

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

ISSN 0233-7673

2 '91



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

EDITORIAL BOARD

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

EDITORIAL COUNCIL

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

Адрес редакции:

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

Научный редактор *В. И. Луговой*

Редактор *Л. А. Рябинина*

Технический редактор *В. Н. Волкова*

Сдано в набор 16.01.91. Подп. в печ. 29.03.91. Формат 70×108/16. Бум. тип. №1. Выс. печ. Усл. печ. л. 4,9. Уч.-изд. л. 5,31. Усл. кр.-отт. 5,6. Тираж 850 экз. Зак. 1-23. Цена 1 р. 20 к.

Отпечатано с матриц Харьковской книжной фабрики им. М. В. Фрунзе в Харьковской городской типографии № 16. 310003, Харьков ул. Университетская, 16, Зак. 383.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ОТДЕЛЕНИЕ ФИЗИОЛОГИИ

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ
И ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

ВСЕСОЮЗНЫЙ

НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ОСНОВАН В 1985 ГОДУ
ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

КИЕВ НАУКОВА ДУМКА 1991

2 1991

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

- Бизяева О. Н., Кершенгольц Б. М., Соломонов Н. Г., Рогожин В. В. Сезонная динамика уровней эндогенных этанола и ацетальдегида в организме длиннохвостого суслика 3
- Черкесова Д. У., Эмирбеков Э. З. Глутаматдегидрогеназная активность головного мозга крыс при самосогревании и в постгипотермическом периоде 9
- Султанова Л. К., Цветков Цв. Д. Влияние скорости замораживания и некоторых криопротекторов на функциональную активность фотосинтетического аппарата гороха 12
- Войтенко Н. Н., Воронова И. П., Молодцова Г. Ф. Моноаминоксидаза мозга при гипотермии и зимней спячке 16
- Груздев А. И., Богдан В. В., Немова Н. Н., Михкеева В. С., Гурьянова С. Д., Крупнова М. Ю. Влияние предельно низких температур зимовки на некоторые биохимические показатели сеголетков карпа 20
- Мяделец О. Д., Суханов А. Ф. Воздействие общей глубокой гипотермии на морфофункциональное состояние нейтрофильных лейкоцитов и макрофагов кожного региона 23

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

- Орлик В. В., Качоровский Б. В., Криворучко Р. А., Винарчик М. И., Миндк М. В., Дорошенко Л. Г., Зубарев Г. П. Длительное хранение эритроцитов при умеренно низкой температуре (-40°C) и клиническая оценка их эффективности 27
- Тракулов Я. Х., Ташходжаева Т. П., Исмаилов С. И., Кулиббетов М. Влияние длительной криоконсервации на биохимические показатели и гистоструктуру щитовидной железы 31
- Македонова Л. Д., Кудрякова Т. А., Кадетов В. В., Наталич Л. А. Лиофилизация фагов холерных вибрионов 01 и не 01 групп 34

КРИОМЕДИЦИНА

- Грищенко В. И., Бабийчук Г. А., Сало В. И., Рябухина Н. И., Лицко О. П., Шайтуро П. Г. Электроэнцефалографические изменения под влиянием криооперевальной гипотермии у женщин с климактерическим синдромом 40
- Козин Ю. И. Динамика температурных изменений в почечной ткани при криотермоабиллировании кавернозных форм нефротуберкулеза в эксперименте 42
- Пальчиков В. Е., Осенний А. С. Двухчастотная импедансметрия кисти руки человека при внешних температурных воздействиях 45

КРИОГЕННОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

<i>Манохина М. С., Полончук А. М., Белоусов Ю. П., Горяинова Л. А., Кузьмина Л. В., Красильников В. А., Корниенко В. Ф. Установка сублимационной сушки срезов и кусочков биологических тканей УСС-1 и результаты ее испытаний</i>	49
---	----

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

<i>Луптак М., Тарасов В. Ф. Высокоточное многопрофильное программное охлаждающее устройство на базе микрокомпьютера</i>	53
<i>Мельник И. Ю. Температурные эффекты при взаимодействии кардиотоников с липосомами</i>	55
<i>ХРОНИКА</i>	56
<i>ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИЙ</i>	56

CONTENT

THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

<i>Bizayeva O. N., Kershengolts B. M., Solomonov N. G., Rogozhyn V. V. The seasonal endogenous ethanol and acetaldehyde dynamics in the body of ground squirrel</i>	3
<i>Cherkesova D. U., Emirbekov E. Z. The glutamate dehydrogenase activity of the rat brain during selfheating and posthypothermia period</i>	9
<i>Sultanova L. K., Tsvetkov Ts. D. The influence of freezing rate and cryoprotectants on the functional activity of the pea photosynthetic apparatus</i>	12
<i>Voitenko N. N., Voronova I. P., Molodtsova G. F. Brain monoaminoxidase in hypothermia and hibernation</i>	16
<i>Gruzdev A. I., Bogdan V. V., Nemova N. N., Mikhkiyeva V. S., Guryanova S. D., Krupnova M. Yu. The effect of lowest temperatures of hibernation on the biochemical state of young <i>Cyprinos carpio</i></i>	20
<i>Myadelets O. D., Sukhanov A. F. The effect of total deep hypothermia on the morphological and functional state of skin neutrophils and macrophages</i>	23

CRYOPRESERVATION OF BIOLOGICAL SYSTEMS

<i>Orlik V. V., Kachorovsky B. V., Krivoruchko P. A., Vinarchik M. I., Minduk M. V., Doroshenko L. G., Zubarev G. P. Prolonged storage of erythrocytes at a moderately low temperature (-40°C) and clinical estimation of their efficiency</i>	27
<i>Turakulov Ya. Kh., Tashkhodzhaeva T. P., Ismailov S. I., Kulimbetov M. The effect of long-term cryopreservation on the biochemical parameters and histological structure of thyroid gland</i>	31
<i>Makedonova L. D., Kudryakova T. A., Kadetov V. V., Natalich L. A. Lyophilization of O1 and non O1 <i>Vibrio cholerae</i> phages</i>	34

CRYOMEDICINE

<i>Grishchenko V. I., Babiychuk G. A., Salo V. I., Ryabukhina N. I., Lipko O. P., Shayturo P. G. Electrophysiological changes caused by craniocerebral hypothermia in women with climacteric syndrome</i>	40
<i>Kozin Yu. I. The dynamics of thermal changes in renal tissue upon cryothermoabacillation of experimental cavernous nephrophthisis</i>	42
<i>Palchikov V. E., Osenniy A. S. Two-frequency impedancemetry of human hand subject to external temperature effects</i>	45

CRYOGENIC EQUIPMENT

<i>Manokhina M. S., Polonchuk A. M., Belousov Yu. P., Goryainova L. A., Kuzmina L. V., Krasilnikov V. A., Korniyenko V. N. A device for lyophilization of biological tissue slices and pieces USS-1 with testing results</i>	49
--	----

SHORT COMMUNICATIONS

<i>Lutak M., Tarasov V. F. Computer-based multifactor programme cooling device of high accuracy</i>	53
<i>Melnik I. Yu. Temperature effects in the interaction between cardiotonics and liposomes</i>	55
<i>CHRONICLE</i>	56
<i>DEFENSE OF THESES</i>	56

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

УДК 591.133.2 : [547.262+547.281.2] : 591.543.42

О. Н. Бизяева, Б. М. Кершенгольц, Н. Г. Соломонов, В. В. Рогожин

СЕЗОННАЯ ДИНАМИКА УРОВНЕЙ ЭНДОГЕННЫХ ЭТАНОЛА И АЦЕТАЛЬДЕГИДА В ОРГАНИЗМЕ ДЛИННОХВОСТОГО СУСЛИКА

Изучены изменения эндогенных уровней этанола и ацетальдегида в крови длиннохвостого суслика, основные каталитические параметры ферментов печени, участвующих в метаболизме этанола и ацетальдегида (алкоголь- и альдегиддегидрогеназы) в зависимости от физиологического состояния, температуры тела животного. Показано, что концентрация эндогенного ацетальдегида в крови в состоянии зимней спячки увеличивается в 5—6 раз, по-видимому, за счет изменений каталитических свойств и содержания АДГ и АльДГ, а этанола уменьшается в 4—5 раз по сравнению с летним периодом. Исследована сезонная динамика изоферментного состава алкогольдегидрогеназы и выявлены изоформы, специфичные для состояния спячки и бодрствования. Обсуждается физиологическая роль эндогенных этанола и ацетальдегида в формировании гомеостаза при гибернации и в активном состоянии организма длиннохвостого суслика. Подчеркивается специфическая биологическая функция эндогенного ацетальдегида как ингибитора катаболических процессов и модификатора активности аминов и опиоидов при гибернации.

Этанол и ацетальдегид являются одними из эндогенных метаболитов тканей животных, уровень которых регулируется двумя ферментами (алкоголь- и альдегиддегидрогеназами). Алкогольдегидрогеназа (АДГ, КФ 1.1.1.1) катализирует реакцию окисления этанола до ацетальдегида с участием НАД, легко обратимую в физиологической области pH . АДГ в основном присутствует в цитоплазме гепатоцитов, тогда как альдегиддегидрогеназа (АльДГ, КФ 1.2.1.3), катализирующая необратимое окисление ацетальдегида, является преимущественно мембранным ферментом митохондрий. У негибернирующих животных различают две группы изоформ АльДГ: с высоким сродством к ацетальдегиду — АльДГ_I ($K_M = 0,1—1,0$ мкМ) и с низким сродством — АльДГ_{II} ($K_M = 0,1—1,0$ мМ) [7]. Алкогольдегидрогеназа также представлена широким набором изоформ, физико-химические параметры которых различаются в меньшей степени [10].

Этанол и ацетальдегид в организме негибернирующих животных могут выполнять разнообразные функции. Так, этанол влияет на проницаемость мембран органов и клетки, служит резервным энергетическим материалом [11], тогда как ацетальдегид может выступать в качестве ингибитора терминального окисления [5] и модификатора активности опиоидных пептидов [14]. Однако у гибернирующих животных содержание этих метаболитов и активности ферментов, их утилизирующих, не изучены, хотя ряд свойств этих функционально активных соединений (например, ингибирование митохондриального окисления ацетальдегидом) позволяют предположить их участие в снижении обмена при гибернации.

Целью настоящей работы было изучение сезонной динамики уровней эндогенных этанола и ацетальдегида и ферментов, их метаболизирующих (алкоголь- и альдегиддегидрогеназ), в организме суслика при гибернации и в активном физиологическом состоянии.

В экспериментах были использованы якутские длиннохвостые суслики (*Citellus undulatus*. Pallas). В зимний период животные содержались в специально оборудованных для спячки помещениях, где температурные условия были близки к естественным. Забор крови и печени производили после декапитации животных.



Для биохимических исследований очистку ферментов из печени суслика проводили по следующей методике. Предварительно многократно промытую печень гомогенизировали на механическом гомогенизаторе, взяв на 1 г ткани 2 мл 0,05 М раствора глицина. Неразрушенные клетки отделяли центрифугированием. К насадочной жидкости прибавляли этанол, охлажденный до 0 °С, до 20 %-ной конечной концентрации. После перемешивания и встряхивания центрифугировали при 7000 g. Супернатант пропускали через колонку с сефадексом G-100 (2,5 см × 50 см), уравновешенную 0,05 М раствором глицина. Элюирование проводили этим же раствором. Для исследования отбирали фракции с максимальным содержанием алкогольдегидрогеназы [6]. Образец содержал до 90 % алкоголь- и альдегиддегидрогеназ от общего количества белка. Белок определяли по методу Лоури [12].

Активность алкогольдегидрогеназы определяли при 23 °С по скорости окисления этанола и образования НАДН при длине волны 340 нм ($\epsilon_{340} = 6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [3]. К 2,2 мл 0,1 М глицин-NaOH-буфера pH, 10,0, добавляли 0,1 мл 36 мМ НАД и 0,1 мл 2,5 мкМ раствора фермента. Реакцию инициировали введением 0,1 мл 0,41 М этанола. Активность альдегиддегидрогеназы определяли по скорости окисления ацетальдегида и образования НАДН. К 2,2 мл 0,1 М глицин-NaOH-буфера, pH 10, добавляли 0,1 мл 24 мМ НАД и 0,1 мл 1—2,5 мкМ фермента. Реакцию инициировали введением 0,1 мл 0,17 М ацетальдегида. Титрование активных центров АДГ и АльДГ проводили по [6].

Концентрацию этанола в крови и печени определяли хроматографическим и энзимологическим методами [13]. Для определения этанола энзимологическим методом использовали в качестве реактива очищенную АДГ зерен пшеницы. Предварительно отгоняли этанол по следующей методике: 3 мл крови или гомогената печени помещали в камеру микроперегонки и на водяной бане при 80 °С выдерживали в течение часа. Концентрацию ацетальдегида определяли методом титрования 2,4-динитрофенилгидрозином и энзимологическим методом. Ацетальдегид отгоняли на микроперегонке при 56 °С в течение часа. Кроме того, концентрацию ацетальдегида рассчитывали теоретически на основе следующей системы ферментативных реакций:

1. $\text{АДГ} + \text{этанол} \xrightleftharpoons{K_{\text{м эт}}} \text{АДГ} \cdot \text{этанол} \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_{+1}} \text{АДГ} \cdot \text{альд} \xrightleftharpoons{K_{\text{м альд}}} \text{АДГ} + \text{альдегид};$
2. $\text{АльДГ}_I + \text{альд} \xrightleftharpoons{K_{\text{м альд}_I}} \text{АльДГ}_I \cdot \text{альд} \xrightarrow{k_2} \text{АльДГ}_I + \text{ацетат};$
3. $\text{АльДГ}_{II} + \text{альд} \xrightleftharpoons{K_{\text{м альд}_{II}}} \text{АльДГ}_{II} \cdot \text{альд} \xrightarrow{k_3} \text{АльДГ}_{II} + \text{ацетат};$ где: $K_{\text{м эт}}$, $K_{\text{м альд}}$, $K_{\text{м альд}_I}$, $K_{\text{м альд}_{II}}$ — константы Михаэлиса АДГ по этанолу и ацетальдегиду, АльДГ_I и АльДГ_{II} — по ацетальдегиду соответственно. k_{+1} , k_{-1} , k_2 , k_3 — каталитические константы АДГ в реакции окисления этанола и восстановления ацетальдегида, АльДГ_I и АльДГ_{II} в реакции окисления ацетальдегида соответственно. Расчет проводили по формуле, приведенной в работе [4]. Дифференциальное определение активности АльДГ_I и АльДГ_{II} проводили как описано в работе [4]. Изоферментный состав АДГ изучали путем электрофоретического разделения в крахмальном геле [15]. Полученные блоки геля денситометрировали.

У негиббернирующих животных и человека в норме уровень эндогенного этанола составляет около 0,05—0,2 мМ, ацетальдегида — 0,2—0,7 мкМ [2]. Эти гомеостатические параметры являются достаточно стабильными. А у суслика уровни этанола и ацетальдегида в крови, определенные нами экспериментально, значительно варьировали в зависимости от физиологического состояния животного. Так, во время спячки (декабрь-февраль) концентрация этанола в крови составила $0,5 \pm 0,1$ мМ, а ацетальдегида более 20 мкМ. В активном состоянии (июнь-июль) уровень этанола в крови возрастал до 3,0—0,2 мМ, а ацетальдегида — падал до $5,0 \pm 0,5$ мкМ. Причем во всех физиологических состояниях организма абсолютные уровни этих метаболитов были существенно выше, чем у негиббернирующих животных,

а соотношение ацетальдегид/этанол увеличивалось при гибернации по сравнению с активным состоянием более чем в 15 раз. Эти изменения характеризуют специфическую направленность обмена этанола и ацетальдегида у гибернирующих животных.

Мы предположили, что сезонные изменения уровней эндогенных этанола и ацетальдегида, а также их соотношения, зависят от содержания и кинетических параметров АДГ и АльДГ и изучили свойства этих ферментов в различных физиологических состояниях суслика. Поскольку температура тела суслика изменяется в течение годового цикла, то определили зависимости активности АДГ в реакции окисления этанола ($АДГ_1$) и восстановления ацетальдегида ($АДГ_2$), АльДГ_I и АльДГ_{II} от температуры (типичные кривые приведены на рис. 1) и с учетом температурных коэффициентов рассчитали истинные активности ферментов печени в состоянии спячки и бодрствования (табл. 1).

Явление относительно высокой активности ряда ферментов (дегидрогеназ) организма гибернирующих животных при околонулевых температурах известно в литературе [1]. Однако на примере этанолметаболизирующих ферментов оно более выражено. Вероятно, это указывает на повышенное функциональное значение системы метаболитов этанол-ацетальдегид в различных физиологических состояниях спящего суслика. Следует отметить, что высокая активность ферментов и высокие концентрации этанола, особенно ацетальдегида, сохраняются, несмотря на общее снижение уровня обмена веществ более чем в 100 раз [16].

Если сравнить величину параметра ($АДГ_1/АДГ_2 + АльДГ_{I+II}$), которая в первом приближении характеризует соотношение концентрации ацетальдегида к этанолу, то его величина в $10,0 \pm 3,0$ раз выше зимой, чем

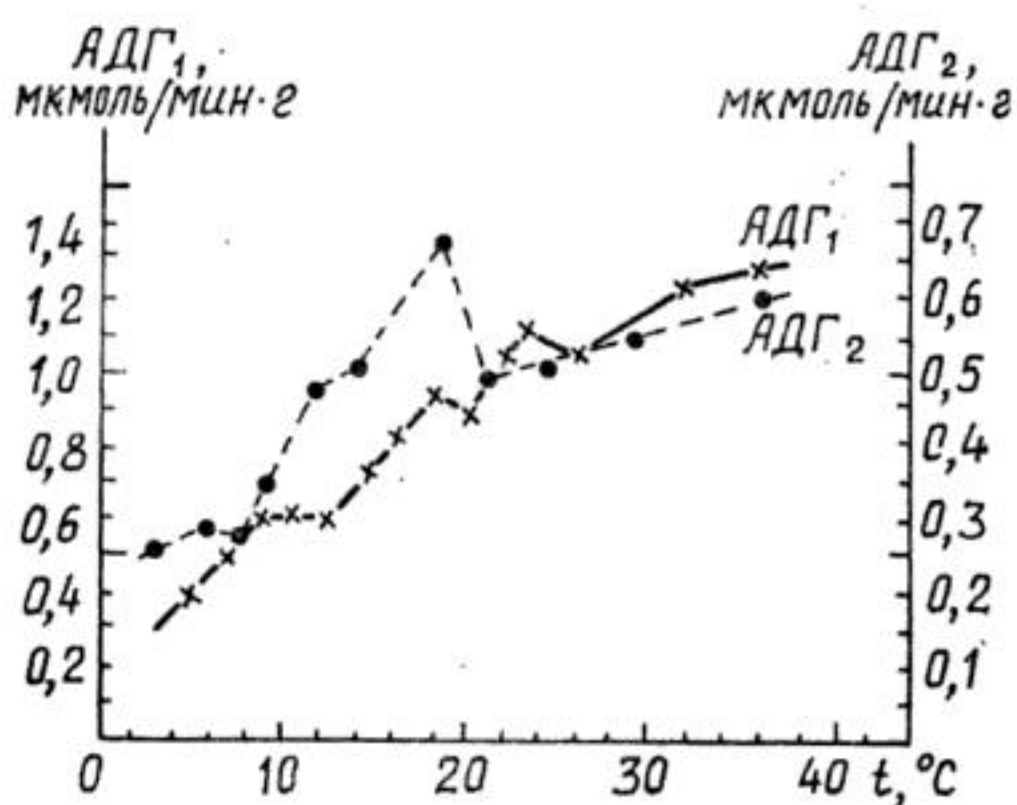


Рис. 1. Температурные зависимости активности алкогольдегидрогеназы печени суслика в реакции окисления этанола ($АДГ_1$) и восстановления ацетальдегида ($АДГ_2$)

Таблица 1

Сезонные изменения максимальных активностей АДГ и АльДГ с учетом истинной температуры тела суслика (мкмоль/мин на 1 г печени)

Месяц, t тела суслика, °C	Кол-во особей	АДГ _I	АДГ ₂	АльДГ _I	АльДГ _{II}
Декабрь, ~4	25	$0,14 \pm 0,1$	$0,33 \pm 0,03$	$0,063 \pm 0,008$	$0,040 \pm 0,004$
Январь, ~4	29	$0,17 \pm 0,2$	$0,79 \pm 0,08$	$0,030 \pm 0,003$	$0,020 \pm 0,002$
Февраль, ~4	7	$0,10 \pm 0,1$	$0,29 \pm 0,03$	$0,050 \pm 0,005$	$0,030 \pm 0,003$
Март, ~4	27	$0,26 \pm 0,2$	$0,98 \pm 0,09$	$0,490 \pm 0,005$	$0,160 \pm 0,012$
Апрель, ~29	20	$0,12 \pm 0,1$	$1,22 \pm 0,11$	$0,030 \pm 0,003$	$0,020 \pm 0,002$
Июнь—июль, ~36	41	$0,12 \pm 0,1$	$2,94 \pm 0,25$	$0,140 \pm 0,011$	$0,120 \pm 0,011$

летом. Эти результаты указывают на то, что изменение соотношения уровней эндогенных этанола и ацетальдегида в активном состоянии и спячке обусловлено изменениями на уровне каталитических параметров АДГ и АльДГ, смещением процессов в сторону образования ацетальдегида зимой и его превращения в этанол и ацетил-КоА летом.

Таблица 2

Величины эффективных констант Михаэлиса ДДГ и АльДГ печени суслика (мкМ) по этанолу и ацетальдегиду и коферментам (НАД и НАДН) в различных физиологических состояниях организма

Месяц, t те- ла суслика, °С	Кол-во особей	K_M	АДГ			K_M АльДГ I	K_M АльДГ II
		по этанолу	по аце- тальдегиду	по НАД	по НАДН	по альд I	по альд II
Декабрь, ~4	9	3100±300	544±50	37±4	13,3±1,2	7,0±0,7	200±20
Январь, ~4	9	2700±300	560±60	38±4	13,3±1,2	7,2±0,7	210±20
Февраль, ~4	3	2700±300	562±60				
Март, ~4	9	2000±200					
Апрель, ~29	11	1020±100	400±40	33±3	14,2±1,5	7,0±0,7	200±20
Июнь—июль ~36	13	2000±200	300±30	57±6	22,2±2,2	10,0±1,0	210±20

Для более точной оценки влияния ферментативных изменений на уровне этанола и ацетальдегида определяли эффективные константы Михаэлиса

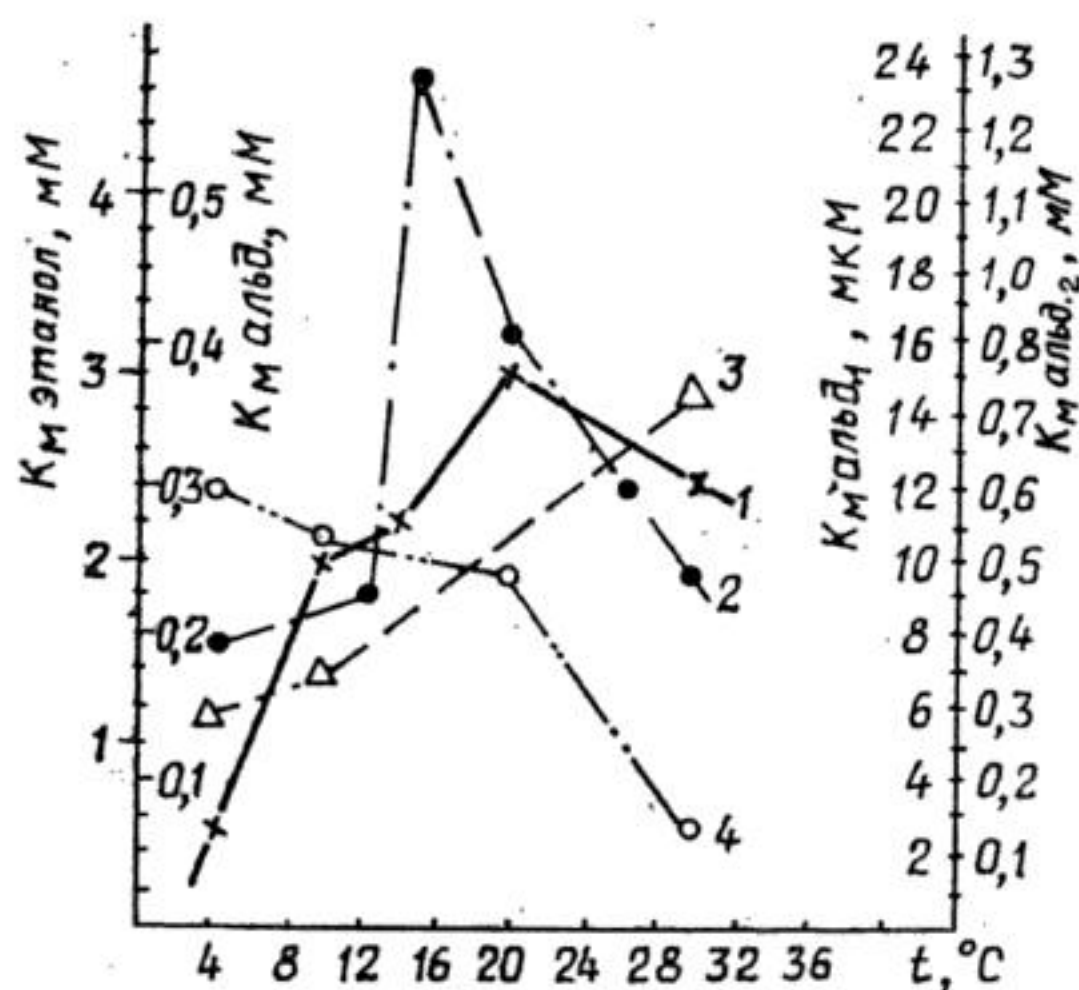


Рис. 2. Температурные зависимости констант Михаэлиса алкогольдегидрогеназы по этанолу (1), ацетальдегиду (2), группы изоформ альдегиддегидрогеназы_I по ацетальдегиду (3) и АльДГ_{II} по ацетальдегиду (4)

изучаемых ферментов по соответствующим субстратам и коферментам (табл. 2). Исследовали их температурные зависимости (рис. 2). Необходимо отметить, что сродство к ацетальдегиду изоформ АльДГ_I с низкой K_m с ростом температуры от 4 °С до 30 °С уменьшается, а изоформ АльДГ_{II} с высокой K_m — увеличивается. Эти зависимости K_m от температуры дают дополнительный рост ацетальдегида при низких температурах тела суслика и вызывают еще большее снижение его уровня при температурах тела близких к 30 °С.

Зная температурные коэффициенты максимальных скоростей и констант Михаэлиса, уровень этанола в крови, мы рассчитали по формуле, приведенной в работе [4], концен-

трацию ацетальдегида, сезонная динамика которого показана на рис. 3, кривая 2. Экспериментальные и расчетные концентрации ацетальдегида в летний период практически совпадают. В зимний период экспериментальные данные по уровню ацетальдегида на 35—40 % ниже расчетных. Это, вероятно, объясняется тем, что в эксперименте мы определяли только

свободный ацетальдегид, в то время как при столь высоких концентрациях ацетальдегида часть его (до 40 %) находится в связанном состоянии с белками, другими молекулами, содержащими аминогруппы. Такой расчет не только доказывает, что противоположные сезонные изменения уровней этанола и ацетальдегида крови суслика обусловлены специфическими изменениями физико-химических свойств АДГ и АльДГ, но и дает еще большую величину изменения соотношения концентрации ацетальдегида к этанолу в гибернации по сравнению с активным состоянием — почти в 30 раз.

