

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ОТДЕЛЕНИЕ ФИЗИОЛОГИИ

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ
И ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

КРИОБИОЛОГИЯ

4 1986

ВСЕСОЮЗНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ОСНОВАН В 1985 ГОДУ
ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

КИЕВ НАУКОВА ДУМКА 1986

СОДЕРЖАНИЕ

На путях углубления исследований, повышения их эффективности	3
Сергеев Г. Б., Сергеев Б. М., Батюк В. А., Громченко И. А. Формирование замороженных образцов и кинетика реакций при низких температурах	5
Лозина-Лозинский Л. К., Успенская З. И. Системное направление в криобиологии	10
Утевский А. М., Чуйко В. А., Беркало Л. В., Македонская В. А. Захват и органификация иодидов после замораживания щитовидной железы с димексидом	16
Гучок М. В. Исследование токсичности 1,2-пропандиола и глицерина для крыс в постнатальном онтогенезе	18
Золочевская Л. И. Аденилатциклазная система печени крыс при холодовом воздействии	20
Стусь Л. К., Куракса В. М. Влияние экранирования геомагнитного поля на эритроциты в процессе хранения при температуре 4 °С	23
Зинченко А. В., Моисеев В. А. Физические состояния системы вода-этиленгликоль по данным дифференциальной сканирующей калориметрии	25
Паращук Ю. С., Смаглий Н. Ю. Нуклеиновые кислоты спермиев человека при криоконсервации и некоторой патологии	28
Солошенко Э. Н. Низкотемпературное лечение в дерматологии лекарственной болезни, холодовой аллергии и крапивницы	30
Шпиченецкий Б. Я., Унков М. Е., Иванов А. Г., Кирпатовский В. И., Онищенко Н. А. Характер кристаллизационных процессов в замораживаемых органах	32
Осецкий А. И. Особенности кинетики ферментативных реакций в среде вязких органических растворителей	36

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Поздняков В. В. Действие ингибиторов анионного транспорта и ионофоров на проницаемость мембран эритроцитов в гипертонических средах	43
Дегтярев А. В. Температурная модификация проницаемости липидных везикул в неравновесных осмотических условиях	44
Семенченко О. А. Влияние криопротекторов на сохранность мембран гепатоцитов в условиях криоконсервации	45
Павличенко С. А., Шапатава К. В., Дерман А. И., Панов А. В. Эндоскопическое криоэлектровоздействие при острых желудочно-кишечных кровотечениях	46

© Издательство «Наукова думка», «Криобиология», 1986

Шифман М. И., Марченко В. С. Секреция нейромедиаторов в центральной нервной системе в условиях гипотермии	47
Бабийчук Г. А. Рецензия. Эмирбеков Э. З., Львова С. П. Механизмы биохимических изменений при низких температурах тела. — Изд-во Ростовского ун-та. — 1985. — 79 с.	48

ХРОНИКА	49
ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИЙ	51

CONTENTS

<i>On the way of extending researches and increasing their efficiency</i>	3
<i>Sergeyev G. B., Sergeyev B. M., Batyuk V. A., Gromchenko I. A. The formation of frozen specimens and kinetics of reactions at low temperatures</i>	5
<i>Lozina-Lozinsky L. K., Uspenskaya Z. I. The system trend in cryobiology</i>	10
<i>Utevsky A. M., Chuyko V. A., Berkalo L. V., Makedonskaya V. A. Uptake and organification of iodides after freezing thyroid glands using dimexide</i>	16
<i>Guchok V. M. Investigation of toxicity of 1,2-propane diol and glycerol for young rats</i>	18
<i>Zolochevskaya L. I. The effect of cold on the rat liver adenylylase system</i>	20
<i>Stus L. K., Kuraksa V. M. The effect of screening the geomagnetic field on erythrocytes during storage at subzero temperatures</i>	23
<i>Zinchenko A. V., Moiseyev V. A. The physical state of water-ethylene glycol system studied by differential scanning calorimetry</i>	25
<i>Parashchuk Yu. S., Smaglyi N. Yu. Nucleic acids of human spermatozoa upon cryopreservation and in pathologic conditions</i>	28
<i>Soloshenko E. N. The usage of low temperatures in dermatology for treating patients with drug diseases, cold allergy and urticaria</i>	30
<i>Shpichenetsky B. Ya., Unksov M. E., Ivanov A. G., Kirpatovsky V. I., Onishchenko N. A. The character of crystallization processes in frozen organs</i>	32
<i>Osetsky A. I. Peculiarities of the kinetics of enzyme reactions in a medium of viscous organic solvents</i>	36

SHORT COMMUNICATIONS

<i>Pozdnyakov V. V. The effect of inhibitors of anion transport and ionophores on the membrane permeability of erythrocytes in hypertonic media</i>	43
<i>Degtyarev A. V. Changes in the permeability of lipid vesicles induced by temperature under conditions of non-equilibrium osmolarity</i>	44
<i>Semenchenko O. A. The effect of cryoprotectants on the integrity of hepatocyte membranes under conditions of cryopreservation</i>	45
<i>Pavlichenko S. A., Shapatava K. V., Derman A. I., Pashov A. V. Endoscope cryoelectroapplication for treating acute gastrointestinal hemorrhage</i>	46
<i>Shifman M. I., Marchenko V. S. Neuromediator secretion in the central nervous system under conditions of hypothermia</i>	47
<i>Babiuchuk G. A. Review. Emirbekov E. Z., Lvova S. P. Mechanisms of biochemical changes at low body temperatures. — University of Rostov Publ. Co. — 1985. — 79 p.</i>	48

CHRONICLE	49
DEFENSE OF THESES	51

НА ПУТЯХ УГЛУБЛЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ, ПОВЫШЕНИЯ ИХ ЭФФЕКТИВНОСТИ

XXVII съезд КПСС — историческое событие в жизни нашей партии, страны, всего прогрессивного человечества. В Политическом докладе, с которым выступил Генеральный секретарь ЦК КПСС М. С. Горбачев, глубоко проанализирована деятельность коммунистов и всего народа на современном этапе, намечены перспективы дальнейшего развития на ближайшие пять лет и до конца тысячелетия. Высший орган партии принял новую редакцию Программы, изменения в Уставе КПСС, утвердил Основные направления экономического и социального развития страны на 1986—1990 годы и на период до 2000 года. Июньский Пленум ЦК рассмотрел план двенадцатой пятилетки, сессия Верховного Совета СССР приняла закон о пятилетнем плане. В связи с Обращением ЦК КПСС начался новый этап во всенародном социалистическом соревновании за успешное выполнение грандиозных предназначений. Советские люди знают, что на основе неуклонного ускорения научно-технического прогресса, совершенствования общественных отношений, углубления социалистической демократии будут осуществлены новые социально-экономические преобразования в стране, достигнут рост народного хозяйства, дальнейшее повышение благосостояния тружеников, они беззаветно верят в реальность планов партии, отдают свои силы и энергию на их осуществление.

В достижении социально-экономических сдвигов советской науке отводится значительная роль. Многочисленный отряд ее представителей призван внести свой весомый вклад в дело ускорения развития всех отраслей производства. На съезде отмечена инициатива парторганизации Украинской республики в деле создания межотраслевых научно-технических комплексов, инженерных центров. Делегат съезда Президент АН УССР академик Б. Е. Патон в своем выступлении подчеркивал необходимость переориентировать научные коллективы на новую, важную, решающую проблематику, перехода к подлинно интенсивному развитию науки, к широкомасштабному внедрению ее достижений в производство.

В борьбе за научно-технический прогресс важное место отводится биологической и медицинской наукам. Жизнь поставила перед работниками этих отраслей задачи по преодолению серьезных трудностей. На путях углубления фундаментальных исследований и ощутимой эффективности от внедрения открытий и предложений препятствиями становятся разобщенность в деятельности коллективов, зачастую мелкомасштабность. Отсутствие необходимой координации, распыление сил и средств приводит к дублированию и растягиванию сроков выполнения поставленных задач, проделанная работа, бывает, не способствует качественным изменениям в медицине, сельском хозяйстве, пищевой промышленности.

Институт проблем криобиологии и криомедицины (ИПКиК) АН УССР предложил объединить усилия различных учреждений и ведомств для скорейшего внедрения в народное хозяйство, медицинскую практику современных достижений в области исследований действия низких температур на клетки, ткани и организмы. Идея была одобрена в Академии наук УССР и внесена для рассмотрения Государственного комитета по науке и технике. Утверждена научно-техническая программа разработки и внедрения в различные отрасли народного хозяйства методов, тех-



нических средств и новых технологических процессов консервирования биологических объектов, лечения с применением холода. Создан координационный совет, головным ведомством по обеспечению комплексного и своевременного выполнения заданий программы назначена Академия наук СССР, головным научным учреждением — Институт проблем криобиологии и криомедицины.

Предложенной многими научными учреждениями научной программой предусмотрены фундаментальные исследования по изучению механизмов криоповреждения и криозащиты биологических систем различных уровней организации, по разработке теоретических основ низкотемпературного консервирования, созданию научных предпосылок направленного синтеза криопротекторов с заданными свойствами. Намечается внедрение научно обоснованных технологических процессов криоконсервирования и долгосрочного хранения биологических объектов, используемых в народном хозяйстве, разработка научных принципов системы низкотемпературных банков на предприятиях различных министерств и ведомств, подготовка и внедрение научно обоснованных методов применения холода в комплексной терапии патологических состояний, хирургии, консервации репродуктивных клеток. Готовятся разработки и рекомендации для изготовления аппаратуры и оборудования по обеспечению широкомасштабного внедрения технологических процессов консервации и лиофилизации.

Огромные и ответственные задачи стоят перед коллективами, включившимися в решение большого круга жизненно важных вопросов.

Энергичнее осуществлять поворот науки к нуждам народного хозяйства — это требование дня, важнейшее условие перестройки деятельности в целях повышения эффективности, во имя созидания. В планах подразделений должны быть предусмотрены конкретные дела каждого сотрудника, оптимальные сроки выполнения производственных заданий. Кропотливая индивидуальная работа с кадрами, постоянная забота о воспитании чувства ответственности за порученное дело — в этом залог успехов перестройки и ускорения.

Необходимо наладить самые тесные связи между учреждениями, отделами и лабораториями, между конструкторскими бюро институтов. Широкая информация по вопросам планирования, сообщения о поисках методик работы, о достижениях в исследованиях, встречи для обмена опытом и внедрений передового, прогрессивного должны занять важное место в решении новых проблем.

Для каждого трудового звена в этих условиях возникает совершенно новый подход к поиску: конечной целью исследования является внедрение в практику, достижение экономического эффекта, вклад в дело укрепления могущества Родины, повышения благосостояния народа.

Г. Б. Сергеев, Б. М. Сергеев, В. А. Батюк, И. А. Громченко

ФОРМИРОВАНИЕ ЗАМОРОЖЕННЫХ ОБРАЗЦОВ И КИНЕТИКА РЕАКЦИЙ ПРИ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ

Успешное решение проблем, стоящих перед современной криобиологией, невозможно без повышения эффективности исследований в таких областях, как криобиохимия и криохимия. Именно установление закономерностей осуществления химических и биохимических процессов в широком температурном интервале, включающем низкие и сверхнизкие температуры, позволит глубже понять механизмы воздействия холода на биологические объекты и на этой основе оптимизировать условия их криоконсервации.

Предметом изучения одного из разделов химии низких температур являются структурно-химические превращения в замороженных многокомпонентных гетерофазных системах. Речь идет о химических или биохимических реакциях, осуществляющихся в условиях изменения физико-химических свойств среды реакции и кристаллизации компонентов смеси при замораживании и охлаждении до температуры опыта. В результате исследований [3, 5] установлено, что скорости или константы скоростей относительно простых модельных реакций чувствительны к изменениям фазового состояния и физико-химических свойств замораживаемой системы и могут быть использованы в качестве кинетического зонда при изучении структурно-химического состояния более сложных объектов, представляющих интерес для криобиологии.

Активация процессов в замороженных системах в присутствии растворимых и нерастворимых добавок. Необходимым условием осуществления химических и биохимических процессов является наличие достаточной молекулярной подвижности, которая в замороженных многокомпонентных системах обеспечивается фазовой неоднородностью, т. е. сосуществованием в широком температурном интервале ниже точки плавления растворителя твердой и жидкой фаз [3]. Существование равновесной жидкой фазы обусловлено понижением температуры плавления растворителя или эвтектики в присутствии растворенных веществ, роль которых могут играть реагенты. Наличие растворимых микропримесей не исчерпывает всех причин существования жидкой фазы в замороженных системах. Происходящее вблизи поверхностей раздела фаз изменение структуры воды препятствует ее кристаллизации вплоть до весьма низких температур [8]. Поэтому присутствие нерастворимых частиц увеличивает содержание жидкой фазы в замороженных образцах. Экспериментально показано, что реакции, заторможенные при замораживании вследствие недостатка воды как реагента или как растворителя, могут быть заметно ускорены введением в замораживаемый раствор добавок [4]. На рис. 1, 2 приведены результаты, полученные при изучении гидролиза *n*-нитрофенилацетата (*n*-НФА) в замороженных водных растворах солей и суспензиях силикагеля соответственно. Видно, что в обоих случаях увеличение содержания добавки ускоряет реакцию. Основную причину увеличения скорости мы видим в том, что при температурах как выше, так и ниже температур плавления эвтектик объем жидкой фазы (реакционной среды) растет пропорционально концентрации растворимой или нерастворимой добавки, препятствуя кристаллизации реагентов в ходе формирования образца и способствуя тем самым сохранению их в реакционноспособном растворимом состоянии.

С практической точки зрения отношение к активации реакций в замороженных системах может быть двояким. Так, если необходимо обеспечить осуществление тех или иных процессов несмотря на замораживание, простейшее решение заключается во внесении в замораживаемый образец инерт-

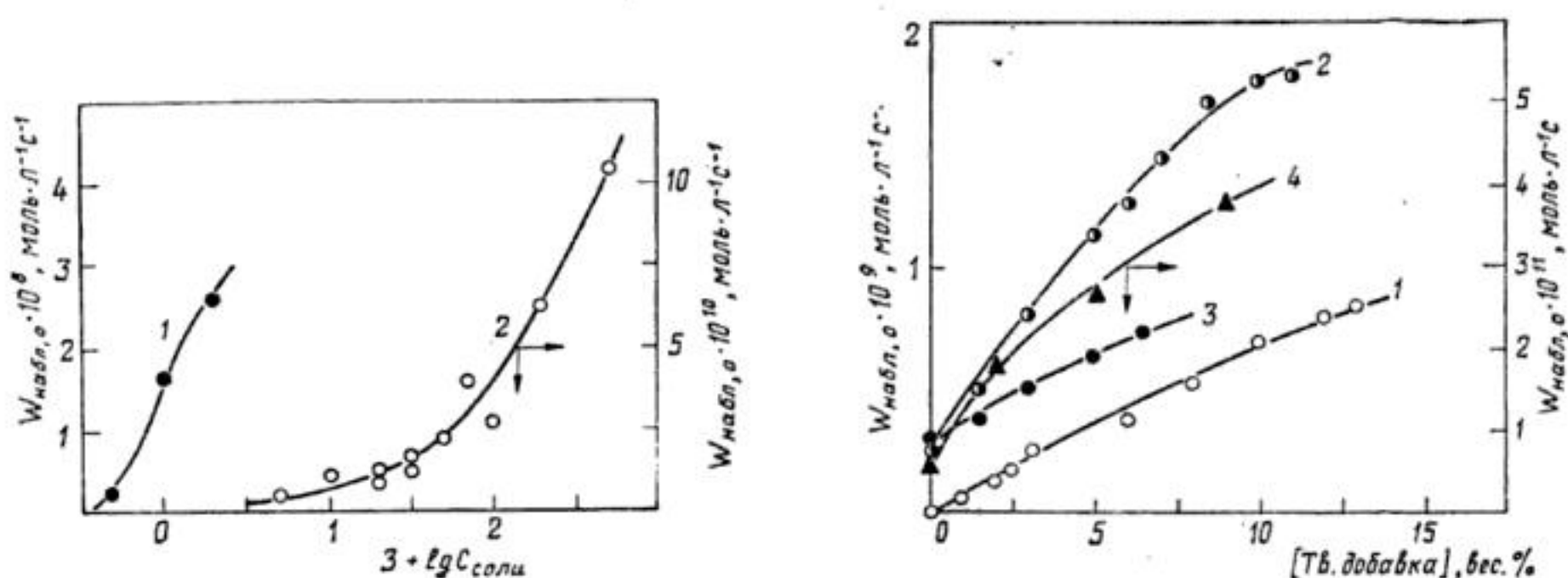


Рис. 1. Зависимость наблюдаемой начальной скорости гидролиза *n*-НФА в замороженных водных растворах от концентрации KF при 267 К (1) и $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ при 264 К (2). $[\text{n-НФА}]_0 = 5 \cdot 10^{-5}$ моль · л⁻¹ (1) и $5 \cdot 10^{-6}$ моль · л⁻¹ (2).

Рис. 2. Зависимость наблюдаемой начальной скорости гидролиза *n*-НФА от содержания силикагеля (1—3) и целлюлозы (4) в замораживаемых растворах Na_2HPO_4 (1, 4), NaF (2) и $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (3). $T = 268,5$ К; $[\text{Na}_2\text{HPO}_4] = 1,45$ %; $[\text{NaF}] = 1,96$ %; $[\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7] = 1,03$ %; $[\text{n-НФА}]_0 = 2 \cdot 10^{-4}$ моль · л⁻¹.

ных в отношении реакции растворимых или нерастворимых добавок. Наоборот, если протекание реакций в замороженном образце нежелательно, необходимо избегать присутствия в нем балластных примесей либо использовать более глубокое охлаждение.

Влияние температуры выдерживания на скорость процессов в замороженных многокомпонентных системах. Наибольшую опасность с точки

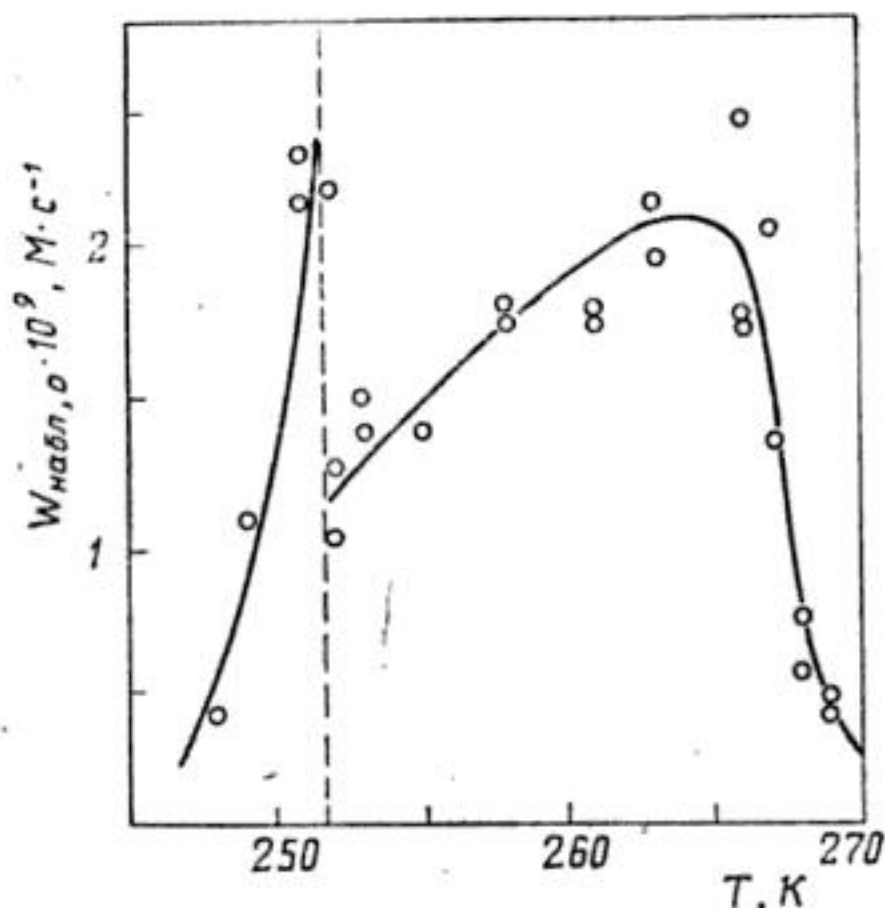


Рис. 3. Температурная зависимость наблюдаемой начальной скорости гидролиза *n*-НФА в замороженных растворах KF. $[\text{n-НФА}]_0 = 5 \cdot 10^{-5}$ моль · л⁻¹; $[\text{KF}] = 1$ моль · л⁻¹; $[\text{NH}_2\text{OH}] = 2,5 \times 10^{-5}$ моль · л⁻¹.

n-НФА и гидроксиламина, ускоряющее реакцию при $T < T_{\text{эвт}}$. Дальнейшее охлаждение тормозит гидролиз.

Влияние скорости охлаждения и особенностей перехода системы к новому низкотемпературному равновесному состоянию на кинетику реакций. Изменение фазового состояния реакционной смеси при замораживании

зрения осуществления нежелательных процессов представляют области, лежащие между температурами плавления чистого растворителя и эвтектики, а также непосредственно примыкающие к $T_{\text{эвт}}$. В качестве иллюстрации на рис. 3 приведен график температурной зависимости наблюдаемой начальной скорости гидролиза *n*-НФА в замороженном растворе KF, содержащем катализатор реакции — гидроксиламин. В условиях опыта концентрация соли (1 моль · л⁻¹) была меньше эвтектической. Образованию эвтектики предшествовали кристаллизация воды и обогащение жидкой фазы KF, субстратом и катализатором, являющееся причиной расположенного вблизи 266 К, т. е. при $T > T_{\text{эвт}}$, максимума на зависимости $W_{\text{набл.}}$ от T . Последующее образование эвтектики при ~ 252 К вызывает дополнительное концентрирование

и охлаждении до температуры опыта может осуществляться в одном временном масштабе с химическим или биохимическим превращением. Поэтому, чем быстрее достигает образец нового равновесного или метастабильного фазового состояния, тем ближе его химический состав к исходному. При этом возможность сохранить исходный состав зависит не только от скорости охлаждения, но и от скоростей химических превращений. Изучение модельных реакций в замороженных системах позволяет оценить как глубину протекания химического процесса на различных этапах приготовления образца, так и продолжительность этих этапов, т. е. охарактеризовать кинетику изменения структурно-фазового состояния системы. При исследовании гидролиза *n*-НФА в замороженных водных растворах солей, в частности, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, установлено, что в образцах, замороженных со скоростью $\sim 7 \text{ K} \cdot \text{мин}^{-1}$ в течение первых 2—5 ч (в зависимости от температуры опыта в интервале 260—270 K), реакция идет относительно быстро, затем резко замедляется [5]. Существование начального, «быстрого» участка на кинетических кривых связано, по-видимому, с протеканием реакции во время медленного установления в системе фазового равновесия. Увеличение скорости охлаждения образцов с $\sim 7 \text{ K} \cdot \text{мин}^{-1}$ (замораживание в криостате, имеющем температуру опыта) до $\sim 100 \text{ K} \cdot \text{мин}^{-1}$ (охлаждение в жидком азоте) практически не влияло на вид начальных, «быстрых» участков, показывая, что изменение скорости охлаждения в указанных пределах не влияет на подход системы к равновесному или квазиравновесному состоянию.

Структурно-фазовые перестройки, заключающиеся в кристаллизации растворителя, реагентов или эвтектик, могут происходить в течение нескольких часов (как в случае $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) либо завершаться за несколько минут. Например, в замороженных растворах KF, содержащих NH_2OH , почти стократное замедление гидролиза *n*-НФА наступает спустя ~ 15 мин с начала реакции и связано, по-видимому, с завершением кристаллизации части субстрата в замороженных и охлажденных до 267 K образцах.

Таким образом, высокая чувствительность кинетических параметров модельных реакций к изменениям фазового состояния образца позволяет рекомендовать кинетический метод для оценки структурно-химических изменений сложных многокомпонентных гетерогенных систем в ходе замораживания, охлаждения и выдерживания при низких температурах.

Изменение физико-химических свойств среды при понижении температуры и кинетика реакций при низких температурах. Формирование замороженного образца сопровождается изменением физико-химических свойств среды, влияющих на скорости химических или биохимических реакций. Зависимость от температуры величин диэлектрической проницаемости, вязкости, pH и др. приводит, в частности, к тому, что определяемая экспериментально из графиков в аррениусовских координатах энергия активации перестает характеризовать истинный энергетический барьер реакции и превращается в эмпирический параметр, зависящий от условий опыта. Это, с одной стороны, затрудняет анализ кинетических данных, а с другой, — ограничивает возможность предсказывать поведение реагирующей системы в широком диапазоне внешних условий, в том числе при низких температурах. Для решения этих проблем в [6] предложен метод оценки вкладов температурных изменений различных физико-химических свойств среды (*i*) в экспериментально определяемую величину энергии активации ($E_{\text{эксп}}$):

$$E_{\text{эксп}} = E_0 - 2,3R \frac{\partial \lg k_{\text{эксп}}}{\partial i} \cdot \frac{\partial i}{\partial (1/T)}, \quad (1)$$

где E_0 — значение изопараметрической энергии активации. Существо предложенного метода, согласно (1), заключается в том, что для корректного учета влияния температуры на $E_{\text{эксп}}$ необходимо знать температурную зависимость свойств среды $\partial i / \partial (1/T)$ и их влияние на константу скорости $\partial \lg k_{\text{эксп}} / \partial i$. Появление в выражении для $E_{\text{эксп}}$ помимо E_0 дополнительного слагаемого приводит к тому, что $E_{\text{эксп}}$ оказывается либо больше, либо меньше E_0 , в частности, в некоторых случаях может наблюдаться явление отрица-

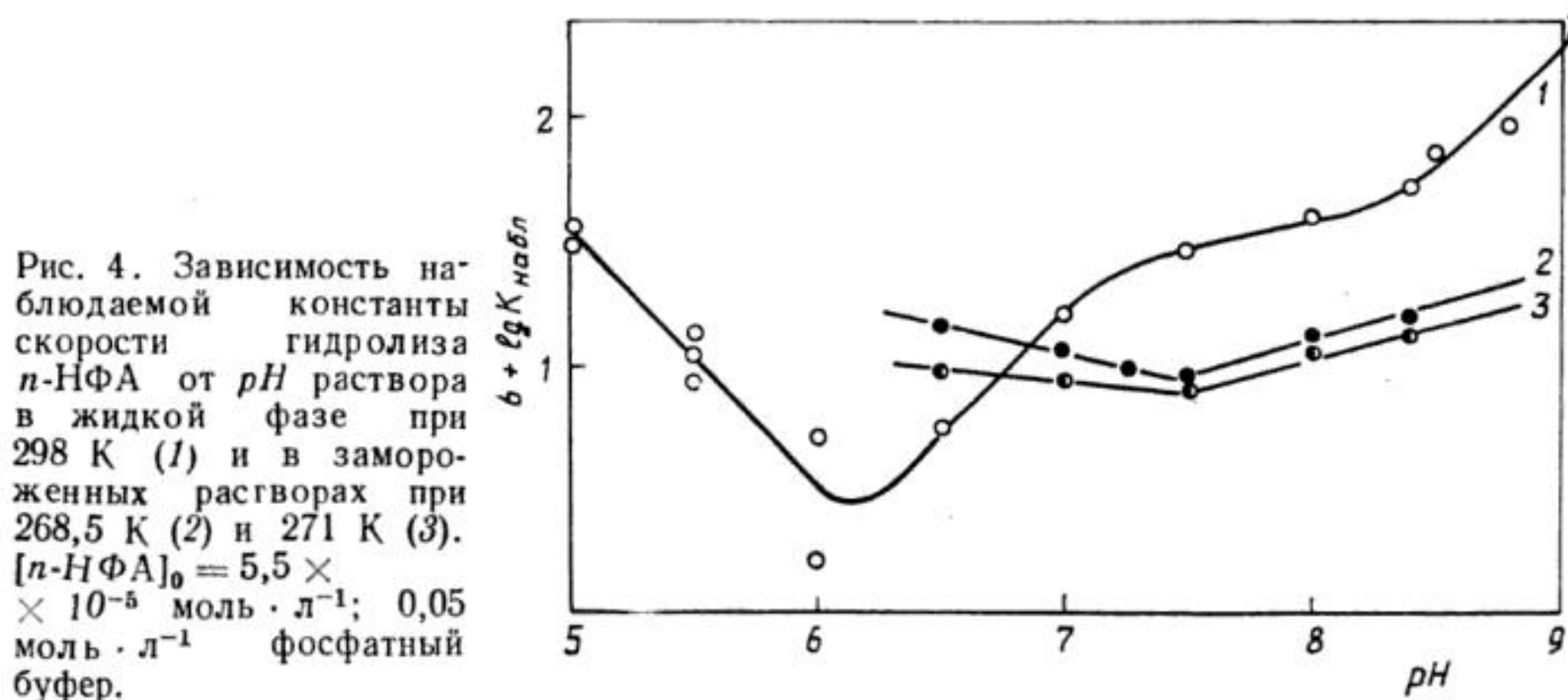
тельного температурного коэффициента, т. е. рост скорости с понижением температуры. Так, на примере окисления 2-метил-3-анилинометил-1,4-нафтохинол-1-диметилфосфата периодатом калия показано, что сильная зависимость константы скорости от полярности среды и рост ϵ с понижением температуры приводят к тому, что $E_{\text{эксп}}$ оказывается отрицательной и составляет $-4,2 \pm 0,9$ кДж $\cdot$ моль $^{-1}$. Для этой реакции величина вклада, связанного с температурой зависимостью ϵ , равна 86,2 кДж $\cdot$ моль $^{-1}$ и значительно превышает вклады, обусловленные изменениями других физико-химических свойств с температурой. По нашему мнению, различия энергий активации элементарных стадий биохимических процессов, а также явление отрицательного температурного коэффициента, связанное с механизмом процесса либо с влиянием среды, серьезно ограничивают широкое и универсальное использование гипотермии в медико-биологической практике. Дело в том, что при наличии указанных обстоятельств охлаждение ниже некоторой критической температуры в общем случае должно приводить к необратимому нарушению присущей живому организму взаимной согласованности скоростей биохимических процессов.

