0,6
Пролин	30,9 $\pm$ 1,0	29,4 $\pm$ 0,6	30,5 $\pm$ 0,8	26,7 $\pm$ 0,7*
Аланин	37,3 $\pm$ 1,1	36,8 $\pm$ 1,2	38,1 $\pm$ 1,1	33,8 $\pm$ 0,9*
Глицин	34,2 $\pm$ 1,1	34,0 $\pm$ 1,2	34,1 $\pm$ 1,1	34,7 $\pm$ 1,0

лот соответственно на 15 и 13,8 %. Двухнедельный срок спячки сопровождался сохранением увеличенного уровня дикарбоновых аминокислот, а также снижением содержания аргинина (на 17,3%), лейцина (на 13,6%) и пролина (на 15,6%) в гидролизате водорастворимой фракции белков мозга. Интересно, что зимняя спячка месячной длительности характеризовалась поддержанием установленного уровня аминокислот в этой фракции белков мозга, содержащей метаболитические белки. Анализ химического состава аминокислот показал, что независимо от длительности зимней спячки (7, 15 и 30 дней) в водорастворимой фракции из больших полушарий головного мозга сусликов увеличиваются суммы общих заряженных и гидрофильных аминокислот (табл. 3). При этом во все исследуемые периоды зимней спячки не изменялась величина суммы основных, аполярных и гидрофобных аминокислот по сравнению с таковой у бодрствующих животных. Тот факт, что во время зимней спячки модифицируются белки водорастворимой фракции тканей мозга подтверждаются данными табл. 3 о значительном снижении вычисленных величин относительной гидрофобности этих белков.

В противоположность водорастворимой фракции белков мозга аминокислотный состав водонерастворимой фракции при 7- и 15-дневной зимней спячке в количественном отношении не изменялся (табл. 2). Однако к месячному сроку спячки в данной гетерогенной, мембраносвязанной фракции белков мозга содержание аспарагиновой и глутаминовой кислот достоверно увеличивалось, а содержание изолейцина, пролина и аланина снижалось. Эти изменения, проявившиеся при более длительной зимней спячке, сказались на характеристике аминокислотного состава белков исследуемой фракции (табл. 3): увеличились величины содержания суммы общих заряженных, суммы гидрофильных аминокислот, а также соотношения общие заряженные/аполярные аминокислоты, снизилась величина соотношения основные/кислые аминокислоты. Следует заметить, что вычисленная величина относительной гидрофобности белков мозга водонерастворимой фракции (белков преимущественно мембранного происхождения) у сусликов в начале зимней спячки увеличилась (на 14,5 % к недельному сроку, на 6,4 % к двухнедельному сроку спячки), а к месячному периоду снижалась (на 23,4 %).

Можно думать, что наши результаты отражают не только изменение соотношения скорости синтеза и распада отдельных групп белков мозга в динамике зимней спячки [4, 6], но и их перераспределение по фракциям.

Характеристика аминокислотного состава белков больших полушарий головного мозга кавказских малых сусликов при зимней спячке с температурой тела $9 \pm 8^\circ\text{C}$ (мкмоль/100 мг белка; $n = 7$)

Группа аминокислот	Водорастворимые белки				Водонерастворимые белки			
	Конт- роль	Спячка, сут			Конт- роль	Спячка, сут		
		7	15	30		7	15	30
Основные	87,5	85,2	83,5	82,6	79,3	80,7	77,5	79,1
Кислые	99,3	113,6	116,9	115,6	95,0	98,9	98,0	106,3
Общие заряженные	186,8	198,8	19,4	198,2	174,3	179,5	175,5	185,4
Гидрофильные	236,3	248,4	246,9	247,2	219,2	224,8	219,9	231,1
Аполярные	90,3	88,9	89,7	90,8	104,6	105,8	103,8	100,1
Гидрофобные	99,5	101,0	102,4	102,2	114,6	117,8	115,2	113,0
Основные								
Кислые	0,9	0,8	0,7	0,7	0,8	0,8	0,8	0,7
Гидрофильные								
Гидрофобные	2,4	2,5	2,4	2,4	1,9	1,9	1,9	2,0
Общие заряженные								
Аполярные	2,1	2,2	2,2	2,2	1,7	1,7	1,7	1,9
Относительная гидрофобность	+20	-17,3	-6,8	-14,5	+124	+142	+132	+95

Примечание. Относительная гидрофобность выражена в условных единицах.

Показано [8], что зимняя спячка сусликов сопровождается качественным и количественным изменением содержания амидных групп, растворимости, электрофоретической подвижности белков мозга, что несомненно приводит к переходу их из одной фракции в другую. Здесь имеются в виду конформационные изменения белковых молекул, связанные с прочным встраиванием в клеточные мембраны, откуда эти белки могут быть извлечены только органическими растворителями. Возможность подобных перестроек показана для нейроспецифического белка S-100 во время зимней спячки [4].

Ранее нами [7] обнаружено снижение относительной гидрофобности белков мозга и при принудительной глубокой гипотермии. По-видимому, снижение гидрофобности белков мозга при пониженных температурах тела указывает на развитие конформационных изменений на уровне белковых молекул. Известно, что снижение температуры от зоны температурного оптимума жизнедеятельности организма (нормотермия или бодрствование) уменьшает лабильность белков [1]. Приспособление белковых молекул к новым температурным условиям, по-видимому, осуществляется путем повышения их гибкости за счет уменьшения гидрофобных взаимодействий. Установленный нами факт снижения гидрофобности белков водорастворимой и водонерастворимой фракций тканей мозга на этапах зимней спячки свидетельствует не только о повышении конформационной гибкости белков, но и определяет их устойчивость к действию протеиназ [8].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александров В. Я. Клетки, макромолекула и температура. — Л.: Наука, 1975. — 225 с.
2. Вторая всесоюз. конф. «Механизмы криоповреждения и криозащиты биологических объектов». (Харьков, декабрь, 1984 г.): Тез. докл. — Харьков: Б. и., 1984. — 284 с.
3. Данн М., Медди Э. Методы анализа мембранных белков // Биохимические исследования мембран. — М.: Мир, 1979. — С. 53—68.
4. Дерий Л. В., Штарк М. Б. О характере белкового синтеза в головном мозге зимоспящих млекопитающих // Докл. АН СССР. — 1983. — 269, № 4. — С. 1010—1013.
5. Крепс Е. М. Липиды клеточных мембран. — Л.: Наука, 1981. — 339 с.
6. Хочака П., Самеро Дж. Стратегия биохимической адаптации. — М.: Мир, 1977. — 398 с.

7. Эмирбеков Э. З., Абдуллаев Р. А., Кличханов Н. К. Патологические особенности белкового метаболизма мозга теплокровного организма при гипотермии // Теорет. вопр. строения и деятельности мозга. — М.: Изд-во Ин-та мозга АМН СССР, 1983. — С. 186—189.
8. Эмирбеков Э. З., Львова С. П. Механизмы биохимических изменений при низких температурах тела. — Ростов-на-Дону: Изд-во РГУ, 1985. — 80 с.
9. Эмирбеков Э. З., Абдуллаев Р. А., Исмаилов И. А., Ким Е. Р. Нейрохимические изменения при природной адаптации к низкой температуре тела // II Всесоюз. конф. «Важнейшие теоретические и практические проблемы терморегуляции». — Минск: Б. и., 1985. — С. 326.
10. Aboderin A. A. An empirical hydrophobicity scale for aminoacids and some of applications // Int. J. Biochem. — 1971. — 2, N 11. — P. 537—544.