Одним из механизмов выявленных сезонных изменений свойств ферментов может быть изменение изоферментного спектра. Мы изучили полиморфизм АДГ в различные сезоны (в различных физиологических состояниях суслика). Было обнаружено, что фермент представлен пятью изоформами. В зависимости от физиологического состояния животного наблюдаются значительные как количественные, так и качественные изменения в составе изоферментов (рис. 4). У спящего суслика преобладает АДГ₄ и практически отсутствует АДГ₅. Вероятно, при низких температурах тела АДГ₄ определяет смещение равновесия в сторону повышения уровня ацетальдегида. АДГ₅,

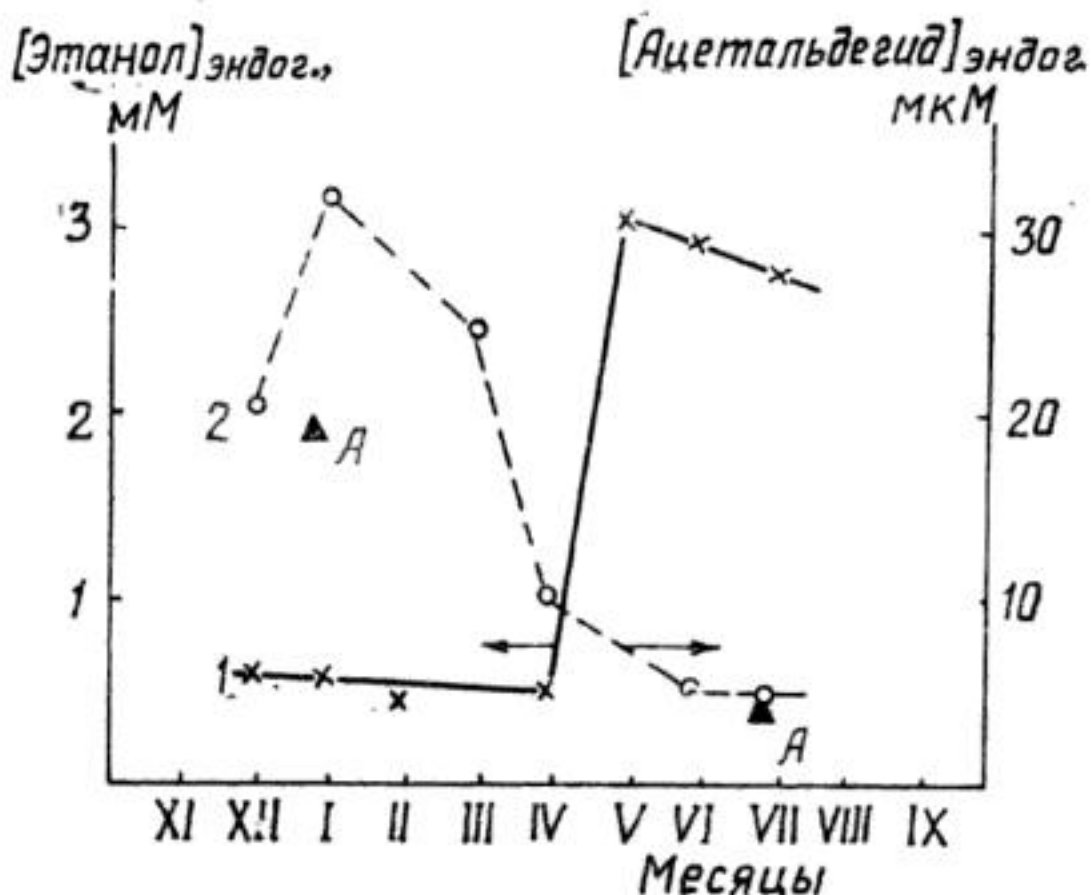


Рис. 3. Сезонная динамика содержания эндогенных этанола и ацетальдегида в крови суслика, кривые (1) и (2) соответственно. Кривая (2) построена на основании теоретического расчета, как описано в тексте. Точками (А) обозначены экспериментально наблюдаемые концентрации ацетальдегида крови, полученные энзимологическим методом

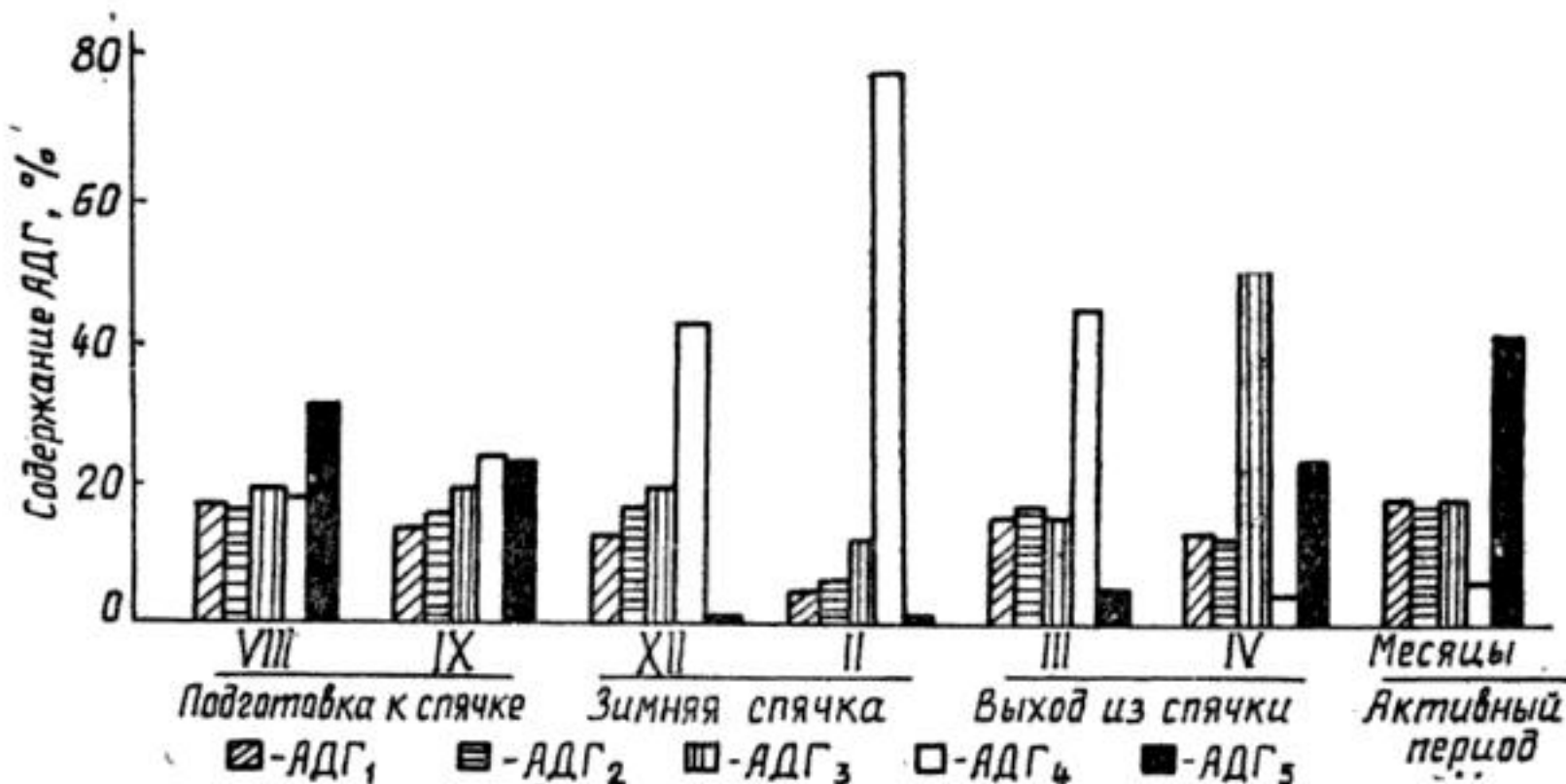


Рис. 4. Изоферментный спектр алкогольдегидрогеназы печени суслика в зависимости от физиологического состояния животных (сезонная динамика). Условия проведения электрофореза и денсиметрирования описаны в работе [14]

по-видимому, ответственна за смещение равновесия в сторону этанола в активном состоянии суслика (летом доля АДГ₅ увеличивается до 40 %).

В литературе отмечается индукция этанолом значительной гипотермии у незимоспящих животных при температуре окружающей среды не более 20—23 °С [9], вероятно, также вследствие повышения содержания ацетальдегида в этих условиях.

Возможной биологической ролью ацетальдегида при гибернации может быть его участие в модификации опиоидных и других регуляторных пептидов (поэтому, вероятно, растет зимой доля связанных форм ацетальдегида), метаболизме катехоламинов, серотина.

В противоположность ацетальдегиду эндогенный этанол может выступить в роли резервного эффективного биоэнергетического субстрата, легко вовлекаемого в обмен, снижающего интенсивность перекисного окисления липидов [8], повышающего неспецифическую резистентность организма в условиях интенсивного аэробного катаболизма. Вероятно, для выполнения этих функций уровень этанола и повышается летом.

В заключение следует подчеркнуть еще одну очень важную проблему, которую ставит проведенное исследование. Поскольку в крови суслика (особенно в состоянии спячки) циркулирует большое количество эндогенного ацетальдегида, сравнимое с содержанием этого вещества в крови человека при алкогольном опьянении, организм животного должен обладать эффективными системами защиты от его токсического действия. Изучение этих систем могло бы дать важную информацию для разработки новых методов лечения алкоголизма, снижения токсического действия алкогольных напитков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ануфриев А. И., Соломонова Т. Н., Васильев И. С. и др. Исследование показателей углеводного метаболизма длиннохвостого суслика в период зимней спячки // Криобиология. — 1986. — № 2. — С. 29—31.
2. Буров Ю. В., Тресков В. Г., Кампов-Полевой А. Б. и др. Уровень эндогенного этанола и алкогольная мотивация // Бюлл. exper. биол. и мед. — 1983. — 96, № 11. — С. 67—69.
3. Кершенгольц Б. М., Рогожин В. В. Влияние межсубъединичных взаимодействий в АДГ из печени лошади на кинетику окисления этанола // Биохимия. — 1979. — 44, № 4. — С. 661—671.
4. Кершенгольц Б. М., Серкина Е. В. Некоторые методические подходы к изучению метаболизма этанола. — 1981, 7 с. Рукопись. деп. в ВНИИМИ. № Д — 3793.
5. Комиссарова И. А., Магалиф А. Ю., Ротенберг Ю. С., Гудкова Ю. В. Молекулярные механизмы действия эндогенного и экзогенного этанола // Изв. АН СССР. Сер. Сиол. — 1983. — № 2. — С. 260—267.
6. Рогожин В. В., Говорова Т. П., Кершенгольц Б. М. Селективный метод титрования активных центров алкогольдегидрогеназы хлор- и гидроксимеркурибензоатом // Биоорг. химия. — 1988. — 14, № 12. — С. 1626—1631.
7. Сатановский В. И. Состояние АльДГ печени и мозга крыс при предпочтении этанола и алкогольной интоксикации: Автореф. дис. канд. наук. — Гродно. — 1981. — 20 с.
8. Сторожок С. А. Содержание гидроперекисей в липидах, активность супероксиддисмутазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы эритроцитов при алкогольной интоксикации // Вопр. мед. химии. — 1983. — 29, № 6. — С. 31—34.
9. Alari L., Sjoquist B., Lewander T. Ethanol-induced hypothermia and biogenic amine metabolites // Drug and Alcohol Depend. — 1987. — 19, N 4. — P. 369—373.
10. Dworschak R., Plapp B. ADH from Horse Liver // Biochemistry. — 1977. — 16, N 1. — P. 110—116.
11. Goldstein D. B., Chin T. H. Interaction of Ethanol with biological membranes // Fed. Proc. — 1981. — 40, N 7. — P. 2073—2076.
12. Lowry O. H., Rosebough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. — 1951. — 193, N 1. — P. 265—275.
13. Ruz J., Fernandez A., de Castro D. L., Valcarcel M. Determination of ethanol in blood // J. Pharm. and Biomed. Anal. — 1986. — 4, N 5. — P. 545—558.
14. Sammers M. C., Gidley M. J., Sanders I. K. Acetaldehyde Enkephalin's elucidation of the structure of the acetaldehyde adducts of methionine-enkephaline and leucine-enkephalin // FEBS letters. — 1980. — 111, N 2. — P. 307—310.
15. Tsukamoto S., Kumagai T., Iribe E. Polymorphism of liver alcohol dehydrogenase in Japanese // Japan. J. Stud. Alcohol. — 1980. — 15, N 1. — P. 74—82.
16. Wang L. C. H. The latencies and metabolic rates of natural torpor in the Richardson's ground squirrel // Can. J. Zool. — 1979. — 57, N 1. — P. 149—155.

Якутский ин-т биологии СО АН СССР

Поступила 12.12.88

O. N. BIZAYEVA, B. M. KERSHENGOLTS, N. G. SOLOMONOV, V. V. ROGOZHYN
THE SEASONAL ENDOGENOUS ETHANOL AND ACETALDEHYDE
DYNAMICS IN THE BODY OF GROUND SQUIRREL

Yakutsk Institute for Biology of the Siberian Branch of the USSR Academy of Sciences

Changes in endogenous ethanol and acetaldehyde blood contents were studied in ground squirrels basing on catalytic parameters of liver enzymes participating in ethanol and acetyldehyde (alcohol- and aldehyde dehydrogenase) metabolism as functions of physiological conditions and body temperature. The blood concentration in endogenous acetaldehyde increases during hibernation by a factor of 5 to 6, probably due to changes in catalytic properties and ADH and AIDH contents. The content of ethanol decreases by a factor of 4—5 as compared to that in Summer. The seasonal dynamics of isoenzyme content of alcoholdehydrogenase has been studied, and isoforms specific for hibernation and active state have been identified. The physiological role of exogenous ethanol and acetaldehyde in the formation of homeostasis during hibernation and in the active state of ground squirrel is discussed. The specific biological function of endogenous acetaldehyde is accentuated as inhibitor of catabolic processes and modifier of the activity of amines and opoides during hibernation.

УДК 617—089.583.29—07 : 616.831—008.931 : 577.152.1

Д. У. Черкесова, Э. З. Эмирбеков

ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ
ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ САМОСОГРЕВАНИИ
И В ПОСТГИПОТЕРМИЧЕСКОМ ПЕРИОДЕ

После глубокой (20 °C) и пролонгированной (1 ч) гипотермии глутаматдегидрогеназная активность в гомогенатах больших полушарий мозга крыс повышается и на этапах самосогревания и в раннем постгипотермическом периоде продолжает оставаться на довольно высоком уровне. Однако независимо от длительности глубокой гипотермии к 3-м сут постгипотермического периода происходит возвращение активности фермента к норме.

Изучение влияния охлаждения на биохимические процессы теплокровного организма представляет интерес в связи с широким использованием метода искусственной гипотермии в медицинской практике [3, 6] и в экспериментальной биологии [8]. Мозг особо чувствителен к гипотермии [10] и нарушение его метаболизма, в частности азотистого, имеет постгипотермические последствия [1, 2]. Центральное место в модификации азотистого обмена в мозгу при гипотермии занимает изменение активности ферментов обмена глутамина и глутаминовой кислоты [4, 9]. Характерной особенностью при этом является повышение активности глутаматдегидрогеназы [7], одного из ключевых ферментов азотистого и энергетического обменов. Причиной изменения активности глутаматдегидрогеназы может быть освобождение связанных с мембраной митохондрий латентных форм фермента [11] в результате изменения внутримитохондриального гомеостаза и модификации мембран мозга при гипотермической патологии [5, 10].

Для оценки роли изменения активности глутаматдегидрогеназы как в компенсаторных, так и патологических реакциях мозга, вызываемых гипотермией, представляет интерес изучение ее активности при самосогревании после перенесенного охлаждения и в постгипотермическом периоде.

Эксперименты проводили на самцах беспородных крыс массой 180—200 г. Животных охлаждали (без наркоза) в специальных камсрах до ректальной температуры 30 и 19—20 °C соответственно за 15 и 60 мин. В отдельных сериях опытов сниженную температуру тела поддерживали в течение 1 ч. После каждого этапа охлаждения крыс удаляли из камер и оставляли при комнатной температуре. Восстановление нормальной температуры тела (36,5 °C) происходило: после гипотермии 30 °C за 1,5—2 ч, а после гипотермии 20—19 °C за 2,5—3 ч. Исследовали животных при самосогревании до 28, 34 и 36,5 °C, а также через 1 ч и на 3-и сут после полного восстановления

температуры тела. В качестве контроля брали интактных и до соответствующей температуры охлажденных крыс.

В нужный момент контрольных крыс декапитировали. Из больших полушарий головного мозга готовили гомогенат и в нем определяли глутаматдегидрогеназную активность (КФ 1.4.1.3) по описанному ранее методу [7]. Активность глутаматдегидрогеназы (ГДГ) выражали в наномолях НАДН₂ на 1 мг белка за 1 мин. Концентрацию белка в пробах определяли методом Лоури [12]. Для выявления обратимости температурных флюктуаций активности ГДГ проводили оценки активности фермента при температурах инкубации: 37, 30 и 20 °С.

Обнаружено (табл.), что у охлажденных до ректальной температуры 30 °С крыс при дальнейшем самосогревании до 34 и 36,5 °С, а также через 1 ч и на 3-и сут постгипотермического периода ГДГ активность в гомогенатах головного мозга при всех температурах инкубации проб почти не изменяется. У животных, перенесших пролонгированную (1 ч) гипотермию 30 °С, на всех последующих этапах самосогревания и в постгипотермическом периоде активность фермента также не подвергается статистически достоверным изменениям. Повышение активности фермента после глубокой гипотермии 20 °С при всех температурах инкубации проб имеет тенденцию к быстрому восстановлению активности на этапах самосогревания и в постгипотермическом периоде.

Глутаматдегидрогеназная активность в больших полушариях мозга крыс (в наномолях НАДН₂ на 1 мг белка за 1 мин) при самосогревании и в постгипотермическом периоде ($M \pm m$; $n = 6 - 7$)

Варианты опытов	Температурная инкубация проб, °С		
	37	30	20
Контроль (нормотермия)	69,37 ± 2,69	50,21 ± 2,40	38,10 ± 1,70
Гипотермия 30 °С (кратковременная), последующее самосогревание до:	73,20 ± 3,53	56,66 ± 2,40	40,19 ± 0,15
34,0 °С	69,05 ± 1,52	51,90 ± 2,15	37,18 ± 1,14
36,0 °С	69,19 ± 1,05	51,46 ± 1,49	36,89 ± 1,16
Постгипотермический период:			
через 1 ч	69,07 ± 1,25	51,70 ± 1,32	37,66 ± 1,20
на 3-и сут	69,70 ± 2,03	50,47 ± 2,15	36,32 ± 1,55
Гипотермия 30 °С (пролонгированная 1 ч), последующее самосогревание до:	78,57 ± 1,84	60,66 ± 1,82	44,64 ± 1,52
34,0 °С	75,90 ± 0,17	60,54 ± 0,10	44,54 ± 2,05
36,5 °С	70,18 ± 1,60	55,75 ± 2,24	41,01 ± 2,46
Постгипотермический период:			
через 1 ч	70,01 ± 2,10	52,35 ± 1,9	38,9 ± 2,15
на 3-и сут	68,9 ± 2,8	50,31 ± 1,5	38,2 ± 1,66
Гипотермия 20 °С (кратковременная), последующее самосогревание до:	81,20 ± 1,95*	64,28 ± 2,43*	52,90 ± 2,66*
28,0 °С	76,35 ± 9,83	62,41 ± 3,38	46,02 ± 2,59
36,5 °С	71,05 ± 1,39	58,16 ± 1,39	41,53 ± 0,02
Постгипотермический период:			
через 1 ч	71,10 ± 1,9	59,20 ± 1,5	41,2 ± 1,8
на 3-и сут	68,60 ± 2,98	51,69 ± 2,98	39,87 ± 1,90
Гипотермия 20 °С (пролонгированная 1 ч), последующее самосогревание до:	106,00 ± 3,60*	82,70 ± 3,95*	56,00 ± 1,59*
28,0 °С	94,00 ± 2,50*	74,73 ± 1,55*	50,85 ± 1,59*
36,5 °С	82,1 ± 1,9*	68,5 ± 1,2*	48,3 ± 2,1*
Постгипотермический период:			
через 1 ч	78,10 ± 1,57*	62,00 ± 1,12*	45,78 ± 1,15*
на 3-и сут	67,40 ± 2,40	49,10 ± 2,22	37,20 ± 1,65

Примечание. * — Достоверные различия ($P < 0,05$) по отношению к контролю.

Так, установившийся при глубокой (20 °С) гипотермии уровень ГДГ активности в мозгу при самосогревании до 28—29 °С снижается в среднем на 10—12 % и соответствует значениям активности у крыс, перенесших

умеренную гипотермию 30 °С. По завершению самосогревания до 36,5 °С у этой группы животных уже не обнаруживается достоверных изменений активности ГДГ по сравнению с интактными животными. Отсутствуют изменения в активности фермента через 1 ч и на 3-и сут постгипотермического периода.

Существенная активация ГДГ при глубокой (20 °С) гипотермии, пролонгированной до 1 ч, также носит обратимый характер. Для этой группы животных характерен более затяжной выход из состояния глубокой гипотермии: температура тела восстанавливается в течение 3,5 ч. При самосогревании крыс до 28 °С активность ГДГ мозга по сравнению с уровнем активности фермента у охлажденных крыс снижается всего лишь на 10 % при всех исследованных температурах инкубации проб. На следующем этапе самосогревания до 36,5 °С активность фермента продолжает падать, хотя еще не достигает уровня активности интактных крыс. Однако к 3-м сут постгипотермического периода происходит возвращение ГДГ активности к норме. При этом характер температурной зависимости активности фермента совпадает с таковым у нормотермических животных. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что наблюдаемые нами изменения активности ГДГ при гипотермии носят обратимый характер, определяющийся глубиной и продолжительностью гипотермии.

Можно думать, что повышение активности глутаматдегидрогеназы при гипотермии и быстрая ее обратимость при самосогревании и в постгипотермическом периоде обусловлены особенностями аллотопической регуляции активности фермента. Известно, что ГДГ образует комплекс с кардиолипидом внутренней мембраны МХ, и 90 % активности фермента при этом находится в латентном состоянии [11]. Нарушение внутримитохондриального гомеостаза может вызвать десорбцию фермента с внутренней мембраны митохондрий, что, по-видимому, является причиной активации фермента при гипотермии. Повышение содержания аммиака в тканях мозга охлажденного организма, возможно, выполняет роль положительного модулятора активности ГДГ [10].

Несмотря на то, что структурные и метаболические нарушения мозга при гипотермии имеют постгипотермические последствия, относительно быстрая обратимость глутаматдегидрогеназной реакции позволяет предположить, что аллотопическая регуляция фермента играет важную роль при экстремальных воздействиях на организм и обеспечивает участие ГДГ в компенсаторных реакциях мозга.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдуллаев Р. А., Эмирбеков Э. З. Содержание свободных аминокислот в мозге при гипотермии и в различные сроки постгипотермического периода // *Вопр. мед. хим.* — 1980. — 26. — Вып. 6. — С. 802—807.
2. Абдуллаев Р. А. Свободные аминокислоты и аминокислотный состав белков мозга при гипотермии и в постгипотермическом периоде // *Механизмы пластичности мозга при функциональных и патологических воздействиях: Тез. докл. Всес. симпозиума.* — Махачкала: Б. и., 1982. — С. 9.
3. Волколахов Я. В., Лацис А. Т. Глубокая гипотермия в кардиохирургии детского возраста. — Л.: Медицина, 1977. — 152 с.
4. Исмаилов И. А., Эмирбеков Э. З. Глутаминовая и глутаматдекарбоксилазная активность ткани мозга при гипотермии и зимней спячке // *Укр. биохим. журн.* — 1980, № 52. — С. 682—688.
5. Крепс Е. М. Липиды клеточных мембран. — Л.: Наука, 1981. — 339 с.
6. Малая Л. Т., Власенко Н. А. Кардиозащитные эффекты гипотермии и состояние систем нейрогуморальной регуляции при инфаркте миокарда // *Механизмы криовреждения и криозащиты биологических объектов: Тез. докл. 2-й Всес. конф.* — Харьков: Б. и., 1984. — С. 160.
7. Черкесова Д. У., Эмирбеков Э. З. Влияние гипотермии на глутаматдегидрогеназную активность мозга // *Бюлл. exper. биол. мед.* — 1982, № 9. — С. 33—35.
8. Эмирбеков Э. З. Функциональная нейрохимия. — Махачкала: ДГУ, 1980. — 126 с.
9. Эмирбеков Э. З. Механизмы пластичности мозга при функциональных и патологических воздействиях // *Механизмы пластичности мозга при функциональных и патологических воздействиях: Тез. докл. Всес. конф.* — Махачкала: Б. и., 1982. — С. 187.

10. Эмирбеков Э. З., Львова С. П. Механизмы биохимических изменений при низких температурах тела.— Ростов / Дон: РГУ, 1985.— 79 с.
11. Dodd G. H. The Interaction of Glutamate Dehydrogenase and Malate Dehydrogenase with Phospholipid Membranes // Eur. J. Biochem.— 1973.— 33, N°3.— P. 418—427.
12. Lowry O. H., Rosebrough N. I., Farr A. L., Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem.— 1951.— 193, N°265.— P. 265—275.

Дагестанский гос. ун-т,
г. Махачкала

Поступила 17.09.87

D. U. CHERKESOVA, E. Z. EMIRBEKOV

THE GLUTAMATE DEHYDROGENASE ACTIVITY OF THE RAT BRAIN DURING SELFHEATING AND THE POSTHYPOTHERMIA PERIOD

V. I. Lenin state University of Dagestan, Makhachkala

After deep (20 °C) and prolonged (1 hr) hypothermia, the glutamate dehydrogenase activity in homogenates of rat brain hemispheres has been found to increase during selfheating and posthypothermia period. However, the enzyme activity restored to the normal level in 3 days after hypothermia independently of its duration.

УДК 57.043

Л. К. Султанова, Цз. Д. Цветков

ВЛИЯНИЕ СКОРОСТИ ЗАМОРАЖИВАНИЯ И НЕКОТОРЫХ КРИОПРОТЕКТОРОВ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА ГОРОХА

Исследованы изменения фотохимической активности выделенных хлоропластов гороха во время замораживания. Активность определяли по восстановлению 2,6-дихлорфенолиндофенола (ДХФИФ) при освещении. Использовали две разные скорости замораживания. Восстановление ДХФИФ определяли по изменению оптической плотности при 610 нм. Установлено снижение активности хлоропластов при замораживании, при этом повреждение в процессе медленного замораживания выражено сильнее. Сахароза в концентрации 0,2 М проявляет криопротектирующий эффект, увеличивая активность при обеих скоростях замораживания. Эффект выражен сильнее при меньшей скорости замораживания. Сходный криопротектирующий эффект проявляет глицерин в 10 %-ной концентрации.

Многочисленные работы по замораживанию различных биологических объектов привели к заключению, что их повреждение происходит на уровне мембраны. Исследования влияния низких температур на хлоропластные мембраны направлены главным образом на выяснение механизмов повреждения и криопротекции во время замораживания, а также механизма акклиматизации их к холоду. Однако трудно установить точный характер повреждений мембран — как структуры, так и их функциональной активности.

Хлоропласты и тилакоидные мембраны являются объектами для криобиологических исследований, чувствительность мембран к действию низких температур была показана в [1, 2]. Однако конкретный характер криоповреждения структуры и функции мембран полностью не установлен. Было отмечено понижение функциональной активности хлоропластов, выраженное в уменьшении фотофосфорилирования, но до настоящего времени не выяснены структурно-функциональные повреждения мембран при замораживании хлоропластов разными способами.

Таким образом, цель данного исследования: проследить изменения функциональной активности хлоропластов при их замораживании с двумя различными скоростями; выявить протектирующее действие сахарозы и глицерина на эту активность.

Хлоропласты были выделены из листьев гороха в среде, содержащей 0,4 М NaCl, 1,5 мМ MgCl, 50 мМ фосфатный буфер (pH 7,8), и инкубировались в среде, содержащей 10 мМ KCl, 2 мМ MgCl, 50 мМ фосфатный буфер (pH 7,3)

с добавлением соответственно 0,2 М сахарозы или 10 % глицерина, там где это указано.

Замораживание проводили двумя способами (рис. 1): медленно со скоростью 1,0 °С/мин (А), используя программный замораживатель «Юнион Карбайд» (США), и быстро — прямым погружением суспензии в жидкий азот (Б). Оттаивание проводили на водяной бане при температуре 37 °С.

Изменения фотохимической активности хлоропластов регистрировали по восстановлению дихлорфенолиндофенола (ДХФИФ) во время освещения белым светом (по уменьшению оптической плотности суспензии в области 610 нм). После освещения хлоропластов количество ДХФИФ уменьшается пропорционально времени освещения. Принято считать, что ДХФИФ является специфичным акцептором электронов, переносимых по пути фотосистемы II. Скорость расходования ДХФИФ (уменьшение экстинкции в области 610 нм) принята мерой фотохимической активности хлоропластов.

На рис. 1 (А) представлены данные, полученные при изучении влияния разных скоростей замораживания на фотохимическую активность хлоропластов. По абсциссе отмечено время освещения суспензии хлоропластов в минутах, по ординате — экстинкция в области 610 нм как процент контрольной экстинкции (контролем являются хлоропласты с добавленным 5,10 М ДХФИФ без освещения). Как видно, фотохимическая активность хлоропластов нарастает пропорционально с наклоном ($\text{tg } \alpha$) кривых. Сплошная линия показывает фотохимическую активность контрольных (незамороженных) хлоропластов. Их активность оказывалась наибольшей ($\text{tg } \alpha = 3,70$).

Прерывистая линия (а) показывает фотохимическую активность хлоропластов, замороженных путем медленного охлаждения (со скоростью 1 °С/мин до -40 °С с последующим погружением в жидкий азот — 196 °С). Их активность намного меньше активности контрольных хлоропластов ($\text{tg } \alpha = 1,72$). В то же время хлоропласты, замороженные путем быстрого охлаждения прямым погружением в жидкий азот (кривая б), тоже проявляют уменьшение фотохимической активности, но это уменьшение выражено слабее, чем в случае медленно охлаждаемых хлоропластов ($\text{tg } \alpha = 2,70$). Эти данные получены при замораживании в среде без сахарозы. Добавление сахарозы к среде замораживания почти полностью восстанавливает фотохимическую активность хлоропластов. Из рис. 1 (Б) видно, что замораживание в присутствии сахарозы тоже ингибирует активность, но в меньшей степени. Здесь кривая а относится к медленно охлаждаемым хлоропластам, а кривая б — к быстро охлаждаемым хлоропластам, но замороженным в присутствии сахарозы.