Анализ температурных зависимостей величины pH буферных систем [1] позволяет объяснить различия $E_{\text{эксп}}$ одной и той же реакции, определенных в различных условиях. Так, для гидролиза n -НФА в HCl -трис-буферном растворе $E_{\text{эксп}}$ составляет 13 кДж $\cdot$ моль $^{-1}$, а в фосфатном — 57 кДж $\times$ $\times$ моль $^{-1}$. Известно, что величина pH HCl -трис-буфера существенно сдвигается с изменением температуры, так что $\frac{\partial pH}{\partial (1/T)} \approx 2,3 \cdot 10^3$ ед $\cdot pH \cdot K$, значение же pH фосфатного буферного раствора слабо зависит от температуры. Поэтому, если для гидролиза n -НФА в фосфатном буфере вкладом величины $2,3R \frac{\partial \lg k_{\text{эксп}}}{\partial pH} \cdot \frac{\partial pH}{\partial (1/T)}$ в $E_{\text{эксп}}$ можно пренебречь, то для HCl -трис-буфера учет приводит к тому, что рассчитанная величина E_0 оказывается равной 45 кДж $\cdot$ моль $^{-1}$, т. е. приближается к значению, определенному в фосфатном буфере в условиях практического постоянства pH . Таким образом, различие значений $E_{\text{эксп}}$ в HCl -трис- и фосфатном буферных растворах в первую очередь обусловлено различной температурной зависимостью pH среды, связанной с различиями энтальпий ионизации фосфорной кислоты и HCl -трис-буфера, а не различиями механизмов реакции.

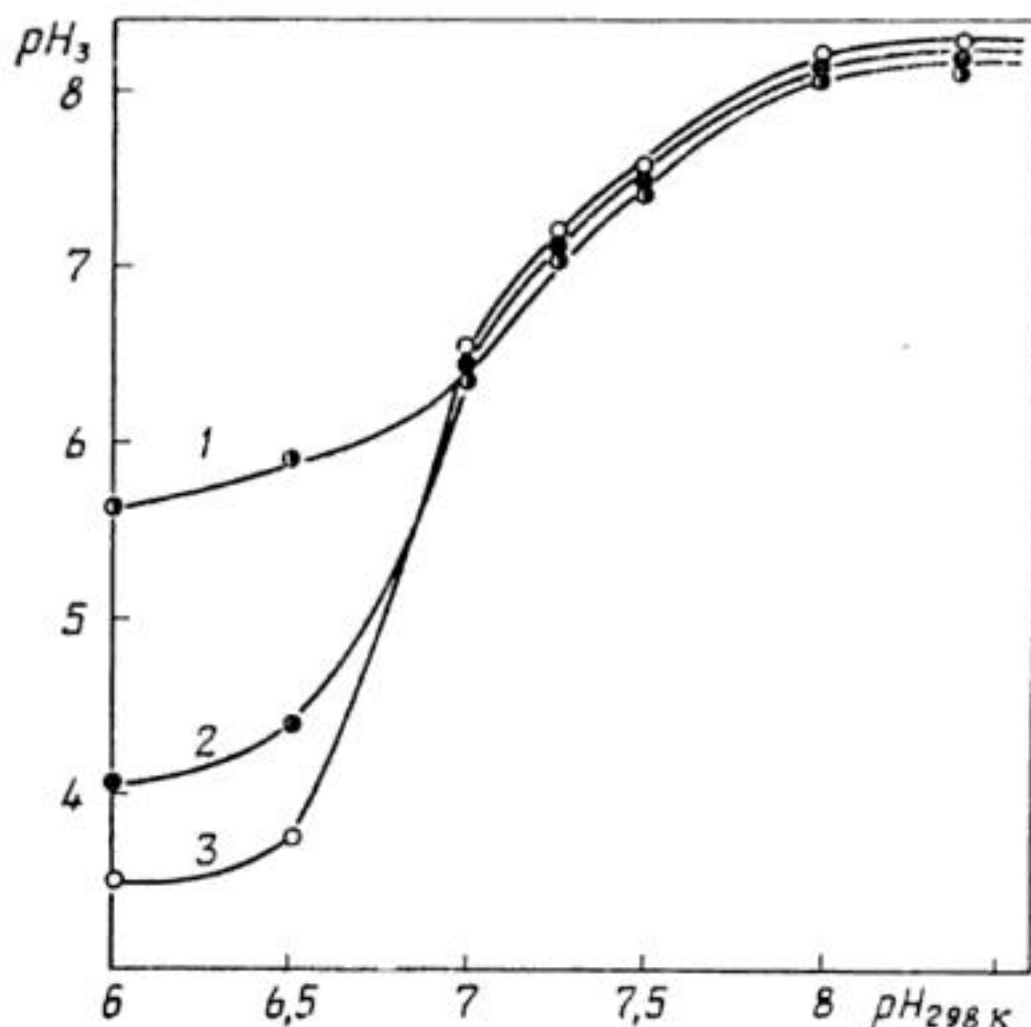
Приведенные примеры показывают, каким образом с помощью уравнения (1) можно оценить вклады температурных изменений величин ϵ и pH среды в $E_{\text{эксп}}$ и рассчитать изопараметрические значения E_0 , необходимые для установления механизма процесса и оптимизации условий его осуществления. Аналогично можно учесть влияние на скорость реакции температурных изменений других физико-химических свойств среды, например, вязкости, что важно, в частности, для реакций в биомембранах.

Замораживание системы сопровождается резким или скачкообразным изменением ее физико-химических свойств. Это связано с появлением новой фазы или фаз и распределением компонентов между ними. Для замороженных растворов характерно концентрирование ограниченно растворимых во льду веществ в незамерзающей жидкой фазе. В тех случаях, когда от концентраций этих веществ зависят влияющие на скорость процесса физико-химические свойства, например, ϵ , pH , ионная сила, вязкость и др., анализ кинетических данных с помощью уравнения (1) оказывается недостаточным, и возникает необходимость определения концентраций интересующих нас компонентов в различных областях замороженной системы. Оценить изменения свойств среды при замораживании позволяет изучение модельных реакций, чьи кинетические параметры являются чувствительными функциями этих свойств. В качестве примера остановимся на кинетическом методе определения pH жидкой фазы, сосуществующей со льдом в замороженных водно-солевых растворах. В жидкой фазе такой метод pH -метрии является одним из наиболее точных [9]. В работах [10, 11] показано, что изменение pH буферных растворов при замораживании свя-

зано с кристаллизацией их компонентов. Для буферных растворов, используемых в нейтральной, слабокислой или слабощелочной области, например, фосфатного, в качестве модельной тест-реакции выбран гидролиз *n*-НФА [7]. На рис. 4 (кривая 1) приведен график зависимости логарифма наблюдаемой константы скорости гидролиза от *pH* фосфатного буфера (0,05 моль · л⁻¹



K_2HPO_4 : 0,05 моль · л⁻¹ NaH_2PO_4) при 298 К. Наличие двух восходящих ветвей и точки минимума связано с кислотно-основным катализом выбранной реакции [2]. Видно, что минимальное значение константы в жидкой фазе при 298 К наблюдается при *pH* = 6,2. Кривые 2 и 3 представляют собой графики *pH*-зависимостей $\lg k_{\text{набл}}$ в замороженных растворах при 268,5 и 271,0 К. Видно, что при этих температурах $k_{\text{набл}}$ проходит через минимум при значениях *pH* исходных замораживаемых растворов близких к 7,5. Расчет, выполненный в [7] с использованием данных по кинетике реакции в жидкой фазе и значений энтальпий ионизации фосфорной кислоты, показывает, что точки минимумов *pH*-зависимостей $k_{\text{набл}}$ при 268,5 и 271,0 К должны лежать при *pH* 5,6 и 5,8 соответственно, т. е. понижение температуры должно вызывать незначительный сдвиг в кислую область по сравнению с жидкой фазой при 298 К. Наблюдаемый в эксперименте сдвиг минимума на ~ 1,5 ед. *pH* объяснен кристаллизацией Na_2HPO_4 в ходе формирования образца и влиянием на величину *pH* роста ионной силы. Опыты по охлаждению и замораживанию фосфатного буферного раствора подтвердили предположение о кристаллизации его щелочного компонента [7] и закислении среды реакции. В результате для того, чтобы создать в жидкой фазе замороженной при 268,5 К — 271,0 К системы кислотность, соответствующую *pH* 5,6—5,8, необходимо замораживать растворы, содержащие избыток щелочного компонента буфера и имеющие при 298 К *pH* ≈ 7,5. Близкие



результаты получены при определении состава жидкой фазы, присутствующей в замороженных фосфатных буферных растворах, расчетным путем. При расчетах использованы температурные зависимости растворимостей фосфорнокислых солей, уравнения материального баланса по ионам, присутствующим в растворе до и после замораживания, условия электронейтральности, а также температурные зависимости ионного произведения воды. На рис. 5 приведен график зависимости величины pH раствора, сосуществующего с твердой фазой при 271,0; 268,5 и 267,0 К, от исходного значения pH 0,05 моль $\cdot$ л⁻¹ фосфатного буфера. Видно, что замораживание не приводит к заметным сдвигам pH щелочных растворов, в то время как нейтральные и слабокислые заметно закисляются.

Таким образом, в работе показано, что в гетерофазных системах при низких температурах реакции и формирование замороженных образцов в общем случае не разделены во времени, а осуществляются одновременно. По этой причине изучение динамики изменения химического состава замороженного образца кинетическими методами является одним из наиболее информативных способов анализа структурно-фазовых перестроек как модельных, так и биологических систем под воздействием низких температур.

1. Бейтс Р. Определение pH . Теория и практика.— М. : Химия, 1972.— 398 с.
2. Дженкс В. П. Катализ в химии и энзимологии.— М. : Мир, 1972.— 468 с.
3. Сергеев Г. Б., Батюк В. А. Кримохимия.— М. : Химия, 1978.— 296 с.
4. Сергеев Г. Б., Сергеев Б. М., Калнина И. А. Каталитическое действие солей на гидролиз p -нитрофенилацетата в замороженных водных растворах // Кинетика и катализ.— 1985.— 26, № 5.— С. 1063—1068.
5. Сергеев Г. Б., Сергеев Б. М., Калнина И. А. Гидролиз p -нитрофенилацетата в водно-солевых системах, способных к образованию эвтектик // Журн. физ. химии.— 1984.— 56, № 10.— С. 2431—2434.
6. Сергеев Г. Б., Батюк В. А., Сергеев Б. М. Влияние температур на экспериментальные энергии активации // Докл. АН СССР.— 1975.— 224, № 2.— С. 387—390.
7. Сергеев Г. Б., Сергеев Б. М., Калнина И. А., Батюк В. А. Изменение pH среды при замораживании и кинетика кислотно-основного гидролиза p -нитрофенилацетата в замороженных растворах // Кинетика и катализ.— 1983.— 24, № 2.— С. 341—346.
8. Ушакова Л. А., Квливидзе В. И., Склянкин А. А. О возможности существования квазижидкой пленки на поверхности ледяных кристаллов при отрицательных температурах // Связанная вода в дисперсных системах. Вып. 1.— М. : Изд-во Моск. ун-та, 1970.— С. 155—166.
9. Швабе К. К. Основы техники измерения pH .— М. : ИЛ, 1962.— 471 с.
10. Orie Y., Morita M. Measurement of pH of frozen buffer solutions by using pH indicators // J. Biochem.— 1977.— 81, N 1.— p. 163—168.
11. Williams-Smith D. L., Bray R. C., Barber M. Y. et al. Changes in apparent pH on freezing aqueous buffer solutions and their relevance to biochemical electron-paramagnetic — resonance spectroscopy // Biochem. J.— 1977.— 81, N 1.— P. 593—600.

Московский государственный
ун-т им. М. В. Ломоносова

Поступила 11.03.86

УДК 576.593.17

Л. К. Лозина-Лозинский, З. И. Успенская

СИСТЕМНОЕ НАПРАВЛЕНИЕ В КРИОБИОЛОГИИ

В современной криобиологии все более расширяются фундаментальные исследования, однако преобладают эмпирические материалы и методические публикации. Накопленные данные еще не позволили выдвинуть какую-либо одну общую теорию повреждения и устойчивости в криобиологии, но их уже достаточно, чтобы близко подойти к объяснению явлений, протекающих в цикле: охлаждение-замораживание-отогревание.

Мы не раз подчеркивали множественность факторов, вызывающих криоповреждения и определяющих холодоустойчивость клеток и организмов [4]. В настоящей статье сделана попытка выделить те вопросы

и явления в общей проблеме криоповреждений, которые имеют непосредственное отношение к теоретическим основам криобиологии. Помимо исследования частных вопросов криобиологии, следует уделить внимание изучению взаимодействия внутренних и внешних факторов в упомянутом цикле, который состоит из неразрывно связанных между собой этапов. К этому нужно добавить изучение состояния живой системы в условиях той среды, в которой она находилась до и после завершения цикла. Как известно, на каждом из этапов происходят специфические процессы, образующие целостную систему явлений. Ввиду множественности факторов, вызывающих криоповреждения, следует искать те исходные и ведущие причины, от которых в конечном итоге зависит состояние клетки. Для этого необходимо, хотя бы кратко, проанализировать значение наиболее известных криоповреждений и вызывающих их внешних условий.

Одной из наиболее важных причин криоповреждения считают образование внутриклеточного льда, нарушающего тонкую структуру клетки. Подтверждением этого положения служат, во-первых, преимущественная гибель в случае внутриклеточного образования льда, во-вторых, сохранение жизнеспособности клетки после быстрого и сверхбыстрого охлаждения, когда вода переходит в твердое аморфное состояние (витрификация) или происходит образование субмикроскопических кристаллов льда, не нарушающих структуру цитоплазмы. К другой существенной причине криоповреждений относят дегидратацию клеток и тканей организма, возникающую в результате вымерзания воды и ее выхода из клетки. С этими процессами связаны изменение объема клетки и ее деформация, повышение осмотического давления и образование токсических концентраций солей, то есть явления, известные под обобщающим названием «эффекта раствора».

Устойчивость клеток к процессу замерзания зависит от степени дегидратации и от количества замерзающей воды в клетке, которое определяется соотношением связанной и свободной воды. Это состояние обусловлено гидрофобностью и гидрофильностью макромолекулярных соединений, вязкостью протоплазмы и характеризуется реакциями клеток второго этапа цикла, то есть во время замораживания. Многие исследователи считают, что повреждение биохимических структур в основном происходит не в процессе замерзания воды, а во время оттаивания и рекристаллизации, когда наблюдается рост кристаллов льда [3, 11].

Меньшее значение придается первому этапу — охлаждению с переохлаждением, когда не происходит образование льда. Большинство исследователей считает, что клетки и эктотермные организмы не страдают от переохлаждения. Тем не менее некоторые организмы и клетки чувствительны к температуре ниже 0°C, особенно на определенных стадиях развития, и быстрее погибают в переохлажденном состоянии, чем в замерзшем при одинаковой температуре среды. Это было экспериментально показано на дрожжах *Endomyces magnusii*.

В течение цикла охлаждение-замораживание-отогревание внутренние и внешние факторы, взаимодействуя, создают такое сложное сочетание условий для повреждения клеток, что практически возникают большие трудности в определении их причин. Более целесообразно на основе теоретических предпосылок и экспериментальных данных выделить те из причин, которые могут вызвать криоповреждения на всех этапах, начиная с охлаждения. Под системным направлением в криобиологии мы понимаем, во-первых, мультифакторность реакций клеток на низкие температуры [4], во-вторых, выделение основной биосистемы в клетке, ответственной за криоповреждения. Еще в начале века Н. А. Максимов, исследуя основные причины криоповреждения, указал на роль клеточных мембран тогда, когда их структура не была изучена [5]. Большинство криобиологов придает очень важное значение реакциям мембран при замораживании-оттаивании, но в качестве причин гибели клетки прежде всего ставят внешние причины, такие как дегидратация, повышение концентрации ионов в среде и внутриклеточное образование льда. Конечно, взаимодействие между всеми этими факторами

в итоге и решает судьбу клетки, но роль реакции мембран распространяется и на другие явления, возникающие при действии низких температур.

В. Я. Александров, изучая теплоустойчивость клеток, предложил гипотезу, согласно которой причина устойчивости и повреждения клеток при нагреве определяется конформационной гибкостью белковых макромолекул. Вместе с тем им не исключается влияние субоптимальных температур на состояние жирокислотных остатков липидов мембран и некоторых других факторов. О конформационной гибкости белков и нуклеиновых кислот автор судит по температуре плавления их макромолекул, т. е. по температуре денатурации, а в отношении жирных кислот — по степени их насыщенности. Трактовка проблемы холодоустойчивости, по сравнению с теплоустойчивостью, усложняется тем, что с понижением температуры происходят фазные изменения среды и структуры воды, а также снижение жизненных функций вплоть до их прекращения. Денатурационная теория повреждения не может служить основой для объяснения холодовых альтераций в живых системах, хотя явления денатурации белков и нуклеиновых кислот в разбавленных растворах при некоторых условиях охлаждения имеют место, например, при многократном повторении цикла замораживания-оттаивания [1, 3]. Максимальное количество денатурированного белка в растворе выявляется уже при его замораживании до -10°C , в клетке же такие условия не вызывают денатурации белковых макромолекул; клетки, как правило, переносят и значительно более сильное охлаждение и замораживание. В исследованиях, посвященных действию замораживания-оттаивания на ферменты и их комплексы, обнаружены различия криолабильности и стабильности их вне мембран и в составе клеток. Реакции различных ферментов на низкие температуры бывают прямо противоположными. Имеется подробный обзор этих вопросов [1], поэтому приведем лишь некоторые примеры и выводы. Активность Са-АТФазы саркоплазматического ретикулума закономерно возрастает при быстром замораживании (в жидком азоте) и сохраняется на этом уровне после хранения при -80°C в течение 40 дней, при медленном же замораживании до -20°C и хранении в течение 10 дней — инактивируется. Сходные явления показаны и для других мембранных ферментов. Скорость повреждения саркоплазматического ретикулума увеличивается при повышении концентрации хлористого натрия в среде замораживания, по-видимому, в связи с ростом кристаллов льда.

Роль инактивации ферментов в повреждении и гибели клеток при замораживании-оттаивании не столь велика, чтобы придавать ей существенное значение. Наблюдающиеся значения денатурации ферментных и других белков *in vitro* при медленном замораживании-оттаивании или при многократном повторении цикла не служат доказательством того, что такие необратимые явления вызываются и в живых клетках. Большинство ферментов, связанных в мембранах клеток, обладают большей структурной устойчивостью, чем вне клетки. Таким образом, денатурация ферментных белков является в значительной степени следствием криоповреждения мембран, а не причиной гибели клеток при замораживании. Об этом свидетельствуют эксперименты, в которых важную роль в выживаемости клеток играет дегидратация и «эффект раствора». Относительно медленное замораживание (например $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$), с одной стороны, понижая содержание воды внутри клетки, повышает ее устойчивость, с другой — повышает концентрацию солей, инактивирующих ферменты, которые из-за нарушения проницаемости мембран выходят из клетки.

Согласно денатурационной теории повреждения Насонова и Александрова [6], денатурация макромолекулярных соединений наступает при самых разнообразных внешних воздействиях и, будучи неспецифической реакцией, является основной причиной клеточных повреждений (альтераций). Однако причиной необратимых повреждений организма и клетки может быть специфическая реакция организма, как целого, которая вызывает неспецифические изменения в органеллах клетки. Приспособленность и, следовательно, устойчивость организмов к внешним факторам определяется в про-

цессе эволюции и онтогенеза прежде всего на организменно-популяционном уровне. Под влиянием нарушения биологических функций организма, скорость которых зависит от температуры, происходят изменения на молекулярном уровне.

Одной из задач криобиологии является получение ответа на вопрос: на каком уровне биологической системы возникают первичные нарушения под влиянием низких температур? Нам представляется, что ответить на него можно, лишь изучая реакции живого организма и сравнивая их с процессами, происходящими на молекулярном уровне. В пользу денатурационной теории повреждения говорит относительная ее универсальность — неспецифичность реакции белков на внешние воздействия. Однако сходство описываемых явлений не всегда свидетельствует об однородности причин, их вызывающих. Например, при охлаждении инфузорий *Paramecium caudatum* до сильного переохлаждения (-17°C) в определенной точке температурной шкалы наблюдается излом на кривой жизнеспособности, характеризующий ускорение их гибели. То же наблюдается при нагревании парамеций в зоне, критической для выживания. Все повреждения, полученные в области температур излома кривой жизнеспособности, оказываются обратимыми [4]. Исходя из предположения, что в зоне излома происходит денатурация белков, коэффициент которой (Q_{10}) очень высок, можно было бы заключить, что причины гибели клеток при переохлаждении и нагреве одинаковы и обусловлены денатурацией макромолекул белков. Однако экспериментально это подтвердить не удалось, а высокие значения Q_{10} встречаются при самых разнообразных биологических и физико-химических процессах. Экспериментальные наблюдения свидетельствуют о том, что в случае снижения температуры происходит набухание и увеличение объема клетки и затем их лизис (у инфузорий), а при нагреве — коагуляция цитоплазмы с последующим разрушением. При замерзании и переохлаждении тканей набухание мало заметно, так как этому препятствуют окружающие клетки. Судя по изменению объема клетки при охлаждении, можно предположить, что повреждения происходят в мембранах, а не непосредственно в макромолекулярных соединениях. В пользу мембранной теории холодовых повреждений говорят и многие другие прямые и косвенные данные, объясняющие мультифакторность криоповреждений. Роль клеточных мембран в криоповреждениях подробно рассматривалась многими исследователями [2, 11]. Исходя из данных, приводимых этими авторами, можно прийти к некоторым выводам. Денатурация при замораживании вызывается дегидратацией, которая может повредить клеточные мембраны, но поскольку одновременная частичная и даже значительная потеря воды клетками является не только повреждающим фактором, а и важнейшей защитой во время замораживания, то, следовательно, причина разрушения клеток связана не с денатурацией при дегидратации. Этому не противоречит тот факт, что некоторые чувствительные к низкой температуре клетки, например сперматозоиды млекопитающих, не переносят замораживания без криопротекторов и замораживания при относительно медленном охлаждении, когда происходит повреждение мембраны по электронномикроскопическим данным [1].

Нередко гибель клеток при быстром охлаждении наступает без замораживания и дегидратации и ее объясняют температурным (холодовым) шоком, при котором отмечены нарушения в структуре липидов и белков клеточных мембран [9]. В настоящее время доказано, что сильное охлаждение вызывает значительные изменения молекулярной структуры липидов, а также обратимые (или необратимые) конформационные нарушения мембранных белков [2]. В области положительных температур ниже оптимума жизнедеятельности происходит сенсбилизация мембран к температурам ниже нуля [1]. Эти свойства мембран подтверждают, что возникновение различных криоповреждений клетки обязано прежде всего изменениям в структуре и проницаемости мембран на всех этапах цикла охлаждения-замораживания-отогревания. В качестве примера нарушения проницаемости мембраны при переохлаждении можно привести наблюдаемое с помощью люминесцент-

ной микроскопии обесцвечивание хлоропластов эвглен (*Euglena gracilis*) без снижения их жизнеспособности. Выход хлорофилла и других пигментов, так же как солей и белков, после охлаждения и таяния происходит под влиянием различных факторов.

Помимо изменения проницаемости и структуры мембран в процессе замораживания нарушается не только ферментативная активность клеток, но теряется способность к синтезу ряда веществ (например, у растений способность к синтезу АТФ из АДФ и фосфатов на свету). Проницаемостью мембран для воды можно объяснить многие причины повреждения при низких температурах тканевых клеток и одноклеточных организмов. Большая проницаемость для воды «выгодна» тем клеткам, которые хорошо переносят дегидратацию, а благодаря этому — сильное охлаждение и замерзание. Исходя из этого, можно программировать условия криоконсервации. Например, коэффициент проницаемости для воды у эритроцитов в 10 раз выше, чем у пресноводных инфузорий, и в 100 раз выше, чем у амёб. Видимо, в связи со слабой проницаемостью внешней мембраны все попытки криоконсервации амёб были безуспешны.

Как известно, при криоконсервации помимо глубины охлаждения первостепенное значение имеет скорость охлаждения и отогревания. При этом невозможно предложить определенный метод охлаждения и отогревания для оптимальной низкотемпературной консервации, так как разные организмы и типы клеток реагируют на скорость охлаждения-замораживания не одинаково. Показано, что большая скорость охлаждения ($100\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) до $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ одинаково повреждает эритроциты и дрожжи, но причины повреждений различны: эритроциты разрушаются под влиянием повышенной концентрации раствора, а дрожжи погибают от внутриклеточного образования льда. Известно, что у этих клеток совершенно различные мембраны, обладающие разной проницаемостью для воды, поэтому для успешной криоконсервации необходимо найти для каждой системы оптимальную скорость охлаждения. Имеются данные, что цисты инфузорий *Colpoda taupasi* выживают после быстрого замораживания до температуры жидкого азота, трофонты же этих инфузорий удастся криоконсервировать с применением криопротектора и при ином режиме замораживания [7]. Эти различия, вероятно, можно объяснить тем, что мембраны цист сильно отличаются от мембран инфузорий в активном состоянии.

Между тем, зная проницаемость внешних мембран для воды, можно вести поиски оптимальной скорости охлаждения и оттаивания более успешно. Скорость, при которой идет процесс кристаллизации воды внутри клеток, колеблется от $0,1$ до $1000\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ [11]. Чем больше скорость охлаждения, тем более вероятно образование внутриклеточного льда в клетках с невысокой проницаемостью мембран. При высокой скорости отогревания меньше страдают плазматические мембраны, так как их структура не успевает разрушиться под влиянием роста кристаллов льда, и вся система клетки не так подвергается изменению концентрации токсических солей и механическому давлению растущих пузырьков газа, освобождающегося при таянии льда. Наблюдаемое во многих случаях благоприятное действие медленного замораживания можно объяснить относительно слабой проницаемостью мембран для воды, которая, выходя из клетки при замерзании внеклеточной воды, вызывает дегидратацию протоплазмы и препятствует образованию кристаллов льда внутри клетки. В связи с этим приобрело широкое распространение открытое Асахоной поэтапное охлаждение: сначала медленное до -30°C , а затем быстрое — до самых низких температур. Следует заметить, что в период максимальной холодоустойчивости ряда организмов (цист покоя простейших, насекомых во время пика диапаузы) поэтапное охлаждение и замораживание не является необходимым для сохранения их жизнеспособности.

Преимущество медленного охлаждения должно сказываться при большой плотности клеточной мембраны (какой, например, обладают покоящиеся клетки). К сожалению, вопрос о влиянии скорости охлаждения и замора-

живания в зависимости от микроструктуры мембран по существу не изучался. Весьма возможно, что явление холодового шока связано именно с действием низких температур на микроструктуру мембран клеток. Большинство исследователей сходится в одном: высокая скорость оттаивания важнее режима охлаждения. Считается, что образование кристаллов льда вне и внутри клетки наносит меньший вред, чем процесс рекристаллизации при таянии. Однако это правило относится к большинству животных клеток и к одноклеточным организмам, но не к целым многоклеточным животным, например насекомым, которые переносят медленное отогревание при комнатной температуре.

Рапатц и соавторы [12], считая криповреждение клеток эритроцитов результатом нарушения структуры клеточных мембран, высказывают предположение, что мембраны находятся в разных состояниях в зависимости от температуры и присутствия солей и растворов других веществ. При быстром охлаждении эритроцитов их клеточные мембраны приходят в более устойчивое состояние, чем до замораживания. Этому не способствует медленное охлаждение даже в случае быстрого оттаивания. Отметим, что эритроциты весьма специфические клетки, и закономерности, полученные в экспериментах с ними, переносить на другие клетки следует с осторожностью.