Дагестанский гос. ун-т
им. В. И. Ленина,
г. Махачкала

Поступила 28.01.88

E. Z. EMIRBEKOV, R. A. ABDULLAYEV

THE AMINO ACID COMPOSITION OF GROUND SQUIRREL BRAIN PROTEIN FRACTIONS DURING HIBERNATION

V. I. Lenin State University of Dagestan, Makhachkala

The contents of aspartate and glutamate in water-soluble proteins of ground squirrel brain have been shown to increase by 14 % during one week hibernation, with increasing the content of dicarbonic amino acids and decreasing the contents of arginine (by 17 %), leucine (by 17.8 %), and proline (by 15.6 %) after week and month hibernation periods. Changes in brain water-insoluble proteins were observed only after 30 days of hibernation, namely the contents of glutamate and aspartate increased and the contents of proline and alanine decreased. The calculated relative hydrophobicity of the studied brain proteins appeared to undergo different changes at the onset of hibernation with decreasing to a month period.

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

УДК 57.043:578.088

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

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЭО-1500 ПРИ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИИ ЭРИТРОЦИТОВ В БОЛЬШИХ ОБЪЕМАХ

Исследовалось повреждение эритроцитов при двухэтапном режиме охлаждения: медленном на стадии фазового перехода вода — лед и быстром после его прохождения. Получены отрицательные результаты влияния подобных режимов на сохранность эритроцитов.

Сделано предположение, что в условиях медленного течения фазового перехода вода — лед причиной повреждения эритроцитов является образование на поверхности мембран микротрещин, стабилизированных поверхностноактивными молекулами ПЭО-1500 и приводящих к разрушению мембраны при дальнейшем охлаждении.

Для оптимальной криозащиты эритроцитов требуется примерно 30 % раствора непроникающих криопротекторов [1, 5]. Расчетные данные свидетельствуют о сохранении защитных свойств полимерных соединений и при значительном уменьшении их концентрации [4]. Опытные проверки подтвердили это утверждение, однако скорости замораживания при этом несравненно возросли. Отсюда следует, что малые концентрации непроникающих криопротекторов требуют высоких скоростей охлаждения, а при больших концентрациях высокие скорости замораживания не обязательны. Можно предположить, что при уменьшении скорости замораживания эритроцитов начинают проявляться или усиливаться какие-то процессы, способствующие их повреждению.

Таким образом, представляет интерес оценить возможность повышения сохранности эритроцитов, криоконсервированных в присутствии ПЭО-1500 в концентрации до 10 %, путем варьирования скорости охлаждения на различных его этапах.

Охлаждение больших объемов эритроцитов с высокой скоростью достаточно сложная задача. Повысить скорость охлаждения можно при уменьшении толщины замораживаемого объема либо при вращении или встряхивании во время погружения в жидкий азот. Однако эти приемы трудно применить на практике. Скорость замораживания биоматериала на начальном этапе, помимо прочих факторов (интенсивность теплоотвода окружающей среды, теплопроводность стенок контейнера, теплопроводность охлаждаемого объекта и т. д.), определяется теплотой фазового перехода вода — лед, которая значительна по величине. Можно считать, что при постоянстве параметров процесса охлаждения, после окончания фазового перехода вода — лед, скорость охлаждения повысится. Если предположить, что для сохранности эритроцитов требуется высокая скорость охлаждения только в определенном температурном интервале и в этот интервал не входит температура начала фазового перехода вода — лед, то представляется возможным, частично реализовав фазовый переход во всем объеме контейнера, повысить скорость охлаждения его при более низких температурах. При этом необходимым условием является проведение фазового перехода вода — лед в условиях, не повреждающих эритроциты: умеренный осмотический напор воды на мембрану, допустимая степень обезвоживания клеток.

Нами исследована сохранность эритроцитов донорской крови человека при медленном охлаждении до различных отрицательных температур с вариацией времени экспозиции при них. В качестве криопротектора использовали полиэтиленоксид 1500 (ПЭО-1500), приготовленный в 10 и 20 %-ных концентрациях на физиологическом растворе. Смешивание криопротектора с эритроцитами производили в соотношении 1 : 1, время экспозиции равнялось 30 мин ($t = 24^\circ\text{C}$). Сохранность эритроцитов оценивалась по содержанию свободного гемоглобина и осмотической хрупкости. Замораживание и отогрев эритроцитомассы проводили на установке для отработки режимов криоконсервирования в элементарных объемах [2]. Объем замораживаемой суспензии эритроцитов равнялся 0,2 мл. Условия замораживания — отогрева во всех опытах оставались постоянными: скорость охлаждения $(0,2 \pm 0,05)^\circ\text{C}/\text{мин}$, скорость отогрева $(0,7 \pm 0,05)^\circ\text{C}/\text{мин}$. Ошибка опытов при доверительной вероятности 0,95 равна 14 %.

Результаты экспериментов приведены на рисунках 1—4. Полученные зависимости свидетельствуют о том (рис. 1 и 2), что температурная зона начала повреждения эритроцитов находится в диапазоне $-3,0 \div -3,5^\circ\text{C}$. При дальнейшем понижении температуры повреждения резко возрастают. Следовательно, можно считать, что при температуре кристаллизации внеклеточной среды (до -3°C) повреждение эритроцитов не происходит.

По данным гемолиза, экспозиция эритроцитомассы при -3°C влияет незначительно на их сохранность, а при -2°C практически не оказывает влияния (рис. 3, 4). Осмотическая хрупкость эритроцитов в этой серии опытов изменялась незначительно ($0 \div 2\%$).

Полученные зависимости сохранности эритроцитов позволили наметить режим охлаждения, допускающий увеличение скорости охлаждения в предполагаемом повреждающем диапазоне температур: охлаждение до -2°C со скоростью $0,2^\circ\text{C}/\text{мин}$, стабилизация при этой температуре в течение 25 мин, охлаждение от -2 до -196°C с максимально большой скоростью. При реализации этого режима охлаждения скорость охлаждения от -2°C до -196°C в разных вариантах достигала 85, 450, 1100 $^\circ\text{C}/\text{мин}$. При использовании этого режима достаточной криозащиты не наблюдалось. Так, под защитой 5 % ПЭО-1500 происходил почти полный гемолиз эритроцитов, под защитой 10 % ПЭО-1500 выход свободного гемоглобина составлял 450 мг %, тогда как при замораживании по одноэтапной программе со скоростью 300—400 $^\circ\text{C}/\text{мин}$ эта величина не превышала 150 мг %. Такой результат свидетельствует о том, что повреждение эритроцитов, не фиксируемое применявшимися нами методами, произошло в температурном диапазоне до -2°C . Проявилось это скрытое повреждение при дальнейшем охлаждении.

Возможно, что это повреждение мембраны клетки и оно не связано с ее полным разрушением. Можно предположить, что причиной этого повреждения на данном этапе был напор воды на мембрану или чрезмерное обезвоживание клетки растущими кристаллами льда. Эти процессы могут вызывать локальные нарушения мембраны в виде микротрещин, «залечивание»