Более наглядно влияние сахарозы как криопротектора на фотохимическую активность мембран при обеих скоростях замораживания показано на рис. 2: А — медленное охлаждение, Б — быстрое охлаждение; кривая а представляет данные об изменении фотохимической активности хлоропластов, замороженных в среде без добавления сахарозы, кривая б — хлоропластов, замороженных в среде с добавлением сахарозы в концентрации 0,2 М. Сплошной линии соответствует фотохимическая активность контрольных (незамороженных) хлоропластов. Видно, что сахароза проявляет

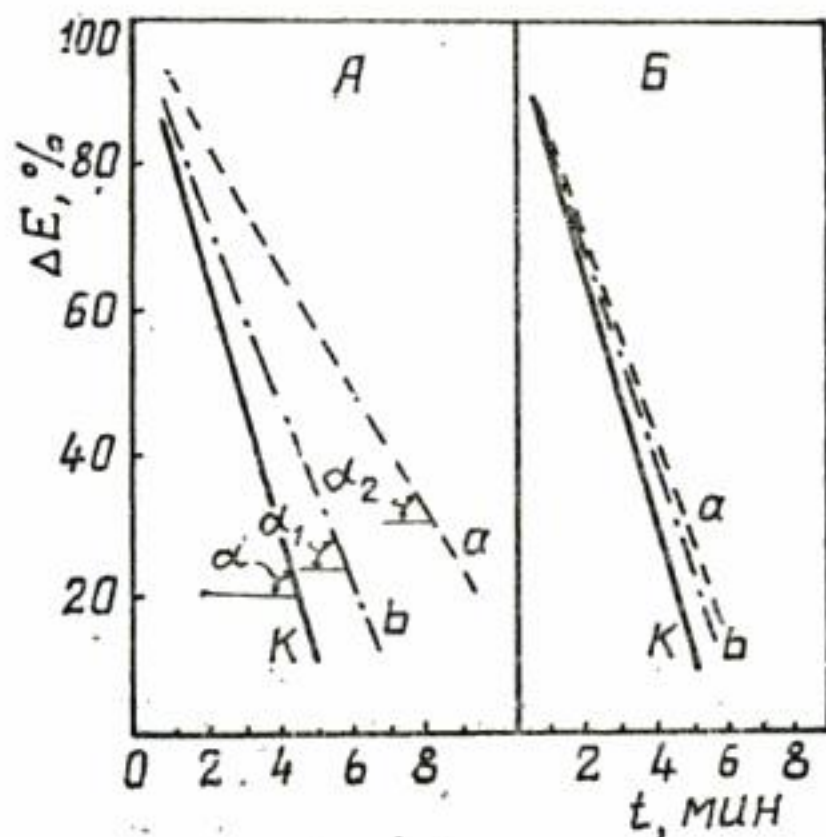


Рис. 1. Влияние разных скоростей замораживания на ФХА хлоропластов: а — хлоропласты, замороженные путем медленного охлаждения; б — хлоропласты, замороженные путем быстрого охлаждения; К — контрольные (незамороженные) хлоропласты; А — среда без добавления сахарозы; Б — среда с добавленной сахарозой (0,2М)

криопротектирующий эффект при обеих скоростях замораживания хлоропластов. Этот эффект выражен в уменьшении ингибирующего действия замораживания на фотохимическую активность. Следует отметить, что в случае медленного охлаждения действие сахарозы выражено сильнее ($K = 1 - \text{tg}\alpha_2/\text{tg}\alpha_1 = 0,43$ — медленное охлаждение, $K = 1 - \text{tg}\beta_2/\text{tg}\beta_1 = 0,10$ — быстрое охлаждение).

На рис. 3 приведены данные о защитном влиянии глицерина на фотохимическую активность хлоропластов: *А* — медленно и *Б* — быстро охлаждаемые хлоропласты. Кривая *а* показывает активность хлоропластов, замороженных в среде без криопротекторов, *б* — хлоропластов, замороженных в присутствии 10 %-ного глицерина. Видно, что влияние глицерина на фотохимическую активность, как и в случае с сахарозой, выражено сильнее в отношении хлоропластов, замороженных путем медленного охлажде-

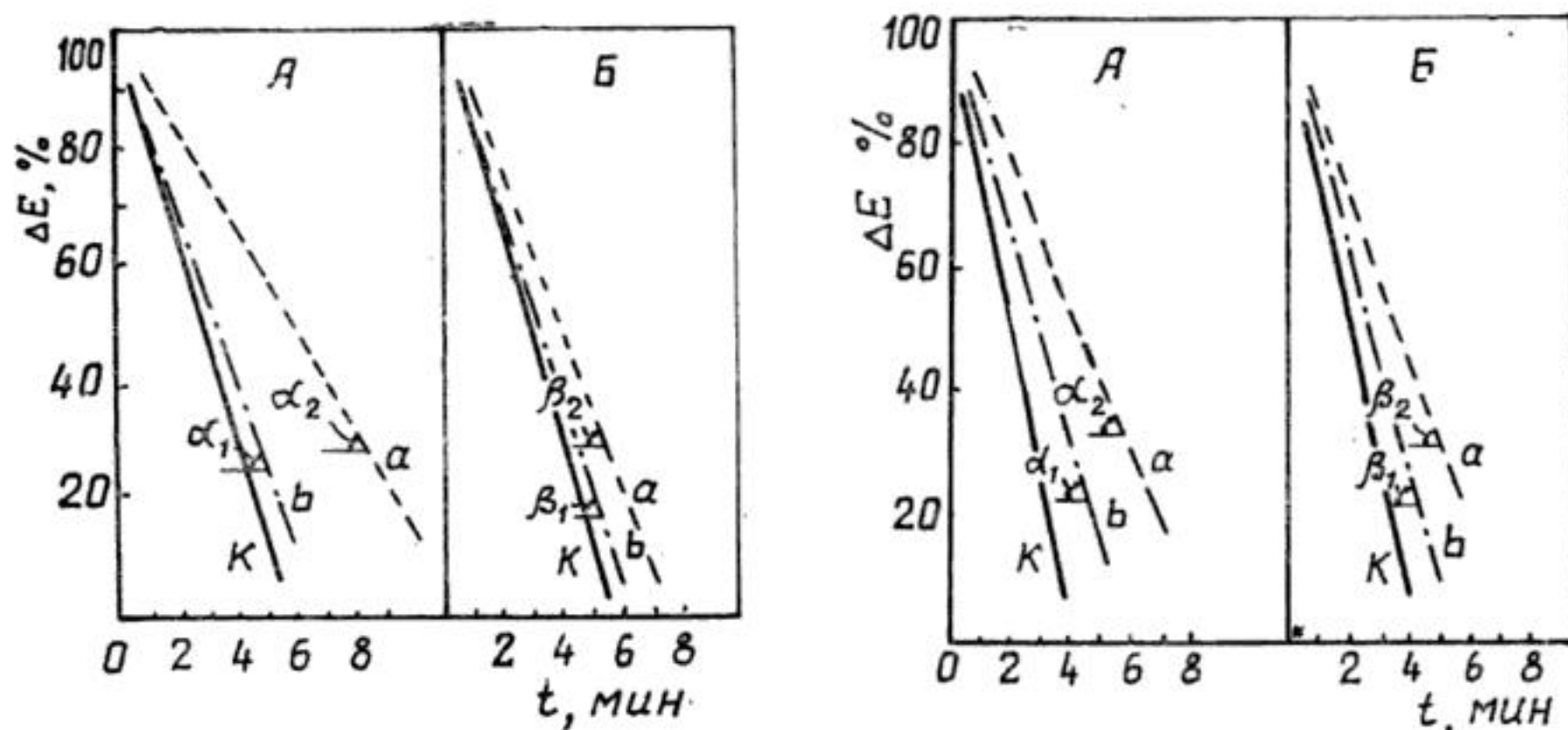


Рис. 2. Влияние сахарозы на ФХА хлоропластов: *а* — хлоропласты, замороженные в среде без добавления сахарозы; *б* — хлоропласты, замороженные в среде с добавленной сахарозой (0,2М); *к* — контрольные (незамороженные) хлоропласты; *А* — медленное замораживание; *Б* — быстрое замораживание

Рис. 3. Влияние глицерина на ФХА хлоропластов: *а* — хлоропласты, замороженные в среде без добавления глицерина; *б* — хлоропласты, замороженные в среде с добавленным глицерином (10 %); *к* — контрольные (незамороженные) хлоропласты; *А* — медленное замораживание; *Б* — быстрое замораживание

ния, однако разница между двумя эффектами меньше, чем в случае сахарозы ($K = 0,29$ — для медленно охлаждаемых хлоропластов и $K = 0,26$ — для быстро охлаждаемых).

Полученные данные показывают, что фотохимическая активность хлоропластов уменьшается при их замораживании и оттаивании. Эти результаты согласуются с данными об уменьшении фотофосфорилирования после замораживания и оттаивания хлоропластов [4]. Скорость транспорта электронов в процессе фотосинтеза, так же как и величина фотофосфорилирования, является мерой функциональной активности хлоропластов. Было бы интересно связать эти результаты с изменениями, произошедшими в структуре хлоропластных мембран после замораживания с двумя разными скоростями, но, к сожалению, пока таких данных не имеется.

Тот факт, что фотохимическая активность хлоропластов уменьшается сильнее после замораживания хлоропластов путем медленного охлаждения, свидетельствует, что такое охлаждение оказывает более сильный эффект повреждения на биологические мембраны. Вполне вероятно, что более медленная скорость охлаждения способствует образованию больших кристаллов льда, которые прижимают механическим способом мембраны хлоропластов и приводят к их разрушению. С другой стороны, медленное замораживание приводит к более длительному воздействию на мембраны сверхвысоких

концентраций ионов, образовавшихся во внешней среде. Это может привести к разрушению мембран и к потере некоторых существенных ферментов. Было показано выделение СФ-1 (сопрягающего фактора), RuDP — карбоксилазы, NADP-редуктазы и пластоцианина в процессе замораживания [5]. Тот факт, что глицерин и тем более сахара оказывают защитный эффект в процессе медленного замораживания, можно принять как подтверждение коллигативного действия криопротекторов. Другими словами глицерин, как и сахара, не взаимодействуют специфическим образом с мембраной или с отдельными ее компонентами (например, белками или липидами), а действует по принципу разбавления «токсических веществ» во время замораживания. Подтверждением этому предположению являются наблюдения Сантариуса [4], который заметил нарастание криопротектирующего эффекта сахаров с увеличением их концентрации. Если предположить, что этот протектирующий эффект проявляется во время самого процесса замораживания, то больший эффект будет отмечен в случае более длительного воздействия повреждения (меньшей скорости замораживания).

Таким образом, замороженные-оттаянные хлоропласты проявляют меньшую фотохимическую активность (ФХА) по отношению к контрольным (незамороженным) хлоропластам, определенную по восстановлению ДХФИФ на свету. При этом меньшая скорость охлаждения во время замораживания приводит к более сильно выраженному повреждению;

— сахара в концентрации 0,2 М оказывает защитный эффект при двух используемых скоростях охлаждения. Эффект выражен сильнее в случае медленного охлаждения. Сходный эффект проявляет глицерин в концентрации 10 %.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Grafflage S., Krause G. Simulation of in situ freezing damage of the photosynthetic apparatus by freezing in vitro of thylakoids suspended in complex media // *Planta*.— 1986.— 168.— P. 67—76.
2. Hinch D. K., Schmidt J. E., Heber U., Schmitt J. M. Colligative and non-colligative freezing damage to thylakoid membranes // *Biochim. Biophys. Acta*.— 1984.— 769.— P. 8—14.
3. Lovelock J. E. The hemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing // *Biochim. Biophys. Acta*.— 1953.— 10.— P. 414—426.
4. Santarius K. A. The effect of freezing on thylakoid membranes in the presence of organic acids // *Plant Physiol*.— 1971.— 48.— P. 155—162.
5. Volger H., Heber U., Berzborn R. J. Loss of function of biomembranes and solubilization of membrane proteins during freezing // *Biochim. Biophys. Acta*.— 1978.— 511.— P. 455—469.

Сельскохозяйственная академия,
г. София

Поступила 10.05.89

L. K. SULTANOVA, Ts. D. TSVETKOV

THE INFLUENCE OF FREEZING RATE AND CRYOPROTECTANTS ON THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF THE PEA PHOTOSYNTHETIC APPARATUS

Academy of Agriculture, Sofia

Changes in photochemical activity of isolated pea chloroplasts were studied upon freezing. The activity was estimated by reduction of 2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIP) under illumination. Two freezing rates have been used. The reduction of DCPIP was judged by changes in optical density at 610 nm. The activity of chloroplasts has been found to decrease on freezing with the cryoinjury being more pronounced during slow freezing. Sucrose in a 0.2 M concentration appeared to exert a cryoprotective effect increasing the activity when using both freezing rates. The effect was more pronounced upon slow freezing. A similar cryoprotective effect had 10 % glycerol.

Н. Н. Войтенко, И. П. Воронова, Г. Ф. Молодцова

МОНОАМИНОКСИДАЗА МОЗГА ПРИ ГИПОТЕРМИИ И ЗИМНЕЙ СПЯЧКЕ

Изучалось действие низких температур на МАО типа А мозга эндотермов крыс Вистар и гетеротермов краснощеких сусликов. Инкубация ферментов при 37 °С у крыс в состоянии гипотермии и после выхода из нее показала появление необратимых температурных конформеров МАО типа А с положительной кооперативностью между центрами МАО, связывающими серотонин, при неизменной активности МАО типа А. У гетеротермов сусликов в состоянии зимней спячки при инкубации фермента при 37 °С активность МАО типа А была выше, чем при 7 °С, и появлялась положительная кооперативность по субстрату.

Молекулярные механизмы адаптации метаболизма нейромедиаторов мозга, в частности серотонина, к низким температурам изучены недостаточно [6, 8]. Природная гипотермия гетеротермов (зимняя спячка), свободная от всех осложнений искусственной гипотермии эндотермов, является ценной моделью для изучения молекулярных механизмов, противостоящих действию низких температур на метаболизм нейромедиаторов мозга. Ключевым ферментом деградации серотонина в мозге, дезаминирующим серотонин, является моноаминоксидаза ((МАО) амин: кислород оксидоредуктаза, дезаминирующая, содержащая флаavin, КФ 1.4.3.4). Изучалось влияние низких температур на активность МАО типа А, специфически дезаминирующей серотонин мозга крыс Вистар в сравнении с зимоспящими животными краснощековыми сусликами.

Работа проведена на крысах линии Вистар и на краснощеких сусликах (*Citellus Erythrognis Br.*). Отловленные летом в Новосибирской области суслики осенью помещались в специальное помещение с температурой 2—6 °С, где они впадали в спячку. В 1-й серии опытов крыс охлаждали в холодильной камере с температурой — 16° С до понижения температуры тела до 25 °С, состояния «холодового наркоза». Часть крыс после извлечения из холодильной камеры согревали при комнатной температуре до 37 °С и затем декапитировали, остальных после извлечения из холодильной камеры содержали при комнатной температуре в течение 4 сут. Параллельно этим опытам проведено изучение влияния длительного холодового воздействия на МАО типа А мозга крыс. Для этого крыс содержали в холодильной камере при температуре 2 °С в течение 14 сут. Температура тела этих животных все время находилась на уровне 37 °С. Контролем служили интактные крысы. Во 2-й серии опытов температура тела крыс снижалась до 18 °С (состояния глубокой гипотермии), когда всего 2—3 °С отделяет животных от смерти. Для этого крыс помещали приблизительно на 10 мин в тающий лед до понижения температуры тела до 25 °С, а затем переносили в воду с температурой 18 °С. Одну часть крыс декапитировали при достижении температуры тела 18 °С, другую часть крыс после охлаждения до 18 °С разогревали в сухом термостате с температурой 30 °С до температуры тела 36 °С. В 3-й серии опытов изучали влияние низких температур на МАО типа А мозга сусликов, которые находились в состоянии бодрствования, спячки, пробуждения с температурой тела 37, 2—6, 22 °С соответственно. Животных декапитировали, головной мозг выделяли на холоде. Для определения активности МАО весь мозг (за исключением мозжечка) гомогенизировали в 0,32 М растворе сахарозы. Фракцию митохондрий, содержащую МАО, выделяли методом дифференциального центрифугирования. Активность МАО определяли по методу [2]. В качестве специфического субстрата МАО типа А использовали серотонин креатининсульфат («Реанал», Венгрия). Активность МАО типа А выражали в нмоль аммиака/мг белка · мин. Белок определяли по Лоурн.

При концентрациях серотонина, близких к насыщающим, при каждом состоянии животных рассчитывали коэффициент кооперативности Хилла n_H [7] для определения зависимости начальной скорости (v) дезаминирования

серотонина от его концентрации $[S]_0$ с целью оценки величины кооперативного взаимодействия между центрами МАО, связывающими серотонин. Инкубацию препаратов МАО проводили при 37 °С в большинстве случаев, инкубацию при 7 °С проводили только у сусликов в состоянии зимней спячки.

При кратковременном резком охлаждении крыс, несмотря на глубокое падение температуры тела до 25 °С и даже до 18 °С, при инкубации препаратов МАО при 37 °С, возможной температуре тела после разогревания, активность МАО типа А существенно не снижалась, однако коэффициент кооперативности Хилла n_H становился выше единицы (табл. 1), что свидетельствует о появлении положительного кооперативного взаимодействия между центрами МАО, связывающими серотонин, под влиянием гипотермии. При разогревании крыс после гипотермии 25 и 18 °С, несмотря на отсутствие изменений активности МАО типа А, при инкубации препаратов МАО при 37 °С коэффициент кооперативности Хилла n_H все еще оставался повышенным (табл. 1), что свидетельствует об оставшихся после гипотермии конформационных изменениях МАО.

Высокий коэффициент кооперативности Хилла n_H продолжал сохраняться у крыс, содержащихся в течение 4 сут после охлаждения при комнатной температуре (табл. 1), при неизменной активности МАО типа А в условиях инкубации при 37 °С. Длительное действие низкой температуры 2 °С без понижения температуры тела не вызывало изменений ни активности МАО типа А, ни коэффициента кооперативности Хилла n_H (табл. 1).

Таблица 1

Активность МАО типа А (нмоль аммиака/мг белка · мин) ствола головного мозга крыс Вистар и коэффициент кооперативности Хилла n_H , рассчитанный для зависимости начальной скорости (v) дезаминирования серотонина от его концентрации $[S]_0$ при гипотермии 25 и 18 °С а также выходе из гипотермии

Серии опытов	Температура тела, °С	Активность МАО А	Кол-во животных	Коэффициент кооперативности Хилла в области концентраций серотонина 0,25; 0,50; 1,00, мМ
Гипотермия 25 °С				
Контроль	37	4,8±0,15	12	0,80
Гипотермия	25	4,6±0,28	14	1,73
Восстановление температуры тела	37	5,4±0,29	19	1,70
Через 4 сут после гипотермии	37	5,0±0,17	12	2,0
Охлаждение при 2 °С в течение 14 сут	37	4,9±0,24	8	1,0
Гипотермия 18 °С				
Контроль	37	2,88±0,06	6	1,02
Гипотермия	18	2,75±0,12	4	2,61
Разогревание после гипотермии	37	3,24±0,32	5	2,77

Примечание. В качестве субстрата 1,0 мМ серотонина креатининсульфата.

В табл. 2 приведены данные о бодрствующих сусликах, сусликах в состоянии зимней спячки, пробуждающихся от спячки. В состоянии зимней спячки при температуре тела 2—6 °С и температуре инкубации близкой к реальной (7 °С) активность МАО типа А была сниженной по сравнению с бодрствованием, но коэффициент кооперативности Хилла n_H находился на уровне единицы, как и в состоянии бодрствования (табл. 2). И только при инкубации при 37 °С (температуре, возможной при переходе от спячки к бодрствованию) активность МАО типа А повысилась. При этом коэффициент кооперативности Хилла повысился более чем вдвое. В состоянии про-

буждения, перехода от спячки к бодрствованию, при температуре инкубации 37 °С активность МАО типа А была выше, чем у сусликов в состоянии зимней спячки при их реальной температуре, но несколько ниже, чем у бодрствующих, и резко повышен коэффициент кооперативности Хилла n_H (табл. 2).

Таблица 2

Активность МАО типа А (нмоль аммиака/ мг белка · мин) в стволе головного мозга сусликов и коэффициент кооперативности Хилла n_H , рассчитанный для зависимости начальной скорости (v) дезаминирования серотонина от его концентрации S_0 при разных физиологических состояниях

Серии опытов	Температура инкубации, °С	Температура тела, °С	Активность МАО А	Количество животных	Коэффициент кооперативности Хилла в области концентраций серотонина, мМ	
					0,063 0,125 0,250	0,250 0,50 1,00
Бодрствование	37	37	$3,06 \pm 0,38$	6	1,17	0,90
Спячка	7	2—6	$0,49 \pm 0,04^{***}$	6		
	37	2—6	$2,25 \pm 0,03^*$	6		2,52
Пробуждение	37	22	$1,67 \pm 0,14^{**}$	6		3,52

Примечание. * — $P < 0,05$; ** — $P < 0,01$; *** — $P < 0,001$ по сравнению с бодрствованием. В качестве субстрата 1,0 мМ серотонина креатининсульфата.

Полученные данные показали, что кратковременное снижение температуры тела крыс до состояния «холодового наркоза» (25 °С) и до состояния глубокой гипотермии (18 °С), в условиях инкубации препаратов МАО при 37 °С (возможной температуре тела после выхода крыс из гипотермии) не вызывало снижения активности МАО типа А мозга крыс. Очевидно, это и является проявлением молекулярных механизмов, способных противостоять непосредственному влиянию низких температур на фермент. Для МАО типа А таким молекулярным механизмом, по-видимому, служит образование температурных конформеров с положительной кооперативностью между центрами МАО, связывающими серотонин. В результате чего активность МАО типа А повышается и компенсирует непосредственное действие низких температур, описанное Аррениусом — Вант-Гоффом. Образованные под влиянием низких температур температурные конформеры МАО типа А, по всей видимости, необратимы, поскольку на 4-й день после восстановления температуры тела положительная кооперативность по субстрату сохранялась. Можно думать, что в момент гипотермии температурные конформеры выполняют положительную, адаптивную роль, поскольку препятствуют падению метаболизма серотонина в мозге.

У эндотермов крыс Вистар кратковременное непосредственное действие низких температур (гипотермия при 25 °С и инкубация при 25 °С) понижает реальную активность МАО типа А в 2,7 раза [5], но это понижение обратимо и при инкубации при 37 °С активность МАО типа А достигает уровня контроля, несмотря на появление положительной кооперативности по субстрату (табл. 1). Отсутствие повышения активности МАО типа А при положительной кооперативности по субстрату у разогретых крыс с температурой тела 37 °С, температурой инкубации 37 °С, может быть связано с нарушением других молекулярных механизмов, регулирующих активность МАО типа А, прямым действием низких температур. Не исключено, что под влиянием низких температур ингибируется синтез белков или пептидов, повышающих активность МАО типа А [4].

Конформационные изменения МАО типа А у эндотермных крыс, возникающие под влиянием низких температур, носят необратимый характер, так как сохраняются и после согревания крыс в течение нескольких дней.

Образование таких конформеров у эндотермов, вероятно, позволяет расширить предел переносимости низких температур только до 16 °С.

Следует отметить, что длительное действие низких температур на организм эндотермов, которое не сопровождается падением температуры тела, не вызывает и конформационных изменений МАО типа А. В этом случае, по всей видимости, в начале действия низких температур эндотермы переживают состояние холодового стресса, при котором описана обратимая трансформация МАО типа А [3]. Позже наступает период адаптации, не связанный с изменением конформации МАО типа А.

Гетеротермные животные суслики по иному преодолевают угнетающее действие низких температур на метаболизм серотонина в мозге. Как показано ранее [1], у сусликов температурные конформеры МАО типа А с положительной кооперативностью по субстрату образуются только в переходные периоды засыпания и пробуждения. Во время бодрствования и спячки у сусликов в мозге работают жесткие «тепловая» и «холодовая» формы МАО, поскольку положительное кооперативное взаимодействие между центрами МАО типа А, связывающими серотонин, отсутствует.

Существование «холодовой» и «тепловой» МАО типа А, по всей видимости, позволяет расширить пределы переносимости гетеротермными животными низких температур от 37 до 2 °С.

Итак, у эндотермных животных крыс Вистар в состоянии «холодового наркоза» (25 °С) и в состоянии глубокой гипотермии (18 °С) непосредственное действие низких температур вызывает образование необратимых температурных конформеров МАО типа А, которые, по-видимому, противостоят прямому действию низких температур, поддерживая уровень серотонина в мозге равный контрольному [6].

У гетеротермных животных сусликов, в отличие от эндотермных животных крыс, обратимые температурные конформеры МАО типа А образуются только в переходные периоды засыпания и пробуждения [1], в состоянии зимней спячки работает жесткая «холодовая» форма МАО типа А, которая и обеспечивает у спящих сусликов в мозге уровень серотонина, равный контрольному [6].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Войтенко Н. Н. Влияние низких температур на моноаминоксидазу мозга зимоспящих сусликов // Криобиология. — 1988. — № 1. — С. 34—39.
2. Горкин В. З., Вережкина И. В., Гриднева Л. И. и др. Методы исследования активности и специфического торможения моноаминоксидаз митохондрий // Современные методы в биохимии. — М.: Медицина. — 1968. — С. 155—177.
3. Горошинская И. А., Грабовская Л. А., Броницкая З. Г., Кричевская А. А. Активность моноаминоксидаз мозга при холодовой адаптации и совместном действии холода и гипербарооксигенации // Физиол. журн. СССР. — 1981. — 67, № 11. — С. 1611—1616.
4. Доведова Е. Л., Попова Н. С., Качалова Л. М. Действие пептида дельта-сна на активность моноаминоксидаз, ацетилхолинэстеразу и биоэлектрическую активность структур головного мозга // Нейрохимия. — 1983. — 2, № 2. — С. 138—147.
5. Молодцова Г. Ф. Влияние кратковременного охлаждения на моноаминоксидазную ферментную систему мозга крыс // Вопросы мед. химии. — 1982. — 28, № 5. — С. 36—40.
6. Попова Н. К., Науменко Е. В., Колпаков В. Г. Серотонин и поведение. — Новосибирск: Наука, 1978. — 302 с.
7. Силонова Г. В., Ливанова Л. Б., Курганов Б. И. Аллостерическое ингибирование фосфорилазы Б из мышц кролика // Молек. биология. — 1969. — 3, № 5. — С. 768—783.
8. Ророва Н. К., Конусова А. V. Brain and peripheral effects of serotonin on thermoregulation // Biogenic amines. — 1985. — 3, N 2. — P. 125—134.

Ин-т цитологии и генетики

СО АН СССР,

Ин-т физиологии АМН СССР, г. Новосибирск

Поступила 29.03.89

BRAIN MONOAMINOXIDASE IN HYPOTHERMIA AND HIBERNATION

*Institute for Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the USSR Academy of Sciences;
Institute for Physiology of the USSR Academy of Medical Sciences, Novosibirsk*

The effect of low temperatures on MAO type A of endothermal Wistar rat and heterothermal ground squirrel brains has been studied. Incubation of the enzyme of hypothermal and pothypothermal rats at 37 °C demonstrated the appearance of irreversible temperature conformers of MAO type A with positive cooperativeness between the serotonin in-binding MAO centers with the activity of MAO type A being unchanged. The incubation of the enzyme of hibernating heterothermal ground squirrels showed higher activity of MAO type A at 7 °C than at 37 °C with the appearance of substrate positive cooperativeness.

УДК 57.554.3+577.150.36

**А. И. Груздев, В. В. Богдан, Н. Н. Немова, В. С. Михкеева,
С. Д. Гурьянова, М. Ю. Крупнова**

ВЛИЯНИЕ ПРЕДЕЛЬНО НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР ЗИМОВКИ НА НЕКОТОРЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СЕГОЛЕТКОВ КАРПА

Изучали влияние предельно низких температур (1—0 °C) зимовки на активность лизосомальных ферментов, альдолазы, цитохромоксидазы, изоферментный состав лактатдегидрогеназы, фракционный состав липидов, количество свободного оксипролина, уровень циклических нуклеотидов в тканях карпа *Cyprinus carpio*. Показано, что близкая к 0 °C температура вызывает такие изменения исследуемых биохимических параметров, которые свидетельствуют о физиологических сдвигах, выходящих за пределы адаптаций.

Одним из важных экологических факторов, влияющих на физиолого-биохимические процессы эктотермов, является температура. Известно, что для каждого вида рыб существует определенный диапазон температур, в пределах которого обмен существенно не меняется. Если понижение или повышение температуры среды достигает уровня, превышающего адаптивные возможности, то наблюдается нарушение нормального соотношения между различными метаболическими процессами. Однако существующая точка зрения пока не имеет строгих доказательств [7].

Оптимальной температурой для зимовки сеголетков карпа в прудах является 1—2 °C; снижение температуры до значений, близких к нулевым (0,1—0,2 °C), вызывает нарушение физиологических функций организма [8]. Биохимические аспекты этой проблемы изучены недостаточно.

В настоящей работе исследовалось влияние предельно низких температур (близких к 0 °C) зимовки на некоторые биохимические показатели сеголетков карпа, связанные с различными звеньями энергетического обмена и играющие определенную роль в поддержании гомеостаза и его регуляции.

Использовали годовиков карпа *Cyprinus carpio* с Сямозерского рыбозаводного завода (Карельская АССР) в феврале 1984 г. Температура воды в период отлова составляла 1—2 °C. Средняя масса исследуемых рыб 74,4 г. Две сравниваемые группы (до 10 рыб в каждой) содержали в 40-литровых аквариумах, где с помощью термостатируемых устройств с точностью до 0,2 °C поддерживалась температура 1 и 0 °C при постоянной аэрации. Эксперимент длился 3 нед., что считается достаточным периодом для адаптации. В течение этого времени смертность у рыб отсутствовала. В параллельных опытах с идентичными условиями содержания спустя 1 мес. отход рыб оказался в 2 раза выше при температуре 0 °C, чем при 1 °C.

В различных тканях рыб ($n = 9$) измеряли активность внутриклеточных протеиназ — катепсинов D и B [1], а также кислой фосфатазы, β -глюкози-

дазы [5], цитохромоксидазы (ЦО) [11], альдолазы и изоферментов лактатдегидрогеназы (ЛДГ) [2]. Липиды разделяли с помощью тонкослойной хроматографии и количественно определяли гидроксаматным методом [9]. Фосфолипиды определяли по фосфору. Проводили также количественное определение связанного оксипролина [4] и концентрацию циклического аденозинмонофосфата [10]. Статистическую обработку данных проводили с применением общепринятых методов и непараметрического критерия различий Вилкоксона-Манна-Уитни [3].

В табл. 1 представлены данные по изменению биохимических параметров в тканях карпа при уменьшении температуры воды от 1 к 0 °С. Увеличение активности лизосомальных протеиназ, кислой фосфатазы, β -глюкозидазы указывает на повышение скорости деградации белков, некоторых углеводов и фосфорных эфиров в клетках печени и мышц карпа. Такое возрастание активности кислых гидролаз при низкой температуре (около 0 °С) может быть следствием усиления аутофагоцитоза и повышения синтеза лизосомальных ферментов с образованием новых лизосом. Возрастание гидролитических процессов в клетке может быть направлено, по-видимому, на утилизацию внутриклеточных компонентов, поврежденных в результате действия стресс-фактора (предельно низкая температура) и частично на энергетические потребности. Существенных различий уровня общей активности этих ферментов у карпов при температурах 1 и 7 °С, лежащих в пределах нормального физиологического диапазона, не обнаружено.