Исходя из существенной роли в криповреждениях дегидратации клеток при внеклеточном образовании льда, вызывающей повышение концентрации электролитов, и, с другой стороны, кристаллизации воды внутри клетки, Мазур предложил двухфакторную гипотезу криповреждения [10], которая получила большое распространение среди исследователей, хотя она не объясняет, почему многие клетки погибают при внеклеточном образовании льда и медленном охлаждении. Вместе с тем Мазур присоединяется к мнению большинства авторов, подчеркивая, что между свойствами мембран и реакцией клеток на замораживание имеется тесная зависимость. Сама температура влияет на проницаемость клетки и определяет равновесие между дегидратацией и внутриклеточным образованием льда.

Гипотеза Меримена о криповреждении в связи с «минимальным клеточным объемом» также основана на повреждении мембран вследствие увеличения осмотического давления при повышении концентрации внеклеточного раствора в результате образования льда [11]. Причиной повреждения автор считает изменение объема (сжатие клетки), а не действие концентрации электролитов, как полагают Левит и некоторые другие исследователи [8]. По-видимому, при внеклеточном образовании льда на клетку могут действовать разные факторы в зависимости от степени дегидратации, и далеко не всегда клетка изменяет свою конфигурацию, сохраняя объем, который она имела до замораживания. Таким образом, можно сказать, что проблема криповреждения сводится не к изучению повреждений клетки как таковой или изменений структуры белков, ферментов и других веществ, а к изучению нарушений, возникающих в клеточных мембранах.

Явления адаптации организмов к изменениям температуры среды также во многом зависят от свойств мембран клеток, но этот вопрос исследован недостаточно. Хорошо известно, что в процессе закаливания и подготовки к состоянию покоя в период понижения температуры среды структура клеточных мембран наружных покровов сильно изменяется, образуя плотные оболочки, часто непроницаемые для воды. Химическая структура мембран тоже меняется, поэтому экологическое значение их исключительно велико. Меньше изучены изменения в наружных и плазматических мембранах, происходящие во время кратковременных периодических и непериодических колебаний температуры, и их роль в онтогенезе. Между тем, устойчивость и повреждаемость организмов и клеток может резко меняться в течение жизни индивида, клона или штамма. В связи с этим при криоконсервации живых систем очень важно учитывать их состояние перед охлаждением и условия подготовки объекта к эксперименту. Обладая высокой способностью к восстановлению и самосборке, мембраны ответственны за реабилитацию клеток и репарацию повреждений после того, как они прошли цикл охлаждения-

замораживания-отогревания. На изучение этого периода необходимо обратить большее внимание, чем это было до сих пор [3].

Рассматривая холодоустойчивость и возникновение криповреждений как систему реакций клеток на температурные воздействия в течение всего цикла от охлаждения до отогревания, можно прийти к выводу о системном характере всех реакций на низкие температуры и их связи со структурой и функцией мембран. Холодоустойчивость многоклеточных организмов и происхождение криоанабиоза, будучи явлениями системного порядка, связаны с первичной и вторичной реакциями на организменном и видовом уровнях. Под первичной реакцией понимается устойчивость и лабильность физической макромолекулярной структуры соединений, входящих в состав первичных живых систем, которые и в настоящее время составляют основу живой материи. Благодаря устойчивости этих макромолекулярных соединений и межмолекулярных связей возможен анабиоз при самых низких температурах вплоть до абсолютного нуля. Вторичное реагирование связано с процессами, протекающими на более высоком уровне в связи с активной жизнедеятельностью в течение эволюции и онтогенетической адаптации. В этом участвуют системы как первичного происхождения, так и вторичного, а также весь комплекс биологических процессов и структур, подчиненных регуляторным механизмам. Эта область ответных реакций на низкие температуры в большей степени относится к проблемам экологии и физиологии и не входит в круг проблем, затронутых в представленной работе.

1. *Актуальные проблемы криобиологии* / Под ред. Н. С. Пушкаря. — Киев : Наук. думка, 1981. — 606 с.
2. Белоус А. М., Бондаренко В. А., Бондаренко Т. П. Молекулярные механизмы криповреждений биомембран // *Итоги науки и техники.* — ВИНТИ АН СССР. Сер. Биофизика. — 1978. — 9, — С. 80—113.
3. Лозина-Лозинский Л. К. *Очерки по криобиологии.* Л. : Наука, 1972. — 288 с.
4. Лозина-Лозинский Л. К. Общие вопросы криобиологии // *Криобиология.* — 1985. — № 1. — С. 13—19.
5. Максимов Н. А. О вымерзании и холодостойкости растений. — СПб., 1913. — С. 1—330.
6. Насонов Д. Н., Александров В. Я. Реакция живого вещества на внешние воздействия. — М.-Л., 1940. — 252 с.
7. Успенская З. И., Лозина-Лозинский Л. К. Устойчивость к замораживанию трофонтов *Colpoda* в присутствии полиэтиленоксида // *Цитология.* — 1981. — 22, № 9. — С. 1066—1072.
8. Mazur P., Leibo S. P., Chu E. H. Y. A two-factor hypothesis of freezing injury / *Exp. Cell. Res.* — 1972. — 71, N 2. — P. 342—355.
9. Lovelock J. E. Denaturation of lipid-protein complexes as a cause of damage by freezing // *Proc. Roy. Soc. (Biol.).* — 1957. — 147. — P. 427—433.
10. Mazur P., Leibo S. P., Chu E. H. Y. A two-factor hypothesis of freezing injury // *Exp. Cell. Res.* — 1972. — 71, N 2. — P. 342—355.
11. Meryman H. T. The exceeding of medium tolerable cell volume in hypertonic suspension as a cause of freezing injury // *The Frozen Cell.* — London, 1970. — P. 51—63.
12. Rapatz G., Luyet B., Mackenzie A. Effect of cooling and rewarming rates on glycerolated human erythrocytes // *Cryobiology.* — 1975. — 12, N 4. — P. 293—308.

Ин-т цитологии АН СССР,
г. Ленинград

Поступила 11.05.86

УДК 57.043 : 612.43

А. М. Утевский, В. А. Чуйко, Л. В. Беркало, В. А. Македонская

ЗАХВАТ И ОРГАНИФИКАЦИЯ ИОДИДОВ ПОСЛЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ДИМЕКСИДОМ

Важными этапами гормонообразования в щитовидной железе являются захват и последующая органификация иодидов. Учитывая различия в структурной и функциональной организации этих процессов, представляло

интерес исследовать их реакцию на замораживание, а также влияние на них криопротектора димексида.

Исследования выполнялись на щитовидных железах быка. Для определения захвата иодида (^{131}J) срезы тиреоидной паренхимы толщиной 1,5—2 мм, длиной 5—6 мм, шириной 3—4 мм инкубировались при 37 °С в среде, содержащей 0,037 МБк ^{131}J . Реакцию останавливали помещением срезов в охлажденный до 2 °С раствор Хенкса. Срезы для удаления адсорбированного на поверхности изотопа промывались средой инкубации. Для определения процесса органификации иодида к срезам щитовидной железы, помещенным в Кребс-Рингер бикарбонатный буфер с pH 7,4, добавляли 0,001 МБк ^{131}J . Инкубация с изотопом проводилась в течение 3 ч при 37 °С. Срезы промывали в буфере, добавляли 10 % трихлоруксусной кислоты, гомогенизировали в присутствии сыворотки крови быка и центрифугировали. Радиоактивность проб измерялась на счетчике Гамма (ВНР).

Данные экспериментов о влиянии замораживания на аккумуляцию иодидов представлены в таблице 1. Они свидетельствуют о пореждающем действии замораживания щитовидной железы до —196 °С на процесс захвата иодида. Использование с криозащитной целью 10 %-ного димексида не способствует сохранению исследуемой активности. Эффективным для этой цели является 5 %-ный димексид. Полученные в настоящем исследовании данные согласуются с результатами исследований, выполненных ранее на щитовидной железе человека [1]. Замораживание без криопротектора приводит к усилению в щитовидной железе процесса органификации иодида (табл. 2).

Под влиянием используемого фактора активность включения иодида в белки возрастает. При этом сохраняется чувствительность данного про-

Т а б л и ц а 1. Влияние замораживания и димексида на захват иодида щитовидной железой быка

Условия эксперимента	Захват ^{131}J имп/мин/мг ткани
Интактная ткань (контроль)	$0,238 \pm 0,011$
Замораживание	$0,106 \pm 0,005^*$
Инкубация с 5 %-ным димексидом	$0,185 \pm 0,014$
Инкубация с 10 %-ным димексидом	$0,245 \pm 0,021$
Замораживание (1—3 °С/мин) с 5 %-ным димексидом	$0,209 \pm 0,082$
Замораживание (1—3 °С/мин) с 10 %-ным димексидом	$0,109 \pm 0,005^*$

* — достоверно к контролю.

Т а б л и ц а 2. Влияние замораживания и димексида на органификацию иодида (% от стандарта) в щитовидной железе быка

Условия эксперимента	Базальная активность (контроль)	KJ 10^{-4} М	Мерказолил 10^{-3} М
Интактная ткань	$0,260 \pm 0,044$	$0,115 \pm 0,033^*$	$0,113 \pm 0,037^*$
Замораживание (1—3 °С/мин)	$1,102 \pm 0,230$	$0,322 \pm 0,121^*$	$0,253 \pm 0,106^*$
Инкубация с 10 %-ным димексидом	$0,164 \pm 0,034$	$0,054 \pm 0,005^*$	$0,050 \pm 0,004^*$
Замораживание (1—3 °С/мин) с 10 %-ным димексидом	$1,213 \pm 0,604$	$0,067 \pm 0,017^*$	$0,048 \pm 0,010^*$

* — достоверно к контролю.

цесса к ингибиторам KJ и мерказолилу. Использование при замораживании криопротектора димексида не устраняет стимулирующее действие замораживания, в то время как сам по себе 10 %-ный димексид не оказывает на исследуемый процесс выраженного влияния.

Хранение щитовидной железы при —196 °С в течение 6 месяцев и одного года (табл. 3) оказывает на процесс органификации стимулирующее влияние, которое, однако, менее выражено, чем при замораживании щитовидной железы, не сопровождающемся продолжительным ее хранением. Длительное хранение не приводит к утрате чувствительности исследуемой функции щитовидной железы к специфическим стимуляторам и ингибиторам. Таким образом, длительное хранение щитовидной железы при —196 °С не приносит существенных изменений в активность исследуемого процесса.

Т а б л и ц а 3. Органификация ^{131}J в срезах криоконсервированной щитовидной железы человека, хранившейся в низкотемпературном банке (% включения мг белка) $n = 7$

Условия эксперимента	Базальная активность (контроль)	KJ $1 \cdot 10^{-4}$ М	Мерказолил $1 \cdot 10^{-3}$ М	Адреналин $1 \cdot 10^{-6}$ М
Интakтная ткань	$0,096 \pm 0,024$	$0,043 \pm 0,005^*$	$0,040 \pm 0,004^*$	$0,157 \pm 0,025$
Замораживание (1—3 °C/мин)	$0,16 \pm 0,056$	$0,098 \pm 0,012^*$	$0,075 \pm 0,02^*$	$0,713 \pm 0,01^*$
Хранение при —196 °C 6 мес	$0,242 \pm 0,047$	$0,08 \pm 0,003^*$	$0,072 \pm 0,023^*$	$0,923 \pm 0,01^*$
Хранение при —196 °C 12 мес	$0,186 \pm 0,044$	$0,067 \pm 0,011^*$	$0,055 \pm 0,011^*$	$1,792 \pm 0,054^*$

* — во всех сравнениях достоверно к контролю, $p < 0,05—0,001$.

Возможной причиной неодинаковой криочувствительности исследуемых этапов обмена йода в щитовидной железе: аккумуляции и органификации, является различие в структурно-функциональной организации этих процессов. Захват иодида представляет собой достаточно сложно организованный процесс, в реализации которого принимают участие мембранные Cl^- и HCO_3^- АТФ-азы и карбоангидраза [2]. Как известно, мембранные структуры являются наиболее чувствительными из клеточных органелл к замораживанию. В то же время процесс органификации иодида протекает в просвете фолликулов. Возможное защитное действие на него оказывает основной функциональный гликопротеин щитовидной железы — тиреоглобулин, равномерно распределяющийся в тиреоидной паренхиме в виде коллоидного раствора, заключенного в фолликулы.

1. Пушкарь Н. С., Цариковская Н. Г., Чуйко В. А. Низкотемпературное консервирование и аутоимплантация щитовидной железы человека // Актуальные проблемы криобиологии. — Киев : Наук. думка, 1981. — С. 390—415.
2. Chow S., Kamp J., Woodbury D. Correlation of transport with $\text{Na}^+—\text{K}^+—\text{ATPase}$, HCO_3^- -ATPase and carbonic anhydrase activities in different functional states of the rat thyroid gland // J. Endocrinol. — 1982. — 92, N 2. — P. 371—379.

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

Поступила 09.04.86.

УДК 57.043.615.9

В. М. Гучок

ИССЛЕДОВАНИЕ ТОКСИЧНОСТИ 1,2-ПРОПАНДИОЛА И ГЛИЦЕРИНА ДЛЯ КРЫС В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ

1,2-пропандиол (1,2-ПД) и глицерин при однократном их введении в организм взрослых животных представляют собой малотоксичные вещества и являются активными криопротекторами.

Исследования по определению токсико-фармакологических критериев выполнены, в основном, на взрослых животных. Сравнительных данных о токсичности глицерина и 1,2-ПД при введении их молодым животным в доступной литературе обнаружить не удалось. Целью настоящей работы являлось сравнительное изучение токсичности 1,2-ПД и глицерина для животных ранних периодов постнатального развития и взрослых особей.

Опыты проведены на беспородных белых крысах обоего пола различных возрастных групп от новорожденных до половозрелых. Все животные были разделены на группы (табл. 1,2). Всего было использовано 315 крысят и 60 половозрелых крыс.

1,2-ПД, выпускаемый Кемеровским объединением «Химпром», и глицерин квалификации «ЧДА» вводили внутривентально однократно в 20 %-ных растворах, приготовленных на физиологическом растворе. Концентрация растворов была выбрана с учетом вводимых объемов соответствующих доз веществ, которые не должны превышать разрешенные для внутривентального введения. Интегральным показателем токсичности, отражающим совокупность развивающихся морфофункциональных изменений, считали гибель животных и ее сроки в течение двухнедельного наблюдения. Верхние параметры токсичности определяли методом пробит-анализа по В. Б. Прозоровскому [2]. Кроме того, для всех возрастных групп животных вычисляли показатель функции угла наклона (S) по Литчфилду и Уилкоксона [4] и суммарный показатель опасности по формуле $\frac{1}{ДЛ-50 \cdot S}$ [3].

Из табл. 1 видно, что для новорожденных крысят токсичность 1,2-ПД оставалась на том же уровне, что и для взрослых особей. С увеличением возраста крысят токсичность незначительно увеличивалась: к 5-10-дневному в 1,1 раза, а к 11—17-дневному в 1,3 раза. Далее по мере развития животных она несколько уменьшилась по сравнению с уровнем для взрослых крыс — к 18—26-дневному возрасту в 1,27 раза. К 27—30-дневному возрасту крысят токсичность 1,2-ПД соответствовала степени, присущей 18—26-дневным животным. Затем к возрасту 1,5 мес токсичность опять несколько возросла, не превысив к этому сроку величины, характерной для 11—17-дневных крысят.

Таблица 1. Токсичность 1,2-ПД для белых крыс при внутривентальном введении в постнатальном онтогенезе

Возраст животных, дни	Токсичность и другие показатели опасности развития острого смертельного отравления				
	ДЛ-16, г/кг	ДЛ-50 и ее доверительные границы, г/кг	ДЛ-84, г/кг	S	$\frac{1}{ДЛ-50 \cdot S}$
Половозрелые		18,22 (14,0÷22,44)		1,12	0,0490
2—3	14,57	18,35 (15,20÷21,00)	22,14	1,23	0,0221
5—10	9,64	16,68 (11,68÷21,68)	23,93	1,58	0,03795
11—17	10,95	14,10 (11,87÷16,33)	17,30	1,26	0,0564
18—26	14—84	23,10 (15,24÷30,96)	30,60	1,44	0,030
27—30	14,62	22,8 (17,0÷28,6)	31,11	1,46	0,030
45	9,00	15,40 (10,97÷19,83)	21,70	1,56	0,0416

Таблица 2. Токсичность глицерина для белых крыс при внутривентальном введении в постнатальном онтогенезе

Возраст животных, дни	Токсичность и другие показатели опасности развития острого смертельного отравления				
	ДЛ-16, г/кг	ДЛ-50 и ее доверительные границы, г/кг	ДЛ-84, г/кг	S	$\frac{1}{ДЛ-50 \cdot S}$
Половозрелые	6,17	7,35 (6,68÷8,01)	8,40	1,16	0,1165
2—3	13,88	17,18 (14,05÷20,32)	20,47	1,21	0,0481
5—10	11,15	13,90 (11,91÷16,21)	17,40	1,23	0,0584
11—17	7,95	9,92 (8,05÷11,79)	11,90	1,37	0,0735
18—26	5,66	7,31 (5,83÷8,79)	8,96	1,21	0,1130
27—30	6,32	8,82 (6,67÷10,96)	11,34	1,39	0,0815

Для новорожденных животных токсичность глицерина была самой низкой (табл. 2). ДЛ-50 для новорожденных крысят в 2,58 раза превысила соответствующие дозы для взрослых животных. Затем, в процессе раннего постнатального онтогенеза животных, токсичность глицерина постепенно нарастала и к 3—3,5-недельному возрасту достигла уровня взрослых. При сравнении полученных данных (рис.) обращает на себя внимание различие изменений токсичности 1,2-ПД и глицерина в процессе постнатального развития белых крыс. На протяжении всего постнатального периода

среднесмертельные дозы 1,2-ПД для крысят всех возрастных периодов и взрослых животных существенно не отличались, поскольку их доверительные интервалы перекрывают друг друга в значительно большей степени, чем то допустимо. Изменение токсичности глицерина для крысят носит однонаправленный линейный характер. Токсичность вещества постепенно повышается и задолго до развития у крыс половозрелости достигает уровня, свойственного взрослым животным. Из других показателей опасности развития острого смертельного отравления (см. табл. 1 и 2) видно, что степень риска отравления у крысят, как правило, ниже опасности для взрослых животных. Однако она не полностью соответствует изменениям среднесмертельных доз 1,2-ПД и глицерина в раннем постнатальном онтогенезе животных. Гибель крысят и взрослых животных в ходе экспериментов при введении исследуемых веществ наступала примерно в одни и те же сроки. Мы не изучали причины выявленных колебаний выносливости экспериментальных животных к глицерину и отсутствие его к 1,2-ПД в периоде их раннего постнатального развития. Правоммерно предположить, что в основе их лежат различия химической структуры веществ и определенный комплекс морфологических особенностей и различий физиологических функций и их регуляторных механизмов, свойственных животным разных периодов постнатального развития [1].

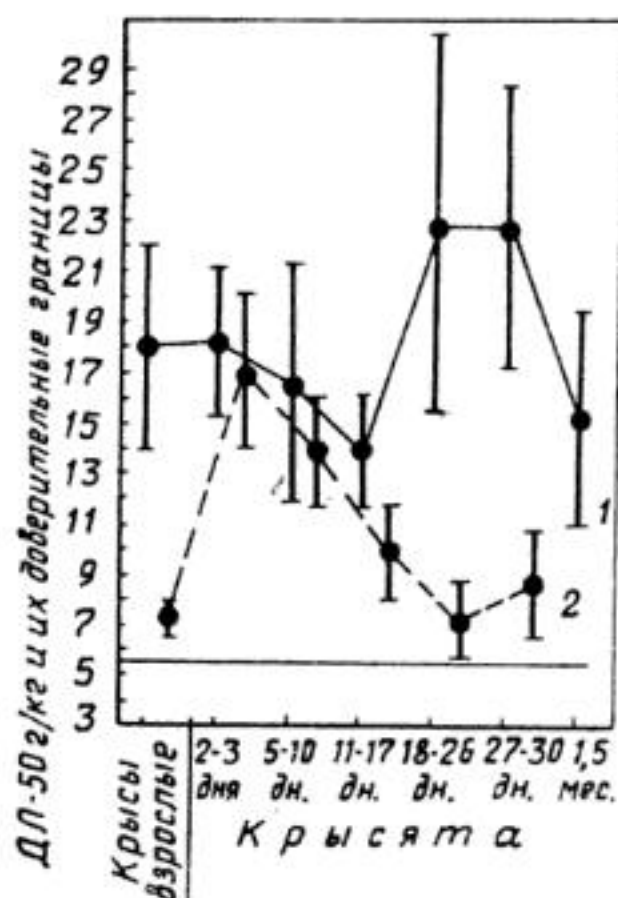


Рис. Изменение токсичности 1,2-пропандиола (1) и глицерина (2) для крыс в постнатальном онтогенезе.

Таким образом, 1,2-пропандиол и глицерин при однократном внутрибрюшинном введении животным в раннем постнатальном периоде развития, согласно классификации секции предельно допустимых концентраций, относятся к малотоксичным веществам. Животные, получавшие 1,2-пропандиол в период раннего постнатального развития, более резистентны к нему в отличие от крыс, которым вводился глицерин.

1. Аршавский И. А. Очерки по возрастной физиологии. — М.: Медицина, 1967. — 476 с.
2. Прозоровский В. Б. Использование метода наименьших квадратов для пробит-анализа кривых летальности // Фармакология и токсикология. — 1962. — № 1. — С. 115—119.
3. Саноцкий И. В., Уланова И. П. Критерии вредности в гигиене и токсикологии при оценке опасности химических соединений. — М.: Медицина, 1975. — 328 с.
4. Zitchfield J. T., Wilcoxon J. A simplified method of evaluating dose-effect experiments // J. Pharmacol. Exp. Ther. — 1949. — 96, N 2. — P. 99—113.

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

Поступила 10.01.84

УДК 57.043

Л. И. Золочевская

АДЕНИЛАТЦИКЛАЗНАЯ СИСТЕМА ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ХОЛОДОВОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

В стрессовых ситуациях важную роль в поддержании гомеостаза играет гормональная регуляция [3]. Согласно современным представлениям, действие многих гормонов, медиаторов и других биологически активных веществ на процессы, протекающие в клетке, осуществляется через систему циклических нуклеотидов [8]. Однако изменение активности этой системы при холодовом воздействии изучено недостаточно [1]. В настоящей работе исследовались содержание циклических нуклеоти-

дов и активность ферментов синтеза и гидролиза цАМФ (аденилатциклазы и фосфодиэстеразы) в печени крыс при воздействии на них холода.

Объектом исследования служили беспородные белые крысы обоего пола массой 150—180 г., которых содержали в холодовой камере при температуре 4—6 °С. В опыт брали животных на 1, 3, 9 и 30-е сут их пребывания в холодовых условиях. Выбранные сроки характеризуют как острое стрессорное действие холода (1-е и 3-и сут), критическую стадию (9-е сут), так и хроническое влияние холода (30-е сут) [1, 6]. Контролем служили крысы, содержащиеся такое же время в условиях вивария при температуре 20—22 °С.

Печень крыс гомогенизировали (1 : 4) в *трис*-сахарозном буфере (*pH* 7,4). Гомогенат центрифугировали при 2000 об/мин в течение 15 мин. Осадок, представляющий собой грубую фракцию плазматических мембран, суспендировали в среде, содержащей 50 мМ *трис*-HCl буфер (*pH* 7,4), 5 мМ теofilлин, 4 мМ хлористый магний, и использовали для определения активности аденилатциклазы. Содержание цАМФ определяли в надосадочной фракции методом конкурентного белкового связывания при помощи стандартных наборов фирмы «Amersham». Об активности аденилатциклазы судили по количеству образовавшегося цАМФ в среде инкубации, содержащей в качестве субстрата 2 мМ АТФ, за 10 мин при 37 °С. Исследовали базальную активность аденилатциклазы и влияние на эту активность фторида натрия ($2 \cdot 10^{-2}$ М), адреналина (10^{-5} М) и норадреналина (10^{-5} М), которые добавлялись *in vitro* в среду инкубации. Действие гормонов исследовали на фоне блокады β -рецепторов пропранололом (10^{-5} М). Активность фосфодиэстеразы определяли в надосадке, используя в качестве среды инкубации 1 мМ имидазольный буфер (*pH* 7,6), содержащий 1 мМ MgSO₄ и 10^{-3} М цАМФ. Время инкубации 20 мин при 37 °С. Реакцию останавливали нагреванием в кипящей водяной бане в течение 3 мин. Ферментативную активность оценивали по накоплению неорганического фосфата из продукта фосфодиэстеразной реакции 5-АМФ в ходе сопряженной реакции, которую проводили в присутствии яда гюрзы (0,1 мг/мл) в качестве источника 5-нуклеотидной активности. Реакцию останавливали 55 % ТХУ. Белок определяли по Лоури.

Т а б л и ц а 1. Аденилатциклазная система печени крыс при холодовом воздействии (4—6 °С)

Срок наблюдения, сут	Содержание цАМФ, пмоль · мг белка	Активность аденилатциклазы, п моль цАМФ · мг белка · мин								Активность фосфодиэстеразы, нмоль Р · мг белка · мин
		базальная	активируемая							
			NaF ($2 \cdot 10^{-2}$ M)		адреналином (10^{-5} M)		норадреналином (10^{-5} M)			
			абсолютная величина	степень активации	абсолютная величина	степень активации	абсолютная величина	степень активации		
Контроль	$0,38 \pm 0,04$	$0,43 \pm 0,05$	$2,77 \pm 0,39$ $p < 0,001$	6,44	$1,01 \pm 0,12$ $p < 0,01$	2,35	$0,65 \pm 0,08$ $p < 0,05$	1,51	$12,93 \pm 0,78$	
1-е	$0,63 \pm 0,10$ $p < 0,05$	$1,34 \pm 0,19$ $p < 0,001$	$3,59 \pm 0,54$ $p < 0,001$	2,68	$1,62 \pm 0,10$ $p < 0,001$	1,21	$1,98 \pm 0,22$ $p < 0,001$	1,48	$13,75 \pm 0,33$ $p > 0,3$	
3-и	$0,34 \pm 0,09$ $p > 0,6$	$0,59 \pm 0,03$ $p < 0,05$	$2,44 \pm 0,04$ $p < 0,001$	4,14	$1,14 \pm 0,18$ $p < 0,01$	1,93	$0,82 \pm 0,07$ $p < 0,01$	1,39	$12,42 \pm 0,53$ $p > 0,6$	
9-е	$0,37 \pm 0,05$ $p > 0,8$	$0,49 \pm 0,08$ $p > 0,05$	$2,74 \pm 0,27$ $p < 0,01$	5,59	$1,20 \pm 0,28$ $p < 0,05$	2,45	$0,64 \pm 0,15$ $p > 0,2$	1,31	$12,09 \pm 0,23$ $p > 0,3$	
30-е	$0,36 \pm 0,02$ $p > 0,6$	$0,45 \pm 0,06$ $p > 0,8$	$2,64 \pm 0,54$ $p < 0,01$	5,87	$0,91 \pm 0,18$ $p < 0,05$	2,02	$0,54 \pm 0,09$ $p > 0,3$	1,20	$11,48 \pm 0,48$ $p > 0,1$	

Представленные данные (табл. 1) показывают, что увеличение содержания циклических нуклеотидов происходило в 1-е сут пребывания животных в холодовых условиях. Фторид, адреналин и норадреналин оказывали стимулирующее влияние на активность аденилатциклазы печени контрольных крыс. Это стимулирующее влияние сохранялось во все последующие сроки исследования. В первые сутки холодового воздействия обнаружены увеличение базальной активности аденилатциклазы и дополнительная активация фермента под влиянием фторида, гормона и медиатора. При этом надо отметить, что норадреналин в этот период оказывал более выраженное стимули-

рующее влияние по сравнению с другими активаторами. На 3-и сут исследования базальная активность фермента хотя и снижалась по сравнению с первыми сутками, но все же была значимо выше контрольной. В остальные исследуемые сроки (9 и 30-е сут) изменений базальной активности фермента и дополнительной его активации изученными препаратами не наблюдалось. Если в первые сутки холодового воздействия на фоне возросшей базальной активности степень активации аденилатциклазы норадреналином оставалась на уровне контроля, то под влиянием фторида и адреналина она снизилась почти в два раза и достигла контрольного уровня к 9-м сут исследования. Блокатор β -рецепторов пропранолол не оказывал влияния на активность аденилатциклазы (табл. 2) и блокировал активирующее действие адреналина и норадреналина как у контрольных, так и у опытных животных. Активность фосфодиэстеразы (табл. 1) в исследуемые сроки не изменялась.