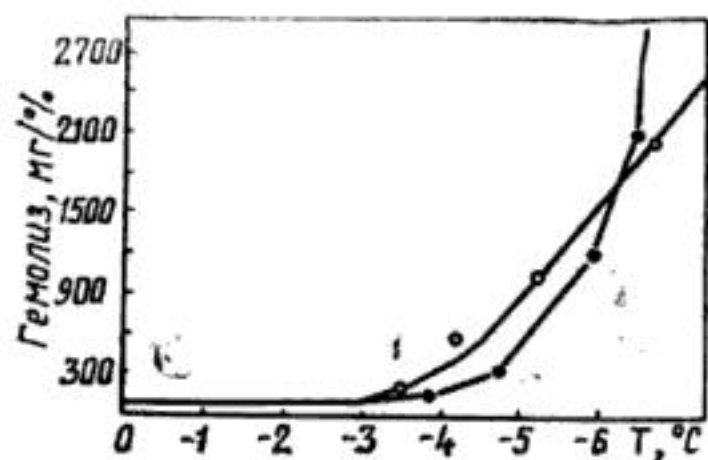


Рис. 1

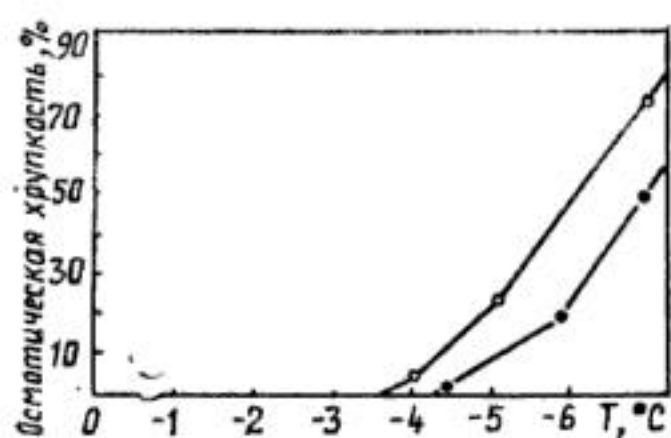


Рис. 2

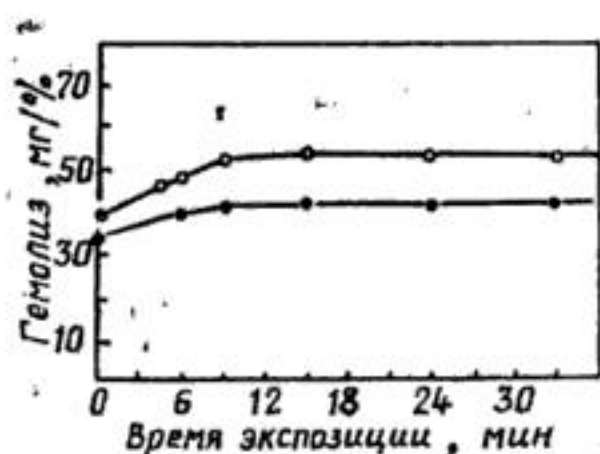


Рис. 3

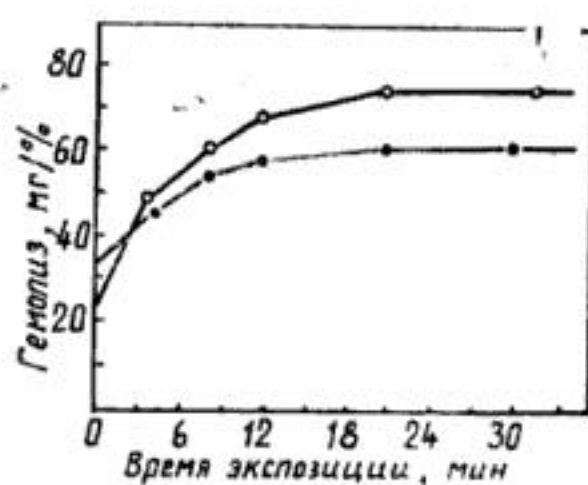


Рис. 4

Рис. 1. Влияние температуры охлаждения на гемолиз эритроцитов: ● — 10 % ПЭО-1500; ○ — 20 % ПЭО-1500

Рис. 2. Влияние температуры охлаждения на осмотическую хрупкость эритроцитов: ● — 10 % ПЭО-1500; ○ — 20 % ПЭО-1500

Рис. 3. Влияние экспозиции при -2°C на сохранность эритроцитов: ● — 10 % ПЭО-1500; ○ — 20 % ПЭО-1500

Рис. 4. Влияние экспозиции при -3°C на сохранность эритроцитов: ● — 10 % ПЭО-1500; ○ — 20 % ПЭО-1500

которых затрудняется адсорбцией в них молекул ПЭО-1500, являющихся поверхностноактивными на границе раздела внеклеточная среда — мембрана клетки. Стабилизация микротрещин мембраны молекулами ПЭО-1500 включает и процесс проникновения молекул ПЭО-1500 в них. Процесс этот, по-видимому, затруднен и не реализуется при больших скоростях охлаждения из-за недостатка времени. При выбранном нами режиме криоконсервирования достаточно времени для развития микротрещин. Мембраны с такими нарушениями не выдерживают осмотический напор воды или деформацию при обезвоживании и разрушаются при дальнейшем понижении температуры от -2°C .

Подобное действие наблюдается при адсорбционном понижении прочности твердых тел в процессе разрушения их в растворе поверхностноактивного вещества. Этот эффект широко используют в металлдобывающей и горнодобывающей промышленности [3].

Таким образом, на примере ПЭО-1500 изучена возможность применения непроникающих криопротекторов для консервации эритроцитов в больших объемах. Полученные данные свидетельствуют о недостаточной криозащите используемых концентраций криопротектора при медленном фазовом переходе вода — лед. Сделано предположение о том, что в условиях медленного протекания стадии фазового перехода вода — лед причиной повреждения эритроцитов является образование на поверхности их мембран микротрещин, стабилизированных поверхностноактивными молекулами ПЭО-1500 и приводящих к разрушению мембраны при дальнейшем охлаждении.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бредихина Л. П. Функциональная сохранность эритроцитов при низкотемпературном консервировании в растворах полиэтиленоксида: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Харьков, 1983. — 16 с.
2. Новиков А. Н., Олейник С. Т., Ишков Г. С. и др. Лабораторная установка для обработки режимов криоконсервирования биологических объектов в элементарных объемах // Криобиология и криомедицина. — 1983. — Вып. 12. — С. 75—78.
3. Ребиндер П. А., Штейнер Л. А., Жигач К. Ф. Понизители твердости в бурении. — М.: Изд-во АН СССР, 1944. — 102 с.
4. Doeblner G. F., Rowe A. W., Rinfret A. P. Freezing of mammalian blood and its constituents // Cryobiology. — New York: Acad. Press., 1966. — P. 407.
5. Rinfret A. P., Cowley C. W., Doeblner G. F., Schreiner H. R. The preservation of blood by rapid freezing // Proc. Congr. Int. Soc. Blood Trans., 9th, Mexico (1962). — Basel: Karger, 1964. — P. 80.

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

Поступила 01.07.88

A. N. NOVIKOV, S. T. OLEYNIK, O. V. LIPINA, E. N. CHERNYSH CRYOPRESERVATION OF LARGE VOLUMES OF ERYTHROCYTES USING PEO—1500

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

Damage of erythrocytes subjected to two-step cooling has been studied at the stages of slow cooling during water — ice phase transition, and rapid cooling after completion of the phase transition. Negative results have been obtained. It has been suggested that erythrocytes were damaged during slow water — ice phase transition by microcracks appearing on their surfaces, which were stabilized by surfactant molecules of PEO-1500 causing membrane damage on further cooling.

УДК 57.043:575.014.41

Г. Ю. Максудов, В. Г. Панченко

ОПЫТ КРИОКОНСЕРВАЦИИ СПЕРМЫ ЖУРАВЛЕЙ

Сперму четырех видов журавлей криоконсервировали с помощью трех различных методик, применяющихся в промышленном птицеводстве. Лучшие результаты были получены при использовании модифицированной методики Секстона и Гн. Обсуждаются предварительные результаты четырехлетних экспериментов.