Таблица 1

Биохимические показатели в тканях сеголетков карпов после 3-недельного содержания в условиях с предельно низкими температурами

Показатели	Единица измерения	Печень		Мышцы	
		1 °С	0 °С	1 °С	0 °С
Катепсин	$E_{280}/г/ч$	$6,0 \pm 0,4$	$10,2 \pm 0,3$	$5,1 \pm 0,5$	$12,1 \pm 0,4$
Катепсин В	$E_{525}/г/ч$	$20,0 \pm 0,5$	$28,2 \pm 0,9$	$12,1 \pm 1,0$	$17,0 \pm 0,7$
β -глюкозидаза	$E_{410}/г/ч$	$0,2 \pm 0,03$	$0,6 \pm 0,08$	—	—
Связанный оксипролин	Мкг/г сухой ткани	—	—	$32,8 \pm 2,4$	$23,2 \pm 1,7$
Общие фосфолипиды	% к сухой массе	$9,7 \pm 0,5$	$7,7 \pm 0,3$	$8,0 \pm 3,0$	$7,9 \pm 0,3$
Фосфатидилхолин	То же	$6,2 \pm 0,5$	$4,8 \pm 0,2$	$5,1 \pm 0,3$	$4,8 \pm 0,2$
Фосфатидилэтаноламин	»	$3,4 \pm 0,3$	$2,2 \pm 0,1$	$2,7 \pm 0,2$	$2,9 \pm 0,1$
цАМФ	пмоль/мг белка	$10,4 \pm 0,6$	$14,3 \pm 0,7$	$5,5 \pm 0,4$	$7,4 \pm 0,5$

При близкой к 0 °С температуре наблюдалось снижение содержания в мышцах карпов оксипролина. Коллаген обычно считается метаболически инертным, то есть он в основном накапливается и не расходуется на протяжении жизни индивидуума. Отмеченные изменения вероятнее всего вызваны деструкцией соединительной ткани и гидролизом коллагена при низкой температуре, что частично можно связать с увеличением активности лизосомальных протеиназ, обладающих и коллагенолитическим действием.

При определении активности ферментов углеводного обмена (альдолаза, изоферменты ЛДГ), а также цитохромоксидазы, наибольшие изменения обнаружены в печени и почках (табл. 2). В этих тканях годовиков карпа, акклиматизированных к нулевой температуре, уменьшалась активность, сопровождающаяся в почках снижением активности альдолазы и изоферментов ЛДГ, содержащих полипептиды А и В¹, что свидетельствует об ослаблении гликолиза, в том числе анаэробного. В красных мышцах возрастала активность изоферментов ЛДГ, содержащих полипептиды А и В². На фоне неизменной активности цитохромоксидазы, а также пониженной плавательной активности рыб при 0 °С, эти изменения можно расценивать как

Таблица 2

Активность изоферментов ЛДГ альдолазы (А) и цитохромоксидазы (ЦО) в тканях годовиков карпа после 3-недельного содержания в условиях с предельно низкими температурами

Ферменты, изоферменты ЛДГ	Почки		Жабры		Мышцы красные		Печень	
	1 °С	0 °С	1 °С	0 °С	1 °С	0 °С	1 °С	0 °С
A ₄ , усл. ед./г сыр. массы	72	57	52	32**	262	270		
A ₃ B ¹ ₁ То же	140	95	79	60	134	134		
A ² B ₂ ² »	108	88	70	64**	184	200		
A ₂ B ¹ B ² ₁ »	143	111	91	76	148	154		
AB ₃ ² »	108	111	87	75	180	206		
AB ¹ B ₂ ² »	137	111	70	76	142	154		
AB ₃ ¹ »	138	114	95	74	—	—		
B ₄ ² »	221	222	107	91	238	278**		
B ¹ B ₃ ² »	188	185	116	97	250	282		
B ₂ B ₂ ² »	131	123	97	78**	200	212		
B ₃ B ¹ B ² »	57	38	33	24	28	26		
B ₄ ¹ »	5	—	—	—	—	—		
A ₄ »	87	75	23	23	28	24	18	15
ЦО*, г/сыр. массы	1954	1439**	554	537	8422	8466	691	590**

Примечание. * — Константа скорости реакции первого порядка в обратных минутах; ** — различия достоверны при $P < 0,05$.

следствие усиления анаэробного гликолиза, связанного, видимо, с необходимостью реокисления НАДН в НАД и сопряженного также с мобилизацией углеводных запасов мышц на образование лактата, который может использоваться для синтеза жирных кислот в печени и в реакциях глюконеогенеза.

Исследование липидного состава печени показало, что при акклимации к нулевой температуре снижался уровень фосфолипидов с одновременным уменьшением концентрации фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина (см. табл. 1). Эти результаты говорят о нарушении механизмов адаптации к близкой к 0 °С температуре, поскольку у рыб характерной адаптационной реакцией на понижение температуры воды является повышение уровня фосфолипидов за счет увеличения содержания фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина [6]. Следует отметить также повышение уровня лизофосфатидилхолина (8,3 % от общих фосфолипидов), который обычно присутствует в тканях рыб в незначительных количествах и повышается при неблагоприятных воздействиях вследствие активации фосфолипазы A₂. В мышцах рыб, акклимированных к 0 °С, в содержании фосфолипидов наблюдались менее выраженные изменения. Уменьшение количества фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина в тканях молоди карпа при близких к нулевой температурах могли значительно снижать скорости тех реакций, для которых эти фосфолипиды являются эффекторами. Это относится и к действию лизофосфатидилхолина, который в повышенных концентрациях выступает как ингибитор некоторых мембраносвязанных ферментов.

При снижении температуры воды до 0 °С повышалось содержание циклического аденозинмонофосфата в печени и мышцах карпа (см. табл. 1), что являлось, по-видимому, первоначальной реакцией организма на экстремальное воздействие, направленное на активацию катаболических процессов.

Таким образом, при близких к 0 °С температурах, выходящих за пределы нормального физиологического диапазона для карпов, наблюдаются

изменения исследуемых биохимических параметров, отражающие необратимые физиологические сдвиги, завершающиеся угнетением основных жизненных процессов, и приводящие к гибели молоди рыб в зимний период [5].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеев Л. П. Определение активности протеиназ по расщеплению белковых субстратов // Современные методы в биохимии.— М.: Наука, 1968.— 2.— С. 112, 130.
2. Груздев А. И., Сидоров В. С., Смирнов Ю. А., Чеченков А. В. Активность изоферментов лактатдегидрогеназы при некрозе плавников у молоди семги *Salmo salar* L. (*Salmonidae*) // Вопросы ихтиологии.— 1983.— 23.— Вып. 4.— С. 652—660.
3. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрической статистики для оценки различий двух групп наблюдений в медико-биологических исследованиях.— М.: Медицина, 1965.— 25 с.
4. Замараева Т. В. Метод определения содержания коллагеновых белков по оксипролину // Современные методы в биохимии.— М.: Медицина, 1977.— С. 262—264.
5. Карпанин Д. П., Иванов А. П. Рыбоводство.— М.: Пищевая промышленность.— 1967.— 371 с.
6. Крекс Е. М. Липиды клеточных мембран.— Л.: Наука, 1981.— 339 с.
7. Нейфах А. А., Горголюк С. И. Молекулярные проблемы температурной адаптации у рыб и других пойкилотермных животных // Экологическая физиология и биохимия рыб: Тез. докл. VI Всес. конф.— Вильнюс: Б. и., 1985.— С. 163—165.
8. Остроумова И. Н., Штерман Л. Я., Черникова В. В. и др. О нарушении постоянства внутренней среды у сеголетков карпа под влиянием низкой температуры в период зимовки // Современные вопросы экологической физиологии рыб.— М.: Наука, 1979.— С. 246—249.
9. Сидоров В. С., Лизенко Е. И., Болгова О. М. и др. // Лососевые Карелии.— Петрозаводск: Б. и., 1972.— С. 150—161.
10. Gilman A. C. A protein binding assay for adenosine, 3,5 — monophosphate // Proc. Nat. Acad. Sci.— 1970.— 67.— P. 305—312.
11. Smith L. Cytochromes A, A₁, A₂ and A₃ // Methods in enzymology.— 1955.— 11.— P. 732—740.

Ин-т биологии Карельского
филиала АН СССР, г. Петрозаводск

Поступила 17.09.87

A. I. GRUZDEV, V. V. BOGDAN, N. N. NEMOVA, V. S. MIKHKIYEVA,
S. D. GURYANOVA, M. Yu. KRUPNOVA

THE EFFECT OF LOWEST TEMPERATURES OF HIBERNATION ON THE BIOCHEMICAL STATE OF YOUNG *CYPRINUS CARPIO*

Institute for Biology of the Karelian Branch of the USSR Academy of Sciences, Petrozavodsk

The effect of lowest temperatures of hibernation (1 to °C) on the activity of lysosomal enzymes, aldolase, cytochrome oxidase, isoenzyme composition of lactate dehydrogenase, lipid composition, levels of free oxypipicoline and cyclic nucleotides were studied in tissues of *Cyprinus carpio*. The temperature near °C has been shown to cause changes in the biochemical parameters which indicate physiological alterations beyond the scope of adaptation.

УДК 616—089.583.29 : 612.112.95+612.112.91

О. Д. Мяделец, А. Ф. Суханов

ВОЗДЕЙСТВИЕ ОБЩЕЙ ГЛУБОКОЙ ГИПОТЕРМИИ НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ И МАКРОФАГОВ КОЖНОГО РЕГИОНА

В экспериментах на 20 белых крысах изучалось влияние общей глубокой гипотермии на функциональную активность макрофагов и нейтрофилов кожи и регионарного лимфоузла. Макрофаги выявлялись по поглощению ими трипанового синего, который вводили в кожу межлопаточной области. Нейтрофилы выявлялись с помощью реакции на щелочную фосфоэстеразу. Установлено, что после гипотермии наблю-

дается общее увеличение числа макрофагов во всех слоях кожи и синусах мозгового вещества, возрастает интенсивность захвата ими трипанового синего. Происходит также увеличение числа нейтрофилов и активности в них фермента. Сделан вывод об увеличении защитных свойств кожного региона после гипотермии.

При проведении общей глубокой гипотермии важным является вопрос отдаленных последствий влияния этого фактора на организм. В постгипотермическом периоде формируются адаптационные перестройки в органах и системах, направленные на ликвидацию последствий холодового воздействия [6]. Немаловажное значение в этих перестройках принадлежит коже как внешнему барьеру, в которой в постгипотермическом периоде происходят существенные компенсаторно-адаптационные изменения [7]. Однако роль кожи в устранении последствий влияния гипотермии на организм изучена недостаточно. Данные литературы показывают, что в выполнении барьерно-защитных функций кожа тесно связана с периферическими лимфоузлами. Эта связь осуществляется как в условиях нормы [3], так и при различных заболеваниях кожи [3, 4, 5] путем постоянной миграции иммунокомпетентных клеток из кожи в регионарный лимфоузел и обратно. Поэтому защитно-приспособительные реакции в коже целесообразно оценивать в совокупности с таковыми в лимфоузле, обозначив этот морфофункциональный комплекс как «кожный регион».

Целью настоящей работы и являлось изучение морфофункционального состояния нейтрофильных лейкоцитов и макрофагов (гистиоцитов) кожного региона после проведения общей глубокой гипотермии.

Эксперименты выполнены на 20 белых крысах-самцах массой 150—170 г. Состояние общей глубокой гипотермии достигалось по следующей методике [2]. Предварительно наркотизированных этиловым эфиром животных охлаждали в положении на спине на полиэтиленовой пленке (для предотвращения непосредственного контакта тела животного с хладагентом) в ванночке со смесью «вода-лед». Скорость охлаждения была постоянной ($\sim 1^\circ\text{C}$ за 5 мин) и регулировалась путем извлечения животных из ванночки. Температуру тела измеряли при помощи тонкого ртутного термометра с ценой деления $0,5^\circ\text{C}$, введенного в прямую кишку на глубину около 5 см. Кожная температура измерялась при помощи электротермометра и составляла при ректальной температуре тела 18°C : в области спины — $15\text{—}16^\circ\text{C}$, в области живота — 17°C . Животных охлаждали до ректальной температуры 18°C , выдерживали при этой температуре 2 ч, а затем согревали лампой-рефлектором с брюшной стороны тела со скоростью 1°C за 5 мин до 37°C . Подача эфира во время эксперимента осуществлялась при помощи стеклянной воронки с ватой, периодически орошаемой эфиром. По мере охлаждения животных доза эфира постепенно уменьшалась и подача его полностью прекращалась при ректальной температуре $23\text{—}24^\circ\text{C}$. На этапе согревания крыс наркоз применялся в температурном интервале $23\text{—}29^\circ\text{C}$. Продолжительность эксперимента составляла около 5 ч (~ 1 ч 30 мин охлаждение, 2 ч — экспозиция, ~ 1 ч 30 мин — согревание). Декапитацию производили через 24 ч, 3, 7 и 30 сут после эксперимента. В каждую группу включали по 5 животных. Контрольная группа состояла из 8 животных. Для определения функциональной активности макрофагов и контрольным, и экспериментальным животным за 24 ч до взятия материала подкожно в межлопаточную область вводили 0,5 мл 0,5 % водного раствора трипанового синего. Кожу межлопаточной области и надлопаточный узел фиксировали в фиксаторе Буэна и заливали в парафин. Срезы толщиной 7 мкм докрашивали литиевым кармином. Число макрофагов определяли на площади 1 мм^2 : в коже — отдельно в сосочковом слое дермы и в глубоких отделах сетчатого слоя-гиподерме, а в лимфоузле — в промежуточных синусах мозгового вещества. Интенсивность захвата трипанового синего определяли по 5-балльной системе. Функциональное состояние нейтрофильных лейкоцитов кожного региона исследовали путем выявления в них активности щелочной фосфомоноэстеразы (ЩФ) методом Берстона [1], для чего ис-

пользовали криостатные срезы толщиной 10 мкм, приготовленные после замораживания материала в жидком азоте. Число нейтрофильных лейкоцитов на площади 1 мм² определяли в коже отдельно для сосочкового и сетчатого слоев дермы, а также гиподермы. В лимфоузле эти клетки подсчитывали отдельно в корковом и мозговом веществе. Активность ЩФ оценивали по 5-балльной системе. Все полученные цифровые данные обрабатывали статистически с использованием критерия *И* Вилкоксона-Манна-Уитни.

Морфофункциональные изменения нейтрофилов и макрофагов кожного региона крыс после воздействия общей глубокой гипотермии

Показатели	Сроки наблюдения	Кожа			Лимфоузел	
		Сосочковый слой	Сетчатый слой	Гиподерма	Корковое вещество	Мозговое вещество
Численность нейтрофилов на 1 мм ² среза	Контроль	103,0 →	204,0 →	1223,3	251,1	275,2
	24 ч	220,1* →	672,0* →	2694,1*	241,2	291,0
	3 сут	139,0 →	427,1* →	1695,4	234,0	264,1
	7 сут	128,9 →	223,0 →	1647,3	274,1	278,7
	30 сут	125,8 →	342,4* →	2358,7	316,0	394,4*
Активность ЩФ нейтрофилов, баллы	Контроль	2,5 →	3,1	3,3	3,3	3,2
	24 ч	3,0	3,2	3,4*	3,5	3,5*
	3 сут	2,4 →	3,7*	3,7*	3,7*	3,8*
	7 сут	2,8 →	3,1	3,4	3,9*	3,8*
	30 сут	2,5 →	3,1	3,0	3,7*	3,8*
Численность макрофагов на 1 мм ² среза	Контроль	49,1 →	812,4 →	—	—	4057,8
	24 ч	309,4* →	953,2* →	—	—	7077,2*
	3 сут	410,3* →	1245,1* →	—	—	7097,1*
	7 сут	340,9* →	1037,4* →	—	—	6395,7*
	30 сут	335,3* →	1093,7* →	—	—	5577,8*
Интенсивность поглощения макрофагами трипанового синего, баллы	Контроль	0,9 →	1,6 →	—	—	2,7
	24 ч	2,5*	2,4* →	—	—	3,5*
	3 сут	2,5*	2,6* →	—	—	3,4*
	7 сут	1,5*	2,2* →	—	—	3,3*
	30 сут	2,5*	2,2*	—	—	3,3*

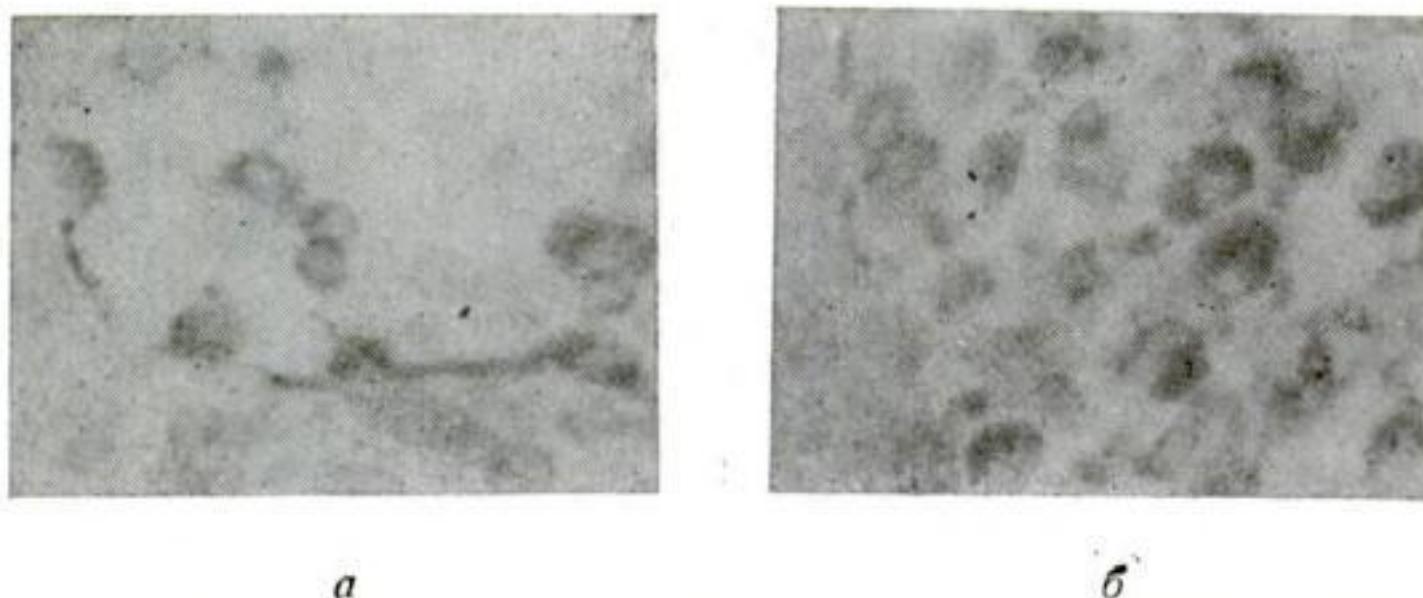
Примечание. * — достоверно по отношению к контролю. Стрелкой указана достоверность различий между соседними показателями.

Результаты исследования представлены в таблице и на рисунке. Нейтрофильные лейкоциты в коже крыс обнаруживались во всех слоях дермы и в гиподерме, а в лимфоузле — и в корковом, и в мозговом веществе. У контрольных животных в нейтрофилах кожного региона выявлялась выраженная активность ЩФ, что свидетельствует о высокой функциональной активности клеток [8]. При этом наименьшей активностью фермента была в нейтрофилах сосочкового слоя, а максимальной — в клетках лимфоузла. Число клеток на единицу площади в коже возрастало от поверхностных к глубоким слоям, в лимфоузле между двумя зонами различий не наблюдалось.

После гипотермического воздействия наблюдалась активация популяции нейтрофильных лейкоцитов кожного региона. В сосочковом слое дермы эта активация была незначительной и выражалась в возрастании численности клеток на единицу площади через 24 ч после эксперимента без увеличения активности ЩФ. В сетчатом слое увеличение функциональной активности нейтрофильных лейкоцитов было более выраженным и продолжительным: число клеток было достоверно увеличено практически на протяжении всего периода наблюдения (за исключением 7-х сут, когда достоверно от контроля не отличалось). Спустя 3 сут в клетках достоверно повышалась активность ЩФ. В гиподерме число нейтрофилов было увеличено через 24 ч, а активность ЩФ была достоверно повышена через 24 ч и 3 сут после эксперимента.

Как и у контрольных, у крыс, подвергавшихся гипотермии, также наблюдался градиент содержания нейтрофилов между поверхностными и глубокими слоями кожи, но на более высоком количественном уровне. В лимфоузле достоверное увеличение численности нейтрофильных лейкоцитов наблюдалось лишь через 30 сут после гипотермии и только в мозговом веществе. Более выраженными были изменения активности ЩФ в клетках лимфоузла. Так, в нейтрофилах коркового вещества активность фермента достоверно увеличивалась через 3 сут после эксперимента и сохранялась повышенной до конца наблюдения. В мозговом веществе фермент был активирован на протяжении всего наблюдения.

Макрофаги, поглотившие трипановый синий, в коже контрольных животных обнаруживались в наиболее глубоких отделах сетчатого слоя и в гиподерме. Значительно меньше встречалось их в сосочковом слое. Интенсивность захвата трипанового синего в среднем составляла для макрофагов сетчатого слоя-гиподермы 1,6 балла, а для макрофагов сосочкового слоя —



Поглотительная способность макрофагов мозговых синусов надлопаточного лимфоузла после гипотермического воздействия (прижизненная окраска трипановым синим; докраска литиевым кармином) X200: а — мозговой синус контрольного животного, б — мозговой синус животного через 3 сут после гипотермического воздействия. Увеличение числа макрофагов и интенсивности захвата ими красителя

менее 1 балла. В лимфоузле макрофаги, меченные трипановым синим, выявлялись в синусах мозгового вещества. Интенсивность захвата трипанового синего составляла 2,7 балла.

После холодового воздействия наблюдалась резкая активация макрофагов кожного региона (табл., рис.). В коже возрастала численность макрофагов и интенсивность захвата ими трипанового синего не только в сетчатом слое-гиподерме, но также и в сосочковом слое, причем значительно — до 2,5 баллов. В мозговом веществе лимфоузла также наблюдалось достоверное увеличение обоих показателей морфофункционального состояния макрофагов. И в коже, и в лимфоузле активация макрофагов сохранялась на протяжении всего наблюдения.

Таким образом, после гипотермического воздействия в каждом регионе наблюдались существенные адаптационно-приспособительные перестройки, выразившиеся в активации клеток, ответственных за фагоцитарную функцию — нейтрофильных лейкоцитов и макрофагов. Более выраженной и стабильной была активация популяции макрофагов, что, на наш взгляд, можно объяснить большей продолжительностью жизни макрофагов [5]. Увеличение активности исследованных фагоцитарных систем после холодового воздействия свидетельствует о повышении защитных свойств кожного региона в постгипотермическом периоде.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Берстон М. Гистохимия ферментов. — М.: Мир, 1965. — 464 с.
2. Борисов В. А., Базеко Б. С. Возможность оживления животных после достижения критической температуры // Материалы 27 науч. сессии и 27 студ. конф. Витебск. мед. ин-та. — Витебск: Б. и., 1969. — С. 287—289.

3. *Кожа* / Под ред. А. М. Чернуха и Е. П. Фролова.— М.: Медицина, 1982.— 334 с.
4. *Кормейн Р. Х., Асгар С. С.* Иммунология и болезни кожи.— М.: Медицина, 1983.— 255 с.
5. *Мовэт Г.* Острое воспаление // Воспаление, иммунитет, гиперчувствительность / Под ред. Г. Мовэта.— М.: Медицина, 1975.— С. 9—128.
6. *Сумбатов Л. А.* Искусственная гипотермия.— М.: Медицина, 1985.— 86 с.
7. *Суханов А. Ф., Мяделец О. Д.* Влияние общей глубокой гипотермии на взаимоотношения клеток в коже белых крыс разного возраста // *Арх. анат.*— 1987.— 93, № 1.— С. 58—62.
8. *Шубич М. Г., Нагоев Б. С.* Щелочная фосфатаза лейкоцитов в норме и патологии.— М.: Медицина, 1979.— 224 с.

Витебский мед. ин-т

Поступила 17.05.88

O. D. MYADELETS, A. F. SUKHANOV

THE EFFECT OF TOTAL DEEP HYPOTHERMIA ON THE MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL STATE OF SKIN NEUTROPHILS AND MACROPHAGES

Medical Institute of Vitebsk

The effect of total deep hypothermia (rectal temperature 18 °C for 2 hr) on the functional activity of skin and regional lymph node macrophages and neutrophils was studied in experiments on 20 white rats. Macrophages were found by trypane blue exclusion administered subcutaneously between the shoulder-blades. Neutrophils were determined by the alkaline phosphomonoesterase reaction. Total increasing the number of macrophages was observed in all skin layers and brain sinuses with decreased trypane blue exclusion. The number of neutrophils and enzyme activity increased as well. The protective ability of skin region has been concluded to increase after hypothermia.

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

УДК 615.387.014.41.038

**В. В. Орлик, Б. В. Качоровский, Р. А. Криворучко,
М. И. Винарчик, М. В. Миндюк, Л. Г. Дорошенко, Г. П. Зубарев**

ДЛИТЕЛЬНОЕ ХРАНЕНИЕ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ УМЕРЕННО НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ (—40 °C) И КЛИНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ИХ ЭФФЕКТИВНОСТИ

Приводятся материалы о разработанном в Львовском НИИ гематологии и переливания крови методе замораживания и хранения эритроцитов в электрических рефрижераторах при умеренно низкой температуре —40 °C, доступном для внедрения на станциях переливания крови во всех регионах страны. В результате проведенных клинико-лабораторных исследований выявлена высокая эффективность использования эритроцитов, сохраняемых в замороженном состоянии до 2 лет, в комплексном лечении анемии у больных хирургическими заболеваниями, острой и хронической почечной недостаточностью, заболеваниями системы крови.

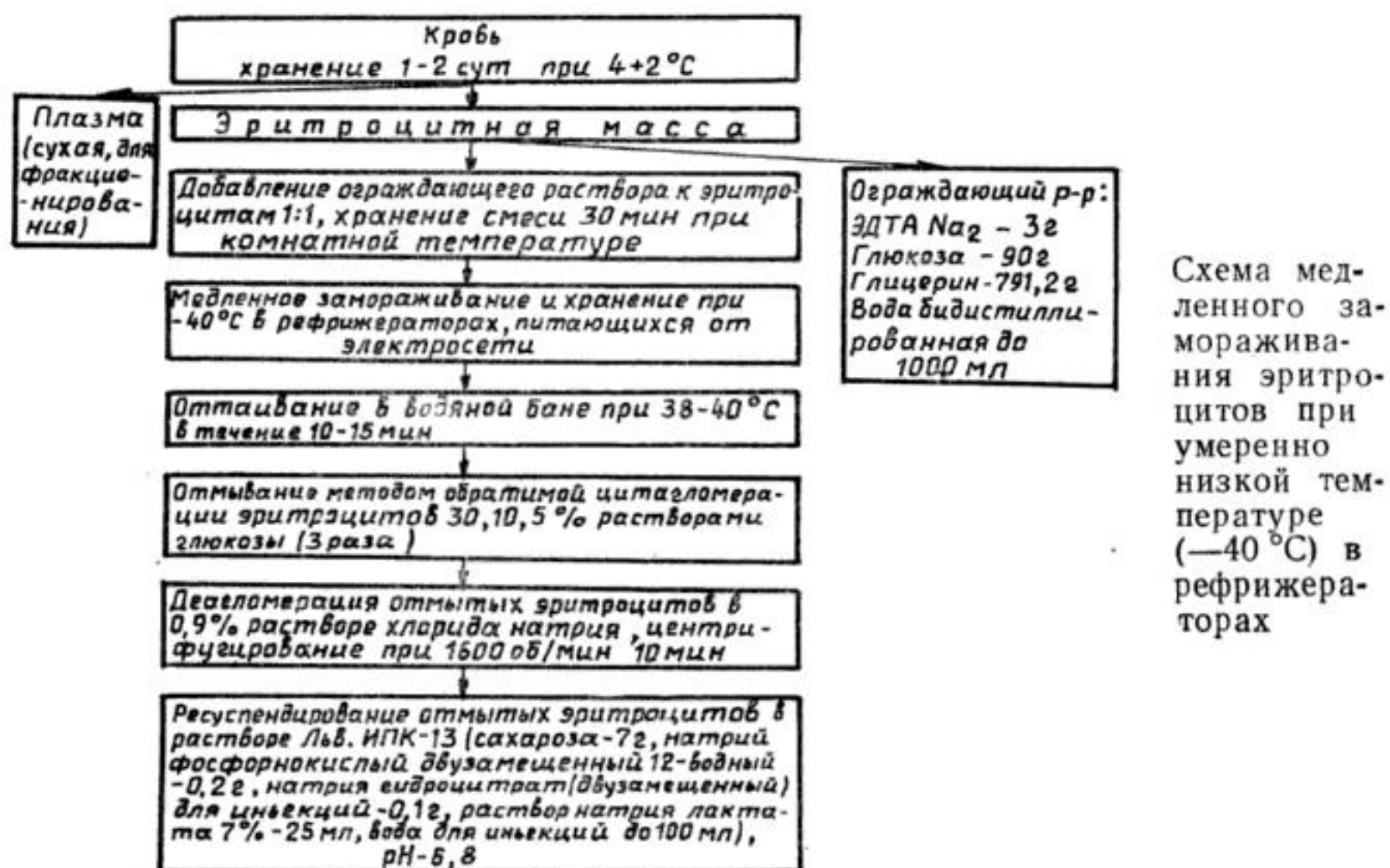
Метод криоконсервирования эритроцитов при ультранизкой температуре (—196 °C) с применением глицерина считается оптимальным для сохранности их функциональной полноценности при длительном хранении [2]. Однако метод основан на использовании сложного и дорогостоящего криогенного оборудования с постоянным обеспечением его жидким азотом. В связи с этим получило все большее признание консервирование эритроцитов при умеренно низких температурах в электрических рефрижераторах [1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10].