Полученные результаты свидетельствуют, что повышение содержания циклических нуклеотидов в печени крыс в первые дни пребывания животных в холодových условиях обусловлено увеличением базальной активности аденилатциклазы. Увеличение активности аденилатциклазы можно объяс-

Таблица 2. Активность аденилатциклазы, стимулированной гормонами на фоне блокады β -рецепторов пропранололом в печени крыс при холодovом воздействии, пмоль цАМФ · мг белка · мин

Срок наблюдения, сут	Базальная активность	Пропранолол	Пропранолол + адреналин	Пропранолол + норадреналин
Контроль	$0,43 \pm 0,05$	$0,54 \pm 0,17$ $p_1 > 0,5$	$0,50 \pm 0,04$ $p_1 > 0,2$	$0,48 \pm 0,12$ $p_1 > 0,8$
1-е	$1,34 \pm 0,19$ $p_1 < 0,001$	$0,65 \pm 0,09$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,4$	$0,54 \pm 0,13$ $p_1 > 0,7$ $p_2 > 0,9$	$0,54 > 0,05$ $p_1 > 0,8$ $p_2 > 0,08$
3-и	$0,49 \pm 0,08$ $p_1 > 0,05$	$0,57 \pm 0,07$ $p_1 > 0,1$ $p_2 > 0,8$	$0,40 \pm 0,03$ $p_1 > 0,1$ $p_2 > 0,05$	$0,48 \pm 0,05$ $p_1 > 0,5$ $p_2 > 0,9$

Примечание. Здесь p_1 — сравнение с контрольной базальной активностью, p_2 — сравнение с пробами, содержащими пропранолол.

нить активацией симпато-адреналовой системы, вызванной стрессорным действием холода и повышенным освобождением катехоламинов, реализующих свое влияние на метаболические процессы клетки через аденилатциклазную систему путем активации аденилатциклазы и увеличения скорости синтеза циклических нуклеотидов [7]. Большая выраженность стимулирующего влияния норадреналина, чем адреналина, согласуется с литературными данными о важной роли данного медиатора в возникновении адаптационной реакции к холоду [7]. Так как аденилатциклаза представляет собой сложную систему, состоящую из нескольких взаимодействующих между собой компонентов, то вызванное действием холода снижение степени активации фермента под влиянием фторида и адреналина свидетельствует о качественных сдвигах, происходящих в аденилатциклазном комплексе. Эти изменения могут затрагивать саму молекулу фермента, действие фторида на которую осуществляется через регуляторную субъединицу [2]. Снижение чувствительности исследуемого процесса к адреналину может быть связано с нарушением взаимосвязи в системе гормонорецептор-аденилатциклаза. Эти нарушения могут быть обусловлены изменением количества рецепторов в мембране, снижением связывания гормона рецепторами или торможением степени сопряженности рецепторов с ферментом [4].

Отсутствие изменений в аденилатциклазной системе печени животных, в более поздние сроки действия свидетельствует, по всей вероятности, о том,

что применяемое воздействие не носит повреждающего характера и приспособление организма к неблагоприятным условиям происходит через различные компенсаторные молекулярные механизмы, использующие адаптационную функцию белков, липидов, их комплексов, других макромолекул [5]. Блокирование пропранололом активирующего действия адреналина и норадреналина свидетельствует о реализации гормонального влияния в печени крыс через β -адренорецепторы.

Таким образом, исследование аденилатциклазной системы печени крыс, подвергавшихся холодовому воздействию, показывает, что в механизме защитно-приспособительной реакции к холоду на первых этапах важную роль играют аденилатциклаза и циклические нуклеотиды. Несмотря на качественные изменения, происходящие в отдельных звеньях аденилатциклазы, функциональная активность всех компонентов аденилатциклазного комплекса и их способность к сопряжению полностью сохраняется.

1. Меерсон Ф. З., Пшенникова М. Г., Голубева Л. П. и др. Влияние адаптации к высотной гипоксии и холоду на активность аденилатциклазы миокарда крыс // *Вопр. мед. химии.* — 1978. — Вып. 4. — С. 486—490.
2. Окунев В. Н., Жиронов В. В. Биохимические механизмы действия фтора // *Укр. биохим. журн.* — 1985, 57, № 2. — С. 103—113.
3. Селье Г. Концепция стресса как мы ее представляем // *Новое о гормонах и механизме их действия.* — Киев : Наук. думка, 1977. — С. 27—51.
4. Ткачук В. А. Участие аденилатциклазы в проведении гормонального сигнала через мембрану // *Укр. биохим. журн.* — 1981. — 53, № 2, С. 5—27.
5. Хочачка П., Сомеро Д. Стратегия биохимической адаптации. — М. : Мир, 1977. — 398 с.
6. Шугалей В. С., Ананян А. А., Ломакина Л. В., Арутюнян Л. С. Активность аргиназы и протеолитические процессы в мозге и печени крыс в ходе акклиматизации к холоду // *Укр. биохим. журн.* — 1981, 53, № 5. — С. 110—113.
7. Hsieh A. C., Carlson G. D. Role of adrenaline and noradrenaline in chemical regulation of heat production // *Am. J. Physiol.* — 1957. — 190, N 2. — P. 243—246.
8. Sutherland E. W., Robinson I. A. The role of cyclic 3,5-AMP in responses to catecholamines and other hormones // *Pharmacol. — Rev.* — 1966. — 18, N 1. — P. 145—162.

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

Поступила 17.07.85

УДК 577.3 : 612.111.014.41

Л. К. Стусь, В. М. Куракса

ВЛИЯНИЕ ЭКРАНИРОВАНИЯ ГЕОМАГНИТНОГО ПОЛЯ НА ЭРИТРОЦИТЫ В ПРОЦЕССЕ ХРАНЕНИЯ ПРИ ТЕМПЕРАТУРЕ 4°C

Проведены исследования по изучению влияния ослабления геомагнитного поля в $10^2 \div 5 \cdot 10^2$ раз на предгемолитическое состояние эритроцитов в процессе хранения в холодильной камере при температуре $4 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение трех недель. Тестирование предгемолитического состояния эритроцитов донорской крови, заготовленной на консервирующем растворе «глюгицир» [3], проводили методом кислотных эритрограмм [2] и измерением содержания свободного гемоглобина в надосадке после центрифугирования [1].

Тщательно перемешанную кровь разливали в пробирки по 5 мл и закрывали пробками. Контрольные образцы находились в холодильной камере вне магнитного экрана, опытные образцы — в магнитном экране, помещенном в холодильную камеру. Экранирование геомагнитного поля (ГМП) достигалось с помощью трехслойного ферромагнитного экрана из отожженного пермоллоя. Исследование контрольных и опытных образцов проводили непосредственно перед их внесением в холодильную камеру, а также на 3, 5, 7, 9, 12, 15, 19, 20, 22-е сутки хранения. В качестве параметра, характеризующего устойчивость эритроцитов к кислотному гемолизу, использовали среднее время гемолиза в растворе соляной кислоты.

Исследованиями, проведенными на 26 донорах было установлено, что распределение крови по среднему времени гемолиза эритроцитов в кислот-

ном гемолитике ($P \geq 0,95$) подчиняется нормальному закону (рис. 1). В дальнейшей работе для уменьшения дисперсии результатов и проведения сравнительного анализа нами была отобрана эритроцитарная масса с $\bar{t} = 4,3 \pm 0,25$; $5,1 \pm 0,6$; $6,0 \pm 0,5$ мин. Кривые, приведенные на рис. 2, иллюстрируют ход изменения среднего времени гемолиза эритроцитов в период хранения крови. Особенности в динамике кислотной резистентности эритроцитов с различным исходным состоянием проявляются уже в начальные сроки хранения. Видно, что у эритроцитов доноров в исходном состоянии характеризующихся максимальным временем гемолиза, в первые дни отмечено его уменьшение. Значение $\bar{t}$ порядка 5,0 мин увеличивается до максимального и уменьшается в последующие дни. У доноров, эритроциты которых характеризуются средним временем гемолиза 4,0—4,5 мин, изменений $\bar{t}$ в первые дни хранения не наблюдается. Общей чертой в динамике изменения кислотной резистентности консервированных эритроцитов является ее колебательный характер. В условиях экранирования ГМП ход изменения кислотной резистентности эритроцитов при гипотермическом хранении несколько иной, хотя колебательный характер кривых сохраняется. Заметны незначительные изменения и в динамике накопления свободного гемоглобина. Во всех случаях изменения в динамике накопления свободного

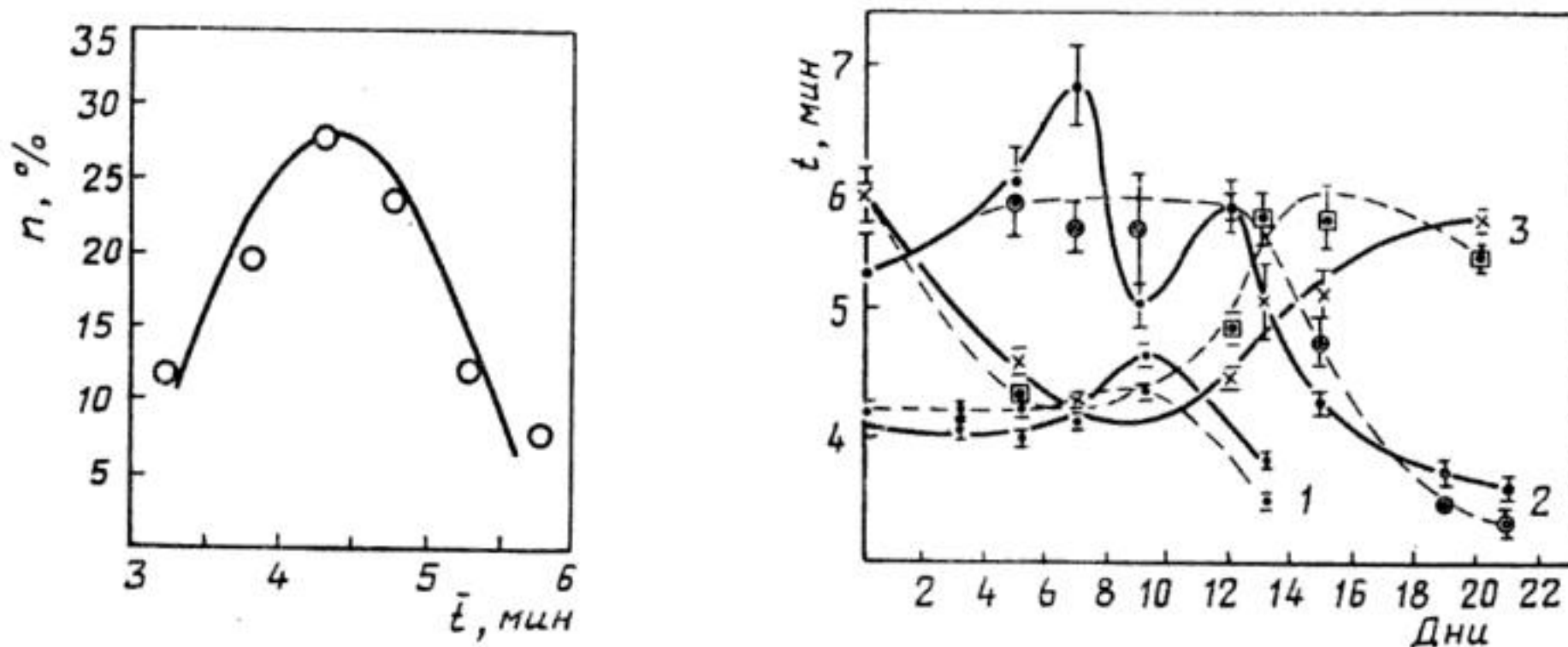


Рис. 1. Распределение крови по исходным значениям среднего времени гемолиза эритроцитов в кислотном гемолитике (по оси абсцисс — среднее время гемолиза эритроцитов $\bar{t}$ в кислотном гемолитике, по оси ординат — количество доноров).

Рис. 2. Изменение кислотной резистентности эритроцитов доноров с различным исходным состоянием при гипотермическом хранении крови: 1 — эритроцитарная масса с $\bar{t} = 4,3 \pm 0,25$ мин, 2 — эритроцитарная масса с $\bar{t} = 5,1 \pm 0,6$ мин, 3 — эритроцитарная масса с $\bar{t} = 6,0 \pm 0,5$ мин (по оси абсцисс — дни хранения, по оси ординат — среднее время гемолиза эритроцитов в кислотном гемолитике; сплошная линия — контроль, пунктир — опыт).

гемоглобина в опытных и контрольных образцах коррелируют с изменением среднего времени гемолиза эритроцитов в кислотном гемолитике.

Таким образом, приведенные исследования показали, что ГМП является фактором, оказывающим влияние на состояние мембраны эритроцитов в условиях гипотермического хранения консервированной крови. Однако в целом эти изменения не ухудшают свойств консервированных эритроцитов в указанные сроки.

1. Рождественская М. А. Определение гемоглобина в плазме консервированной крови // Актуальные вопросы переливания крови. — М. : Медгиз, 1955. — С. 55—58.
2. Терсков И. А., Гительзон И. И. Метод химических (кислотных) эритрограмм // Биофизика. — 1975. — 2. — Вып. 2. — С. 259—266.
3. Аграненко В. А., Суворова И. А., Голубева В. Л. и др. Новый консервирующий раствор для крови с аденином, никотинамидом и фосфатами // Гистология и трансфузиология. — 1985. — № 2. — С. 12—18.

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

Поступила 02.04.85

ФИЗИЧЕСКИЕ СОСТОЯНИЯ СИСТЕМЫ ВОДА-ЭТИЛЕНГЛИКОЛЬ ПО ДАННЫМ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ СКАНИРУЮЩЕЙ КАЛОРИМЕТРИИ

Несмотря на широкое применение водных растворов этиленгликоля в качестве криопротектора, в литературе имеется сравнительно мало данных о состоянии системы вода-этиленгликоль (ЭГ) при температурах ниже линии ликвидуса. Луйе и Расмуссен [4] предприняли попытку исследовать расстеклование, спонтанную кристаллизацию и рекристаллизацию закаленных (т. е. быстро охлажденных) водных растворов ЭГ, однако использованный метод дифференциального термического анализа не позволил получить данные в области составов, близких к эвтектическому. Отт и соавторы [5] исследовали диаграмму плавления системы вода-ЭГ в равновесных условиях; было выявлено существование двух стабильных и одной метастабильной эвтектик. Настоящая работа предпринята с целью исследования равновесных фазовых переходов (плавление) и неравновесных состояний в системе вода-ЭГ во всем диапазоне концентраций.

Термограммы регистрировали на дифференциальном сканирующем калориметре [1] с системой программного регулирования температуры. Максимальная чувствительность прибора составляла около 10^{-5} Вт, погрешности измерения температуры $\pm 0,2$ К, теплоемкости $\pm 2,5$ %. Образцы массой 100 мг помещали в стаканчики из нержавеющей стали диаметром 12 мм, плотно закрывали притертыми крышками (между поверхностью образца и крышкой оставался воздушный зазор) и охлаждали вне калориметрического блока. Использовали два способа охлаждения: быстрое охлаждение или закалку погружением образца в жидкий азот, при этом средняя скорость изменения температуры в интервале от 293 до 120 К составляла $16 \text{ К} \cdot \text{с}^{-1}$, и медленное охлаждение в специальном охлаждающем устройстве со скоростью $3,3 \cdot 10^{-3} \text{ К} \cdot \text{с}^{-1}$. Охлажденные образцы помещали в контейнер с жидким азотом, быстро переносили в предварительно охлажденный до 77 К калориметрический блок и снимали температурные зависимости теплопоглощения (термограммы) при нагреве со скоростью $6,67 \cdot 10^{-3} \text{ К} \cdot \text{с}^{-1}$. Эта скорость примерно на порядок ниже скоростей, использованных ранее другими авторами при исследовании системы вода-ЭГ.

Термограммы водных растворов этиленгликоля, полученные с помощью данной методики, оказались намного сложнее известных из литературы [4] для системы вода-ЭГ. На рис. 1 приведены некоторые из термограмм водных растворов этиленгликоля после охлаждения их со скоростью $16 \text{ К} \cdot \text{с}^{-1}$, на которых наряду с известными тепловыми эффектами, такими как плавление (9), расстеклование (1) и кристаллизация (2), виден ряд экзо- и эндотермических пиков, не описанных ранее в литературе. Полученные термограммы были использованы для построения диаграмм физических состояний системы вода-ЭГ (рис. 2, 3), так как на них представлены области и равновесных, и неравновесных состояний.

На линии ликвидуса 9 имеются две стабильные эвтектики при температурах $224 \pm 0,2$ и $231 \pm 0,2$ К и концентрациях 57,5 и 81,5 масс. % ЭГ соответственно. Положение линии ликвидуса и эвтектических точек на диаграмме хорошо совпадает с результатами работы [5]. Вода и ЭГ образуют непрочное соединение, которому соответствует дистектика при соотношении

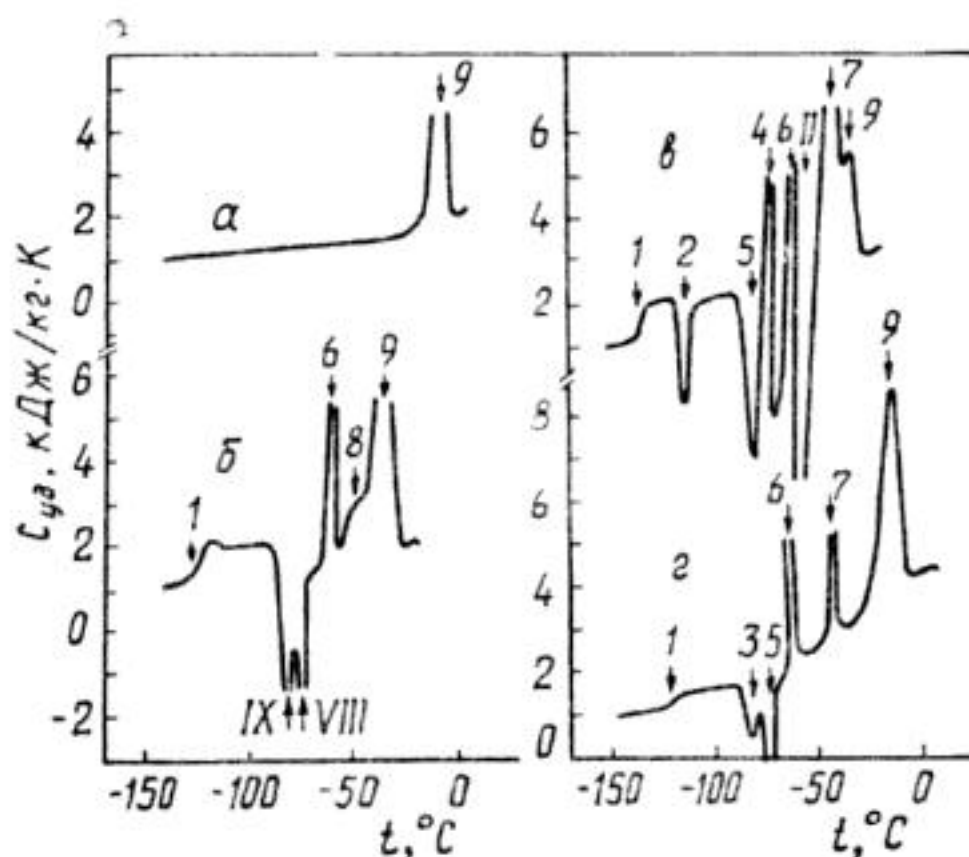


Рис. 1. Термограммы водных растворов этиленгликоля (охлаждение со скоростью $16 \text{ К} \cdot \text{с}^{-1}$). а — 100, б — 87, в — 46, г — 15 масс. % ЭГ.

компонентов 1 моль H_2O / моль ЭГ. Линия 1 обозначает расстеклование и разграничивает области твердоаморфного вещества и переохлажденной жидкости. Скачок температуры расстеклования при концентрации 42 масс. % ЭГ лежит на границе двух концентрационных областей, в которых вещество либо частично кристаллизуется на этапе охлаждения (до 42 % ЭГ), либо при $X = 42$ масс. % ЭГ и выше происходит его полное стек-

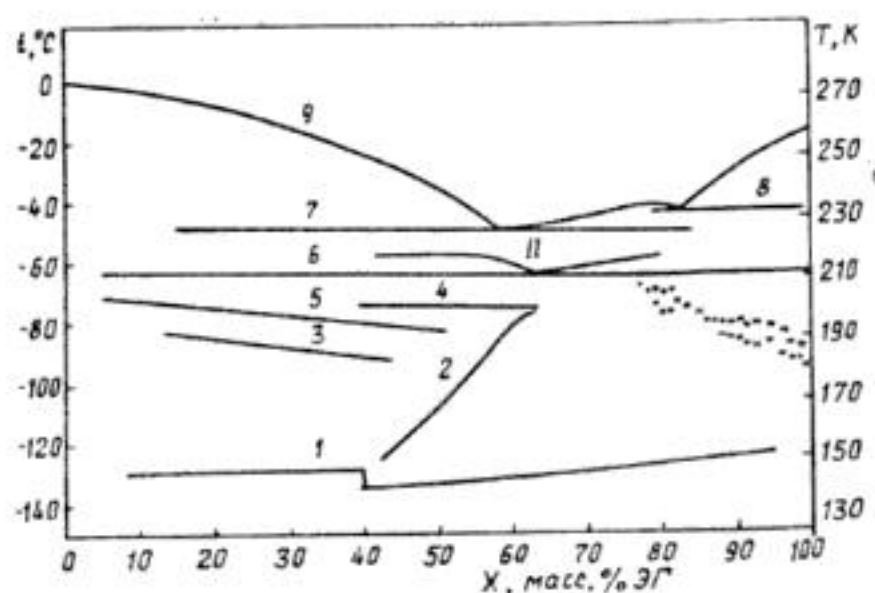


Рис. 2. Диаграмма физических состояний системы вода — этиленгликоль (охлаждение со скоростью $16 \text{ K} \cdot \text{s}^{-1}$). Обозначения линий соответствуют цифровым обозначениям пиков на рис. 1.

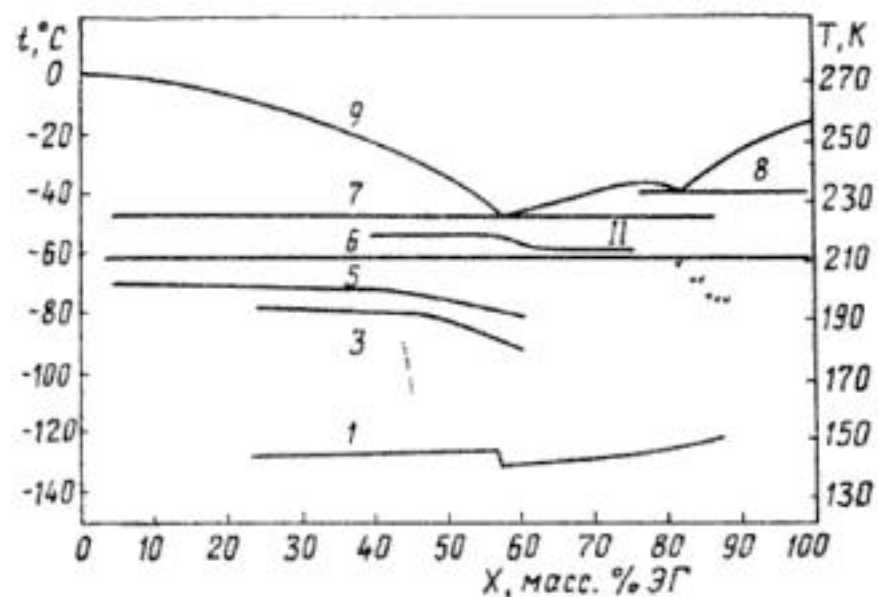


Рис. 3. Диаграмма физических состояний системы вода-этиленгликоль (охлаждение со скоростью $3,3 \cdot 10^{-3} \text{ K} \cdot \text{s}^{-1}$). Обозначения линий соответствуют цифровым обозначениям пиков на рис. 1.

лование при охлаждении. Линия 2 отвечает кристаллизации переохлажденной жидкости на этапе нагрева. На диаграмме физических состояний имеются три эвтектических изотермы (линии 6—8). Две из них при температурах $224 \pm 0,2$ и $231 \pm 0,2 \text{ K}$ соответствуют плавлению стабильных эвтектик [5]. В широком диапазоне концентраций от 5 до 99 масс. % ЭГ расположена эвтектическая изотерма 6, лежащая ниже линии ликвидуса 9 и отвечающая

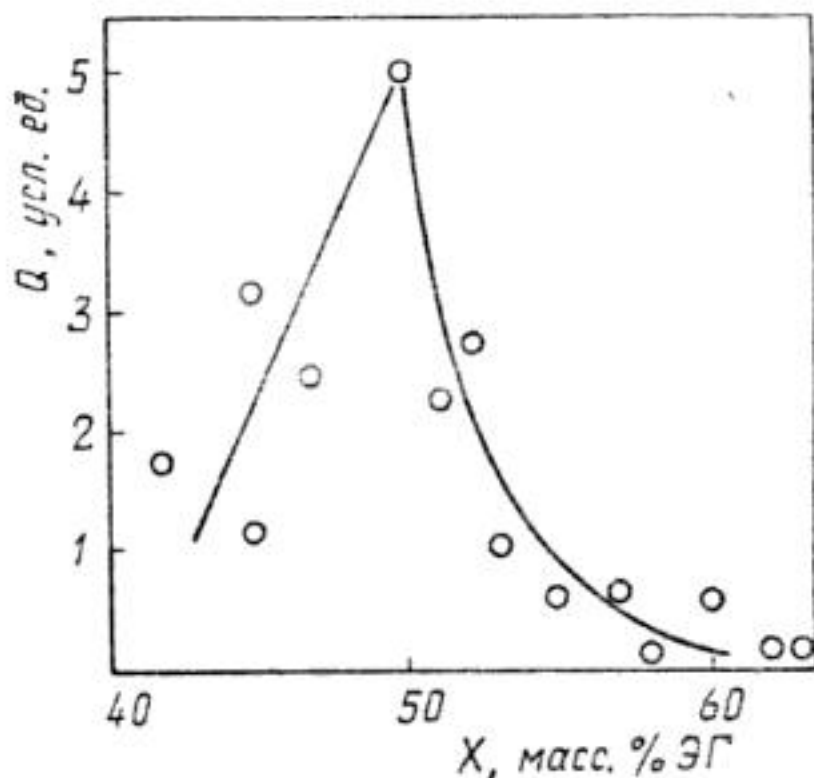


Рис. 4. Зависимость теплового эффекта эндотермического пика при 200 К от концентрации водного раствора этиленгликоля.

плавлению метастабильной эвтектики при температуре $209,5 \pm 0,2 \text{ K}$. Авторам [5] специальным методом медленного охлаждения без встряхивания удалось построить линию ликвидуса в метастабильной области. В настоящей работе подобные условия не реализовались, однако плавление эвтектики наблюдалось в широком интервале концентраций.

Эндотермический эффект 4 (рис. 1) и соответствующая ему на диаграмме линия 4 при 200 К не были описаны в литературе. Характер пика теплопоглощения 4 такой же, как и при плавлении эвтектик, хотя подобным образом может проявляться разрушение клатратных соединений. Для определения состава этих образований была построена зависимость теплового эффекта пика 4 от концентрации ЭГ (рис. 4). Максимальная площадь пика 4

получена при содержании этиленгликоля в растворе 50 масс. %, что составляет примерно 3 моля воды на моль ЭГ. Данное значение концентрации носит только оценочный характер, поскольку из-за наложения экзо- и эндотермических эффектов теплоту плавления не удалось определить с достаточной точностью. На диаграмме физических состояний, полученной после медленного охлаждения (рис. 3), изотерма 4 отсутствует. Следовательно, ее существование связано с еще менее стабильным состоянием системы, чем состояние, обуславливающее эвтектическую изотерму 6. Появление этого

теплового эффекта можно объяснить, вероятно, наличием в системе нестабильных гидратов этиленгликоля состава $\text{ЭГ} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$.