Криоконсервация гамет редких видов животных является составной частью программы сохранения генома [1]. Создание банков замороженной спермы поможет решить и ряд практических вопросов, возникающих при разведении исчезающих видов в неволе, в частности поддержание генетического разнообразия искусственных популяций, сохранение гамет ценных производителей, использование спермы неспособных к копуляции самцов и т. п. [4, 6, 8]. Мировая фауна журавлей насчитывает 15 видов, 7 из которых отнесены к категории редких и исчезающих. Для их спасения созданы специализированные питомники, в том числе питомник редких видов журавлей Окского государственного биосферного заповедника. Он и послужил базой для проводившихся в 1985—1988 гг. исследований.

Журавли — моногамы с коротким периодом половой активности. Объем их эякулята крайне мал (0,01—0,08 мл.). Для сравнения — эякулят петуха равен 0,5—0,8 мл, канарейки — 0,01 мл [8]. Количество и объем получаемых доз спермы журавлей сильно ограничены и вынуждают отказаться от многих традиционных приемов.

Сперму получали через день массажем [5, 6, 8]. Полученный эякулят сразу доставляли в лабораторию. Объем пробы измеряли прогретой стеклянной пипеткой емкостью 0,1 мл. Концентрацию спермиев подсчитывали в камере Горяева. Качество свежего и замороженно-оттаянного семени определяли по процентному содержанию спермиев с прямолинейным поступательным движением и по результатам окрашивания эозином и трипановым синим. Микроскоп был оборудован термостатированным столиком.

Таблица 1

Основные характеристики методов замораживания, применявшихся при консервации спермы журавлей

Метод замораживания	Время эквilibрации до и после добавления протектора, мин	Протектор	Режим охлаждения	Режим оттаивания до появления жидкой фазы
УНИИП [3]	20±0	8—10% ДМФ	От 0 до —96° С, 50° С/мин; от —96 до —196° С, 15° С/мин	Водяная баня от 40 до 60° С
ВНИИРГЖ [5]	20±0	8—10% ДМА	Автокапсулирование накапыванием в жидкий азот Наслоение на стенки охлажденного до —80° С сосуда с последующим погружением в жидкий азот	Водяная баня от 40 до 60° С
Секстон и Ги [9]	15±10	6% ДМСО	От 0 до —20° С, 1° С/мин; от —20 до —80° С, 50° С/мин; от —80 до —196° С, 160° С/мин	«на снегу», 0° С

Примечание. В наших опытах в каждом методе опробовались все три криопротектора (ДМА, ДМФ, ДМСО).

Таблица 2

Активность спермы журавлей при криоконсервации различными методами, %

Метод замораживания	Канадский журавль		Серый журавль		Красавка		Стерх	
	1	2	1	2	1	2	1	2
УНИИП [3]	50	0	90	10	80	0 ³	— ⁴	—
ВНИИРГЖ [5]	50	0	70	0 ³	90	0 ³	30	0 ³
	90	0 ³	—	—	—	—	—	—
Секстон и Ги [9]	75	50	80	50	80	45	80	30
	90	40	99	50	—	—	—	—

1 — активность спермы до замораживания; 2 — активность после оттаивания; 3 — в мазке найдены единичные подвижные спермии; 4 — замораживание не проводилось.

Таблица 3

Некоторые показатели спермы журавлей

Вид	Объем эякулята, мкл		pH		Концентрация, сп/мл
	1	2	1	2	
Канадский журавль (<i>Grus canadensis</i>)	43,7	41,9	7,4	2,9	2,0—6,0×10 ⁷
Серый журавль (<i>Grus grus</i>)	36,75	66,4	7,2	2,85	2,5×10 ⁷
Красавка (<i>Anthropoides virgo</i>)	28,1	34,9	7,1	3,0	1,2—2,0×10 ⁷
Стерх (<i>Grus leucogeranus</i>)	43,5	55,4	7,1	3,5	6,0×10 ⁷

1 — среднее значение; 2 — константа вариации (%).

Для определения pH использовали лакмусовую бумажку «Merck» диапазона 6,4—8,0. Точность дозировки сред и протекторов обеспечивалась пипеточными дозаторами «Eppendorf». Сперма замораживалась в пластиковых ампулах емкостью 1 мл. Крипротекторы (диметилформамид, диметилацетамид, диметилсульфоксид) в 1985—86 гг. были получены из Института проблем криобиологии и криомедицины АН УССР, в 1987—88 гг. использовались реактивы «Serva». В наших опытах применялись следующие методики: УНИИП [5], ВНИИРГЖ [3], Секстона и Ги [9]. Из краткое описание приведено в табл. 1. Результаты криоконсервации спермы и её анализа приведены в табл. 2 и 3.

Из использовавшихся разбавителей: ЛКС-1 (ВНИИРГЖ), среда «Юбилейная» (ВНИИРГЖ) [3] и Б-26 модифицированная, лучшие результаты (при различных методиках замораживания) были получены с последним. Полученная из УНИИП, среда Б-26 имеет следующий состав (на 100 мл бидистиллированной воды, г): $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ — 0,12, KH_2PO_4 — 0,2, глицин — 0,75 поливинилпирролидон — 0,04, фруктоза — 0,61, лактоза — 4,44. Сперма журавлей оказалась чрезвычайно чувствительной к токсическому действию крипротекторов. Доза 8—10 % конечной концентрации протектора в разбавленном семени, предусмотренная методиками [3, 5], вызвала сильное снижение активности спермиев сразу после добавления протектора. Положительные результаты в наших экспериментах были получены в диапазоне концентраций протекторов 2—6%. Это согласуется с данными других авторов [6, 7, 8]. Все использовавшиеся протекторы (ДМА, ДМФ, ДМСО) показали сходные результаты для каждого метода.

Исследования зарубежных авторов выполнялись на сперме канадских журавлей [6, 7, 8, 9]. Для этого вида нами получены близкие результаты. Данные Б. Н. Вепринцева с соавт. [2] не подтвердились. Возможно, это обусловлено колебаниями в качестве исходного семени, токсическим действием протекторов, либо неучтенными факторами, поскольку подробного описания процедур замораживания эти авторы не приводят. Кроме того, в экспериментах [2] размораживание спермы проводилось в теплой водяной бане. В наших опытах и по другим данным [6, 7] оттаивание спермы «на снегу» имело очевидное преимущество по качеству получаемой спермы. Неудачная попытка криоконсервации спермы журавлей по методу [3], вероятно, объясняется его специфичностью для спермы петухов. Осеменение кур замороженной по этому методу спермой давало значительно лучшие результаты, чем метод [8].

Изучение окрашенных препаратов подтвердило наблюдения [6] о наличии в оттаянных образцах значительного количества неподвижных неокрашивающихся спермиев. Такие сперматозоиды являются потенциально фертильными, они могут активироваться и оплодотворить яйцеклетку. Однако пробные осеменения размороженной спермой не дали положительных результатов. В опытах использовали только одну пару канадских журавлей с имевшим низкое исходное качество спермы самцом. В других работах оплодотворяемость яиц журавлей при осеменении оттаянной спермой достигала 20 % [6]. Получение устойчиво высоких результатов замораживания затрудняется малыми знаниями о биохимии и физиологии спермы журавлей. Это не позволяет моделировать происходящие при консервации процессы. Эмпирический подбор оптимальных режимов осложняется малыми объемами эякулятов, ограниченным числом использующихся самцов, необходимостью приучения птиц к массажному сбору спермы. Вполне возможно, что сперма разных видов журавлей отличается по устойчивости к замораживанию. Очевидно, что методы криоконсервации спермы журавлей нуждаются в дальнейшем совершенствовании и изучении.

Авторы благодарят Т. А. Кашенцеву за большую помощь в работе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вепринцев Б. Н., Ротт Н. Н. Проблема сохранения генофонда. — Пущино: ОНТИ НЦБИ. — 1984. — 48 с.