В Львовском научно-исследовательском институте гематологии и переливания крови разработаны метод криоконсервирования эритроцитов при умеренно низкой температуре —40 °C с использованием в качестве криопротектора глицерина в конечной концентрации 39,6 %, а также спо-

соб их отмывания и ресуспендирования в плазмозамещающем растворе (рис.) [5]. Установлена морфологическая и функциональная полноценность размороженных отмытых эритроцитов, ресуспендированных в плазмозамещающем растворе, при их хранении до 7 дней в условиях положительной температуры.

С целью внедрения метода криоконсервирования эритроцитов при -40°C на всех станциях переливания крови страны приобретает актуальное и практическое значение углубленное изучение в клинике одного из важных элементов компонентной терапии — размороженных отмытых эритроцитов.

Нами изучена возможность клинического применения переливаний размороженных отмытых эритроцитов, криоконсервированных при умеренно низкой температуре (-40°C) и дана оценка их терапевтической эффективности в комплексном лечении анемии у больных хирургическими заболеваниями, острой и хронической почечной недостаточностью, а также при анемии у больных с заболеваниями системы крови.



Под наблюдением находилось 116 больных в возрасте от 16 до 68 лет. Всем больным в связи с наличием у них анемии в комплекс лечебных средств включались трансфузии размороженных отмытых и ресуспендированных в плазмозамещающем растворе эритроцитов, криоконсервированных при -40°C , в дозах от 150 до 300 мл. Взвесь эритроцитов переливалась от 1 до 10 раз с частотой 1—3 раза в неделю. Всего было использовано 345 доз эритроцитов. Из них до 6 мес хранилось 98 доз, от 6 мес до 1 года — 103 дозы, от 1 года до 1,5 лет — 76 доз и от 1,5 до 2 лет — 68 доз.

После оттаивания и отмывания эритроциты, ресуспендированные в плазмозамещающем растворе, хранились при положительной температуре (4°C) до их переливания в клинике в течение 1—7 дней.

Взвесь размороженных отмытых эритроцитов применялась для переливания только после предварительного исследования содержания в ней свободного гемоглобина и внеклеточного калия. Параметры этих и других биохимических свойств эритроцитов, определяющих их сохранность, были в пределах допустимых величин (табл. 1). Образцы всех переливавшихся доз размороженных отмытых эритроцитов при бактериологическом контроле были стерильны.

Оценку лечебной эффективности и переносимости больными переливаний размороженных отмытых эритроцитов, криоконсервированных при

Таблица 1

Некоторые физико-биохимические показатели, характеризующие размороженные отмытые и ресуспендированные в растворе Льв. ИПК-13 эритроциты, криоконсервированные при -40°C

Исследуемые показатели	Статистические показатели	После отмывания	7-ой день хранения при 4°C
Гематокрит, л/л	$M \pm m$	$0,39 \pm 0,012$	$0,42 \pm 0,034$
Свободный гемоглобин, г/л	$M \pm m$	$0,31 \pm 0,025$	$0,95 \pm 0,070$
Внеклеточный калий, ммоль/л	$M \pm m$	$1,70 \pm 0,20$	$3,70 \pm 0,50$
АТФ, мкмоль/г Нв	$M \pm m$	$3,00 \pm 0,18$	$2,30 \pm 0,17$
2,3-ДФГ, мкмоль/г Нв	$M \pm m$	$14,20 \pm 1,00$	$10,50 \pm 1,63$
Осмотическая стойкость эритроцитов	$M \pm m$	$0,42 \pm 0,02$	$0,48 \pm 0,02$
Электрофоретическая подвижность эритроцитов, $\text{мк} \cdot \text{см} \cdot \text{В}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$	$M \pm m$	$0,945 \pm 0,020$	$0,915 \pm 0,040$

-40°C , проводили на основании анализа результатов клинических наблюдений, а также с помощью лабораторных методов исследований.

При оценке переносимости больными трансфузий эритроцитов, криоконсервированных при -40°C , учитывались как общее состояние больных, так и динамика изменения систолического и диастолического артериального давления, центрального венозного давления, частоты пульса, дыхания, температуры тела (табл. 2). Результаты наблюдений показали, что проводимые трансфузии хорошо переносились больными — во время и после переливаний не было зафиксировано развития посттрансфузионных реакций и осложнений.

Таблица 2

Показатели гемодинамики, частоты пульса, дыхания и температуры тела больных после трансфузий эритроцитов, криоконсервированных при -40°C ($n = 26$)

Исследуемые показатели	Статистические показатели	Этапы исследований				
		До трансфузии	Непосредственно после трансфузии	Через 1 ч после трансфузии	Через 2 ч после трансфузии	Через 3 ч после трансфузии
Давление: артериальное систолическое, мм рт. ст.	$M \pm m$ p	$117 \pm 3,27$	$120,0 \pm 2,35$ $>0,05$	$120,0 \pm 3,1$ $>0,05$	$115,0 \pm 3,0$ $>0,05$	$121,0 \pm 2,2$ $>0,05$
артериальное диастолическое, мм рт. ст.	$M \pm m$ p	$75 \pm 1,9$	$78,0 \pm 1,8$ $>0,05$	$80,0 \pm 1,6$ $>0,05$	$80,0 \pm 1,3$ $>0,05$	$80,0 \pm 1,1$ $>0,05$
центральное венозное, мм водного ст.	$M \pm m$ p	$87 \pm 9,2$	$100,0 \pm 7,5$ $>0,05$	$101,0 \pm 9,0$ $>0,05$	$93,0 \pm 7,2$ $>0,05$	$91,0 \pm 7,6$ $>0,05$
Пульс, частота в 1 мин	$M \pm m$ p	$84 \pm 4,3$	$83,0 \pm 3,4$ $>0,05$	$81,0 \pm 3,4$ $>0,05$	$83,0 \pm 4,0$ $>0,05$	$85,0 \pm 4,6$ $>0,05$
Дыхание, частота в 1 мин	$M \pm m$ p	$22 \pm 0,9$	$21,0 \pm 0,8$ $>0,05$	$21,0 \pm 0,8$ $>0,05$	$20,0 \pm 0,5$ $>0,05$	$21,0 \pm 0,7$ $>0,05$
Температура тела, $^{\circ}\text{C}$	$M \pm m$ p	$37,5 \pm 0,16$	$37,4 \pm 0,11$ $>0,05$	$37,2 \pm 0,10$ $>0,05$	$37,5 \pm 0,11$ $>0,05$	$37,6 \pm 0,11$ $>0,05$

Примечание. p — достоверность различия исследуемого показателя по сравнению с исходными данными.

Для выяснения вопроса, наблюдается ли внутрисосудистый гемолиз в ответ на переливания размороженных отмытых эритроцитов, исследовали содержание свободного гемоглобина в крови больных. Проведенные исследования показали незначительное повышение свободного гемоглобина в крови больных после переливания размороженных отмытых эритроцитов от $0,14 \pm 0,019$ г/л до $0,20 \pm 0,025$ г/л ($p > 0,05$, $n = 21$). Через 24 ч после трансфузий уровень этого показателя уменьшился, достигая исходной величины $0,13 \pm 0,014$ г/л ($p > 0,05$, $n = 21$). Полученные результаты сви-

детельствуют об отсутствии гемолиза, подтверждают устойчивость перелитых красных клеток в кровяном русле реципиента.

При изучении влияния переливаний размороженных отмытых эритроцитов на показатели красной крови больных с анемией установлено, что после повторных переливаний данной трансфузионной среды заметно увеличивалось содержание гемоглобина от $93,0 \pm 1,50$ г/л до $111,0 \pm \pm 4,60$ г/л ($p < 0,05$, $n = 25$), возросло количество эритроцитов от $2,7 \pm \pm 0,18$ Т/л до $3,9 \pm 0,36$ Т/л ($p < 0,05$, $n = 25$), что явилось свидетельством выраженного заместительного эффекта переливаний размороженных отмытых эритроцитов, криоконсервированных при -40°C .

Для определения жизнеспособности и кислородно-транспортной функции перелитых красных клеток крови у больных после трансфузий размороженных отмытых эритроцитов исследовались такие фосфорорганические соединения, как аденозинтрифосфорная кислота (АТФ), 2,3-дифосфоглицериновая кислота (2,3-ДФГ), а также показатель P_{50} (табл. 3). Полученные результаты исследований АТФ показали, что после трансфузий размороженных эритроцитов, криоконсервированных при -40°C , повышался энергетический потенциал красных клеток крови больных, что являлось подтверждением высокой жизнеспособности перелитых эритроцитов. После применения размороженных эритроцитов величина P_{50} возрастала аналогично динамике увеличения концентрации 2,3-ДФГ в эритроцитах крови больных.

Т а б л и ц а 3

Динамика изменения содержания АТФ, 2,3-ДФГ и показателя P_{50} в крови больных после трансфузий эритроцитов, криоконсервированных при -40°C

Исследуемые показатели	Статистические показатели	ЭТАПЫ ИССЛЕДОВАНИЙ		
		До трансфузии	После трансфузии	Через 24 ч после трансфузии
АТФ, мкмоль/г Нв	n $M \pm m$ p	18 $2,6 \pm 0,16$	18 $3,1 \pm 0,11$ $< 0,05$	18 $3,2 \pm 0,11$ $< 0,05$
2,3-ДФГ, мкмоль/г Нв	n $M \pm m$ p	18 $9,7 \pm 0,18$	18 $10,6 \pm 0,17$ $< 0,05$	18 $11,3 \pm 0,21$ $< 0,05$
P_{50} (7,4), мм рт. ст.	n $M \pm m$ p	13 $26,5 \pm 1,91$	13 $29,3 \pm 2,57$ $> 0,05$	13 $32,6 \pm 2,57$ $< 0,05$

Примечание. p — достоверность различия исследуемого показателя по сравнению с исходными данными.

Таким образом, переливания размороженных отмытых эритроцитов повышают метаболическую активность и дыхательную функцию крови больных. Это обусловлено высокими потенциальными возможностями перелитых эритроцитов, так как еще до трансфузий они отмыты от старых, малоустойчивых клеток, и по содержанию АТФ и 2,3-ДФГ обладают достаточной жизнеспособностью и возможностью переноса кислорода.

В результате проведенных исследований выявлена эффективность переливаний размороженных отмытых эритроцитов, хранившихся при умеренно низкой температуре (-40°C) в течение 2 лет, в комплексном лечении больных анемией, развившейся в результате хирургических заболеваний, острой и хронической почечной недостаточностью, а также при анемии у больных с заболеваниями системы крови. Данная гемотрансфузионная среда является ареактогенной, оказывает выраженный заместительный эффект.

Следовательно, опыт применения размороженных отмытых эритроцитов, криоконсервированных при -40°C , показал, что эта трансфузионная среда является перспективной для использования в клинике.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Буденная М. П. Модификация метода криоконсервирования эритроцитов при умеренно низких температурах с использованием отечественного низкотемпературного холодильника «КЛГХ» // Сб. гематол. и перелив. крови.— 1986.— Вып. 21.— С. 63—65.
2. Виноград-Финкель Ф. Р., Киселев А. Е., Гинзбург Ф. Г. и др. Применение глубокого холода для длительного консервирования крови в замороженном состоянии // Пробл. гематол. и перелив. крови.— 1963.— № 5.— С. 3—16.
3. Виноград-Финкель Ф. Р., Бурдыга М. А., Тальская И. Н. Разработка метода замораживания и длительного хранения эритроцитов с глицерином в диапазоне температур от -25 до -60°C // Пробл. гематол. и перелив. крови.— 1969.— № 3.— С. 34—38.
4. Воробьева Г. С., Виноград-Финкель Ф. Р. Метод замораживания и отмывания эритроцитов для клинической практики, долгосрочно сохраняемых с высокими концентрациями глицерина при -70°C в воздушном рефрижераторе // Пробл. гематол. и перелив. крови.— 1973.— № 9.— С. 21—25.
5. Гланц Р. М., Криворучко Р. А., Сенник Я. К. Замораживание эритроцитов при умеренно низкой температуре (-40°C) для клинического применения. Методич. рекоменд.— Львов: Б. и., 1976.— 12 с.
6. Криворучко Р. А., Полищук Р. С., Стасюк Н. С. К вопросу консервирования эритроцитарной массы при умеренно низкой температуре // Сб. гематол. и перелив. крови.— 1969.— Вып. 5.— С. 187—191.
7. Семенова Н. В., Федорова Л. И., Азовская С. Н. и др. Криоконсервирование эритроцитов при -30°C : Тез. докл.— 2 Всесоюз. съезд гемат. и трансф.— М., 1985.— С. 55.
8. Meryman H. T., Hornblower M. A. A modification of the highglycerol, slow-freeze approach to erythrocyte preservation // Transfusion.— 1969.— 9, N 5.— P. 284.
9. Valeri C. R., Valeri D. A., Dennis R. C. et al. Biochemical modification and free representation of red blood cells. A new method // Crit. Care Med.— 1979.— 7, N 9.— P. 439—445.
10. Valeri C. R., Valeri D. A., Gray A. et al. Red blood cells concentrates at 4°C for 35 days in CPDA-1, CPDA-2, or CPDA-3 anticoagulant-preservative, biochemically modified, and frozen and stored in the polyvinyl-chloride plastic primary collection bag with 40 % w/v glycerol at -80°C // Transfusion.— 1982.— 22.— P. 102—106.

Львовский филиал Киевского НИИ
гематологии и переливания крови

Поступила 05.07.89

V. V. ORLIK, B. V. KACHOROVSKY, P. A. KRIVORUCHKO, M. I. VINARCHIK,
M. V. MINDUK, L. G. DOROSHENKO, G. P. ZUBAREV

PROLONGED STORAGE OF ERYTHROCYTES AT A MODERATELY LOW TEMPERATURE (-40°C) AND CLINICAL ESTIMATION OF THEIR EFFICIENCY

Lvov Branch of the Research Institute for Hematology and Blood Transfusion of Kiev

A method of freezing and storage of erythrocytes in electrical refrigerators at a moderately low temperature (-40°C) available for the usage at blood transfusion centers is presented. The results of clinical and laboratory studies showed a high efficiency of erythrocytes stored in the frozen state for up to 2 years for treatment of anemia in patients with surgical diseases, acute and chronic renal insufficiency and blood diseases

УДК 542.27.01.611.441

Я. Х. Туракулов, Т. П. Ташходжаева, С. И. Исмаилов, М. Кулиббетов

ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОЙ КРИОКОНСЕРВАЦИИ НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ И ГИСТОСТРУКТУРУ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Проведено исследование гистоструктуры, реконсервированной после 3-летней криоконсервации щитовидной железы больных диффузно-токсическим зобом, а также способности ее срезов к поглощению ^{131}I и к образованию ^{131}I -аминокислот. Показано, что включение ^{131}I в белки щитовидной железы после криоконсервации происходит более активно, чем в белки нативной щитовидной железы, в гидролизатах срезов криоконсервированной железы содержится больший, чем в контроле, процент высокомолекулярных ^{131}I -тироксина и ^{131}I -трийодтиронина. Гистологический анализ свидетельствует о хорошей сохранности основных структурно-функциональных элементов в щитовидной железе после ее деконсервации.

Многочисленные свидетельства сохранности основных показателей тиреоидной функции в процессе криоконсервации щитовидной железы были получены после хранения щитовидной железы при -196°C от шести месяцев до года [1, 2, 3]. Вопрос же о возможности создания полноценного банка тиреоидных трансплантатов может быть успешно решен лишь после подтверждения неизменности морфофункциональных характеристик щитовидной железы после длительной криоконсервации.

В связи с этим целью работы явилось изучение способности к поглощению ^{131}I и к образованию ^{131}I -соединений срезами деконсервированной после 3-летней криоконсервации щитовидной железы, удаленной у больных диффузно-токсическим зобом, а также исследование ее гистоструктуры.

Замораживание ткани щитовидной железы проводили сразу же после удаления двухэтапным методом с использованием в качестве криопротекто-

Т а б л и ц а 1
Включение ^{131}I в белки щитовидной железы (диффузно-токсический зоб)

Исследуемый материал	Число желез	% включения масса сухого белка, мг $M \pm m$	P
Нативная щитовидная железа (контроль)	4	$0,53 \pm 0,01$	$p < 0,01$
Щитовидная железа после криоконсервации и 3-летнего хранения при -196°C	8	$0,89 \pm 0,11$	

ра 10 %-ного ДМСО в растворе Хенкса [5]. Для гистологического исследования использовали фиксатор Карнуа и окраску гематоксилин-эозином. Для определения включения ^{131}I в белки щитовидной железы тонкие срезы инкубировали в течение 2 ч при температуре 37°C в Krebs-Рингер-фосфатном буфере (pH 7,4) при насыщении кислородом и добавлении ^{131}I (200 тыс. имп/мин). После инкубации сре-

зы гомогенизировали, белки осаждали добавлением 10 %-ной трихлоруксусной кислоты (ТХУК), подсчитывали активность на счетчике ГСУ-1 и выражали в процентах включения ^{131}I на 1 мг сухого белка. Для определения состава и содержания йодистых компонентов срезы после инкубации с ^{125}I (1 000 000 имп/мин) подвергали обработке трипсином при температуре 37°C в течение 24 ч с использованием фосфатного буфера pH 8,34. Проводили трехразовую экстракцию йодированных аминокислот с использованием кислого и нормального бутанола; экстракт концентрировали и подвергали хроматографическому разделению в сольвентной системе бутанол-этанол-2N NH_4OH (5 : 1 : 2) на бумаге типа «М» восходящим способом. Для определения процентного содержания йодаминокислот хроматограммы разрезали на полоски шириной 2 мм, радиоактивность их считали на счетчике ГСУ-1, строили графики хроматографического разделения йодистых компонентов и взвешивали площади, соответствующие стандартному расположению монойодтирозина (МИТ), дийодтирозина (ДИТ), неорганического йода (I), трийодтиронина (T_3) и тироксина (T_4) [6].

Данные, полученные при исследовании включения метки ^{131}I в белки щитовидной железы, представлены в табл. 1. Из результатов следует, что включение ^{131}I в белки криоконсервированной щитовидной железы происходит более активно, чем в белки нативной щитовидной железы.

Результаты исследования процентного содержания йодированных соединений в срезах щитовидной железы после 2-часовой инкубации их с ^{125}I представлены в табл. 2. Из результатов следует, что по составу образованных за период инкубации йодированных компонентов гидролизаты криоконсервированных желез больных диффузным токсическим зобом не отличаются от гидролизатов нативных желез. Процентное же содержание меченых ^{125}I -компонентов свидетельствует о некотором преобладании более йодированных аминокислот T_4 и T_3 в гидролизатах криоконсервированных желез.

Содержание йодистых компонентов в гидролизатах срезов щитовидной железы (диффузно-токсический зоб) после инкубации с ^{125}I

Вид материала	Число желез	Йодистые компоненты							
		ДИТ	МИТ	I	T ₄	T ₃	X-компонент	$\frac{\text{ДИТ}}{\text{МИТ}}$	$\frac{T_3+T_4}{\text{МИТ}+\text{ДИТ}}$
Нативная щитовидная железа (контроль)	4	7,96± ±0,84	14,7± ±2,1	39,8± ±5,5	6,7± ±0,84	3,2± ±0,52	19,5± ±3,21	0,54	0,43
Щитовидная железа после криоконсервации и 3-летнего хранения при —196°C.	6	9,1± ±0,98	15,8± ±1,7	30,9± ±4,1	15,0± ±1,9	10,6± ±0,97	18,6± ±4,10	0,57	1,02

Примечание. X-компонент — продукт превращения неорганического йода, образовавшегося в ходе дейодирования.

Гистологический анализ свидетельствует о хорошей сохранности основных структурно-функциональных элементов в щитовидной железе после ее деконсервации (рис.). Фолликулы средних и крупных размеров, полости заполнены коллоидом, плотным в центре и слабо вакуолизированным по периферии.

Тиреоидный эпителий в основном кубической формы, реже уплощенный. В некоторых фолликулах отмечается двухрядный тиреоидный эпителий. Ядра плотные, крупные, занимают большую часть тиреоцитов. Фолликулы в основном плотно прилегают друг к другу; встречаются островки межфолликулярного эпителия, кое-где отмечается рассеянная и очаговая лимфоидная инфильтрация с разрушением близлежащих фолликулов. Указанные особенности гистоструктуры являются характерными и для нативной ткани щитовидной железы, удаленной у больных диффузным токсическим зобом.



Гистоструктура криоконсервированной (—196 °C) щитовидной железы после 3-летнего хранения при —196 °C. Окраска гематоксилин-эозин. X400

Ранее мы показали, что низкотемпературная консервация (—196 °C) тиреотоксической ткани щитовидной железы в течение 6—12 мес не нарушает основных биохимических показателей ее функции [4]. Представленные в данной работе результаты морфофункционального исследования тиреотоксической тиреоидной паренхимы, хранившейся при температуре —196 °C в течение 3 лет, свидетельствуют о возможности использования таких желез в качестве трансплантационного материала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гулевский А. К., Переверзев Н. П., Белоус А. М. Влияние ультранизких температур (—196 °C) на биосинтез суммарных белков в срезах внутренних органов в эксперименте // Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины. — Киев: Наук. думка, 1974. — С. 47—49.
2. Гулевский А. К., Чуйко В. А., Калько А. И. Биосинтез суммарных белков в срезах щитовидной железы при замораживании (—196 °C) и оттаивании (37 °C) // Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины. — Киев: Наук. думка, 1974. — С. 45—47.
3. Мицкевич М. С. Восстановление функциональной активности щитовидной железы после глубокого охлаждения (—196 °C) // Изв. АН СССР. Сер. Биол. — 1958. — № 2. — С. 149—160.
4. Туракулов Я. Х., Мухамедзянова И. Р., Исмаилов С. И., Ташходжаева Т. П. Биохимические показатели функции тиреоидной ткани при криоконсервации // Криобиология. — 1986. — № 2. — С. 7—10.

5. А. с. 935050 СССР, МКИ² А 01 N 1/02. Способ криоконсервирования щитовидной железы человека / А. М. Утевский, В. А. Чуйко, А. Ю. Петренко. Опубл. 15.06.82. Бюл. № 22.

6. Shigenobu Nagataki, Kazuo Shizume, Kiku Nakao. Effect of chronic graded doses of iodine on thyroid hormone synthesis // *Endocrinology*. — 1966. — 79. — P. 667.

Ин-т биохимии АН УзССР,
НИИ краевой медицины, г. Ташкент

Поступила 11.08.88

Ya. Kh. TURAKULOV, T. P. TASHKHODZHAYEVA, S. I. ISMAILOV,
M. KULIMBETOV

THE EFFECT OF LONG-TERM CRYOPRESERVATION ON THE BIOCHEMICAL PARAMETERS AND HISTOLOGICAL STRUCTURE OF THYROID GLAND

*Institute for Biochemistry of the Uzbek Academy of Sciences;
Research Institute of Territory Medicine, Tashkent*

The histological structure of thawed thyroid gland of patients with diffuse-toxic goiter subject to 3 year cryopreservation has been studied and the ability of slices to incorporate ¹³¹I and to form ¹³¹I amino acids was estimated. It has been demonstrated that the incorporation of ¹³¹I into frozen-thawed thyroid gland proteins is more active than into proteins of fresh thyroid gland. A higher percentage of highly iodided ¹³¹I-thyroxine and ¹³¹I-triiodothyronine has been found in cryopreserved thyroid tissue as compared to the control. The histological analysis indicates a good maintainance of main structure-functional elements of thyroid gland after thawing.

УДК 579.843.1 : 616.078.075

Л. Д. Македонова, Т. А. Кудрякова, В. В. Кадетов, Л. А. Наталич

ЛИОФИЛИЗАЦИЯ ФАГОВ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ 01 И НЕ 01 ГРУПП

Разработан режим предварительного замораживания и сублимации, подобраны оптимальные защитные среды для лиофилизации умеренных фагов холерных вибрионов 01 и не 01 групп.

В настоящее время наиболее современным и перспективным способом консервирования биоматериалов является метод сублимационного высушивания. Лиофилизация широко используется для стабилизации дизентерийных, стафилококковых, псевдотуберкулезных, чумных и др. фагов [2, 3, 4, 5].

Лиофильному высушиванию холерных фагов посвящены единичные исследования, причем выполнены они на модели вирулентных фагов холерных вибрионов [1, 6, 7].

Работ, касающихся способов сохранения умеренных холерных фагов и фагов холерных вибрионов не 01 группы, в доступной литературе мы не обнаружили. Вместе с тем умеренные холерные фаги и фаги холерных вибрионов не 01 группы нестабильны и при хранении в жидком виде быстро снижают литическую активность. Поэтому поиски методических подходов, направленных на разработку оптимальных условий консервации и хранения умеренных холерных фагов и фагов холерных вибрионов не 01 группы приобретают особую актуальность.

Целью настоящей работы явились подбор оптимальных защитных сред, исследование параметров процесса предварительного замораживания, продолжительности сублимации и досушивания умеренных холерных фагов, а также изучение возможности использования разработанного способа для лиофилизации фагов холерных вибрионов не 01 группы.

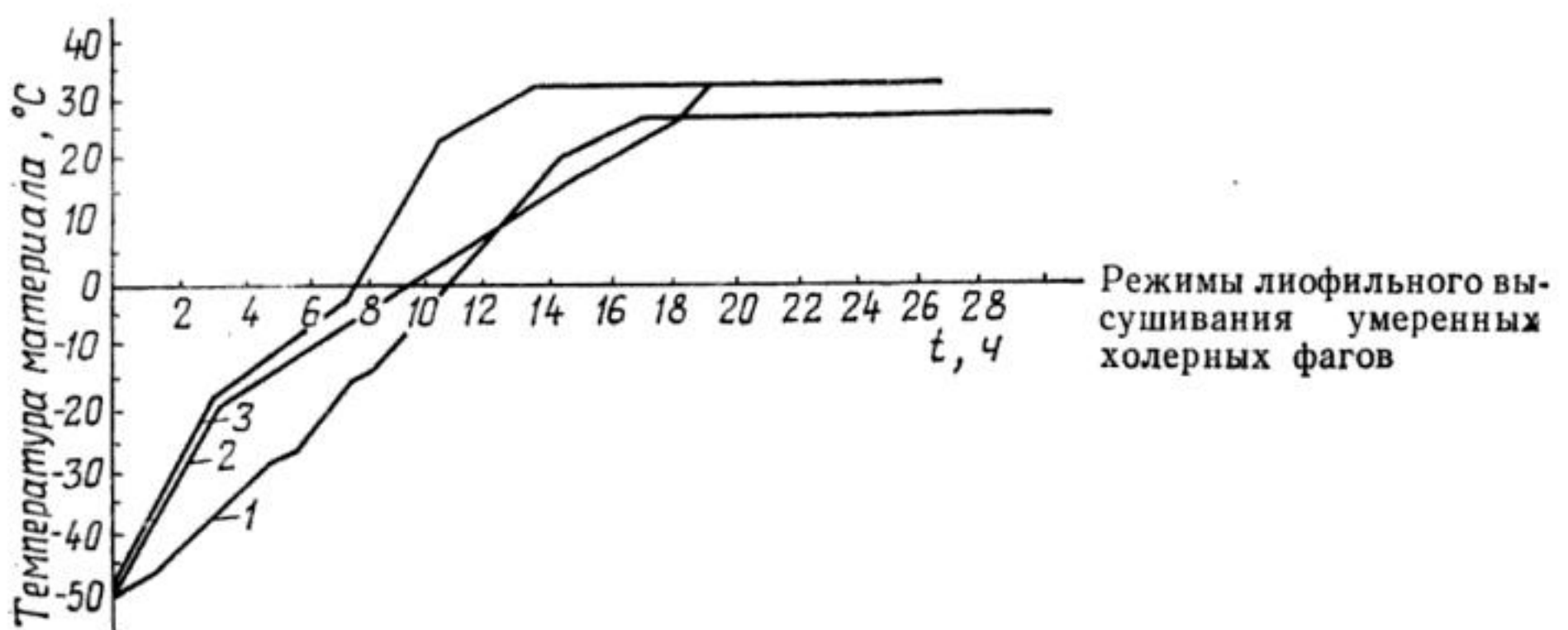
В работе использовались умеренные фаги вибрионов эльтор II серотипа: 2044, 6932, 8556, выделенные из одноименных лизогенных штаммов, а так-

же фаги 53, 1865 и 26074 холерных вибрионов не 01 группы. Исходные титры фагов $n \cdot 10^5$ — $n \cdot 10^9$ БОЕ/мл. Индикаторами служили *V. eltor* 75М, *V. Nag* 13, 17968. Фаги размножали на агаре и в бульоне Мартена, рН 7,6—7,8. В качестве сред высушивания использовали большой набор стабилизаторов, применявшихся различными авторами для сушки вирусных препаратов [1, 6]. Защитные среды соединяли с лиофилизирруемыми фагами в соотношении 2 : 1 (2 объема защитной среды и 1 объем фага). Препараты фагов разливали в 5-кубиковые ампулы по 2 мл. Высушивание производили в вакуум-сушильной установке LZ—9С. Число жизнеспособных фаговых корпускул определяли методом агаровых слоев по Грациа.

При изучении различных вариантов режима высушивания умеренных холерных фагов были испытаны разнообразные условия предварительного замораживания, параметры продолжительности сублимации и досушивания. В качестве стабилизатора в этих опытах использовали известную сахарозо-желатиновую среду.