В области концентраций от 43 до 80 масс. % ЭГ на термограммах регистрируется тепловыделение в виде широкого экзотермического максимума, растянутого в интервале температур до 20 К (линия, отмеченная на рис. 2 и 3 цифрой *II*). После медленного охлаждения этот пик не исчезает на термограммах, хотя несколько смещается по температуре (рис. 3). Данный экзотермический эффект ранее в литературе описан не был. Для выяснения его природы потребуются дополнительные исследования, однако можно предположить, что эффект обусловлен завершением процесса кристаллизации при медленном нагреве. При высоких концентрациях ЭГ на термограммах наблюдаются экзотермические пики кристаллизации, температуры которых отмечены на рис. 2 цифрами *III—IX*. Выяснение состава образующихся при этом кристаллов требует привлечения дополнительных методов исследования. Линиями 3 и 5 на рис. 2 отмечены концентрационные зависимости температур экзотермических эффектов, которые могут быть обусловлены кристаллизацией либо водного компонента, либо гидратов на этапе нагрева. Тот факт, что в водных растворах веществ, образующих водородные связи с молекулами воды, может развиваться кристаллизация гидратов на этапе медленного нагрева, известен в литературе. Например, Баутрон и Кауфман [2], используя методы ДСК и рентгенографии, наблюдали аналогичные явления в системе вода-этанол.

Для подтверждения сделанных нами предположений о природе наблюдаемых на термограммах тепловых эффектов было проведено исследование системы вода-ЭГ после медленного охлаждения. На диаграмме физических состояний (рис. 3) неизменными в пределах погрешности эксперимента остаются положения линии ликвидуса 9 и эндотерм 6—8.

Расстеклование регистрируется в более узком диапазоне концентраций — от 25 до 88 масс. % ЭГ, что объясняется более полной кристаллизацией уже на этапе охлаждения. Скачок температуры расстеклования после медленного охлаждения смещается до концентрации, при которой все гидрофильные центры ЭГ гидратированы, и в системе отсутствует свободная вода. Избыток свободной воды при медленном охлаждении кристаллизуется в виде льда или образуются гидраты ЭГ. На это указывает тот факт, что после медленного охлаждения не регистрируется линия кристаллизации льда из переохлажденного состояния.

После медленного охлаждения водных растворов этиленгликоля линии 3 и 5 смещаются к более высоким показателям температуры (рис. 3), причем линия 3 смещается в большей степени, а соответствующие им экзотермические пики на термограммах значительно уменьшаются по интенсивности, но не исчезают полностью. Эти факты можно объяснить тем, что кристаллизация эвтектических составов в области концентраций с большим содержанием воды протекает медленно, и даже понижение температуры со столь малой скоростью не приводит к их полной кристаллизации. Именно медленным протеканием процессов кристаллизации в системе вода-ЭГ можно объяснить то, что, несмотря на кристаллизацию эвтектического состава, значительная часть вещества при охлаждении остается в стеклообразном состоянии.

Из приведенных данных видно, что возможность получения стабильных (равновесных) структур в системе вода-ЭГ сильно зависит от протекания релаксационных процессов, связанных с диффузией, которая существенно замедляется с понижением температуры. Как известно из литературы [3], отмеченным выше свойством обладают системы с развитыми межмолекулярными водородными связями, некоторые концентрированные водные растворы макромолекул. В таких системах временная шкала заторможенной релаксации при низких температурах может стать сравнимой или даже более длительной, чем временная шкала эксперимента, что ведет к затруднению кристаллизации и определяет тенденцию системы к стеклованию.

1. Зинченко А. В., Моисеев В. А. Исследование низкотемпературных фазовых переходов в водных растворах ПЭГ-400 калориметрическим методом // Криобиология и криомедицина.— 1979. Вып. 5.— С. 27—30.
2. Boutron P., Kaufmann A. Metastable states in the system water-ethanol. Existence of a second hydrate, curious properties of both hydrates // J. Chem. Phys.— 1978.— 68, N11.— P. 503—504.
3. Water. A comprehensive treatise / Edited by F. Franks.— N—Y—London: Plenum Press, 1982.— 484 p.
4. Luyet B., Rasmussen D. On some inconspicuous changes occurring in aqueous systems subjected to below zero °C temperatures // Biodynamica.— 1973.— 11, N 242.— P. 209—215.
5. Ott J. B., Gates J. R., Lamb J. D. Solid-liquid phase equilibria in water-ethylene glycol // J. Chem. Thermodynamic.— 1972.— 4, N 1, P. 123—126.

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

Поступила 17.12.84

УДК 616 : 612.616 : 547.963.3 : 57.043 : 616.69—008.8

Ю. С. Паращук, Н. Ю. Смаглий

НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ СПЕРМИЕВ ЧЕЛОВЕКА ПРИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ И НЕКОТОРОЙ ПАТОЛОГИИ

Вопросы криоконсервации спермиев человека неразрывно связаны с проблемой бесплодного брака. Это обусловлено тем, что в настоящее время с целью лечения некоторых форм бесплодия все шире применяется искусственная инсеминация криоконсервированной спермой. Возрастающие клинические потребности в криоконсервированном биоматериале выдвигают целый ряд требований к качеству спермиев после замораживания-оттаивания. Наиболее существенными из них являются максимальное сохранение оплодотворяющих свойств, то есть сохранение акросомы и предупреждение утечки из нее ферментов, обеспечение целостности митохондрий, энергетического метаболизма спермиев. Очень важным требованием является также предупреждение разрушения ядра половой клетки, содержащего набор хромосом, которые обеспечивают передачу наследственной информации будущему ребенку. Как известно, во время замораживания-оттаивания на спермии действует целый ряд неблагоприятных факторов: температурный шок, дегидратация, рекристаллизация и другие. В этих условиях возможно разрушение ДНК, что может в дальнейшем привести к развитию наследственной патологии.

В литературе по этому вопросу нет единого мнения. Если в 60-х годах предполагали, что при замораживании спермиев животных разрушается основной носитель генетической информации — дезоксирибонуклеиновая кислота, то в настоящее время эта точка зрения пересмотрена, и считается, что ДНК не изменяется ни при криоконсервировании, ни при длительном хранении [2]. Необходимо отметить, что данные положения были высказаны на основании результатов исследования нормальной семенной жидкости животных и при использовании недостаточно чувствительных цитохимических методик. В медицине выводы о состоянии генетического аппарата спермиев человека после криоконсервации до настоящего времени основываются лишь на результатах клинических наблюдений за родившимися детьми. По-видимому, необходима информация о состоянии ДНК в спермиях на этапе, предшествующем искусственной инсеминации, то есть после криоконсервации.

В связи с тем, что исследование содержания ДНК в семенной жидкости человека проводилось сравнительно редко [3], а после криоконсервации не изучалось, в данной работе была поставлена цель: изучить содержание нуклеиновых кислот в сперме человека в норме до и после криоконсервации

и в нативной сперме при некоторых видах патологии: олигоспермии, астено- и тератоспермии.

Следует отметить, что количественное определение ДНК в семенной жидкости имеет большое значение, так как данный показатель в комплексе с другими отражает оплодотворяющую способность спермиев [3]. По мнению автора [6], количество нуклеиновых кислот в спермиях у мужчин с нормальной репродуктивной функцией и бесплодных значительно отличается. Это положение может быть использовано в целях диагностики. Кроме того, изучение содержания ДНК в нативных эякулятах у мужчин с различной патологией важно в связи с тем, что в настоящее время предпринимаются попытки криоконсервации патологической спермы, и при этом необходимо знать предполагаемую оплодотворяющую способность спермиев после оттаивания. Вопросы, касающиеся содержания РНК, также изучены недостаточно. Имеющиеся сведения порой противоречивы. Так, некоторые авторы [3, 4] приводят данные о том, что в спермиях содержится небольшое количество РНК. Другие, наоборот, находят в зрелых спермиях РНК в больших количествах [7]. Исходя из этого, мы посчитали целесообразным наряду с изучением ДНК исследовать содержание РНК, поскольку соотношение ДНК/РНК может иметь важное значение при оценке состояния криоконсервированных спермиев и при некоторых патологических состояниях.

Содержание ДНК и РНК в спермиях определяли чувствительным спектрофотометрическим методом по Шмидту и Тангаузеру в модификации Н. М. Климова и Г. Ф. Коромылова [1]. Для исследования использовали 0,5 мл семенной жидкости. Поскольку показатели содержания нуклеиновых кислот при этом получаются очень незначительными, перерасчет производили на 10^{10} спермиев, показатели выражали в мг % Р (фосфора). Количество проб в каждом опыте составляло от 8 до 11.

Криоконсервация проводилась по двухэтапной программе. При этом на первом этапе применялось медленное охлаждение до 4°C , затем следовал период «холодовой» адаптации, а на втором этапе — быстрое замораживание [5]. Криопротектором являлся глицерин.

Изучение содержания ДНК в спермиях, полученных от мужчин с нормальной репродуктивной функцией, показало, что ее количество равняется $4,1 \pm 0,42$ мг % Р. Другие критерии указывали на нормальную оплодотворяющую способность спермиев. Количество спермиев в 1 мл превышало 60 млн, а процент подвижных составлял не менее 60.

После криоконсервации было выявлено незначительное снижение ДНК в спермиях по сравнению с нативными (таблица).

Наряду с некоторым уменьшением содержания ДНК имело место снижение подвижности спермиев после цикла замораживания-оттаивания. В целом выживаемость спермиев составила 67 %.

Таким образом, метод криоконсервации суспензии половых

Т а б л и ц а. Содержание нуклеиновых кислот в сперме человека, мг % Р

Исследуемая сперма	К-во наблюдений	ДНК $M \pm m$	РНК $M \pm m$	РНК/ДНК
Нормальная	11	$4,1 \pm 0,42$	$4,9 \pm 0,46$	1,19
После криоконсервации	10	$3,0 \pm 0,19$	$3,5 \pm 0,36$	1,17
При олигоспермии	8	$1,8 \pm 0,17$	$4,8 \pm 0,68$	2,66
При астеноспермии	10	$2,5 \pm 0,19$	$5,9 \pm 1,0$	2,36
При тератоспермии	10	$2,5 \pm 0,19$	$5,9 \pm 1,0$	2,36

клеток с криопротектором по двухэтапной программе замораживания не оказывает существенного влияния на ядро спермия, содержащее наследственную информацию. Этот вывод позволяет обосновать применение криоконсервированной спермы после оттаивания для искусственной инсеминации. Что касается патологической спермы, то было обнаружено достоверное снижение количества ДНК при олигоспермии с $4,1$ мг % Р в норме до $1,8$ мг % Р; при астеноспермии и тератоспермии — до $2,5$ мг % Р. Полученные данные подтверждают вывод о том, что морфологические

изменения становятся заметными позже, чем изменения в содержании ДНК [3]. Подвижность спермиев также сохраняется значительно дольше, чем оплодотворяющая способность.

Содержание РНК в норме и после криоконсервации в спермиях было несколько больше, чем ДНК: 4,9 мг% Р РНК по сравнению с 4,1 мг% Р ДНК в норме и 3,5 мг% Р по сравнению с 3,0 мг% Р после криоконсервации. В связи с этим можно предположить, что и в зрелых спермиях интенсивно идут обменные процессы и, в частности, синтез белков. При астено- и тератоспермии наблюдается тенденция к увеличению содержания РНК в сперме до 5,9 мг% Р, что может свидетельствовать о нарушении обмена или незрелости клеток. При олигоспермии, хотя абсолютное количество РНК не увеличивается по сравнению с нормой, однако соотношение РНК/ДНК резко изменяется — 2,66 против 1,19. При криоконсервации нормальной спермы это соотношение не нарушается и практически является таким же, как и в нативной сперме (1,17). Патологические же состояния резко нарушают это соотношение, которое при олиго-, астено- и тератоспермии больше 2,0.

Таким образом, криоконсервирование нормальной семенной жидкости существенно не влияет на содержание нуклеиновых кислот в сперме человека, а при олиго-, астено- и тератоспермии отмечается достоверное снижение содержания ДНК и увеличение соотношения РНК/ДНК. Это дает возможность использовать определение количества ДНК и соотношение нуклеиновых кислот РНК/ДНК в качестве тестов, указывающих на полноценность и, вероятно, оплодотворяющие свойства эякулята, а также сохранность содержимого ядра спермиев. Эти тесты могут использоваться при определении качества эякулята для инсеминации, а также при подборе криопротекторов и режимов криоконсервации спермиев.

1. Климов Н. М., Коромыслов Г. Ф. Метод количественного определения нуклеиновых кислот в крови, ее компонентах и тканях животных // Бюл. Всесоюз. ин-та экспериментальной ветеринарии. — 1970. — Вып. VIII. — С. 143—148.
2. Кононов В. П. Нуклеиновые кислоты спермиев хряков при замораживании / Докл. ВАСХНИЛ. — 1980. — № 7. — С. 34—36.
3. Кунин М. А. Бесплодие в браке. М., 1973. — 232 с.
4. Шергин Н. П. Биохимия сперматозоидов сельскохозяйственных животных. — М. : Колос, 1967. — 240 с.
5. А. с. 1103837 СССР, МКИ³ А 01 № 1/00. Способ консервирования спермы человека / В. И. Грищенко, Н. С. Пушкар, Ю. С. Парашук и др. — Оpubл. 23.07.84, Бюл. № 27.
6. Meyhoffer W. Mikrospektrophotometrische Massungen des Nucleinsauregehaltes von Spermien fertiler und infertiler Manner // Arch. Klin. exp. Derm. — 1963. — 216, N. 5. — S. 556—561.
7. Rao B. R., Chanhani B. M., Jairam B. T., Pandey J. N. Nucleic acid composition in the semen of paly and corridali breeds of rams // Indian Vet. J. — 1983. — 60, N10. — P. 855—856.

Харьковский медицинский ин-т

Поступила 02.12.85

УДК 615.2/3—616.5.001—615.832.93

Э. Н. Солошенко

НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЕ ЛЕЧЕНИЕ В ДЕРМАТОЛОГИИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ БОЛЕЗНИ, ХОЛОДОВОЙ АЛЛЕРГИИ И КРАПИВНИЦЫ

Сведения о целесообразности использования гипотермии для подавления аллергических реакций носят противоречивый характер. С одной стороны, имеются данные о том, что под влиянием общего охлаждения развивается поражение коллагенового комплекса соединительной ткани и наступает аутоиммунизация организма продуктами его распада [1]. С другой стороны, известно, что в состоянии гипотермии подавляются все звенья ме-

ханизмов патологических процессов, изменяются свойства патогенного агента, уменьшается степень первичного повреждения тканей, угнетаются нервные и гуморальные механизмы генерализации патологических процессов, то есть патологические процессы предотвращаются и ослабляются [2]. Кроме того, имеются данные о воздействии низких температур на адаптационные механизмы организма через гипоталамо-гипофизарно-надпочечную систему [3]. Поэтому поиск немедикаментозных способов терапии в настоящее время является актуальной проблемой, особенно для больных лекарственной болезнью, а также холодовой аллергией и крапивницей, у которых, как правило, с помощью одних медикаментозных средств не удается достичь в короткие сроки клинической ремиссии и избавить этих больных от очередных рецидивов.

Лечение с помощью локальной гипотермии проведено 22 больным аллергическими дерматозами, из них 12 больным холодовой аллергией и крапивницей и 10 больным с кожными проявлениями лекарственной болезни. Контрольную группу составляли 18 больных лекарственной болезнью и 23 — холодовой аллергией и крапивницей, которые находились на лечении обычными десенсибилизирующими средствами. Возраст больных 23—58 лет. Способ лечения заключался в том, что больным лекарственной болезнью (при наличии у них полисенсibilизации и при сочетанном ее течении с холодовой аллергией), а также больным холодовой аллергией и крапивницей ежедневно в течение месяца осуществляли аппликации кусочков льда на дезинфицированную спиртом внутреннюю поверхность предплечья в ее нижней трети с постепенным увеличением экспозиции низкотемпературного воздействия. Курс лечения состоял из 30 сеансов: экспозиция льда с 1 до 10 мин, ежедневно увеличиваясь на 1 мин (10 сеансов); экспозиция льда в течение 10 мин (10 сеансов) и экспозиция льда с 10 до 1 мин, ежедневно уменьшаясь на 1 мин (10 сеансов). Одновременно с низкотемпературным воздействием назначали больным с целью выработки у них антигистаминного иммунитета и профилактики рецидивов введение гистаглобина по 2,0 мл подкожно 2 раза в неделю или по 2,0 мл подкожно через день.

В зависимости от индивидуальных особенностей организма больного и состояния его реактивности проводили при холодовой аллергии и крапивнице 2—5 курсов лечения по данной методике с интервалами между курсами в 2 мес, при лекарственной болезни — 1—2 курса.

Оценку эффективности терапии осуществляли на основании клинических данных и лабораторных иммунологических показателей, свидетельствующих о снижении степени сенсibilизации к медикаментам (при лекарственной болезни), повышении титров антигистаминного фактора сыворотки крови.

Во время лечения больным рекомендовали проводить общеукрепляющие процедуры, соблюдать гипоаллергическую диету. Накануне терапии санировали очаги хронической инфекции, обследовали желудочно-кишечный тракт. При наличии показаний одновременно проводили также десенсибилизацию бактериальными аллергенами (стрепто-стафиловакциной).

Анализ клинического наблюдения за больными, а также результаты лабораторных исследований свидетельствовали о том, что способ локальной гипотермии является более эффективным по сравнению с традиционным способом лечения больных холодовой крапивницей и аллергией обычными десенсибилизирующими средствами, а также больных лекарственной болезнью, особенно при непереносимости ими десенсибилизирующих средств, или методом выбора при назначении терапии при сочетанном течении лекарственной болезни и холодовой аллергии.

Эффективность лечения при комплексном назначении локальной гипотермии и парентеральным введением гистаглобина повышалась за счет сокращения сроков наступления клинического выздоровления, получения более стойкой клинической ремиссии, а также уменьшения числа рецидивов. Кроме того, указанный способ терапии позволял избегать развития аллергических реакций на лекарства в процессе проведения лечения, что чрез-

вычайно важно при наличии у большинства обследованных полисенсibilизации. Так, у больных холодовой крапивницей сроки наступления клинического выздоровления сокращались на 11 дней, а число рецидивов — на 60 %; у больных лекарственной болезнью сроки терапии сокращались на 4—5 дней, а число рецидивов — на 44 %. Показатели специфических иммунологических тестов (лимфобластической трансформации, реакции альтерации и агломерации лейкоцитов), свидетельствующие о снижении степени выраженности сенсibilизации к медикаментам у больных лекарственной болезнью, при назначении локальной гипотермии к периоду наступления клинического выздоровления либо нормализовались, либо имели тенденцию к нормализации, так же как и титры антигистаминного фактора сыворотки крови и другие показатели, характеризующие неспецифические факторы защиты организма (содержание иммуноглобулинов сыворотки крови, активность лизоцима, комплемента). Сдвиги в сторону нормализации показателей отмечали также и у больных холодовой крапивницей и аллергией, леченных указанным способом, в то время как при использовании традиционных десенсibilизирующих средств лабораторные показатели к периоду наступления клинического выздоровления или ремиссии, как правило, не возвращались к исходным данным.

Недостатком способа локальной гипотермии с использованием в качестве хладагента льда является отсутствие точной дозировки низкотемпературного воздействия, а также быстрое таяние льда и связанные с этим неудобства при проведении терапии. С целью устранения указанных недостатков в Харьковском НИИ дерматологии и венерологии опробован опытный образец терапевтического устройства для точечной и локальной гипотермии, которым можно легко осуществлять дозирование низкотемпературного воздействия в стационарных и амбулаторных условиях.

1. Аршанский Ш. М. Аллергические реакции у животных при общем охлаждении // Климатофизиологические проблемы Сибири и Дальнего Востока. Сб. материалов симпозиума (Новосибирск, май, 1970). Новосибирск, 1970. — С. 80—81.
2. Ахметбекова Х. А. Гипотермия и реактивность организма // Тр. Казан. НИИ онкологии и радиологии. — 1970. — 7. — С. 106—110.
3. Свигулис А. Воздействие физического фактора на иммунологическую реактивность организма // Реабилитация больных на курортах Литвы. — Вильнюс, 1973. — С. 186—189.

Харьковский НИИ дерматологии
и венерологии

Поступила 04.04.85

УДК 57.043 : 53.082.7

**Б. Я. Шпиченецкий, М. Е. Унксов, А. Г. Иванов,
В. И. Кирпатовский, Н. А. Онищенко**

ХАРАКТЕР КРИСТАЛЛИЗАЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ В ЗАМОРАЖИВАЕМЫХ ОРГАНАХ

Для выбора режима низкотемпературной консервации органов необходим послойный контроль процесса кристаллизации с целью обеспечения наиболее равномерного замораживания по всему объему органа. Для исследования процесса кристаллизации в биообъектах используются следующие методы: микроскопическое наблюдение динамики замораживания в поляризованном свете, электрометрические исследования изменения удельного электрического сопротивления, снятие термограмм в различных зонах ткани [1]. При микроскопическом исследовании может быть изучен процесс кристаллизации только на поверхности объекта, измерение удельного электрического сопротивления позволяет оценить динамику процесса кристаллизации и соотношение твердой и жидкой фаз интегрально по всему объему

исследуемого объекта, а термограммы не позволяют судить о динамике процесса кристаллизации, так как во время перехода основной массы воды в лед температура остается постоянной.

Для решения поставленной задачи нами была разработана методика послойного исследования кристаллизационных процессов в замораживаемых органах электрометрическим методом. Для этой цели в различные слои органа от периферии к центру вводятся игольчатые коаксиальные электроды и с их помощью в процессе замораживания одновременно регистрируются электрические параметры отдельных слоев органа. Размеры электродов значительно меньше размеров исследуемого объекта, поэтому они не вызывают существенного изменения теплофизических параметров органа. Электрическое поле, параметры которого подлежат измерению, локализовано в объеме не более 1 мм^3 .

Конструкция игольчатого коаксиального электрода, применяемого для измерения импеданса коркового слоя почки с целью исследования консервации органа, описана в работе [2]. Игольчатый коаксиальный электрод представляет собой тонкую металлическую трубку диаметром $0,8 \text{ мм}$, покрытую внутри и снаружи слоем диэлектрика, с помещенным в ней тонким металлическим стержнем диаметром $0,2 \text{ мм}$, не имеющим электрического контакта с трубкой, конец которого выступает из нее на $0,2 \text{ мм}$. Концы трубки защищены.

Таким образом, при размерах биообъекта порядка $3 \cdot 10^4 \text{ мм}^3$ зонд не вносит существенных искажений в температурное поле биообъекта. Так как клеточная ткань не является гомогенной средой, а представляет собой структуру со сложной архитектурой, то каждая клетка является самостоятельным центром кристаллизации. Введение в клеточную структуру новых центров кристаллизации (зондов) незначительно влияет на динамику процесса кристаллизации в клеточной ткани при замораживании.

Для проверки степени влияния электрода на процесс кристаллизации были проведены эксперименты с образцами из разных материалов различных размеров. В однородных средах электрод является центром кристаллизации, и кристаллы растут вокруг него, однако в мелкодисперсных средах, характерный размер которых на порядок меньше размеров электрода (например, в крови), инициаторами кристаллизации являются острые края электрода. После их полировки активный рост кристаллов на электроде прекратился, что позволяет сделать вывод о незначительном влиянии электродов на процесс кристаллизации в мелкодисперсной среде.

Игольчатые коаксиальные электроды подсоединяются к импедансометру ВМ-507. В качестве измеряемой величины был выбран угол диэлектрических потерь (φ), измеряемый на частоте 10 кГц . Выбор этого параметра обусловлен тем, что в процессе кристаллизации угол потерь регистрируется в одном измерительном диапазоне прибора. Максимальные изменения φ наблюдались на частоте 10 кГц в пределах от 5 до -90°C . По расчетам авторов [2] поляризация игольчатых электродов на частоте 10 кГц существенно не влияет на импедансные характеристики. Для проверки этого предположения нами были проведены измерения φ с различными диаметрами трубки ($d = 0,8 - 3 \text{ мм}$) и выступающей частью $0,2 - 2 \text{ мм}$. Результаты измерений с разными электродами близки на частотах выше 5 кГц , но с повышением частоты уменьшается информативность измерений, поэтому выбрана частота 10 кГц , на которой поляризации электродов не наблюдалось.

После насыщения криопротектором, в качестве которого использовался 10% -ный раствор диметилсульфоксида (ДМСО), орган помещался в контейнер из оргстекла. В центральный и корковый слои исследуемого органа вводились игольчатые коаксиальные электроды. Исследования проводились на почках собак и белых крыс. Контейнер с органом помещался в камеру замораживателя программного биообъектов ЗПБ 1.00.00.00. Контроль за выполнением режима замораживателя велся с помощью термосопротивления, помещенного в контейнер с раствором криопротектора, в котором находился орган. Угол диэлектрических потерь φ в разных зонах органа и темпера-

тура в контейнере регистрировались с помощью многоточечного потенциометра КСП-4.

Исследования проводились при скоростях замораживания: на I-м этапе (до кристаллизации раствора криопротектора) от 1 °С/мин до 6 °С/мин и на II-м этапе — 10 °С/мин. Температура перехода на II-й этап замораживания составляла —9 °С, что соответствовало температуре кристаллизации 10 %-ного раствора ДМСО. При каждой скорости замораживания на I-м этапе было проведено 5 циклов замораживания почек собак и крыс. Кривые зависимости угла диэлектрических потерь в поверхностной 1-й и центральной 2-й зонах почки от времени ее замораживания τ при скорости замораживания на I-м этапе 5 °С/мин, а на II-м этапе 10 °С/мин приведены на рис. 1. Здесь t_1 — время начала кристаллизации в поверхностном слое, t_2 — время начала кристаллизации в центральном слое, Δt — запаздывание начала кристаллизации в центре относительно поверхности, Δt_{cp} —

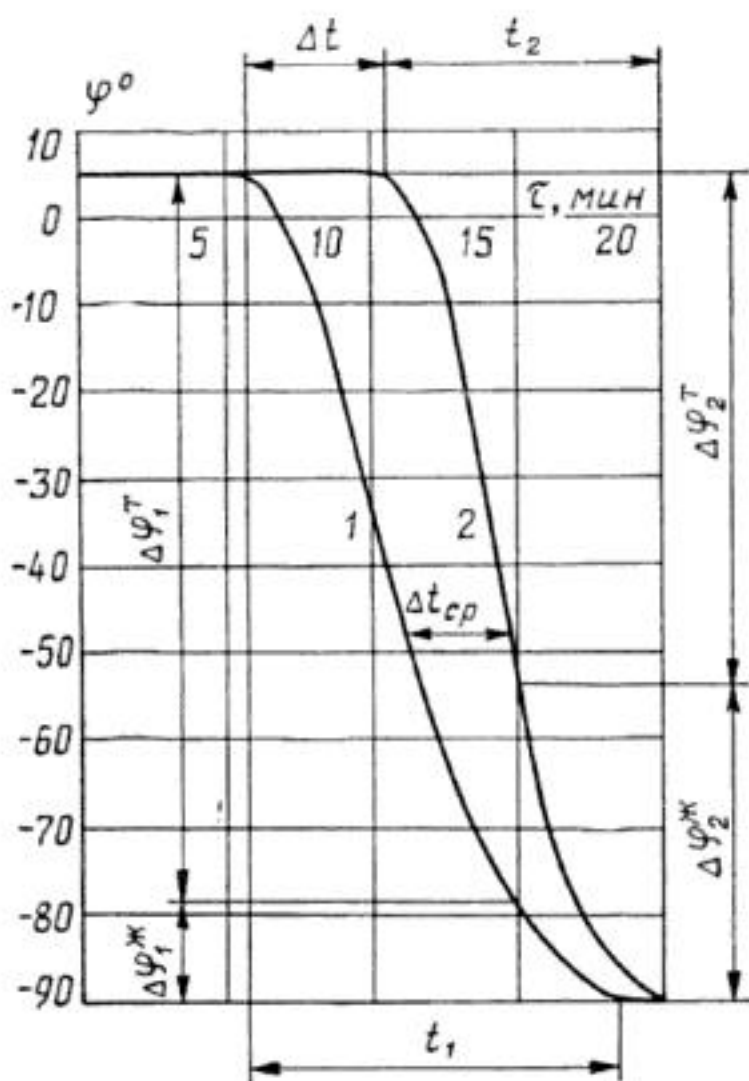


Рис. 1. Зависимости угла диэлектрических потерь φ в поверхностной (1) и центральной (2) зонах почки от времени замораживания τ .

запаздывание в середине петли, образованной кривыми, снятыми в поверхностном и центральном слоях. Плавный характер кривых связан с существованием двух структур воды: тетрагональной (льдоподобной) и плотноупакованной. Аномально высокая теплоемкость воды также связана с существованием этих двух структур, т. е. при подводе энергии к водосодержащему телу большая ее часть расходуется на фазовые переходы кристаллической структуры в плотноупакованную. При охлаждении наблюдается обратный переход, таким образом, отвод энергии затруднен. Большая крутизна кривой зависимости в центральной зоне объясняется тем, что энергия, выделяющаяся при кристаллизации, легче передается к периферийным слоям от центральных, чем отбирается от периферии, в связи со сравнительно малой теплопроводностью внешней среды; поэтому время окончания кристаллизации в центральной зоне отстает от времени окончания кристаллизации на периферии меньше, чем соответствующие времена начала кристаллизации.