2. Вепринцев Б. Н., Жовнир О. А., Костин И. О. и др. Криоконсервация половых продуктов некоторых видов диких птиц // Первое Всесоюз. совещ. по пробл. зоокультуры: Тез. докл.— М., 1986.— Т. 2.— С. 16—19.
3. Курбатов А. Д. Низкотемпературное хранение спермы птиц.— Криобиология.— 1985.— № 3.— С. 13—15.
4. Максудов Г. Ю., Панченко В. Г., Зудов В. Е. К возможности криоконсервации спермы журавлей // Первое Всесоюз. совещ. по пробл. зоокультуры: Тез. докл.— М., 1986.— Т. 2.— С. 58—59.
5. Сахацкий Н. И. Низкотемпературная консервация спермы гусей и уток.— Пушино: ОНТИ НЦБИ, 1984.— 23 с.
6. Gee G. F., Sexton T. J. Artificial insemination of cranes with frozen semen // Proc. Int. Crane Workshop.— 1979.— N 1.— P. 89—94.
7. Gee G. F., Bakst M. R., Sexton T. J. Cryogenic preservation of semen from the greater sandhill crane // J. Wild. Manage.— 1985.— 49, N 2.— P. 480—484.
8. Gee G. F., Temple S. A. Artificial insemination for breeding non-domestic birds // Symp. Zool. Soc.— London, 1978.— Vol. 43.— P. 51—72.
9. Sexton T. J., Gee G. F. A comparative study on the cryogenic preservation of semen from the sandhill crane and the domestic fowl // Symp. Zool. Soc.— London, 1978.— Vol. 43.— P. 89—95.

МГУ им. М. В. Ломоносова;
Окский гос. биосферный
заповедник

Поступила 31.05.88

G. Yu. MAXUDOV, V. G. PANCHENKO

THE EXPERIENCE OF FREEZING OF CRANE SEMEN

M. V. Lomonosov State University of Moscow; State Biosphere Reserve on the Oka

Semen of four crane species were frozen by three methods used in poultry breeding. The best results were obtained with a modified method of Sexton and Gee. The preliminary data accumulated during four years are discussed.

КРИОГЕННОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

УДК 57.043

Ю. Г. Боженков, В. А. Афанасьев

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ В СОЗДАНИИ КРИОХИРУРГИЧЕСКИХ АППАРАТОВ И ИНСТРУМЕНТОВ

Проведены исследования различных видов криохирurgicalических аппаратов и инструментов, освещены их недостатки и достоинства. Разработана классификация криохирurgicalических аппаратов и инструментов.

Криогенный метод лечения широко используют в клинической практике. В настоящее время в литературе описано значительное количество криохирurgicalических аппаратов и криоинструментов (КХА и КХИ) для медицины [4, 5, 6]. Криоаппарат — это устройство для локального замораживания тканей, включающее: источник холода; элемент, транспортирующий холод; инструмент для криовоздействия; систему управления и регулирования. Криоинструмент — это активная часть криоаппарата, предназначенная для криовоздействия на ткани опосредствованным или непосредственным путем. Предложены различные классификации КХА и КХИ [2, 3, 6]. Однако в литературе не отражены вопросы компоновки инструментов с источниками холода, предельных объемов замораживаемой ткани, ограничения по числу криовоздействий, работоспособности КХИ различного назначения с различными способами передачи холода. При создании КХА и КХИ не учитывают достижения в области криогенной техники, в частности микрокриогенной, организационных сложностей, которые могут возникнуть при массовом изготовлении и применении этих систем в медицинской практике. Нами предпринята попытка на основании литературных данных и собственного опыта определить наиболее перспективное направление в создании и применении аппаратов и инструментов. Для этого нами разработаны класси-

фикации КХА и КХИ (рис. 1, 2), учитывающие функциональную связь аппаратов и инструментов и достижения в микрокриогенной технике.

Из всех микрокриогенных систем могут найти применение в криохирургии баллонные дроссельные, компрессорные дроссельные, системы на базе криостата, системы на базе криостата с автономным ожижителем воздуха (азота). Однако каждая из этих систем имеет свои преимущества и недостатки при использовании в медицине (таблица).

КХА на базе баллонной дроссельной системы наиболее прост по устройству и в эксплуатации, легко автоматизируется, наиболее дешевый в изго-



Рис. 1. Классификация криохирургических аппаратов

товлении. К недостаткам следует отнести малую холодопроизводительность, что существенно ограничивает область применения КХА. К организационным трудностям при массовом применении следует отнести заправку и транспортировку баллонов с газом. Рекомендуемая область применения — офтальмология, оториноларингология, нейрохирургия, где требуется замораживать небольшие объемы тканей (до 1—3 см³).

Основными преимуществами компрессорной дроссельной системы и жидкостной МКС (микрокриогенной системы) с автономным ожижителем воздуха (например газовой криогенной машины Стирлинга) является автономность по источнику холода. Однако системы являются сложными по конструкции, дорогостоящими, а их ремонт возможен только на предприятии-изготовителе. Несмотря на их необходимость, особенно для клиник, удаленных от центров производства криогенных жидкостей, выпуск в настоящее время этой аппаратуры ограничен.

Наиболее перспективно применение в КХА жидкостных МКС на базе сосуда Дьюара (криостата). Эти аппараты можно использовать только в лечебных учреждениях, приближенных к центрам производства криогенных

жидкостей, хотя вопрос поставки жидкого азота в настоящее время в клиниках областных городов СССР не является проблемным и может быть разрешен на местах.

Нами были разработаны и испытаны КХА на базе каждой из МКС, приведенных в таблице. В результате экспериментальных и клинических исследований выявлено, что наиболее перспективным является КХА на базе жидкостной МКС, выполненный в виде малогабаритного металлического термоса, встроенного в инструмент, емкостью 300—600 мл по жидкому азоту в комплекте с сосудом Дьюара. Аппарат оказался простым и удобным в эксплуатации, безопасным при работе, легко транспортировался [9].



Рис. 2. Классификация криохиргических инструментов

Все криохиргические инструменты (рис. 2) можно классифицировать по назначению, способу передачи холода к тканям, способу связи с источником холода (криоагентом). Наиболее перспективными следует считать автономные КХИ с непосредственным способом передачи холода к тканям. При замораживании патологических участков, расположенных в труднодоступных областях, более приемлем опосредствованный способ. При проектировании КХИ с опосредствованным способом передачи холода с целью повышения эффективности передачи холода, надежности его работы и исключения пленочного кипения криоагента необходимо обеспечивать интенсивную циркуляцию криоагента внутри криоинструмента.

Во всех случаях, когда возможна передача криоагента непосредственно на ткань, КХИ с непосредственным способом передачи холода являются наиболее предпочтительными (в плане повышения эффективности холодопередачи, экономичности, упрощения конструкции). Для исключения растекания жидкого азота по тканям необходимо использовать мягкие пористые материалы, уложенные на поверхность патологического очага. Мы широко использовали 8—14-слойный марлевый аппликатор, выкроенный

Сравнительные характеристики микрокриогенных систем (+ МКС удовлетворяют требованию, — МКС не удовлетворяют требованию)