Предварительное замораживание умеренных фагов 2044 и 6932 осуществляли следующими способами:

- 1) замораживание ампул в спирту, охлажденном до -60°C , со скоростью $12^\circ\text{C}/\text{мин}$ до конечной температуры $-55 \div -60^\circ\text{C}$ (непосредственно перед сушкой);
- 2) замораживание до температуры $-55 \div -60^\circ\text{C}$ со скоростью $12^\circ\text{C}/\text{мин}$ и дальнейшее выкаливание в низкотемпературном холодильнике при температуре $-55 \div -60^\circ\text{C}$ в течение 16—18 ч;



- 3) замораживание в низкотемпературном холодильнике при температуре $-55 \div -60^\circ\text{C}$ со скоростью $1^\circ\text{C}/\text{мин}$ в течение 16—18 ч до конечной температуры $-55 \div -60^\circ\text{C}$.

Эксперименты показали, что 1-й и 2-й способы предварительного замораживания незначительно отличались друг от друга, тогда как при 3-м варианте замораживания наблюдалось более значительное снижение числа жизнеспособных корпускул фагов 2044 и 6932 с $1,2 \cdot 10^7$ до $6,3 \cdot 10^4$ и с $3,0 \cdot 10^7$ до $3,5 \cdot 10^5$ соответственно (табл. 1).

Было испытано 3 режима высушивания, при которых продолжительность замораживания составляла 3—4 мин, период сублимации — 13—19 ч и период досушивания — 8—11 ч.

Таблица 1

Выжимаемость умеренных холерных фагов 2044 и 6932 при различных способах предварительного замораживания

Варианты замораживания	Титры фага по Грациа после лиофилизации ($M \pm m$)	
	2044	6932
1-й	$(7,0 \pm 1,1) \cdot 10^5$	$(1,5 \pm 0,3) \cdot 10^6$
2-й	$(4,3 \pm 0,6) \cdot 10^5$	$(9,0 \pm 2,4) \cdot 10^5$
3-й	$(6,3 \pm 1,2) \cdot 10^4$	$(3,5 \pm 0,8) \cdot 10^5$

Как видно из рисунка, по 1-му режиму сублимация длилась 27 ч, при этом температура материала повышалась в течение 3 ч от -50 до -40 °С и в течение следующих 14 ч — от -40 до 25 °С. Досушивание продолжалось 10 ч при температуре 25 °С.

При 2-м режиме сублимация осуществлялась 24 ч, температура повышалась в течение первых 3 ч от -50 до -20 °С, в течение 10 ч от -20 до 30 °С. Досушивание длилось 11 ч при температуре 30 °С.

При 3-м режиме время сублимации оставалось 24 ч. Температура материала повышалась первые 3 ч от -50 °С до -20 °С, следующие 16 ч — от -20 °С до 30 °С. Досушивали в течение 5 ч при температуре 30 °С.

Сублимация при 1-х 2 режимах начальные 2 ч проводилась без подогрева. Затем включался подогрев, скорость которого составляла 5 °С/ч. При 3-м режиме подогрев включался через час.

Сравнение титров фагов до и после высушивания при разных режимах сублимации показало, что наибольшее количество фаговых корпускул сохранилось при первом режиме — $19,2$ % частиц фага 2044, $7,05$ % — фага 6932 и $7,4$ % — фага 8556 (табл. 2).

Выживаемость фагов в процессе лиофилизации во многом зависит от среды высушивания, которая выполняет роль буфера, обеспечивающего равномерное обезвоживание материала в процессе сушки.

В опытах по подбору оптимальных защитных сред лиофилизацию проводили по отработанному ранее режиму: предварительное замораживание в охлажденном до -60 °С спирту со скоростью 12 °С/мин до конечной температуры -55 ÷ -60 °С. Длительность лиофилизации 27 ч. Досушивание при температуре 25 °С в течение 10 ч. Остаточная влажность в пределах 2 — 5 %.

В экспериментах было установлено, что растворы сорбита, инозита и декстрана не обеспечивали эффективную защиту умеренных холерных фагов в процессе лиофилизации (выживаемость не более $1,5$ %). Растворы диметилсульфоксида (7 и 10 %) оказывали инактивирующее действие на фаги. В 4 %-ном растворе триса выживали только единичные корпускулы изученных фагов. Отсутствие выраженного защитного действия у изученных сред в процессе лиофильного высушивания умеренных холерных фагов определило необходимость изыскания новых стабилизаторов.

Для повышения жизнеспособности умеренных холерных фагов были испытаны различные варианты сред с добавлением солей магния и кальция. Добавление к сахарозо-желатиновой среде и к 20 %-ному раствору лактозы ионов магния и кальция обеспечивало увеличение количества жизнеспособных корпускул фагов с 2 — 8 % до 68 % по отношению к исходному жидкому препарату (табл. 3).

В опытах с длительным хранением препаратов фагов (срок наблюдения 2 года), высушенных в различных защитных средах, выявлено, что среды с лактозой не обеспечивают выживаемость фаговых корпускул в образцах, хранившихся при температуре 37 °С. Уже через 3 мес. хранения фаги погибали полностью. Однако при температуре 4 — 10 °С фаги 2044 и 6932, высушенные в 20 %-ном растворе лактозы с $0,75$ % $MgCl_2$ и в 20 %-ном растворе лактозы с $0,6$ % $CaCl_2$ и $0,15$ % $MgCl_2$, длительно сохраняют свою активность (100 % и $20,7$ — $50,8$ % корпускул соответственно, срок наблюдения 2 года). Фаги 2044, 6932 и 8556, высушенные в сахарозо-желатиновых средах с добавлением различного количества $MgCl_2$ и $CaCl_2$, обладали высокой жизнеспособностью в разных условиях хранения препаратов. Для всех изученных фагов лучшей защитной средой при хранении их при 4 — 10 °С являлась сахарозо-желатиновая с $0,75$ % хлористого магния (сохранялось 100 % фаговых корпускул). Сахарозо-желатиновый стабилизатор с добавкой хлористого кальция позволяет сохранить лиофилизированные препараты фага при повышенных температурах в течение 12 мес (до $2,93$ % корпускул).

Таблица 2

Выживаемость умеренных холерных фагов 2044, 6932 и 8556 при разных режимах лиофилизации с использованием сахарозо-желатиновой защитной среды

Фаг	1-й режим				2-й режим				3-й режим			
	Титры фага ($M \pm m$)		% выживаемости	Р	Титры фага ($M \pm m$)		% выживаемости	Р	Титры фага ($M \pm m$)		% выживаемости	Р
	до высушивания	после высушивания			до высушивания	после высушивания			до высушивания	после высушивания		
2044	$(1,2 \pm 0,1) \cdot 10^7$	$(2,3 \pm 0,6) \cdot 10^6$	19,2	$<0,05$	$(1,2 \pm 0,2) \cdot 10^7$	$(1,6 \pm 0,2) \cdot 10^7$	13,3	$<0,05$	$(1,6 \pm 0,1) \cdot 10^8$	$(9,5 \pm 1,0) \cdot 10^5$	0,59	$<0,05$
6932	$(1,7 \pm 0,1) \cdot 10^7$	$(1,8 \pm 0,1) \cdot 10^6$	7,05	$<0,05$	$(3,0 \pm 0,1) \cdot 10^7$	$(3,7 \pm 0,6) \cdot 10^6$	1,3	$<0,05$	$(8,5 \pm 2,1) \cdot 10^6$	$(9,2 \pm 2,4) \cdot 10^4$	1,08	$<0,05$
8556	$(1,9 \pm 0,2) \cdot 10^6$	$(1,3 \pm 0,1) \cdot 10^5$	7,4	$<0,05$	$(1,7 \pm 0,3) \cdot 10^7$	$(2,4 \pm 0,2) \cdot 10^5$	1,4	$<0,05$	$(1,2 \pm 0,2) \cdot 10^8$	$(6,3 \pm 1,5) \cdot 10^5$	0,52	$<0,05$

Примечание. Величину Р для каждого фага рассчитывали по отношению к его исходному титру, определяемому в 1-е сут после высушивания.

Влияние защитной среды на выживаемость умеренных холерных фагов 2044, 6923 и 8556 в процессе лиофилизации

Титры фагов ($M \pm m$)												
Защитная среда	2044				6932				8556			
	исходного жидкого	после лиофилизации	Р	% выживаемости	исходного жидкого	после лиофилизации	Р	% выживаемости	исходного жидкого	после лиофилизации	Р	% выживаемости
Сахароза + желатина	$(4,0 \pm 1,2) \cdot 10^7$	$(3,7 \pm 0,9) \cdot 10^5$	$<0,05$	0,92	$(1,1 \pm 0,3) \cdot 10^7$	$(2,4 \pm 0,4) \cdot 10^5$	$<0,05$	2,16	$(6,5 \pm 0,8) \cdot 10^7$	$(1,5 \pm 0,1) \cdot 10^6$	$<0,05$	2,3
Сахароза + желатина + $MgCl_2$	$(1,5 \pm 0,1) \cdot 10^7$	$(5,5 \pm 0,6) \cdot 10^6$	$<0,05$	45,8	$(4,8 \pm 0,6) \cdot 10^7$	$(1,2 \pm 0,1) \cdot 10^7$	$<0,05$	25,0	$(1,8 \pm 0,2) \cdot 10^7$	$(4,0 \pm 0,9) \cdot 10^6$	$<0,05$	22,2
Сахароза + желатина + $CaCl_2$	$(1,2 \pm 0,1) \cdot 10^7$	$(4,2 \pm 0,3) \cdot 10^6$	$<0,05$	35,0	$(4,8 \pm 0,6) \cdot 10^7$	$(1,2 \pm 0,1) \cdot 10^7$	$<0,05$	25,0	$(8,2 \pm 1,1) \cdot 10^6$	$(1,5 \pm 0,1) \cdot 10^6$	$<0,05$	18,2
Сахароза + желатина + $MgCl_2$ + $CaCl_2$	$(1,2 \pm 0,1) \cdot 10^7$	$(4,6 \pm 0,2) \cdot 10^6$	$<0,05$	38,3	$(4,8 \pm 0,6) \cdot 10^7$	$(3,1 \pm 0,4) \cdot 10^7$	$<0,05$	64,5	$(1,8 \pm 0,2) \cdot 10^7$	$(8,0 \pm 1,2) \cdot 10^6$	$<0,05$	44,2
Лактоза + $CaCl_2$	$(5,0 \pm 0,2) \cdot 10^7$	$(3,4 \pm 0,7) \cdot 10^7$	$<0,05$	68,0	$(4,8 \pm 0,6) \cdot 10^7$	$(1,2 \pm 0,1) \cdot 10^7$	$<0,05$	25,0	$(8,2 \pm 1,1) \cdot 10^6$	$(3,4 \pm 0,6) \cdot 10^6$	$<0,05$	41,4

Способ сохранения фагов путем их лиофильного высушивания был разработан для умеренных фагов холерных вибрионов 01 группы [8]. Имеющиеся в настоящее время диагностические фаги холерных вибрионов не 01 группы отличаются низкой стабильностью при хранении, что ограничивает их применение в практических целях. В связи с этим был использован разработанный способ для стабилизации их свойств. Для сушки были взяты 3 умеренных фага холерных вибрионов не 01 группы: 53, 1865 и 26074, жидкие препараты которых утрачивали литическую активность через 3 мес хранения. В качестве стабилизатора использовали сахарозо-желатиновую среду с 0,75 % хлористого кальция. Как видно из табл. 4, в препаратах фагов сразу после лиофилизации содержалось $n \cdot 10^5$ — $n \cdot 10^8$ активных корпускул, а после хранения в течение 24 мес при 4—10 °С — $n \cdot 10^3$ — $n \cdot 10^4$ фаговых частиц.

Таблица 4

Лиофильное высушивание фагов холерных вибрионов не 01 группы на сахарозо-желатиновой среде с 0,75 % хлористого кальция

Фаг	Титры фага по Грациа ($M \pm m$)				
	исходный	после высушивания	P	через 24 мес	P
53	$(4,9 \pm 1,1) \cdot 10^9$	$(8,0 \pm 1,6) \cdot 10^5$	$< 0,05$	$(5,0 \pm 1,1) \cdot 10^4$	$< 0,05$
1865	$(6,0 \pm 1,7) \cdot 10^5$	$(4,7 \pm 0,8) \cdot 10^5$	$> 0,1$	$(5,0 \pm 0,9) \cdot 10^3$	$< 0,05$
26074	$(1,5 \pm 0,1) \cdot 10^9$	$(2,0 \pm 0,1) \cdot 10^8$	$< 0,05$	$(5,0 \pm 0,4) \cdot 10^4$	$< 0,05$

Таким образом, разработан метод лиофильного высушивания умеренных фагов холерных вибрионов 01 и не 01 групп. Для лиофилизации холерных фагов в качестве защитных предложены среды, состоящие из сахарозы 10 % + желатины 1,5 % + хлористого кальция 0,75 % и сахарозы 10 % + желатины 1,5 % + хлористого магния 0,75 %.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Брандзишевский Ю. В., Остроумова Н. М., Павлов В. А. и др. Технология изготовления лиофилизированного препарата холерных диагностических фагов // Пробл. особо опасн. инф. — 1974. — Вып. 1. — С. 78—81.
2. Быстрый Н. Ф., Чанишвили Т. Г., Гоголадзе З. Д. и др. Сравнительная характеристика усовершенствованных жидких и сухих дизентерийных фагов, изготовленных Тбилиским НИИВС // Тр. Тбил. НИИВС. — 1958. — 3. — С. 23—24.
3. Ежова Г. Г. О лиофилизации дифтерийных фагов // Лаб. дело. — 1969. — № 9. — С. 568—570.
4. Ларина В. С., Красикова М. А., Павлов В. А. и др. Опыт лиофильного высушивания чумного диагностического бактериофага Л-413С // Биохимия, патофизиол. и микробиол. особо опасн. инф. — Саратов: Б. и., 1983. — С. 53—57.
5. Нефедьева Н. П., Петрушина Л. И., Бакина М. Н. и др. О лиофилизации типовых стафилококковых фагов // Журн. микробиологии, эпидемиол. и иммунобиол. — 1965. — № 4. — С. 121—125.
6. Никитин Е. Е., Звягин И. В. Высушивание холерного бактериофага // Замораживание и высушивание биологических препаратов. — М.: Б. и., 1971. — С. 252—253.
7. Шиганова Л. Б. Усовершенствование диагностических холерных монофагов ХДФ-3, ХДФ-4, ХДФ-5: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Саратов. — 1982. — 19 с.
8. А. с. 1296578 СССР, МКИ⁴ С 12 N 7/00. Способ хранения холерных бактериофагов / Л. Д. Македонова, Т. А. Кудрякова, В. В. Кадетов — Оpubл. 15.03.87. Бюл. № 10.

Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный ин-т

Поступила 04.07.88

L. D. MAKEDONOVA, T. A. KUDRYAKOVA, V. V. KADETOV, L. A. NATALICH
LYOPHILIZATION OF O1 AND NON O1 VIBRIO CHOLERAЕ PHAGES

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

A regimen of freeze-drying and sublimation has been developed, optimal protective media have been selected for lyophilization of moderate O1 and non O1 *Vibrio cholerae* phages.

КРИОМЕДИЦИНА

УДК 618.173—089.583.9 : 615.832

*В. И. Грищенко, Г. А. Бабийчук, В. И. Сало, Н. И. Рябухина,
О. П. Липко, П. Г. Шайгуро*

ЭЛЕКТРОЭНЦЕФАЛОГРАФИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ
ПОД ВЛИЯНИЕМ КРАНИОЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ГИПОТЕРМИИ
У ЖЕНЩИН С КЛИМАКТЕРИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ

У 30 женщин в возрасте от 48 до 60 лет, страдающих климактерическим синдромом, проведена краниocereбральная гипотермия (КЦГ). Показано, что КЦГ способствует нормализации деятельности неспецифических систем головного мозга, исчезновению показателей их функциональной нестабильности.

Климактерический период наступает у большинства женщин в возрасте 48—50 лет и совпадает с периодом наиболее активной социальной и профессиональной деятельности. У 35—70 % женщин он протекает с проявлениями патологии, которые квалифицируются как климактерический синдром, приводящий к снижению и нередко к потере трудоспособности [1]. При этом возникают серьезные нарушения в нервной, эндокринной, вегетососудистой и других системах. Появление психоэмоциональных, вегетативных и обменно-эндокринных расстройств на фоне возрастных изменений в репродуктивной системе свидетельствует о непосредственной связи климактерических нарушений с изменением функции гипоталамуса, высших отделов центральной нервной системы (ЦНС) [2].

В период патологического течения климакса со стороны центральной нервной системы наблюдаются затяжные реакции, которые вследствие ослабления процесса торможения с трудом прекращаются. Сдвиги в функциональном состоянии, т. е. при патологическом течении климакса, свидетельствуют о нарастании процесса возбуждения и ослаблении процесса торможения [3]. Многими авторами, в частности Змановским Ю. Ф. [4], изучались особенности нейрофизиологии у женщин с климактерическими расстройствами.

Учитывая то, что краниocereбральная гипотермия (КЦГ) ведет к нормализации метаболических процессов в структурах мозга, что в свою очередь влечет за собой изменение физиологической активности головного мозга и способствует повышению активности адаптационных механизмов [5, 6, 7, 8], мы впервые применили КЦГ для лечения женщин, страдающих климактерическим синдромом. Никакие другие традиционные медикаментозные методы лечения (гормонотерапия, витаминотерапия, седативные средства, нейроблокаторы, спазмолитики, препараты йода) нами не применялись. В нашу задачу входило исследование изменений, происходящих в электрической активности мозга под воздействием КЦГ у женщин с климактерическими расстройствами.

Было обследовано 30 женщин в возрасте от 48 до 60 лет, страдавших климактерическим синдромом, у 22 из них климактерический синдром развился после перенесенной психотравмы. 25 женщин были в возрасте 48—54 лет и 5 женщин — в возрасте 55—60 лет.

Все наблюдавшиеся отмечали приливы: у 20 из них до 20 и более раз в сут, у 10 — до 10—12 раз в сут. Все женщины страдали бессонницей, повышенной потливостью, связанной с приливами, головокружениями, повышенной возбудимостью, раздражительностью, плаксивостью, 9 больных предъявляли жалобы на различного рода парестезии, 8 — на боли в области сердца, 25 — на головные боли, которые часто стали беспокоить в последнее время, у 9 женщин были жалобы на кожный зуд. Из анамнеза установлено, что никто из бывших под наблюдением женщин не болел энцефалитом, менингитом. Все они были консультированы невропатологом, никаких органических поражений ЦНС не было выявлено. Анализ фоновых ЭЭГ у больных с климактерическим синдромом позволил выявить следующие особенности, по сравнению со здоровыми женщинами этого же возраста. У 13 женщин в затылочно-теменных и затылочно-височных отведениях регистрировался гиперсинхронный, заостренный, веретенообразный α -ритм с амплитудой 80—110 мкВ и частотой 10—11 кол./с. У 10 женщин во всех отведениях преобладала среднеамплитудная β -активность (до 10 мкВ) с частотой 20—25 кол./с с элементами низкоамплитудного α -ритма, большим количеством острых волн низкой амплитуды («плоский тип» ЭЭГ по Змановскому). У остальных женщин ЭЭГ носили полиморфный дизритмический характер, нередко десинхронный, с билатеральными разрядами быстрых и медленных волн. Следует отметить, что почти у всех женщин регистрировались Θ -волны. Индекс волн Θ -диапазона был в пределах обычного. У 5 женщин отмечалось большое количество волн Θ -диапазона низкой амплитуды. Выявленные особенности ЭЭГ женщин, страдавших климактерическим синдромом, в целом согласуются с данными Змановского Ю. Ф. [4], Сметник В. П. и др. [2], Вихляевой Е. М. и др. [9], Григорьева М. Ю. и Джафаровой В. М. [10].

Женщинам, у которых был диагностирован климактерический синдром, проводилось лечение методом однократного проведения КЦГ на аппарате «Холод-2Ф» в умеренном режиме (по Мурскому): t в наружном слуховом проходе 36—33 °С, t в прямой кишке — 37—35 °С. Длительность процедуры составляла 1,5—2 ч. За 30—40 мин до проведения КЦГ, с целью исключения холодовых реакций организма, проводилась премедикация: натрия оксидутират внутрь — 20,0, пипольфен — 2,0, реланиум — 2,0 в/м.

Через 2 недели после проведения КЦГ у всех женщин имело место уменьшение количества и интенсивности приливов: у тех женщин, у которых отмечалось 20 и более приливов в сутки, их становилось не более 4—5, а у женщин, отмечавших до 10—12 приливов в сутки, приливы стали беспокоить не каждый день и появлялись 2—3 раза в сутки, у всех женщин исчезла, повышенная потливость, связанная с приливами, нормализовался сон, прекратились парестезии, значительно уменьшились, а у 18 женщин полностью исчезли головокружения, у 4 из 8 — боли в области сердца, у 20 женщин, отмечавших ранее сильные головные боли, значительно снизилась интенсивность и частота их возникновения, у 25 женщин исчезли повышенная возбудимость, раздражительность, плаксивость.

После достижения выраженного клинического эффекта у женщин повторно регистрировалась ЭЭГ. При этом отмечена положительная динамика для всех фоновых ЭЭГ. У всех 13 женщин нормализовалась амплитуда и частота α -ритма. Амплитуда снизилась до 50—60 мкВ, частота уменьшилась до 9—10 кол./с, т. е. появилась тенденция к замедлению α -ритма, что соответствует возрастной норме. Однако у 5 женщин еще сохранилась заостренность α -ритма. Это женщины, которые еще до появления признаков климактерического синдрома страдали неврозами, в том числе 3 из них — неврозами Шарко. Клинически у этих женщин, в отличие от всех остальных, после проведения КЦГ оставалась слабая повышенная возбудимость, раздражительность.

На ЭЭГ у всех женщин значительно уменьшились, а в ряде случаев исчезли, признаки ирритации церебральных структур (комплексов острая-медленная волна), исчезали веретена, отдельные острые волны. У 5 жен-

щин значительно уменьшился индекс волн Θ -диапазона в затылочно-теменных и затылочно-височных отведениях и стал в пределах обычного. В 7 случаях, когда в лобно-центральных областях преобладал среднеамплитудный α -ритм, перемежающийся с β -активностью, после проведенной КЦГ в лобно-центральных областях начинала превалировать β -активность, значительно снижалась амплитуда α -ритма.

Таким образом, краниocereбральная гипотермия, проведенная у женщин с климактерическим синдромом, способствует нормализации деятельности неспецифических систем головного мозга, исчезновению показателей их функциональной нестабильности и пароксизмальной деятельности, что свидетельствует о положительном терапевтическом эффекте КЦГ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Крымская М. Л. Климактерический период.— М.: Медицина, 1989.— 270 с.
2. Сметник В. П., Ткаченко Н. М., Глезер Г. А., Москаленко Н. П. Климактерический синдром.— М.: Медицина, 1988.— 286 с.
3. Давыдов С. Н. Климактерий женщины.— М.: Медицина, 1966.— 32 с.
4. Змановский Ю. Ф. Возрастные нейрофизиологические особенности и климактерические расстройства у женщин.— М.: Медицина, 1975.— 190 с.
5. Бабийчук Г. А. Направленная минимализация функций систем жизнеобеспечения с помощью охлаждения организма // Механизмы криоповреждения и криозащиты биологических объектов: Тез. докл. Второй Всес. конф.— Харьков: Б. и., 1984.— 2.— 123 с.
6. Аринчин Н. И., Мурский Л. И., Никитин В. М. Краниocereбральная гипотермия в эксперименте и в клинике // Теоретические проблемы действия низких температур на организм: Матер. Всес. конф. Регионарная гипотермия.— Владимир: Б. и., 1972.— С. 256—259.
7. Мурский Л. И. Физиологические механизмы гипотермии.— Владимир: Б. и., 1975.— 126 с.
8. Мурский Л. И. Физиология гипотермии.— Ярославль: Б. и., 1958.— 237 с.
9. Вихляева Е. М., Крымская М. Л., Мануилова И. А. Клинические и патогенетические особенности некоторых форм патологического климакса // Акуш. и гинек.— 1966.— № 5.— С. 20—24.
10. Мануилова И. А., Змановский Ю. Ф., Григорьев М. Ю., Джафарова В. М. Лечение больных с климактерическим синдромом гормональными препаратами // Клиническая медицина.— 1974.— № 3.— С. 129—133.

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

Поступила 15.01.90

V. I. GRISHCHENKO, G. A. BABIYCHUK, V. I. SALO, N. I. RYABUKHINA,
O. P. LIPKO, P. G. SHAYTURO

ELECTROPHYSIOLOGICAL CHANGES CAUSED BY CRANIOCEREBRAL HYPOTHERMIA IN WOMEN WITH CLIMACTERIC SYNDROME

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

Thirty females aging 48 to 60 with climacteric syndrome were subject to craniocerebral hypothermia (CCH). CCH has been shown to favor the normalization of the activity of unspecific brain systems with disappearance of symptoms of the functional instability and paroxysmal activity.

УДК 616.61/63—002.5; 615.832.9

Ю. И. Козин

ДИНАМИКА ТЕМПЕРАТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ПОЧЕЧНОЙ ТКАНИ ПРИ КРИОТЕРМОАБАЦИЛЛИРОВАНИИ КАВЕРНОЗНЫХ ФОРМ НЕФРОТУБЕРКУЛЕЗА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

В эксперименте у 120 собак изучена динамика температурных градиентов в почечной ткани при применении оригинальных способов внутрикавернозной криотермодеструкции инкапсулированных инфекционно-воспалительных процессов. Сопоставле-

ние показателей многоточечной радиальной термометрии с результатами бактериологических и гистологических исследований позволило предложить наиболее эффективные и атравматичные параметры криотермовоздействия.

Низкая эффективность современной химиотерапии распространенных деструктивных форм нефротуберкулеза и отсутствие максимально щадящего и в то же время высокоэффективного хирургического способа санации каверн [1, 2] потребовали поиска и разработки оригинальных способов субоперационного их абациллирования путем криотермовоздействия на казеозно-некротические массы и стенки остаточных полостей.

Созданная по оригинальному способу у 141 беспородной собаки экспериментальная модель кавернозного туберкулеза почек [3] и проведенная апробация оригинальных методов криоорошения [4, 5] на 78 особях, а также новых способов криотермоаппликации еще на 42 животных, позволили изучить термодинамику почечной ткани при применении методов криотермоабациллирования внутриорганных инкапсулированных инфекционных процессов.

Температура измерялась с помощью игловых полупроводниковых датчиков, устанавливаемых одновременно на расстоянии 5, 10, 15, 20 и 30 мм от зоны контакта криоагента или криоканюли с внутренним слоем кавернозных образований. Линейно-радиальное расположение термодатчиков в окружающей патологический очаг почечной паренхиме позволяло контролировать динамику изменения в ней температурных градиентов. Изучены также скорости охлаждения и нагрева почечной ткани в среднем сегменте и противоположном полюсе оперированной почки. Полупроводниковые датчики подключались к разработанному Физико-техническим институтом низких температур АН УССР электронному термометру 76-Э563.00.00, где линеризованный сигнал преобразовывался в цифровой с регистрацией динамики температур от 50 до -50°C . Разрешающая способность термометра была $0,1^{\circ}\text{C}$ при основной погрешности $\pm [(Tx - 38,4) \cdot 0,007 + 0,1]^{\circ}\text{C}$, где Tx — показание термометра. Кроме дисплейного изображения, цифровой сигнал через согласующее устройство подключался к транскриптору Ф5033 с последующей передачей на цифропечатающее устройство. Термографическая регистрация осуществлялась в заданные на транскрипторе определенные временные промежутки (5, 10, 15 или 20 с). Графическая регистрация тканевых температур с помощью компенсационного самопишущего потенциометра КСП-4 проводилась лишь на начальном этапе экспериментальных исследований.

При применении метода криоорошения азотом с помощью аппарата КАС—01-У.4.2 (24 случая) уже через 15—20 с отмечено быстро прогрессирующее со скоростью до $95^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ понижение температуры почечной ткани в 5 мм зоне от пиогенной капсулы до $-20,3^{\circ}\text{C}$ за 30—40 с. В дальнейшем уже через 60—120 с понижение температуры подлежащих тканей практически прекращалось, в то же время компенсаторное усиление кровотока в зоне медленного охлаждения в ряде случаев приводило к выносу больших масс охлажденной, оттекающей из почки крови и нарушению ее реологических свойств. При применении метода криоорошения это связано еще и с постоянным перемещением парожидкостной струи по поверхности, подлежащей криообработке. Достаточная для гарантированного абациллирования температура (-80 ± 10) $^{\circ}\text{C}$ достигается лишь в зоне непосредственного контакта хладагента с пиогенной капсулой — зона абсолютной криодеструкции. Зона частичной криодеструкции и гемодинамических нарушений с тканевой температурой до уровня эвтектических $-20 \div -25^{\circ}\text{C}$ захватывает прилегающую ткань, располагающуюся на расстоянии 5—10 мм от орошаемой поверхности. Далее на расстоянии от 10 до 20 мм от патологического очага температура почечной ткани выше эвтектической до $5-7^{\circ}\text{C}$. В этой зоне медленного охлаждения или глубокой гипотермии не происходило полного замораживания ткани и гистологически — это зона активной регенерации паренхимы почек. Начиная с 20—30 мм зоны умеренной гипотермии,

где охлаждение ткани не ниже 10—12 °С, и дальше от патологического очага гистологически и гистохимически структура почечной ткани существенно не менялась.