По кривым зависимости угла диэлектрических потерь в определенной зоне органа от времени замораживания можно качественно оценить соотношение объемов твердой и жидкой фаз (V_T и $V_{ж}$) в любой момент времени кристаллизации. Оно соответствует соотношению отрезков ординат этой зависимости в области кристаллизации, т. е. $\frac{V_{ж}}{V_T} \approx \frac{\varphi_T - \varphi(t)}{\varphi(t) - \varphi_{ж}}$, где $\varphi_T = -90^\circ$, $\varphi_{ж} = 5^\circ$, $\varphi(t)$ — текущее значение угла диэлектрических потерь. Результаты импедансометрических и микроскопических исследований показывают, что приведенное соотношение отражает реальное с точностью 10 %.

На рис. 1: $\Delta\varphi_1^T$ — ордината зависимости в момент времени t , соответствующая твердой фазе в поверхностном слое; $\Delta\varphi_1^Ж$ — ордината зависимости в момент времени t , соответствующая жидкой фазе в поверхностном слое; $\Delta\varphi_2^T$ и $\Delta\varphi_2^Ж$ соответствующие ординаты для центрального слоя. Например, для момента времени $t = 15$ мин замораживания со скоростью 5 °С/мин на I-м этапе для почки крысы $\Delta\varphi_1^T = 78^\circ$, $\Delta\varphi_1^Ж = 17^\circ$, $\Delta\varphi_2^T = 42^\circ$, $\Delta\varphi_2^Ж = 53^\circ$, что свидетельствует о том, что в данный момент времени в поверхностной зоне преобладает твердая фаза, а в центральной — жидкая фаза.

Описанная методика дает возможность выбора режима замораживания, обеспечивающего более равномерное охлаждение по всему объему органа. Для этого необходимо выбрать такую скорость охлаждения, чтобы уменьшить площадь петли, ограниченную кривыми зависимости угла φ от времени охлаждения τ в центральной и поверхностной зонах, т. е. задача заключается в минимизации Δt и $\Delta t_{\text{ср}}$. Для этой цели были проведены экспериментальные исследования зависимости параметров кристаллизации t_1 , t_2 , Δt , $\Delta t_{\text{ср}}$ от скорости замораживания на I-м этапе путем обработки кривых зависимости угла φ от времени охлаждения τ , полученных при разных скоростях охлаждения на I-м этапе.

Зависимости параметров кристаллизации t_1 , t_2 , Δt , $\Delta t_{\text{ср}}$ в почках белых крыс от скорости замораживания v на I-м этапе представлены на рис. 2. Графики $t_1 = f(v)$ и $t_2 = f(v)$ построены путем математической обработки соответствующих кривых. При небольших (до 3 °C/мин) скоростях охлаждения наблюдается значительное ускорение процесса кристаллизации поверхностного слоя с ростом скорости охлаждения, однако при дальнейшем увеличении скорости охлаждения зависимость становится менее выраженной.

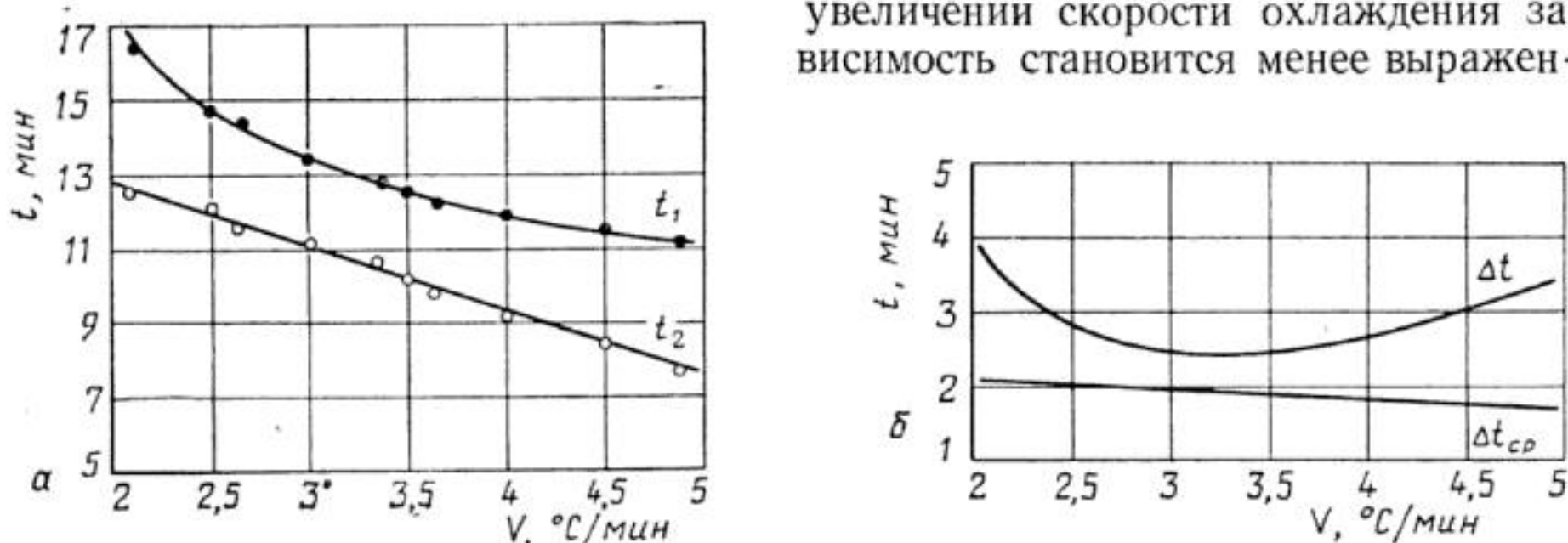


Рис. 2. Зависимости параметров кристаллизации t_1 , t_2 (а); Δt , $\Delta t_{\text{ср}}$ (б) в почке от скорости замораживания до кристаллизации V .

ной, что является результатом экранирования быстrokристаллизующегося поверхностного слоя. Время кристаллизации в центральной зоне приблизительно линейно зависит от скорости охлаждения. Это связано с тем, что тепловой поток пропорционален скорости изменения температуры. Соответственно $\Delta t = t_1 - t_2$ имеет минимум для скорости охлаждения 3 °C/мин. Эта скорость и является оптимальной для начала кристаллизации. Для дальнейшего охлаждения с момента начала кристаллизации большое значение приобретает параметр $\Delta t_{\text{ср}}$, описывающий энергетику процесса кристаллизации. Как видно из рис. 2, уменьшения $\Delta t_{\text{ср}}$ можно добиться увеличивая скорость замораживания v , однако при этом возрастает Δt , т. е. процесс кристаллизации в центре органа значительно запаздывает по отношению к поверхности, что приводит к неоднородности образующейся кристаллической структуры и появлению добавочных напряжений, к повреждению ткани. При приближении $\Delta t_{\text{ср}}$ к Δt , что наблюдается при скоростях замораживания близких к 3 °C/мин, протекание процессов кристаллизации в разных слоях органа осуществляется с минимальным запаздыванием, и, следовательно, в этом случае кристаллизация происходит наиболее равномерно по всему объему органа. Необходимо было бы также измерить время запаздывания окончания кристаллизации в центральной зоне относительно периферической, что однако затруднено недостаточным разрешением и малой крутизной зависимости угла диэлектрических потерь от времени вблизи значений $\varphi = -90^\circ$.

Таким образом, можно сделать следующие выводы:

- регистрация зависимостей угла диэлектрических потерь от времени охлаждения в разных слоях (зонах) органа позволяет исследовать динамику кристаллизационных процессов в этих зонах;
- по соотношению отрезков ординат этой зависимости в любой момент

времени кристаллизации можно оценить соотношение твердой и жидкой фаз в исследуемом слое в данный момент времени;

— определяя по установленным зависимостям параметры кристаллизации в разных слоях органа при различных режимах замораживания, можно выбрать режим, обеспечивающий более равномерное замораживание по всему объему органа;

— для почек белых крыс скорость замораживания до кристаллизации, обеспечивающая наиболее равномерное замораживание, составляет 3 °С/мин.

1. Пушкарь Н. С., Белоус А. М., Иткин Ю. А. и др. Низкотемпературная кристаллизация в биологических системах. — Киев: Наук. думка, 1977. — 243 с.
2. Fourcade C., Chighier E., Barbier M. et. al. Application de l'impedance tissulaire à l'étude de la conservation de rein // Unite de Recherche d'INSERM. — 1978. — P. 133—138.

Всесоюзный заочный машиностроительный ин-т,
г. Москва,
Научно-исследовательский ин-т
трансплантологии и искусственных органов, г. Москва

Поступила 06.05.86

УДК 541.128 : 547.962

А. И. Осецкий

ОСОБЕННОСТИ КИНЕТИКИ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ В СРЕДЕ ВЯЗКИХ ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

Общую схему ферментативной реакции можно представить в виде нескольких последовательных этапов:



включающих в себя диффузионное сближение субстрата и фермента в растворе, образование фермент-субстратного комплекса, превращение субстрата в продукт и диффузионное удаление продукта от активного центра фермента. Каждый из этих этапов является термоактивируемым процессом и характеризуется определенной энергией активации. Если реакция не диффузионно-контролируемая, таким этапом, как правило, является образование фермент-субстратного комплекса, что характерно для начальных стадий реакций с достаточно высокой концентрацией субстрата. В этом случае влияние среды на кинетику протекающей в ней реакции сводится к рассмотрению влияния различных свойств раствора на эффективную энергию активации Q^* , контролируемую конформационную подвижность фермента. Величину Q^* можно записать как

$$Q^* = Q_0 + Q_e + Q_\eta, \quad (1)$$

где Q_0 — высота усредненного потенциального барьера, разделяющего исходную и конечную конформации фермента в процессе образования фермент-субстратного комплекса $[ES]$; Q_e и Q_η — электростатическая и диссипативная составляющие эффективной энергии активации, определяемые соответствующими свойствами растворителя.

Если активируемые фрагменты молекулы несут некоторый электрический заряд, для их смещения в процессе конформационного перехода требуется дополнительная энергия Q_e , затрачиваемая на преодоление сил электростатического взаимодействия. Естественно, что такое взаимодействие в молекуле носит довольно сложный характер. Однако считается [1, 7], что в большинстве случаев его можно упростить, сведя ситуацию к взаимодействию отдельных молекулярных комплексов, обладающих суммарными электрическими зарядами z_1e и z_2e и смещающихся друг относительно друга на характерное для каждого конкретного случая расстояние $\Delta d = d_f - d_0$. В результате величину Q_e можно определить,

$$Q_e \simeq \pm \frac{z_1 z_2 e^2 \Delta d}{d_f d_0} \frac{1}{\epsilon}, \quad (2)$$

где e — заряд электрона; z_1 и z_2 — целые числа, обозначающие число зарядов в каждом комплексе; d_0 и d_f — начальное и конечное расстояния между смещающимися комплексами; ϵ — диэлектрическая проницаемость растворителя и знак (+) соответствует разноименным зарядам.

Для целого ряда реакций, в том числе и катализируемых ферментами, проведенные с помощью (2) оценки вполне удовлетворительно согласуются с экспериментом. Подгоночный параметр $|d_f d_0 / \Delta d z_1 z_2|$ лежит при этом в пределах $(2-6) \cdot 10^{-8}$ см [7].

В свою очередь, появление диссипативной составляющей Q_η в (1) связано с весьма тонким дисбалансом процессов теплообмена активированной молекулы фермента со средой [4]. В его основе лежит тот факт, что флуктуационные смещения отдельных фрагментов биомолекулы реализуются достаточно быстро [2] за счет энергии теплового движения составляющих ее атомов [4] и лежат в пределах $10^{-9}-10^{-7}$ см [2, 5], т. е. в среднем составляют величину $\langle h_f \rangle \simeq 10^{-8}$ см. Эти обстоятельства приводят к тому, что в момент образования фермент-субстратного комплекса взаимодействие фермента со средой определяется двумя конкурирующими процессами. С одной стороны, происходит непрерывная потеря энергии молекулой фермента за счет эффектов, близких к эффекту вязкого трения. Поскольку такая потеря сопровождается уменьшением средней энергии теплового движения атомов активируемой биомолекулы, с другой стороны, включаются релаксационные процессы, заключающиеся в передаче энергии от частиц среды к этим атомам.

В силу того, что время развития конформационной флуктуации t_f сравнимо с полупериодом тепловых колебаний атомов фермента, а время полной релаксации к начальному равновесному состоянию t_R составляет как минимум несколько периодов тепловых колебаний частиц среды, т. е. выполняется условие $t_R > t_f$ и возникают отличные от нуля значения диссипативной составляющей Q_η . В данном случае нас интересует энергия Q_η , которую молекула фермента обратимо теряет в результате рассмотренного энергообмена с ближайшими атомарными слоями среды к моменту достижения вершины потенциального барьера реакции. Точный расчет величины Q_η представляет собой отдельную сложную задачу. Поэтому здесь мы ограничимся лишь относительно простой оценкой, вполне достаточной для сравнения получаемых на основании развиваемой модели результатов с экспериментом. Определяя, в рамках этой оценки, диссипируемую биомолекулой в процессе перехода из основного в активируемое состояние энергию с помощью закона Стокса и характеризуя эффективность релаксационных процессов с помощью коэффициента

$$j = 1 - \frac{t_f}{t_R}, \quad (3)$$

для величины Q_η получим:

$$Q_\eta = j \varphi \eta \langle v_f \rangle l_f \langle h_f \rangle. \quad (4)$$

Здесь $\langle v_f \rangle = \langle h_f \rangle / t_f$ — средняя скорость смещения отдельных фрагментов каталитического центра фермента в процессе конформационной флуктуации, l_f — общая длина этих фрагментов, φ — коэффициент, учитывающий их форму, η — вязкость среды.

Ферментативный катализ в среде вязких криопротекторов. Полученные для Q_η и Q_e соотношения позволяют проанализировать влияние вязкости растворов на кинетику протекающих в них ферментативных реакций. Пусть скорость такой реакции, протекающей в водном растворе при комнатной температуре, характеризуется на начальной стадии, когда она является заведомо не диффузионно-контролируемой, константой скорости K_{vl} . В этом случае изменение вязкости раствора за счет введения криопротекторных веществ от значения η_1 до значения $\eta_2 = \eta_1 + \Delta\eta$ приводит, согласно (4), к увеличению эффективной энергии активации рассматриваемой реакции на

$$\Delta Q_\eta^* = \Delta Q_\eta = j \varphi \Delta\eta \langle v_f \rangle l_f \langle h_f \rangle. \quad (5)$$

При комнатных температурах (300 — 290 К) и 30 — 50 %-ных добавках криопротекторов на основе глицерина, этиленгликоля, 1,2-пропандиола величина $\Delta\eta$ не превосходит 3 — 5 сП. Поэтому, принимая характерные для рассматриваемых ферментов и водно-органических растворов значения входящих в выражение (5) параметров, а именно: $j \simeq 0,1$; $\varphi \simeq 1$; $\langle v_f \rangle \simeq 10^4$ см/с; $\langle h_f \rangle \simeq 10^{-8}$ см; $l_f \simeq 5 \cdot 10^{-7}$ см, получим значения ΔQ_η порядка 2 — 3 ккал/моль.

Одновременно добавки криопротекторов вызывают изменение диэлектрической проницаемости находящегося при комнатной температуре раствора от значения ϵ_1 до значения $\epsilon_2 = \epsilon_1 - \Delta\epsilon$, т. е., согласно (2), приводят к изменению электростатической составляющей энергии активации на величину

$$\Delta Q_\epsilon = \Delta Q_\epsilon^* = \frac{z_1 z_2 e^2 \Delta d}{d_f d_0} \left(\frac{\Delta\epsilon}{\epsilon_1 \epsilon_2} \right). \quad (6)$$

Для рассматриваемых концентраций криопротекторов $\Delta\epsilon \simeq 10$, что при $\Delta d \leq d_0$ и $d_f \simeq 5 \cdot 10^{-8}$ см приводит к значениям ΔQ_ϵ порядка 0,4 — 0,5 ккал/моль. В результате, определяя суммарное ингибирующее действие криопротектора как

$$\ln \frac{K_{v1}}{K_{v2}} = \frac{\Delta Q_\eta + \Delta Q_\epsilon}{kT_1}, \quad (7)$$

где K_{v1} и K_{v2} — значения константы скорости реакции до и после добавления в раствор криопротектора, T_1 — температура, k — постоянная Больцмана, для $\ln K_{v1}/K_{v2}$ при $T_1 = 280$ — 300 К и $\Delta Q_\epsilon > 0$, получим значения в интервале от 2 до 5. Эти значения достаточно хорошо согласуются с результатами, полученными при добавлении этиленгликоля и глицерина в растворы, в которых протекали реакция разложения перекиси водорода, катализируемая каталазой [3], реакция гидролиза карбоксибензила-*L*-аланила-*L*-аланила-*L*-аланина, катализируемая карбоксипептидазой А [7], и другие [2]. Так, например, при добавлении при 4 °С в раствор, где протекал процесс связывания камфоры с ферри-формой цитохрома P_{450} , до 50% этиленгликоля, константа скорости реакции уменьшалась в 200 раз [3]. Поскольку проведенные при этом дополнительные исследования показали, что такие добавки этиленгликоля конформацию цитохрома не изменяют [3], объяснить столь сильное ингибирование реакции можно только предположив экспоненциальную зависимость K_v от η . В частности, проведенные оценки показывают, что влияние на скорость реакции скачков диэлектрической проницаемости раствора, возникающих при добавлении криопротекторов, слабее, чем влияние протекающего одновременно процесса увеличения вязкости. Поэтому выделить электростатические эффекты из общего ингибирующего действия органических добавок иногда не удастся [3].

Проанализируем теперь температурную зависимость ферментативных реакций в среде криопротекторов в интервале температур $T_1 \simeq (30)^\circ\text{C}$ — $T_2 \simeq (-50)^\circ\text{C}$ и ниже. Особый интерес эта зависимость представляет в рассмотренном выше и типичном для большинства биохимических реакций случае, когда при комнатной температуре уменьшение диэлектрической проницаемости растворителя за счет добавления криопротектора приводит к увеличению энергии активации реакции [3, 7], т. е. при $\Delta Q_\epsilon > 0$. При последующем понижении температуры от $T_1 = T_{\text{комн}}$, как правило, наблюдается достаточно сильный рост величины ϵ , что должно вызывать соответствующее уменьшение электростатической составляющей энергии активации реакции Q_ϵ . Так, при изменении ϵ по закону [3]:

$$\epsilon = c_1 \exp(c_2 - c_3 T), \quad (8)$$

для Q_ϵ имеем

$$\ln Q_\epsilon \sim c_3 T, \quad (9)$$

где c_1 , c_2 и c_3 — постоянные величины.

В результате в отсутствие флуктуационно-диссипативных эффектов, т. е. при $Q_\eta = 0$, скорость реакции будет уменьшаться с понижением температуры значительно слабее, чем это предсказывает классическое уравнение Аррениуса:

$$K_v = K_{v0} \exp\left(-\frac{Q_0}{kT}\right), \quad (10)$$

причем разница между теоретической зависимостью и экспериментом должна возрастать по мере увеличения интервала охлаждения $\Delta T = T_1 - T_2$ (рис. 1, б, штрих-пунктирная кривая). Характерно, что для компенсации этой разницы недостаточно относительно слабой предэкспоненциальной зависимости величины K_v от вязкости растворителя η , которую предсказывают модели, основанные на представлении о броуновском движении молекул в момент их химического взаимодействия [4, 7]. Такая компенсация

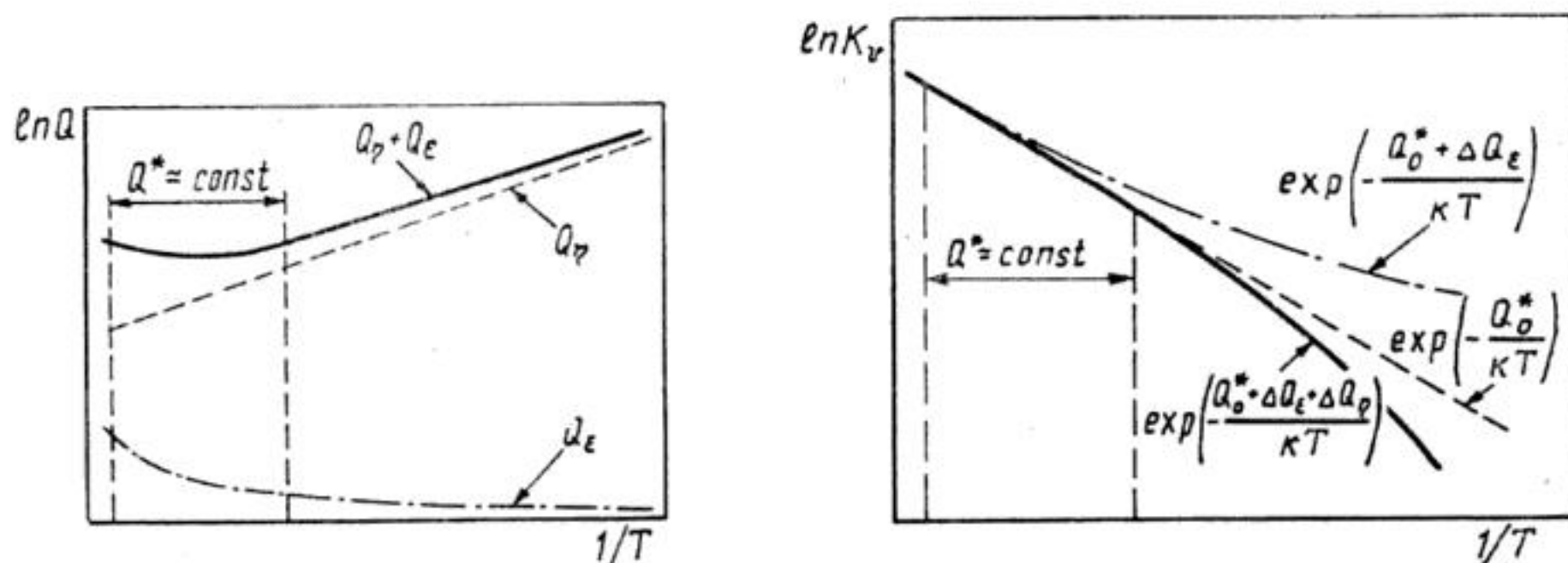


Рис. 1. (а, б). Типичные температурные зависимости параметров Q_η и Q_ϵ , входящих в эффективную энергию активации Q^* (а), и константы скорости реакции (б) для ферментативных реакций в среде водно-органических растворителей.

может происходить только в случае зависимости от вязкости η показателя экспоненты, что и дает рассмотренная в работе [4] модель:

$$K_v = K_{v0} \exp\left(-\frac{Q_0 + Q_\epsilon + Q_\eta}{kT}\right). \quad (11)$$

В рамках этой модели при экспоненциальной зависимости величины η от температуры [3]

$$\eta \simeq a_1 \exp(a_2/T), \quad (12)$$

для слагаемого Q_η можно записать

$$\ln Q_\eta \sim a_2/T, \quad (13)$$

где a_1 и a_2 — постоянные величины.

Типичная зависимость величин $Q_\eta(T)$ и $Q_\epsilon(T)$, а также их суммы ($Q_\eta + Q_\epsilon$) от температуры схематически показана на рис. 1, а. Видно, что в начальный момент охлаждения увеличение диссипативной составляющей энергии активации реакции может компенсироваться соответствующим уменьшением электростатического слагаемого, так что величина Q^* в некотором интервале температур практически остается величиной постоянной. При более низких температурах влияние флуктуационно-диссипативных эффектов становится более существенным, что приводит к непрерывному увеличению параметра Q^* с понижением температуры. Соответствующая такому изменению величины $Q^*(T)$ зависимость $K_v(T)$ показана на рис. 1, б сплошной кривой. На рис. 2, а, б представлены экспериментально полученные в работах [3, 7] зависимости $K_{ve}(T)$ для ряда ферментативных реакций. Совпадение экспериментально полученных кривых $K_{ve}(T)$ с теоретически рассчитанными с учетом флуктуационно-диссипативных эффектов зависимостями (сплошная кривая на рис. 1, б)

наглядно демонстрирует достаточно сильное влияние вязкости растворителя на скорость низкотемпературных ферментативных реакций.

Здесь следует отметить, что зависимость от температуры входящих в эффективную энергию активации Q^* слагаемых Q_η и Q_e может приводить к существенным ошибкам при экспериментальном определении высоты потенциального барьера реакции $U_0 \equiv Q_0$, особенно в области температур, где выполняется условие $\Delta Q_\eta \gg \Delta Q_e$. Действительно, согласно выражению (11), экспериментально определяемая энергия активации реакции равна:

$$Q_e^* = \frac{T_1 T_2}{\Delta T} \ln \frac{K_{v1}}{K_{v2}} = Q_0 + (Q_{\eta 1} + Q_{e1}) + \frac{T_1}{\Delta T} (\Delta Q_\eta + \Delta Q_e), \quad (14)$$

где $\Delta T = T_1 - T_2$; $\Delta Q_\eta = Q_{\eta 2} - Q_{\eta 1}$; $\Delta Q_e = Q_{e2} - Q_{e1}$; K_{v1} , $Q_{\eta 1}$, Q_{e1} — значения параметров K_v , Q_η и Q_e при температуре T_1 ; K_{v2} , $Q_{\eta 2}$, Q_{e2} — значения этих же параметров при температуре $T_2 < T_1$. Из выражения (14) и проведен-

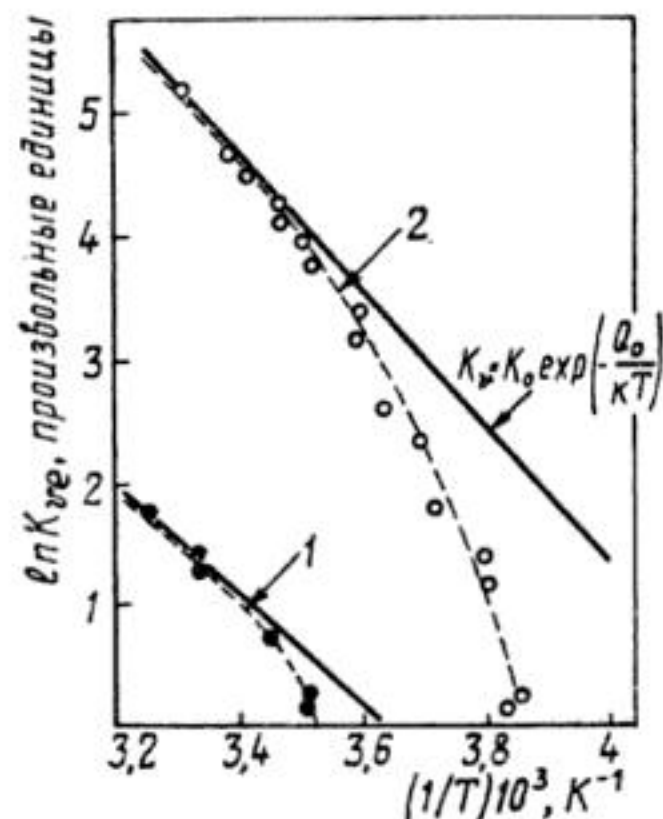
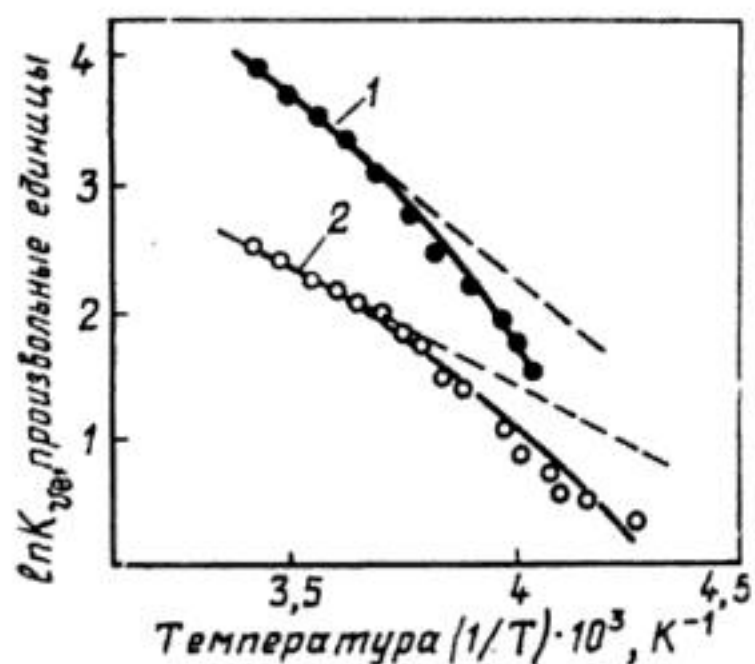


Рис. 2 (а, б.) Экспериментально полученные температурные зависимости констант скоростей реакций $K_{ve}(T)$ для а) катализируемого флавопротеином восстановления феррицианида под действием НАД-Н-цитохром- b_5 -редуктазы (кривая 1) [3] и катализируемого пероксидазой окисления гваякола перекисью водорода (кривая 2) [3]; б) катализируемого карбоксипептидазой А гидролиза карбоксибензила- L -аланил- L -аланил- L -аланина [$z(L-Ala)_3$] (кривая 1) [7] и ассоциации камфоры с ферри-формой цитохрома P_{450} (кривая 2) [3].