Требования к МКС	Типы МКС и их соответствие требованиям			
	Баллонная дроссельная	Компрессионная дроссельная	Жидкостная	Жидкостная с автономным охладителем
1. Диапазон температуры охлаждения от -20 до -196 °С	+	+	+	+
2. Объем замороженной ткани при однократном криовоздействии до 50 см^3	до 1 см^3	до 5 см^3	+	+
3. Скорость охлаждения ткани, примыкающей к наконечнику, не менее 10 °С/с	+	+	+	+
4. Время получения заданной области замораживания в одном цикле не более 10 мин	+	+	+	+
5. Число повторных циклов криовоздействия за период операции — не менее двух раз	+	+	+	+
6. Число циклов криовоздействия до профилактического ремонта — не менее 10^4	—	—	+	—
7. Число циклов криовоздействия в течение всего ресурса работы не менее $3 \cdot 10^5$	—	—	+	—
8. Время подготовки аппарата к работе не более 10 мин	+	+	+	+
9. МКС должна быть:				
— работоспособной с канюлями малого диаметра (3 мм)	+	+	+	+
— работоспособной с криоинструментами различного назначения, с различными способами холодопередачи	—	—	+	+
— работоспособной при отклонении от вертикали $\pm 90^\circ$	+	+	+	+
— автономной по источнику холода	—	+	—	+
— безопасной для пациента и обслуживающего персонала	+	+	+	+
10. Габариты: минимальные	—	—	+	—
11. Масса: минимальная	—	—	+	—
12. Стоимость: минимальная	+	—	+	—
13. Шум в работе не более 60 дБ	+	—	+	—
14. Количество обслуживающего персонала не более 1 человека	+	+	+	+

в соответствии с размером и конфигурацией патологического очага. После наложения аппликатора на образование его насыщали жидким азотом из криораспылителя. Марля в силу гигроскопичности впитывает криоагент и не дает ему растекаться по поверхности органа или ткани, испарение происходит непосредственно в атмосферу. Необходимо избегать перенасыщения марли криоагентом, что приводит к стеканию его в отлогие места.

Способ воздействия на ткань распылением был опробован и на полых органах. Подача жидкого азота в полость желудка способствует быстрому и эффективному замораживанию органа. При этом способе замораживания площадь поперечного сечения отводящей криоагент трубки должна быть в 140 и более раз больше площади поперечного сечения подводящей криоагент трубки из-за опасности разрыва стенки желудка парами жидкого азота [8]. Кроме того, использовали криохирургические устройства, позволяющие замораживать паренхиматозный орган при непосредственном введении жидкого азота в глубь органа или тканей. С целью предупреждения закупорки отводящей криоагент трубки кровью процесс замораживания составили из двух фаз. В первую, после введения наконечника в глубь органа, производили опосредствованное замораживание окружающих тканей [7] или продували отводящие элементы атмосферным воздухом, создавая полость в тканях [9]. Во вторую фазу осуществляли непосредственное введение криоагента в образовавшуюся полость с удалением образовавшихся паров через отводящие элементы.

Для реализации противовоспалительного эффекта мы использовали замораживание гнойных ран криоглицерином [10]. Получали его путем замораживания глицерина в жидком азоте, при этом он из жидкости превращался в твердое вещество. При помешивании образовывались твердые гранулы диаметром от 1 до 5 мм, которые шпателем засыпали в полость гнойника. В результате малой теплоемкости криоглицерин быстро таял и замораживал ткани на небольшую глубину (не более 5 мм). Кроме того, реализовывалось криопротекторное действие, замораживая ткани, криоглицерин предохранял их от крионекроза.

Таким образом, в результате выполненных исследований нами разработана классификация КХА и КХИ, которая облегчает решение вопросов их унификации и стандартизации. Апробированы КХА на базе баллонной и компрессорной дроссельных МКС, жидкостных МКС и жидкостных с автономным оживителем, различные типы криоинструментов. Определено, что наиболее перспективными направлениями в разработке аппаратов и инструментов является создание их на базе малогабаритных металлических термосов емкостью 300—600 мл, встроенных в инструмент, которые наиболее удобны в клинической работе.

Во всех случаях, когда возможна передача криоагента непосредственно на ткань, наиболее перспективными являются автономные КХИ с непосредственным способом передачи холода к тканям. Для повышения эффективности криовоздействия КХИ с опосредованным способом охлаждения необходима принудительная циркуляция жидкого криоагента в инструменте.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Боженков Ю. Г. Использование локального замораживания в клинической хирургии // Хирургия. — 1988. — № 4. — С. 145—148.
2. Бородай Ю. Н., Веркин Б. И. Классификация инструментов для криохирургии // Мед. техника. — 1971. — № 4. — С. 34—36.
3. Геселевич А. М., Комаров Б. А. Современный криохирургический инструментарий и показания к его применению // Тр. 3-го съезда хирургов РСФСР. — Горький: Б. и., 1969. — С. 343—345.
4. Криохирургия / Под ред. Э. И. Канделя. — М.: Медицина. — 1974. — 303 с.
5. Пачес А. И., Шенталь В. В., Птуха Т. П. Криогенный метод лечения опухолей головы и шеи. — М.: Медицина, 1978. — 168 с.
6. Практическая криомедицина / Под ред. В. И. Грищенко и Б. П. Сандомирского. — Киев: Здоров'я, 1987. — 248 с.
7. А. с. 728853 СССР, МКИ³ А 61 В 17/36. Устройство для локального замораживания тканей криораспылением / В. А. Афанасьев, А. Н. Кабанов, Ю. Г. Боженков, В. А. Плоскирев // Открытия. Изобретения. — 1980. — № 15. — С. 29.
8. А. с. 1158180 СССР, МКИ⁴ А 61 В 17/36. Криохирургический зонд / Ю. Г. Боженков, В. А. Афанасьев // Открытия. Изобретения. — 1985. — № 20. — С. 27.
9. А. с. 1242142 СССР, МКИ⁴ А 61 В 17/36. Криохирургический инструмент / Ю. Г. Боженков, В. А. Афанасьев // Открытия. Изобретения. — 1986. — № 25. — С. 27.
10. А. с. 1291151 СССР, МКИ⁴ А 61 К 31/045. Способ лечения гнойных полостных заболеваний / Ю. Г. Боженков // Открытия. Изобретения. — 1987. — № 7. — С. 25.

Омский гос. мед. ин-т

Поступила 16.03.88

Yu. G. BOZHENKOV, V. A. AFANASYEV

PERSPECTIVE APPROACHES IN CREATING CRYOSURGICAL EQUIPMENT

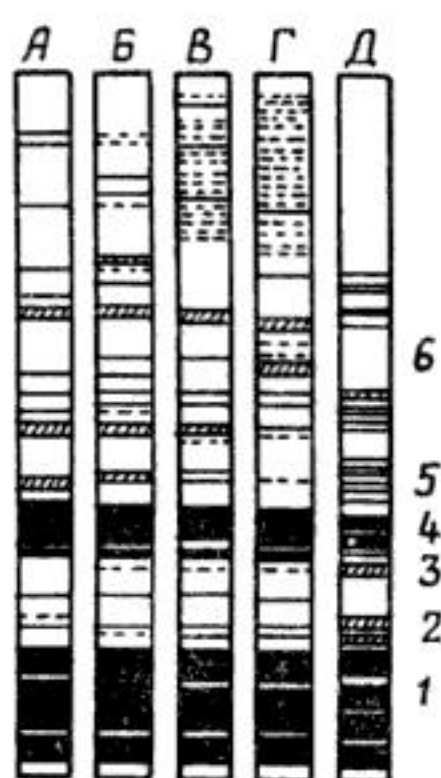
State Medical Institute of Omsk

Different types of cryosurgical equipment were discussed in relation to their faults and benefits. Cryosurgical units and instruments have been classified.

СПЕКТР НЕГИСТОНОВЫХ БЕЛКОВ И СООТНОШЕНИЕ РНК И ДНК В ХРОМАТИНЕ ПЕЧЕНИ КРЫС ПОСЛЕ КРИОВОЗДЕЙСТВИЯ

Структурные и функциональные изменения хроматина, касающиеся негистоновых белков и соотношения нуклеиновых кислот в хроматине печени, могут представлять интерес с точки зрения реализации механизмов влияния локальных криовоздействий на печень, вызывающих ее регенерацию [1]. Негистоновые белки (НГБ) — многочисленный гетерогенный класс ДНК-связывающих белков, выполняющих в клетке функции регуляторов экспрессии генов. В состав НГБ входят также разнообразные полимеразы и белки, аналогичные сократительным белкам мышц. Набор НГБ изменяется по составу, количеству, химическим модификациям в зависимости от биологического состояния клетки [3, 4]. Действие различных внешних и внутренних факторов может оказывать влияние на соотношение РНК и ДНК в хроматине [4].