При предваряющей криоорошению обработке гипертоническим солевым раствором остатков некротических масс и пиогенной капсулы [5] в 2—3 раза возрастала скорость замораживания в подлежащей криодеструкции 5 мм зоне с уменьшением радиального распространения холода на периферийные отделы почечной паренхимы. Показатели температуры в этой зоне быстро и равномерно достигали при применении фреона-12 (10 случаев) — —13,8 °С, закиси азота (4 случая) — —25,8 °С и азота (18 случаев) — —46,6 °С. При двукратной 30-секундной обработке стенок каверн парожидкостной струей азота с принудительным отогревом струей горячего воздуха ($T_n = 44 \pm \pm 1$ °С) [4] термометрия в 5 мм зоне, прилегающей к каверне почечной ткани, показала, что она охлаждается в среднем до температуры —25,4 °С со скоростью 61,4 °С/мин и затем быстро нагревается в течение одной минуты до 18,6 °С (скорость нагрева 44 °С/мин). Эта методика исключала посткриохирургическое паренхиматозное кровотечение, уменьшала зону гемодинамических нарушений. При этом эффективность абациллирования, по результатам бактериологического изучения почечной ткани и мочи, возрастала до 90,9 %.

Во второй серии экспериментальных исследований (42 собаки) внутрикавернозная аппликационная криотермодеструкция выполнялась с помощью разработанных ФТИНТ АН УССР криодиатермозонда-насадки к работающему на азоте аппарату КАС-01-У.4.2 и криотермозонда к работающему на закиси азота «Аппарату для локальной криотермодеструкции урологическому» (АЛКУ-01). При контактном воздействии активные наконечники криотермозондов соответственно охлаждались до —130 или —85 °С с последующим принудительным их нагревом до 60 и 80 °С. В изучаемых зонах скорости замораживания почечной ткани при контактно-аппликационной криотермодеструкции снижались на 10—20 °С/мин и составляли в 5 мм зоне 35,5 °С/мин, 10 мм — 23 °С/мин, 15 мм — 15 °С/мин и 20 мм — 11 °С/мин. В то же время скорости отогрева и последующего нагрева почечной ткани существенно

Средний показатель динамики температур и скоростей замораживания-нагрева в окружающей кавернозные образования почечной ткани ($M \pm m$)

Способы криотермовоздействия (температура, °С, и скорости, °С/мин соответственно)		Зоны термометрии							
		Абсолютной криотермодеструкции		Частичной криотермодеструкции		Глубокой гипотермии		Умеренной гипотермии	
		Охлаждение	Нагрев	Охлаждение	Нагрев	Охлаждение	Нагрев	Охлаждение	Нагрев
Криоорошение	Общепринятая методика	—20,3	6,6	—9,0	13,2	7,5	29,9	21,9	33,6
		57,3	5,4	46,0	3,9	28,5	4,5	14,1	2,3
	Сочетанно с обработкой 10 % р-ром натрия хлорида	—29,8	1,5	—11,8	16,5	5,2	22,7	21,1	29,6
		65,8	6,3	47,8	5,7	30,9	3,5	15,0	1,1
	Сочетанно с принудительным отогревом $T_n = 44 \pm \pm 1$ °С	—25,4	18,6	—7,9	27,5	6,4	31,3	20,8	33,7
		61,4	44,0	43,9	35,4	29,7	24,9	15,7	12,9
Криотермоаппликация	Криодиатермозондом-насадкой к аппарату КАС-01-У.4.2	—49,3	—6,0	—17,2	—0,5	5,8	15,2	18,6	26,7
		48,8	43,3	29,6	16,5	17,2	9,4	11,4	8,1
	Криотермозондом аппарата АЛКУ-01	—48,6	—11,8	—15,8	—5,8	6,7	12	24,2	26,8
		32,1	23,6	20,1	7,2	14,0	4,9	11,7	2,8

повысились, составив в среднем в 5 мм зоне $\approx 28,1^\circ\text{C}/\text{мин}$, 10 мм — $12,1^\circ\text{C}/\text{мин}$, 15 мм — $7,2^\circ\text{C}/\text{мин}$ и 20 мм — $7,65^\circ\text{C}/\text{мин}$. Замораживание тканей и их нагрев в заданном объеме были более равномерными, и в зависимости от экспозиции зона абсолютной криодеструкции захватывала от 5 до 15 мм, а зона частичной криодеструкции гемодинамических нарушений располагалась на расстоянии 15—20 мм от криотермоканолюли.

Результаты многоточечной радиальной термометрии и термографии в анатомо-морфологически обусловленных зонах криотермоповреждения окружающей кавернозные образования почечной ткани при применении различных способов воздействия приведены в сводной таблице.

Сопоставление создаваемых при криоорошении и криотермоаппликации температур в зоне непосредственного контакта хладагента или криоканолюли с патологическими тканями и результатов бактериологического и анатомо-морфологического исследований зоны санации внутрипочечных патологических очагов позволило выработать требования к применяемой аппаратуре. Для эффективного и атравматичного криотермоабациллирования туберкулезных каверн должны обеспечиваться следующие оптимальные параметры внутриполостного воздействия: скорость охлаждения $(250 \pm 50)^\circ\text{C}/\text{мин}$ до температуры $(-80 \pm 10)^\circ\text{C}$ и экспозицией воздействия (3 ± 2) мин с последующим отогревом со скоростью $(40 \pm 10)^\circ\text{C}/\text{мин}$ до температуры $(50 \pm 10)^\circ\text{C}$ с экспозицией воздействия (3 ± 2) мин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Камышан И. С., Погребинский В. М. Туберкулез мочевых органов. — Киев: Здоров'я, 1987. — 184 с.
2. Струков А. И., Соловьев И. П. Морфология туберкулеза в современных условиях, 2-е изд. — М.: Медицина, 1986. — 232 с.
3. А. с. 1443019 СССР, МКИ⁴ G 09 B 23/28. Способ моделирования деструктивного туберкулеза почки / Ю. И. Козин. — Оpubл. 07.12.88. Бюл. № 45.
4. А. с. 1447355 СССР, МКИ⁴ A 61 B 17/00. Способ лечения инфекционных полостных образований почки / Ю. И. Козин. — Оpubл. 30.12.88. Бюл. № 48.
5. А. с. 1516099 СССР, МКИ⁴ A 61 B 17/36. Способ хирургического лечения объемных инкапсулированных образований / Ю. И. Козин, Т. Н. Юрченко, В. Ф. Козлова, Л. Ю. Дмитриева. — Оpubл. 23.10.89. Бюл. № 39.

Харьковский мед. ин-т

Поступила 28.01.90

Yu. I. KOZIN

THE DYNAMICS OF THERMAL CHANGES IN RENAL TISSUE UPON CRYOTHERMOABACILLATION OF EXPERIMENTAL CAVERNOUS NEPHRORHTHISIS

Medical Institute of Kharkov

The dynamics of temperature gradients in renal tissue was studied in experiments on 120 dogs using methods of intracavernous cryothermodestruction of encapsulated infectious inflammatory processes. The comparison of parameters of multipoint radial thermometry with the bacteriological and histological results allowed to suggest more effective and non-traumatic parameters of cryoapplication.

УДК 577.3 : 573.3

В. Е. Пальчиков, А. С. Осенний

ДВУХЧАСТОТНАЯ ИМПЕДАНСМЕТРИЯ КИСТИ РУКИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ВНЕШНИХ ТЕМПЕРАТУРНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ

Методом двухчастотной импедансметрии оценены изменения структурно-функциональных свойств кисти руки человека при различных температурных воздействиях на организм. Показано, что в зимний период года (длительное воздействие низких температур) импеданс кисти руки и коэффициенты его обратной зависимости от темпера-

туры кисти выше, чем в теплый летний период. Соответственно у лиц, проживающих в условиях более холодного климата, показатели импеданса были выше. Повышение показателей импеданса кисти при непосредственных воздействиях пониженных температур у них также было выше, чем у лиц из более теплого климата. Предложены механизмы для объяснения изменений импеданса кисти на высоких и низких частотах при температурных воздействиях.

Длительные температурные воздействия (сезонные колебания температур, проживание в условиях теплого или холодного климата) должны приводить к направленным изменениям структурно-функциональных свойств кисти руки как наиболее активной части тела человека в осуществлении теплообмена между организмом и средой. Для их отражения может быть весьма информативен метод электроимпедансметрии в области частот от 10 кГц до 1 МГц, где сказывается гетерогенность строения биообъекта во всем объеме клеток [8]. Различия механизмов, определяющих показатели импеданса на этих частотах, позволяют более полно и дифференцированно подходить к анализу полученных результатов измерений, к оценке вклада различных структур в полный импеданс межэлектродного участка тела, что и явилось целью данной работы.

Для оценки изменений импеданса кисти руки (ИК) при сезонных изменениях внешних температур обследованы 21 человек (возраст 16—46 лет) летом (июль) и 29 человек (17—56 лет) зимой (февраль). В это же время проведены 2 серии контрольных опытов с локальным кратковременным (2—3 мин) охлаждением и обогревом кистей рук (17—33°С) для оценки зависимости импеданса кисти от температуры кисти. Обследованы 9 человек в зимнее и летнее время. Всего 21 опыт — 133 измерения.

Для оценки влияния внешней температуры как климатического фактора были обследованы в летнее время (июль — август): жители Ивано-Франковска (1-я группа — 7 человек, возраст 29—55 лет); жители Новосибирска (2-я группа — 5 человек, 22—29 лет). Обследования обеих групп проведены в утренние и вечерние часы (7 ч и 16 ч) в Ивано-Франковске перед отъездом, а также в 1-й день и через неделю после возвращения; в Нижневартовске (север Западной Сибири) в течение 2 недель пребывания в полевых условиях, начиная с 3-го дня. Жители Новосибирска предварительно в течение 3 дней были обследованы в Новосибирске. Такой подход связан с тем, что климат в Новосибирске холоднее, чем в Ивано-Франковске, но теплее, чем в Нижневартовске [4].

Показатели высокочастотного (ВЧИ) и низкочастотного (НЧИ) импеданса кисти руки регистрировали на частотах 1 МГц и 10 кГц соответственно, с помощью двухчастотного кондуктометра «ТОНУС-2» [1]. Активный электрод, выполненный в виде чашечки (0,2 см²), заполненной электропроводной пастой, накладывали на кончик указательного пальца в центре папиллярного рисунка. Индифферентный металлический электрод из нержавеющей стали (40 см²) помещали на ладонь той же руки. Паста создает плотный и надежный контакт «электрод-кожа», но в течение кратковременной регистрации не успевает существенно изменить импеданс рогового слоя кожи. Малая площадь активного электрода обеспечивает измерение импеданса мягких тканей кисти, лежащих в непосредственной близости от электрода. На частотах 10 кГц импеданс клеточных тканей выше, чем жидкостей, и ток течет в основном по межклеточным пространствам [8]. При этом для электродов малой площади еще значительно сказывается импеданс кожи, ее рогового слоя. В нашем случае он составил 84 % полного НЧИ. На частотах 1 МГц емкостное сопротивление рогового слоя кожи снижается [8], и основной вклад в полный ВЧИ дают ткани, расположенные под кожей, — 86 %. Большую роль в определении полного импеданса играют уже дипольная и макроструктурная поляризация внутриклеточных образований [3]. В кисти руки, с ее развитой сосудистой сетью, значительными колебаниями гемодинамики и малым объемом мышц на показатели ВЧИ некоторое влияние может оказывать кровенаполнение.

У обследованных лиц измеряли также температуру пальцев рук (ТПР) с помощью медицинского электротермометра ТПЭМ-1.

Зимой, в условиях постоянного воздействия на организм внешних пониженных температур, импеданс кисти (ВЧИ = (965 ± 28) Ом; НЧИ — (4555 ± 178) Ом) выше, чем летом (ВЧИ = (765 ± 29) Ом, $P < 0,001$; НЧИ = (2776 ± 100) Ом, $P < 0,001$). Повышение НЧИ (39,1 %) существенно больше, чем ВЧИ (20,7 %) при снижении ТПР в среднем на $4,7^\circ\text{C}$ ($P < 0,01$).

Для изолированных тканей коэффициенты зависимости импеданса от температуры объекта составляют 1,5—2 % [5]. Это соответствует температурному коэффициенту Вант-Гоффа для электропроводности (1,2—1,3) и связано, по-видимому, преимущественно с изменением кинетической энергии атомов и молекул [3, 7].

Изменения НЧИ, определяющегося главным образом импедансом рогового слоя кожи, относительные и абсолютные, много больше, чем ВЧИ. Снижение потоотделения и повышение сухости кожи (увеличение НЧИ) в зимний период увеличивают ее теплоизоляционные свойства. Это может быть наиболее экономичной реакцией при адаптации организма к длительному воздействию низких температур окружающей среды.

Активное увеличение ВЧИ кисти руки в некоторой степени можно объяснить вазоконстрикцией и повышением тонуса стенки кровеносных сосудов, однако это объяснение не будет исчерпывающим. На частотах 1 МГц ток достаточно свободно проходит сквозь клеточные структуры [8], и существенное значение должен иметь импеданс внутриклеточных образований (клеточные электролиты, содержание внутриклеточной воды, конформационные свойства белковых комплексов и т. д.). Содержание воды может быть весомым фактором при адаптации к условиям воздействия пониженных температур. Эти закономерности прослеживаются даже на растительных объектах, где отсутствует кровоток. Так, у более зимостойких растений импеданс в термонеutralных условиях выше. Повышение его в зимний период и при кратковременных охлаждениях у зимостойких также больше, чем у менее зимостойких [2]. Значительные колебания температуры кисти и ее тесная прямая связь с внешними температурами предполагают также изменение структуры ферментных комплексов и повышение конформационной лабильности макромолекул для повышения термоустойчивости биохимических реакций — сезонные и «мгновенные» изоферменты [7]. Увеличение подкожножирового слоя, повышающее теплоизоляцию организма, также может увеличить ВЧИ.

Обратная зависимость импеданса кисти руки от ее температуры при кратковременных локальных охлаждениях и обогреве кисти также имела четкую сезонную динамику. Коэффициенты этой зависимости зимой были выше, чем летом ($P < 0,05$). Для ВЧИ зимой они составляли при охлаждении — 4,7 %; при обогревании — —3,9 %; для НЧИ — —2,6 % и — 1,9 % соответственно на 1°C . Летом для ВЧИ — — 2,7 % и — 3,5 %; для НЧИ — —0,2 % и 0,5 %. Более того, летом отрицательная корреляция НЧИ и температуры кисти даже менялась на положительную, если учесть величину должного пассивного изменения импеданса — —2 % $^\circ\text{C}$.

Активные изменения НЧИ должны быть обусловлены прежде всего, по-видимому, потоотделением и гидротранспирацией, которые усиливаются при значительных повышениях ТПР. Однако значительное снижение емкостного сопротивления рогового слоя кожи при сильном его увлажнении за счет потоотделения может усилить роль кровотока в динамике НЧИ. Это, вероятно, и обусловило особенности динамики НЧИ в летнее время. В этом случае при снижении теплоизоляционных возможностей увлажненного рогового слоя кожи сосудистые реакции могут частично компенсировать повышение теплоотдачи за счет дополнительного притока тепла с кровью, и наоборот. Изменение направленности сосудистых реакций в теплое летнее вре-

мя могло обуславливать и меньшие величины коэффициента температурной зависимости для ВЧИ по сравнению с холодным зимним периодом.

Таким образом, проживание в условиях воздействия низких температур (зима) приводило к увеличению ВЧИ и особенно НЧИ кисти руки и большей их изменчивости при непосредственных температурных воздействиях по сравнению с летним периодом.

Особенности показателей импеданса кисти руки у жителей разных климатических районов должны отражаться в исходных значениях импеданса кисти и их динамике при непосредственных температурных воздействиях так же, как и в случае сезонной динамики импеданса и его температурной зависимости. Так, у лиц 1-й группы исходные значения ВЧИ (832 ± 40 Ом) и НЧИ (2942 ± 116 Ом) были выше ($P < 0,01$), чем у лиц 2-й группы (ВЧИ = (603 ± 19) Ом; НЧИ = (2236 ± 97) Ом), проживающих в условиях более теплого климата, хотя ТПР у них достоверно не отличались ($P > 0,05$). Кроме того, перемещение первых из Новосибирска в Ивано-Франковск (район со сходными температурными условиями в это время года (июль), температура воздуха при обследованиях 24°C и $24\text{—}25^\circ\text{C}$ соответственно) привело к небольшому снижению ВЧИ ($P < 0,001$) и НЧИ ($P > 0,05$) и повышению ТПР ($P < 0,05$); показатели импеданса у них оставались выше ($P < 0,01$), чем у вторых.

В обеих группах при перемещении из Ивано-Франковска в Нижневартовск в условиях непосредственного холодного воздействия (низкие утренние температуры воздуха при обследованиях — $13\text{—}16^\circ\text{C}$) происходило повышение импеданса кисти. В 1-й и 2-й группах повышение ВЧИ (соответственно 100 % и 70 %) было больше, чем НЧИ (40 % и 30 %). Повышение ВЧИ и НЧИ в 1-й группе было больше, чем во 2-й. При этом ТПР в 1-й группе снижалась недостоверно ($P > 0,05$), во 2-й происходило устойчивое снижение в среднем на $3\text{—}5^\circ\text{C}$ ($P < 0,05$). То есть, теплоизоляционные свойства кисти руки при непосредственных воздействиях пониженных температур у лиц 1-й группы оказались более высокими.

Меньшие теплоизоляционные свойства и эффективность механизмов терморегуляции у жителей более теплых климатических районов подтверждают исследования конкретных показателей физической и химической терморегуляции [6].

При достаточно высоких внешних температурах ($18\text{—}25^\circ\text{C}$) во время вечерних обследований в 1-й группе показатели импеданса кисти руки и ТПР уже не отличались от исходных ($P > 0,05$). Во 2-й группе повышение импеданса кисти одинаково проявлялось как при действии низких внешних температур во время утренних обследований в соответствии со снижением ТПР, так и при достаточно высоких внешних температурах при последующих вечерних обследованиях, когда ТПР у них повышалась до исходного уровня ($P > 0,05$).

Таким образом, как и в случае сезонной динамики импеданса кисти руки, проживание в условиях более холодного климата приводило к увеличению ВЧИ и НЧИ и тем большему, чем ниже температуры непосредственного воздействия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алейников А. Ф., Верещагин Г. А., Осенний А. С. Портативный кондуктометр «ТОНУС-2» // Контроль и диагностика сельскохозяйственных объектов. — Новосибирск: Б. и. — 1981. — С. 16—19.
2. Войников В. К., Федотова В. Д., Усова Т. К. Изучение электросопротивления тканей узлов кущения озимых растений в период перезимовки // Изв. Сиб. отд-я АН СССР. Сер. биол. наук. — 1977. — № 5, вып. 1. — С. 87—90.
3. Губанов Н. И., Утелбергенов А. А. Медицинская биофизика. — М.: Медицина, 1978. — 335 с.
4. Мамонтов Н. В. Статистические характеристики температуры воздуха в различные часы суток на территории СССР. — М.: Гидрометеиздат, 1979. — 215 с.
5. Маслов Н. А. Об импедансе мышцы при тепловой контрактуры // ДАН СССР. — 1952. — 84, № 1. — С. 59—62.

6. Матюхин В. А., Недбаева Н. Д., Диверт Г. М. Влияние холодовых воздействий на терморегуляторные реакции человека в условиях Сибири // Физиология человека. — 1982. — 8, № 4. — С. 868—871.

7. Хочачка Ч., Сомеро Дж. Стратегия биохимической адаптации. — М.: Мир, 1977. — 398 с.

8. Schwan H. P. Electrical properties of body tissues and impedance plethysmography // IRE Transact. Med. Electron. — 1955. — PGWE. — 3. — P. 32—46.

Ин-т физиологии СО АМН СССР, г. Новосибирск

Поступила 24.10.88

V. E. PALCHIKOV, A. S. OSENNIY

TWO-FREQUENCY IMPEDANCE METRY OF HUMAN HAND SUBJECT TO EXTERNAL TEMPERATURE EFFECTS

Institute for Physiology of the USSR Academy of Medical Sciences, Novosibirsk

Structure-functional changes in human hand under different temperature effects were estimated by the method of two-frequency impedancemetry. It has been demonstrated that the impedance and the coefficient of the inverse dependence on the hand temperature is higher in winter than in summer. Therefore, the impedance parameters were higher in persons living in colder climate. Increasing the hand impedance parameters under the direct effect of low temperatures was higher than in persons living in warmer climate. The mechanisms of changes in hand impedance at low and high frequencies caused by temperature have been suggested.

КРИОГЕННОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

УДК 621.56 (088.8)

М. С. Манохина, А. М. Полончук, Ю. П. Белоусов, Л. А. Горяинова,
Л. В. Кузьмина, В. А. Красильников, В. Ф. Корниенко

УСТАНОВКА СУБЛИМАЦИОННОЙ СУШКИ СРЕЗОВ И КУСОЧКОВ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ УСС-1 И РЕЗУЛЬТАТЫ ЕЕ ИСПЫТАНИЙ

Дано описание сублимационной установки УСС-1, предназначенной для сублимационного высушивания объектов, требующих малых теплотрат: криотомных срезов животных и растительных клеток, небольших кусочков тканей для гистологических и электронномикроскопических исследований, культур тканей. Представлены результаты испытаний установки, проведенных на конкретных биологических объектах.

Методы криостабилизации биоструктур используются при структурно-химическом анализе клеток и тканей животных и растений. Большое разнообразие физико-химических характеристик объектов требует сложных, многоступенчатых процедур подготовки замороженного биоматериала к анализам, для чего необходимы специальные оборудование и технологические линии, обеспечивающие программное замораживание и хранение замороженных биоматериалов, криотомирование и сохранение срезов криостабилизированных структур, сублимацию (лиофилизацию) и хранение высушенных образцов.

Зарубежными фирмами технологические линии разработаны лишь для электронномикроскопического структурного и спектрального рентгеновского анализа клеток [2, 4].

Одним из возможных этапов обработки криостабилизированного биоматериала, является сублимационное высушивание, обеспечивающее хорошую сохранность тонкой структуры тканей и клеток, фиксированных глубоким замораживанием. Его применение предупреждает появление артефактов, связанных с процессами оттаивания (разрывы клеточных мембран, смещение легкорастворимых соединений с мест их прижизненной локализа-

ций и др.). Сублимационное высушивание биообъектов используется в гистохимических исследованиях, при изучении низкомолекулярных органических и неорганических веществ, радиоавтографическом анализе, цитофотометрии в видимом и ультрафиолетовом свете, в рентгеновской гистоспектрографии, электронной микроскопии [2].

За рубежом для лиофилизации гистологических блоков и криотомных срезов существует ряд установок (УТ-001, фирмы «Лейболд-Херауес», ЕТД-4 фирмы «Эдвардс», ЕД-5 фирмы «Т. Системз»), применение этого метода в СССР сдерживается отсутствием отечественного оборудования.

СКТБ с ОП Института проблем криобиологии и криомедицины АН УССР разработало по заданию Центра структурно-химического анализа Биологического НИИ ЛГУ комплект оборудования для криостабилизации

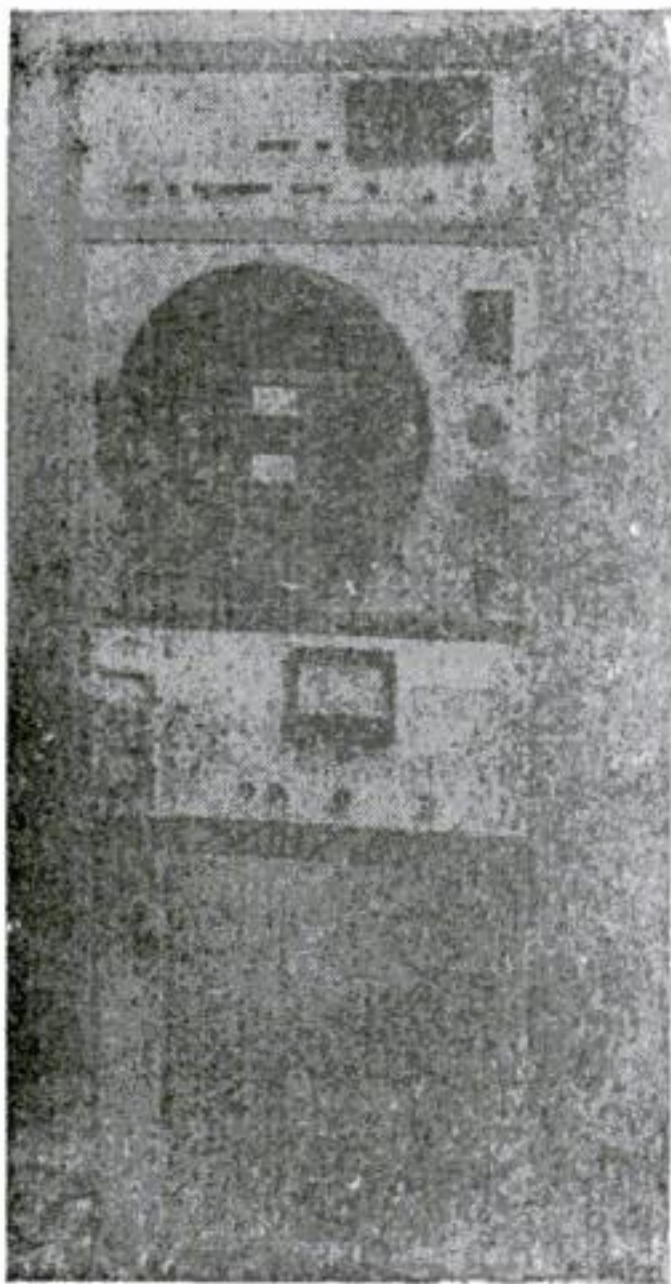


Рис. 1. Установка УСС-1

биоструктур, в который входит установка сублимационной сушки УСС-1 (рис. 1). Установка предназначена для сублимационного высушивания объектов, требующих малых теплотрат: криотомных срезов животных и растительных тканей, небольших кусочков тканей для гистологических и электронномикроскопических исследований, культур тканей. Количество влаги, удаляемой за один цикл, не более 1 г.

В вакуумной камере установки расположены рабочий стол для размещения образцов и десублиматор, охлаждаемые и нагреваемые термобатареями из элементов Пельтье. Радиаторы термобатарей охлаждаются водой, расход воды порядка $2,10^{-6} \text{ м}^3/\text{с}$. Размер рабочего стола $135 \times 130 \text{ мм}^2$.

Для манипуляций с криотомными срезами установки комплектуются специальными контейнерами и переносными укладками, снабженными перфорированными крышками для фиксации срезов.

В установке автоматически поддерживается заданная температура рабочего стола в диапазоне $60 \div -50^\circ\text{C}$. Температура десублиматора — 60°C . Предусмотрен режим оттаивания десублиматора. Газы из камеры удаляются вакуумным насосом, обеспечивающим полное остаточное давление $8,10^{-3} \text{ мм рт. ст.}$ Для уменьшения загрязнения камеры парами масла из форвакуумного насоса предусмотрена водяная (азотная) ловушка.

В установке контролируются электрические параметры, температура рабочего стола и десублиматора, давление в камере. Имеется выход на самопишущий прибор для записи температуры рабочего стола на диаграммной ленте. Осуществляется контроль наличия воды в системе охлаждения и автоматическое отключение питания термобатарей при повышении температуры радиаторов выше допустимого. Заполнение камеры сухим газом при смене образца или при окончании процесса высушивания происходит через осушающий патрон. Имеется возможность заливки высушенных образцов в парафин в камере сушки.

В Центре структурно-химического анализа Биологического НИИ ЛГУ совместно с лабораторией сна и бодрствования Института эволюционной физиологии, биохимии им. И. М. Сеченова АН СССР были проведены 2 серии испытаний УСС-1. В 1-й серии определялись режимы лиофилизации криостатных срезов, а во 2-й — гистологических блоков тканей различных органов позвоночных и беспозвоночных животных.

В процессе испытаний выяснялась пригодность УСС-1 для высушивания биоматериала при гистохимических исследованиях на светооптическом уровне.Arteфакты, вызываемые замораживанием или высушиванием, выявлялись различными методами морфологического контроля (окраска срезов базофильными красителями), гистоэнзимологическими реакциями (реакция на НАДН-гидрогеназу, щелочную фосфатазу). Метод Фалька—Хилларпа на гистофлуоресцентное выявление биогенных моноаминов [3] — высокочувствительный к артефактам, возникающим в процессе замораживания и высушивания, требующий для выявления тончайших нервных терминалей крайне щадящих режимов обработки тканей, — оказался наиболее оптимальным для определения возможностей испытываемого прибора.