ных выше оценок следует, что для протекающих в присутствии криопротекторов ферментативных реакций величину Q_0 с достаточной степенью точности можно определить только в тех температурных интервалах, где выполняются условия $Q_0 \gg Q_\eta$ и $\Delta Q_\eta \simeq |\Delta Q_e|$. Так, для рассмотренных выше криопротекторов значения параметров Q_η и ΔQ_η в интервале температур 280—300 К не превышают 2—4 ккал/моль, что сравнимо с экспериментальными погрешностями при определении энергии активации. Однако уже в интервале температур 230—260 К вязкость большинства растворителей на основе криопротекторов при понижении температуры на 10—15 К возрастает на 10—15 сПз, что приводит к значениям слагаемых Q_η и $T_1/\Delta T (\Delta Q_\eta + \Delta Q_e)$ в выражении (14) порядка 10—20 ккал/моль и выше. В результате экспериментально определяемые без учета диссипативных эффектов значения Q_0 могут существенно отличаться от истинных. Так, например, если реакция катализируемого флавопротеином восстановления феррицианида протекает в 50 %-ном водном растворе этиленгликоля, то ее энергия активации Q^* , определенная в интервале температур 275—290 К, составляет ~ 14 ккал/моль [3]. Если же определить энергию активации этой реакции в интервале температур 240—250 К, она будет составлять ~ 30 ккал/моль [3] (рис. 2, а, кривая 1). Естественно, что столь сильное увеличение Q^* связано не с изменением высоты потенциального барьера реакции $U_0 \equiv Q_0$, а с ростом диссипативной составляющей Q_η за счет увеличения вязкости среды. То же самое относится и к протекающим в аналогичных рас-

творам реакциям, а именно: ассоциации камфоры и ферри-формы цитохрома P_{450} , где при переходе от интервала температур 280—300 К к интервалу 260—275 К энергия активации реакции увеличивается от 11 ккал/моль до 21 ккал/моль [3] (рис. 2, б, кривая 2), реакции катализируемого пероксидазой окисления гваякола, в процессе которой понижение температуры от 270—280 К до 250 К сопровождается увеличением энергии активации реакции от 4 ккал/моль до 9 ккал/моль [3] (рис. 2, а, кривая 2), и другим [2, 7]. Оценки показывают, что наблюдаемые изменения энергий активации реакций с понижением температуры коррелируют с температурной зависимостью вязкости растворов и вполне удовлетворительно описываются выражением (14), т. е. являются прямым следствием флуктуационно-диссипативных эффектов. Вместе с тем часто зависимость $Q^*(T)$ может быть вызвана изменением механизма реакции. Поэтому при изучении особенностей низкотемпературного ферментативного катализа необходим тщательный количественный анализ температурной зависимости кинетических кривых в каждом конкретном случае.

Влияние вязкости среды на конформационную подвижность биомолекул. Эффекты резкого замедления конформационной подвижности биомолекул за счет увеличения вязкости среды наглядно проявляются в опытах по абсорбционной гамма-резонансной спектроскопии и рэлеевскому рассеянию мессбауэровского излучения [2]. Типичные температурные зависимости доли упругого рэлеевского рассеяния мессбауэровского излучения f_R на молекулах сывороточного альбумина человека показаны на рис. 3. Согласно рис. 3, фактор f_R для 37 %-ного водного раствора сывороточного альбумина резко уменьшается в интервале температур 240—300 К и при комнатной температуре не превышает значения $2 \cdot 10^{-2}$. В настоящее время этот эффект однозначно связывается с влиянием вязкости среды на частоту W термоактивируемых конформационных перестроек исследуемых биомолекул, однако традиционные модели диффузионной активации [6] не позволяют объяснить его количественно. Так, например, добавление к двум частям исследуемого раствора одной части глицерина при комнатной температуре, что соответствует увеличению его вязкости в 3—4 раза (от 1 сП до 3—4 сП [3, 7]), приводит к увеличению f_R от $1,8 \cdot 10^{-2}$ до $5,3 \cdot 10^{-1}$, т. е. в 30 раз (рис. 3 [2]). Даже если предположить, что все условия диффузионного приближения в данном случае выполняются, получаемая на его основе предэкспоненциальная зависимость W от η явно слабее наблюдаемых экспериментально эффектов. Вместе с тем эти эффекты легко объяснить с точки зрения рассматриваемого здесь явления увеличения эффективной энергии активации Q^* , характеризующей флуктуационные переходы между конформационными состояниями, за счет увеличения вязкости среды. Учитывая, что при комнатной температуре, когда выполняется условие $t_\gamma \gg 1/W$, где $t_\gamma \simeq 1,4 \cdot 10^{-7}$ с — время жизни мессбауэровского ядра, выражение для f_R имеет вид

$$f_R \simeq f_0 \exp\left(\frac{Q^*}{kT}\right), \quad (15)$$

согласно (1) и (5) для отношения f_{R2}/f_{R1} можно записать:

$$f_{R2}/f_{R1} = \exp\left(\frac{\Delta Q_\eta}{kT}\right). \quad (16)$$

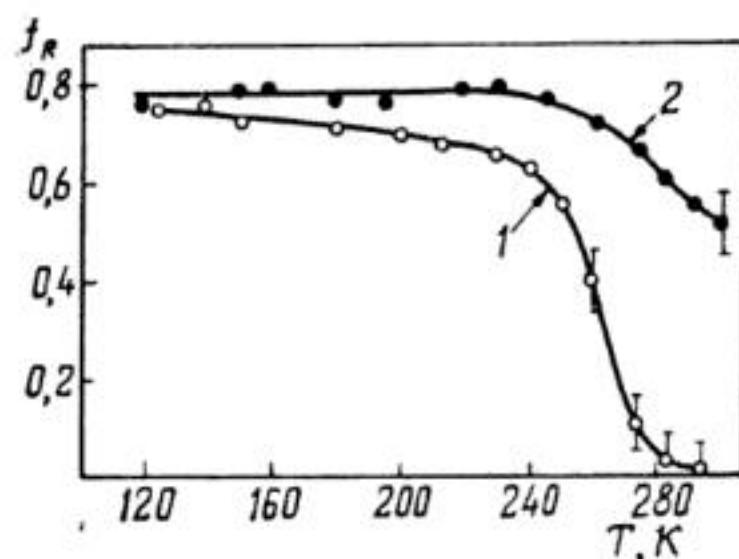


Рис. 3. Зависимости доли упругого рэлеевского рассеяния мессбауэровского излучения от температуры для различных образцов сывороточного альбумина человека [2]: 1 — 37 %-ный водный раствор сывороточного альбумина; 2 — водно-глицериновый (2 : 1) раствор сывороточного альбумина.

Здесь f_{R1} и f_{R2} — доли упругого рэлеевского рассеяния мессбауэровского излучения образцами сывороточного альбумина до и после добавления в исследуемый раствор глицерина соответственно; ΔQ_{η} — изменение эффективной энергии активации за счет флуктуационно-диссипативных эффектов.

При $T \simeq 300$ К и $\Delta Q_{\eta} \simeq 2$ ккал/моль, что, согласно (5), соответствует значениям $\Delta\eta \simeq 3$ сП, имеем $f_{R2}/f_{R1} \simeq 28$. Это вполне удовлетворительно согласуется с экспериментом [2].

Таким образом, совершенно аналогичное влияние вязкости среды на конформационную подвижность биомолекул и скорость не диффузионно-контролируемых ферментативных реакций убедительно показывает, что последняя определяется частотой флуктуационного изменения конформации активного центра фермента в процессе катализа. В свою очередь, экспоненциальная зависимость частоты этих изменений от вязкости среды означает, что их природа связана только с особенностями теплового движения составляющих биомолекулу атомов, а не частиц среды, как это предполагалось ранее.

В заключение следует отметить, что проведенный в [4] и настоящей работе анализ особенностей замедления криобиохимических реакций за счет флуктуационно-диссипативных эффектов позволяет сформулировать новые направления в криобиологических исследованиях. Первое связано с возможностью достаточно сильно ингибировать различные биохимические процессы за счет повышения вязкости среды, в которой они реализуются. Этот факт может лечь в основу принципиально новых способов консервирования биосистем. Второе обусловлено тем, что входящее в эффективную энергию активации ферментативной реакции слагаемое Q_{η} пропорционально величине $A^* = l_f \langle h_f \rangle$, представляющей собой так называемую активационную площадь, т. е. произведение общей длины смещающихся в процессе образования фермент-субстратного комплекса фрагментов активного центра на среднее расстояние их смещения. В свою очередь, параметр A^* , характеризующий собой структуру флуктуационных изменений конформации фермента в процессе катализа, можно легко определить из экспериментально измеряемых значений Q_e^* . В результате появляется возможность весьма эффективного исследования особенностей образования фермент-субстратных комплексов на основе анализа как величины активационной площади A^* , так и ее зависимостей от параметров, определяющих кинетику ферментативных реакций.

1. Амиц Э. Влияние растворителя на скорость и механизм химических реакций. — М. : Мир, 1968. — 328 с.
2. Гольданский В. И., Крупянский Ю. Ф., Фролов Е. Н. Роль конформационных под состояний в реакционной способности белковых молекул // Мол. биология. — 1983. — 17, № 3. — С. 532—542.
3. Дузу П. Криобиохимия. — М. : Мир, 1980. — 228 с.
4. Осецкий А. И. Влияние вязкости среды на скорость не диффузионно-контролируемых биохимических реакций // Криобиология. — 1986. — № 2. — С. 14—20.
5. Страйер Л. Биохимия. Т. 1 — М. : Мир, 1984. — 232 с.
6. Шайтан К. В., Рубин А. Б., Чернавский Д. С., Килячков А. А. Эффект Мессбауэра, конформационная подвижность и влажность белков // Биофизика. — 1981. — 26, № 2. — С. 228—232.
7. Gavish B., Werber M. M. Viscosity-dependent structural fluctuations in enzyme catalysis // Biochemistry. — 1979. — 18, N 7. — P. 1269—1275.

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

Поступила 18.07.85

ДЕЙСТВИЕ ИНГИБИТОРОВ АНИОННОГО ТРАНСПОРТА И ИОНОФОРОВ НА ПРОНИЦАЕМОСТЬ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ В ГИПЕРТОНИЧЕСКИХ СРЕДАХ

Реакция эритроцитов на повышение тоничности среды проявляется в начальном изменении объема и формы. В этих условиях потеря воды и трансмембранный обмен анионов осуществляются достаточно быстро, однако изменение характеристик катионного транспорта происходит лишь при нарушении структуры мембраны, когда в ней формируются дефекты. Критическим интервалом концентраций NaCl, выше которой наблюдается потеря ионов K^+ , является 0,7—0,8 М. Следует отметить, однако, что дополнительным фактором, способным вызвать освобождение ионов K^+ и обезвоживание клеток, является увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} — так называемый «эффект Гардоша». Указанный процесс зависит от клеточного фонда аденозин-3-фосфорной кислоты, а также от соотношения в среде электролитов и неэлектролитов.

С учетом изложенного нами были проведены эксперименты, в которых изучалось влияние модификаторов транспорта анионов (пиридоксаль-5-фосфат) и Ca^{2+} (ионофор А 23187) на характеристики пассивного транспорта ионов K^+ в гипертонических средах, включающих NaCl и сахарозу. Параллельно оценивалась взаимосвязь между начальными характеристиками проницаемости мембраны и чувствительностью эритроцитов к холодовому шоку при охлаждении в интервале 37—0 °С.

В работе использовалась донорская кровь. Эритроциты промывались трижды физиологическим раствором (150 мМ NaCl, 10 мМ — фосфатный буфер, pH 7,4). Плотный осадок (гематокрит 80 %) хранили при 0 °С. Холодовый шок проводили по методу [1]. Уровень гемолиза определяли спектрофотометрически при 420 нм. Обработка эритроцитов пиридоксальфосфатом проводилась по методу [2]. Концентрацию K^+ в среде определяли с помощью валиномицинового электрода.

Как показали проведенные эксперименты, в гипертонических средах уровень освобождения ионов K^+ существенно зависит от величины трансмембранного градиента анионов и скорости их обмена через анионтранспортную систему эритроцитов. В этих условиях ингибитор транспорта анионов пиридоксаль-5-фосфат, вызывающий обратимое пиридоксилирование лизиновых остатков белка-переносчика, снижал уровень освобождения ионов K^+ и величину гемолиза клеток при охлаждении от 37 до 0 °С. Эффект ингибитора особенно резко проявлялся в средах, содержащих неэлектролит (сахарозу), или с низким содержанием (NaCl).

Указанный эффект можно объяснить влиянием трансмембранного градиента анионов на мембранный потенциал, контролирующий транспорт катионов. Ингибирующий эффект пиридоксаль-5-фосфата наблюдался также при изменении pH среды, причем максимальный эффект ингибитора отмечен в безсолевой среде, включающей неэлектролит (0,86 М сахарозу). В последнем случае увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} с помощью ионофора А 23187 (в среде, содержащей 1 мМ $CaCl_2$) приводит к снижению уровня освобождения ионов K^+ . Резкое возрастание выхода ионов K^+ наблюдалось в клетках, освобожденных от ионов Ca^{2+} после обработки А 23187 и Са-комплексом ЭГТА. Подобная закономерность проявлялась и в средах с умеренной гипертонией (0,3 М NaCl). При нагружении клеток ионами Ca^{2+} наблюдалось снижение величины холодового гемолиза после охлаждения от 37 до 0 °С. Полученные данные свидетельствуют, что в гипертонических средах развитие процессов, включенных в эффект Гардоша, ограничено, что можно объяснить «переключением» каналов утечки ионов K^+ на механизм, контролируемый мембранным потенциалом, который определяется градиентом анионов через мембрану эритроцитов.

1. Jung C. Y., Green F. A. Hypertonic cryohemolysis: ionophore and pH effects /J. Membrane Biol.— 1978.— 39, N 2.— P. 273—284.
2. Matsuyama H., Kawano Y., Hamasaki H. J. Anion transport activity in the human erythrocyte membrane modulated by proteolytic digestion of the 38 000 dalton

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

Поступило 23.04.85

УДК 577.37

А. В. Дегтярев

ТЕМПЕРАТУРНАЯ МОДИФИКАЦИЯ ПРОНИЦАЕМОСТИ ЛИПИДНЫХ ВЕЗИКУЛ В НЕРАВНОВЕСНЫХ ОСМОТИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ

Для исследования нарушений барьерной функции фосфолипидной мембраны при охлаждении ее в температурном интервале, не включающем зону фазовых переходов липидов, нами использованы везикулы из яичного лецитина, дицетилфосфата и холестерина в молярном соотношении 100 : 10 : 3, полученные по методу, описанному в [1], в 10 мМ *трис*-HCl буфере pH 7,5, содержащем 300 мМ сахарозы и 10 мМ дитиодинитродибензойной кислоты (ДТНБ). Качество липидов контролировали методом тонкослойной хроматографии. Проницаемость мембраны как функцию температуры и времени измеряли спектрофотометрически по выходу ДТНБ при длине волны 420 нм. Внешняя среда содержала 10 мМ восстановленный глутатион в качестве окрашивающего реагента для ДТНБ. Суспензию везикул быстро (за 20 мс) смешивали в соотношении 1 : 16 с внешним буфером, содержащим 10 мМ *трис*-HCl pH 7,5 и от 160 до 200 мМ NaCl. После окончания быстрой фазы осмотического ответа суспензию охлаждали от 22 до 0 °C со скоростью 3—6 град/мин, а затем отогревали до 22 °C со скоростью 6—8 град/мин.

Установлено, что кинетические кривые выхода маркера как функции температуры параметрически зависят от исходной концентрации NaCl во внешней среде. Это позволило построить зависимость критической температуры начала лизиса везикул ($T_{кр}$) от начальных осмотических условий. При этом выявлены следующие закономерности:

- в изоосмотических условиях лизис везикул начинается при снижении температуры на 10—12 °C относительно исходной величины (22 °C);

- при сдвиге исходных условий в сторону гипо- и гипертонии $T_{кр}$ смещается соответственно в сторону более высоких или более низких температур с эффективностью 0,48 град/мМ;

- в условиях умеренной гиперосмолярности (180—200 мМ NaCl) происходит спонтанный лизис везикул при постоянной начальной температуре на уровне 1—6 %, коррелирующий с исходной осмотической активностью везикул;

- выявлено, что величина суммарного выхода маркера в цикле охлаждения-нагрева обратно пропорционально связана с исходной осмолярностью внешней среды;

- между скоростью охлаждения, с одной стороны, и критической температурой и степенью лизиса, с другой стороны, не выявлено коррелятивной зависимости.

Наблюдаемые экспериментальные закономерности хорошо согласуются с представлениями о термоупругом поведении фосфолипидного бислоя при изменении температуры среды. В области гипоосмотических концентраций NaCl получено полуколичественное соответствие экспериментальных данных с предсказаниями математической модели, описывающей поведение бислоя при охлаждении в терминах термоупругости. В области гиперосмотических концентраций теоретические оценки зависимости $T_{кр}$ от внешней концентрации NaCl дают в 5—7 раз завышенную величину. Это можно объяснить тем, что в процессе сжатия везикулы теряют мембранный материал и частично захватывают ионы соли из внешней среды. Барьерная функция клеточных мембран может нарушаться по термоупругому механизму при охлаждении суспензии в условиях достаточно большой гипертонии, когда клетки достигают минимального объема. Такое предположение основано на том, что цитозоль при достижении клеткой мини-

мального объема переходит в состояние плотно упакованного геля, обладающего высокой вязкостью и практически несжимаемого. В то же время часть воды в клетке остается способной к самообмену с внешней средой, что может приводить к возникновению отрицательного гидростатического давления внутри клетки и «обжатию» цитогеля мембраной. В этих условиях должно выполняться неравенство:

$$\bar{T} \leq \frac{\Delta P}{\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2}},$$

где $\bar{T}$ — изотропное натяжение мембраны, а R_1 и R_2 — главные радиусы кривизны в исследуемой точке. Если отрицательное гидростатическое давление ΔP достаточно велико, т. е.

$$|\Delta P| \geq \frac{\nu (T_{кр} - T_0) (R_1 + R_2)}{R_1 \cdot R_2},$$

где $\nu = \left(\frac{\partial \bar{T}}{\partial T} \right)_\alpha$ для клеточной мембраны при постоянной площади, T_0 — начальная, а $T_{кр}$ — критическая температура, то проницаемость мембраны должна резко возрастать при охлаждении ее до $T_{кр}$:

$$T_{кр} = T_0 + \frac{\bar{T}_{кр}}{\nu},$$

где $T_{кр}$ — критическое изотропное натяжение клеточной мембраны. При этом барьерная функция мембраны должна нарушаться в первую очередь на участках с отрицательной кривизной.

1. Szoka F. J., Papahadjopoulos D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse phase evaporation // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1978. — 75, N 9. — P. 4194—4198.

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

Поступило 02.04.85

УДК 57.043 : 547.422 : 577.352.3

О. А. Семенченко

ВЛИЯНИЕ КРИОПРОТЕКТОРОВ НА СОХРАННОСТЬ МЕМБРАН ГЕПАТОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

В настоящее время возрос интерес к вопросу сохранения изолированных клеток печени, что связано с перспективой их использования в медицинской практике. Одним из предпочтительных методов длительного сохранения клеток печени в жизнеспособном состоянии может быть их криоконсервирование при ультранизких температурах [2, 3].

В настоящей работе на изолированных клетках печени изучено влияние криопротекторов полиэтиленоксида (ПЭО-400), диметилсульфоксида (ДМСО) и медленного замораживания на уровень сохранности их мембран. О степени нарушения проницаемости мембран гепатоцитов судили по выходу в среду замораживания некоторых ферментов (кислой фосфатазы, кислой рибонуклеазы), ионов K^+ и общего белка.

Опыты проводили на беспородных белых крысах-самцах массой 150—200 г. Гепатоциты выделяли модифицированным методом [1]. Свежевыделенные клетки оценивались микроскопически по степени окрашивания 0,2 %-ным раствором трипанового синего. В работе использовался лишь качественный по этому показателю материал.

Полученные осадки ресуспендировали в растворах ПЭО-400 и ДМСО (конечная концентрация 10 %), приготовленных на различных физиологических средах: 0,15 М NaCl, буфере Кребса-Рингера, растворе Хенкса, альбуминово-солевой среде и среде-199 (рН всех растворов 7,4). После получасовой экспозиции на холоде пробы замораживались со скоростью 2 °С/мин до —196 °С на промышленной установке. После отогрева

при 37 °С на водяной бане размороженные образцы и контрольные пробы центрифугировали в течение 2 мин при 1500 об/мин. В надосадках определяли активность кислой фосфатазы по методу Боданского, кислой рибонуклеазы по методу Баррета, общего белка и ионов K^+ .

Установлено, что медленное замораживание изолированных клеток печени в солевых средах различного состава без криопротекторов приводит к значительному повышению проницаемости мембран и выходу в среду замораживания ферментных белков (46—60 %), ионов K^+ (65—85 %) и общего белка до (6 мг/мл). Присутствие ПЭО-400 и ДМСО в среде инкубации гепатоцитов до замораживания не изменяло уровня изучаемых показателей по сравнению с контрольными измерениями. При медленном замораживании гепатоцитов в солевых средах с криопротекторами отмечается значительное уменьшение солюбилизации ферментов (24—40 %), ионов K^+ (34—42 %), общего белка (3,0—3,7 мг/мл). Четко проявляются различия в степени солюбилизации лизосомальных гидролаз в зависимости от примененного криопротектора. В случае применения ДМСО степень солюбилизации лизосомальных ферментов на 20—30% меньше по сравнению с ПЭО-400, что, по-видимому, связано с проникновением ДМСО внутрь клетки и стабилизацией внутриклеточных мембранных систем, в частности лизосом. Наиболее эффективной криозащитной средой является раствор, включающий 10 %-ный ДМСО и многокомпонентную среду-199.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о том, что медленное замораживание изолированных клеток печени в средах различного солевого состава приводит к элиминации в среду замораживания ферментных белков, ионов K^+ и общего белка. В основе солюбилизации биологически важных макромолекул и ионов лежит нарушение проницаемости мембран гепатоцитов под действием низкотемпературных факторов. Использование криопротективных веществ значительно повышает сохранность изолированных клеток печени.

1. Кравченко Л. П., Карева Л. В., Семенченко О. А., Коптелов В. А. Способ выделения изолированных гепатоцитов // Медико-технические, фармакологические и научные аспекты медицинской профилактики, диспансеризации и реабилитации.— Харьков: 1984.— С. 231.
2. Kusano M., Ebata H., Onishi T. et al. Transplantation of cryopreserved isolated hepatocytes into the rat spleen // Transplant. Proceed.— 1981.— XIII, N 1.— P. 848—854.
3. Le Cam A., Guillouzo A., Treychet P. Ultrastructural and biochemical studies of isolated adult rat hepatocytes prepared under hypoxic conditions. Cryopreservation of hepatocytes // Experimental Cell Res.— 1976.— 98, N 2.— P. 382—395.

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

Поступило 02.04.85

УДК 616—072.1+615 382.97 : 33—005.1

С. А. Павличенко, К. В. Шапатава, А. И. Дерман, А. В. Панов

ЭНДОСКОПИЧЕСКОЕ КРИОЭЛЕКТРОВООЗДЕЙСТВИЕ ПРИ ОСТРЫХ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНЫХ КРОВОТЕЧЕНИЯХ

В последние годы нашим институтом совместно со специалистами Ин-та проблем криобиологии и криомедицины АН УССР в клиническую практику внедрено использование метода сочетанного криоэлектровоздействия на источник острого желудочно-кишечного кровотечения (ОЖКК) при выполнении эндоскопического исследования.

Показанием к его выполнению служило обнаружение при эндоскопии признаков продолжающегося кровотечения или угрозы его рецидива (крупный тромбированный сосуд, большие размеры и преобладание деструктивных процессов в зоне источника ОЖКК).

Метод выполнен у 40 больных (28 мужчин, 12 женщин): в возрасте до 30 лет — 8 больных, 30—60 лет — 11, 60—70 лет — 9, старше 70 лет — 12 больных. Язвенная болезнь желудка и 12-перстной кишки была диагностирована у 20 больных, единичные острые язвы и эрозии желудка — у 8, синдром Маллори-Вейсса — у 7, кровоточащий

рак желудка — у 3, доброкачественные образования желудка (изъязвленные лейомиомы и полипы) — у 2 больных.

Манипуляция выполнялась через проведенный в биопсийный канал эндоскопа двухпросветный зонд оригинальной конструкции, один из просветов которого использовался для подведения жидкого фреона, а второй содержал электрод для электрокоагуляции. Криоэлектровоздействие проводилось с экспозицией в 30—60 с с последующим 5—7-минутным визуальным контролем за достижением гемостаза.

У всех больных применение данного метода позволило добиться непосредственного гемостаза. У 7 больных (17,5 %) в сроки от 4 ч до 3 сут развился рецидив кровотечения, что потребовало проведения срочного хирургического вмешательства.

Наиболее благоприятные результаты (отсутствие рецидива ОЖКК) получены у больных с кровотечением на почве острого эрозивно-язвенного гастрита, синдрома Маллори-Вейсса, с изъязвленными доброкачественными новообразованиями желудка. У пациентов с кровотечениями из крупных сосудов, расположенных в дне кратера язвы, а также с распадающимися злокачественными новообразованиями желудка метод был менее эффективным, возрастала вероятность развития рецидива ОЖКК.

Время, прошедшее с момента достижения гемостаза у больных с рецидивами ОЖКК, было использовано для проведения восполнения кровопотери, коррекции показателей белкового, электролитного, кислотно-щелочного обмена, стабилизации гемодинамических параметров. Дальнейшее использование метода криоэлектрокоагуляции при эндоскопии и обобщение полученных результатов позволят выработать четкие показания для его выполнения, что будет способствовать улучшению результатов лечения больных с ОЖКК различного генеза.

Харьковский НИИ общей
и неотложной хирургии

Поступило 02.04.85

УДК 612.822.1 : 615.832.9

М. И. Шифман, В. С. Марченко

СЕКРЕЦИЯ НЕЙРОМЕДИАТОРОВ В ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ В УСЛОВИЯХ ГИПОТЕРМИИ

Снижение температуры гомойотермных организмов приводит к терморегуляторным реакциям, главную роль в которых играет гипоталамическая область мозга. Установлено, что в функционировании гипоталамических центров терморегуляции важную роль играют норадренергические и серотонинергические системы.

Для изучения механизмов действия краниocereбральной гипотермии (КЦГ) на секрецию нейромедиаторов была использована методика получения фракции изолированных синапсов — синаптосом. Крыс линии Вистар (масса 180—200 г) охлаждали в установке, разработанной в Ин-те проблем криобиологии и криомедицины АН УССР. После охлаждения крыс декапитировали, извлекали гипоталамус и по методу Хайоша получали синаптосомы. Секрецию ^3H -норадреналина (^3H -НА) и ^3H -серотонина (^3H -СТ) изучали по методу К. Котмана. Используемый в работе наркоз (тиопентал натрия и гамма-оксимасляная кислота (ГОМК)) подавляет секрецию ^3H -НА и ^3H -СТ. На начальном этапе охлаждения (первые 15 мин) и особенно на уровне 34 °С (ректальная температура) происходит активация секреции ^3H -НА на 50 и 104 % соответственно. Секреция ^3H -СТ ингибируется в этих же условиях на 35 и 50 %. КЦГ до ректальной температуры 30 °С ингибирует секрецию как ^3H -НА, так и ^3H -СТ на 52 и 80 %.

Было показано, что внутригипоталамические инъекции норадреналина и серотонина приводят к изменению температуры тела. По характеру ответов на инъекции всех изученных экспериментальных животных можно разделить на 2 группы. У 1-й группы (кошка, собака, обезьяна) инъекции серотонина приводят к гипертермии, а у 2-й группы (кролик, овца, мышь, крыса, бык, коза) — к гипотермии. Введение норадреналина вызывает гипертермию у животных 1-й группы и гипотермию — у животных 2-й группы. Следовательно, охлаждение животного должно приводить к повышению секреции в гипоталамусе того нейромедиатора, который при внутри-

гипоталамических инъекциях вызывает гипертермию. И, наоборот, охлаждение должно ингибировать секрецию нейромедиатора, вызывающего гипотермию. С этих позиций становится ясным наблюдаемое в наших опытах усиление секреции ^3H -НА на начальных этапах гипотермии и при действии КЦГ (34 °C) и ингибирование секреции ^3H -СТ.