В работе использованы 38 белых крыс-самцов линии Вистар массой 200—250 г, которых подвергали различного вида воздействиям (таблица). Криовоздействие на печень в двух точках с экспозицией 30 с в каждой проводили аппликатором с температурой на воздухе -180°C и диаметром наконечника 7 мм, получая крионекроз 8—10 % массы органа. Животных брали в опыт через двое суток после операции. Белковый состав выделенного хроматина определяли путем электрофореза образцов в ПААГ с ДДС — Na [2]. Для определения местоположения гистонов в спектре белков хроматина параллельно с опытными образцами велась разгонка чистых гистоновых белков крыс. Гели денситометрировали. Содержание ДНК и РНК определяли спектрофотометрически на СФ-26 [2].



Белковый состав хроматина печени крыс в ПААГ-ДДС-Na. А — контроль; Б — криовоздействие на нормальную печень; В — цирротически измененная печень; Г — криовоздействие на цирротически измененную печень; Д — схематическое изображение зон известных белков хроматина: 1 — коровые гистоны, 2 — белки HMG 14/17, 3 — белки HMG 1/2, 4 — гистон H1, 5 — РНП-белки, 6 — белки матрикса

Проведенные исследования дали следующие результаты. В хроматине интактной печени отношение РНК/ДНК составило $0,598 \pm 0,004$. После криовоздействия на нормальную печень соотношение нуклеиновых кислот остается на уровне контроля и равно $0,576 \pm 0,03$ ($P > 0,05$). То есть криовоздействие, примененное нами, видимо, не нарушает стабильность изучаемого показателя.

После электрофореза на гелевых пластинах образцы белков хроматина интактной печени представлены (20 ± 1) белковыми зонами без учета участков коровых гистонов и линкерного гистона H1. Белковый состав хроматина, выделенного после криовоздействия на печень, практически не отличается от контроля (рисунок). Количество белковых фракций здесь составляет 20 ± 2 . Некоторые изменения в спектре белков

Материал исследования

Способ воздействия на ткань печени	Изучаемый показатель	
	Спектр НГБ	РНК/ДНК
Криовоздействие на нормальную печень	+	+
Хроническая затравка печени CCl_4 с целью моделирования цирроза печени [1]	+	—
Криовоздействие на патологически измененную печень	+	—
Контроль	+	+

хроматина наблюдаются у животных, перенесших длительную затравку CCl_4 . Общее количество фракций НГБ достигает 32 ± 1 . Появляется значительное число слабых белковых фракций, подвижность которых ниже, чем гистона *H1*. Известно, что в этих участках локализуются гетерогенные РНП-белки, белки ядерного матрикса, которые вследствие тесной ассоциации хроматина с другими белок-содержащими структурами ядра извлекаются с истинными ДНК-связывающими НГБ, а также белки, функциональная роль которых остается пока неизвестной. Криовоздействие на патологически измененную печень не приводит к выраженным изменениям спектра НГБ хроматина, который насчитывает (31 ± 1) белковые фракции.

Таким образом, влияние локальных криовоздействий на спектр НГБ хроматина не выявлено. То есть регенерационный эффект от данного вида воздействия на ткань печени связан, возможно, с иными проявлениями изменений НГБ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сандомирский Б. П., Волкова Н. А., Журавлев А. С. и др. Механизмы криостимуляции регенерации поврежденных тканей // Криобиология. — 1985. — № 1. — С. 29—36.
2. Малышев А. Б., Шевцова М. Я., Гауцель В. В. и др. Белки хроматина регенерирующей печени белых крыс и фактор регуляции деления клеток в онтогенезе // Механизмы онтогенеза и их регуляция. — Киев: Наук. думка, 1987. — С. 29—35.
3. Martinez-Sales V., Baguena J. Changes in non-histone proteins during mouse liver regeneration // Cell. Mol. Biol. — 1981. — 27, N 2—3. — P. 223—229.
4. Sobczak J., Duguet M. Molecular biology of liver regeneration // Biochimie. — 1986. — 68, N 7—8. — P. 957—967.

Ин-т проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР,
г. Харьков;
НИИ биологии Харьковского гос. уч-та

Поступила 26.12.88

ХРОНИКА

I ВСЕСОЮЗНЫЙ РАДИОБИОЛОГИЧЕСКИЙ СЪЕЗД

I Всесоюзный радиобиологический съезд, организованный Академией наук СССР, научным советом АН СССР по проблемам радиобиологии и Институтом химической физики АН СССР, состоялся 21—27 августа 1989 г. в г. Москве. В работе съезда приняли участие около 400 радиобиологов и специалистов смежных дисциплин и ведущих научных центров нашей страны. На съезд были представлены доклады, касающиеся самых различных научных и научно-практических аспектов развития радиобиологии, слушание которых проходило на 20 секциях и пленарных заседаниях. Наиболее важные доклады можно сгруппировать в три раздела. 1. Действие малых доз ионизирующей радиации на биологический объект (доклады Е. Б. Бурлаковой, А. М. Кузина, Л. Б. Пинчук и др.). 2. Проблемы радиационной безопасности, связанные с работой АЭС (доклады Н. В. Куликова, В. П. Сидорова, А. Д. Покаржевского, М. Г. Шандака и др.). 3. Поиск эффективных препаратов, оказывающих радиопротективное действие (доклады Ю. Б. Кудряшева, В. Г. Яшунского, А. А. Турдыева, А. Ф. Кожокару и др.). Кроме того, значительный интерес представляли доклады, касающиеся радиационной иммунологии (А. А. Ярилина, В. М. Манько, А. М. Поверенного, А. Г. Конопляникова и др.).

Большое внимание на съезде было уделено вопросам, касающимся последствий аварии на Чернобыльской АЭС. Отмечались важность и необходимость разработки системного подхода к контролю за лицами, подвергавшимся воздействию ионизирующей радиации, социальной их обеспеченности, медицинскому контролю.

В заключение съезд принял ряд постановлений и резолюций, касающихся вопросов дальнейшего развития радиобиологии. На съезде был учрежден и избран президентом Всесоюзного общества радиобиологов.

А. Н. Гольцев

ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИЙ

В специализированном совете при Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР защищены диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. В работе С. И. Дрокина «Липиды сперматозоидов рыб, нерестящихся в пресной и соленой воде, до и после криоконсервирования» показано, что спермии морских рыб более криорезистентны, чем спермии пресноводных видов. Криолабильность сперматозоидов пресноводных видов рыб проявляется в сильном повреждении их цитоплазматической мембраны, что было отмечено при исследовании ультраструктуры, а также об этом свидетельствует выход части фосфолипидов в спермальную жидкость (около 30 %). Причем повреждения возникают в основном на этапе разбавления спермы криозащитной средой.

Изучение липидных составов и жирнокислотных характеристик фосфолипидов показало, что сперматозоиды морских видов рыб по молярному отношению холестерина к фосфолипидам в 2—3 раза превосходят сперматозоиды пресноводных видов.

Сделано заключение о том, что более высокая криорезистентность спермиев морских видов рыб обусловлена их устойчивостью к осмотическим градиентам среды существования. Молекулярная основа этих особенностей определяется наличием высокого уровня отношения холестерина к фосфолипидам.