Лиофилизация криостатных срезов. Криостатные срезы (8—10 мкм) надпочечников, семенников и яичников мышей, блоков из области стриатума мозга крыс, ганглиев ЦНС трех видов моллюсков, ганглиев брюшной нервной цепочки медицинской пиявки (*Hirudo medicinalis*) изготавливали из

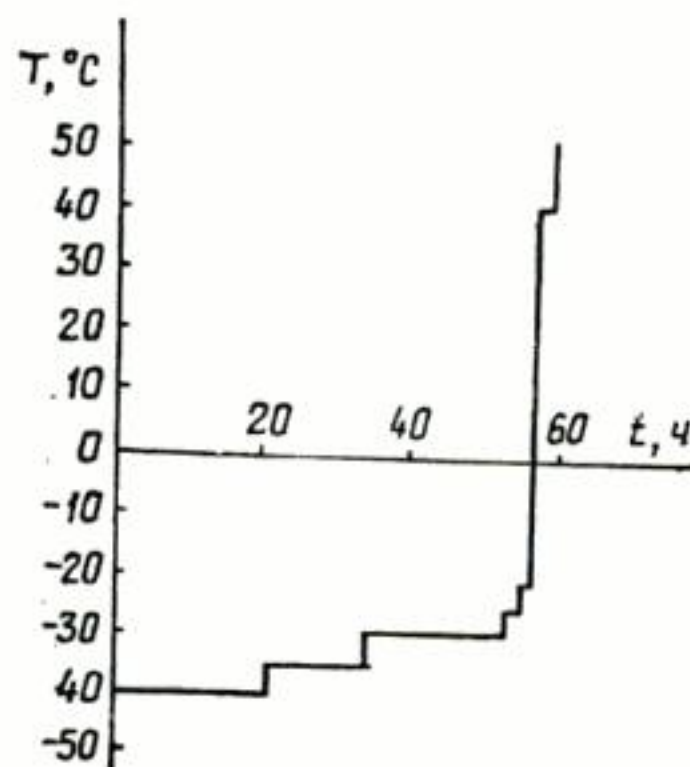


Рис. 2. Специфическое свечение в нервных структурах ганглия ЦНС катушки (*Planorbis sp.*) (сушка криостатных срезов в течение 1,5 ч): а — нервные волокна, б — тела нейронов. X 20

Рис. 3. Термограмма сушки криостатных срезов (1,5 ч)

замороженных жидким азотом блоков в криостате фирмы «Лейтц». Замороженные срезы раскладывались слоями в охлажденную металлическую укладку с контейнерами, которая закрывалась перфорированной крышкой и устанавливалась на предварительно охлажденный рабочий стол камеры УСС-1. Временные и температурные режимы лиофилизации для криостатных срезов тканей органов разных животных подбирались эмпирически, в зависимости от структурных особенностей (плотность, консистенция, липидный, солевой состав и т. д.) и оценивались по качеству получаемой гистофлуоресцентной реакции на биогенные моноамины. Хорошие результаты были получены в основном после 2—3-часовой лиофилизации срезов, при начальной температуре на рабочем столике УСС-1 равной — 40 °С, на десублиматоре — 60 °С и давлении $3 \cdot 10^{-2}$ мм рт. ст. в камере установки. В процессе сушки температура рабочего столика ступенчато повышалась через эмпирически подбираемые временные интервалы от — 40 °С до 50 °С, в результате чего температура контейнеров со срезами доводилась приблизительно до 30 °С. Срезы вынимались из камеры для проведения гистохимической реакции Фалька-Хилларпа, заключались в вазелиновое масло и просматривались в люминесцентном микроскопе ЛЮМАМ-Р8. На препаратах выявлялось специфическое свечение в телах моноаминергических нейронов и в нервных волокнах, в том числе и тончайших. Локализация свечения была четкой, без малейших признаков диффузии, сохранность ткани также была хорошей. На рис. 2 приведена фотография катехоламинергических нервных

волокон в ганглии ЦНС катушки (*Planorbis sp.*), на рис. 3 приведена термограмма этого опыта. Эти данные позволяют сделать заключение о высоких достоинствах испытываемой установки УСС-1 при использовании ее для сублимационной сушки криостатных срезов.

Лиофилизация гистологических блоков. Гистологические блоки — головной мозг травяных лягушек (*Rana temporaria*) (мозг использовался целиком, включая все отделы), мозг шипа (*Acipenser undiventrus*) (в ряде случаев рассекался на переднюю и заднюю половины на уровне мозжечка, но чаще высушивался целиком), блоки мозга крыс из области стриатума, ганглии ЦНС катушки (*Planorbis sp.*), тритонии (*Tritonia sp.*) замораживались жидким азотом и помещались в контейнерах на рабочий столик вакуумной камеры УСС-1. Временные и температурные режимы лиофилизации подбирались эмпирически и оценивались по качеству получаемой гистофлуоресцентной реакции на биогенные моноамины. Количество кусочков,

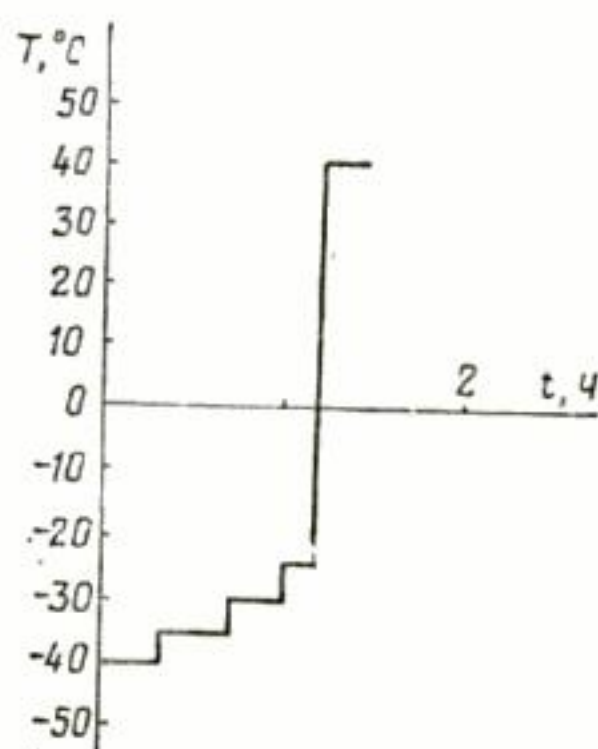
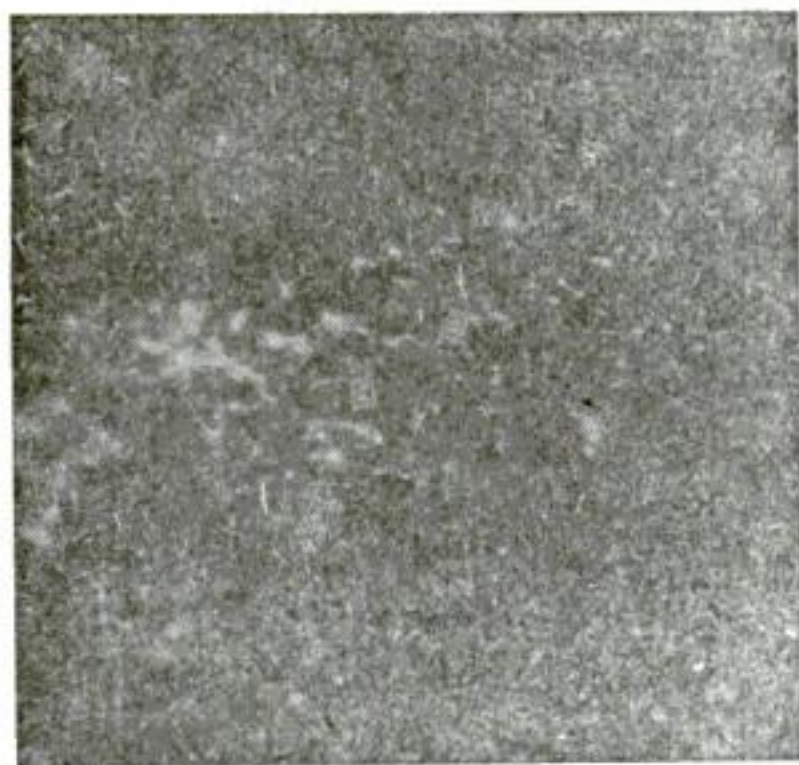


Рис. 4. Специфическое свечение в нервных волокнах мозга шипа (*Acipenser undiventrus*) (сушка кусочков в течение 60 ч): а — нервные волокна. X 20

Рис. 5. Термограмма сушки кусочков мозга шипа (*Acipenser undiventrus*) (60 ч)

высушиваемых в одной партии, не превышало 20 (по массе соответствовало 20 блокам мозга травяной лягушки). Хорошие результаты получены при 36—60-часовом высушивании. Начальная температура рабочего стола равнялась -40°C и через эмпирически подбираемые временные интервалы ступенчато повышалась до 50°C . Образцы прогревались при этом до $30\text{—}40^{\circ}\text{C}$, быстро вынимались из камеры и обрабатывались газообразным параформальдегидом для получения гистофлуоресцентной реакции на биогенные моноамины. Высушенные блоки помещались в расплавленный, предварительно дегазированный парафин и пропитывались им в емкости, откачиваемой форвакуумным насосом в течение 5 мин. Конструкция УСС-1 позволяет заливать кусочки парафином в вакуумной камере установки.

Парафиновые блоки хранились в эксикаторе и по мере надобности с них получали срезы толщиной 7—10 мкм, которые монтировали на сухие предметные стекла, депарафинировали и просветляли ксилолом, заключали в вазелиновое масло и просматривали в люминесцентном микроскопе ЛЮ-МАМ-Р8. На препаратах специфическое свечение, характерное как для катехол-, так и для индоламинов, выявлялось в телах нейронов, в нервных волокнах, в том числе и в тончайших терминалях. Локализация свечения, как и на криостатных срезах, была четкой, без малейших признаков диффузии. Сохранность ткани также была хорошей. На рис. 4 представлен снимок специфического зеленого свечения в катехоламинергических нервных волокнах в головном мозге шипа (*Acipenser undiventrus*). На рис. 5 представлена термограмма этого опыта. Результаты испытаний показали при-

годность УСС-1 для высушивания криотомных срезов и гистологических блоков. При этом достоинствами УСС-1 являются:

— отсутствие в вакуумной камере химически агрессивных сред типа P_2O_5 , которые используются в известных установках;

— низкая температура десублиматора и терморегулируемый рабочий стол, позволяющие для каждого объекта подбирать оптимальный режим сушки в широком диапазоне температуры;

— укладка с перфорированной крышкой и специальные контейнеры, исключающие оттаивание замороженных срезов при манипуляциях и не позволяющие им разлетаться в камере в процессе сушки.

Таким образом, установка УСС-1 благодаря своим техническим характеристикам и эксплуатационным возможностям может найти широкое применение в самых различных медико-биологических исследованиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Луппа Х. Основы гистохимии. — М.: Мир, 1980. — 343 с.
2. Шахматов Б. А., Буравков С. В. Применение метода рентгеноспектрального локального микроанализа в биологии и медицине // Арх. анат., гист., эмбр. — 1983. — 84, № 4. — С. 95—107.
3. Falck B., Owman C. A detailed methodological description of the fluorescence method for the cellular localization of biogenic monoamines // Acta Univ. Lundensds, 1965. — P. 11, 7—49.
4. Gupta B. L., Hall T. A., Moreton R. B. Electron probe x-ray microanalysis // Transport of ions and water in animals. — London: Acad. Press, 1977.

Биологический НИИ ЛГУ, г. Ленинград,
СКТБ с ОП Ин-та проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР, г. Харьков,
Ин-т эволюционной физиологии, биохимии
им. И. М. Сеченова АН СССР, г. Ленинград

Поступила 10.06.89

M. S. MANOKHINA, A. M. POLONCHUK, Yu. P. BELOUSOV, L. A. GORYAINOVA,
L. V. KUZMINA, V. A. KRASILNIKOV, V. N. KORHIYENKO

A DEVICE FOR LYOPHILIZATION OF BIOLOGICAL TISSUE SLICES AND PIECES USS-1 WITH TESTING RESULTS

Biological Research Institute of the State University of Leningrad; I. M. Sechenov Institute for Evolution Physiology and Biochemistry of the USSR Academy of Sciences, Leningrad; Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the UkrSSR Academy of Sciences, Kharkov

A device USS-I is described for lyophilization of biological systems requiring small thermal expenses such as cryotome slices of animal and plant cells, small pieces of tissues for histological and electron microscope studies, and cell cultures. Testing results are presented.

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 57.043

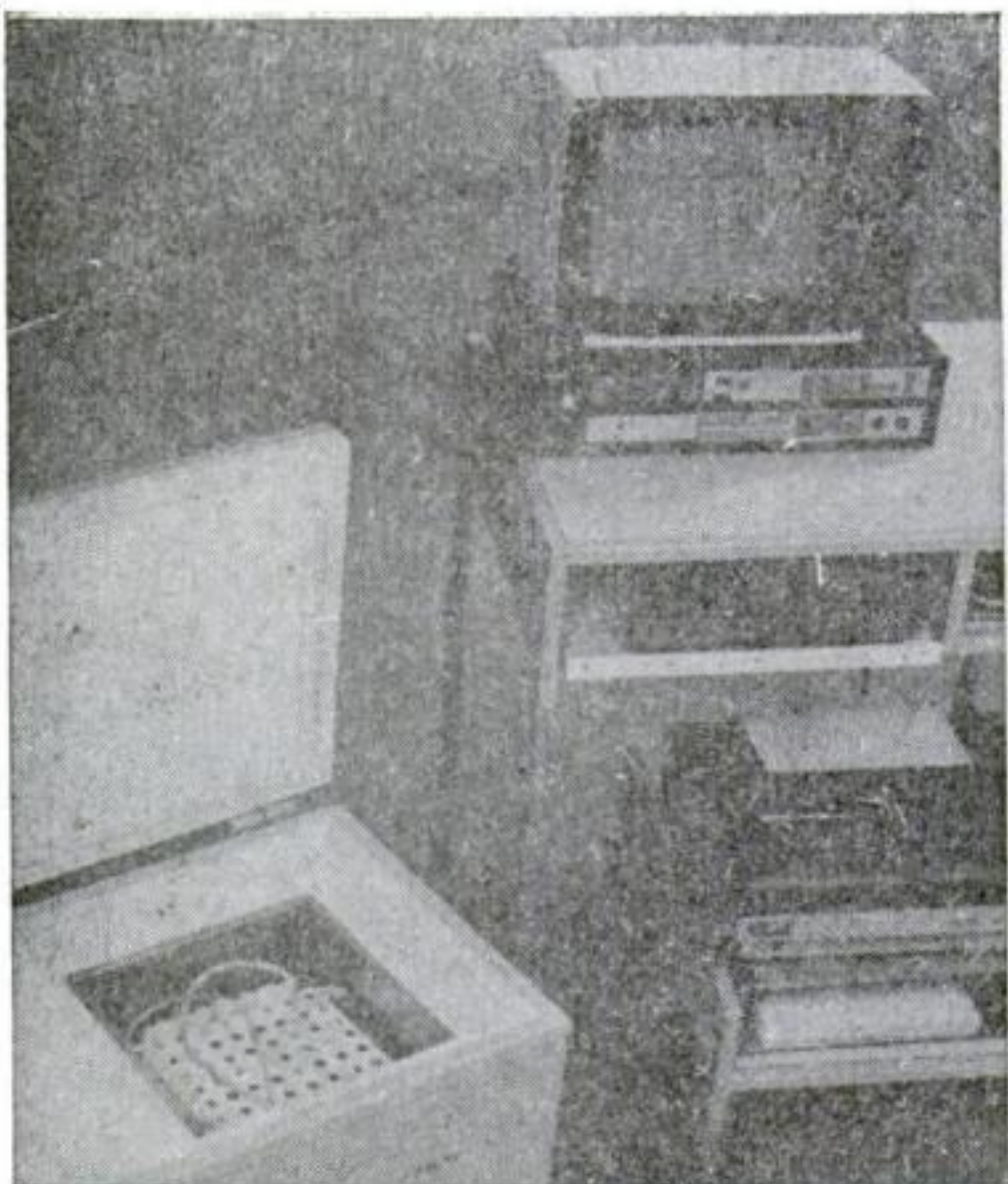
М. Луптак, В. Ф. Тарасов

ВЫСОКОТОЧНОЕ МНОГОПРОФИЛЬНОЕ ПРОГРАММНОЕ ОХЛАЖДАЮЩЕЕ УСТРОЙСТВО НА БАЗЕ МИКРОКОМПЬЮТЕРА

В существующих в настоящее время устройствах для программного охлаждения биообъектов предусматривается наличие микропроцессора или других авторегулирующих устройств в виде встроенного блока. Для расширения функциональных возможностей подобных устройств было разработано охлаждающее устройство, управление которым осуществляется штатным компьютером.

Разработанное охлаждающее устройство предназначено для программного замораживания биологических объектов с целью их криоконсервирования или других объектов, при работе с которыми требуются низкие температуры. Устройство включает в себя 8-разрядный микрокомпьютер РМД-85 (ЧСФР), монитор, печатающее устройство, магнитофон, электронный блок управления, камеру замораживания и систему снабжения хладагентом (рис.).

Электронная часть управления камерой охлаждения представляет собой отдельно выполненный блок, при помощи которого осуществляется сопряжение между системой снабжения жидким азотом и микрокомпьютером. В него входят следующие части: параллельный интерфейс, А/Ц преобразователь измерений температуры, давления и количества жидкого азота, электронный регулятор электромагнитного клапана, датчик контроля давления, система контроля исправности устройства.



Высокоточное программное охлаждающее устройство на базе микрокомпьютера

Рабочая камера объемом от 5 до 50 литров (в зависимости от модификации) выполнена прямоугольной формы из нержавеющей стали с пенопластовой теплоизоляцией. В камере расположены два герметично выполненных датчика температуры, смонтированных таким образом, что возможно их использование в качестве измерителей температуры с точностью $\pm 0,1^\circ\text{C}$ вне камеры. Измерение температуры осуществляется по четырехпроводной схеме подключения термометров с дальнейшей линеаризацией при помощи микрокомпьютера в диапазоне $50 - 100^\circ\text{C}$. Подача хладагента в камеру реализуется электромагнитным клапаном, расположенным в нижней части сосуда Дьюара.

Используемый в устройстве микрокомпьютер позволяет легко и удобно управлять процессами охлаждения и нагрева. Программирование и управление в ручном режиме решены в форме диалога между оператором и компьютером, для чего достаточно с помощью клавиатуры набирать требуемые команды, изображенные на экране монитора. В автоматическом режиме имеется возможность одновременного ввода восьми программ, в каждой из которых можно задать восемь различных этапов. Задание программ возможно выполнять в виде скорости этапа или времени, за которое достигается нужная температура. Заданные таким образом программы можно записать при помощи магнитофона на магнитную ленту для многократного их использования. Охлаждение в диапазоне скоростей $0,1 - 50^\circ\text{C}/\text{мин}$ можно проводить с регулированием по камере (с точностью $\pm 0,3^\circ\text{C}/\text{мин}$) или объекту. Весь процесс охлаждения или нагрева изображается на мониторе в реальном времени в форме термограммы с точностью $\pm 1^\circ\text{C}$. Кроме того на экране изображаются температуры в камере и образце с точностью $\pm 0,1^\circ\text{C}$, давление и уровень жидкого азота. В верхней части экрана монитора изображены реальное время реализации программы, программная скорость и время стабилизации температуры в случае необходимой остановки в ручном режиме. Имеется возможность выбора записи изображения всей термограммы или ее частей. В случае отклонения от заданных параметров информация об этом изображается на экране монитора. При завершении программы имеется возможность записи термограммы и основных параметров на бумажную или магнитную ленты.

Для использования в качестве переносного предусмотрена модификация программного охлаждающего устройства, предполагающая замену микрокомпьютера РМД-85 на встроенный микрокомпьютер, состоящий из блока с микропроцессором и ин-

терфейса для возможного подключения к персональным компьютерам РС-ХТ, РС-АТ или аналогичным.

Таким образом, разработанное программное охлаждающее устройство предусматривает приобретение лишь криогенной его части и подключение к имеющемуся компьютеру, что намного снижает материальные затраты. Применение охлаждающего устройства в полном комплекте дает возможность использовать компьютер в штатном режиме.

Ин-т экспериментальной физики

Поступило 26.10.90

САН ЧСФР, г. Кошице,

Ин-т проблем криобиологии и

криомедицины АН УССР, г. Харьков

УДК 57.043

И. Ю. Мельник

ТЕМПЕРАТУРНЫЕ ЭФФЕКТЫ ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ КАРДИОТОНИКОВ С ЛИПОСОМАМИ

Было изучено взаимодействие липосом, приготовленных из лецитина и кардиолипина, с гликозидными и негликозидными кардиотониками, которые относятся к лиотропным агентам [1, 2]. Физико-химические параметры липосом при воздействии с кардиотониками исследовали по тепловым эффектам с помощью микрокалориметра ЛКБ-2107 (Швеция), изменение микровязкости и полярности окружения — с помощью флуоресцентного зонда пирена, встроенного в бислои, на спектрофлуориметре Хитачи MPF-4 (Япония). Корреляцию перечисленных параметров устанавливали с помощью ЭВМ «Искра-226» (язык «BASIC»).

Установлено, что при взаимодействии кардиотоников как с кардиолипидными, так и с лецитиновыми фосфолипидными бислоями определяется взаимосвязь между изменением микровязкости липидов и тепловым эффектом реакции, оцениваемым по высоте сигнала в начальный период реакции, с коэффициентом корреляции 0,9. Наличие такой взаимосвязи позволяет разработать объективные критерии, указывающие на характер структурных переходов в мембранах при различных видах низкотемпературных воздействий.

Нами выявлено, что в условиях эксперимента при концентрации фосфолипидов $1,33 \cdot 10^{-4}$ моль/л и кардиотоников $6,66 \cdot 10^{-5}$ моль/л при объеме 1 л за период 20 мин величина теплового эффекта реакции кардиотоников с липосомами из кардиолипина значительно ниже, чем при взаимодействии с липосомами из лецитина, причем на величину экзотермической реакции оказывают влияние структура и концентрация кардиотоников. Так, при взаимодействии липосом с убихином величины этой реакции достигают 2,02 Дж/моль, со строфантиндином ацетатом — 3,0 Дж/моль, с суфаном — 3,63 Дж/моль, с пароксибензойной кислотой — 5,22 Дж/моль. Изменение микровязкости лецитиновых липосом в присутствии суфана и убихинона снижается, а при взаимодействии с строфантиндином ацетатом несколько повышается. Наиболее вероятным механизмом указанных изменений является различный характер комплексообразования кардиотоников с фосфолипидным бислоем, который убывает в ряду: пароксибензойная кислота < суфан < строфантиндином ацетат > убихинон.

Таким образом, использованные критерии оценки физико-химических свойств липидных систем различной химической природы позволяют определить общие параметры структурной дестабилизации (либо стабилизации) липидных бислоев, а также специфичность изменений, в определенных участках мембран.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Горчакова Н. А., Бударин Л. И., Гребенников В. Н. Фармакологические основы комплексообразования сердечных гликозидов с фосфатидилхолином и металлами // Фармакология кардиотонических средств. — М.: Медицина, 1988 — С. 51—58.
2. Чекман И. С., Горчакова Н. А., Ератусь В. В., Мудрая И. С. Инотронный эффект строфантина в сочетании с кальцием на сердечную мышцу // Бюл. эксп. биол. и мед. — 1985. — 99, № 3. — С. 320—323.

Киевский НИИ Фармакологии и токсикологии

Поступило 08.02.91

ХРОНИКА

ШКОЛА-СЕМИНАР ПО КРИОБИОЛОГИИ

Межведомственная ихтиологическая комиссия провела школу-семинар по криобиологии на базе Института проблем криобиологии и криомедицины АН УССР 15—26 октября 1990 г. На школе рассмотрены биофизические теории криоповреждения и криозащиты клеточных структур, роль внеклеточной и внутриклеточной кристаллизации при низкотемпературном консервировании биообъектов, влияние начального переохлаждения и инициирования кристаллообразования во внеклеточной среде на сохранность биообъектов. Представлены доклады по анабиозу и механизмам клеточной адаптации к низким температурам, роли белков цитоскелета в холодовой стабильности клеток, криоконсервации клеточных суспензий, перспективам применения криопротекторов при охлаждении организма, электронномикроскопическим методам в решении криобиологических задач. Сделаны сообщения о генетических аспектах сбора коллекции геномов рыб для криобанка, об использовании криоконсервации для восстановления редких и исчезающих видов рыб, создании химер для реализации генетической информации нежизнеспособных зародышей. Обсуждались проблемы естественных криопротекторов, криоконсервации беспозвоночных, разработки криобиологических методов изучения клеток, режимов замораживания и размораживания, способы и среды для консервации гамет и эмбрионов рыб, криоконсервации яйцеклеток и эмбрионов млекопитающих. Вниманию слушателей были представлены доклады, посвященные современным замораживателям для решения промышленных и исследовательских работ, основным принципам коллекционирования генетических ресурсов рыб для криобанка, перспективам криоконсервации гамет и эмбрионов рыб, влиянию низких температур на спермию. В работе школы приняли участие ученые из ИПКиК АН УССР, МГУ, ИБР АН СССР, ИБФ АН СССР и др. учреждений. Проводились занятия за круглым столом и в лабораториях института.

З. В. Линевиц

ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИЙ

В специализированном совете при Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР в 1990 г. Г. Ф. Жегуновым защищена диссертационная работа на соискание ученой степени доктора биологических наук «Биохимические и ультраструктурные основы функциональной активности сердца зимоспящих животных». Показано, что основой адекватной функциональной активности сердца и других органов сусликов на различных этапах баута являются циклические структурно-функциональные перестройки клеток, управляемые синтезом и заменой специфических белков. Получены экспериментальные доказательства участия генома клеток в процессах адаптации клеток путем регуляции белкового синтеза. Установлено, что свойство клеток органов и тканей зимоспящих животных функционировать в широком диапазоне температур обусловлено не особенностями их ультраструктурной организации, а способностью к быстрой реорганизации интенсивности метаболизма.

В. В. Рязанцевым защищена диссертационная работа на соискание ученой степени кандидата биологических наук «Влияние физико-химических факторов замораживания на взаимодействие спектрина с мембранами липосом и эритроцитов». Получены новые данные о реакции белков спектрин-актинового комплекса (САК) эритроцитов на воздействие низких температур. Показано, что замораживание-отогрев клеток инициирует в мембранах изменения белок-белковых взаимодействий, которые были исследованы с помощью сшивающего белки агента — диамида. Этот процесс сопровождается изменением уровня фосфорилирования спектрина. На модельных клетках — протеолипосомах установлено, что белки САК эритроцитов способны стабилизировать липидный бислой мембраны при действии низких температур. Наряду с этим замораживание белков САК приводит к снижению числа мест связывания спектрина с мембранами липосом и эритроцитов. Выявленные структурно-функциональные нарушения мембран могут быть в существенной степени предотвращены введением в среду замораживания 4—6 % глицерина.

ВТОРАЯ МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ «УСПЕХИ СОВРЕМЕННОЙ КРИОБИОЛОГИИ»

Уважаемые коллеги!

21—25 апреля 1992 года в г. Харькове состоится 2-я Международная конференция «Успехи современной криобиологии», проводимая под эгидой Международного института холода и ЮНЕСКО. Научная программа конференции будет формироваться из докладов приглашенных лекторов, устных и стендовых докладов участников. Рабочие языки конференции — русский и английский.

Предлагаемая для обсуждения тематика: 1. Механизмы криоповреждения и криозащиты биологических объектов. 2. Криобиохимия мембран и макромолекул. 3. Физикохимия водных растворов криопротекторов и криоконсервантов во время охлаждения и при низких температурах. 4. Криобиология репродуктивных клеток, тканей и эмбрионов. 5. Гипотермия. Механизмы адаптации к искусственному и естественному охлаждению. Проблемы гипобриоза. 6. Консервация биологических объектов при низких температурах. 7. Медико-биологические проблемы холодовой адаптации. 8. Криоаппаратура для биологических исследований и клинического использования.

Во время конференции предполагается проведение выставки научного криобиологического оборудования.

Для участия в конференции необходимо до 20 мая 1991 года представить в Оргкомитет тезисы Вашего доклада на русском и английском языках.

Обязательное условие публикации — предъявление квитанции об уплате регистрационного взноса, который дает право на участие в работе конференции (один взнос на одно лицо). Регистрационный взнос составляет 150 рублей. Для аспирантов, соискателей и стажеров — 50 рублей. При отсутствии квитанции об оплате Оргкомитет будет лишен возможности принять тезисы к публикации.

Деньги переводить на счет ИПКиК АН УССР, расчетный счет 000609226 МФО 351339 в Ленинском отделении Жилсоцбанка г. Харькова с пометкой «Конференция».

Тезисы представляются в одном экземпляре на английском языке и в двух экземплярах на русском языке; второй экземпляр тезисов должен иметь визу дирекции учреждения с гербовой печатью и быть подписан внизу авторами. К тезисам необходимо приложить экспертное заключение по установленной форме. Образец оформления тезисов приведен ниже. Тезисы с экспертным заключением и сопроводительным письмом следует направлять по адресу: 310015 г. Харьков, ул. Переяславская, 23, ИПКиК АН УССР, Оргкомитет Международной конференции.

Образец оформления тезисов:

ФАКТОРЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ОРГАНИЗМА ПРИ ПОНИЖЕННЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ

Петренко П. Г., Иванов В. Д.

**Институт проблем криобиологии и криомедицины АН УССР, г. Харьков
310015 СССР.**

Далее следует текст тезисов, отпечатанный через 1,5 интервала на пишущей машинке со стандартным шрифтом. Полный объем тезисов не должен превышать 38 строк, в каждой из которых должно быть не более 63 знаков.

НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ острой печеночной недостаточности, коррекции ряда метаболических нарушений открываются при использовании ксеногепатоцитов. Хранящиеся в низкотемпературном банке свинные гепатоциты характеризуются высокой сохранностью морфологических и метаболических свойств.

Материал поставляется в одноразовых контейнерах. Стоимость одной дозы (контейнера) 97 р. без учета расходов на транспортировку.

Возможно создание в лечебном учреждении низкотемпературного банка ксеногепатоцитов.

Наш адрес: 310015, г. Харьков, ул. Переяславская, 23. Институт проблем криобиологии и криомедицины АН УССР. Телефон для справок (057) 70-29-35.

С 1991 года журнал «Криобиология» переименован и выходит под названием «Проблемы криобиологии». В журнале публикуются научные работы по всем аспектам действия охлаждения и замораживания в биологии, медицине и пищевой промышленности, по проблемам гипотермии, низкотемпературному консервированию клеток и тканей, криохирургии, по сублимационному высушиванию, о криопротекторных веществах и их фармакологическом действии. Освещаются вопросы гибернации, зимостойкости растений, конструирования приборов и оборудования для низкотемпературного консервирования биологических объектов и криомедицины.

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

Периодичность — 4 номера в год. Подписная цена: на 3 мес. — 1 р. 20 к., на 6 мес. — 2 р. 40 к., на 12 мес. — 4 р. 80 к.

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

Our journal KRIOBIOLOGIYA (CRYOBIOLOGY) published by Naukova Dumka Publ. Co. is renamed to Problemy Kriobiologii (Problems of Cryobiology) in 1991. The journal is designated for the communication of papers on aspects of low temperature studies covering the chemical and life sciences and their associated technologies. Coverage includes: physical and chemical changes accompanying freezing and thawing, low temperature 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.

Problemy Kriobiologii will be published 4 times a year.

ISSN 0233—7673. Проблемы криобиологии, 1991, № 2. 1—56