В следующей серии экспериментов изучали секрецию ^3H -НА *in vivo* гипоталамусом при помощи «push-pull»-канюли. В передний гипоталамус по стереотаксическим координатам инъецировали 5 мкл ^3H -НА и после 20-минутного периода инкубации начинали перфузию со скоростью 40 мкл/мин. В течение опыта через каждые 15 мин собирали фракции перфузата, в которых определяли ^3H -НА, используя счетчик «Intertechnique SL—40». Охлаждение проводили, используя пары азота. КЦГ в первые 20 мин охлаждения приводит к резкому (в 9—9,5 раза) возрастанию уровня секреции ^3H -НА.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о ведущей роли моноаминов в терморегуляции и раскрывают нейромедиаторные механизмы действия КЦГ на центральные системы терморегуляции.

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

Поступило 02.04.85

РЕЦЕНЗИЯ

Механизмы биохимических изменений при низких температурах тела/
Э. З. Эмирбеков, С. П. Львова — Изд-во Ростовского ун-та.—1985.—79 с.

Книга Э. З. Эмирбекова и С. П. Львовой посвящена изучению уникального свойства теплокровных животных приспосабливаться к пониженной температуре среды путем снижения метаболизма и собственной температуры тела. Это эволюционно детерминированное качество, повышающее устойчивость организма к экстремальным факторам, является зимней спячкой, представляющей собой один из видов гипотермии. Авторы посвятили свой труд исследованию метаболизма центральной нервной системы, формирующей гомеостатические реакции у гипотермированных и гибернирующих животных.

Большой интерес представляют установленные авторами монографии факты изменения фонда свободных аминокислот мозга, функциональных групп белков, дискоординации процессов синтеза нейротрансмиттеров, глутаминазы, глутаминсинтетазы и других ферментов при гипотермической патологии. Ферментам зимоспящих животных свойственна высокая активность, которую авторы связывают с изменениями в клеточных мембранах. По их мнению, лабильность и высокая активность аммиака является одним из важнейших звеньев в механизме, обеспечивающем пластичность мозга при реакциях приспособления к холоду.

Определенный научный интерес представляет предположение, согласно которому в организме спящих и пробуждающихся животных важным является взаимоотношение нейромедиаторных и белковых систем, что подтверждается наличием в крови и мозгу веществ пептидной природы, участвующих в индукции зимней спячки и обладающих гипногенными свойствами.

Книга представляет интерес для широкого круга ученых, занимающихся вопросами изучения механизмов гомеостаза охлажденного организма, его резистентности к низким температурам. Фактический материал монографии является ценным для дальнейших исследований и изысканий путей возможной коррекции нарушений, возникающих после действия холода на организм.

Г. А. Бабийчук

**СОВЕЩАНИЕ «КОНСЕРВАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ»
(г. ПУЩИНО, МОСК. ОБЛ., МАРТ 1986 г.)**

Ежегодное совещание по вопросам консервации генетических ресурсов проходило с 4 по 6 марта 1986 г. в Институте биологической физики АН СССР (г. Пущино, Моск. обл.). В его работе приняли участие ученые Москвы, Ленинграда, Харькова, других городов страны.

Профессор Б. Н. Вепринцев в своем выступлении подчеркнул, что хозяйственная деятельность человека остро поставила вопрос сохранения природных ресурсов в районах активного их освоения.

Член-корреспондент АН УССР В. И. Грищенко изложил современные научные взгляды на проблему сохранения генофонда человека, указал на факторы, неблагоприятно влияющие на сохранность генома: алкоголь, лекарственные препараты, физические воздействия, в том числе ионизирующую радиацию, являющуюся причиной вредных мутаций. Были также рассмотрены вопросы о значении антимутагенов и медико-генетического консультирования, о сохранении «семейного» генофонда, использовании нативных и криоконсервированных спермиев для инсеминации, о проблеме экстракорпорального оплодотворения, криоконсервации и трансплантации эмбрионов.

А. М. Малащенко рассказал о создании криоэмбриотеки — генетической коллекции мышей, которые могут быть использованы в экспериментальной генетике для поиска и коллекционирования мутантов, чувствительных к мутагенам разных классов, канцерогенам, и изучения возможных корреляций между дефектами энзимов, мутагенностью и предрасположенностью к раку.

Было доложено о поиске новых методов оценки жизнеспособности эмбрионов (Ю. А. Лабас). Это установление 4—6-минутной циклики мембраны и бластомеров в икринках щуки (у окуня и карпа она отсутствует), использование высокочувствительных тепловых датчиков, определение околочлеточных электрических градиентов, определение дзета-потенциалов фиксированного заряда поверхности клетки.

Некоторые аспекты биотехнологии, научной генетики и генной инженерии были затронуты в выступлении профессора А. А. Нейфаха. Обращалось внимание на опасность, вызванную потерей генетического стандарта в результате так называемого дрейфа генов. Сообщалось об успешном введении гена гормона роста в промоторный участок его молекулы, что имеет важное практическое значение.

Вопросам криоконсервации спермы сельскохозяйственных животных (В. А. Наук) и теоретическим аспектам криоконсервации зародышей млекопитающих (Н. Д. Безуглый) были посвящены два доклада. Интересные сообщения касались изучения криопротективной активности веществ ряда амидов (А. Н. Новиков, Т. П. Линник) и действию криопротекторов на ионные каналы биомембран (лаборатория Б. Н. Вепринцева). Заслушаны несколько докладов по вопросам экологии, криоконсервации спермы птиц, рыб, млекопитающих редких и исчезающих видов.

На заседании «круглого стола» по вопросам криоконсервации ооцитов и эритроцитов обсуждались вопросы овогенеза, культивирования, способы криоконсервации. Большое внимание было уделено теоретическим вопросам криоконсервации ооцитов и эмбрионов.

На совещании было принято решение о создании межотраслевой лаборатории по криоконсервации ооцитов, эмбрионов, спермы, гонад, соматических клеток и все-союзного банка хранения геномов.

Ф. В. Дахно

**ВСЕСОЮЗНЫЙ СИМПОЗИУМ «СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ
ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ В БИОЛОГИИ
И МЕДИЦИНЕ» (г. ЗВЕНИГОРОД, АПРЕЛЬ 1986 г.)**

24—26 апреля 1986 г. в г. Звенигороде состоялся Всесоюзный симпозиум «Современные методы электронной микроскопии в биологии и медицине», организованный Научным советом АН СССР по электронной микроскопии. На симпозиуме рассматривались проблемы разработки и использования новых методов препарирования и анали-

за медико-биологических объектов: макромолекул, вирусов, микроорганизмов, различных клеток и тканей. Пленарные доклады по использованию методов электронной микроскопии в различных областях науки были представлены проф. Райхлиным Н. Т. (онкология), Делекторским В. В. (дерматология), Бирюзовой В. И. и Поповым В. Л. (микробиология), Быковским А. Ф., Клименко С. М. (вирусология). О методах обработки электронно-микроскопических изображений биомacroмолекул были представлены сообщения Е. В. Орловой и М. Б. Шермана (Ин-т кристаллографии АН СССР). Большие группы работ были посвящены иммунной электронной микроскопии (Б. П. Уланов, А. Ф. Кротова, М. Б. Королев и др.), а также выбору оптимальных подходов и артефактам электронно-микроскопического изучения биологических структур (проф. А. Ф. Быковский, Н. В. Белицер и др.). Низкие температуры и как объект изучения, и как метод анализа структуры явились предметом изучения многих исследователей. Новые данные о структурных компонентах мембран были получены с использованием метода замораживания-скалывания Я. Ю. Комисарчиком, В. И. Романовым (Ин-т цитологии АН СССР), А. И. Раппопортом (Ин-т микробиологии АН Латв ССР). Сообщение о новых технических средствах препарирования клеток и тканей, используемых в рутинных электронно-микроскопических исследованиях, в том числе и криобиологических, представили А. С. Капрельянц, Л. Н. Марченко (Ин-т проблем криобиологии и криомедицины АН УССР. Работы Т. Н. Юрченко, Г. Ф. Жегунова, Н. В. Репина, Т. П. Говорухи (ИПКК АН УССР) были посвящены изучению влияния охлаждения на различные субклеточные элементы клеток и тканей.

А. С. Капрельянц

IV ВСЕСОЮЗНЫЙ СИМПОЗИУМ «РЕГУЛЯЦИЯ ИММУННОГО ГОМЕОСТАЗА» (г. СУЗДАЛЬ, МАЙ 1986 г.)

В мае 1986 г. в г. Суздале состоялся IV Всесоюзный симпозиум «Регуляция иммунного гомеостаза», организованный научным советом АН и АМН СССР по физиологии человека и профильными учреждениями. В работе симпозиума приняли участие иммунологи, физиологи, патофизиологи, нейрофизиологи.

Основная тематика представленных докладов была посвящена проблеме изучения эндокринной и нейро-гуморальной регуляции функции иммунной системы, роли нейромедиаторных факторов и регуляторных пептидов в модуляции защитных сил организма.

В программных докладах Е. А. Корневой и Р. В. Петрова были освещены вопросы изучения нервных, эндокринных, нейромедиаторных механизмов регуляции защитных реакций в норме и патологии, способов их нейрогуморальной и фармакологической коррекции, показана динамика вовлечения глубоких структур мозга в ходе реализации реакции на антиген, выявлена зависимость интенсивности и динамики электрофизиологических изменений в мозге от силы специфического антигенного воздействия.

Новые данные о роли эндогенных опиоидов в регуляции иммунологических реакций представлены в докладе А. А. Зозули. Показано, что интенсивность, характер протекания сложных межклеточных взаимодействий в процессе формирования иммунного ответа регулируются общими для всего организма группами биологически активных веществ, среди которых важное место занимают опиоиды — низкомолекулярные пептиды центрального происхождения.

Результаты экспериментального изучения свойств костномозговых иммуnoreгуляторов — миелопептидов, свидетельствующие о том, что миелопептиды обладают широким спектром биологических активностей и, по-видимому, принимают участие в межклеточных взаимодействиях, были представлены А. А. Михайловой.

В ряде докладов (Девойно Л. В., Гущина Г. В., Захаровой Л. А., Зозули А. А.) сообщалось о наличии на иммунокомпетентных клетках опиатных рецепторов, для которых лигандами являются гуморальные субстанции центрального происхождения.

А. Н. Гольцев, Н. Н. Попов

ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИЙ

В специализированном совете при Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР в 1985 г. защищена диссертационная работа на соискание ученой степени доктора медицинских наук С. О. Табергеновым на тему: «Функциональные и метаболические эффекты гормонов щитовидной железы и катехоламинов и их взаимоотношения в регуляции энергетического обмена». Работа посвящена комплексному изучению механизма действия тиреоидных гормонов и катехоламинов, значимости метаболизма гормонов и адрено-тиреоидного взаимодействия на разных уровнях в регуляции энергетического обмена в норме и при нейрогенном стрессе с дистрофическими поражениями миокарда. Сформулировано положение об адренотиреоидной системе как нейро-гуморальном звене, осуществляющем регуляцию биоэнергетикой физиологических функций и механизмов адаптации.

На соискание ученой степени кандидата биологических наук защищена работа А. Ю. Семенченко «Изучение структуры и проницаемости мембран эритроцитов человека и митохондрий печени крысы при охлаждении до субнулевых температур». Обнаружено, что в процессе модификации структуры мембран митохондрий под влиянием гипертонического стресса в интервале температур $0 \div -20^\circ\text{C}$ наблюдается сходство в характере температурной зависимости таких процессов, как формирование фрагментов мембран и изменение свободной активности малатдегидрогеназы.

В исследовании С. В. Малышкиной «Структурно-метаболические изменения суставного хряща после локального криовоздействия» на соискание ученой степени кандидата биологических наук найдены режимы криовоздействия, позволяющие получить криодеструктивные изменения, локализованные только в суставном хряще или распространяющиеся на субхондральную кость. Установлено, что ультраструктурные изменения клеток в участке непосредственного контакта хряща с хладагентом характеризуются полной деструкцией всех клеточных органоидов. Действие низких температур нарушает макромолекулярную организацию межклеточного вещества. Степень и скорость этих изменений зависит от температуры, экспозиции криовоздействия и природы макромолекул.

Защищены диссертационные работы на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. В исследовании Ю. В. Кононова «Низкотемпературное консервирование эритроцитов в отделениях долгосрочного хранения крови» обосновано требование тщательного предварительного тестирования эритроцитов, предназначенных для длительного хранения, по системе резус, а также на наличие маркеров вирусного гепатита В. Разработаны технические средства, обеспечивающие механизацию отдельных этапов криоконсервирования клеток крови.

В работе Ю. И. Пономарева «Криоконсервирование трансплантатов аортальных клапанов» разработана технологическая последовательность криоконсервирования цельных трансплантатов аортальных клапанов, соблюдение которой позволяет сохранить жизнеспособность и биологические характеристики клапанов на уровне нативных образцов.

В исследовании А. С. Журавлева «Дозированные локальные криохирургические воздействия в лечении больных хроническим тонзиллитом» определена взаимосвязь между объемом некротизации ткани миндалин после локальных криовоздействий и выраженностью иммунологических сдвигов в организме больных хроническим тонзиллитом. Разработан новый метод лечения — курс точечных криовоздействий, для реализации которого разработаны криоаппликатор оториноларингологический КМ-22 и криозонд.

УДК 541.117.127: 128.12.132.4

Формирование замороженных образцов и кинетика реакций при низких температурах / Сергеев Г. Б., Сергеев Б. М., Батюк В. А., Громченко И. А. // Криобиология. — 1986. — № 4. — С. 5—10.

Обобщены результаты исследований некоторых модельных химических реакций в замороженных водных гетерофазных системах. Установлено, что основными факторами, влияющими на скорость процессов, являются фазовое состояние замороженных образцов и физико-химические свойства среды реакции. Предложено использовать кинетические параметры модельных реакций для оценки динамики изменения структурно-химического состояния замороженных объектов при низких температурах. Ил. 5. Библиогр. 11 назв.

УДК 576.593.17

Системное направление в криобиологии / Лозина-Лозинский Л. К., Успенская З. И. // Криобиология. — 1986. — № 4. — С. 10—16.

В работе выделены некоторые вопросы и явления в общей проблеме криоповреждений, имеющие отношение к теоретическим основам криобиологии. Дан анализ наиболее известных криоповреждений и вызывающих их внешних условий. Представлены данные, показывающие, что объектом первичных клеточных нарушений являются мембраны. Они ответственны за репарацию повреждений после цикла охлаждения-замораживание-отогревание. Библиогр. 12 назв.

УДК 57.43: 612.43

Захват и органификация иодидов после замораживания щитовидной железы с димексидом / Утевский А. М., Чуйко В. А., Беркало Л. В., Македонская В. А. // Криобиология. — 1986. — № 4. — С. 16—18.

Изучалось влияние замораживания до -196°C и димексида на процессы иодаккумуляции и органификации в ткани щитовидной железы. Показано, что замораживание без криопротектора снижает активность захвата иодида, в то время как его включение в белки тиреоидной паренхимы увеличивается. Димексид оказывает незначительное влияние на данные процессы. Замораживание с 10 %-ным димексидом на 75 % сохраняет захват иодида и незначительно стимулирует включение его в белки щитовидной железы. Хранение тиреоидной паренхимы в течение 6—12 мес при -196°C обеспечивает способность к органификации иодида. Табл. 3. Библиогр. 2 назв.

УДК 57.043.615.9

Исследование токсичности 1,2-пропандиола и глицерина для крыс в постнатальном онтогенезе / Гучок В. М. // Криобиология. — 1986. — № 4. — С. 18—20.

Установлено, что белые крысы в раннем постнатальном онтогенезе, как и взрослые животные, более резистентны к однократному воздействию больших доз 1,2-ПД, чем глицерина. Токсичность глицерина для крыс с возрастом постепенно повышается по сравнению с токсичностью 1,2-ПД. Ил. 1. Табл. 2. Библиогр. 4 назв.

УДК 57.043

Аденилатциклазная система печени крыс при холодовом воздействии / Золочевская Л. И. // Криобиология. — 1986. — № 4. — С. 20—23.

В работе исследовали содержание циклических нуклеотидов и активность ферментов синтеза и гидролиза цАМФ (аденилатциклазы и фосфодиэстеразы) в печени крыс на 1, 3, 9 и 30-е сут пребывания животных в холодовой камере (от 4 до 6 °С). На ранних этапах холодового воздействия (1-е и 3-и сут) обнаружено увеличение содержания циклических нуклеотидов, повышение базальной активности аденилатциклазы и снижение степени активации фермента фторидом и адреналином. Блокатор β -рецепторов пропранолол снимал активирующее действие адреналина и норадреналина на аденилатциклазу. Активность фосфодиэстеразы во все исследуемые сроки не отличалась от контрольной. Полученные результаты свидетельствуют об участии аденилатциклазной системы печени крыс в механизме защитно-приспособительной реакции на холод. Табл. 2. Библиогр. 8 назв.

УДК 577.3: 612.111.014.41

Влияние экранирования геомагнитного поля на эритроциты в процессе хранения при температуре 4 °С. / Стусь Л. К., Куракса В. М. // Криобиология. — 1986. — № 4. — С. 23—24.

Гипотермическое хранение консервированной крови в условиях экранирования геомагнитного поля не ухудшает свойств консервированных эритроцитов в указанные сроки. Ил. 2. Библиогр. 3 назв.

УДК 536.421.4 : 532.77

Физические состояния системы вода-этиленгликоль по данным дифференциальной сканирующей калориметрии / Зинченко А. В., Моисеев В. А. // Криобиология. — 1986. — № 4. — С. 25—28.

Система вода-этиленгликоль (ЭГ) исследована методом дифференциальной сканирующей калориметрии в диапазоне температур от 77 до 273 К в режиме нагрева со скоростью $6,67 \cdot 10^{-3} \text{ К} \cdot \text{с}^{-1}$ после быстрого ($16 \text{ К} \cdot \text{с}^{-1}$) и медленного ($3,3 \cdot 10^{-3} \text{ К} \cdot \text{с}^{-1}$) охлаждения от 300 до 77 К. Метастабильные состояния системы различны после охлаждения с различными скоростями. Измерены концентрационные зависимости температур стеклования и кристаллизации из переохлажденного состояния. Построены диаграммы физических состояний системы вода-ЭГ. Ил. 4. Библиограф. 5 назв.

УДК 616:612.616:547.963.3:57.043:616.69— 088.8

Нуклеиновые кислоты спермиев человека при криоконсервации и некоторой патологии / Паращук Ю. С., Смаглий Н. Ю. // Криобиология. — 1986, № 4. — С. 28—30.

Представлены результаты определения содержания ДНК и РНК в нормальной сперме человека до и после криоконсервации и в нативной сперме при некоторой патологии: олиго-, астено-и тератоспермии. Показано, что криоконсервирование существенно не влияет на содержание нуклеиновых кислот в нормальной сперме человека, а при патологии отмечается достоверное снижение содержания ДНК и увеличение соотношения РНК/ДНК. Предлагается использовать определение количества ДНК и соотношение нуклеиновых кислот в качестве тестов, указывающих на полноценность, а следовательно, и оплодотворяющие свойства эякулятов. Табл. 1. Библиогр.: 7 назв.

УДК 615.2/3—616.5.001—615.832.93

Низкотемпературное лечение в дерматологии лекарственной болезни, холодовой аллергии и крапивницы / Солошенко Э. Н. // Криобиология. — 1986. — № 4. — С. 30—32.

Представлены результаты изучения эффективности терапии у 22 больных лекарственной болезнью, холодовой аллергией и крапивницей способом локальной гипотермии с одновременным парентеральным введением гистаглобина. Анализ данных клинических наблюдений и иммунологических исследований свидетельствует о перспективности указанного способа, что позволяет его рекомендовать как метод выбора терапии для больных лекарственной болезнью с полисенсibilизацией, особенно при сочетанном течении лекарственной болезни и холодовой аллергии. Библиогр. 3 назв.

УДК 57.043:53.082.7

Характер кристаллизационных процессов в замораживаемых органах / Шпиченецкий В. Я., Унксов М. Е., Иванов А. Г., Кирпатовский В. И., Онищенко Н. А. // Криобиология. — 1986. — № 4. — С. 32—36.

Описана методика исследования кристаллизационных процессов в органе путем снятия зависимостей угла диэлектрических потерь в разных зонах органа от времени замораживания путем введения в эти зоны игольчатых коаксиальных электродов. Получены зависимости параметров кристаллизации в разных зонах органа от скорости охлаждения. Показано, что наиболее равномерное замораживание происходит в режиме минимального запаздывания и наибольшего соответствия кристаллизационных процессов, определяемых зависимостями параметров кристаллизации. Ил. 2. Библиогр. 2 назв.

УДК 541.128:547.962

Особенности кинетики ферментативных реакций в среде вязких органических растворителей / Осецкий А. И. // Криобиология. — 1986. — № 4. — С. 36—42.

На основании модели «обратимо диссипирующих подсистем» получено соотношение для определения эффективной энергии активации не диффузионно-контролируемых ферментативных реакций. Показано, что кроме параметров, характеризующих потенциальный барьер реакции, в нее может входить слагаемое, отражающее влияние вязкости среды на процесс флуктуационного преодоления этого барьера. Проведено сопоставление известных экспериментальных данных о влиянии вязких криопротекторов на ферментативный катализ и конформационную подвижность биомолекул с полученными в работе результатами. Обсуждены перспективы исследования флуктуационно-диссипативных эффектов в различных биологических системах. Ил. 3. Библиогр. 7 назв.

UDC 541.117.127:128.12.132.4

The formation of frozen specimens and kinetics of reactions at low temperatures / Sergeyev G. B., Sergeyev B. M., Batyuk V. A., Gromchenko I. A. // Kriobiologiya. — 1986. — N 4. — P. 5—10.

The results of studies on the kinetics of some model chemical reactions in frozen heterogenous aqueous systems are presented. The phase state of frozen specimens and physico-chemical properties of the reaction medium have been found to be the main factors affecting the rate of the processes. The kinetic parameters of model reactions were proposed to be used for estimation of the dynamics of structural and chemical changes in the state of frozen systems at low temperatures. 5 figs. Refs.: 11 titles.

UDC 576.593.17

The system trend in cryobiology / Lozina-Lozinsky L. K., Uspenskaya Z. I. // Kriobiologiya. — 1986. — N 4. — P. 10—16.

Some problems and phenomena of cryogenesis dealing with theoretical fundamentals of cryobiology are considered. The main factors which cause cryodamage have been analyzed. The data indicating that membranes are the primary site of injury to cells are presented. Membranes seem to be responsible for the repair after damage caused by cooling-freezing-thawing. The investigation of this process requires more attention than it has been paid to until recently. Refs.: 12 titles

UDC 57.043: 612.43

Uptake and organification of iodides after freezing thyroid glands using dimexide / Utevsky A. M., Chuyko V. A., Berkalo L. V., Makedonskaya V. A. // Kriobiologiya. — 1986. — N 4. — P. 16—18.

The effect of freezing to -196°C and dimexide on the iodine accumulation and organification in thyroid tissue was studied. It has been shown that freezing without cryoprotectant decreases the activity of iodine uptake and increases the iodine incorporation into thyroid parenchyme proteins, dimexide affects these processes but insignificantly. Freezing with dimexide maintained the iodine uptake by 75% and slightly stimulated the incorporation of iodine into thyroid proteins. The ability to iodine organification seems to be maintained during storage at -196°C for 12 months. 3 tables. Refs.: 2 titles

UDC 57.043.615.9

Investigation of toxicity of 1,2-propane diol and glycerol for young rats // Guchok V. M. // Kriobiologiya.— 1986.— N 4.— P. 18—20.

White rats in postnatal ontogeny as well as adults have been found to be more resistant to the effect of high single dose of 1,2-propane diol than to that of glycerol. 1 fig. 2 tables. Refs.: 4 titles

UDC 57.043

The effect of cold on the rat liver adenylate cyclase system / Zolochetskaya L. I. // Kriobiologiya.— 1986.— N 4.— P. 20—23.

The content of cyclic nucleotides and the activity of cAMP synthesis and hydrolysis enzymes (adenylate cyclase and phosphodiesterase) in rat liver on the 1st, 3rd, 9th and 30th days of animal exposure to cold in a cooling chamber (4 to 6 °C) were studied. At early stages of cold exposure (the 1st and 3rd days) an increase in the cyclic nucleotide content, in the adenylate cyclase basal activity and a decrease in the degree of fluoride and adrenaline activation of the enzyme have been found. A blocker of β -receptors propranol removed the activation effect of adrenaline and noradrenaline on adenylate cyclase. The phosphodiesterase activity was similar to the control one during a whole period of observation. The results obtained indicate that the rat liver adenylate cyclase system is involved in the mechanism of protective-adaptive response to cold. 2 tables. Refs. 8 titles

UDC 577.3:612.111.014.41

The effect of screening the geomagnetic field on erythrocytes during storage at subzero temperatures / Stus L. K., Kuraksa V. M. // Kriobiologiya.— 1986.— N 4.— P. 23—24.

The properties of cryopreserved erythrocytes are shown to be maintained during storage under conditions of screening the geomagnetic field. 1 fig. Refs.: 3 titles

UDC 536.421.4.532.77

The physical state of water-ethylene glycol system studied by differential scanning calorimetry / Zinchenko A. V., Moiseyev V. A. // Kriobiologiya.— 1986.— N 4.— P. 25—28.

The water-ethylene glycol system was studied using differential scanning calorimetry in a temperature range of 77 to 273 K after rapid ($16 \text{ K} \cdot \text{s}^{-1}$) and slow ($3.3 \cdot 10^{-3} \text{ K} \cdot \text{s}^{-1}$) cooling from 300 to 77 K and warming at a rate of $6.67 \cdot 10^{-3} \text{ K} \cdot \text{s}^{-1}$. Metastable conditions of the system appeared to be different after cooling at various rates. The temperature dependencies of the vitrification and crystallization after supercooling on the concentration are measured. The diagrams of physical states of the water-ethylene glycol system are presented. 4 figs. Refs. 5 titles

UDC 616: 612.616: 547.963.3: 57.043:616.69—008.8

Nucleic acids of human spermatozoa upon cryopreservation and in pathologic conditions / Parashchuk Yu. S., Smaglyi N. Yu. // Kriobiologiya.— 1986.— N 4.— P. 28—30.

The contents of DNA and RNA in normal human sperm before and after cryopreservation as well as in pathologic conditions, that is oligo-, asteno- and teratospermy are determined. Cryopreservation has been shown to affect the content of nucleic acids in human sperm but insignificantly. Decreasing the DNA content and increasing the RNA/DNA ratio were observed in pathologic sperm. The determination of DNA content and the ratio of nucleic acids can be used as a test for fertilization capacity of ejaculates and maintenance of the spermatozoon nucleus. 1 table. Refs. 7 titles

UDC 615.2/3—616.5.001—615.832.93

The usage of low temperatures in dermatology for treating patients with drug diseases, cold allergy and urticaria / Soloshenko E. N. // Kriobiologiya.— 1986.— N 4.— P. 30—32.

The efficiency of treating 22 patients with drug disease, cold allergy and urticaria by local cryoapplication and simultaneous parenteral administration of histoglobulin was studied. The analysis of clinical and immunologic data indicated that the proposed technique can be recommended as a method of choice for treating patients with drug diseases and polysensitization, in particular in cases of combined drug disease and cold allergy. Refs. 3 titles

UDC 57.043:53.082.7

The character of crystallization processes in frozen organs / Shpichenetsky B. Ya, Unksov M. E., Ivanov A. G., Kirpatovsky V. I., Onishchenko N. A. // Kriobiologiya.— 1986.— N 4.— P. 32—36.

The method of investigation of crystallization processes by measurement of the dependence of dielectric loss angle in different areas of the organ upon freezing time using coaxial needle electrodes introduced into these areas. The dependences of crystallization parameters in different organ areas on cooling rates are obtained. The most uniform freezing has been shown to occur in the regimen of minimum delay and maximum correspondance of crystallization processes which are determined by the dependences of crystallization parameters. 2. figs. Refs. 2 titles

UDC 541.128:547.962

Peculiarities of the kinetics of enzyme reactions in a medium of viscous organic solvents / Osetsky A. I. // Kriobiologiya.— 1986.— N 4.— P. 36—42.

The relationship for the effective activation energy in non-diffusively controlled enzyme reactions has been obtained using a model of reversibly dissipation subsystems. In addition to parameters which describe the reaction potential barrier, an addendum indicating the effect of medium viscosity on crossing the barrier can be included. The results obtained are compared with known experimental data on the effect of viscous cryoprotectants on the enzyme catalysis and conformational mobility of biomolecules. The perspectives of studies on the fluctuation and dissipation effects in different biological systems are discussed. 3. figs. Refs.: 7 titles

65 к.

70474

Наукова думка
Криобиология.—1986.—№ 4.—С.1—56