В исследовании А. И. Михайлика «Экспериментальное обоснование низкотемпературного консервирования куриных эмбрионов» изучено влияние ряда криопротекторов на жизнеспособность ранних куриных эмбрионов на этапах криоконсервирования. Показано, что лучшим из изученных является α -пропиленгликоль. Определены оптимальные условия его применения при криоконсервировании эмбрионов кур. Разработанный способ замораживания куриных эмбрионов до -79°C позволяет хранить и транспортировать их на твердой углекислоте. Способ культивирования обеспечивает контроль за жизнеспособностью эмбрионов на этапах криоконсервирования. Метод культивирования может найти широкое применение в экспериментальной эмбриологии, фармакологии, онтогенологии, а также в исследованиях по генетической и клеточной инженерии.

В диссертационной работе Ю. А. Демина на соискание ученой степени кандидата медицинских наук «Структурное состояние склеры после криоконсервирования и трансплантации» получены экспериментальные данные, характеризующие структурные изменения склеры после низкотемпературного консервирования, изучен морфогенез репаративного процесса после трансплантации криоконсервированной склеры, что в целом имеет важное значение для понимания теоретических основ влияния охлаждения на соединительнотканые структуры. Обнаружено, что под воздействием факторов криоконсервирования в межклеточном веществе развивается комплекс изменений, характеризующийся нарушением ориентационной упорядоченности молекул гликозаминогликанов и коллагена, частичном нарушении архитектоники коллагеновых волокон. Показано, что морфогенез репаративного процесса обусловлен одинаковыми структурными проявлениями при трансплантации как нативной, так и криоконсервированной склеры.

На основании полученных данных экспериментально обоснована возможность применения криоконсервированной склеры в клинической практике для склероукрепляющих операций при прогрессирующей близорукости.

РЕЦЕНЗИЯ

на книгу: Н. Н. Демин, Т. Х. Шортанова, Э. З. Эмирбеков. *Нейрохимия зимней спячки млекопитающих*. — Л.: Наука, 1988. — 136 с.

Зимняя спячка представляет собой уникальное биологическое явление, при котором естественным путем резко снижается температура тела, следовательно, и скорость практически всех биохимических и физиологических процессов. Путем впадения

в состоянии зимней спячки некоторые виды теплокровных животных переносят экстремальные условия: холод, отсутствие воды, пищи. В то же время у гомойотермных организмов нормальный ход метаболических процессов возможен лишь в узком температурном режиме: $(38 \pm 4)^\circ\text{C}$. При более низких температурах тела, при гипотермии, у них происходит дискоординация функций и метаболизма — жизнь оказывается в опасности. Проблема зимней спячки вызывает не только общебиологический интерес, но и привлекает внимание непосредственно с практической точки зрения: фундаментальные результаты могут быть положены в основу разработки методов создания искусственной гипотермии (гипобиоза), управляемой при помощи естественных механизмов, что чрезвычайно важно для клиники, когда требуется поддержать организм на длительный период в состоянии значительно сниженных физиологических функций.

В имеющихся сведениях о зимней спячке, особенно о молекулярных механизмах, лежащих в ее основе, еще много белых пятен. В частности, совершенно недостаточно описаны биохимические процессы в нервной системе животных во время зимней спячки. Предлагаемая монография — одна из первых попыток в мировой литературе восполнить этот пробел. Книга написана специалистами, внесшими значительный экспериментальный вклад в разработку проблемы нейрохимических основ зимней спячки. Собственные данные авторов представлены в развернутом виде. Нейрофизиологические и гормональные изменения, происходящие во время зимней спячки, значительно лучше исследованы, чем нейрохимические аспекты зимней спячки млекопитающих. Однако уже назрела необходимость обобщить и проанализировать имеющийся в настоящее время фактический материал об изменениях в метаболизме мозга животных в период зимней спячки. Ни в отечественной, ни в зарубежной литературе нет такого рода обобщающих крупных обзоров. Это обстоятельство еще раз подчеркивает своевременность выхода предлагаемой монографии.

Структура книги определена имеющимися в мировой литературе сведениями по криобиологии и нейрохимии зимней спячки. Она состоит из глав, посвященных динамике и метаболизму нейромедиаторов, нейромодуляторов, регулирующих состояние зимней спячки; изменениям содержания белков и РНК в ходе зимней спячки; метаболизму, количественным изменениям низкомолекулярных азотистых веществ; липидам и динамике мембранных структур; сложной биоэнергетике мозга в гибернационном цикле. Следует отметить, что в кратком «Введении», в котором изложены общие физиологические данные, характеризующие состояние зимней спячки, авторы впервые предприняли попытку выделить отличие зимней спячки от пассивного холодового оцепенения холоднокровных животных. Большую ценность для специалистов представляет «Заключение» книги. В этом разделе авторы не ограничиваются подведением итогов предыдущих глав, обобщением и анализом фактического материала, который носит в основном фрагментарный характер, но и впервые в мировой практике ставят множество конкретных вопросов, экспериментальная разработка которых в перспективе представляется крайне важной.

С нашей точки зрения, нет сомнений в том, что книга представит большой интерес как для специалистов нейрохимиков, нейрофизиологов, нейрофармакологов, нейробиологов широкого профиля, криобиологов, так и для студентов вузов при изучении курсов криобиологии, нейрохимии, экологической физиологии, сравнительной биохимии и т. д.

А. М. Белоус

ВІСНИК
АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНСЬКОЇ РСР
ЖУРНАЛ МЕНЯЕТ ПРОФИЛЬ

Президиум АН УССР принял постановление «О перестройке журнала «Вісник Академії наук Української РСР». Главными задачами ведущего в республике академического периодического издания — ежемесячного научного и общественно-политического журнала Президиума АН УССР — становятся:

всестороннее освещение деятельности АН УССР, ее традиций, работы высших органов управления Академии — Общего собрания и Президиума; постоянное информирование научной общественности о том, как АН УССР выполняет свои уставные функции; обеспечение открытости и гласности в работе академических учреждений; установление диалога между учеными и общественностью;

широкая пропаганда научных открытий и наиболее выдающихся достижений ученых на приоритетных направлениях исследований, распространение опыта реализации важнейших научно-технических проектов, международных, всесоюзных, республиканских и региональных программ, а также разработки и внедрения революционных технологий;

анализ и обобщение отечественного и зарубежного опыта организации науки, широкое обсуждение проблем управления исследовательской деятельностью, путей повышения ее эффективности;

разработка нравственных аспектов научной деятельности; формирование активной гражданской позиции ученого, воспитание чувства его ответственности перед современниками и потомками;

освещение истории АН УССР, истории науки и техники на Украине, межреспубликанских и международных связей ученых АН УССР;

критический анализ новинок литературы, а также журнальных публикаций, имеющих методологическое, общенаучное и общекультурное значение;

развитие новой украинской научной терминологии.

Журнал будет выходить, как и прежде, ежемесячно, объемом 10,5 уч.-изд. л.

Подписная цена на год — 14 р. 40 к.

Цена одного номера — 1 р. 20 к.

Индекс — 74090.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКОВА ДУМКА» ВЫПУСТИЛО В СВЕТ КНИГУ:

Обозная Э. И., Панков Е. Я. Цитохимия костного мозга при криоконсервировании: Атлас.— Киев : Наук. думка, 1989 (I) — 20 л.: 2 р. 40 к.

В атласе освещены вопросы цитохимического анализа криоконсервированных клеток костного мозга. Систематизированы и изложены в удобной для практического использования форме сведения о маркерно-цитохимических реакциях клеток костного мозга в процессе дифференцировки при кроветворении и на этапах низкотемпературного консервирования. Атлас хорошо иллюстрирован (около 500 черно-белых и цветных фотографий). Для цитологов, цитохимиков, гематологов.

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

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

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

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

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

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